

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-546145

(P2024-546145A)

(43)公表日 令和6年12月17日(2024.12.17)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	Z N A 4 B 0 2 9
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 3/00 (2006.01)	C 1 2 M 3/00	
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全33頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2024-535789(P2024-535789)	(71)出願人	524225154
(86)(22)出願日	令和4年12月22日(2022.12.22)		クレ. エーアイ, インク.
(85)翻訳文提出日	令和6年6月13日(2024.6.13)		KURE. AI, INC.
(86)国際出願番号	PCT/US2022/053815		アメリカ合衆国 オハイオ州 4 4 1 1 8
(87)国際公開番号	WO2023/122277		, シェイカー ハイツ, シェルバーン ロ
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)		ード 1 9 0 1 5
(31)優先権主張番号	63/292,843		1 9 0 1 5 Shelburne Roa
(32)優先日	令和3年12月22日(2021.12.22)		d, Shaker Heights, O
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		hio 4 4 1 1 8 U. S. A.
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100079980
			弁理士 飯田 伸行
		(74)代理人	100167139
			弁理士 飯田 和彦
		(72)発明者	ウォルド, デイヴィッド
			アメリカ合衆国 オハイオ州 4 4 1 1 8
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 迅速Tー細胞製造

(57)【要約】

【構成】 本発明はTー細胞などの遺伝子組み換え免疫エフェクター細胞の迅速製造方法を提供するものである。この方法を使用すると、CAR-T細胞などの遺伝子組み換え免疫エフェクター細胞を迅速（＜1日）に製造できる。

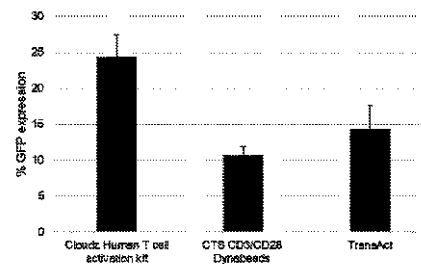


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子組み換え T 細胞集団の迅速製造方法であって、
混合単核細胞集団を獲得し、
この獲得と実質的に同時に、
前記混合単核細胞集団内の T 細胞集団を活性化し、そして
この単核細胞集団をウィルスベクターに暴露して、前記単核細胞集団内の少なくとも
前記 T 細胞集団に外因性ヌクレオチドを導入する、
遺伝子組み換え T 細胞集団の迅速製造方法。

【請求項 2】

前記活性化および少なくとも一種のウィルスベクターへの暴露を同時に行う工程から 2
4 時間以内に少なくとも遺伝子組み換え T 細胞を有する前記混合単核細胞集団を採取す
る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、IL-18 および IL-21 からなるサ
イトカイン群の一つかそれ以上から選択する活性化剤に、および/または CD3、CD2
8、OX40、CD2、CD27、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)
、ICOS (CD278) および 4-1BB (CD137) の一つかそれ以上の活性化剤
から選択する活性化剤に前記混合単核細胞を暴露することによって前記活性化を行う、請
求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

IL-7 および IL-15 からなる群のうちの一つかそれ以上から選択する活性化剤に
前記混合単核細胞を暴露することによって前記活性化を行う、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記活性化およびウィルスベクターへの暴露を行う工程の前に前記単核細胞集団に含ま
れる単球集団の付着によって少なくとも部分的な欠失を行う工程を有する、請求項 1 に記
載の方法。

【請求項 6】

外因性サイトカインの不在下で前記活性化およびウィルスベクターへの暴露の工程を行
う、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

CD3 活性化剤、CD28 活性化剤、可溶性または表面結合 CD3 抗体または可溶性ま
たは表面結合 CD28 抗体の一つかそれ以上に前記単核細胞集団を暴露することによって
前記活性化の工程を行う、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

CD3 活性化剤または可溶性あるいは表面結合 CD3 抗体の一方または両方に前記単核
細胞集団を暴露することによって前記活性化の工程を行う、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

T 細胞の前分離工程または前活性化工程を行わずに前記活性化の工程およびウィルス
ベクターへの暴露の工程を実施する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

さらに、前記遺伝子組み換え T 細胞集団を有する前記混合単核細胞集団を凍結保存す
る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記混合単核細胞集団をアフエシスまたは末梢血液採取によって得る、請求項 1 に記
載の方法。

【請求項 12】

レンチウイルス、レトロウイルスおよびアデノウイルスからなる群からウィルス導入ベ
クターを選択する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

実質的に同時に行う前記活性化の工程およびウィルス導入ベクターの工程に続いて分画遠心分離工程を行って、DNAサイズセレクションによってゲノムDNAからプラスミドDNAを除去する工程をさらに有する、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

請求項1～12のいずれか1項に記載の方法によって製造した遺伝子組み換えT細胞。

【請求項15】

請求項1～12のいずれか1項に係る遺伝子組み換えT細胞集団の迅速製造方法用の密閉システムキットであって、

混合単核細胞集団を受け取る第1殺菌容器、

単球を欠失させた混合単核細胞集団を受け取る第2殺菌容器、

ビーズを使用しないT細胞活性化剤、

T細胞集団に外因性ヌクレオチドを導入するウィルスベクター、

適正な培地、および

適正な細胞洗浄溶液を有し、

前記混合単核細胞集団から単球を欠失させる適正な材料で少なくとも第1容器を構成し、

前記第1容器および前記第2容器は、前記ビーズを使用しないT細胞活性化剤、前記ウィルス導入ベクター、前記培地および前記細胞洗浄溶液が殺菌導入される、密閉システムキット。

【請求項16】

前記ビーズを使用しないT細胞活性化剤は、CD3活性化剤、CD28活性化剤、OX40活性化剤、CD2活性化剤、CD27活性化剤、ICAM-1活性化剤、LFA-1(CD11a/CD18)活性化剤、ICOS(CD278)活性化剤および4-1BB(CD137)活性化剤およびCD3抗体からなる群のうちの一つかそれ以上から選択される、請求項15に記載の密閉システムキット。

【請求項17】

さらに、IL-2、IL-7およびIL-15からなる群から選択される一つかそれ以上のサイトカインを有する、請求項16に記載の密閉システムキット。

【請求項18】

前記ビーズを使用しないT細胞活性化剤は、可溶性または表面結合CD3抗体および可溶性または表面結合CD28抗体の一つかそれ以上からなる群から選択される、請求項16に記載の密閉システムキット。

【請求項19】

前記ビーズを使用しないT細胞活性化剤は、可溶性または表面結合CD3抗体の一つかそれ以上からなる群から選択される、請求項18に記載の密閉システムキット。

【請求項20】

前記ウィルスベクターは、レンチウィルス、レトロウィルスおよびアデノウィルスからなる群から選択される、請求項15に記載の密閉システムキット。

【請求項21】

前記第1容器および前記第2容器の一方又は両方が細胞培養バッグおよび細胞培養フラスコからなる群から選択される、請求項15に記載の密閉システムキット。

【発明の詳細な説明】

【関連出願】

【0001】

本願は、ここに全体を援用する、2021年12月22日を出願日とする米国仮出願第63/292,843号の優先権を主張する実用特許出願である。

【電子提出シーケンスリストへの参照】

【0002】

本出願とともに、2022年12月22日を作成日とし、バイト数が13000バイト

10

20

30

40

50

の、2459S_005WO.xmlを名称とするXMLファイルとして電子提出するシーケンスリスト全体を本明細書に援用するものとする。

【技術分野】

【0003】

本発明はウイルス媒介性導入を使用して一日未満で、遺伝子改変T細胞生成物を製造することを可能にするとともに、生成物リリース試験にイノベーションを加えてこの生成物を臨床使用するさいの障害を乗り越える迅速なT細胞製造工程に関する。

【背景】

【0004】

T細胞療法は疾患、特に癌、感染症や自己免疫疾患の治療に大きな潜在性を有する。T細胞療法の改善強化の一つの方法では、ウイルス媒介性遺伝子転移を使用してT細胞の遺伝子組み換えを行って、これら細胞の活性化および/または目的の標的細胞に対する特異性を強化する。例えば、レンチウイルスおよびレトロウイルスを使用してT細胞にキネマ抗原レセプター(CARs)を発現したところ、ガン治療に大きな潜在性があることがわかった。特にCD19に向けてキネマ抗原レセプター(CAR-T細胞)を発現する自己T細胞は再発または難治性B細胞性リンパ腫に罹っている患者に有意な効能を示した。

