(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-521025
(P2024-521025A)
(43)公表日　令和6年5月28日(2024.5.28)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｎ	*15/86 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/86	Ｚ	４Ｃ０８７
Ｃ１２Ｎ	*15/867(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/867	Ｚ	
Ａ６１Ｋ	*35/15 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/15		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全48頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-568170(P2023-568170)
(86)(22)出願日　令和4年5月19日(2022.5.19)
(85)翻訳文提出日　令和5年11月3日(2023.11.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/030109
(87)国際公開番号　WO2022/246112
(87)国際公開日　令和4年11月24日(2022.11.24)
(31)優先権主張番号　63/190,387
(32)優先日　令和3年5月19日(2021.5.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　592048844
ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９００１５ ロサンゼルス スイート ２３００ オリーブ ストリート １１５０ エス．
(74)代理人　110003007
弁理士法人謝国際特許商標事務所
(72)発明者　イン、チーロン
アメリカ合衆国 ９００３３ カリフォルニア州、ロサンゼルス、ビーシーシー５１２、１４２５ サン パブロ スロリート、ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア、ケック スクール オブ メディシン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　がん免疫治療のためのキメラ抗原受容体で改変された顆粒球－マクロファージ前駆体

(57)【要約】
本開示は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように顆粒球－マクロファージ前駆体（ＧＭＰ）を遺伝子操作する方法、およびがん免疫治療のためを含む、その使用を提供する。特定の実施形態では、本開示は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するようにＧＭＰを遺伝子操作する方法であって、ＣＡＲを含むベクターをＧＭＰ中に導入して、ＣＡＲを発現するＧＭＰ（ＣＡＲ－ＧＭＰ）を形成するステップ；ＣＡＲ－ＧＭＰを、規定された培養条件において複数回の継代にわたって拡大増殖および培養して、ＣＡＲ－ＧＭＰの集団を生成するステップ；およびＣＡＲ－ＧＭＰの集団を、顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞に分化するようにｉｎ ｖｉｔｒｏで誘導するステップであって、顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞がＣＡＲを発現する、ステップ、を含む方法を提供する。
【選択図】図５Ｃ

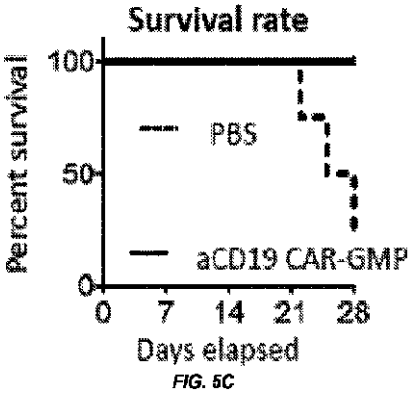


FIG. 5C

【特許請求の範囲】
【請求項１】
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように顆粒球－マクロファージ前駆体（ＧＭＰ）を遺伝子操作する方法であって、
ＣＡＲを含むベクターをＧＭＰ中に導入して、ＣＡＲを発現するＧＭＰ（ＣＡＲ－ＧＭＰ）を形成するステップ；
前記ＣＡＲ－ＧＭＰを、規定された培養条件において複数回の継代にわたって拡大増殖および培養して、ＣＡＲ－ＧＭＰの集団を生成するステップ；および
ＣＡＲ－ＧＭＰの前記集団を、顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞に分化するようにｉｎ　ｖｉｔｒｏで誘導するステップであって、前記顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞がＣＡＲを発現する、ステップ
を含む、方法。
【請求項２】
前記ＧＭＰが幹細胞から得られる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記幹細胞が造血幹細胞である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記造血幹細胞が、対象の骨髄から単離される、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記対象が哺乳動物対象である、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記対象がヒト患者である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記ＣＡＲが、抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞の抗腫瘍活性を、それらの貪食および／または炎症促進性サイトカイン分泌を増加させることによって増加させるように設計された少なくとも１つの細胞内ドメインを含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記ベクターがウイルスベクターである、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記ウイルスベクターが、複製性または非複製性であり得、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、麻疹ベクター、ヘルペスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、レオウイルスベクター、セネカバレーウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、パルボウイルスベクターまたはアルファウイルスベクターであり得る、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記規定された培養条件が、前記ＣＡＲ－ＧＭＰを、
（ｉ）増殖因子、
（ｉｉ）Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤、ならびに
（ｉｉｉ）Ｗｎｔ活性化因子および／またはＧＳＫ－３阻害剤
を含む培養培地中で培養することを含み、前記ＣＡＲ－ＧＭＰが、複数回の細胞継代および／またはクローン性拡大増殖を受けた後に、形態学的に実質的に未変化のままである、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記培養培地が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記培養培地が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約５：１～約１：５の比率

で含む、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記培養培地が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約１：１の比率で含む、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記培養培地が、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）フラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロール、ならびにリノレン酸および／またはリノール酸から選択される１つまたは複数の補充剤を含む、請求項１１～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
前記培養培地には、インスリン、トランスフェリン、ＢＳＡフラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロール、ならびにリノレン酸および／またはリノール酸が補充される、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記増殖因子が幹細胞因子（ＳＣＦ）である、請求項１１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤が、ＧＤＣ－０８７９、ＰＬＸ４０３２、ＧＳＫ２１１８４３６、ＢＭＳ－９０８６６２、ＬＧＸ８１８、ＰＬＸ３６０３、ＲＡＦ２６５、ＲＯ５１８５４２６、ベムラフェニブ、ＰＬＸ８３９４、ＳＢ５９０８８５およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項１１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記Ｗｎｔ活性化因子が、ＳＫＬ　２００１、ＢＭＬ－２８４、ＷＡＹ　２６２６１１、ＣＡＳ　８５３２２０－５２－７、ＱＳ１１およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項１１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記ＧＳＫ－３阻害剤が、ＣＨＩＲ９９０２１、ＣＨＩＲ９８０１４、ＳＢ２１６７６３、ＢＩＯ、Ａ１０７０７２２、ＡＲ－Ａ０１４４１８およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項１１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記ＣＡＲ－ＧＭＰが、マクロファージに分化するように誘導され、これは、前記ＣＡＲ－ＧＭＰを、マクロファージコロニー刺激因子（ＭＣＳＦ）を含むマクロファージ分化培地を用いて培養することを含み、前記マクロファージがＣＡＲを発現する、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記マクロファージ分化培地が、ＲＰＭＩ　１６４０、胎仔ウシ血清（ＦＢＳ）およびＭＣＳＦを含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
請求項２１または請求項２２に記載の方法によって調製される、ＣＡＲを発現するマクロファージ。
【請求項２４】
前記ＣＡＲ－ＧＭＰを顆粒球に分化させるステップをさらに含み、これは、前記ＧＭＰを、顆粒球コロニー刺激因子（ＧＣＳＦ）を含む顆粒球分化培地を用いて培養することを含み、前記顆粒球がＣＡＲを発現する、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記顆粒球分化培地が、ＲＰＭＩ　１６４０、ＦＢＳおよびＧＣＳＦを含む、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
請求項２４または請求項２５に記載の方法によって調製される、ＣＡＲを発現する顆粒

球。
【請求項２７】
がんを有する対象を、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するマクロファージまたは顆粒球で処置するための免疫治療方法であって、
請求項２１に記載のマクロファージまたは請求項２４に記載の顆粒球を含む組成物を、がんを有する前記対象に投与するステップ
を含む、方法。
【請求項２８】
前記組成物が、静脈内または腫瘍間投与される、請求項２７に記載の免疫治療方法。
【請求項２９】
前記対象が、副腎皮質癌、ＡＩＤＳ関連がん、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、肛門がん、肛門直腸がん、肛門管のがん、虫垂がん、小児小脳星細胞腫、小児大脳星細胞腫、基底細胞癌、皮膚がん（非黒色腫）、胆道がん、肝外胆管がん、肝内胆管がん、膀胱（ｂｌａｄｄｅｒ）がん、膀胱（ｕｒｉｎａｒｙ　ｂｌａｄｄｅｒ）がん、骨および関節がん、骨肉腫および悪性線維性組織球腫、脳がん、脳腫瘍、脳幹神経膠腫、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫、三重陰性乳房がんが含まれる乳房がん、気管支腺腫／カルチノイド、カルチノイド腫瘍、消化管、神経系がん、神経系リンパ腫、中枢神経系がん、中枢神経系リンパ腫、子宮頸がん、小児がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸がん、結腸直腸がん、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、リンパ系新生物、菌状息肉症、Ｓｅｚｉａｒｙ症候群、子宮内膜がん、食道がん、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼がん、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫、胆嚢がん、胃（ｇａｓｔｒｉｃ（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、卵巣胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛性腫瘍神経膠腫、頭頸部がん、肝細胞（肝臓）がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、眼内黒色腫、眼球がん、島細胞腫瘍（膵内分泌）、カポジ肉腫、腎臓がん、腎がん、喉頭がん、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、ヘアリー細胞白血病、口唇および口腔がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、Ｗａｌｄｅｎｓｔｒａｍ高ガンマグロブリン血症、髄芽腫、黒色腫、眼内（眼）黒色腫、メルケル細胞癌、悪性中皮腫、中皮腫、転移性扁平上皮頸部がん、口のがん、舌のがん、多発性内分泌腫瘍症候群、菌状息肉症、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、慢性骨髄性白血病、急性骨髄球性白血病、多発性骨髄腫、慢性骨髄増殖性障害、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、口腔（ｏｒａｌ）がん、口腔（ｏｒａｌ　ｃａｖｉｔｙ）がん、中咽頭がん、卵巣がん、卵巣上皮がん、卵巣低悪性度潜在的腫瘍、膵がん、島細胞膵がん、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉性腫瘍、下垂体腫瘍、形質細胞新生物／多発性骨髄腫、胸膜肺芽細胞腫、前立腺がん、直腸がん、腎盂および尿管、移行上皮がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、ユーイングファミリーの肉腫腫瘍、軟部組織肉腫、子宮がん、子宮肉腫、皮膚がん（非黒色腫）、皮膚がん（黒色腫）、乳頭腫、光線角化症および角化棘細胞腫、メルケル細胞皮膚癌、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、胃（ｓｔｏｍａｃｈ（ｇａｓｔｒｉｃ））がん、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、精巣がん、咽喉がん、胸腺腫、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺がん、腎盂および尿管ならびに他の泌尿臓器の移行上皮がん、妊娠性絨毛性腫瘍、尿道がん、子宮内膜子宮がん、子宮肉腫、子宮体がん、膣がん、外陰部がん、ならびにウィルムス腫瘍から選択されるがんを有する、請求項２７または請求項２８に記載の免疫治療方法。
【請求項３０】
１つまたは複数の抗がん剤を、がんを有する前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項２７～２９のいずれか一項に記載の免疫治療方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
関連出願への相互参照
本出願は、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、２０２１年５月１９日出願の米国仮特許出願第６３／１９０，３８７号から、３５　Ｕ．Ｓ．Ｃ．§１１９の下で優先権を主張する。
【０００２】
本開示は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように顆粒球－マクロファージ前駆体（ＧＭＰ）を遺伝子操作する方法、およびがん免疫治療のためを含む、その使用を提供する。
【背景技術】
【０００３】
顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞は、ヒトにおける自然免疫系の不可欠な構成要素である。これらは、病原体に対する第一線の防御であり、我々の身体の恒常性を維持する際、ならびに感染症、代謝疾患およびがんが含まれる種々の疾患を予防する際にも、中心的な役割を果たす。これらの細胞は、骨髄中の共通の前駆体である顆粒球－マクロファージ前駆体（ＧＭＰ）に起源する。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
顆粒球－単球前駆体（ＧＭＰ）は、自然免疫系の２つの主要な構成要素である顆粒球およびマクロファージの共通の前駆体である。ＧＭＰおよびそれらの誘導体の長期拡大増殖を実施できないことは、これらの免疫細胞の治療適用を大きく制限してきた。本明細書で提示される研究では、均一なＧＭＰは、完全に規定された条件において、長期にわたって指数関数的に拡大増殖され得ることが示された。拡大増殖されたＧＭＰは、機能的顆粒球およびマクロファージに分化する能力を含む、ＧＭＰの重要な特色を保持した。拡大増殖されたＧＭＰの移植は、免疫不全マウスにおいて細菌感染症を有効に予防した。さらに、拡大増殖されたＧＭＰは、がん細胞を特異的に貪食するマクロファージを産生するために遺伝子操作され得る。本明細書に記載される方法および組成物は、指数関数的拡大増殖および遺伝子操作されたＧＭＰを可能にする。本開示の方法および組成物によって作製されたＧＭＰは、広範な疾患、特に、感染性疾患およびがんを処置するための免疫治療の開発のために有用である。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
特定の実施形態では、本開示は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように顆粒球－マクロファージ前駆体（ＧＭＰ）を遺伝子操作する方法であって、ＣＡＲを含むベクターをＧＭＰ中に導入して、ＣＡＲを発現するＧＭＰ（ＣＡＲ－ＧＭＰ）を形成するステップ；ＣＡＲ－ＧＭＰを、規定された培養条件において複数回の継代にわたって拡大増殖および培養して、ＣＡＲ－ＧＭＰの集団を生成するステップ；およびＣＡＲ－ＧＭＰの集団を、顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞に分化するようにｉｎ　ｖｉｔｒｏで誘導するステップであって、顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞がＣＡＲを発現する、ステップ、を含む方法を提供する。さらなる実施形態では、ＧＭＰは、幹細胞から得られる。なおさらなる実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞である。別の実施形態では、造血幹細胞は、対象の骨髄から単離される。なお別の実施形態では、対象は、哺乳動物対象である。さらなる実施形態では、対象は、ヒト患者である。なおさらなる実施形態では、ＣＡＲは、抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞の抗腫瘍活性を、それらの貪食および／または炎症促進性サイトカイン分泌を増加させることによって増加させるように設計された少なくとも１つの細胞内ドメインを含む。別の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。なお別の実施形態では、ウイルスベクターは、複製性または非複製性であり得、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、麻疹ベクター、ヘルペスベクター

、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、レオウイルスベクター、セネカバレーウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、パルボウイルスベクターまたはアルファウイルスベクターであり得る。ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。別の実施形態では、規定された培養条件は、ＣＡＲ－ＧＭＰを、（ｉ）増殖因子、（ｉｉ）Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤、ならびに（ｉｉｉ）Ｗｎｔ活性化因子および／またはＧＳＫ－３阻害剤を含む培養培地中で培養することを含み、ＣＡＲ－ＧＭＰは、複数回の細胞継代および／またはクローン性拡大増殖を受けた後に、形態学的に実質的に未変化のままである。さらなる実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地（Ｎｅｕｒａｌ　Ｂａｓａｌ　Ｍｅｄｉｕｍ）を含む。なおさらなる実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約５：１～約１：５の比率で含む。別の実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約１：１の比率で含む。なお別の実施形態では、培養培地は、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）フラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよび／またはリノレン酸から選択される１つまたは複数の補充剤を含む。さらなる実施形態では、培養培地には、インスリン、トランスフェリン、ＢＳＡフラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよびリノレン酸が補充される。ある特定の実施形態では、増殖因子は、幹細胞因子（ＳＣＦ）である。別の実施形態では、Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤は、ＧＤＣ－０８７９、ＰＬＸ４０３２、ＧＳＫ２１１８４３６、ＢＭＳ－９０８６６２、ＬＧＸ８１８、ＰＬＸ３６０３、ＲＡＦ２６５、ＲＯ５１８５４２６、ベムラフェニブ、ＰＬＸ８３９４、ＳＢ５９０８８５およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。なお別の実施形態では、Ｗｎｔ活性化因子は、ＳＫＬ　２００１、ＢＭＬ－２８４、ＷＡＹ　２６２６１１、ＣＡＳ　８５３２２０－５２－７、ＱＳ１１およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。さらなる実施形態では、ＧＳＫ－３阻害剤は、ＣＨＩＲ９９０２１、ＣＨＩＲ９８０１４、ＳＢ２１６７６３、ＢＩＯ、Ａ１０７０７２２、ＡＲ－Ａ０１４４１８およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。別の実施形態では、規定された培養条件は、ＣＡＲ－ＧＭＰを、（ｉ）増殖因子；（ｉｉ）Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤；（ｉｉｉ）マイトジェン活性化キナーゼ相互作用タンパク質キナーゼ１および２（Ｍｎｋ１／２）を阻害する薬剤；（ｉｖ）ＰＩ３Ｋ経路を阻害する薬剤；（ｖ）必要に応じて、１つまたは複数の血清構成要素を含む培養培地中で培養することを含み；ＣＡＲ－ＧＭＰは、複数回の細胞継代および／またはクローン性拡大増殖を受けた後に、形態学的に実質的に未変化のままである。さらなる実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を含む。なおさらなる実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約５：１～約１：５の比率で含む。別の実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約１：１の比率で含む。なお別の実施形態では、培養培地は、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）フラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよび／またはリノレン酸から選択される１つまたは複数の補充剤を含む。さらなる実施形態では、培養培地には、インスリン、トランスフェリン、ＢＳＡフラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよびリノレン酸が補充される。なおさらなる実施形態では、増殖因子は、幹細胞因子（ＳＣＦ）である。別の実施形態では、Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤は、ＧＤＣ－０８７９、ＰＬＸ４０３２、ＧＳＫ２１１８４３６、ＢＭＳ－９０８６６２、ＬＧＸ８１８、ＰＬＸ３６０３、ＲＡＦ２６５、ＲＯ５１８５４２６、ベムラフェニブ、ＰＬＸ８３９４、ＳＢ５９０８８５およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。さらなる実施形態では、Ｍｎｋ１／２を阻害する薬剤は、ＣＧＰ－５７３８０、セルコスポラミド（ｃｅｒｃｏｓｐｏｒａｍｉｄｅ）、ＢＡＹ　１１４３２６９、トミボセルチブ（ｔｏｍｉｖｏｓｅｒｔｉｂ）、ＥＴＣ－２０６、ＳＬＶ－２４３６およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。なおさらなる実施形態では、ＰＩ３Ｋ経路を阻害する薬剤は、３－メチルアデニン、ＬＹ２９４００２、アルペリシブ、ワートマニン、ケルセチン、ｈＳＭ

Ｇ－１阻害剤１１ｊ、ザンデリシブ、アルペリシブ塩酸塩、イデラリシブ、ブパリシブ、コパンリシブ、ＩＰＩ５４９、ダクトリシブ、ピクチリシブ、ＳＡＲ４０５、デュベリシブ、フィメピノスタット（ｆｉｍｅｐｉｎｏｓｔａｔ）、ＧＤＣ－００７７、ＰＩ－１０３、ＹＭ－２０１６３、ＰＦ－０４６９１５０２、タセリシブ、オミパリシブ（ｏｍｉｐａｌｉｓｉｂ）、サモトリシブ（ｓａｍｏｔｏｌｉｓｉｂ）、イソラムネチン、ＺＡＴＫ４７４、パルサクリシブ、リゴサチブ、ＡＺＤ８１８６、ＧＳＫ２６３６７７１、ジシテルチド、ＴＧ１００－１１５、ＡＳ－６０５２４０、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－１、ダクトリシブトシル酸塩、ゲダトリシブ（ｇｅｄａｔｏｌｉｓｉｂ）、ＴＧＸ－２２１、ウムブラリシブ、ＡＺＤ　６４８２、セラベリシブ（ｓｅｒａｂｅｌｉｓｉｂ）、ビミラリシブ（ｂｉｍｉｒａｌｉｓｉｂ）、アピトリシブ、アルファ－リノレン酸、Ｖｐｓ３４－ＰＩＫ－ＩＩＩ、ＰＩＫ－９３、Ｖｐｓ３４－ＩＮ－１、ＣＨ５１３２７９９、レニオリシブ、ボクスタリシブ（ｖｏｘｔａｌｉｓｉｂ）、ＧＳＫ１０５９６１５、ソノリシブ（ｓｏｎｏｌｉｓｉｂ）、ＰＫＩ－４０２、ＰＩ４ＫＩＩＩベータ－ＩＮ－９、ＨＳ－１７３、ＢＧＴ２２６マレイン酸塩、ピクチリシブジメタンスルホン酸塩、ＶＳ－５５８４、ＩＣ－８７１１４、ケルセチン二水和物、ＣＮＸ－１３５１、ＳＦ２５２３、ＧＤＣ－０３２６、セレタリシブ（ｓｅｌｅｔａｌｉｓｉｂ）、アカリシブ（ａｃａｌｉｓｉｂ）、ＳＡＲ－２６０３０１、ＺＡＤ－８８３５、ＧＮＥ－３１７、ＡＭＧ３１９、ネミラリシブ（ｎｅｍｉｒａｌｉｓｉｂ）、ＩＩＴＺ－０１、ＰＩ－１０３塩酸塩、オロキシンＢ、ピララリシブ（ｐｉｌａｒａｌｉｓｉｂ）、ＡＳ－２５２４２４、クパンリシブ（ｃｐａｎｌｉｓｉｂ）二塩酸塩、ＡＭＧ　５１１、ジシテルチドＴＦＡ、ＰＩＫ－９０、テナリシブ（ｔｅｎａｌｉｓｉｂ）、エスクレチン、ＣＧＳ　１５９４３、ＧＮＥ－４７７、ＰＩ－３０６５、Ａ６６、ＡＺＤ３４５８、ジンセノサイドＲｋ１、ソフォカルピン（ｓｏｐｈｏｃａｒｐｉｎｅ）、ブパリシブ塩酸塩、Ｖｐｓ３４－ＩＮ－２、リンペルリシブ（ｌｉｎｐｅｒｌｉｓｉｂ）、アルニコリド（ａｒｎｉｃｏｌｉｄｅ）Ｄ、ＫＰ３７２－１、ＣＺＣ２４８３２、ＰＦ－４９８９２１６、（Ｒ）－デュベリシブ、ＰＱＲ５３０、Ｐ１１δ－ＩＮ－１、ウムブラリシブ塩酸塩、ＭＴＸ－２１１、ＰＩ３Ｋ／ｍＴＯＲ阻害剤－２、ＬＸ２３４３、ＰＦ－０４９７９０６４、ポリガラサポニン（ｐｏｌｙｇａｌａｓａｐｏｎｉｎ）Ｆ、グラウコカリシン（ｇｌａｕｃｏｃａｌｙｘｉｎ）Ａ、ＮＳＣ７８１４０６、ＭＳＣ２３６０８４４、ＣＡＹ１０５０５、ＩＰＩ－３０６３、ＴＧ　１００７１３、ＢＥＢＴ－９０８、ＰＩ－８２８、ブレビアナミド（ｂｒｅｖｉａｎａｍｉｄｅ）Ｆ、ＥＴＰ－４６３２１、ＰＩＫ－２９４、ＳＲＸ３２０７、ソフォカルピン一水和物、ＡＳ－６０４８５０、デスメチルグリシテイン（ｄｅｓｍｅｔｈｙｌｇｌｙｃｉｔｅｉｎ）、ＳＫＩＶ、ＷＹＥ－６８７、ＮＶＰ－ＱＡＶ－５７２、ＧＮＥ－４９３、ＣＡＬ－１３０塩酸塩、ＧＳ－９９０１、ＢＧＴ２２６、ＩＨＭＴ－ＰＩ３Ｋδ－３７２、ＰＩ３Ｋα－ＩＮ－４、パルサクリシブ塩酸塩、ＰＦ－０６８４３１９５、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－６、（Ｓ）－ＰＩ３Ｋα－ＩＮ－４、ＰＩ３Ｋ（ガンマ）－ＩＮ－８、ＢＡＹ１０８２４３９、ＣＹＨ３３、ＰＩ３Ｋγ阻害剤２、ＰＩ３Ｋδ阻害剤１、ＰＡＲＰ／ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－１、ＬＡＳ１９１９５４、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－９、ＣＨＭＦＬ－ＰＩ３ＫＤ－３１７、ＰＩ３Ｋ／ＨＤＡＣ－ＩＮ－１、ＭＳＣ２３６０８４４ヘミフマル酸塩、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－２、ＰＩ３Ｋ／ｍＴＯＲ阻害剤－１、ＰＩ３Ｋδ－ＩＮ－１、オイスカフ酸、ＫＵ－００６０６４８、ＡＺＤ　６４８２、ＷＹＥ－６８７二塩酸塩、ＧＳＫ２２９２７６７、（Ｒ）－ウムブラリシブ、ＰＩＫ－２９３、イデラリシブＤ５、ＰＩＫ－７５、ヒルステノン（ｈｉｒｓｕｔｅｎｏｎｅ）、ケルセチンＤ５、ＰＩＫ－１０８、ｈＳＭＧ－１阻害剤１１ｅ、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－１０、ＮＶＰ－ＢＡＧ９５６、ＰＩ３Ｋγ阻害剤１、ＣＡＬ－１３０、ＯＮ１４６０４０、ＰＩ３ｋδ阻害剤１、ＰＩ３Ｋα／ｍＴＯＲ－ＩＮ－１、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。別の実施形態では、ＣＡＲ－ＧＭＰは、マクロファージに分化するように誘導され、これは、ＣＡＲ－ＧＭＰを、マクロファージコロニー刺激因子（ＭＣＳＦ）を含むマクロファージ分化培地を用いて培養することを含み、マクロファージは、ＣＡＲを発現する。なお別の実施形態では、マクロファージ分化培地は、ＲＰＭＩ　１６４０、胎仔ウシ血清（ＦＢＳ）およびＭＣＳＦを含む。代替的な実