【0005】

遺伝子組み換えT細胞の潜在性については、再発または難治性非ホジキンリンパ腫(NHL)および急性リンパ性白血病(ALL)に対する自己CD19CAR-T細胞の顕著な臨床成功によって注目を浴びている。侵襲性疾患、再発疾患または難治性疾患の場合、化学療法で依然対処できるなら、大量療法に続いて自家肝細胞移植を行い、治療を行う(1、2)。不幸にも、患者の50%までに再発が生じるか、難治性になり、従来の化学療法では再発患者/難治患者では結果がおもわしくない(例えば、完全緩解率(CR)は7%で、中央値全生存期間は6.3カ月である(OS)(3))。対照的に、CD19CAR-T治療の場合、これらの患者では結果に有意に改善が認められた(例えば、1年目で>50%CR、>OS50%(4))。

【0006】

米国では市販のCD19およびBCMA CAR-T細胞製剤はFDAの承認を受け、その他多くの世界中の国で規制当局の認可を受けているにも拘わらず、既存の治療法は世界の多くの国で使用するにはコストが桁違いであり、米国においてさえ経済的なハードルは相当に高い。製薬会社での自家CAR-T製剤の現状での製造コストは患者当たり~100k USDと推定されている(5)。コストに加えて、製造プロセスが遅く、患者治療において望ましくない遅れが生じている。現状のFDA承認製剤は患者に届くまで~3-6週間を要し、治療遅れを原因としてかなりの数の患者において疾病が進行する結果になっている。現状のCAR-T治療の別な課題は、NHL、急性リンパ腫白血病や多発性骨髄腫などのB細胞悪性腫瘍以外の大半の悪性腫瘍に対する有効性が悪いことである。さらに、初期の結果が期待のもてるものであったNHLなどの疾病に対してさえ、多くの患者(~50%)は1年後に持続的な緩和をもつことができない(6、7)。CAR-T治療が患者において最善の結果が得られていない原因は複数考えられるが、一つの課題は患者に注入されたCAR-T細胞の持続性が低いことにある。CAR-T細胞の持続性は製造したCAR-T製剤の分化状態に相関するとの報告がある。特に、より分化率の高い製剤はより未熟度の強い細胞即ちナイーブ細胞と比較してin vivo持続性が低いと考えられている((8)に論考がある)。

【0007】

従来のCAR-T製造はT細胞分離、T細胞活性化、T細胞導入(回転接種、レトロネクチン、ポリブレンなどの導入効率を改善強化する方法と併用することが多い)を伴う長く、複雑な上にコストの高いプロセスである。有効な導入を可能にするT細胞刺激は一般にCD3またはCD3/CD28での刺激およびサイトカイン刺激(例えばIL-2、IL-7、IL-21および/またはIL-15)を伴う。多くの場合、コストの高い装置を必要とする複雑で高度な製造プロセスを利用するだけでなく、このプロセスは時間およ

10

20

30

40

50

び作業が集約的である。例えば、T細胞は長く、コストの高いプロセスを伴う磁気ビーズを使用して分離していた。ビーズの場合、さらに別な工程を付設して除去を行うため、時間がかかる上に、専用の装置および専用の製造技術が必要になる。複雑な製造の場合、生成物の殺菌性を確保する専用のクリーンルーム施設を使用する必要がある。

【0008】

T細胞にウィルス（例えばレンチウィルスやレトロウィルスなど）を効率よく導入するために、以前から知られているように、また広く実践されているように、サイトカイン（例えばIL-2、IL-7およびIL-15）の存在下で1～3日間T細胞を最初に活性化してから、ウィルス導入を行う必要がある。従って、従来の製造には、CD3および/またはCD3/CD28で1～3日間最初に活性化工程を行ってから、効率的な導入を実施できる。また、T細胞を活性化後1～2週間膨張させることも広く行われている。ウィルス導入後、従来の方法では一部T細胞膨張フェーズを行って、患者注入に十分なT細胞の生成を行っている。

【0009】

臨床的なCAR-T細胞の製造事例の大きな比率で、初期の製造段階（即ちウィルス導入の前の段階）でT細胞を分離する。特に、T細胞分離工程はウィルスをベースとする遺伝子工学を伴う従来から報告されている迅速な遺伝子組み換えT細胞製造工程（一日かそれ未満）全体の大部分を占める工程である。臨床的な製造を目的としてT細胞を分離するほぼすべての場合、T細胞の精製は磁気ビーズ（一般にはCD3/CD28 Dynabeads（登録商標）（ThermoFisher Scientific、Waltham、MA）またはCD4/CD8磁気ビーズ（Miltenyi Biotec、Bergish Gladbach、Germanyのいずれか））を使用して行う。患者への点滴前に多くは除去する必要のあるこれらビーズはT細胞に強く結合するため、剥落（一般に標的表面抗原のインターナリゼーション後に生じる）までに数日必要である。例えば、ThermoFisher Scientific社の報告によれば、CD3/CD28ビーズは剥落に数日要し、ビーズ剥落の結果として、ビーズ除去を～3日前に試みなければ、（結合ビーズのために）T細胞の有意な画分が失われることになる（asset.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/11131D_32D_61D.pdf）。

【0010】

Miltenyi Biotech社は、当社の磁気ビーズは2～3日では結合した細胞から離脱しないと報告している。実際、Miltenyi Biotechビーズは離脱する代わりに数日後にインターナリゼーション化し、従ってT細胞に未知の影響を与えることがある（Tthermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/cell-isolation-and-expansion/cell-isolation/see-how-miltenyi-microbeads-interact-with-your-t-cells.html）。

【0011】

複雑な製造工程に固有なコスト高および治療遅れの理由から、またT細胞の培養時間を短縮できるため、ナイーブ集団（例えばin vivo持続性の強化改善を目的とする）を維持できる作用効果から、簡単かつ迅速な製造工程が望ましい。特に、1日かそれ未満の工程が有利である。というのは、培養時間が短縮し、ナイーブT細胞集団が有意に増加し、最終的にクリーンルーム施設外部においての簡単な密閉システム製造が可能になるからである。さらに、T細胞の分離を必要としないプロセスは数多くの理由から有利な作用効果を実現できる。例示すると、プロセスの簡易性が増すためコストが下がり、専門技術度が下がり、作業員数が小さくなり、拡張性が増す。さらに、T細胞分離工程が必要なくなるため、腫瘍細胞や病原体感染細胞溶解性などの既知の好ましい治療特性を有するNK細胞などの付随的な細胞種を生成物は含むことができる。驚くべきことに、迅速CAR-T製造に分離T細胞とは逆に単核細胞（例えばPBMCMまたは単球欠失PBMCMなど）の混合集団を利用できる効果が随伴することも明らかになった。例えば、分離T細胞の場合、T細胞分離工程を使用せずにPBMCMを使用して実施した同じ製造プロセスと比較し

て、製造生成物における非常に望ましいナイーブ T 細胞集団が減少した。

【0012】

従来の臨床的に迅速 CAR-T 製造工程の場合、ウィルス遺伝子送達を利用するとの報告がある。その製造方法では T 細胞分離工程を使用するため、余計なコストや複雑性の層が付け加わり、大きな細胞損を惹起せずに細胞から磁気ビーズを外すことができないため、可能な限り短時間で細胞を効率的に製造する能力が阻害されることになる。

【0013】

一つの従来工程として、～24時間の ex vivo 培養を伴う2日未満の製造プロトコルが報告されている ([aspublications.org/blood/article/138/Supplement%201/2848/481328/Preservation-of-T-Cell-Stemness-with-a-Novel](https://www.aspublications.org/blood/article/138/Supplement%201/2848/481328/Preservation-of-T-Cell-Stemness-with-a-Novel))。報告によれば、このプロセスは T 細胞分離工程を伴う。鍵となる相違点は T 細胞分離、T 細胞活性化の方法であり、またサイトカインの使用であり、自動化の使用である。これらによって使用機器 (～400k) および高い消耗品コストの両者に対するコストが大幅に上昇する。マイクロビーズを使用するため、この生成物にはインターナリゼーションマイクロビーズが随伴する可能性が高い。

10

【0014】

1日以上実施できるとの報告がある別な従来工程では、分離 T 細胞に CD3 / CD18 Dynabeads および大投与量 IL-2 (300 μl/ml) を使用する必要がある。Dynabeads を使用するため、細胞を1日で採取すれば、T 細胞の損失がかなり大きくなる。さらに、大投与量の IL-2 を使用するため、T 細胞の分化が大きくなる。

20

【0015】

遺伝子組み換え T 細胞の複雑で、長時間を要する上にコストの高い製造工程における制限のために、現状の多数のアプローチでの T 細胞分化の課題からみて、効能があり、手に入れやすい CAR-T 生成物を製造できる迅速でコスト効果の高い、拡張可能な CAR-T 製造プラットフォームを開発する必要性は大きい。ここに記載の方法及びシステムはこの長年のニーズに応えるものである。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】1. Rodriguez J, Caballero MD, Gutierrez A, Solano C, Arranz R, Lahuerta JJ, Sierra J, Gandarillas M, Perez-Simon JA, Zuazu J, Lopez-Guillermo A, Sureda A, Carreras E, Garcia-Larana J, Marin J, Garcia J C, Fernandez De Sevilla A, Rifon J, Varela R, Jarque I, Albo C, Leon A, SanMiguel J, Conde E. Autologous stem-cell transplantation in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma not achieving complete response after induction chemotherapy: the GEL/TAMO experience. *Ann Oncol*. 2004; 15(10): 1504-9. Epub 2004/09/16. doi:10.1093/annonc/mdh391. PubMed PMID: 15367411.