施形態では、方法は、ＣＡＲ－ＧＭＰを顆粒球に分化させるステップをさらに含み、これは、ＧＭＰを、顆粒球コロニー刺激因子（ＧＣＳＦ）を含む顆粒球分化培地を用いて培養することを含み、顆粒球は、ＣＡＲを発現する。さらなる実施形態では、顆粒球分化培地は、ＲＰＭＩ　１６４０、ＦＢＳおよびＧＣＳＦを含む。

【０００６】

ある特定の実施形態では、本開示は、本開示の方法によって作製される、ＣＡＲを発現するマクロファージもまた提供する。

【０００７】

特定の実施形態では、本開示は、本開示の方法によって作製される、ＣＡＲを発現する顆粒球をさらに提供する。

【０００８】

別の実施形態では、本開示は、がんを有する対象を、ＣＡＲを発現するマクロファージまたは顆粒球で処置するための免疫治療方法であって、本開示の方法によって作製されるＣＡＲを発現するマクロファージまたは本開示の方法によって作製されるＣＡＲを発現する顆粒球を含む組成物を、がんを有する対象に投与するステップを含む、方法を提供する。さらなる実施形態では、組成物は、静脈内または腫瘍間投与される。なおさらなる実施形態では、マクロファージまたは顆粒球は、免疫治療方法で処置される対象の幹細胞由来のＧＭＰから得られる。別の実施形態では、対象は、副腎皮質癌、ＡＩＤＳ関連がん、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、肛門がん、肛門直腸がん、肛門管のがん、虫垂がん、小児小脳星細胞腫、小児大脳星細胞腫、基底細胞癌、皮膚がん（非黒色腫）、胆道がん、肝外胆管がん、肝内胆管がん、膀胱（ｂｌａｄｄｅｒ）がん、膀胱（ｕｒｉｎａｒｙ　ｂｌａｄｄｅｒ）がん、骨および関節がん、骨肉腫および悪性線維性組織球腫、脳がん、脳腫瘍、脳幹神経膠腫、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫、三重陰性乳房がんが含まれる乳房がん、気管支腺腫／カルチノイド、カルチノイド腫瘍、消化管、神経系がん、神経系リンパ腫、中枢神経系がん、中枢神経系リンパ腫、子宮頸がん、小児がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸がん、結腸直腸がん、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、リンパ系新生物、菌状息肉症、Ｓｅｚｉａｒｙ症候群、子宮内膜がん、食道がん、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼がん、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫、胆嚢がん、胃（ｇａｓｔｒｉｃ（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、卵巣胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛性腫瘍神経膠腫、頭頸部がん、肝細胞（肝臓）がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、眼内黒色腫、眼球がん、島細胞腫瘍（膵内分泌）、カポジ肉腫、腎臓がん、腎がん、喉頭がん、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、ヘアリー細胞白血病、口唇および口腔がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、Ｗａｌｄｅｎｓｔｒａｍ高ガンマグロブリン血症、髄芽腫、黒色腫、眼内（眼）黒色腫、メルケル細胞癌、悪性中皮腫、中皮腫、転移性扁平上皮頸部がん、口のがん、舌のがん、多発性内分泌腫瘍症候群、菌状息肉症、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、慢性骨髄性白血病、急性骨髄球性白血病、多発性骨髄腫、慢性骨髄増殖性障害、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、口腔（ｏｒａｌ）がん、口腔（ｏｒａｌ　ｃａｖｉｔｙ）がん、中咽頭がん、卵巣がん、卵巣上皮がん、卵巣低悪性度潜在的腫瘍、膵がん、島細胞膵がん、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉性腫瘍、下垂体腫瘍、形質細胞新生物／多発性骨髄腫、胸膜肺芽細胞腫、前立腺がん、直腸がん、腎盂および尿管、移行上皮がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、ユーイングファミリーの肉腫腫瘍（ｅｗｉｎｇ　ｆａｍｉｌｙ　ｏｆ　ｓａｒｃｏｍａ　ｔｕｍｏｒ）、軟部組織肉腫、子宮がん、子宮肉腫、皮膚がん（非黒色腫）、皮膚がん（黒色腫）、乳頭腫、光線角化症および角化棘細胞腫、メルケル細胞皮膚癌、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、胃（ｓｔｏｍａｃｈ（ｇａｓｔｒｉｃ））がん、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、精巣がん、咽喉がん、胸腺腫、胸腺腫および胸腺癌、甲

状腺がん、腎盂および尿管ならびに他の泌尿臓器の移行上皮がん、妊娠性絨毛性腫瘍、尿道がん、子宮内膜子宮がん、子宮肉腫、子宮体がん、腟がん、外陰部がん、ならびにウィルムス腫瘍から選択されるがんを有する。なお別の実施形態では、免疫治療方法は、１つまたは複数の抗がん剤を、がんを有する対象に投与するステップをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】図１Ａ～Ｅは、操作されたＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰから生成されたαＣＤ１９　ＣＡＲ－マクロファージが、ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を有効に貪食することを示す図である。（Ａ）ＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰを、ＧＦＰ　ｍＲＮＡでエレクトロポレーションしたか、またはＧＦＰレンチウイルス（ｐＳｉｎ－ＧＦＰ）で形質導入した。トランスフェクションの４８時間後に、ＧＦＰ発現を、蛍光顕微鏡（上パネル）およびフローサイトメトリー（下パネル）によって分析した。フローサイトメトリーデータは、５つの独立した実験からの平均±ＳＤとして示される。（Ｂ）ＣＡＧ－Ｃａｓ９－ＧＦＰマウスに由来するＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰを、対照またはＧＦＰ　ｓｇＲＮＡでエレクトロポレーションし、ＧＦＰ発現を、エレクトロポレーションの４８時間後に、フローサイトメトリーによって分析した。データは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤとして示される。（Ｃ）ＣａｒＰ－ＲＦＰ、ＣａｒＰＦｃ－１９－ＲＦＰおよびＣａｒＰｚＦｃ－１９－ＲＦＰの構造を示す模式図。（Ｄ）ＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰを、ＣａｒＰ－ＲＦＰまたはＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰレンチウイルスで形質導入し、ＲＦＰ陽性ＧＭＰを選別し、ＳＣＦ／２ｉ中でさらに拡大増殖させた。ＲＦＰ陽性ＧＭＰに由来する１×１０^{5}個のマクロファージを、抗ＣＤ４７抗体を用いてまたは用いずに事前処置した１×１０^{6}個のＧＦＰ陽性ヒトＢ－ＡＬＬ細胞と共に共培養した。細胞を、共培養の１時間後にＰＢＳで洗浄し、位相差画像および蛍光画像を取得した。（Ｅ）（Ｄ）中の細胞をトリプシン処理し、ＧＦＰおよびＲＦＰ発現を、フローサイトメトリーによって分析した。貪食性マクロファージのパーセンテージを定量化した。データは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤとして示される。

【図２】図２Ａ～Ｃは、ＧＭＰの拡大増殖、分化および遺伝子操作を示す図である。（Ａ）ＧＦＰ標識したＥ．ｃｏｌｉと共に１時間インキュベートすることによる、ＧＭＰ由来マクロファージの貪食分析。マクロファージによって飲み込まれたＧＦＰ標識した細菌を示す代表的な位相差画像および蛍光画像、ならびにＧＦＰ標識した細菌と共に（赤）または伴わずに（青）インキュベートしたＧＭＰ由来マクロファージのフローサイトメトリー分析の代表的なプロット。フローサイトメトリーデータは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤとして示される。（Ｂ）分化した細胞を、２×１０^{4}細胞／ウェルの密度で９６ウェルプレート中にプレートし、５００ｎｇ／ｍｌのＬＰＳを用いてまたは用いずに６時間刺激し、その後、上清中のサイトカイン分泌を、ＥＬＩＳＡによって測定した。データは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤとして示される。（Ｃ）改変ＳＣＦ／２ｉ中で拡大増殖させたＧＭＰを、ＣａｒＰ－ＲＦＰまたはヒトＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰレンチウイルスで形質導入した。ＲＦＰ陽性ＧＭＰを選別し、改変ＳＣＦ／２ｉ中でさらに拡大増殖させた。ＲＦＰ陽性ＧＭＰに由来するマクロファージを、１×１０^{5}細胞／ウェルの密度で２４ウェルプレート中にプレートし、ＤＭＥＭ／１０％ＦＢＳ中で一晩培養し、その後、抗ＣＤ４７抗体を用いてまたは用いずに事前処置した１×１０^{6}個のＧＦＰ陽性ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を各ウェルに添加した。共培養の１時間後、細胞をＰＢＳで洗浄し、トリプシン処理し、ＧＦＰおよびＲＦＰ発現を、フローサイトメトリーによって分析した。貪食性マクロファージのパーセンテージを定量化した。データは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤとして示される。

【図３】図３Ａ～Ｄは、図１に関連して、遺伝子操作されたＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰ由来マクロファージによるヒトＢ－ＡＬＬ細胞の貪食を示す図である。（Ａ）ＳＣＦ／２ｉマウスＧＭＰを、ＣａｒＰ－ＲＦＰまたはＣａｒＰＦｃ１９－ＲＦＰレンチウイルスで形質導入し、ＲＦＰ陽性細胞を選別し、ＳＣＦ／２ｉ中で拡大増殖させた。ＲＦＰ陽性マウスＧＭＰに由来するマクロファージを、１×１０^{5}細胞／ウェルの密度で２４ウェルプレート中にプレートし、ＤＭＥＭ／１０％ＦＢＳ中で一晩培養し、その後、１×１０^{6}個のＧＦ

Ｐ陽性ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を各ウェルに添加した。共培養の１時間後、細胞をＰＢＳで洗浄し、トリプシン処理し、ＧＦＰおよびＲＦＰ発現を、フローサイトメトリーによって分析した。貪食性マクロファージのパーセンテージを定量化した。データは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤとして示される。（Ｂ）異なる時点におけるＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰ発現マクロファージの貪食のプロセスを示すタイムラプス画像。時間は分で示される。矢印は、貪食される前および後のＧＦＰ陽性Ｂ－ＡＬＬ細胞を示す。画像はビデオから抽出した。（Ｃ）ＳＣＦ／２ｉマウスＧＭＰを、αＨＥＲ２　ＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰレンチウイルスで形質導入した。ＲＦＰ陽性ＧＭＰを選別し、ＳＣＦ／２ｉ中で拡大増殖させた。ＲＦＰ陽性ＧＭＰに由来するマクロファージを、１×１０^{5}細胞／ウェルの密度で２４ウェルプレート中にプレートし、ＤＭＥＭ／１０％ＦＢＳ中で一晩培養し、その後、１×１０^{6}個のＧＦＰ陽性ＳＫ－ＢＲ－３細胞を各ウェルに添加した。共培養の１時間後、位相差画像および蛍光画像を取得した。（Ｄ）ＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰを、αＣＤ１９　ＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰまたはαＨＥＲ２　ＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰレンチウイルスで形質導入し、ＲＦＰ陽性ＧＭＰを選別し、ＳＣＦ／２ｉ中でさらに拡大増殖させた。αＣＤ１９　ＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰまたはαＨＥＲ２　ＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰを発現する１×１０^{5}個のマクロファージを、ＧＦＰ陽性ヒトＢ－ＡＬＬ細胞またはＳＫＢＲ－３細胞と共に共培養した。共培養の１時間後、細胞をＰＢＳで洗浄し、トリプシン処理し、ＧＦＰおよびＲＦＰ発現を、フローサイトメトリーによって分析した。貪食性マクロファージのパーセンテージを定量化した。データは、３つの独立した実験からの平均±ＳＤとして示される。

【図４】図４Ａ～Ｂは、図２Ｃに関連して、操作されたＧＭＰに由来するαＣＤ１９　ＣＡＲ－マクロファージが、ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を有効に貪食することを示す図である。（Ａ）ＧＭＰを、改変ＳＣＦ／２ｉ中で拡大増殖させ、ヒトＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰ（ｈ　ＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰ）レンチウイルスで形質導入した。ｈＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰ発現ＧＭＰに由来するマクロファージを、ＧＦＰ標識したヒトＢ－ＡＬＬ細胞と共に共培養した。共培養の１時間後、位相差画像および蛍光画像を取得した。（Ｂ）抗ＣＤ４７抗体と共に事前インキュベートしたＧＦＰ標識したヒトＢ－ＡＬＬ細胞と共に共培養したｈＣａｒＰｚＦｃ１９－ＲＦＰ発現マクロファージの逐次的な蛍光画像。

【図５】図５Ａ～Ｄは、αＣＤ１９　ＣＡＲ－ＧＭＰの移植がマウスにおいて白血病細胞を弱体化させることを示す図である。（Ａ）ＧＦＰ標識したヒトＢ細胞性急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）細胞を、ＮＳＧマウス中に注射して、Ｂ－ＡＬＬマウスモデルを創出した。Ｂ－ＡＬＬ注射の２１日後、ａＣＤ１９　ＣＡＲ－ＧＭＰまたはＰＢＳを注射し、ＦＡＣＳ分析を週に１回実施して、末梢血中のＧＦＰ陽性Ｂ－ＡＬＬ細胞の割合を決定した。（Ｂ）代表的なＦＡＣＳ分析結果。（ｃ）対照（ＰＢＳ）および処置（ａＣＤ１９　ＣＡＲ－ＧＭＰ）についての生存率。（Ｄ）対照および処置マウスにおける血液中のＧＦＰ陽性Ｂ－ＡＬＬ細胞のパーセンテージ。

【発明を実施するための形態】

【００１０】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」および「この（ｔｈｅ）」は、文脈が明らかに他を示さない限り、複数形の指示対象を含む。したがって、例えば、「１つの（ａ）細胞」に対する言及は、複数の細胞を含み、「この（ｔｈｅ）顆粒球－マクロファージ前駆体」に対する言及は、当業者に公知の１つまたは複数の顆粒球－マクロファージ前駆体およびその等価物に対する言及を含む、などである。

【００１１】

また、「または」の使用は、特記しない限り、「および／または」を意味する。同様に、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」および「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」は、相互交換可能であり、限定と解釈されない。

【００１２】

種々の実施形態の説明が、用語「含む」を使用する場合、当業者は、一部の具体的な例において、ある実施形態が、「～から本質的になる」または「～からなる」という言葉を使用して代替的に記載され得ることを理解することが、さらに理解される。

【００１３】

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者に一般に理解される意味と同じ意味を有する。多くの方法および試薬は、本明細書に記載される方法および試薬と類似または等価であるが、例示的な方法および材料が、本明細書で開示される。

【００１４】

本明細書で言及される全ての刊行物は、本明細書の記載と併せて使用され得る方法論を記載および開示することを目的として、参照により本明細書に完全に組み込まれる。さらに、本開示で明示的に定義された用語と類似または同一な、１つまたは複数の刊行物中で提示される任意の用語に関して、本開示中に明示的に提供された用語の定義が、あらゆる点で優先する。

【００１５】

本発明が、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコールおよび試薬などに限定されず、したがって変動し得ることを理解すべきである。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を記載することだけを目的としており、特許請求の範囲のみによって定義される本発明の範囲を制限することは意図しない。

【００１６】

作業例以外では、または他に示される場合、本明細書で使用される成分の量または反応条件を表す全ての数字は、全ての場合において、用語「約」によって修飾されていると理解すべきである。用語「約」は、パーセンテージと併せて本開示を記載するために使用される場合、±１％を意味する。他の例では、本明細書で使用される場合、用語「約」は、測定可能な値、例えば、量、持続時間などを指し、特定された値からの±２０％、±１０％、±５％、±１％、±０．５％または±０．１％の変動を包含する。

【００１７】

本明細書で使用される場合、用語「投与する」は、所望の部位における薬剤の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法または経路による、対象中への本明細書で開示される薬剤（例えば、操作されたＧＭＰ、またはそれに由来するマクロファージもしくは顆粒球）の配置を指す。

【００１８】

「自家」細胞は、本明細書で使用される場合、細胞が後に再投与される個体と同じ個体に由来する細胞を指す。

【００１９】

用語「抗体断片」は、本明細書で使用される場合、一般に、インタクトな抗体の抗原結合部位を含み、したがって、抗原に結合する能力を保持する、インタクトな抗体の一部分のみを含むタンパク質断片を指す。本定義によって包含される抗体断片の例には、以下が含まれる：（ｉ）ＶＬ、ＣＬ、ＶＨおよびＣＨ１ドメインを有するＦａｂ断片；（ｉｉ）ＣＨ１ドメインのＣ末端における１つまたは複数のシステイン残基を有するＦａｂ断片である、Ｆａｂ’断片；（ｉｉｉ）ＶＨおよびＣＨ１ドメインを有するＦＤＡ断片；（ｉｖ）ＶＨおよびＣＨ１ドメインならびにＣＨ１ドメインのＣ末端における１つまたは複数のシステイン残基を有するＦｄ’断片；（ｖ）抗体の単一の腕のＶＬおよびＶＨドメインを有するＦｖ断片；（ｖｉ）ＶＨドメインからなるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄら、Ｎａｔｕｒｅ ３４１、５４４～５４６（１９８９））；（ｖｉｉ）単離されたＣＤＲ領域；（ｖｉｉｉ）ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ’断片を含む二価断片である、Ｆ（ａｂ’）２断片；（ｉｘ）単鎖抗体分子（例えば、単鎖Ｆｖ；ｓｃＦｖ）（Ｂｉｒｄら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３～４２６（１９８８）；およびＨｕｓｔｏｎら、ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）８５：５８７９～５８８３（１９８８））；（ｘ）同じポリペプチド鎖中に軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に接続された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を

含む、２つの抗原結合部位を有する「二重特異性抗体」（例えば、ＥＰ４０４，０９７；ＷＯ９３／１１１６１；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：６４４４～６４４８（１９９３）を参照されたい）；（ｘｉ）相補的軽鎖ポリペプチドと一緒になって抗原結合領域の対を形成するタンデムＦｄセグメントの対（ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１）を含む「直鎖状抗体」（Ｚａｐａｔａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７～１０６２（１９９５）；および米国特許第５，６４１，８７０号）。

【００２０】

「Ｂ－Ｒａｆ」キナーゼ阻害剤は、Ｂ－Ｒａｆキナーゼと呼ばれるタンパク質の活性を遮断もしくは低減する、またはＢ－Ｒａｆキナーゼの量を低減する物質、例えば、化合物または分子を指す。Ｂ－Ｒａｆは、細胞成長およびシグナル伝達を制御することを助けるキナーゼ酵素である。これは、黒色腫および結腸直腸がんが含まれる一部の型のがんにおいて、変異した（変化した）形態で見出され得る。一部のＢ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤は、がんを処置するために使用される。Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤の例には、ＧＤＣ－０８７９、ＰＬＸ４０３２、ＧＳＫ２１１８４３６、ＢＭＳ－９０８６６２、ＬＧＸ８１８、ＰＬＸ３６０３、ＲＡＦ２６５、ＲＯ５１８５４２６、ベムラフェニブ、ＰＬＸ８３９４およびＳＢ５９０８８５が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書で開示される方法は、Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤ＧＤＣ－０８７９の使用を含む。

【００２１】

「有益な結果」には、疾患状態の重症度を低くすることまたは軽減すること、疾患状態が悪化しないように予防すること、疾患状態を治癒させること、疾患状態が発症しないように予防すること、患者が疾患状態を発症する可能性を低下させること、および患者の寿命または平均余命を延長させることが含まれ得るが、これらに決して限定されない。非限定的な例として、「有益な結果」または「所望の結果」は、１つまたは複数の症状の軽減、欠損の程度の縮小、がん進行の安定化された（即ち、悪化しない）状態、転移または侵襲性の遅延または減速、およびがんに関連する症状の寛解または緩和であり得る。

【００２２】

本開示の目的のために、用語「がん」は、他のように具体的に示されない限り、細胞増殖性障害、新生物、前がん性細胞障害およびがんを包含するために使用される。したがって、「がん」は、転移または腫瘍成長をもたらし得る異常な細胞増殖を受ける任意の細胞を指す。例示的ながんには、副腎皮質癌、ＡＩＤＳ関連がん、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、肛門がん、肛門直腸がん、肛門管のがん、虫垂がん、小児小脳星細胞腫、小児大脳星細胞腫、基底細胞癌、皮膚がん（非黒色腫）、胆道がん、肝外胆管がん、肝内胆管がん、膀胱（ｂｌａｄｄｅｒ）がん、膀胱（ｕｒｉｎａｒｙ　ｂｌａｄｄｅｒ）がん、骨および関節がん、骨肉腫および悪性線維性組織球腫、脳がん、脳腫瘍、脳幹神経膠腫、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫／悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、視覚路および視床下部神経膠腫、三重陰性乳房がんが含まれる乳房がん、気管支腺腫／カルチノイド、カルチノイド腫瘍、消化管、神経系がん、神経系リンパ腫、中枢神経系がん、中枢神経系リンパ腫、子宮頸がん、小児がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸がん、結腸直腸がん、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、リンパ系新生物、菌状息肉症、Ｓｅｚｉａｒｙ症候群、子宮内膜がん、食道がん、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼がん、眼内黒色腫、網膜芽細胞腫、胆嚢がん、胃（ｇａｓｔｒｉｃ（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、卵巣胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛性腫瘍神経膠腫、頭頸部がん、肝細胞（肝臓）がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、眼内黒色腫、眼球がん、島細胞腫瘍（膵内分泌）、カポジ肉腫、腎臓がん、腎がん、喉頭がん、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、ヘアリー細胞白血病、口唇および口腔がん、肝臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、Ｗａｌｄｅｎｓｔｒａｍ高ガンマグロブリン血症、髄芽腫、黒色腫、眼内（眼）黒色腫、メルケル細胞癌、悪性中皮腫、中皮

腫、転移性扁平上皮頸部がん、口のがん、舌のがん、多発性内分泌腫瘍症候群、菌状息肉症、骨髄異形成症候群、骨髄異形成／骨髄増殖性疾患、慢性骨髄性白血病、急性骨髄球性白血病、多発性骨髄腫、慢性骨髄増殖性障害、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、口腔（ｏｒａｌ）がん、口腔（ｏｒａｌ　ｃａｖｉｔｙ）がん、中咽頭がん、卵巣がん、卵巣上皮がん、卵巣低悪性度潜在的腫瘍、膵がん、島細胞膵がん、副鼻腔および鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体芽腫およびテント上原始神経外胚葉性腫瘍、下垂体腫瘍、形質細胞新生物／多発性骨髄腫、胸膜肺芽細胞腫、前立腺がん、直腸がん、腎盂および尿管、移行上皮がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、ユーイングファミリーの肉腫腫瘍、軟部組織肉腫、子宮がん、子宮肉腫、皮膚がん（非黒色腫）、皮膚がん（黒色腫）、乳頭腫、光線角化症および角化棘細胞腫、メルケル細胞皮膚癌、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、胃（ｓｔｏｍａｃｈ（ｇａｓｔｒｉｃ））がん、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、精巣がん、咽喉がん、胸腺腫、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺がん、腎盂および尿管ならびに他の泌尿臓器の移行上皮がん、妊娠性絨毛性腫瘍、尿道がん、子宮内膜子宮がん、子宮肉腫、子宮体がん、膣がん、外陰部がん、ならびにウィルムス腫瘍が含まれるがこれらに限定されない。

【００２３】

「キメラ抗原受容体」または「ＣＡＲ（単数）」または「ＣＡＲ（複数）」は、本明細書で使用される場合、細胞（例えば、ＧＭＰ細胞）上に抗原特異性をグラフトする、操作された受容体を指す。ＣＡＲは、人工Ｔ細胞受容体、キメラＴ細胞受容体またはキメラ免疫受容体としても公知である。種々の実施形態では、ＣＡＲは、抗原特異的ドメイン（ＡＳＤ）、ヒンジ領域（ＨＲ）、膜貫通ドメイン（ＴＭＤ）、共刺激ドメイン（ＣＳＤ）および細胞内シグナル伝達ドメイン（ＩＳＤ）を含む組換えポリペプチドである。

【００２４】

「ＣＡＲ結合ドメイン」は、標的細胞上の抗原に特異的に結合するＣＡＲの部分を指す。一部の実施形態では、ＣＡＲの結合ドメインは、抗体またはその機能的等価物またはその断片またはその誘導体が含まれる、ＣＡＲ構築物（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０１７／０６４３７９を参照されたい）において使用される公知の結合ドメインのいずれかを含む。標的化領域は、全長重鎖、Ｆａｂ断片、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片、二価単鎖抗体または二重特異性抗体を含み得、これらは各々、標的抗原に対して特異的である。

【００２５】

「状態」および「疾患状態」には、本明細書で使用される場合、がん、腫瘍または感染性疾患が含まれ得る。例示的な実施形態では、状態には、悪性新生物細胞増殖性障害または疾患の任意の形態が含まれるが、これらに決して限定されない。

【００２６】

「共刺激ドメイン」は、本明細書で使用される場合、細胞の増殖、生存および／または発生を増強するポリペプチドドメインを含むＣＡＲの部分を指す。共刺激ドメインは、必要に応じたドメインまたはＣＡＲである。本発明のＣＡＲは、共刺激ドメインを含まなくてもよく、１つまたは複数の共刺激ドメインを含んでもよい。各共刺激ドメインは、典型的には、ＴＮＦＲスーパーファミリーのメンバー、ＣＤ２８、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、Ｄａｐ１０、ＣＤ２７、ＣＤ２、ＣＤ５、ＩＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１（ＣＤ１１ａ／ＣＤ１８）、Ｌｃｋ、ＴＮＦＲ－Ｉ、ＴＮＦＲ－ＩＩ、Ｆａｓ、ＣＤ３０、ＣＤ４０またはそれらの組み合わせを含む。他の共刺激ドメイン（例えば、他のタンパク質からの）は、当業者に明らかである。

【００２７】

「遺伝子改変されたＧＭＰによって標的化される疾患」は、本明細書で使用される場合、遺伝子改変された細胞が、治療的に有益な結果をもたらすために罹患細胞を標的化するか健康な細胞を標的化するかにかかわらず、本開示の遺伝子改変されたＧＭＰ細胞（またはそれに由来する顆粒球もしくはマクロファージ）による、任意の様式での任意の疾患に関与する任意の細胞の標的化を包含する。遺伝子改変された細胞は、ＣＡＲを発現し、このＣＡＲは、標的細胞の表面上に発現される抗原のいずれかを標的化し得る。標的化され

得る抗原の例には、癌腫、肉腫、リンパ腫、白血病、胚細胞腫瘍および芽細胞腫上で発現される抗原；種々の免疫細胞上で発現される抗原；ならびに種々の血液学的疾患、自己免疫疾患および／または炎症性疾患に関連する細胞上で発現される抗原が含まれるがこれらに限定されない。標的化され得る他の抗原は、当業者に明らかであり、本開示のＣＡＲによって標的化され得る。

【００２８】

用語「有効量」または「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、疾患または障害の少なくとも１つまたは複数の症状を減少させるための、ＣＡＲを発現するように操作されたＧＭＰ（それに由来するマクロファージまたは顆粒球）を含む組成物の量を指し、所望の効果を提供するのに十分な組成物の量に関する。語句「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、任意の医学的処置に適用可能な合理的なベネフィット／リスク比で、障害を処置するのに十分な組成物の量を意味する。

【００２９】

症状における治療的または予防的に有意な低減は、対照もしくは未処置の対象、または本明細書に記載される細胞性組成物を投与する前の対象の状態と比較した、測定されたパラメーターにおける、例えば、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約１００％、少なくとも約１２５％、少なくとも約１５０％またはそれよりも大きな低減である。測定されたまたは測定可能なパラメーターには、疾患の臨床的に検出可能なマーカー、例えば、上昇したまたは抑圧されたレベルの生物学的マーカーが含まれる。要求される正確な量は、処置されている疾患の型、対象の性別、年齢および体重などの因子に依存して変動する。

【００３０】

「エフェクター機能」は、分化した細胞の特殊化した機能を指す。顆粒球またはマクロファージのエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはサイトカインの分泌であり得る。

【００３１】

用語「発現ベクター」は、発現されるヌクレオチド配列に動作可能に連結された発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用性エレメントを含み；発現のための他のエレメントは、宿主細胞によってまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏ発現系中に供給され得る。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを取り込むコスミド、プラスミド（例えば、ネイキッド、またはリポソーム中に含有された）およびウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなど）が含まれる、全て当該分野で公知のものが含まれる。

【００３２】

「顆粒球コロニー刺激因子」または「ＧＣＳＦ」（コロニー刺激因子３（ＣＳＦ３）としても公知）は、顆粒球および幹細胞を産生するように骨髄を刺激する糖タンパク質である。種々の種にわたる遺伝子配列、タンパク質配列およびオルソログが、当該分野で公知である（例えば、参照により本明細書に組み込まれるＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿０００７５０．１を参照されたい）。

【００３３】

「増殖因子」は、細胞、例えば、幹細胞の成長を促進するのに有効であり、補充剤として培養培地に添加されない限り、基本培地の構成要素ではない物質、例えば、化合物または分子を指す。増殖因子には、幹細胞因子（ＳＣＦ）、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、酸性線維芽細胞増殖因子（ａＦＧＦ）、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、インスリン様増殖因子－Ｉ（ＩＧＦ－Ｉ）、インスリン様増殖因子－ＩＩ（ＩＧＦ－ＩＩ）、血小板由来増殖因子－ＡＢ（ＰＤＧＦ）、および血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）、アクチビン－Ａ、Ｗｎｔおよび骨形態形成タンパク質（ＢＭＰ）、インスリン、サイトカイン、ケモカイン、モルフォゲン、中和抗体、他のタンパク質、ならびに小分子が含まれるがこれら

に限定されない。外因性増殖因子がまた、実質的に未分化の状態でのＧＭＰの培養物の維持を補助するために、本開示に従う培地に添加され得る。かかる因子またはそれらの有効な濃度は、本明細書の他の場所に記載されるように、または細胞を培養する当業者に公知の技法を使用して、同定され得る。特定の実施形態では、ＧＭＰは、ＳＣＦを含む培養培地中で培養される。

【００３４】

「ヒンジ領域」は、本明細書で使用される場合、ＣＡＲ結合ドメインとＣＡＲの膜貫通ドメインとの間にある親水性領域を指す。ヒンジ領域には、抗体のＦｃ断片またはその断片もしくは誘導体、抗体のヒンジ領域またはその断片もしくは誘導体、抗体のＣＨ２領域、抗体のＣＨ３領域、人工スペーサー配列、あるいはそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。ヒンジ領域の例には、ＣＤ８ａヒンジ、および例えば、Ｇｌｙ３ほどの小ささであり得るポリペプチドで作製された人工スペーサー、またはＩｇＧ（例えば、ヒトＩｇＧ４）のＣＨ１およびＣＨ３ドメインが含まれるがこれらに限定されない。他のヒンジ領域は、当業者に明らかであり、本発明の代替的実施形態と併せて使用され得る。

【００３５】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」または「細胞質ドメイン」は、本明細書で使用される場合、エフェクター機能シグナルを伝達し、その特殊化した機能を実施するように細胞に指示するドメインを含むＣＡＲの部分を指す。エフェクター機能シグナルを伝達するドメインの例には、Ｔ細胞受容体複合体のｚ鎖またはそのホモログのいずれか（例えば、ｈ鎖、ＦｃｅＲ１ｇおよびｂ鎖、ＭＢ１（Ｉｇａ）鎖、Ｂ２９（Ｉｇｂ）鎖など）、ヒトＣＤ３ゼータ鎖、ＣＤ３ポリペプチド（Ｄ、ｄおよびｅ）、ｓｙｋファミリーチロシンキナーゼ（Ｓｙｋ、ＺＡＰ　７０など）、ｓｒｃファミリーチロシンキナーゼ（Ｌｃｋ、Ｆｙｎ、Ｌｙｎなど）ならびにＴ細胞伝達に関与する他の分子、例えば、ＣＤ２、ＣＤ５およびＣＤ２８が含まれるがこれらに限定されない。他の細胞内シグナル伝達ドメインは、当業者に明らかである。

【００３６】

用語「単離された」は、本明細書で使用される場合、それが通常関連する他の材料を実質的に含まない分子、生物学的薬剤、細胞または細胞性材料を指す。一態様では、用語「単離された」は、天然供給源中に存在するそれぞれ他のＤＮＡもしくはＲＮＡ、またはタンパク質もしくはポリペプチド、または細胞もしくは細胞オルガネラから分離された、核酸、例えば、ＤＮＡもしくはＲＮＡ、またはタンパク質もしくはポリペプチド（例えば、抗体もしくはその誘導体）、または細胞もしくは細胞オルガネラを指す。用語「単離された」は、組換えＤＮＡ技法によって産生される場合には細胞性材料、ウイルス材料もしくは培養培地を実質的に含まない、または化学的に合成される場合には化学的先駆物質もしくは他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはペプチドもまた指す。さらに、「単離された核酸」は、断片として天然に存在することがなく、天然状態で見出されない、核酸断片を含む意味である。用語「単離された」は、他の細胞性タンパク質から単離されたポリペプチドを指すためにも本明細書で使用され、精製されたポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両方を包含する意味である。用語「単離された」は、他の細胞または組織から単離された細胞または組織を指すためにも本明細書で使用され、培養された細胞または組織および操作された細胞または組織の両方を包含する意味である。

【００３７】

「リンカー」または「リンカードメイン」は、本明細書で使用される場合、本開示のＣＡＲのドメイン／領域のいずれかを一緒に連結する、約１～１００アミノ酸長のオリゴペプチドまたはポリペプチド領域を指す。リンカーは、隣接するタンパク質ドメインが互いに対して動くように自由であるように、グリシンおよびセリンなどの柔軟な残基から構成され得る。より長いリンカーは、２つの隣接するドメインが互いを立体的に妨害しないことを確実にすることが望ましい場合に使用され得る。リンカーは、切断可能または切断不能であり得る。切断可能なリンカーの例には、２Ａリンカー（例えば、Ｔ２Ａ）、２Ａ様

リンカーまたはそれらの機能的等価物およびそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、リンカーには、ピコルナウイルス２Ａ様リンカー、ブタテシオウイルスのＣＨＹＳＥＬ配列（Ｐ２Ａ）、Ｔｈｏｓｅａ ａｓｉｇｎａウイルス（Ｔ２Ａ）またはそれらの組み合わせ、バリアントおよび機能的等価物が含まれる。他のリンカーは、当業者に明らかである。

【００３８】

用語「レンチウイルスベクター」は、特に、Ｍｉｌｏｎｅら、Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１７（８）：１４５３～１４６４（２００９）に提供される自己不活性化レンチウイルスベクターが含まれる、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部に由来するベクターを指す。クリニックで使用され得るレンチウイルスベクターの他の例には、例えば、Ｏｘｆｏｒｄ ＢｉｏＭｅｄｉｃａのＬＥＮＴＩＶＥＣＴＯＲ（登録商標）遺伝子送達技術、ＬｅｎｔｉｇｅｎのＬＥＮＴＩＭＡＸ（商標）ベクター系などが含まれるがこれらに限定されない。非臨床型のレンチウイルスベクターもまた利用可能であり、当業者に公知である。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「長期培養」または「長期拡大増殖」は、細胞が数において拡大増殖し、ならびに／またはかなりの生存度および実質的に類似の形態学を維持するような、制御された条件下での細胞の増殖を指す。一部の実施形態では、この用語は、所望の形態学および細胞数を維持しながらの培養の期間（例えば、約２か月間またはそれよりも長い期間にわたる）を指し、または少なくとも１０回の培養継代の継代（例えば、培地交換）の数に関連し得る。他の実施形態では、この用語は、ある期間にわたる数における増加（例えば、約２か月間の期間での、少なくとも１００万倍の増加）を指す。一部の実施形態では、長期培養物は、４か月間よりも長い期間、６か月間よりも長い期間、または１年間よりも長い期間にわたって培養される。他の実施形態では、長期培養物は、１５継代よりも多く、１８継代よりも多く、または２０継代よりも多く継代される。

【００４０】

「マクロファージコロニー刺激因子」または「ＭＣＳＦ」（コロニー刺激因子１（ＣＳＦ １）としても公知）は、単球、マクロファージおよび骨髄前駆体細胞の増殖、分化および生存に関与する。種々の種にわたる遺伝子配列、タンパク質配列およびオルソログが、当該分野で公知である（例えば、参照により本明細書に組み込まれるＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿０００７４８．４を参照されたい）。

【００４１】

「ポリヌクレオチド」には、本明細書で使用される場合、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｃＤＮＡ（相補的ＤＮＡ）、ｍＲＮＡ（メッセンジャーＲＮＡ）、ｒＲＮＡ（リボソームＲＮＡ）、ｓｈＲＮＡ（低分子ヘアピン型ＲＮＡ）、ｓｎＲＮＡ（核内低分子ＲＮＡ）、ｓｎｏＲＮＡ（短核小体（ｓｈｏｒｔ ｎｕｃｌｅｏｌａｒ）ＲＮＡ）、ｍｉＲＮＡ（ｍｉｃｒｏＲＮＡ）、ゲノムＤＮＡ、合成ＤＮＡ、合成ＲＮＡおよび／またはｔＲＮＡが含まれるがこれらに限定されない。

【００４２】

別の配列に対してある特定のパーセンテージ（例えば、８０％、８５％、９０％または９５％）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）は、アラインした場合に、そのパーセンテージの塩基（またはアミノ酸）が、２つの配列を比較した場合に同じであることを意味する。アラインメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、当該分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌら編、１９８７）補遺３０、セクション７．７．１８、表７．７．１に記載されるものを使用して決定され得る。好ましくは、デフォルトパラメーターがアラインメントのために使用される。典型的なアラインメントプログラムは、デフォルトパラメーターを使用するＢＬＡＳＴである。特に、典型的なプログラムは、以下のデフォルトパラメーターを使用するＢＬＡＳＴＮおよびＢＬＡＳＴＰである：遺伝子コード＝標準；フィルター＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝６０；期待値＝１０

；マトリックス＝ＢＬＯＳＵＭ６２；描写＝５０配列；ソート法＝ＨＩＧＨ　ＳＣＯＲＥ；データベース＝非冗長、ＧｅｎＢａｎｋ＋ＥＭＢＬ＋ＤＤＢＪ＋ＰＤＢ＋ＧｅｎＢａｎｋ　ＣＤＳ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎｓ＋ＳｗｉｓｓＰｒｏｔｅｉｎ＋ＳＰｕｐｄａｔｅ＋ＰＩＲ。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスにおいて見出すことができる：ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＢＬＡＳＴ。

【００４３】

本開示が、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、抗体もしくはその断片に関連する場合、それらの等価物もしくは生物学的等価物は、本開示の範囲内であると意図されることが、明確な引用なしに、他を意図しない限り、推論される。本明細書で使用される場合、用語「その生物学的等価物」は、参照タンパク質、抗体もしくはその断片、ポリペプチドまたは核酸に言及する場合、「その等価物」と同義である意図であり、所望の構造または機能性をなおも維持しつつ最小限の相同性を有するものを意図する。本明細書で具体的に列挙されない限り、上記のいずれもが、その等価物を含むことが企図される。例えば、等価物は、少なくとも約７０％の相同性もしくは同一性、または少なくとも８０％の相同性もしくは同一性、およびあるいは、または少なくとも約８５％、またはあるいは少なくとも約９０％、またはあるいは少なくとも約９５％、またはあるいは少なくとも９８％のパーセント相同性もしくは同一性を意図し、参照タンパク質、ポリペプチド、抗体もしくはその断片または核酸と実質的に等価な生物学的活性を示す。あるいは、ポリヌクレオチドに言及する場合、その等価物は、参照ポリヌクレオチドまたはその相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドである。あるいは、ポリペプチドまたはタンパク質に言及する場合、その等価物は、参照ポリペプチドまたはタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドから発現されたポリペプチドまたはタンパク質である。

【００４４】

用語「レトロウイルスベクター」は、レトロウイルスゲノムの少なくとも一部分に由来するベクターを指す。レトロウイルスベクターの例には、ＡｄｄｇｅｎｅまたはＣｌｏｎｔｅｃｈから入手可能な、ＭＳＣＶｎｅｏ、ＭＳＣＶ－ｐａｃ（またはＭＳＣＶ－ｐｕｒｏ）、ＭＳＣＶ－ｈｙｇｒｏが含まれる。レトロウイルスベクターの他の例は、ＭＳＣＶ－Ｂｇｌ２－ＡｖｒＩＩ－Ｂａｍ－ＥｃｏＲ１－Ｘｈｏ－ＢｓｔＢ１－Ｍｌｕ－Ｓａｌ－ＣｌａＩ．Ｉ０３（配列番号８７２）である。

【００４５】

用語「スリーピングビューティートランスポゾン」または「スリーピングビューティートランスポゾンベクター」は、スリーピングビューティートランスポゾンゲノムの少なくとも一部分に由来するベクターを指す。

【００４６】

「幹細胞因子」または「ＳＣＦ」（ＫＩＴ－リガンド、ＫＬまたはスチール因子としても公知）は、ｃ－ＫＩＴ受容体（ＣＤ１１７）に結合するサイトカインである。ＳＣＦは、膜貫通タンパク質および可溶性タンパク質の両方として存在することができる。このサイトカインは、造血（血球の形成）、精子形成およびメラニン形成において重要な役割を果たす。種々の種にわたる遺伝子配列、タンパク質配列およびオルソログが、当該分野で公知である（例えば、参照により本明細書に組み込まれるＮＣＢＩ参照配列ＮＰ＿０００８９０．１を参照されたい）。

【００４７】

本明細書で使用される場合、「実質的に均一な集団」は、細胞の少なくとも８０％、好ましくは少なくとも９０％、９５％、もしくはさらには９８％またはそれよりも多くが、示された型のものである、細胞の集団を指す。

【００４８】

「膜貫通ドメイン」は、本明細書で使用される場合、形質膜を横断するＣＡＲの領域を指す。ＣＡＲの膜貫通ドメインは、膜貫通タンパク質（例えば、Ｉ型膜貫通タンパク質）の膜貫通領域、人工疎水性配列またはそれらの組み合わせである。他の膜貫通ドメインは

、当業者に明らかである。一部の実施形態では、膜貫通ドメインは、Ｔ細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、ＣＤ２８、ＣＤ３イプシロン、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１６、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、ＫＩＲＤＳ２、ＯＸ４０、ＣＤ２、ＣＤ２７、ＬＦＡ－１（ＣＤｌ　ｌａ、ＣＤ１８）、ＩＣＯＳ（ＣＤ２７８）、４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）、ＧＩＴＲ、ＣＤ４０、ＢＡＦＦＲ、ＨＶＥＭ（ＬＩＧＨＴＲ）、ＳＬＡＭＦ７、ＮＫｐ８０（ＫＬＲＦｌ）、ＣＤ１６０、ＣＤ１９、ＩＬ２Ｒベータ、ＩＬ２Ｒガンマ、ＩＬ７Ｒ　ａ、ＩＴＧＡ１、ＶＬＡ１、ＣＤ４９ａ、ＩＴＧＡ４、ＩＡ４、ＣＤ４９Ｄ、ＩＴＧＡ６、ＶＬＡ－６、ＣＤ４９ｆ、ＩＴＧＡＤ、ＣＤｌ　ｌｄ、ＩＴＧＡＥ、ＣＤ１０３、ＩＴＧＡＬ、ＣＤｌ　ｌａ、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＡＭ、ＣＤｌ　ｌｂ、ＩＴＧＡＸ、ＣＤｌ　ｌｃ、ＩＴＧＢ１、ＣＤ２９、ＩＴＧＢ２、ＣＤ１８、ＬＦＡ－１、ＩＴＧＢ７、ＴＮＦＲ２、ＤＮＡＭ１（ＣＤ２２６）、ＳＬＡＭＦ４（ＣＤ２４４、２Ｂ４）、ＣＤ８４、ＣＤ９６（Ｔａｃｔｉｌｅ）、ＣＥＡＣＡＭ１、ＣＲＴ　ＡＭ、Ｌｙ９（ＣＤ２２９）、ＣＤ１６０（ＢＹ５５）、ＰＳＧＬ１、ＣＤ１００（ＳＥＭＡ４Ｄ）、ＳＬＡＭＦ６（ＮＴＢ－Ａ、Ｌｙｌ０８）、ＳＬＡＭ（ＳＬＡＭＦ１、ＣＤ１５０、ＩＰＯ－３）、ＢＬＡＭＥ（ＳＬＡＭＦ８）、ＳＥＬＰＬＧ（ＣＤ１６２）、ＬＴＢＲ、ＰＡＧ／Ｃｂｐ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ３０、ＮＫｐ４６、ＮＫＧ２Ｄおよび／またはＮＫＧ２Ｃの膜貫通ドメインから選択されるタンパク質に由来するまたはそれからクローニングされた膜貫通ドメインを含み得る。

【００４９】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」、「処置」、「処置すること」または「寛解」は、疾患または障害に関連する状態の進行または重症度を逆転、軽減、寛解、阻害、減速または停止させることが目的である、治療的処置を指す。用語「処置すること」は、状態、疾患または障害、例えばがんの少なくとも１つの有害効果または症状を低減または軽減することを含む。処置は、１つまたは複数の症状または臨床マーカーが低減される場合、一般に、「有効」である。あるいは、処置は、疾患の進行が低減もしくは休止される場合、「有効」である。即ち、「処置」には、症状またはマーカーの改善だけでなく、処置の非存在下で予想される症状の進行または悪化の休止または少なくとも減速もまた含まれる。有益なまたは所望の臨床結果には、検出可能であれ検出不能であれ、１つまたは複数の症状の軽減、疾患の程度の縮小、疾患の安定化された（即ち、悪化しない）状態、疾患進行の遅延または減速、病状の寛解または緩和、および軽快（部分的であれ全体的であれ）が含まれるがこれらに限定されない。疾患の「処置」という用語には、疾患の症状または副作用からの救済を提供することも含まれる（緩和処置が含まれる）。一部の実施形態では、がんの処置には、腫瘍体積を減少させること、がん細胞の数を減少させること、がん転移を阻害すること、平均余命を増加させること、がん細胞増殖を減少させること、がん細胞生存を減少させること、またはがん性状態に関連する種々の生理学的症状の寛解が含まれる。

【００５０】

「Ｗｎｔ活性化因子」は、ＷｎｔシグナルＷｎｔシグナル伝達経路を誘導する化合物または分子を指す。ＷｎｔシグナルＷｎｔシグナル伝達経路は、細胞表面受容体を介してシグナルを細胞中に送るタンパク質で始まるシグナル伝達経路の一群である。３つのＷｎｔシグナルＷｎｔシグナル伝達経路が特徴付けられている：カノニカルなＷｎｔ経路、非カノニカルな平面内細胞極性経路および非カノニカルなＷｎｔ／カルシウム経路。３つ全ての経路は、生物学的シグナルを細胞の内側のＤｉｓｈｅｖｅｌｅｄタンパク質に送るＦｒｉｚｚｌｅｄファミリー受容体への、Ｗｎｔタンパク質リガンドの結合によって活性化される。Ｗｎｔは、３５０～４００アミノ酸長である分泌型脂質改変シグナル伝達糖タンパク質の多様なファミリーを含む。これらのタンパク質上で起こる脂質改変の型は、２３～２４個のシステイン残基の保存されたパターン中のシステインのパルミトイル化である。パルミトイル化は、分泌のための形質膜へのＷｎｔタンパク質の標的化を開始させ、脂肪酸の共有結合に起因してＷｎｔタンパク質がその受容体に結合するのを可能にするので、必要である。Ｗｎｔタンパク質は、適切な分泌

を確実にするために炭水化物を結合させる糖鎖付加もまた受ける。Ｗｎｔシグナル伝達では、これらのタンパク質は、パラ分泌および自己分泌経路を介して異なるＷｎｔ経路を活性化するリガンドとして作用する。これらのタンパク質は、種にわたって高度に保存されている。これらは、マウス、ヒト、Ｘｅｎｏｐｕｓ、ゼブラフィッシュ、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａおよび多くの他のものにおいて見出され得る。Ｗｎｔ活性化因子の例には、ＳＫＬ２００１、ＢＭＬ－２８４、ＷＡＹ　２６２６１１、ＣＡＳ　８５３２２０－５２－７およびＱＳ１１が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、本明細書で開示される方法は、Ｗｎｔ活性化因子活性を有する本開示の化合物の使用を含む。