30

【非特許文献2】2. Vose JM, Zhang MJ, Rowlings PA, Lazarus HM, Bolwell BJ, Freytes CO, Pavlovsky S, Keating A, Yanes B, van Besien K, Armitage JO, Horowitz MM, Autologous B, Marrow Transplant Registry Lymphoma Working C. Autologous transplantation for diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma in patients never achieving remission: a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol*. 2001; 19(2):406-13. Epub 2001/02/24. doi: 10.1200/JCO.2001.19.2.406. PubMed PMID: 11208832.

40

【非特許文献3】3. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruville J, Westin J, Link BK, Hay A, Cerhan JR, Zhu L, Boussetta S, Feng L, Maurer MJ, Navale L, Wiecek J, Go WY, Gisselbrecht C. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international

50

SCHOLAR-1 study. *Blood*. 2017;130(16): 1800-8. Epub 2017/08/05. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620. PubMed PMID: 28774879; PMCID: PMC5649550.

【非特許文献4】4. Westin JR, Kersten MJ, Salles G, Abramson JS, Schuster SJ, Locke FL, Andreadis C. Efficacy and Safety of CD19-Directed CAR-T Cell Therapies in Patients With Relapsed/Refractory Aggressive B-Cell Lymphomas: Observations From the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND Trials. *American journal of hematology*. 2021. Epub 2021/07/27. doi:10.1002/ajh.26301. PubMed PMID: 34310745.

【非特許文献5】5 Harrison RP, Zylberberg E, Ellison S, Levine BL. Chimeric antigen receptor-T cell therapy manufacturing: modelling the effect of offshore production on aggregate cost of goods. *Cytotherapy*. 2019;21(2):224-33. Epub 2019/02/17. doi:10.1016/j.jcyt.2019.01.003. PubMed PMID: 30770285.

【非特許文献6】6. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff P J, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycok J, Elias M, Chang D, Witezorek J, Go WY. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *NEngl J Med*. 2017;377(26):2531-44. Epub 2017/12/12. doi: 10.1056/NEJMoal 707447. PubMed PMID: 29226797; PMCID: PMC5882485.

【非特許文献7】7. Kersten MJ, Spanjaart AM, Thieblemont C. CD19-directed CAR T-cell therapy in B-cell NHL. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(5):408-17. Epub 2020/08/03. doi:10.1097/CCO.0000000000000668. PubMed PMID: 32740094.

【非特許文献8】8. Zhang H, Zhao P, Huang H. Engineering better chimeric antigen receptor T cells. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9(1):34. Epub 2020/12/10. doi: 10.1186/s40164-020-00190-2. PubMed PMID: 33292660; PMCID: PMC7709221.

【非特許文献9】9. Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *Journal of translational medicine*. 2010;8: 104. Epub 2010/10/28. doi: 10.1186/1479-5876-8-104. PubMed PMID: 20977748; PMCID: PMC2987859.

【非特許文献10】10. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jager U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak O, Salles G, Maziarz RT, Investigators J. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2019;380(1):45-56. Epub 2018/12/07. doi: 10.1056/NEJMoal 804980. PubMed PMID: 30501490.

【非特許文献11】11. Jones A, Torkel C, Stanley D, Nasim J, Borevitz J, Schwessinger B. High-molecular weight DNA extraction, clean-up and size selection for long-read sequencing. *PloS one*. 2021;16(7):e0253830. Epub 2021/07/16. doi: 10.1371/journal.pone.0253830. PubMed PMID: 342

10

20

30

40

50

64958; PMCID: PMC8282028.

【発明の概要】

【0017】

本発明の目的および作用効果に従うと、本発明の一つの態様は遺伝子組み換えT細胞集団の迅速な製造方法に関する。この方法は混合単核細胞集団を得る工程、ほぼ同時に混合単核細胞集団に含まれるT細胞集団を活性化し、混合単核T細胞集団をウィルスベクターに暴露し混合単核T細胞集団に含まれる少なくともT細胞集団に、外来ヌクレオチドを導入する工程を有する。T細胞を分離する工程は必要ない。本発明方法の実施態様では、少なくとも遺伝子組み換え集団を有する混合単核細胞集団を、同時に行う活性化工程および少なくとも一種のウィルスベクターに暴露する工程から24時間以内に採取する。

10

【0018】

いくつかの実施態様では、活性化工程はIL-2、IL-7、IL-15、およびIL-21からなるサイトカイン群のうちの一つかそれ以上から選択する活性化剤および/またはCD3、CD28、OX40、CD2、CD27、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、および4-1BB (CD137) のうちの一つかそれ以上を対象とする活性化剤から選択する活性化剤に混合単核細胞を暴露することによって行う。一部の実施態様では、IL-7およびIL-15からなる群のうちの一つかそれ以上から選択する活性化剤に混合単核細胞を暴露することによって活性化を行う。他の実施態様では、活性化工程およびウィルスベクターへの暴露工程の前に、単核細胞集団に含まれる単球集団の付着 (アドヒアランス) によって少なくとも部分的な欠失を行う工程を含む。

20

【0019】

本方法のいくつかの実施態様では、活性化工程およびウィルスベクターへの暴露工程については、外因性サイトカインの不在下で行うのが好ましい。活性化工程はCD3活性化剤、CD28活性化剤、可溶性か、あるいは表面結合CD3抗体、または可溶性か、あるいは表面結合CD28抗体の一つかそれ以上に混合単核細胞集団を暴露することによって行うことができる。

【0020】

混合単核細胞集団は遺伝子組み換えT細胞集団を有する。混合単核細胞集団はアフエリス、あるいは末梢血の採血によって得ることができる。

30

【0021】

いくつかの実施態様では、ウィルス導入ベクターはレンチウィルス、レトロウィルス、およびアデノウィルスからなる群から選択する。いくつかの実施態様では、実質的に同時に行う活性化工程およびウィルス導入ベクターへの暴露工程に続いて分画遠心工程を行ってDNAサイズ選択によってゲノムDNAからプラスミドDNAを除去する。

【0022】

本発明の別な態様は上記方法によって製造した遺伝子組み換えT細胞に関する。

【0023】

本発明のさらに別な態様は、上記方法に従って遺伝子組み換えT細胞集団を迅速に製造する方法を実施する密閉システムキットに関する。本発明の密閉システムキットは混合単核細胞集団を受け取る第1の殺菌容器、単球が欠失した混合単核細胞集団を受け取る第2の殺菌容器、ビーズを含まないT細胞活性化剤、T細胞集団に外因性ヌクレオチドを導入するウィルスベクター、適正な培地、および適正な細胞洗浄溶液を有するものとする。いくつかの実施態様では、混合単核細胞集団から単球を欠失させるために適する材料から少なくとも第1容器を形成する。第1および第2の容器については、ビーズを含まないT細胞活性化剤、ウィルス導入ベクター、培地、および細胞洗浄溶液を殺菌状態で導入できる容器を使用することができる。

40

【0024】

これら以外については、クローズドシステムキットの各種要素/試薬は上記と実質的に同じである。第1および第2の容器それぞれ、あるいは両者については、細胞培養バッグ

50

および細胞培養フラスコからなる群から選択することができる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