【００５１】

顆粒球およびマクロファージは、自然免疫系の２つの主要な細胞型である。これらは、病原体に対する第一線の防御であり、我々の身体の恒常性を維持する際、ならびに感染症ならびに代謝疾患およびがんが含まれる種々の疾患を予防する際にも、中心的な役割を果たす。顆粒球およびマクロファージは、貪食と呼ばれるプロセスにおいて、侵入してくる微生物を飲み込み消化する。貪食に加えて、マクロファージは、抗原提示体としても重要な役割を果たし、リンパ球などの他の免疫細胞を動員することによって、特異的防御機構（適応免疫）を開始する。最近、マクロファージは、がんと闘うための魅力的な治療標的にもなっている。その大きい治療潜在力にもかかわらず、顆粒球およびマクロファージを拡大増殖および遺伝子改変するための有効な方法は存在せず、それらの臨床適用を大きく制限している。

【００５２】

より有望なアプローチは、顆粒球およびマクロファージが起源する骨髄中の共通の前駆体である顆粒球－単球前駆体（ＧＭＰ）細胞を拡大増殖および遺伝子改変することである。本明細書で使用される場合、ＧＭＰは、哺乳動物種（例えば、ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、ヒト、マウス、霊長類、ラットなど）に由来し得るまたはそれから得られ得る。ｅｘｖｉｖｏで拡大増殖されたＧＭＰは、治療適用のために十分なマクロファージを生成する能力を可能にし得る。拡大増殖されたＧＭＰは、最も豊富な型の顆粒球である好中球へと分化するようにも誘導され得、好中球は、好中球減少症または好中球機能不全を有する患者において感染症と闘うために、血液循環中に次いで注入され得る。より重要なことに、ＧＭＰは、増強された抗腫瘍活性または抗菌活性を有する遺伝子操作されたマクロファージを生成するために容易に改変され得る。マクロファージは、それらを操作するために使用される遺伝子材料を含む任意の外来粒子を飲み込み消化するが、ＧＭＰは貪食活性を有さず、このことが、それらをはるかに好ましい標的にしている。しかし、数十年間の集中的な研究にもかかわらず、ＧＭＰ、ならびに造血系の他の幹／前駆体細胞の長期ｅｘ　ｖｉｖｏ拡大増殖は、いまだ実現されていない。

【００５３】

造血系の細胞は、最上位の造血幹細胞（ＨＳＣ）、最下位の種々の成熟血球、ならびに中間の造血幹および前駆体細胞（ＨＳＰＣ）、例えば、間にあるＧＭＰの階層構造で体系化される。ＨＳＰＣの大きな治療潜在力に誘引されて、多数のグループが、過去２０年間にそれらのｅｘ　ｖｉｖｏ拡大増殖のための培養条件を開発することを試みてきた。今までのところ、全ての条件が根本的な制限を有している：これらの条件は、任意の型のＨＳＰＣの均一な集団を連続して指数関数的に拡大増殖させることができない。

【００５４】

独自の課題は、１つの型のＨＳＰＣを別の型のＨＳＰＣから、特に、その直ぐ上流の前駆体および下流の子孫から区別し分離することの困難さであった。実際、従来の免疫表現型分析は、１つのＨＳＰＣ型をその直ぐ上流の前駆体および下流の子孫から区別することができない。クローンレベルでは、先を見越して精製されたＨＳＣは、なおも高度に不均一であり、多様な遺伝子発現パターンおよび別個の細胞機能を有する細胞を含有する。ＨＳＰＣは、いくらか類似した細胞表面マーカー発現を有するが不均一な機能を有する細胞の連続体にわたるので、これは予想される。この不均一な細胞集団内で、単一の幹／前駆体細胞型の拡大増殖を促進することができる増殖因子／サイトカインおよび小分子を同定

することは、技術的に非常に挑戦的である。

【００５５】

顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞は、骨髄中の共通の前駆体である顆粒球－マクロファージ前駆体（ＧＭＰ）に起源する。自然免疫細胞の計り知れない治療潜在力にもかかわらず、クリニックにおけるそれらの適用は、これらの細胞またはそれらの前駆体ＧＭＰを有効に拡大増殖および遺伝子改変することが現在できないことに起因して、大きく制限されてきた。ＧＭＰの長期拡大増殖のための方法が、本明細書で提供される。ｅｘ ｖｉｖｏで拡大増殖されたＧＭＰは、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏの両方で、成熟した機能的な顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞へと効率的に分化することができる。これらのｅｘ ｖｉｖｏで拡大増殖されたＧＭＰは、遺伝子改変することもできる。ＧＭＰの産生のための本明細書で開示される方法、およびそれから産生されるＧＭＰは、以下に起因して、大きな有用性を有する：（１）ＧＭＰの長期拡大増殖は、基礎研究および臨床適用の両方のために、無制限の均質な細胞集団を提供する；（２）ＧＭＰの長期拡大増殖は、ＧＭＰ遺伝子およびそれらの発現を改変することによる免疫応答の調節の研究を可能にする；ならびに（３）ｅｘ ｖｉｖｏで拡大増殖されたＧＭＰは、移植が含まれる臨床適用のために使用することができる。例えば、ｅｘ ｖｉｖｏで拡大増殖されたＧＭＰは、好中球減少症を処置するために容易に使用され得る。さらに、本開示は、マクロファージおよび樹状細胞に分化するようにさらに誘導され得るＧＭＰの遺伝子改変（例えば、ノックアウトＳＩＲＰαおよび／またはＰＩ３Ｋγ遺伝子；アンジオテンシン変換酵素の過剰発現）もまた提供する。本明細書で提示される研究では、これらの操作されたマクロファージおよび樹状細胞は、増強された抗腫瘍効果を示し、単剤療法として、または他の免疫学的薬剤、例えば、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１抗体およびキメラ抗原受容体Ｔ（ＣＡＲ－Ｔ）細胞との併用療法として、がんを処置するために臨床的に使用され得る。ＧＭＰを、ＣＡＲ－マクロファージを産生するようにも操作した。これらのＣＡＲ－マクロファージは、がんおよび他の疾患を処置するために使用され得る。

【００５６】

マクロファージは、Ｍ１極性またはＭ２極性として元々分類された多様な表現型を示す。Ｍ１極性化マクロファージは、抗原を提示し、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、インターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）および反応性酸素種（ＲＯＳ）を産生する能力を示す。Ｍ１マクロファージは、抗腫瘍においてより有効であり、Ｔ細胞応答をＴヘルパー１型（Ｔｈ１）または細胞媒介性免疫応答に向けて歪める。対照的に、Ｍ２マクロファージは、ＩＬ－１０およびＴＧＦ－βを産生し、組織リモデリングに関与し、免疫抑制的性質を有し、Ｔｈ２または抗体媒介性免疫応答を促進する。腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）は、腫瘍微小環境の主要な構成要素を構成する。これらの細胞は、腫瘍免疫抑制を促進する優勢なＭ２表現型マクロファージである。最近の研究は、免疫チェックポイント遮断の使用によって無効にされない、Ｔ細胞機能の抑制へのそれらの寄与を支持している。したがって、マクロファージは、がんと闘うための魅力的な治療標的になっている。マクロファージの大きい治療潜在力にもかかわらず、クリニックにおけるそれらの適用は、マクロファージまたはそれらの前駆体ＧＭＰを拡大増殖および遺伝子改変するための有効な方法が現在存在しないことに起因して、大きく制限されてきた。ＧＭＰの長期拡大増殖は、これらの細胞を治療的により適用可能なものにするための遺伝子改変を可能にする。

【００５７】

特定の実施形態では、本開示は、複数回の細胞継代およびクローン性拡大増殖を受けた後に形態学的に未変化のままの顆粒球／マクロファージ前駆体細胞（ＧＭＰ）の均一な細胞集団の長期拡大増殖のための方法を提供する。さらなる実施形態では、本明細書で開示される方法は、ＧＭＰを、増殖因子（例えば、ＳＣＦ）、Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤（例えば、ＧＤＣ－０８７９）、Ｍｎｋ１／２を阻害する薬剤、ＰＩ３Ｋ経路を阻害する薬剤、および必要に応じて、１つまたは複数の血清構成要素が含まれるがこれらに限定されない因子および薬剤の組み合わせを含む培養培地中で培養するステップを含む。なお別の実施形態では、ＧＭＰの長期培養物は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように遺伝

子操作される。

【００５８】

幹細胞は、特定の特殊化した機能を有する細胞（例えば、組織特異的細胞、実質細胞およびそれらの前駆体）が含まれる他の細胞型への分化が可能な細胞である。前駆体細胞（即ち、「多分化能性」）は、異なる最終分化した細胞型を生じることができる細胞、および種々の前駆体細胞を生じることが可能な細胞である。生物の細胞型の全てではないが一部または多くを生じる細胞は、「多能性」幹細胞と呼ばれる場合が多く、これらは、成熟生物の身体中の任意の細胞型へと分化することができるが、リプログラミングなしでは、それらが由来した細胞へと脱分化することはできない。理解されるように、「多分化能性」幹／前駆体細胞（例えば、顆粒球／マクロファージ前駆体細胞（ＧＭＰ））は、多能性幹細胞よりも狭い分化潜在力を有する。ＧＭＰへの誘導の前に、本明細書で開示される幹細胞は、いくつもの遺伝子操作技法、例えば、遺伝子治療、遺伝子編集システム、相同組換えなどの使用によって、遺伝子改変され得る。かかる改変された幹細胞は、増強された治療を提供し得る（例えば、Ｎｏｗａｋｏｗｓｋｉら、Ａｃｔａ Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ Ｅｘｐ（Ｗａｒｓ）７３（１）：１～１８（２０１３）を参照されたい）。ある特定の実施形態では、幹細胞または前駆体細胞は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように、またはキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするポリヌクレオチドを含有するように、操作され得る。

【００５９】

さらなる実施形態では、本明細書で開示されるＧＭＰは、幹細胞に由来する。幹細胞には、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、非胚性（成体）幹細胞および臍帯血幹細胞が含まれ得る。本開示の培地を使用して培養され得る幹細胞型には、ヒト、マウス、ラット、サルおよび類人猿が含まれる任意の哺乳動物種に由来する幹細胞が含まれる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｎａｔｕｒｅ ４４８：３１３～３１８、２００７年７月；およびＴａｋａｈａｓｈｉら、Ｃｅｌｌ １３１（５）：８６１～８７２を参照されたい）。

【００６０】

特定の実施形態では、本開示のＧＭＰは、誘導多能性細胞（ｉＰＳまたはｉＰＳＣ）に由来する。ｉＰＳＣは、（内因性遺伝子の）選択的遺伝子発現によって、または異種遺伝子によるトランスフェクションによって、非多能性細胞から得られる多能性幹細胞の１つの型である。誘導多能性幹細胞は、Ｋｙｏｔｏ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、ＪａｐａｎのＳｈｉｎｙａ Ｙａｍａｎａｋａのチームによって記載されている。Ｙａｍａｎａｋａらは、胚性幹細胞において特に活性な遺伝子を同定し、それらの遺伝子の選択によってマウス線維芽細胞をトランスフェクトするために、レトロウイルスを使用している。最終的に、多能性幹細胞の産生のために重要な４つの重要な多能性遺伝子が単離された：Ｏｃｔ－３／４、ＳＯＸ２、ｃ－ＭｙｃおよびＫｌｆ４。より最近の研究は、ある特定の培養条件と追加の因子を組み合わせたこれらの因子のうちのより少数が、多能性幹細胞を誘導することができるとしている。細胞は、Ｆｂｘ１５$^{+}$細胞についての抗生物質選択によって単離された。同じグループは、Ｈａｒｖａｒｄ、ＭＩＴおよびＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｌｏｓ Ａｎｇｅｌｅｓからの２つの他の独立した研究グループと共に、ｉＰＳへのマウス線維芽細胞の首尾よいリプログラミングを示し、生存可能なキメラの産生さえも示す研究を公開した。

【００６１】

代替的な実施形態では、本明細書で開示されるＧＭＰは、胚性幹細胞（ＥＳＣ）に由来する。ＥＳＣは、ヒト胚の未分化の内部細胞塊に由来する幹細胞である。胚性幹細胞は多能性であり、これは、胚性幹細胞が３つの一次胚葉：外胚葉、内胚葉および中胚葉の全ての誘導体へと成長（即ち、分化）することができることを意味している。多能性は、胚性幹細胞を、成体において見出される成体幹細胞から区別する；胚性幹細胞は、身体中の全ての細胞型を生成することができるが、成体幹細胞は多分化能性であり、限定数の細胞型のみを産生することができる。さらに、規定された条件下では、胚性幹細胞は、それら自

身を無制限に増殖させることが可能である。これは、胚性幹細胞が研究および再生医療の両方のための有用なツールとして使用されることを可能にするが、それは、胚性幹細胞が、継続的な研究または臨床使用のために際限のない数の胚性幹細胞を産生できるからである。

【００６２】

別の代替的な実施形態では、本明細書で開示されるＧＭＰは、臍帯血幹細胞に由来する。臍帯血は、赤ん坊の誕生後に胎盤中および臍帯中に残された血液である。臍帯血は、全血中で見出される全ての要素から構成される。臍帯血は、赤血球、白血球、血漿、血小板を含有し、造血幹細胞に富んでもいる。造血幹細胞は、Ｃｈｕｌａｒｏｊｍｏｎｔｒｉら、Ｊ Ｍｅｄ Ａｓｓｏｃ Ｔｈａｉ ９２（３）：Ｓ８８～９４（２００９）中で教示されるものが含まれる、当該分野で教示されるいくつもの単離方法を使用して、臍帯血から単離され得る。さらに、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｚｅｎ－Ｂｉｏなどが含まれる複数の業者からの市販のキットが、ＣＤ３４$^{+}$細胞（即ち、造血幹細胞）をヒト臍帯血から単離するために利用可能である。

【００６３】

なお別の代替的な実施形態では、本明細書で開示されるＧＭＰは、非胚性幹細胞に由来する。非胚性幹細胞は、それ自体を再生でき、組織または臓器の主要な特殊化した細胞型の一部または全てを生じるように分化することができる。生きた生物における非胚性幹細胞の主な役割は、それらが見出される組織を維持および修復することである。科学者は、非胚性幹細胞の代わりに体性幹細胞という用語も使用し、このとき、体性とは、身体の細胞（胚細胞でも精子でも卵でもない）を指す。非胚性幹細胞は、脳、骨髄、末梢血、血管、骨格筋、皮膚、歯、心臓、腸、肝臓、卵巣上皮および精巣が含まれる多くの臓器および組織において同定されている。これらは、各組織の特定の領域（「幹細胞ニッチ」と呼ばれる）に存在すると考えられる。生きた動物では、非胚性幹細胞は、必要に応じて、長い期間にわたって分裂することができ、特定の組織の特徴的な形状ならびに特殊化した構造および機能を有する成熟細胞型を生じ得る。

【００６４】

特定の実施形態では、本明細書で開示されるＧＭＰは、造血幹細胞（ＨＳＣ）に由来する。ＨＳＣは、臍帯血および骨髄から容易に単離され得る。かかる単離プロトコールは、当該分野で公知であり、典型的には、ＨＳＣの単離のための細胞選択マーカーとして、ＣＤ３４$^{+}$を使用する（例えば、Ｌａｇａｓｓｅら、Ｎａｔ Ｍｅｄ．６：１２２９～１２３４（２０００）を参照されたい）。

【００６５】

本明細書で開示される方法では、ＧＭＰは、増殖因子（例えば、ＳＣＦ）、Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤（例えば、ＧＤＣ－０８７９）、Ｍｎｋ１／２を阻害する薬剤、ＰＩ３Ｋ経路を阻害する薬剤、および必要に応じて、１つまたは複数の血清構成要素が含まれるがこれらに限定されない因子および薬剤の組み合わせを含む培養培地中で成長および拡大増殖され得る。培養培地は、種々の他の生物学的薬剤が補充された改変基本培地であり得る。基本培地は、培養物中の細胞の成長を支持するのに有効なアミノ酸、ビタミン、塩および栄養素の溶液を指すが、通常、これらの化合物は、追加の化合物が補充されない限り、細胞成長を支持しない。栄養素には、細胞によって代謝され得る炭素供給源（例えば、糖、例えば、グルコース）、ならびに細胞の生存に必要な他の化合物が含まれる。これらは、化合物（例えば、必須アミノ酸）を合成するために必要なタンパク質をコードする遺伝子のうち１つもしくは複数の非存在に起因して、細胞自身が合成できない化合物であり、または細胞が合成できる化合物に関しては、それらの特定の発生状態に起因して、必要な生合成タンパク質をコードする遺伝子が、十分なレベルとして発現されていない。いくつかの基本培地、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ＲＰＭＩ １６４０、Ｋｎｏｃｋｏｕｔ－ＤＭＥＭ（ＫＯ－ＤＭＥＭ）およびＤＭＥＭ／Ｆ１２は、哺乳動物細胞培養の分野で公知であるが、実質的に未分化の状態での幹細胞の成長を支持する薬剤

が補充され得る任意の基礎培地（ｂａｓｅ　ｍｅｄｉｕｍ）が使用され得る。ある特定の比率の、上で例示された基本培地のうち１つ（例えば、ＤＭＥＭ／Ｆ１２）と神経基本培地（またはあるいは他の基本培地、例えば、ＩＭＤＭおよび／またはＳｔｅｍＳｐａｎ（商標）ＳＦＥＭＩＩ）とを含む培養培地が、ＧＭＰの成長の改善を予想外に提供したことが、本明細書でさらに見出された。特に、上で例示された基本培地のうち１つ（例えば、ＤＭＥＭ／Ｆ１２）の神経基本培地に対する約５：１～約１：５の比率が、ＧＭＰを培養するために使用され得る。さらなる実施形態では、ＧＭＰを成長させるための培養培地は、約１：１の、神経基本培地に対するＤＭＥＭ／Ｆ１２を含む。

【００６６】

上に示されるように、ＧＭＰを成長させるための本明細書で開示される培養培地には、インスリン、トランスフェリン、ＢＳＡフラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよびリノレン酸が含まれるがこれらに限定されない１つまたは複数の追加の薬剤が補充され得る。ある特定の実施形態では、ＧＭＰを成長させるための本明細書で開示される培養培地には、インスリン、トランスフェリン、ＢＳＡフラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよびリノレン酸が補充される。

【００６７】

理解されるように、継続的に、または定期的な間隔で、典型的には、１～３日毎に、使用済みの培養培地を新鮮な培養培地で置き換えることが望ましい。新鮮な培地を使用することの１つの利点は、細胞が、従来の技法に従ってフィーダー細胞上で培養した場合、または馴化培地中で培養した場合よりも、均一かつ迅速に拡大増殖するように、条件を調整する能力である。

【００６８】

以前の出発細胞集団と比較した場合、４倍、１０倍、２０倍、５０倍、１００倍、１０００倍またはそれよりも大きく拡大増殖されたＧＭＰの集団が得られ得る。適切な条件下では、拡大増殖された集団中の細胞は、培養を開始するために使用したＧＭＰと比較して、５０％、７０％またはそれよりも多くが未分化状態である。１継代当たりの拡大増殖の程度は、培養の終了時に回収された細胞のおおよその数を、培養物中に元々播種された細胞のおおよその数によって除算することによって計算され得る。成長環境の幾何学が限定的である場合、または他の理由のために、細胞は、さらなる拡大増殖のために、類似の成長環境中に必要に応じて継代され得る。総拡大増殖は、継代の各々における全ての拡大増殖の積である。もちろん、各継代で拡大増殖された全ての細胞を保持する必要はない。例えば、細胞が各培養物中で２倍拡大増殖するが、細胞の約５０％だけが各継代で保持される場合、およそ同じ数の細胞が、次に進められる。しかし、４回の培養の後、細胞は、１６倍の拡大増殖を受けたと言われる。細胞は、当該分野で公知の極低温凍結技法によって貯蔵され得る。

【００６９】

本明細書でより詳細に示されるように、ＧＭＰは、増殖因子（例えば、ＳＣＦ）、Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤（例えば、ＧＤＣ－０８７９）、Ｍｎｋ１／２を阻害する薬剤、ＰＩ３Ｋ経路を阻害する薬剤、および必要に応じて、１つまたは複数の血清構成要素が含まれるがこれらに限定されない因子および薬剤の組み合わせを含む培養培地中で成長および拡大増殖され得る。

【００７０】

本開示は、遺伝子操作技法を使用して、本明細書で開示されるＧＭＰを遺伝子改変する方法を提供する。特に、本開示のＧＭＰは、遺伝子改変技法に対して感受性であり、それにより、基礎的科学研究および臨床治療適用におけるＧＭＰの使用を可能にすることが、本明細書で示された。したがって、拡大増殖および遺伝子改変されたＧＭＰは、広い臨床適用へと容易に移転させることができる。したがって、本開示は、本明細書で開示されるＧＭＰを遺伝子改変する方法をさらに提供する。かかる方法は、遺伝子編集システム、相同組換えまたは部位特異的変異誘発を使用することによって、ＧＭＰ中に改変を遺伝子操

作するステップを含み得る。遺伝子編集システムの特定の例には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮおよびＣＲＩＳＰＲが含まれる。

【００７１】

ある特定の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムは、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムであり、Ｃａｓ酵素は、ＤＮＡ切断を触媒するＣａｓ９である。Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓに由来するＣａｓ９または任意の近縁のＣａｓ９による酵素作用は、２０ヌクレオチドのガイド配列にハイブリダイズし、２０ヌクレオチドの標的配列の後ろにプロトスペーサー－隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列（例には、本明細書に記載されるように決定され得るＮＧＧ／ＮＲＧまたはＰＡＭが含まれる）を有する標的部位配列において二本鎖切断を生成する。部位特異的ＤＮＡ認識および切断のためのＣａｓ９を介したＣＲＩＳＰＲ活性は、ガイド配列、ガイド配列に一部ハイブリダイズするｔｒａｃｒ配列、およびＰＡＭ配列によって規定される。ＣＲＩＳＰＲシステムのさらなる態様は、ＫａｒｇｉｎｏｖおよびＨａｎｎｏｎ、Ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ ｓｙｓｔｅｍ：ｓｍａｌｌ ＲＮＡ－ｇｕｉｄｅｄ ｄｅｆｅｎｓｅ ｉｎ ｂａｃｔｅｒｉａ ａｎｄ ａｒｃｈａｅａ、Ｍｏｌｅ Ｃｅｌｌ ２０１０年１月１５日；３７（１）：７に記載されている。

【００７２】

Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ ＳＦ３７０由来のＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座は、４つの遺伝子Ｃａｓ９、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２およびＣｓｎ１のクラスター、ならびに２つの非コードＲＮＡエレメント：ｔｒａｃｒＲＮＡ、および非反復配列の短い鎖（スペーサー、各々約３０ｂｐ）によって間隔をあけられた反復配列（ダイレクトリピート）の特徴的アレイを含有する。このシステムでは、標的化されたＤＮＡ二本鎖切断（ＤＳＢ）は、４つの逐次的なステップで生成される。最初に、２つの非コードＲＮＡであるｐｒｅ－ｃｒＲＮＡアレイおよびｔｒａｃｒＲＮＡが、ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座から転写される。第２に、ｔｒａｃｒＲＮＡは、ｐｒｅ－ｃｒＲＮＡのダイレクトリピートにハイブリダイズし、これは次いで、個々のスペーサー配列を含有する成熟ｃｒＲＮＡへとプロセシングされる。第３に、成熟ｃｒＲＮＡ：ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体は、ｃｒＲＮＡのスペーサー領域とプロトスペーサーＤＮＡとの間でのヘテロ二重鎖形成を介して、プロトスペーサーおよび対応するＰＡＭを含む標的配列にＣａｓ９を指向させる。最後に、Ｃａｓ９が、ＰＡＭの標的配列の切断を媒介して、プロトスペーサー内にＤＳＢを創出する。ある特定の実施形態では、ＲＮＡポリメラーゼＩｌｌベースのＵ６プロモーターは、ｔｒａｃｒＲＮＡの発現を駆動するためのものである。