本発明の新規な特徴については、特許請求の範囲に具体的に記載した通りである。本発明の原理原則を適用した例示的な実施態様を記載する以下の詳細な説明を参照することにより本発明の特徴および作用効果をよりよく理解できるはずである。添付図面中：

【0026】

図1Aに20時間の同時導入/活性化工程を使用した導入効率および単球欠失PBMCに異なるT細胞活性化試薬を使用したGFPLレンチウイルスベクターの比較例を示す。20時間後に、細胞を洗浄し、遊離ウイルス/活性化試薬を除去し、溶解バッファーを使用してCloudz（登録商標）試薬を除去した。導入/活性化の3日後にフローサイトメトリーによってGFPR発現を求めた。利用した工程については、「迅速製造工程の詳細な実施例」の表題を付した欄に記載してある。パネルAにはマトリックスまたはビーズに接合したCD3およびCD28を有する3種類の試薬の使用例を示す。

10

【0027】

図1Bに、活性化剤として、可溶性のCD3（100ng/mL OKT3）またはCD3（100ng/mL）とCD28（300ng/mL）とを併用したものをを使用した以外は、図1Aと同様な製造工程を使用するT細胞製造を示す。さらに、製造はIL-7およびIL-15の存在下および不在下で行った。

【0028】

図1CにT細胞活性化試薬としてImmunocult（登録商標）をメーカーの推奨濃度で使用し、全サンプルにサイトカイン（IL-7およびIL-15）を使用した以外は、図1Bに示す工程で製造したT細胞を示す。

20

【0029】

図1Dに可溶性のCD3（100ng/mL OKT3）、表面結合CD3（5μg/mLのOKT3被覆表面）、またはTransAct（登録商標）（メーカー推奨濃度で使用）を使用してT細胞活性化を行った以外は、図1Aに示す工程で行ったT細胞製造例を示す。

【0030】

図2に同時T細胞活性化（表の左）および順次T細胞活化（表の右）の関係を示す。抗-FMC63抗体（AcroBiosystems、Newark、Delaware）を使用してフローサイトメトリーによってCD19CAR発現を評価した。導入4日後にCAR発現について細胞を調べた。レンチウイルス添加と同時に、あるいはウイルス添加の24時間前のいずれかでPBMCを培養し、これをCloudz（登録商標）T細胞活性化試薬で活性化した。

30

【0031】

図3に迅速な製造工程を使用して導入効率を調節する際の各種のサイトカインの比較例を示す。表示されたサイトカインを使用する「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄に記載したプロセスを使用して単球欠失PBMCにCD19CARレンチウイルスベクターを導入し、FMC63特異性抗体（AcroBiosystems）を使用するフローサイトメトリーによって72時間後にCD19CAR発現について評価した。

40

【0032】

図4に迅速な製造工程を使用する異なる培養時間についての評価を示す。単球欠失PBMCを活性化し、「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄の記載に従ってCD19CARベクターを導入した。プロセス開始6時間後または17時間後に細胞を洗浄して遊離ウイルスを除去し、CloudZ（登録商標）T細胞活性化試薬を除去した。次に、細胞を培地に72時間維持し、フローサイトメトリーによってCD19CAR表面発現を評価した。

【0033】

図5はUF-KURE19細胞が6日間製造した同様なCAR-T細胞よりもin vivo効能が向上したことを示す。NSGマウス（n=5~7/群）にRAJ-E細胞

50

エラーゼ細胞 (0.5×10^6) を静脈注射した。7日目に推奨数の U F - K u r e 1 9 C A R - T 細胞または C A R - T 細胞が 6 日間で製造した場合と同じ C A R を発現した。

【0034】

図 6 に効果的な迅速 T 細胞製造工程には外因性サイトカインが必要ないことを示す。N S G マウスに R a j i ールシフェラーゼ細胞を注射し、7 日後に推奨 C D 1 9 C A R - T 生成物または媒介物に注射し、推奨日に生物発光イメージングを行った。

【0035】

図 7 A にフラグメント除去率の低い q P C R リリース試験を示す。データは迅速製造工程を使用して C D 1 9 C A R - T 導入細胞から生成し、20 時間後に採取した D N A サンプルへの V S V G (レプリケーション能力を持つレンチウィルス) の T a q M a n をベースとする q P C R 試験の結果を示す。(P a c B i o 試薬を使用する) 上記プロトコルを使用して D N A 生成を低いフラグメント除去率を目的として行った。P C R 試験はフラグメント除去率の低いサンプルまたはフラグメント除去を行わないサンプルで行った。

10

【0036】

図 7 B に C D 1 9 C A R レンチウィルスベクターを導入し、各種 M O I で 8 日間培養した T 細胞の導入細胞当りのベクターコピー数のデータを示す。C D 1 9 C A R 発現については C D 1 9 C A R 特異性抗体 (A c r o B i o s y s t e m s) を使用するフローサイトメトリーによって求め、コピー数については G A G および P T P B 2 を対象とする q P C R によって求めた。

【0037】

図 7 C に、図 7 B に示すベクターに 10 : 1 の M O I を使用する迅速製造工程を使用して製造した導入細胞当りのベクターコピー数および T 細胞の C D 1 9 C A R 表面発現に関するデータを示す。導入細胞当りのベクターコピー数については、図 7 B に示す q P C R およびフローサイトメトリーによって求めた。S R E k i t (P a c B i o) を使用して P C R 前に低フラグメントサイズの D N A を除去した。

20

【0038】

図 7 D に D N A ゲル電気泳動の結果を示す。この結果はゲノム D N A の量またはサイズ分布に低いフラグメント除去率が大きな影響を与えないことを示している。レンチウィルス C D 1 9 C A R ベクターを導入し、20 時間後に採取した 2 種類の異なる T 細胞サンプルからゲノム D N A を D N e a s y B l o o d および T i s s u e K i t を使用して生成した。ゲノム D N A サンプルにアガロースゲル電気泳動を直接行うか、あるいは P a c B i o 10 k b S R E K i t を使用して低入力欠失を行った後にこれを行った。レーン 1 : D N A マーカーレーン 2 : サンプル 1 トータルゲノム D N A レーン 3 : S R E キット処理レーン 4 後のトータルゲノム D N A : サンプル 2 トータルゲノム D N A レーン 5 : S R E キット処理後のサンプル 2 トータルゲノム D N A 。

30

【0039】

本発明では各種変更などが可能であるが、本発明の具体的な実施態様は例示のみを目的として図示し、以下に詳細に説明する。なお、具体的な実施態様の説明は本発明を制限するものではなく、特許請求の範囲に記載した発明の精神および範囲内に包含されるすべて変更例や等価例などを包摂するものである。

40

【詳細な説明】

【0040】

以下、本発明要旨を具体化した一つかそれ以上の実施態様を詳述する。本明細書に開示する実施態様へ変更などを加えることを始めとする他の実施態様は、本明細書に開示する情報に照らせば、当業者にとっては自明なことと考えられる。本明細書に開示する情報、特に例示的な実施態様の具体的な細部は理解を容易にすることを第 1 の目的とし、これから不必要な限定は読み取る必要はない。矛盾がある場合は、定義を含め本明細書が優先される。

【0041】

従来方法における上記に要約した課題やその他の欠点に対処するために、また信頼性が

50

高い上にコストパフォーマンスが高く、簡単かつ拡張可能な超高速T細胞製造方法（1日かそれ未満）を開発するために、磁性ビーズを使用する必要がない、場合によってはT細胞分離もサイトカインも使用する必要のないCAR-T細胞の製造方法を開発した。本発明者らは驚くべきことにいかなるエンハンサー（ポリブレン、スピン接種やレトロネクチンなど）を使用せずに、同時に行うT細胞活性化およびウィルス導入を使用して、（混合PBM C、単球欠失PBM Cまたは分離T細胞のいずれかを出発原料とする）T細胞の導入効率を高くできる方法を確認した。この方法は、驚くべきことに、サイトカイン（IL-2、IL-7および/またはIL-15など）の不在下でも、あるいは存在下でも実施できる。以前からある提案に反して、この方法を使用するT細胞導入効率はより従来のT細胞活性化に続いてその1～3日後にウィルス導入を行う場合と同じくらい高い導入効率を達成できた。分離T細胞ではなく、出発源としてPBM Cを使用すると別な作用効果も得られる。即ち、共刺激信号を発する他の単核細胞が存在しているため、CD-28共刺激を必要とすることなくCD3活性化を単独で利用できる。CD3／CD28活性化試薬を使用する必要なくCD3刺激だけでT細胞活性化を行った場合には、目的のセントラルメモリーT細胞をより多く保存できることが知られている（9）。従って、開発したT細胞工程では、プロセスを高度に簡略化でき、従来方法に比較してコストを大幅に削減できるうえに、効率も強化改善できる。