【００７３】

典型的には、内因性ＣＲＩＳＰＲシステムに関して、ＣＲＩＳＰＲ複合体（標的配列にハイブリダイズし、１つまたは複数のＣａｓタンパク質と複合体化したガイド配列を含む）の形成は、標的配列中またはその近傍（例えば、標的配列から１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、５０またはそれよりも多くの塩基対以内）での一方または両方の鎖の切断を生じる。理論によって束縛されることは望まないが、野生型ｔｒａｃｒ配列の全てまたは一部分（例えば、野生型ｔｒａｃｒ配列の約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５もしくはそれよりも多くのヌクレオチド、または約２０、２６、３２、４５、４８、５４、６３、６７、８５もしくはそれよりも多くのヌクレオチドよりも多く）を含み得るまたはそれからなり得るｔｒａｃｒ配列もまた、例えば、ガイド配列に作動可能に連結されるｔｒａｃｒメイト配列の全てまたは一部分への、ｔｒａｃｒ配列の少なくとも一部分に沿ったハイブリダイゼーションによって、ＣＲＩＳＰＲ複合体の一部を形成し得る。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲシステムのエレメントの発現が、１つまたは複数の標的部位におけるＣＲＩＳＰＲ複合体の形成を指示するように、ＣＲＩＳＰＲシステムの１つまたは複数のエレメントの発現を駆動する１つまたは複数のベクターが、宿主細胞（例えば、ＧＭＰまたは幹細胞）中に導入される。例えば、Ｃａｓ酵素、ｔｒａｃｒメイト配列に連結されたガイド配列、およびｔｒａｃｒ配列は各々、別々のベクター上の別々の調節エレメントに作動可能に連結され得る。あるいは、同じまたは異なる調節エレメントから発現されるエレメントのうち２つ以上が、単一のベクター中で組

み合わされ得、１つまたは複数の追加のベクターが、第１のベクター中に含まれないＣＲＩＳＰＲシステムの任意の構成要素を提供する。単一のベクター中で組み合わされるＣＲＩＳＰＲシステムエレメントは、任意の適切な配向で配置され得る、例えば、１つのエレメントが、第２のエレメントに対して５’側に（第２のエレメントの「上流」に）または第２のエレメントに対して３’側に（第２のエレメントの「下流」に）位置し得る。１つのエレメントのコード配列は、第２のエレメントのコード配列の同じ鎖または対向鎖上に位置し得、同じ方向または対向方向で配向され得る。一部の実施形態では、単一のプロモーターが、ＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする転写物、ならびにガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列（必要に応じて、ガイド配列に作動可能に連結される）、および１つまたは複数のイントロン配列内に包埋されたｔｒａｃｒ配列（例えば、各々が異なるイントロン中に、２つ以上が少なくとも１つのイントロン中に、または全てが単一のイントロン中に）のうち１つまたは複数の発現を駆動する。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素、ガイド配列、ｔｒａｃｒメイト配列およびｔｒａｃｒ配列は、同じプロモーターに作動可能に連結され、同じプロモーターから発現される。

【００７４】

一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ発現ベクターは、１つまたは複数の挿入部位、例えば、制限エンドヌクレアーゼ認識配列（「クローニング部位」とも呼ばれる）を含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の挿入部位（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個もしくはそれよりも多くの挿入部位、または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０個もしくはそれよりも多くの挿入部位よりも多く）が、１つまたは複数のベクターの１つまたは複数の配列エレメントの上流および／または下流に位置する。一部の実施形態では、挿入部位中へのガイド配列の挿入後、および発現の際に、ガイド配列が、真核生物細胞（例えば、ＧＭＰまたは幹細胞）中の標的配列へのＣＲＩＳＰＲ複合体の配列特異的結合を指示するように、ベクターは、ｔｒａｃｒメイト配列の上流、かつ必要に応じて、ｔｒａｃｒメイト配列に作動可能に連結された調節エレメントの下流に、挿入部位を含む。一部の実施形態では、ベクターは、２つ以上の挿入部位を含み、各挿入部位は、各部位におけるガイド配列の挿入を可能にするために、２つのｔｒａｃｒメイト配列間に位置する。かかる配置では、２つ以上のガイド配列は、２コピー以上の単一のガイド配列、２つ以上の異なるガイド配列、またはこれらの組み合わせを含み得る。複数の異なるガイド配列が使用される場合、単一の発現構築物が、細胞内の複数の異なる対応する標的配列へとＣＲＩＳＰＲ活性を標的化するために使用され得る。例えば、単一のベクターは、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０もしくはそれよりも多くのガイド配列、または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０もしくはそれよりも多くのガイド配列よりも多くを含み得る。一部の実施形態では、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０もしくはそれよりも多くのかかるガイド配列含有ベクター、または約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０もしくはそれよりも多くのかかるガイド配列含有ベクターよりも多くが提供され得、必要に応じて、細胞に送達され得る。

【００７５】

一部の実施形態では、ベクターは、ＣＲＩＳＰＲ酵素、例えば、Ｃａｓタンパク質をコードする酵素コード配列に作動可能に連結された調節エレメントを含む。Ｃａｓタンパク質の非限定的な例には、Ｃａｓ１、Ｃａｓ１Ｂ、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９（Ｃｓｎ１およびＣｓｘ１２としても公知）、Ｃａｓ１０、Ｃｓｙ１、Ｃｓｙ２、Ｃｓｙ３、Ｃｓｅ１、Ｃｓｅ２、Ｃｓｃ１、Ｃｓｃ２、Ｃｓａ５、Ｃｓｎ２、Ｃｓｍ２、Ｃｓｍ３、Ｃｓｍ４、Ｃｓｍ５、Ｃｓｍ６、Ｃｍｒ１、Ｃｍｒ３、Ｃｍｒ４、Ｃｍｒ５、Ｃｍｒ６、Ｃｓｂ１、Ｃｓｂ２、Ｃｓｂ３、Ｃｓｘ１７、Ｃｓｘ１４、Ｃｓｘ１０、Ｃｓｘ１６、ＣｓａＸ、Ｃｓｘ３、Ｃｓｘ１、Ｃｓｘ１５、Ｃｓｆ１、Ｃｓｆ２、Ｃｓｆ３、Ｃｓｆ４、それらのホモログ、またはそれらの改変バージョンが含まれる。一部の実施形態では、未改変のＣＲＩＳＰＲ酵素、例えば、Ｃａｓ９は、ＤＮＡ切断活性を有する。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配

列の位置、例えば、標的配列内および／または標的配列の相補体内において、一方または両方の鎖の切断を指示する。一部の実施形態では、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、標的配列の最初または最後のヌクレオチドから約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、５０、１００、２００、５００またはそれよりも多くの塩基対以内での、一方または両方の鎖の切断を指示する。一部の実施形態では、ベクターは、変異したＣＲＩＳＰＲ酵素が、標的配列を含有する標的ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を切断する能力を欠如するように、対応する野生型酵素に関して変異したＣＲＩＳＰＲ酵素をコードする。例えば、Ｓ．ｐｙｏｇｅｎｅｓ由来のＣａｓ９のＲｕｖＣ　Ｉ触媒ドメイン中のアスパラギン酸からアラニンへの置換（Ｄ１０Ａ）は、Ｃａｓ９を、両方の鎖を切断するヌクレアーゼから、ニッカーゼ（一本鎖を切断する）に変換する。Ｃａｓ９ａをニッカーゼにする変異の他の例には、限定なしに、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４ＡおよびＮ８６３Ａが含まれる。さらなる例として、Ｃａｓ９の２つ以上の触媒ドメイン（ＲｕｖＣ　Ｉ、ＲｕｖＣ　ＩＩ、およびＲｕｖＣ　ＩＩＩまたはＨＮＨドメイン）が、全てのＤＮＡ切断活性を実質的に欠如する変異したＣａｓ９を産生するために、変異され得る。一部の実施形態では、Ｄ１０Ａ変異は、全てのＤＮＡ切断活性を実質的に欠如するＣａｓ９を産生するために、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４ＡまたはＮ８６３Ａ変異のうち１つまたは複数と組み合わされる。一部の実施形態では、変異した酵素のＤＮＡ切断活性が、その非変異形態と比較して約２５％、１０％、５％、１％、０．１％、０．０１％未満またはそれよりも低い場合、ＣＲＩＳＰＲ酵素は、全てのＤＮＡ切断活性を実質的に欠如するとみなされる。酵素がＳｐＣａｓ９ではない場合、変異は、ＳｐＣａｓ９の１０位、７６２位、８４０位、８５４位、８６３位および／または９８６位に対応するいずれかまたは全ての残基においてなされ得る（これは、例えば、標準的な配列比較ツールによって確定され得る）。特に、以下の変異：Ｄ１０Ａ、Ｅ７６２Ａ、Ｈ８４０Ａ、Ｎ８５４Ａ、Ｎ８６３Ａおよび／またはＤ９８６Ａ、のいずれかまたは全てが、ＳｐＣａｓ９において好ましいだけでなく、置き換えアミノ酸のいずれかについての保存的置換もまた、想定される。他のＣａｓ９における対応する位置における同じもの（またはこれらの変異の保存的置換）もまた示される。

【００７６】

示されたオルソログもまた、本明細書に記載される。Ｃａｓ酵素は、Ｃａｓ９と同定され得るが、それは、これが、ＩＩ型ＣＲＩＳＰＲシステムの複数のヌクレアーゼドメインを有する最も大きいヌクレアーゼと相同性を共有する一般的なクラスの酵素を指し得るからである。最も好ましくは、Ｃａｓ９酵素は、ｓｐＣａｓ９もしくはｓａＣａｓ９由来である、またはそれに由来する。由来したとは、由来した酵素が、野生型酵素と高い程度の配列相同性を有するという意味で、野生型酵素に主に基づくが、本明細書に記載されるいくつかの方法で変異されている（改変されている）ことを意味する。

【００７７】

ＣａｓおよびＣＲＩＳＰＲ酵素という用語は、他が明らかでない限り、一般に、相互交換可能に本明細書で使用されることが理解される。上で言及したように、本明細書で使用される残基番号付けの多くは、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓのＩＩ型ＣＲＩＳＰＲ遺伝子座からのＣａｓ９酵素を指す。しかし、本開示が、他の種の微生物由来の多くのさらなるＣａｓ９、例えば、ＳｐＣａｓ９、ＳａＣａ９、Ｓｔ１Ｃａｓ９などを含むことが理解される。

【００７８】

遺伝子編集システム（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＣＲＩＳＰＲおよびＴＡＬＥＮ）が、改変をＧＭＰまたは幹細胞中に遺伝子操作するため、例えば、ＧＭＰまたは幹細胞中に見出される既存の遺伝子を置き換えまたは破壊する（ノックアウト）ために使用され得る。本明細書に提示される実施例に示されるように、本開示のＧＭＰは、ノックアウト変異に対して特に感受性である。さらに、追加のノックアウト、例えば、ＳＩＲＰα遺伝子ノックアウトおよび／またはＰＩ３Ｋγ遺伝子ノックアウトが、本開示のＧＭＰから容易に創出され得ると予想される。あるいは、同じ編集システム（例えば、ＣＲＩＳＰＲおよびＴＡＬＥＮ）が、その遺伝子座において見出されない配列情報を含有するよ

うに遺伝子座を変更するため（ノックイン変異）に使用され得る。かかる改変は、「獲得された機能」を有するＧＭＰを創出するために使用され得る。かかる改変されたＧＭＰは、例えば、疾患または障害に関連する生体分子を発現させることによって、病状を模倣するために特に有用である。

【００７９】

別の実施形態では、ＧＭＰ細胞は、ベクターを使用して操作される。例えば、本開示のＣＡＲは、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、スリーピングビューティートランスポゾン、ピギーバックトランスポゾンを使用することが含まれるがこれらに限定されないいくつもの技法を使用して、またはｍＲＮＡトランスフェクションによって、または上記方法の組み合わせを使用して、細胞中に導入され得る。ＣＡＲは、内因性プロモーター（例えば、ＴＣＲαまたはＴＣＲβプロモーター）の制御下にあるように発現され得る。一部の実施形態では、ＣＡＲは、外来プロモーター（例えば、ＣＭＶプロモーター）を使用して発現される。

【００８０】

一部の実施形態では、ＣＡＲをコードする核酸分子を導入することは、本明細書に記載されるように培養したＧＭＰ中に、ＣＡＲをコードする核酸分子を含むベクターを形質導入すること、またはＣＡＲをコードする核酸分子をトランスフェクトすることを含む。

【００８１】

一部の実施形態では、方法は、ａ）ＧＭＰの培養物を拡大増殖および維持するために培養されるＧＭＰの集団を提供するステップ；ｂ）ＣＡＲ構築物をコードする核酸を含むベクターをＧＭＰ中に導入するステップ；ならびにｃ）形質転換／トランスフェクトされたＧＭＰを培養するステップ、を含む。一部の実施形態では、方法は、ＧＭＰの、骨髄系およびリンパ系系統の血球への分化、例えば、単球、マクロファージ、顆粒球、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球の、血小板、Ｔ細胞、Ｂ細胞およびナチュラルキラー細胞への分化をさらに提供する。特定の実施形態では、本明細書で開示される方法は、ＧＭＰを、ＭＣＳＦを含むマクロファージ分化培地を用いて培養することによって、本開示のＧＭＰをマクロファージへと分化させるステップをさらに含む。なおさらなる実施形態では、マクロファージ分化培地は、ＲＰＭＩ　１６４０、１０％ＦＢＳおよび２０ｎｇ／ｍＬのＭＣＳＦを含む。代替的な実施形態では、本明細書で開示される方法は、ＧＭＰを、ＧＣＳＦを含む顆粒球分化培地を用いて培養することによって、本開示のＧＭＰを顆粒球へと分化させるステップをさらに含む。なおさらなる実施形態では、顆粒球分化培地は、ＲＰＭＩ　１６４０、１０％ＦＢＳおよび２０ｎｇ／ｍＬのＧＣＳＦを含む。

【００８２】

特定の実施形態では、本開示は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように顆粒球－マクロファージ前駆体（ＧＭＰ）を遺伝子操作する方法であって、ＣＡＲを含むベクターをＧＭＰ中に導入して、ＣＡＲを発現するＧＭＰ（ＣＡＲ－ＧＭＰ）を形成するステップ；ＣＡＲ－ＧＭＰを、規定された培養条件において複数回の継代にわたって拡大増殖および培養して、ＣＡＲ－ＧＭＰの集団を生成するステップ；およびＣＡＲ－ＧＭＰの集団を、顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞に分化するようにｉｎ　ｖｉｔｒｏで誘導するステップであって、顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞がＣＡＲを発現する、ステップを含む方法を提供する。さらなる実施形態では、ＧＭＰは、幹細胞から得られる。なおさらなる実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞である。別の実施形態では、造血幹細胞は、対象の骨髄から単離される。なお別の実施形態では、対象は、哺乳動物対象である。さらなる実施形態では、対象は、ヒト患者である。なおさらなる実施形態では、ＣＡＲは、抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに、顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞の抗腫瘍活性を、それらの貪食および／または炎症促進性サイトカイン分泌を増加させることによって増加させるように設計された少なくとも１つの細胞内ドメインを含む。別の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。なお別の実施形態では、ウイルスベクターは、複製性または非複製性であり得、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター、麻疹ベクター、ヘルペスベクター

、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、レオウイルスベクター、セネカバレーウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、パルボウイルスベクターまたはアルファウイルスベクターであり得る。ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。別の実施形態では、規定された培養条件は、ＣＡＲ－ＧＭＰを、（ｉ）増殖因子、（ｉｉ）Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤、ならびに（ｉｉｉ）Ｗｎｔ活性化因子および／またはＧＳＫ－３阻害剤を含む培養培地中で培養することを含み、ＣＡＲ－ＧＭＰは、複数回の細胞継代および／またはクローン性拡大増殖を受けた後に、形態学的に実質的に未変化のままである。さらなる実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を含む。なおさらなる実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約５：１～約１：５の比率で含む。別の実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約１：１の比率で含む。なお別の実施形態では、培養培地は、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）フラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよび／またはリノレン酸から選択される１つまたは複数の補充剤を含む。さらなる実施形態では、培養培地には、インスリン、トランスフェリン、ＢＳＡフラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよびリノレン酸が補充される。ある特定の実施形態では、増殖因子は、幹細胞因子（ＳＣＦ）である。別の実施形態では、Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤は、ＧＤＣ－０８７９、ＰＬＸ４０３２、ＧＳＫ２１１８４３６、ＢＭＳ－９０８６６２、ＬＧＸ８１８、ＰＬＸ３６０３、ＲＡＦ２６５、ＲＯ５１８５４２６、ベムラフェニブ、ＰＬＸ８３９４、ＳＢ５９０８８５およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。なお別の実施形態では、Ｗｎｔ活性化因子は、ＳＫＬ　２００１、ＢＭＬ－２８４、ＷＡＹ　２６２６１１、ＣＡＳ　８５３２２０－５２－７、ＱＳ１１およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。さらなる実施形態では、ＧＳＫ－３阻害剤は、ＣＨＩＲ９９０２１、ＣＨＩＲ９８０１４、ＳＢ２１６７６３、ＢＩＯ、Ａ１０７０７２２、ＡＲ－Ａ０１４４１８およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。別の実施形態では、規定された培養条件は、ＣＡＲ－ＧＭＰを、（ｉ）増殖因子；（ｉｉ）Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤；（ｉｉｉ）マイトジェン活性化キナーゼ相互作用タンパク質キナーゼ１および２（Ｍｎｋ１／２）を阻害する薬剤；（ｉｖ）ＰＩ３Ｋ経路を阻害する薬剤；（ｖ）必要に応じて、１つまたは複数の血清構成要素を含む培養培地中で培養することを含み；ＣＡＲ－ＧＭＰは、複数回の細胞継代および／またはクローン性拡大増殖を受けた後に、形態学的に実質的に未変化のままである。さらなる実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を含む。なおさらなる実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約５：１～約１：５の比率で含む。別の実施形態では、培養培地は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２および神経基本培地を、約１：１の比率で含む。なお別の実施形態では、培養培地は、インスリン、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）フラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよび／またはリノレン酸から選択される１つまたは複数の補充剤を含む。さらなる実施形態では、培養培地には、インスリン、トランスフェリン、ＢＳＡフラクションＶ、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、ＤＬ－αトコフェロールおよびリノレン酸が補充される。なおさらなる実施形態では、増殖因子は、幹細胞因子（ＳＣＦ）である。別の実施形態では、Ｂ－Ｒａｆキナーゼ阻害剤は、ＧＤＣ－０８７９、ＰＬＸ４０３２、ＧＳＫ２１１８４３６、ＢＭＳ－９０８６６２、ＬＧＸ８１８、ＰＬＸ３６０３、ＲＡＦ２６５、ＲＯ５１８５４２６、ベムラフェニブ、ＰＬＸ８３９４、ＳＢ５９０８８５およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【００８３】

さらなる実施形態では、Ｍｎｋ１／２を阻害する薬剤は、ＣＧＰ－５７３８０、セルコスポラミド、ＢＡＹ　１１４３２６９、トミボセルチブ、ＥＴＣ－２０６、ＳＬＶ－２４３６およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。なおさらなる実施形態では、ＰＩ３Ｋ経路を阻害する薬剤は、３－メチルアデニン、ＬＹ２９４００２、アルペ

リシブ、ワートマニン、ケルセチン、ｈＳＭＧ－１阻害剤１１ｊ、ザンデリシブ、アルペリシブ塩酸塩、イデラリシブ、ブパリシブ、コパンリシブ、ＩＰＩ５４９、ダクトリシブ、ピクチリシブ、ＳＡＲ４０５、デュベリシブ、フィメピノスタット、ＧＤＣ－００７７、ＰＩ－１０３、ＹＭ－２０１６３、ＰＦ－０４６９１５０２、タセリシブ、オミパリシブ、サモトリシブ、イソラムネチン、ＺＡＴＫ４７４、パルサクリシブ、リゴサチブ、ＡＺＤ８１８６、ＧＳＫ２６３６７７１、ジシテルチド、ＴＧ１００－１１５、ＡＳ－６０５２４０、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－１、ダクトリシブトシル酸塩、ゲダトリシブ、ＴＧＸ－２２１、ウムブラリシブ、ＡＺＤ　６４８２、セラベリシブ、ビミラリシブ、アピトリシブ、アルファ－リノレン酸、Ｖｐｓ３４－ＰＩＫ－ＩＩＩ、ＰＩＫ－９３、Ｖｐｓ３４－ＩＮ－１、ＣＨ５１３２７９９、レニオリシブ、ボクスタリシブ、ＧＳＫ１０５９６１５、ソノリシブ、ＰＫＩ－４０２、ＰＩ４ＫＩＩＩベータ－ＩＮ－９、ＨＳ－１７３、ＢＧＴ２２６マレイン酸塩、ピクチリシブジメタンスルホン酸塩、ＶＳ－５５８４、ＩＣ－８７１１４、ケルセチン二水和物、ＣＮＸ－１３５１、ＳＦ２５２３、ＧＤＣ－０３２６、セレタリシブ、アカリシブ、ＳＡＲ－２６０３０１、ＺＡＤ－８８３５、ＧＮＥ－３１７、ＡＭＧ３１９、ネミラリシブ、ＩＩＴＺ－０１、ＰＩ－１０３塩酸塩、オロキシンＢ、ピラリシブ、ＡＳ－２５２４２４、クパンリシブ二塩酸塩、ＡＭＧ　５１１、ジシテルチドＴＦＡ、ＰＩＫ－９０、テナリシブ、エスクレチン、ＣＧＳ　１５９４３、ＧＮＥ－４７７、ＰＩ－３０６５、Ａ６６、ＡＺＤ３４５８、ジンセノサイドＲｋ１、ソフォカルピン、ブパリシブ塩酸塩、Ｖｐｓ３４－ＩＮ－２、リンペルリシブ、アルニコリドＤ、ＫＰ３７２－１、ＣＺＣ２４８３２、ＰＦ－４９８９２１６、（Ｒ）－デュベリシブ、ＰＱＲ５３０、Ｐ１１δ－ＩＮ－１、ウムブラリシブ塩酸塩、ＭＴＸ－２１１、ＰＩ３Ｋ／ｍＴＯＲ阻害剤－２、ＬＸ２３４３、ＰＦ－０４９７９０６４、ポリガラサポニンＦ、グラウコカリシンＡ、ＮＳＣ７８１４０６、ＭＳＣ２３６０８４４、ＣＡＹ１０５０５、ＩＰＩ－３０６３、ＴＧ　１００７１３、ＢＥＢＴ－９０８、ＰＩ－８２８、ブレビアナミドＦ、ＥＴＰ－４６３２１、ＰＩＫ－２９４、ＳＲＸ３２０７、ソフォカルピン一水和物、ＡＳ－６０４８５０、デスメチルグリシテイン、ＳＫＩ　Ｖ、ＷＹＥ－６８７、ＮＶＰ－ＱＡＶ－５７２、ＧＮＥ－４９３、ＣＡＬ－１３０塩酸塩、ＧＳ－９９０１、ＢＧＴ２２６、ＩＨＭＴ－ＰＩ３Ｋδ－３７２、ＰＩ３Ｋα－ＩＮ－４、パルサクリシブ塩酸塩、ＰＦ－０６８４３１９５、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－６、（Ｓ）－ＰＩ３Ｋα－ＩＮ－４、ＰＩ３Ｋ（ガンマ）－ＩＮ－８、ＢＡＹ１０８２４３９、ＣＹＨ３３、ＰＩ３Ｋγ阻害剤２、ＰＩ３Ｋδ阻害剤１、ＰＡＲＰ／ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－１、ＬＡＳ１９１９５４、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－９、ＣＨＭＦＬ－ＰＩ３ＫＤ－３１７、ＰＩ３Ｋ／ＨＤＡＣ－ＩＮ－１、ＭＳＣ２３６０８４４ヘミフマル酸塩、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－２、ＰＩ３Ｋ／ｍＴＯＲ阻害剤－１、ＰＩ３Ｋδ－ＩＮ－１、オイスカフ酸、ＫＵ－００６０６４８、ＡＺＤ　６４８２、ＷＹＥ－６８７二塩酸塩、ＧＳＫ２２９２７６７、（Ｒ）－ウムブラリシブ、ＰＩＫ－２９３、イデラリシブＤ５、ＰＩＫ－７５、ヒルステノン、ケルセチンＤ５、ＰＩＫ－１０８、ｈＳＭＧ－１阻害剤１１ｅ、ＰＩ３Ｋ－ＩＮ－１０、ＮＶＰ－ＢＡＧ９５６、ＰＩ３Ｋγ阻害剤１、ＣＡＬ－１３０、ＯＮ　１４６０４０、ＰＩ３ｋδ阻害剤１、ＰＩ３Ｋα／ｍＴＯＲ－ＩＮ－１、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。別の実施形態では、ＣＡＲ－ＧＭＰは、マクロファージに分化するように誘導され、これは、ＣＡＲ－ＧＭＰを、マクロファージコロニー刺激因子（ＭＣＳＦ）を含むマクロファージ分化培地を用いて培養することを含み、マクロファージは、ＣＡＲを発現する。なお別の実施形態では、マクロファージ分化培地は、ＲＰＭＩ　１６４０、胎仔ウシ血清（ＦＢＳ）およびＭＣＳＦを含む。代替的な実施形態では、方法は、ＣＡＲ－ＧＭＰを顆粒球に分化させるステップをさらに含み、これは、ＧＭＰを、顆粒球コロニー刺激因子（ＧＣＳＦ）を含む顆粒球分化培地を用いて培養することを含み、顆粒球は、ＣＡＲを発現する。さらなる実施形態では、顆粒球分化培地は、ＲＰＭＩ　１６４０、ＦＢＳおよびＧＣＳＦを含む。