10

出発原料としてPBM C、単球欠失PBM Cまたは分離T細胞を使用できる超高速製造プロセスの開発

20

【0042】

本発明の方法では、製造はT細胞の予備的分離工程を行ってから、あるいは行う必要なく実施できる。T細胞の予備的分離を行わない場合には、より迅速に製造工程を実施できる上にコスト削減も可能になり、さらに驚くべきことに、目的のナイーブT細胞を高率化できる。直接T細胞分離を行わずに血液アフェレシスまたは末梢血サンプルを使用する場合、固体表面（組織培養フラスコ/プレートまたはバッグなど）に単に付着するだけで単球欠失によりT細胞を富化できる。単球欠失はプレートやバッグなどの付着表面で実施でき、密閉系でも実施できる。単球欠失は生成物を部分的に生成する簡単かつコストの低い、迅速な方法である。

【0043】

別な態様ではT細胞分離工程を行わないため、最終生成物は遺伝子工学T細胞だけでなく、有利な治療作用を有しているNK細胞などの他の細胞種も含有できる。

30

【0044】

本発明の場合、一つの態様ではビーズを含まない活性化試薬を使用してT細胞を同時に活性化し、低濃度のIL-7およびIL-15（例えば5～10 ng/mlかそれ以下）の存在下で、しかも重要なことにはIL-2の不在下で導入を行う。IL-2はT細胞分化を促すことが公知であり、IL-2の存在下で培養した細胞はナイーブ/未分化フェノタイプの保存率が低いことが知られている。これは、特に使用量（例えば300 IU/ml）が大きい場合に該当する（11-12）。

【0045】

別な態様では驚くべきことに、T細胞の活性化および導入を同時に行う工程はIL-7またはIL-15の存在下では効率が高く、いずれもサイトカインは必要ない。従って、製造工程はIL-7単独下で、あるいはIL-15単独下で実施できる。

40

【0046】

さらに別な態様では驚くべきことに、T細胞の活性化および導入を同時に行う工程はIL-2、IL-7またはIL-15を始めとする外因性サイトカイン添加の完全な不在下で効率が高くなる。従って、製造工程は任意の外因性サイトカインを添加して実施できる。

【0047】

別な実施態様では、遺伝子組み換えT細胞生成物は好ましくはほぼ17～20時間を含む24時間未満で製造できる。

50

【0048】

この工程では、ウィルス導入またはT細胞分離に先立って予め活性化工程を行う必要がなく、いずれも重要な製造時間を短縮でき、製造コストを削減できる。従来、未精製単核細胞（例えばPBMCなど）または単球欠失PBMCの同時導入および活性化を使用すると、（精製T細胞の場合とは逆に）迅速CAR-T製造を効率よく実施できるという報告はない。

【0049】

細胞活性化については、Transact (Miltenyi Biotec)、Cloudz T細胞活性化剤 (Biotechne)、可溶性または表面結合CD3および/またはCD28抗体やCD3および/またはCD3/CD28抗体を共役化したカスタムマイクロバブルなどのCD3またはCD3およびCD28を介してT細胞を活性化する各種試薬を使用して実施できる。特に、Cloudz T細胞活性化剤の場合、TransactよりもT細胞を活性化するとともにこれにウィルスを導入できる能力が高く、これは予期せぬことである。加えて、CD28を併用した、あるいは併用しない可溶性または表面結合CD3も工程実施期間が1日未満である。

10

【0050】

細胞活性化については、CD3およびCD28以外の（あるいはCD28に加えて）他の共刺激分子例えばOX40、CD2、CD27、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) および4-1BB (CD137)などを介してT細胞を活性化する試薬を使用しても実施することができる。

20

【0051】

細胞の活性化および導入後、1日未満（例えば～17から20時間）で細胞を採取でき、直接治療目的に使用してもよく、あるいは後日使用するために凍結保存できる。この製造方法によって得られるT細胞は、T細胞に導入された遺伝子の発現が細胞採取時だけでなく、レシピエントへの注入時に十分でない事実にも拘わらず高い治療効果を示す。

【0052】

従って、本発明方法によれば、細胞治療生成物用の迅速な製造プロトコルが可能になり、実施時間を1日未満に設定できる。

【0053】

本発明方法の別な態様では、手動プロセスまたは自動化プロセスを使用する完全な密閉システム内でT細胞製造プロセスを実施できる。さらに別な態様では、クリーンルームの外側にある完全な密閉システム内で製造を実施できるため、専用のクリーンルームインフラを用意していない多数のセンターで製造を実施できる。

30

【0054】

本発明工程のさらに別な態様は、迅速製造工程で生じるウィルス導入細胞治療生成物に必要なリリース試験における擬陽性の反応性を排除する方法である。レンチウィルスまたはレトロウィルスを生成する細胞トランスフェクション（例として293細胞や293T細胞）からの残留プラスミドDNAは、製造時に最初の数日間細胞治療生成物内に存在する。このプラスミドDNAがベクターコピー数およびレプリケーション能力をもつウィルス試験qPCR評価を実施するさいに擬陽性結果をもたらす。この工程にはリリース試験を組み込み、分画遠心分離に基づくサイズ分離工程を併用してこのプラスミドDNAを排除し、リリースの要求が多い迅速製造T細胞生成物の臨床使用を可能にする。

40

【0055】

本発明の要旨をさらに以下の非制限的な具体的な実施例によって説明する。以下の実施例は本発明の開発および実験の過程における各種時期に収集したデータを表す編集データを含むものである。

【実施例】

【0056】

迅速な遺伝子組み換えT細胞製造プロセスの開発

【0057】

50

従来方法では、前記の迅速な（例えば1日かそれ未満）ウィルス系遺伝子組み換えT細胞製造プロセスは初期に行うT細胞分離工程を有する。ここで開発した迅速な製造プロセスでは、分離したT細胞に加えてPBM Cまたは単球欠失PBM Cを利用できる。PBM Cを出発源として使用する場合には、適宜使用する初期工程で生成物から単球を部分的に欠失することが望まれるさいに単球欠失を行う。この欠失によって、例えば、T細胞、そして場合によってはNK細胞を含む最終生成物にとってより望ましい特定の細胞型にウィルスが優先的に感染できることになる。この欠失は完全でないため、単球が刺激信号（例えばCD80／CD86）をT細胞に送ることになる（例えばT細胞活性化が外因性CD3刺激のみを使用して可能になり、外来CD28または他の刺激との共刺激は必要ない）。一般に、下記の欠失方法を適用すると、図1に示すように、培養2時間後に始まる出発血液製剤からの単球減少率がほぼ50％になる。2時間後に培養を継続したが、この方法を使用する欠失に大きな影響はなかった。さらに、細胞培養を行った細胞密度（5×10⁶細胞/mlおよび2×10⁶細胞/ml）は同じ結果を示す。この欠失は組織培養プレートまたはフラスコでも、あるいはSaint Gobain（仏、パリ）を製造元とするVuelife（登録商標）“AC”シリーズバッグなどの密閉系でも同様な結果を示す。

【0058】

表1：PBM Cからの単球欠失

	1hr	2hr	3hr	4hr
培養細胞濃度	MO%	MO%	MO%	MO%
2 x 10 ⁶ /ml	21.46	13.77	14.86	14.95
5 x 10 ⁶ /ml	20.87	11.25	10.97	11.09

【0059】

末梢血アフレシスサンプルからの単核細胞を組織培養インキュベータ内の6ウェル組織培養プレートで培養した。培養は温度37℃で、表示した時間行った。血液学分析装置（Hemavet（登録商標）、Drew Scientific、Miami Lakes、Florida）を使用して下記時点で被附着細胞内において単球率を求めた。出発集団の出発単球の百分率は25.02％であった。MO％＝単球パーセント。

【0060】

分離T細胞を使用する場合には、これらT細胞は全血、アフレシスサンプルまたは別なT細胞源から直接分離できる。これらT細胞は任意の利用できる方法で分離できる。例えば、CD3、CD4またはCD8磁気ビーズ（例えばMiltenyi BiotecマイクロビーズやThermoFisher Scientific dynabeads（登録商標））の磁気ビーズアプローチを使用できる。これらT細胞はCD3マイクロバブル、CD3／CD28、あるいはCD3やその他のT細胞共刺激リガンドで共役化したマイクロバブルを使用しても効率的にかつ迅速に分離できる。具体的には、脂質マイクロバブルを使用すると、迅速かつ効率的な分離を実施できると同時に、活性化信号を発することができる。