【００８４】

本明細書で提示される研究では、ｅｘ　ｖｉｖｏで拡大増殖されたＧＭＰを、高い効率および特異性でがん細胞を標的化するＣＡＲ－マクロファージを産生するように操作する

ことができることが見出された。したがって、本開示は、がん免疫治療の使用のために、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を発現するように顆粒球－マクロファージ前駆体（ＧＭＰ）を遺伝子操作する方法を提供する。キメラ抗原受容体は、抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび少なくとも１つの細胞内ドメインを含む。細胞内ドメインは、顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞の抗腫瘍活性を、それらの貪食および／または炎症促進性サイトカイン分泌を増加させることによって増加させるように設計される。ＣＡＲ－ＧＭＰは、拡大増殖され、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏで顆粒球、マクロファージまたは樹状細胞に分化するように誘導され得る。ＣＡＲ－ＧＭＰまたはそれらの誘導体である顆粒球、マクロファージおよび樹状細胞は、患者中に養子移入され、患者において、これらは、腫瘍に浸潤し、標的細胞を死滅させることによって、強力な免疫エフェクターとして作用する。

【００８５】

ＣＡＲ－ＧＭＰは、がんを有する対象を処置するために、１つまたは複数の抗がん剤と組み合わせてさらに投与され得る。本明細書で開示されるＣＡＲ－ＧＭＰと共に使用され得る抗がん剤の例には、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）シクロホスファミド；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン（ｐｉｐｏｓｕｌｆａｎ）；アジリジン、例えば、ベンゾドパ（ｂｅｎｚｏｄｏｐａ）、カルボコン、メツレドパ（ｍｅｔｕｒｅｄｏｐａ）およびウレドパ（ｕｒｅｄｏｐａ）；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチイレンチオホスホラミド（ｔｒｉｅｔｈｉｙｌｅｎｅｔｈｉｏｐｈｏｓｐｈｏｒａｍｉｄｅ）およびチイメチローロメラミン（ｔｉｉｍｅｔｈｙｌｏｌｏｍｅｌａｍｉｎｅ）が含まれるエチレンイミンおよびメチラメラミン（ｍｅｔｈｙｌａｍｅｌａｍｉｎｅ）；アセトゲニン（例えば、ブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成アナログトポテカンが含まれる）；ブリオスタチン；カリスタチン（ｃａｌｌｙｓｔａｔｉｎ）；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビセレシン合成アナログが含まれる）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログＫＷ－２１８９およびＣＢ１－ＴＭ１が含まれる）；エリュテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン（ｓａｒｃｏｄｉｃｔｙｉｎ）；スポンジスタチン（ｓｐｏｎｇｉｓｔａｔｉｎ）；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（ｃｈｏｌｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビシン（ｎｏｖｅｍｂｉｃｈｉｎ）、フェネステリン（ｐｈｅｎｅｓｔｅｒｉｎｅ）、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロウレア（ｎｉｔｒｏｓｕｒｅａ）、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチン（ｒａｎｉｍｎｕｓｔｉｎｅ）；ビンカアルカロイド；エピポドフィロトキシン；抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシンガンマｌｌおよびカリケアマイシンオメガｌｌ；Ｌ－アスパラギナーゼ；アントラセンジオン置換尿素；メチルヒドラジン誘導体；ダイネミシンＡが含まれるダイネミシン；ビスホスホネート、例えば、クロドロネート；エスペラミシン；ならびにネオカルチノスタチンクロモフォアおよび関連の色素タンパク質エンジイン抗生物質（ａｎｔｉｏｂｉｏｔｉｃ）クロモフォア）、アクラシノマイシン（ａｃｌａｃｉｎｏｍｙｓｉｎ）、アクチノマイシン、アウトラマイシン（ａｕｔｈｒａｍｙｃｉｎ）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン（ｃａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）、カラビシン（ｃａｒａｂｉｃｉｎ）、カルミノマイシン、カルジノフィリン（ｃａｒｚｉｎｏｐｈｉｌｉｎ）、クロモマイシニス（ｃｈｒｏｍｏｍｙｃｉｎｉｓ）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン（ｄｅｔｏｒｕｂｉｃｉｎ）、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（登録商標）ドキソルビシン（モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ（ｐｙｒｒｏｌｉｎｏ）－ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンが含まれる）、エピルビシン、エソルビシン（ｅｓｏｒｕｂｉｃｉｎ

）、イダルビシン、マルセロマイシン（ｍａｒｃｅｌｌｏｍｙｃｉｎ）、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンＣ、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（ｐｏｔｆｉｒｏｍｙｃｉｎ）、ピューロマイシン、ケラマイシン（ｑｕｅｌａｍｙｃｉｎ）、ロドルビシン（ｒｏｄｏｒｕｂｉｃｉｎ）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキサートおよび５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）；葉酸アナログ、例えば、デノプテリン（ｄｅｎｏｐｔｅｒｉｎ）、メトトレキサート、プテロプテリン（ｐｔｅｒｏｐｔｅｒｉｎ）、トリメトレキサート；プリンアナログ、例えば、フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン（ｔｈｉａｍｉｐｒｉｎｅ）、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えば、アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、ドロモスタノロンプロピオン酸塩、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補給剤（ｒｅｐｌｅｎｉｓｈｅｒ）、例えば、フロリン酸（ｆｒｏｌｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）；アセグラトン；アルドホスファミド（ａｌｄｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）グリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル（ｂｅｓｔｒａｂｕｃｉｌ）；ビサントレン；エダトラキサート（ｅｄａｔｒａｘａｔｅ）；デフォファミン（ｄｅｆｏｆａｍｉｎｅ）；デメコルチン；ジアジコン（ｄｉａｚｉｑｕｏｎｅ）；エルフォルニチン（ｅｌｆｏｒｎｉｔｈｉｎｅ）；エリプチニウム（ｅｌｌｉｐｔｉｎｉｕｍ）酢酸塩；エポチロン；エトグルシド；ガリウム硝酸塩；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン（ｌｏｎｉｄａｉｎｉｎｅ）；マイタンシノイド、例えば、マイタンシンおよびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール（ｍｏｐｉｄａｎｍｏｌ）；ニチアエリン（ｎｉｔｉａｅｒｉｎｅ）；ペントスタチン；フェナメット（ｐｈｅｎａｍｅｔ）；ピラルビシン；ロソキサンチオン（ｌｏｓｏｘａｎｔｉｏｎｅ）；ポドフィリン酸（ｐｏｄｏｐｈｙｌｌｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）多糖複合体（ＪＨＳ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、Ｏｒｅｇ．）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２　２”－トリクロロチイエチルアミン（２，２　２”－ｔｒｉｃｈｌｏｒｏｔｉｉｅｔｈｙｌａｍｉｎｅ）；トリコテセン（特に、Ｔ－２トキシン、ベラクリン（ｖｅｒｒａｃｕｒｉｎ）Ａ、ロリジンＡおよびアングイジン（ａｎｇｕｉｄｉｎｅ））；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（ｇａｃｙｔｏｓｉｎｅ）；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、ＴＡＸＯＬ（登録商標）パクリタキセル（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ、Ｎ．Ｊ．）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ（登録商標）Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒフリーの、パクリタキセルのアルブミン操作されたナノ粒子製剤（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｐａｒｔｎｅｒｓ、Ｓｃｈａｕｍｂｅｒｇ、Ｉｌｌ．）およびＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）（ドセタキセル）（Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ　Ｒｏｒｅｒ、Ａｎｔｏｎｙ、Ｆｒａｎｃｅ）；クロランブシル（ｃｈｌｏｒａｎｂｕｃｉｌ）；ＧＥＭＺＡＲ（登録商標）（ゲムシタビン）；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金配位錯体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標）ビノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ｘｅｌｏｄａ；イバンドロネート；イリノテカン（例えば、ＣＰＴ－１１）；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ　２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＦＭＯ）；レチノイド、例えば、レチノイン酸；カペシタビン；ロイコボリン（ＬＶ）；イレノテカン（ｉｒｅｎｏｔｅｃａｎ）；副腎皮質抑制薬；副腎皮質ステロイド；プロゲスチン；エストロゲン；アンドロゲン；ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ；ならびに上述のいずれかの薬学的に許

容される塩、酸または誘導体が含まれるがこれらに限定されない。腫瘍に対するホルモンの作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）タモキシフェンが含まれる）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン（ｔｒｉｏｘｉｆｅｎｅ）、ケオキシフェン（ｋｅｏｘｉｆｅｎｅ）、ＬＹ１１７０１８、オナプリストンおよびＦＡＲＥＳＴＯＮ－トレミフェンなどが含まれる、抗エストロゲン薬および選択的エストロゲン受容体モジュレーター（ＳＥＲＭ）；副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、ＭＥＧＡＳＥ（登録商標）酢酸メゲストロール、ＡＲＯＭＡＳＬ（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタニエ（ｆｏｒｍｅｓｔａｎｉｅ）、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標）ボロゾール、ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）レトロゾールおよびＡＲＴＭＩＤＥＸ（登録商標）アナストロゾールなど；ならびに抗アンドロゲン薬、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、リュープロリドおよびゴセレリン；ならびにトロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な（ａｂｈｅｒａｎｔ）細胞増殖に関与するシグナル伝達経路中の遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、ＰＫＣ－アルファ、ＲａｌｆおよびＨ－Ｒａｓなど；リボザイム、例えば、ＶＥＧＦ－Ａ発現阻害剤（例えば、ＡＮＧＩＯＺＹＭＥ（登録商標）リボザイム）およびＨＥＲ２発現阻害剤；ワクチン、例えば、遺伝子治療ワクチン、例えば、ＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチンおよびＶＡＸＩＤ（登録商標）ワクチン；ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ（登録商標）ｒＪＬ－２；ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（登録商標）トポイソメラーゼ１阻害剤；ＡＢＡＲＥＬＬＸ（登録商標）ｒｍＲＨ；抗体、例えば、トラスツズマブ、ならびに上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体もまた、含まれる抗がん剤である。

【００８６】

他の型の細胞免疫治療、例えば、ＣＡＲ－Ｔ治療を上回る、このＧＭＰベースのがん免疫治療のいくつかの利点が存在する。ＧＭＰの長期拡大増殖は、免疫治療のための既製のＣＡＲ－マクロファージを産生する機会を提供する。既製のＣＡＲ－マクロファージの臨床適用における主要なハードルは、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）適合性である。ＧＭＰを長期拡大増殖および遺伝子操作する能力は、免疫治療のための既製のＣＡＲ－マクロファージを生成するための健康なドナーおよび／または臍帯血から収集されたＧＭＰのマスター細胞バンクの樹立を可能にする。あるいは、ＨＬＡ－ユニバーサルなＧＭＰが、上記の遺伝子改変技法を使用して生成され得る。ＧＭＰの長期拡大増殖は、これらの細胞をより治療的に適用可能なものにするための、ＧＭＰに対する洗練された多重遺伝子操作を可能にする。例えば、シグナル調節タンパク質－α（ＳＩＲＰα）およびホスファチジルイノシトール３－キナーゼ－γ（ＰＩ３Ｋγ）遺伝子は、ＧＭＰ由来ＣＡＲ－マクロファージの抗腫瘍活性をさらに増強するためにノックアウトされ得る。マクロファージにおけるＳＩＲＰαノックアウトは、腫瘍細胞とマクロファージとの間でのＣＤ４７－ＳＩＲＰα相互作用を破壊することによって、それらの抗腫瘍活性を増強すると予想される。ＰＩ３Ｋγは、マクロファージにおいて豊富に発現され、免疫の刺激（Ｍ１マクロファージ）と抑制（Ｍ２マクロファージ）との間でのマクロファージ切り換えを直接制御する。マクロファージにおけるＰＩ３Ｋγの活性化は、炎症および腫瘍成長の間の免疫抑制を促進する転写プログラムを誘導するが、マクロファージＰＩ３Ｋγの不活性化は、免疫刺激性転写プログラムを促進する。ＰＩ３Ｋγ－／－マクロファージは、免疫刺激性Ｍ１表現型へと極性化することによって、増強された抗腫瘍活性を有すると予想される。

【００８７】

遺伝子操作されたＧＭＰの養子移入は、免疫抑制的腫瘍微小環境（ＴＭＥ）を逆転させる潜在力を有する。腫瘍関連マクロファージ（ＴＡＭ）は、ＴＭＥの主要な構成要素を構成する。実験的研究および臨床研究により、ＴＡＭの大多数が、腫瘍細胞がナチュラルキラー（ＮＫ）およびＴ細胞によって攻撃されるのを防止する免疫抑制的Ｍ２マクロファージであることが見出された。これらの観察は、最大限の抗腫瘍効果を達成するために、他

の免疫治療と組み合わせて、ＴＡＭを標的化する必要性を示唆している。１つの戦略は、免疫抑制的Ｍ２マクロファージに、抗腫瘍活性を有する免疫刺激性Ｍ１マクロファージを補給することである。これは、ＴＡＭを枯渇させることと、その後の、ＰＩ３Ｋγ－／－ＧＭＰまたはＩＬ－１２を過剰発現するＧＭＰから生成された免疫刺激性Ｍ１マクロファージの養子移入とによって、達成され得る。ＩＬ－１２を発現する単球およびマクロファージは、ＴＭＥを免疫抑制性から免疫刺激性に変化させることが示されている。

【００８８】

ＧＭＰは、ＣＡＲ－Ｔ細胞よりも完全かつロバストな免疫応答を開始させる潜在力を有するマクロファージを産生するように操作され得る。マクロファージは、炎症性サイトカインの分泌、がん細胞の貪食、ならびにより重要なことには、がん抗原のプロセシングならびにＮＫおよびＴ細胞へのその提示を介して、それらの抗腫瘍活性を示す。マクロファージは、専門の抗原提示細胞（ＡＰＣ）である。マクロファージによって活性化された内因性ＮＫおよびＴ細胞は、高い選択性および効率で免疫応答を開始させる可能性が高い。したがって、遺伝子操作を介してＧＭＰ／マクロファージの力を利用することは、次世代がん免疫治療を開発するための有望なアプローチを示す。

【００８９】

本開示は、対象における疾患関連抗原の発現に関連する疾患を処置または予防する方法であって、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むＧＭＰ（またはそれに由来するマクロファージ、顆粒球など）の有効量を対象に投与するステップを含み、ＣＡＲが、疾患に関連する疾患関連抗原に結合する抗原結合ドメインを含み、当該疾患関連抗原が、ＣＤ５、ＣＤ１９；ＣＤ１２３；ＣＤ２２；ＣＤ３０；ＣＤ１７１；ＣＳ－１（ＣＤ２サブセット１、ＣＲＡＣＣ、ＳＬＡＭＦ７、ＣＤ３１９および１９Ａ２４とも呼ばれる）；Ｃ型レクチン様分子－１（ＣＬＬ－１またはＣＬＥＣＬ１）；ＣＤ３３；上皮増殖因子受容体バリアントＩＩＩ（ＥＧＦＲｖｉｉｉ）；ガングリオシドＧ２（ＧＤ２）；ガングリオシドＧＤ３（ａＮｅｕ５Ａｃ（２－８）ａＮｅｕ５Ａｃ（２－３）ｂＤＧａｌｐ（ｌ－４）ｂＤＧｌｃｐ（ｌ－ｌ）Ｃｅｒ）；ＴＮＦ受容体ファミリーメンバーＢ細胞成熟化（ＢＣＭＡ）；Ｔｎ抗原（（Ｔｎ　Ａｇ）または（ＧａｌＮＡｃα－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ））；前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体１（ＲＯＲ１）；Ｆｍｓ様チロシンキナーゼ３（ＦＬＴ３）；腫瘍関連糖タンパク質７２（ＴＡＧ７２）；ＣＤ３８；ＣＤ４４ｖ６；急性白血病またはリンパ腫では発現されるが、造血前駆体上では発現されない糖鎖付加されたＣＤ４３エピトープ、非造血がん上で発現される糖鎖付加されたＣＤ４３エピトープ、癌胎児抗原（ＣＥＡ）；上皮細胞接着分子（ＥＰＣＡＭ）；Ｂ７Ｈ３（ＣＤ２７６）；ＫＩＴ（ＣＤ１１７）；インターロイキン－１３受容体サブユニットアルファ－２（ＩＬ－１３Ｒａ２またはＣＤ２１３Ａ２）；メソテリン；インターロイキン１１受容体アルファ（ＩＬ－ｌｌＲａ）；前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ）；プロテアーゼセリン２１（テスティシン（Ｔｅｓｔｉｓｉｎ）またはＰＲＳＳ２１）；血管内皮増殖因子受容体２（ＶＥＧＦＲ２）；ルイス（Ｙ）抗原；ＣＤ２４；血小板由来増殖因子受容体ベータ（ＰＤＧＦＲ－ベータ）；ステージ特異的胎児抗原－４（ＳＳＥＡ－４）；ＣＤ２０；葉酸受容体アルファ；受容体チロシン－タンパク質キナーゼＥＲＢＢ２（Ｈｅｒ２／ｎｅｕ）；ムチン１、細胞表面会合（ＭＵＣ１）；上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）；神経細胞接着分子（ＮＣＡＭ）；プロスターゼ（Ｐｒｏｓｔａｓｅ）；前立腺酸性ホスファターゼ（ＰＡＰ）；伸長因子２変異型（ＥＬＦ２Ｍ）；エフリンＢ２；線維芽細胞活性化タンパク質アルファ（ＦＡＰ）；インスリン様増殖因子１受容体（ＩＧＦ－Ｉ受容体）、炭酸脱水酵素ＩＸ（ＣＡｌＸ）；プロテアソーム（プロソーム（Ｐｒｏｓｏｍｅ）、マクロペイン（Ｍａｃｒｏｐａｉｎ））サブユニット、ベータ型、９（ＬＭＰ２）；糖タンパク質１００（ｇｐｌ００）；ブレークポイントクラスター領域（ＢＣＲ）およびエーベルソンマウス白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ１（Ａｂｌ）からなる癌遺伝子融合タンパク質（ｂｃｒ－ａｂｌ）；チロシナーゼ；エフリンＡ型受容体２（ＥｐｈＡ２）；フコシルＧＭ１；シアリルルイス接着分子（ｓＬｅ）；ガングリオシドＧＭ３（ａＮｅｕ５Ａｃ（２－３）ｂＤＣｌａｌｐ（ｌ－４）ｂＤＧｌｃｐ（ｌ－１）Ｃｅｒ）；トランスグル

タミナーゼ５（ＴＧＳ５）；高分子量黒色腫関連抗原（ＨＭＷＭＡＡ）；ｏ－アセチル－ＧＤ２ガングリオシド（ＯＡｃＧＤ２）；葉酸受容体ベータ；腫瘍内皮マーカー１（ＴＥＭ１／ＣＤ２４８）；腫瘍内皮マーカー７関連（ＴＥＭ７Ｒ）；クローディン６（ＣＬＤＮ６）；甲状腺刺激ホルモン受容体（ＴＳＨＲ）；Ｇタンパク質共役受容体クラスＣグループ５、メンバーＤ（ＧＰＲＣ５Ｄ）；Ｘ染色体オープンリーディングフレーム６１（ＣＸＯＲＦ６１）；ＣＤ９７；ＣＤ１７９ａ；未分化リンパ腫キナーゼ（ＡＬＫ）；ポリシアル酸；胎盤特異的１（ＰＬＡＣ１）；ｇｌｏｂｏＨグリコセラミド（ｇｌｙｃｏｃｅｒａｍｉｄｅ）（ＧｌｏｂｏＨ）の六糖部分；乳腺分化抗原（ＮＹ－ＢＲ－１）；ウロプラキン２（ＵＰＫ２）；Ａ型肝炎ウイルス細胞受容体１（ＨＡＶＣＲ１）；アドレナリン受容体ベータ３（ＡＤＲＢ３）；パンネキシン（ｐａｎｎｅｘｉｎ）３（ＰＡＮＸ３）；Ｇタンパク質共役受容体２０（ＧＰＲ２０）；リンパ球抗原６複合体、遺伝子座Ｋ　９（ＬＹ６Ｋ）；嗅覚受容体５１Ｅ２（ＯＲ５１Ｅ２）；ＴＣＲガンマ代替リーディングフレーム（Ａｌｔｅｒｎａｔｅ　Ｒｅａｄｉｎｇ　Ｆｒａｍｅ）タンパク質（ＴＡＲＰ）；ウィルムス腫瘍タンパク質（ＷＴ１）；がん／精巣抗原１（ＮＹ－ＥＳ０－１）；がん／精巣抗原２（ＬＡＧＥ－１ａ）；黒色腫関連抗原１（ＭＡＧＥ－Ａ１）；ＥＴＳ転座－バリアント遺伝子６、染色体１２ｐ上に位置（ＥＴＶ６－ＡＭＬ）；精子タンパク質１７（ＳＰＡ１７）；Ｘ抗原ファミリー、メンバーｌＡ（ＸＡＧＥｌ）；アンジオポエチン結合性細胞表面受容体２（Ｔｉｅ　２）；黒色腫がん精巣抗原－１（ＭＡＤ－ＣＴ－１）；黒色腫がん精巣抗原－２（ＭＡＤ－ＣＴ－２）；Ｆｏｓ関連抗原１；腫瘍タンパク質ｐ５３（ｐ５３）；ｐ５３変異体；プロステイン（ｐｒｏｓｔｅｉｎ）；サバイビング（ｓｕｒｖｉｖｉｎｇ）；テロメラーゼ；前立腺癌腫瘍抗原－１（ＰＣＴ　Ａ－１またはガレクチン８）、Ｔ細胞によって認識される黒色腫抗原１（ＭｅｌａｎＡまたはＭＡＲＴＩ）；ラット肉腫（Ｒａｓ）変異体；ヒトテロメラーゼ逆転写酵素（ｈＴＥＲＴ）；肉腫転座ブレークポイント；黒色腫のアポトーシス阻害剤（ＭＬ－ＩＡＰ）；ＥＲＧ（膜貫通プロテアーゼ、セリン２（ＴＭＰＲＳＳ２）ＥＴＳ融合遺伝子）；Ｎ－アセチルグルコサミニル－トランスフェラーゼＶ（ＮＡ１７）；ペアードボックスタンパク質Ｐａｘ－３（ＰＡＸ３）；アンドロゲン受容体；サイクリンＢｌ；ｖ－ｍｙｃトリ骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子神経芽細胞腫由来ホモログ（ＭＹＣＮ）；Ｒａｓホモログファミリーメンバー Ｃ（ＲｈｏＣ）；チロシナーゼ関連タンパク質２（ＴＲＰ－２）；チトクロムＰ４５０　ｌＢ　１（ＣＹＰｌＢ　１）；ＣＣＣＴＣ結合因子（ジンクフィンガータンパク質）様（ＢＯＲＩＳ、即ち、インプリント部位の調節因子の兄弟（Ｂｒｏｔｈｅｒ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｒｅｇｕｌａｔｏｒ　ｏｆ　Ｉｍｐｒｉｎｔｅｄ　Ｓｉｔｅｓ））、Ｔ細胞によって認識される扁平上皮癌抗原３（ＳＡＲＴ３）；ペアードボックスタンパク質Ｐａｘ－５（ＰＡＸ５）；プロアクロシン（ｐｒｏａｃｒｏｓｉｎ）結合タンパク質ｓｐ３２（ＯＹ－ＴＥＳｌ）；リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ（ＬＣＫ）；Ａキナーゼアンカータンパク質４（ＡＫＡＰ－４）；滑膜肉腫、Ｘブレークポイント２（ＳＳＸ２）；終末糖化産物の受容体（ＲＡＧＥ－１）；腎遍在性１（ＲＵｌ）；腎遍在性２（ＲＵ２）；レグマイン；ヒト乳頭腫ウイルスＥ６（ＨＰＶ　Ｅ６）；ヒト乳頭腫ウイルスＥ７（ＨＰＶ　Ｅ７）；腸カルボキシルエステラーゼ；ヒートショックタンパク質７０－２変異型（ｍｕｔ　ｈｓｐ７０－２）；ＣＤ７９ａ；ＣＤ７９ｂ；ＣＤ７２；白血球関連免疫グロブリン様受容体１（ＬＡＩＲｌ）；ＩｇＡ受容体のＦｃ断片（ＦＣＡＲまたはＣＤ８９）；白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーＡメンバー２（ＬＩＬＲＡ２）；ＣＤ３００分子様ファミリーメンバーｆ（ＣＤ３００ＬＦ）；Ｃ型レクチンドメインファミリー１２メンバーＡ（ＣＬＥＣ１２Ａ）；骨髄間質細胞抗原２（ＢＳＴ２）；ＥＧＦ様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様２（ＥＭＲ２）；リンパ球抗原７５（ＬＹ７５）；グリピカン－３（ＧＰＣ３）；Ｆｃ受容体様５（ＦＣＲＬ５）；および免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド１（ＩＧＬＬｌ）、ＭＰＬ、ビオチン、ｃ－ＭＹＣエピトープタグ、ＣＤ３４、ＬＡＭＰ１　ＴＲＯＰ２、ＧＦＲアルファ４、ＣＤＨ１７、ＣＤＨ６、ＮＹＢＲ１、ＣＤＨ１９、ＣＤ２００Ｒ、Ｓｌｅａ（ＣＡ１９．９；シアリルルイス抗原）フコシル－ＧＭ１、ＰＴＫ７、ｇｐＮＭＢ、ＣＤＨ１－ＣＤ３２４、ＤＬＬ３、ＣＤ２７６／Ｂ７Ｈ３、ＩＬ１１Ｒａ

、ＩＬ１３Ｒａ２、ＣＤ１７９ｂ－ＩＧＬｌ１、ＡＬＫ　ＴＣＲガンマ－デルタ、ＮＫＧ２Ｄ、ＣＤ３２（ＦＣＧＲ２Ａ）、ＣＳＰＧ４－ＨＭＷ－ＭＡＡ、Ｔｉｍ１－／ＨＶＣＲ１、ＣＳＦ２ＲＡ（ＧＭ－ＣＳＦＲ－アルファ）、ＴＧＦベータＲ２、ＶＥＧＦＲ２／ＫＤＲ、ルイスＡｇ、ＴＣＲ－ベータ１鎖、ＴＣＲ－ベータ２鎖、ＴＣＲ－ガンマ鎖、ＴＣＲ－デルタ鎖、ＦＩＴＣ、黄体形成（Ｌｅｕｔｅｎｉｚｉｎｇ）ホルモン受容体（ＬＨＲ）、卵胞刺激ホルモン受容体（ＦＳＨＲ）、絨毛性ゴナドトロピンホルモン受容体（ＣＧＨＲ）、ＣＣＲ４、ＳＬＡＭＦ６、ＳＬＡＭＦ４、ＨＩＶ１エンベロープ糖タンパク質、ＨＴＬＶ１－Ｔａｘ、ＣＭＶ　ｐｐ６５、ＥＢＶ－ＥＢＮＡ３ｃ、インフルエンザＡヘマグルチニン（ＨＡ）、ＧＡＤ、ＰＤＬ１、グアニリルシクラーゼＣ（ＧＣＣ）、ＫＳＨＶ－Ｋ８．１タンパク質、ＫＳＨＶ－ｇＨタンパク質、デスモグレイン３（Ｄｓｇ３）に対する自己抗体、デスモグレイン１（Ｄｓｇ１）に対する自己抗体、ＨＬＡ、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ａ２、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃ、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＭ、ＨＬＡ－ＤＯＡ、ＨＬＡ－ＤＯＢ、ＨＬＡ－ＤＱ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－Ｇ、ＩＧＥ、ＣＤ９９、ＲＡＳ　Ｇ１２Ｖ、組織因子１（ＴＦ１）、ＡＦＰ、ＧＰＲＣ５Ｄ、クローディン１８．２（ＣＬＤ１８Ａ２またはＣＬＤＮ１８Ａ．２））、Ｐ－糖タンパク質、ＳＴＥＡＰ１、ＬＩＶ１、ＮＥＣＴＩＮ－４、ＣＲＩＰＴＯ、ＧＰＡ３３、ＢＳＴ１／ＣＤ１５７、低コンダクタンスクロライドチャネル、ならびにＴＮＴ抗体によって認識される抗原、からなる群から選択され、それにより、対象を処置するまたは対象における疾患を予防する、方法を提供する。

【００９０】

別の態様では、対象を処置する方法であって、対象における過剰増殖性障害または状態（例えば、がん）、例えば、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、血液がんまたは転移性病変を低減または寛解させるために、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むＧＭＰ（またはそれに由来するマクロファージ、顆粒球など）の有効量を投与するステップを含む、方法が提供される。本明細書で使用される場合、用語「がん」は、組織病理学的な型にも侵襲性のステージにも関係なく、全ての型のがん性成長または発癌プロセス、転移性組織または悪性形質転換した細胞、組織もしくは臓器を含む意味である。例示的な固形腫瘍には、種々の臓器系の悪性疾患、例えば、腺癌、肉腫および癌腫、例えば、乳房、肝臓、肺、脳、リンパ系、消化管（例えば、結腸）、泌尿生殖器（例えば、腎、尿路上皮細胞）、前立腺および咽頭を冒すものが含まれる。腺癌には、がん、例えば、ほとんどの結腸がん、直腸がん、腎細胞癌、肝臓がん、肺の非小細胞癌、小腸のがんおよび食道のがんが含まれる。一実施形態では、がんは、黒色腫、例えば、進行期黒色腫である。上述のがんの転移性病変もまた、本開示の方法および組成物を使用して処置または予防され得る。処置または予防され得る他のがんの例には、膵がん、骨がん、皮膚がん、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、頭頸部のがん、肛門領域のがん、胃がん、精巣がん、子宮がん、ファロピウス管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟部組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病が含まれる慢性または急性白血病、小児の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱のがん、腎臓または尿管のがん、腎盂の癌腫、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄の軸の腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、Ｔ細胞リンパ腫、アスベストによって誘導されたものが含まれる、環境的に誘導されたがん、および当該がんの組み合わせが含まれる。

【００９１】

別の態様では、対象を処置する方法であって、対象における過剰増殖性障害または状態（例えば、がん）、例えば、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、血液がんまたは転移性病変を低減または寛解させるために、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含むＧＭＰ（またはそれに由来するマクロファージ、顆粒球など）の有効量を投与するステップを含む、方法が提供される。本明細書で使用される場合、用語「がん」は、組織病理学的な型にも侵襲性のステー

ジにも関係なく、全ての型のがん性成長または発癌プロセス、転移性組織または悪性形質転換した細胞、組織もしくは臓器を含む意味である。例示的な固形腫瘍には、種々の臓器系の悪性疾患、例えば、腺癌、肉腫および癌腫、例えば、乳房、肝臓、肺、脳、リンパ系、消化管（例えば、結腸）、泌尿生殖器（例えば、腎、尿路上皮細胞）、前立腺および咽頭を冒すものが含まれる。腺癌には、がん、例えば、ほとんどの結腸がん、直腸がん、腎細胞癌、肝臓がん、肺の非小細胞癌、小腸のがんおよび食道のがんが含まれる。一実施形態では、がんは、黒色腫、例えば、進行期黒色腫である。上述のがんの転移性病変もまた、本開示の方法および組成物を使用して処置または予防され得る。処置または予防され得る他のがんの例には、膵がん、骨がん、皮膚がん、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、頭頸部のがん、肛門領域のがん、胃がん、精巣がん、子宮がん、ファロピウス管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟部組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病が含まれる慢性または急性白血病、小児の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱のがん、腎臓または尿管のがん、腎盂の癌腫、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、原発性ＣＮＳリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄の軸の腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮がん、扁平上皮がん、Ｔ細胞リンパ腫、アスベストによって誘導されたものが含まれる、環境的に誘導されたがん、および当該がんの組み合わせが含まれる。

【００９２】

以下の実施例は、本開示を例示する意図であるが、限定する意図はない。これらは、使用され得るものの典型であるが、当業者に公知の他の手順が、あるいは使用され得る。

【実施例】

【００９３】

マウス。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ（ＪＡＸストック番号０００６６４）、Ｂ６．１２９（Ｃｇ）－Ｇｔ（ＲＯＳＡ）２６Ｓｏｒｔｍ４（ＡＣＴＢ－ｔｄＴｏｍａｔｏ、－ＥＧＦＰ）Ｌｕｏ／Ｊ（ｍＴｍＧ、ＪＡＸストック番号００７６７６）、Ｂ６．１２９Ｓ－Ｃｙｂｂｔｍ１Ｄｉｎ／Ｊ（ｇｐ９１ｐｈｏｘ－、ＪＡＸストック番号００２３６５）、ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ　Ｉｌ２ｒｇｔｍ１Ｗｊｌ（ＮＳＧ、ＪＡＸストック番号０５５５７）およびＢ６Ｊ．１２９（Ｃｇ）－Ｇｔ（ＲＯＳＡ）２６Ｓｏｒｔｍ１．１（ＣＡＧ－ｃａｓ９＊、－ＥＧＦＰ）Ｆｅｚｈ／Ｊ（ＣＡＧ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ、ＪＡＸストック番号０２６１７９）マウスは、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから購入した。全てのマウス（雄性および雌性）は、６週齢と１２週齢との間で使用した。全ての動物実験は、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃａｒｅ　ａｎｄ　Ｕｓｅ　Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅによって承認されたプロトコールに従って実施した。動物（１ケージ当たり５匹以下のマウス）に、食物および水を提供し、一定の１２時間の明暗サイクルで維持した。ＮＳＧマウスを、無菌条件下で交配した。

【００９４】

ＣＧＤマウスモデル。ｇｐ９１ｐｈｏｘ－マウス（ＣＧＤマウス）に、致死線量（９５０ｃＧｙ）を照射し、５×１０^{6}個のｔｄＴｏｍａｔｏ陽性ＧＭＰおよび２．５×１０^{4}個のｇｐ９１ｐｈｏｘ－全骨髄細胞（ヘルパー細胞）または２．５×１０^{4}個のヘルパー細胞のみのいずれかを、尾部静脈注射を介して移植した。移植の２日後、マウスに、２×１０^{8}個のＳ　ａｕｒｅｕｓ株５０２Ａ（ＡＴＣＣ番号２７２１７；ＡＴＣＣ）または２００個のＢ　ｃｅｐａｃｉａ桿菌（ＡＴＣＣ番号２５６０９；ＡＴＣＣ）を腹腔内注射した。接種材料中の細菌の数を、連続希釈およびプレーティングによって確認した。ＰＢＳまたは５×１０^{6}個のｔｄＴｏｍａｔｏ陽性ＧＭＰを、細菌の接種の直後に尾部静脈を介して注射し、注射を、その後３日毎に反復した。マウスを１日１回試験し、瀕死の場合、または腹腔チャレンジの７日後に、安楽死させた。腹腔内膿瘍の存在を、目視検査によって評価した。一部の実験では、血液培養物を尾部静脈血液サンプルから得、菌血症をプレ

ート培養によって定量化した。

【００９５】

培地および試薬。ＤＭＥＭ／Ｆ－１２（１２４００００２４）およびＮｅｕｒｏｂａｓａｌ（２１１０３０４９）培地は、Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから購入した。ヒトインスリン（９１０７７Ｃ－２５０ＭＧ）、ヒトＨｏｌｏ－トランスフェリン（Ｔ０６６５－１００ＭＧ）、プトレシン（Ｐ５７８０－５Ｇ）、亜セレン酸ナトリウム（Ｓ９１３３－１ＭＧ）、リノール酸（Ｌ１０１２－１００ＭＧ）、ＤＬ－アルファトコフェロール（ビタミンＥ、Ｔ３２５１－５Ｇ）およびウシ血清アルブミン（Ａ８８０６－５Ｇ）は、Ｓｉｇｍａから購入した。組換えマウスＳＣＦ（２５０－０３）、組換えヒトＭ－ＣＳＦ（３００－２５）および組換えヒトＧ－ＣＳＦ（３００－２３）は、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈから購入した。ＧＤＣ－０８７９（Ｓ１１０４）およびＳＫＬ２００１（Ｓ８３０２）は、Ｓｅｌｌｅｃｋから購入した。

【００９６】

Ｂ７培地を調製するために、５００ｍｌのＤＭＥＭ／Ｆ－１２および５００ｍＬのＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地を混合し、４ｍｇヒトインスリン、２０ｍｇヒトＨｏｌｏ－トランスフェリン（Ｔｒａｎｓｆｅｒｉｎ）、１６ｍｇプトレシン、１２．５μｇ亜セレン酸ナトリウム、１ｍｇリノール酸、１ｍｇビタミンＥおよび２．５ｇウシ血清アルブミンを補充した。インスリンは、容易には溶解しない；インスリンを、０．０１Ｍの無菌ＨＣｌ中で４℃で一晩溶解させて、１０ｍｇ／ｍＬストック溶液を産生する。１ｍＬアリコートで－２０℃で貯蔵する。懸濁物を、アリコート化の前に十分混合した。

【００９７】

マウスＧＭＰの誘導、拡大増殖および分化。細胞を、５％CO_2ウォータージャケットインキュベーター（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で３７℃で培養した。Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ、ｍＴｍＧまたはＣＡＧ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰマウスから単離した骨髄細胞を、2×10^6細胞／ウェルの密度で６ウェルプレート中にプレートし、５０ｎｇ／ｍＬ ＳＣＦ、１μＭ ＧＤＣ－０８７９および１０μＭ ＳＫＬ２００１（ＳＣＦ／２ｉ）を補充したＢ７培地２ｍＬ中で培養した。３～４日後、細胞を、ピペッティングによって上下させて単一細胞懸濁物に解離させ、2×10^6細胞／ウェルの密度で６ウェルプレート中に再プレートし、ＳＣＦ／２ｉを補充したＢ７培地２ｍＬ中で培養した。ＳＣＦ／２ｉ中での２回の継代の後、細胞の大多数は、ＧＭＰであった。ＧＭＰを、規定通りに３日毎に継代した。分化を誘導するために、ＧＭＰを、１０ｃｍ組織培養ディッシュ中にプレートし、１０％ＦＢＳを含有し、２０ｎｇ／ｍＬ Ｍ－ＣＳＦ（マクロファージ分化のため）または２０ｎｇ／ｍＬ Ｇ－ＣＳＦ（顆粒球分化のため）のいずれかを補充したＲＰＭＩ－１６４０培地中で培養した。ＧＭＰ由来マクロファージは７日目に回収し（培地は、４日目に１回交換した）、ＧＭＰ由来顆粒球は３日目に回収して、さらなる実験に使用した。

【００９８】

骨髄由来マクロファージを生成するために、Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスから単離した2×10^6個の骨髄細胞を、１０ｃｍ組織培養ディッシュ中にプレートし、１０％ＦＢＳおよび２０ｎｇ／ｍｌ Ｍ－ＣＳＦを含有するＲＰＭＩ－１６４０培地中で培養した。培地を４日目に交換し、細胞を７日目に回収した。

【００９９】

腹腔マクロファージを、１ｍＬの２％Ｂｉｏ－Ｇｅｌ Ｐ－１００（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、１５０４１７４）を、ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性ＧＭＰの移植の直後にマウス腹腔中に注射し、その後、４日後に無菌ＰＢＳで腹腔洗浄することによって生成した。腹腔から収集した細胞を、蛍光イメージングおよびフローサイトメトリー分析に使用した。

【０１００】

ＧＭＰ細胞の誘導および拡大増殖。臍帯血サンプルは、ＳｔｅｍＣｙｔｅ（Ｂａｌｄｗｉｎ Ｐａｒｋ、ＣＡ）から得、全骨髄は、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（カタログ番号７０５０２．２）から購入し、動員末梢血は、ＳｔｅｍＥｘｐｒｅｓｓ

（カタログ番号ＭＬＥ４ＧＣＳＦ５）から購入した。単核細胞を、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（商標）ＰＬＵＳキット（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、１７－１４４０－０３）を使用して単離した。簡潔に述べると、血液を、１：３の比率でＰＢＳで希釈し、１５ｍｌ Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ（商標）ＰＬＵＳを事前充填したＳｅｐＭａｔｅ（商標）－５０チューブ（Ｓｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、８５４６０）中に添加した。１２００ｇで室温で２０分間の遠心分離の後、最上層を収集し、３００×ｇで４℃で１０分間遠心分離した。残留赤血球を、ＡＣＫ溶解緩衝液を使用することによって除去した。細胞を、即座に使用したか、または液体窒素中で凍結保存した。

【０１０１】

ＧＭＰの拡大増殖のために、Ｌｉｎ-（ＣＤ３、ＣＤ１４、ＣＤ１９およびＣＤ５６）ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ３８$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＧＭＰを、臍帯血、全骨髄または動員末梢血から単離した単核細胞から選別した。選別したＧＭＰを、４×１０^{4}細胞／ウェルの密度で９６ウェルプレート中にプレートし、ＳＣＦ（５０ｎｇ／ｍＬ．ＡＦ－３００－０７、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）、ＧＤＣ－０８７９（１μＭ）を補充したＢ６培地中で培養した。

【０１０２】

最初のプレーティングの５日後、ＧＭＰを、１×１０^{5}細胞／ウェルの密度で４８ウェルプレート中に再プレートすることによって、３日毎に規定通りに継代し、改変ＳＣＦ／２ｉ中で培養した。ＳＢ５９０８８５（０．５μＭ．Ｓ２２２０、Ｓｅｌｌｅｃｋ）によるＧＤＣ－０８７９の置き換えは、ＧＭＰ増殖速度を僅かに増加させることができた。Ｂ６培地を調製するために、５００ｍＬのＤＭＥＭ／Ｆ－１２および５００ｍｌのＮｅｕｒｏｂａｓａｌ培地を混合し、４ｍｇインスリン、２０ｍｇ Ｈｏｌｏ－トランスフェリン、１２．５μｇ亜セレン酸ナトリウム、１ｍｇリノール酸、１ｍｇビタミンＥおよび２．５ｇ血清アルブミンを補充する。

【０１０３】

ヒト白血病細胞の誘導。臨床検体は、成人Ｂ細胞性急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）患者から得た。ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を、ヒトＣＤ４５$^{+}$かつＣＤ１９$^{+}$細胞について選別することによって、Ｂ－ＡＬＬ患者の骨髄吸引物から単離した。ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を、ＧＦＰレンチウイルスで形質導入した。細胞を、ＮＳＧマウス中に移植し、ＧＦＰ$^{+}$白血病細胞を、マウス脾臓から、移植の６週間後に選別した。

【０１０４】

マクロファージ貪食のためのキメラ抗原受容体（ＣａｒＰ）。マウスＧＭＰにおいて使用したＣａｒＰ構築物を、ヒトＣＤ１９ ｓｃＦｖまたはＨＥＲ２ ｓｃＦＶをヒトＣＤ８ヒンジおよび膜貫通領域に融合させることによって構築し、Ｐ２Ａ－ＲＦＰ（ＣａｒＰ－ＲＦＰ）、マウスＦｃｅｒ１ｇ（ＮＭ＿０１０１８５．４、ａａ１９～８６）－マウスＣＤ１９（ＮＭ＿００９８４４．２、ａａ４９１～５３５）－Ｐ２Ａ－ＲＦＰ（ＣａｒＰ^{Ｆｃ１９}－ＲＦＰ）またはマウスＣＤ３ζ（ＮＭ＿００１１１３３９１．２、ａａ５２～１６４）－マウスＦｃｅｒ１ｇ（ａａ４５～８６）－マウスＣＤ１９－Ｐ２Ａ－ＲＦＰ（ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}－ＲＦＰ）に連結した。ＧＭＰにおいて使用したαＣＤ１９ ＣａｒＰ構築物の細胞内ドメインは、ヒトＣＤ３ζ（ＮＭ＿１９８０５３．２、ａａ５２～１６４）－ヒトＦｃｅｒ１ｇ（ＮＭ＿００４１０６．１、ａａ４５～８６）－ヒトＣＤ１９（ＮＭ＿００１１７８０９８．１、ａａ４９８～５４４）であった。全てのＣａｒＰ受容体は、膜標的化のためのＮ末端ＣＤ８ａシグナルペプチド（ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬＰＬＡＬＬＨＡＡＲＰ（配列番号１））を含有する。全ての受容体は、コドン最適化し、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓが合成し、制限酵素切断およびＴ４ライゲーションによって、改変されたｐＳｉｎ－ＥＦ２レンチウイルス骨格中にクローニングした。

【０１０５】

エレクトロポレーション、レンチウイルス産生およびＧＭＰ形質導入。ＧＦＰ ｍＲＮＡ（ＴｒｉＬｉｎｋ、Ｌ７６０１－１００）およびシングルガイドＲＮＡ（Ｓｙｎｔｈｅ

ｇｏ、配列：ＣＣＧＵＣＣＡＧＣＵＣＧＡＣＣＡＧＧＡＵ（配列番号２））を、Ｎｅｏｎトランスフェクションシステム（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、ＭＰＫ５０００）を使用して、ＧＭＰ中にエレクトロポレーションした。簡潔に述べると、ＷＴまたはＣＡＧ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰマウスに由来するＧＭＰを、ＳＣＦ／２ｉ中で拡大増殖させた。トランスフェクションのために、ＧＭＰを回収し、ＰＢＳで２回洗浄し、緩衝液Ｒ中に1×10^{7}／ｍＬの濃度で再懸濁した。５μｇ　ＧＦＰ　ｍＲＮＡまたはｓｇＲＮＡを、ＷＴまたはＣＡＧ－Ｃａｓ９－ＥＧＦＰ　ＧＭＰの懸濁物１０μｌ中に添加し、１６００Ｖの２０ｍｓの１回のパルスでエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの後、ＧＭＰを、ＳＣＦ／２ｉ中にプレートし培養した。４８時間後、ＧＦＰ発現を、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを使用して試験した。

【０１０６】

レンチウイルスを、およそ８０％のコンフルエンスの、１０ｃｍディッシュ中にプレートしたＬｅｎｔｉ－Ｘ　２９３Ｔ細胞（Ｔａｋａｒａ、６３２１８０）においてｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＬＴＸ　ｗｉｔｈ　ｐｌｕｓトランスフェクション試薬（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ、１５３３８１００）を使用する、パッケージングタンパク質をコードするｐＳｉｎプラスミドおよびベクター（ｐＳＰＡＸおよびｐＶＳＶＧ）の共トランスフェクションによって産生した。ウイルス上清を、トランスフェクションの２日後に収集し、０．４５μＭフィルターにかけ、Ｌｅｎｔｉ－Ｘ濃縮器（Ｔａｋａｒａ、６３１２３２）で濃縮した。濃縮されたウイルスを、即座に形質導入に使用したか、または長期貯蔵のために凍結した。ＧＭＰ形質導入のために、レンチウイルスをＧＭＰ培養物に添加し、８００ｇで３２℃で１．５時間遠心分離した。細胞を、新鮮な培地中に再懸濁し、４８時間培養した。ＲＦＰ陽性細胞を、ＦＡＣＳによって選別した。

【０１０７】

定量化および統計分析。統計分析（ＲＮＡ－ｓｅｑ実験を除く）を、ＰＲＩＳＭプログラム（ＧｒａｐｈＰａｄ）を使用して実施した。２つの群は、対応のないｔ検定を使用して比較した。２つよりも多くの処置間の差異の統計的有意性を評価するためには、２元配置ＡＮＯＶＡを利用した。