【0061】

複数のアプローチによってT細胞を活性化できる。PBM Cまたは単球PBM Cを使用する場合、迅速製造工程では可溶性の活性化試薬または表面結合（プレート/バッグなど）のほうが磁気ビーズアプローチよりも好ましい。一つの効果的な活性化アプローチでは、CD3／CD28溶解性マイクロスフェア（ミネアポリス、ミネソタのBiotech

ne / R & D システムズ社製の Clouds (登録商標) Human T 細胞活性化試薬) を使用する。この試薬は数分以内で溶解するため、磁気ビーズを必要せず、生成物の汚染を引き起こすことのないアルギン酸塩共重合体からなる。別な活性化試薬、例えば Immunocult (登録商標) CD3 / CD28 Activator (Stem Cell Technologies、Vancouver Canada) などとも使用可能である。また、利用できる別な活性化剤としては、CD3 又は CD3 / CD28 磁気ビーズ (例えば Dynabeads (登録商標) ThermoFisher Scientific) または TransAct (登録商標) (Miltenyi Biotec) などがある。磁気ビーズ系剤や TransAct 剤については最適であるとは言えない。磁気ビーズは必要な労力が大きく、また初期時点で強く結合するため問題の多い除去工程を必要とするからである。この結果、細胞の過剰な損失を招く。TransAct (登録商標) 活性化試薬については、他の製品と比較すると活性化が “ゆるくかつゆっくり” した試薬との報告があり、後の時点で最適なウィルス導入窓が形成するとの報告があり、また最適なウィルス導入を可能にするために、ウィルス導入前に T 細胞活性化に 1 ~ 2 日必要とするとの報告もある。さらに、TransAct (登録商標) が添加後 2 ~ 3 日前に洗浄によって流された場合には、T 細胞増殖を阻害するとの報告もある (miltenyibiotec.com / upload / assets / IM0017348.PDF)。従って、活性化および導入を同時に行い、1 日未満で生成物を採取する製造プロトコルに関しては、TransAct (登録商標) は好ましい活性化試薬とはいえない。

10

20

【0062】

マトリックス対応活性化試薬に加えて、可溶性あるいは表面被覆 CD3 抗体 (例えば OKT3 抗体、他の CD3 抗体など) を単独で使用するか、あるいは可溶性の CD28 抗体または他の共刺激剤と併用することも別な有効な活性化方法であり、本発明の迅速な製造工程に十分対処できるものである。特に、この方法は共刺激のために外因性 CD28 やその他の試薬を使用する必要なく、T 細胞を活性化できる PBMC 系アプローチの作用効果を享受する方法である。加えて、OKT3 などの CD3 抗体を使用する方法を適用すると、他の活性化刺激に比べてコストを大幅に削減できる上に、患者に未知の副作用をもたらす製造生成物内に存在するスキャホールド (例えばアルギン酸塩、磁気ビーズなど) に伴う危険を最小限に抑えることができる。

30

【0063】

特異性 T 細胞活性化試薬については、上記の 1 日未満の迅速な製造工程においてより効果的に機能することが判明している。特異性 T 細胞活性化試薬を比較するために、IL-7 (10 ng/ml) および IL-15 (5 ng/ml) を含有する TexMACs (登録商標) (Miltenyi Biotec) 培地内の 3% CTS (登録商標) 免疫細胞血清リプレースメント (ThermoFisher Scientific) 中の 96 ウェルプレート内で単球欠失 PBMS (100 µl 中の細胞数 200,000) を培養した。GFP レンチウィルスベクターおよび (メーカーが推奨する濃度を使用する) 活性化試薬を添加し、4 日間細胞を培養した。細胞を洗浄し 20 時間後に培地を交換して遊離ウィルスと遊離活性化試薬を除去した。Cloudz (登録商標) 含有細胞については、溶解バッファーを使用して活性化試薬を除去した。GFP の発現をフローサイトメトリーによって測定した。図 2 A に示すように、Cloudz (登録商標) ヒト T 細胞活性化試薬は TransAct (登録商標) および CTS CD3 / CD28 Dynabeads (登録商標) よりも迅速な製造工程を使用する導入効率の最大化においてより効率的であった。添付図面の多くの場合、ウィルスベクターの使用量は、導入効率を最大化するために過剰量を使用した場合とは逆に、条件間の差異化を促すために低く抑えたことに留意すべきである。図 2 において、高レベルのレンチウィルスベクターを使用した場合に、迅速な製造工程の導入効率を高く維持できる能力が認められる (なお、導入細胞当りのベクターコピー数は 5 未満に維持している)。図 2 B にも示すように、迅速な製造工程は可溶性 CD3 および / または可溶性 CD3 および CD28 抗体 (図 2 C) にも適用可能である。例えば広く使用される CD3 抗体、OKT3 の使用はこの工程に適用できる (図 2 C)。本製造プ

40

50

ロセスに単球欠失を併用すると、C D 3 の単独使用によって導入効率の点で C D 3 および C D 2 8 抗体補給と同様な機能が得られる。留意すべき点は、本製造工程では導入効率の点において O K T 3 C D 3 抗体刺激が I m m u n o c u l t (登録商標) よりも効率が高かったことである (図 2 C)。本発明の迅速製造工程を使用すると、生成物採取時点で (培養開始 2 0 時間後に) C D 6 9 発現によって測定した場合に、表面結合 (例えばプレートまたはフラスコなど) C D 3 抗体および可溶性 C D 3 抗体の両者によって C D 4 T 細胞および C D 8 T 細胞が同様に活性化する。留意すべき点は、可溶性/表面結合 C D 3 で処理した群よりも C D 4 T 細胞における C D 6 9 アップレギュレーションレベルが T r a n s a c t (登録商標) によって低下したことが観察されたことである。この事実は可溶性 C D 3 または培養容器に結合した C D 3 が本発明の迅速工程を使用する T 細胞活性化に効率よく使用できることを示す。さらに、これら活性化試薬が T r a n s A c t (登録商標) などの他の試薬よりもすぐれていることも認められる。

10

【0064】

当分野においては一般に、ウィルス導入効率を最大化するためには、連続 T 細胞活性化に続いてウィルス導入を行うことが必要であると考えられている。ところが、上記の結果は少なくとも本発明の一態様の製造工程を使用すると、T 細胞活性化とウィルス導入を同時に行う方法では、連続方法と本質的に同等な導入効率しか得られないことを示すものである。例えば、C l o u d z T 細胞活性化試薬を使用して単球欠失 P B M C を活性化し、「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄に記載した製造方法を使用して、C l o u d z (登録商標) 添加と同時に、あるいはその 2 4 時間後にレンチウィルス C D 1 9 C h i m e r i c A n t i g e n R e c e p t o r (C A R) ベクターを導入した。図 2 から理解できるように、同時導入を使用した C A R 発現と上記製造工程を使用する連続ウィルス導入を使用した C A R 発現との間には意味のある差異は認められない。

20

【0065】

従来の、そして前記の迅速 T 細胞製造アプローチのいずれもがほぼ一様に I L - 2、I L - 1 5 および/または I L - 7 などのサイトカインを使用する培養条件を採用している。迅速な製造工程に採用するのに最適なサイトカインを評価するために、I L - 2 (3 0 0 μ /m l)、I L - 1 5 (5 n g/m l)、I L - 7 (1 0 n g/m l)、I L - 1 5 および I L - 7 を併用したものを使用し、あるいは外因性サイトカインの完全不在下で「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄に記載した製造プロセスを行った (図 4)。異なるサイトカイン群間における導入 7 2 時間後の T 細胞中の C D 1 9 C A R 発現を比較したところ、導入効率に差異は認められなかった。驚くべきことに、サイトカインの完全不在下でも導入効率に差異は認められなかった。従って、外来サイトカインの不在下で実施できるように製造プロセスを簡略化して、さらにコストを下げ、望まない分化/活性化を引き起こす T 細胞への刺激を抑制することができる。図 1 B から理解できるように、迅速 T 細胞製造プロセスはサイトカイン存在下、不在下で実施した製造との比較から、ほぼ T 細胞の G F P 導入と同じ位効率的であった。

30

【0066】

製造プロセスの別な鍵となる特質は培養期間である。製造工程の一つの目的はその培養期間を制限して、ナイーブ T 細胞部分を分画保存することであるため、培養時間 6 時間と 1 7 時間を使用して製造プロセスを比較した。両方の培養時間の最後で、溶解緩衝液を使用して C l o u d z (登録商標) 試薬を除去し、細胞を洗浄してウィルスを取り除き、ウィルスまたは活性化試薬を含まない新規な培地に懸濁し、合計 7 2 時間培養を行い、C A R 発現を測定した。図 4 に示すように、レンチウィルスベクターおよび T 細胞活性化試薬の 6 時間の培養時間は、フローサイトメトリーによって 3 日目の培養時間測定による有意な C D 1 9 C A R 発現をもたらすために不十分であった。数時間以上ほぼ 1 5 時間未満の中程度の時間は、一般に就業時間中に製造を実施しなければならない制限があるため好ましいとは言えない。

40

【0067】

製造プロセスでは出発源として P B M C または単球欠失 P B M C を使用し、培養時間が

50

1日未満であるため、最終生成物はT細胞に加えて付随的な単核細胞からなる。生成物の組成を評価するために、「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄に記載した方法を使用して、製造工程を3回行った。表2に示すように、T細胞は生成物の最大の画分であるが、生成物は少数のB細胞、NK細胞および単球を含有する。好適な製造方法では凍結生成物を生成するため、生成物の解凍後に試験を行った。顆粒細胞は出発アフェレシスサンプルを少量含むだけでなく、凍結/解凍に対してきわめて敏感であるため、顆粒細胞は生成物中にほとんど検出されなかった。

【0068】

表2．解凍UF-KURE19（17製造時間）生成物を使用した3回の製造工程で得た生成組成物

	Product 1	Product 2	Product 3
% 生存能力	88	94	90
% T cells (CD3)	78	82	78
% CD4 of T cells	53	45	56
% CD8 of T cells	47	55	44
% B cells (CD19)	7	5	5
% NK cells (CD56)	11	6	8
% Monocytes (CD14)	6	3	7

【0069】

CD3、CD4、CD8、CD19、CD56およびCD14抗体だけでなく、7-ADに関してフローサイトメトリーを使用して生成物組成を決定し、生存能力を評価した。

【0070】

レンチウイルス導入後CARなどの蛋白質の有意味な発現はT細胞中では17～20時間以内に生じないため、導入CD19CAR-T生成物の*in vitro*活性を評価するために、「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄に記載した製造工程を使用して単球欠失PBMCからCD19CAR-T細胞を製造した。活性化/導入を20時間行った後、細胞から遊離ウイルスを洗い流し、Cloud Z（登録商標）T細胞活性試薬を除去した。次に、合計3日間の培養期間で細胞を培養してから、標的RAJIヒトリンパ腫細胞及びCAR表面発現に対する細胞傷害活性について評価を行った。表3から理解できるように、迅速製造CAR-T細胞はRAJI腫瘍細胞を高率的に溶菌できた。

【0071】

表3．培養3日後の迅速製造CD19CAR-T細胞の細胞障害活性の*in vitro*試験の結果

	Product 1	Product 2	Product 3
T細胞のCAR発現%	50	44	53
RAJI細胞の溶菌% (CAR-T/RAJI5:1)	51	56	56

【0072】

「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄の記載に従って単球欠失PBMCにCD19CARレンチウイルスベクターを導入し、Cloud Z（登録商標）T細胞活性試薬でT細胞を活性化した。遊離ウイルスを取り除き、20時間後にT細胞活性化試薬を溶解し、細胞培養を3日間継続した。CD19CAR-T細胞のRAJI腫瘍細胞に対する細胞傷害活性について、CAR-T細胞での4時間の共培養後の腫瘍細胞からのカルセインAM色素ロスをフローサイトメトリーによって測定することによって評価した。FMC63特異性

抗体 (AcroBiosystems) を使用するフローサイトメトリーによって CD 19 CAR 発現を測定した。

【0073】

培養 17 ~ 20 時間で生成物を採取したさいに標準的なフローサイトメトリー方法において T 細胞の表面に CD 19 CAR 蛋白質が有意に発現しなかったので、マウスモデルにおいて T 細胞の活性を評価し、生成物の効能を求めた。このようにして、CAR の *in vivo* 完全発現が生じ、T 細胞がヒト CD 19 を発現する細胞に対して細胞傷害活性を獲得できる。迅速製造 CAR-T 生成物の効能が改善したことを証明するために、この *in vivo* 研究では、「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄の記載に従って単球欠失 P BMC を出発原料とし、CD 19 CAR レンチウィルスを導入して 17 時間で製造した凍結保存細胞を利用した。CD 19 CAR を発現したこの生成物を UF-KURE 19 細胞と呼ぶ。同じ工程を使用するが、17 時間の代わりに 6 日間培養を継続した細胞については、Kure 19 と呼ぶ。ヒト RAJI 腫瘍細胞を免疫不全マウス (NSG) に静脈注射してから、腫瘍細胞注射の 7 日後に、CAR-T 生成物の一投与分を静脈注射するヒト悪性リンパ腫の循環マウスモデルで試験した。従来は、このモデルに ~ 500 万の CAR-T 細胞を使用して、有意な効能を実証していたが、本発明の迅速製造生成物の効能が改善することが期待できるため投与量を少なめにした。この UF-KURE 19 生成物の場合、UF-KURE 19 群には 2 百万および 4 百万の CAR 陽性 T 細胞を投与し、6 日間製造生成物には 2 百万の CAR 陽性 T 細胞を投与した。図 5 から理解できるように、UF-KURE 19 細胞は投与量が低くても、あるいは高くても顕著な効能を示す。対照的に、6 日間培養生成物は溶媒処理マウスに比べて腫瘍進行を抑制するが、UF-KURE 19 生成物と比べると、効能は大きく低下する。Kure 19 を使用したマウス研究と同様に、UF-KURE 19 注射投与群は治療によく対処し (体重変化、食事摂取量、外観および行動を見る限り)、毒性の徴候は明らかに見て取れない。

【0074】

CD 19 CAR-T 細胞は (トランスジーンの検出によって測定する限り) 数カ月間、場合によって数年間効果が持続したことが分かっている。例えば、Tisa-cell 生成物は好ましい臨床結果を示した一部の患者では少なくとも 2 年間効果が持続したことが分かっている (10)。RAJI 悪性リンパ腫瘍に罹患している NSG マウスの血液内のヒト T 細胞の増殖についてフローサイトメトリーによって測定した。図 9 にメスの NSG マウスに RAJI 腫瘍細胞を注射 (0.5 million i.v.) した後所定時点でのマウス末梢血の μ l 毎に検出されたヒト T 細胞の平均数を示す (所定時点当りの $n = 3 \sim 5$ で測定を実施)。留意すべき点は、これら測定値を得た血液サンプルは上記に示したマウス有効性研究から誘導したものであることである。表 4 に示すように、UK-KURE 19 細胞の効能は製造日数が 6 日の KURE 19 CAR-T 細胞よりもかなり高く、これはヒト T 細胞増殖に相関する。

【0075】

表 4 : マウス血 1 μ l 当りのフローサイトメトリーによる検出細胞数

	UF-Kure19 4x10 ⁶ cells	UF-Kure19 2x10 ⁶ cells	6 Day CAR-T 2x10 ⁶ cells
Day 32	126.7	60.1	2.7
Day 39	410.1	ND	7.3
Day 46	969.1	995.6	14.9

ND= 検出されず

【0076】

上記のように、迅速製造工程時にサイトカインは、有意な導入効率を達成するためには使用する必要のないものであった。従って、採取 (20 時間) 時に T 細胞への記憶/分化状態へのサイトカインの使用影響を以下のフローサイトメトリーによって評価した。さ