【０１０８】

がん細胞を選択的に標的化するためのＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰの遺伝子操作。マクロファージは、がんを処置するための魅力的な治療標的である。マクロファージは、がん細胞の貪食およびがん抗原のＴ細胞への引き続く提示を介して、それらの抗がん効果を示す。マクロファージは、トランスフェクトが困難な細胞であるので、遺伝子操作をＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰに対して実施することができるかどうか、およびこれらの遺伝子操作されたＧＭＰ由来のマクロファージを、がん細胞を選択的に標的化するために使用することができるかどうかを評価した。最初に、高い効率の遺伝子改変がＳＣＦ／２ｉ　ＧＭＰにおいて達成できたことが実証された。次に、原理証明研究として、ＧＭＰを、ヒトＢ細胞リンパ腫を特異的に標的化するように遺伝子操作した。キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞治療は、Ｂ細胞リンパ腫を処置するために、米国食品医薬品局（ＦＤＡ）によって承認されている。より最近、研究により、がん細胞のマクロファージ媒介性貪食が、貪食のためのＣＡＲ（ＣａｒＰ）を発現するようにマクロファージを操作することを介して増強され得ることが実証された。ヒトＢ細胞抗原ＣＤ１９を認識する細胞外単鎖抗体可変断片（ｓｃＦｖ）（αＣＤ１９　ｓｃＦｖ）、ヒトＣＤ８膜貫通ドメイン、およびＦｃ受容体のマウス共通γサブユニット（ＦｃＲγ）と融合したマウスＣＤ１９細胞質ドメイン、を含有するＣａｒＰを生成した。このＣａｒＰ^{Fc19}導入遺伝子を、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）に連結して（ＣａｒＰ^{Fc19}－ＲＦＰ）、導入遺伝子発現のモニタリングを容易にした。細胞外αＣＤ１９　ｓｃＦｖ抗体断片、ＣＤ８膜貫通ドメインおよび細胞質ＲＦＰを含有するが、細胞質シグナル伝達ドメインを有さない対照ＣａｒＰ（ＣａｒＰ－ＲＦＰ）を構築した（図１Ｃを参照されたい）。

【０１０９】

レンチウイルス感染によってＣａｒＰ^{Fc19}－ＲＦＰおよびＣａｒＰ－ＲＦＰをＳＣ

Ｆ／２ｉ　ＧＭＰ中に導入した後、ＲＦＰ陽性ＧＭＰを選別し、ＳＣＦ／２ｉ中で拡大増殖させた。貪食を評価するために、マクロファージを、ＣａｒＰ^{Ｆｃ１９}－ＲＦＰおよびＣａｒＰ－ＲＦＰ　ＧＭＰから生成し、ＧＦＰ標識したヒトＢ細胞性急性リンパ芽球性白血病（Ｂ－ＡＬＬ）細胞と共に共培養した。予想されたように、非常に稀な（０．２１±０．０８％）貪食が、ＣａｒＰ－ＲＦＰ群において観察されたが、それは、ＣａｒＰ－ＲＦＰが、貪食シグナルの活性化を担う細胞質ドメインを欠くからである。対照的に、ＣａｒＰ^{Ｆｃ１９}－ＲＦＰマクロファージの５．２３±１．３２％が、１時間の共培養内に、ＧＦＰ陽性ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を飲み込んだ（図Ｓ２Ａを参照されたい）。

【０１１０】

ＣａｒＰ^{Ｆｃ１９}－ＲＦＰを発現するマクロファージの貪食効率は、なおも比較的低かったので、効率が、貪食を促進することができるシグナル伝達モチーフを組み合わせることによって改善できるかどうかを試験した。ＣＤ３ζ細胞内ドメインは、ＦｃＲγと同じ免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ＩＴＡＭ）を含有し、貪食を増強できることが示されているので（Ｉｓａｋｏｖ、１９９７）、ＣａｒＰ^{Ｆｃ１９}－ＲＦＰの細胞質ドメインを、マウスＣＤ３ζ細胞質ドメインを追加することによって改変した（ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}－ＲＦＰ）（図１Ｃを参照されたい）。ヒトＢ－ＡＬＬ細胞と共に共培養した場合、ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}－ＲＦＰ発現マクロファージは、白血病細胞を即座に飲み込み始めた。一部のマクロファージは、複数の白血病細胞を貪食した（図１Ｄおよび図３Ｂを参照されたい）。フローサイトメトリー分析により、ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}－ＲＦＰ発現マクロファージの４１．５７±９．２６％が、１時間の共培養内に、白血病細胞を飲み込んだことが示された（図１Ｅを参照されたい）。

【０１１１】

次に、がん細胞を標的化する際のＣａｒＰマクロファージの特異性を評価した。ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}－ＲＦＰのαＣＤ１９　ｓｃＦｖカセットを、ヒト上皮増殖因子受容体２（ＨＥＲ２）ｓｃＦｖで置き換えて、αＨＥＲ２　ＣａｒＰを生成した。αＨＥＲ２　ＣａｒＰ　ＧＭＰから生成されたαＨＥＲ２　ＣａｒＰマクロファージを、ＨＥＲ２を過剰発現するヒト乳房がん細胞株である、ＧＦＰ標識したＳＫ－ＢＲ－３細胞と共に共培養した。３０．８±６．３％のαＨＥＲ２　ＣａｒＰマクロファージは、１時間の共培養内に、ＳＫ－ＢＲ－３－ＧＦＰ細胞を飲み込んだが、貪食は、αＨＥＲ２　ＣａｒＰマクロファージをＨＥＲ２を発現しないＧＦＰ標識したヒトＢ－ＡＬＬ細胞と共に共培養した場合には、非常に稀であった（図３Ｃ～Ｄを参照されたい）。対照的に、ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}－ＲＦＰマクロファージは、ＣＤ１９発現ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を効率的に飲み込んだが、ＣＤ１９陰性であるＳＫ－ＢＲ－３細胞は飲み込まなかった（図３Ｄを参照されたい）。これらの結果は、ＣａｒＰマクロファージが、高度に特異的な様式でがん細胞を標的化することを示唆している。

【０１１２】

ＣＤ４７遮断は、ＣａｒＰマクロファージの貪食を相乗的に増強する。以前の研究は、マクロファージ貪食効率が、マクロファージへの「私を食べないで」シグナルであるＣＤ４７を遮断することによって増加され得ることを示唆した。ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}および抗ＣＤ４７抗体が、マクロファージ貪食を増強するように相乗的に作用できるかどうかを試験した。１時間の共培養内に、事前インキュベーションなしの場合の４１．６±９．３％と比較して、ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}－ＲＦＰ発現マクロファージの８６．２±１３．８％が、２０μｇ／ｍｌ抗ＣＤ４７抗体と共に３０分間事前インキュベートしたヒトＢ－ＡＬＬ細胞を飲み込んだ。ＣａｒＰ－ＲＦＰを発現するマクロファージについて、貪食効率は、ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を抗ＣＤ４７抗体と共に事前インキュベートした場合、０．２１±０．０８％から１８．５７±２．８５％に増加した。より顕著なことに、抗ＣＤ４７抗体と共に事前インキュベートしたほぼ全てのヒトＢ－ＡＬＬ細胞は、２４時間の共培養の後に、ＣａｒＰ^{ｚＦｃ１９}－ＲＦＰ発現マクロファージによって飲み込まれ消化された。これらのデータは、ＣａｒＰおよび抗ＣＤ４７抗体が相乗的に作用して、がん細胞のマクロファージ貪食を改善することを実証している。

【０１１３】

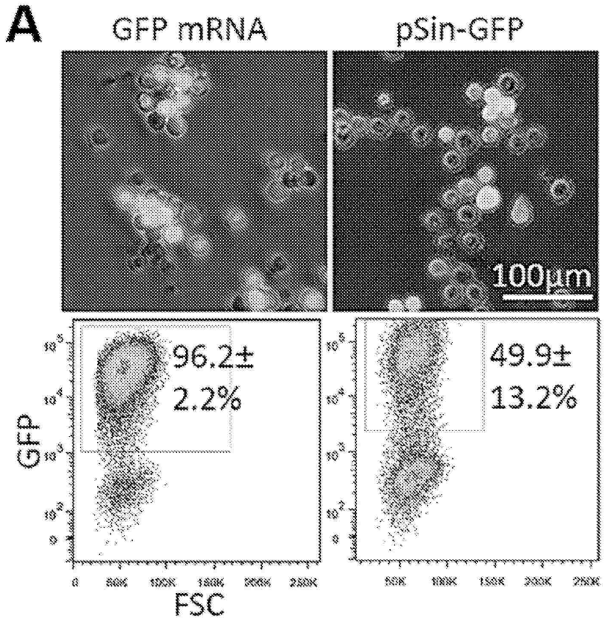
がん細胞を選択的に標的化するように、ｅｘ　ｖｉｖｏで拡大増殖されたＧＭＰを操作する。ｅｘ　ｖｉｖｏで拡大増殖されたＧＭＰを、ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を選択的に貪食するように遺伝子操作することができるかどうかを決定するために、ＣａｒＰ^{zFc19}－ＲＦＰ発現ＧＭＰを生成し、改変ＳＣＦ／２ｉ中で拡大増殖させた。貪食を評価するために、ＣａｒＰ^{zFc19}－ＲＦＰ　ＧＭＰから生成されたマクロファージを、ＧＦＰ標識したヒトＢ－ＡＬＬ細胞と共に共培養した。フローサイトメトリー分析により、ＣａｒＰ－ＲＦＰを発現するマクロファージの０．８７±０．２％と比較して、ＣａｒＰ^{zFc19}－ＲＦＰ発現マクロファージの２８．６±４．５％が、１時間の共培養内に、白血病細胞を飲み込んだことが示された（図２Ｃおよび図４Ａを参照されたい）。ＣａｒＰ^{zFc19}－ＲＦＰマクロファージおよびＣａｒＰ－ＲＦＰマクロファージについての貪食効率は、ヒトＢ－ＡＬＬ細胞を抗ＣＤ４７抗体と共に事前インキュベートした場合、それぞれ、６９．５±５．６％および３２．８±５．５％までさらに増加した（図２Ｃを参照されたい）。より顕著なことに、ＣａｒＰ^{zFc19}－ＲＦＰマクロファージは、３６時間の共培養後に、抗ＣＤ４７抗体と共に事前インキュベートしたほぼ全てのヒトＢ－ＡＬＬ細胞を飲み込み消化した（図４Ｂを参照されたい）。

【０１１４】

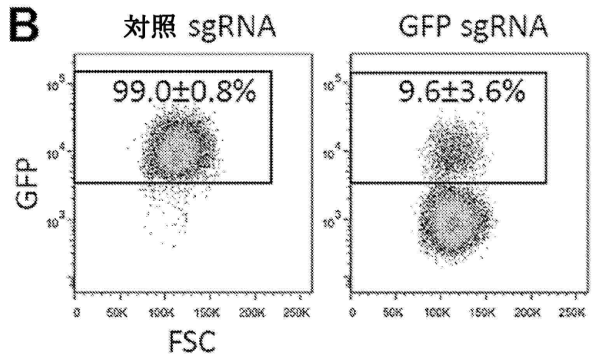
種々の改変が、本開示の精神および範囲から逸脱することなしになされ得ることが理解される。したがって、他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内である。

【図面】

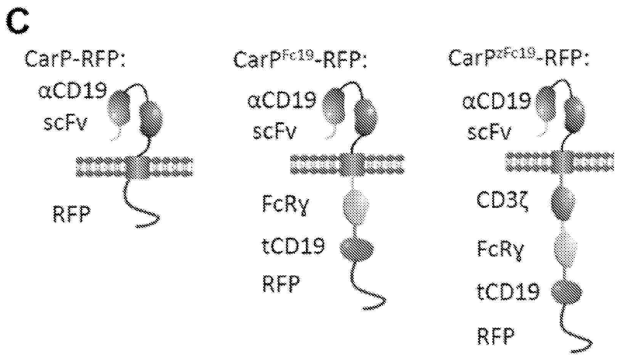
【図１Ａ】



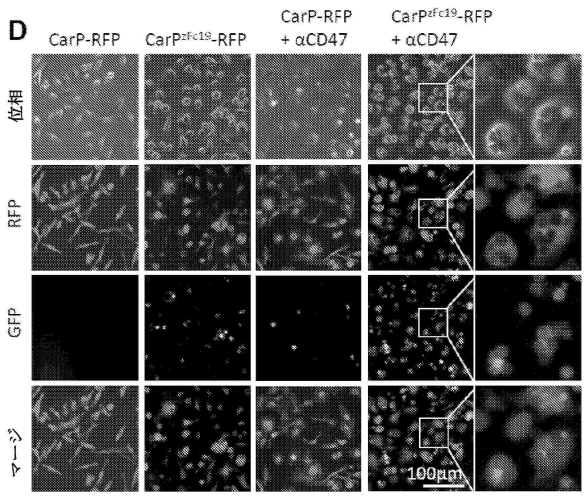
【図１Ｂ】



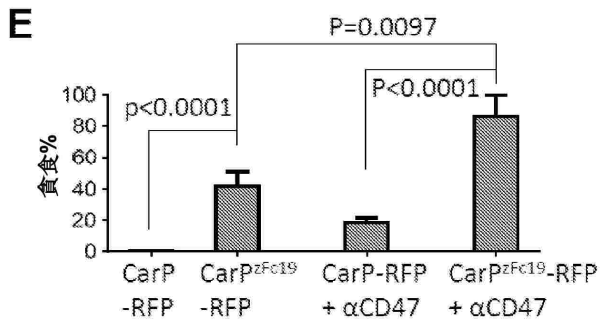
【図１Ｃ】



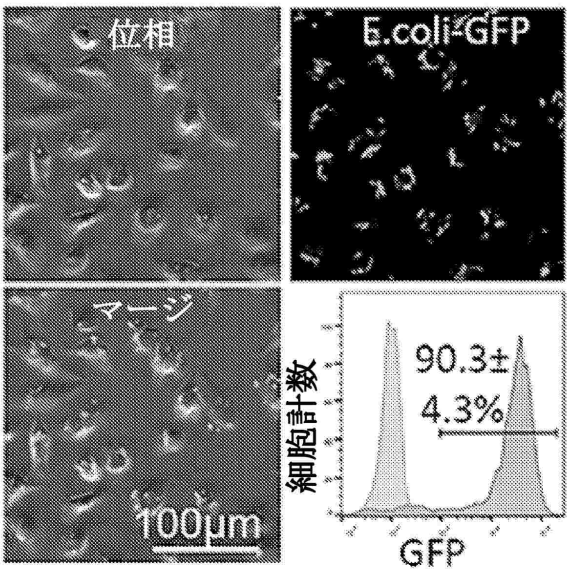
【図１Ｄ】



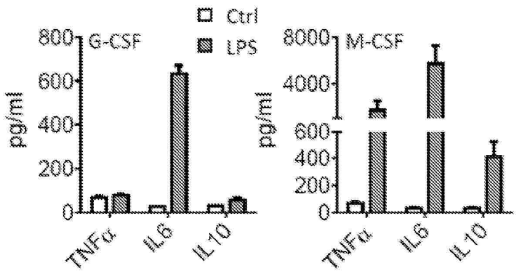
【図１Ｅ】



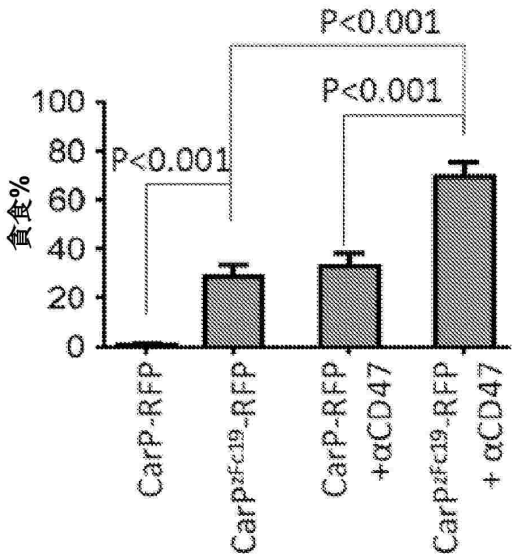
【図２Ａ】



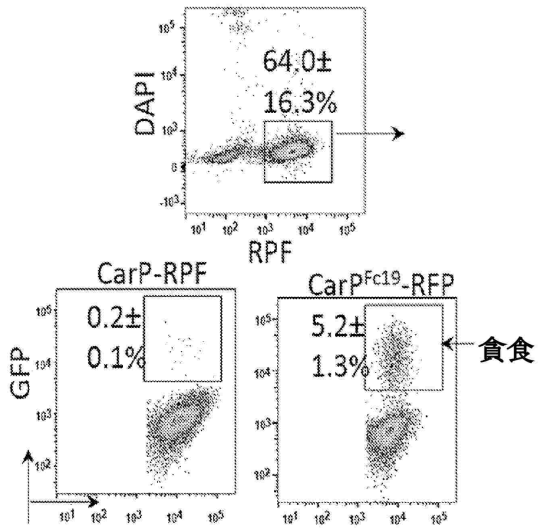
【図２Ｂ】



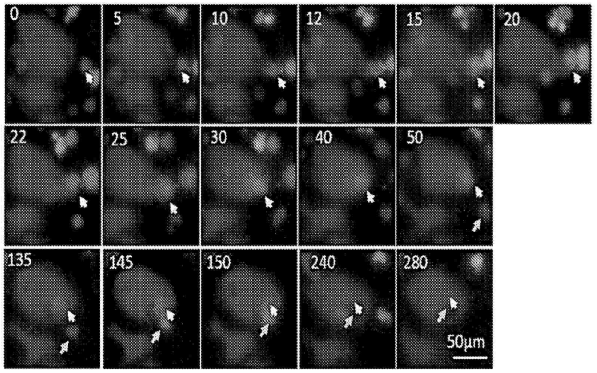
【図２Ｃ】



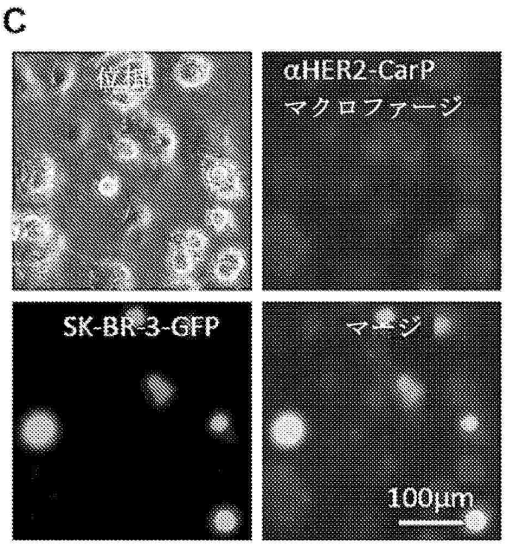
【図３Ａ】



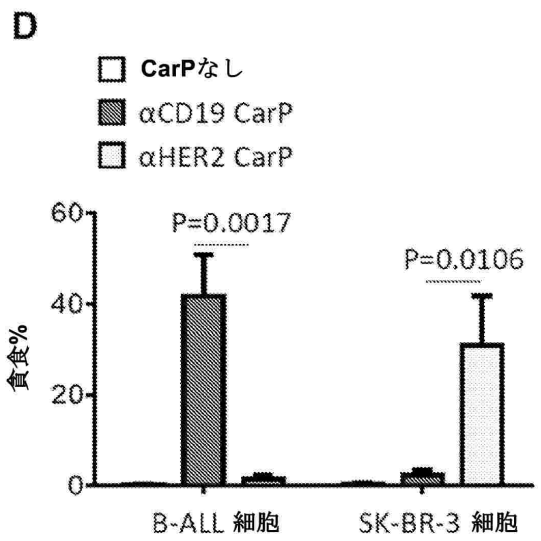
【図３Ｂ】



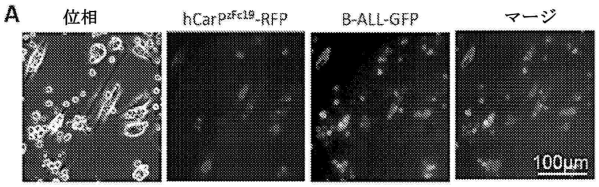
【図３Ｃ】



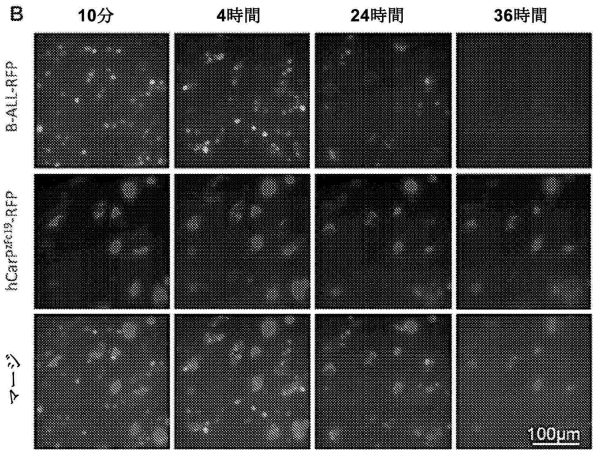
【図３Ｄ】



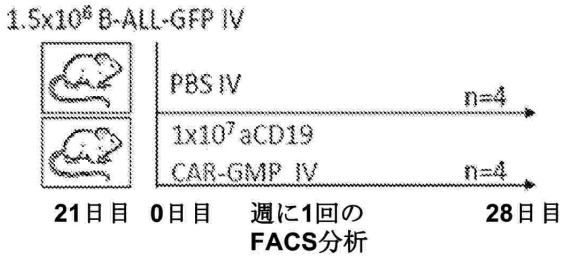
【図４Ａ】



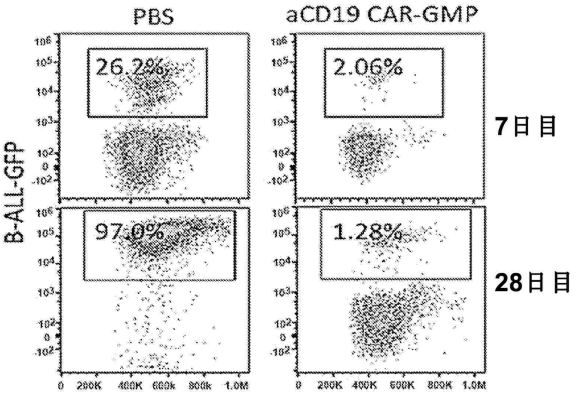
【図４Ｂ】



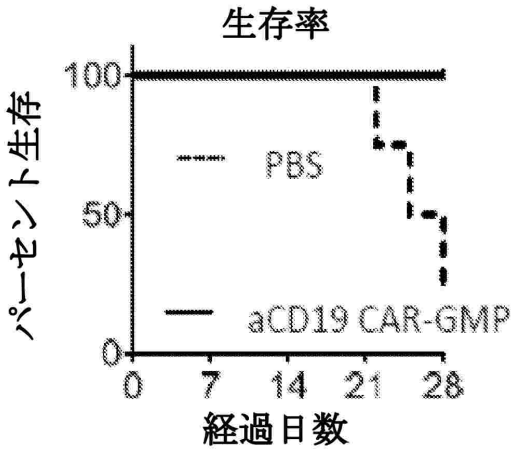
【図５Ａ】



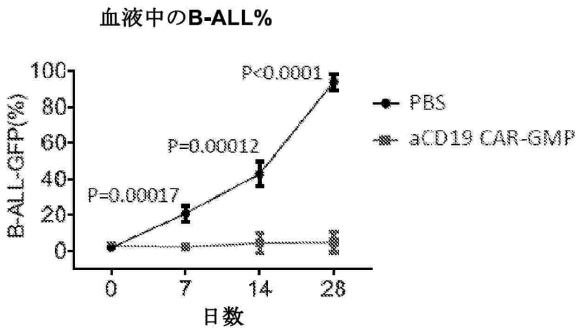
【図５Ｂ】



【図５Ｃ】



【図５Ｄ】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/30109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A61K 39/00; A61P 35/00; C12N 5/0786; C12N 5/0787; C12N 5/10; C12N 15/62 (2022.01)
ADD. C12N 15/867 (2022.01)
CPC - INV. A61K 39/00; A61P 35/00; C12N 5/0642; C12N 5/0645; C12N 5/10; C12N 15/62
ADD. C07K 2319/03; C12N 15/867; C12N 2510/00
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.
Y	WO 2020/076739 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 16 April 2020; [0004], [0005], [0006]	1-7
Y	WO 2016/179319 A1 (CELLERANT THERAPEUTICS, INC.) 10 November 2016; [0013], [0015], [0017], [0018], [0068]	1-7

☐ 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
19 July 2022 (19.07.2022)	AUG 18 2022
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 Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US22/30109

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.: 8-30
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		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02	
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ｃ１２Ｎ	*5/0789(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0789	
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13	
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12	

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,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,ME,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,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

(72)発明者　ユエ、シ
アメリカ合衆国　９００３３　カリフォルニア州、ロサンゼルス、ビーシーシー５１２、１４２５　サン　パブロ　スロリート、ユニバーシティ　オブ　サザン　カリフォルニア、ケック　スクール　オブ　メディシン
(72)発明者　ジン、シュエユエン
アメリカ合衆国　９００３３　カリフォルニア州、ロサンゼルス、ビーシーシー５１２、１４２５　サン　パブロ　スロリート、ユニバーシティ　オブ　サザン　カリフォルニア、ケック　スクール　オブ　メディシン

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C084　AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC752
4C087　AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 CA04 CA12 MA65 NA14 ZB26 ZB27