らに、図 10 に示す製造プロセスに異なるサイトカインを使用し、あるいはサイトカインを使用せずにこの評価を行って、サイトカインの生成物への影響を調べた。最後に、単球欠失 P B M C と出発源としての分離 T 細胞の使用について比較を行った。サンプルのサブセット用の出発源として精製 T 細胞を使用した以外は、「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄に記載した製造工程を使用した。R o s e t t e S e p (登録商標) 製のヒト T 細胞エンリッチメントキット (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s) を使用して、末梢血から T 細胞を精製した。表 5 から理解できるように、分離 T 細胞から出発した生成物と単球欠失 P B M C とを比較した場合、生成物の C D 8 + T 細胞成分は同一ではないことが認められる。特に、P B M C を出発源とした場合には、エフェクターメモリ T 細胞のレベルがわずかに低くなり、T E M R A 細胞のパーセントがわずかに高くなる。C D 8 + T E M R A 細胞の役割については十分に説明されていないが、有用な細胞毒性が強くなると考えられる。C A R - T 効能に相関することが知られているきわめて有用なナイーブ T 細胞のレベルは、C D 8 + T 細胞区画において P B M C または分離 T 細胞で出発した場合と同程度であるが、分離 T 細胞やより低いレベルのより分化した、程度の低いエフェクターメモリ T 細胞と比較した場合には P B M C における有益なセントラルメモリー T 細胞の割合はより高くなる。C D 4 + T 細胞区画では、出発源として分離 T 細胞を使用するよりは P B M C を使用した方が高度に有益なナイーブ T 細胞の割合が高くなる。従って、生成物のフェノタイピングに基づくと、P B M S を使用する工程を使用して開始したほうがより有利であり、臨床的結果が改善し、C A R - T 細胞の i n v i v o 持続性が改善することが判明している。さらに、本研究では、異なるサイトカイン (I L 2、I L 7、I L - 1 5) を使用した場合、又は製造時にサイトカインを使用しない場合について検討を行った。表 5 から理解できるように、P B M C から出発した場合、T 細胞メモリー/分化フェノタイプの点においてどのような条件でも 20 時間工程時に意味のある差異はなく、これは単球欠失 P B M C から出発した場合、この製造工程では驚くべきことにサイトカインは必要な成分ではないことを示唆するものである。興味深いことに、分離 T 細胞から出発し、サイトカインを使用しなかった場合、ナイーブ T 細胞の減少が認められ、これは分離 T 細胞を出発源とする場合、製造時にサイトカインを使用することの重要性を示唆するものである。即ち、P B M C はサイトカインの内因源となり得るものである。

【 0 0 7 7 】

表 5 . 迅速工程を使用して製造した T 細胞のフェノタイプ
C D 8 + T 細胞

T cells		TEMRA	ナイーブ	CM	EM
		CCR7-			
活性化	サイトカイン	CD45RA ⁺	CCR7 ⁺ CD45RA ⁺	CCR7 ⁺ CD45RA-	CCR7-CD45RA-
No	No	4.79	63	6.01	26.2
Yes	No	5.87	58.9	8.53	26.7
Yes	IL2 (300u/ml)	6.75	65.7	5.81	21.7
Yes	IL7 (10ng/ml)	6.73	62.1	6.6	24.6
Yes	IL15 (5ng/ml)	5.02	66.1	6.13	22.8
Yes	IL7 + IL15	5.62	65.4	6.86	22.2
PBMCs					

		TEMRA	ナイーブ	CM	EM
		CCR7-			
活性化	サイトカイン	CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-
No	No	3.3	66.8	8.2	21.8
Yes	No	10.4	64.8	10.1	14.8
Yes	IL2 (300u/ml)	10	64.7	12	13.3
Yes	IL15 (5ng/ml)	8.2	66.3	11.6	13.9
Yes	IL7+IL15	5.6	68.4	11.8	14.2

10

CD4⁺ T cells

T cells

		TEMRA	ナイーブ	CM	EM
		CCR7-			CCR7-
活性化	サイトカイン	CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CD45RA-
No	No	4.1	66.1	18.1	11.6
Yes	No	3.5	63.6	23.2	9.7
Yes	IL2 (300u/ml)	4.1	70.3	18.3	7.3
Yes	IL7 (10ng/ml)	3.3	68.0	20.4	8.3
Yes	IL15 (5ng/ml)	1.9	70.1	21.2	6.8
Yes	IL7 + IL15	2.4	70.2	20.6	6.8

20

PBMCs

		TEMRA	ナイーブ	CM	EM
		CCR7-			CCR7-
活性化	サイトカイン	CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CD45RA-
No	No	2.0	74.4	15.9	7.8
Yes	No	5.4	77.0	13.8	3.8
Yes	IL2 (300u/ml)	4.7	79.7	12.4	3.2
Yes	IL15 (5ng/ml)	3.8	78.7	14.3	3.2
Yes	IL7 + IL15	2.7	82.0	12.3	3.1

30

40

【0078】

「迅速製造工程の詳細な実施例」の欄に記載した迅速工程を使用し、あるいは分離T細胞を出発細胞源として使用する以外はこの工程と同じ工程を使用してT細胞を製造した。20時間後、フローサイトメトリーによって細胞をT細胞フェノタイプについて評価した。

【0079】

in vivo 研究の結果、サイトカインはT細胞を効率よく導入するためには、あるいはPBMCを出発源とする迅速な製造工程を使用して好適なメモリー/分化T細胞フェノタイプを維持するためにはサイトカインは必要がないと認められたために、マウスのi

50

n v i v o 効能研究を行って、さらにこれらの知見の確認を行った。培養時に I L - 7 (1 0 n g / m l) あるいは I L - 1 5 (5 n g / m l) のいずれかを使用して、あるいはサイトカインを使用せずに、単球欠失 P B M C を出発源とする迅速製造工程を使用して C D 1 9 C A R - T 細胞を製造した。上記 N S G マウスに同じヒトリンパ腫瘍モデル (R A J I) を使用した。この場合腫瘍細胞注入の 7 日後に、マウス当り 1.2×10^6 の C D 1 9 C A R 陽性 T 細胞を注入した。図 6 から理解できるように、外因性サイトカインの完全不在下で製造した C A R - T 生成物によってサイトカインを使用して製造した生成物と同様に癌進行を効率よく抑制できた。すべての対照マウスは 4 5 日目に行ったイメージング前に癌進行によって死亡した。留意すべき点は、低投与量である 1.2×10^6 の C D 1 9 C A R 陽性 T 細胞が、迅速工程による C A R - T 生成物の強さをさらに示す図 6 A に示すように、高い効能を示した点である。本研究は P B M C 出発源とする (1 日未満の) 迅速な製造による C A R - T 生成物を生成するために外因性サイトカインは必要ないことも明確に確認するものである。

10

【 0 0 8 0 】

同様な効能に加えて、サイトカインを含まない生成物を使用した場合、マウス内を循環するヒト T 細胞量は減少しなかった。ヒト特異性 C D 3 抗体を使用して腫瘍細胞注入から 4 1 日後に行った図 6 に示す実験およびフローサイトメトリー分析によってマウス血においてヒト T 細胞を定量化した。サイトカインなしの C A R - T グループ : 4 4 9 5 ヒト T 細胞 / マイクロリットルマウス血。 I L 7 / I L 1 5 C A R - T グループ : 1 6 1 8 ヒト T 細胞 / マイクロリットルマウス血。

20

迅速製造工程の詳細な実施例

【 0 0 8 1 】

本行程に加えたいくつかの代表的な応用工程をカッコ内に示す。以下に示す比較的手動操作の多い工程に加えて、工程全体を完全密閉下および / または半自動化、あるいは自動化状態で実施できる。例えば、細胞洗浄、細胞採取などは自動化装置を利用して実施できる。

単球欠失 P B M C を出発源とし、1 日未満で C A R - T 生成物を製造する製造プロセス

A . 出発細胞の入手 (1 日目またはゼロ日目)

白血球除去法 (または末梢血採血) を使用して、患者から自家末梢血単核細胞を得た。細胞生成物を直ちに処理するか、一晚保持した (細胞生成物は望むなら凍結保存でき、後日に処理可能である) 。

30

B . アフェレシスサンプルの処理 (ゼロ日目)

遠心分離によってアフェレシスサンプルを洗浄し、プラズマを除去し、汚染血小板数を減らした (アフェレシスサンプルの代わりに末梢血採血を使用する場合には、フィコールベースの分離方法などによって P B M C を分離した) 。次に、 C T S 免疫細胞血清製剤 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を追加した T e x M A C S (M i l t e n y i B i o t e c) などの培地でアフェレシスサンプルを希釈し、組織培養フラスコ (複数の場合もある) または細胞培養バッグで培養し、 37°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) の培養インキュベータに容れ、 m l 当り 5 百万細胞数までの濃度で単球付着を行った。単球を少なくとも 2 時間フラスコ (複数の場合もある) またはバッグ (複数の場合もある) に付着させた後、付着しない細胞を新規な組織培養フラスコまたはバッグに移した。 I L 7 (1 0 n g / m l) および I L 1 5 (5 n g / m l) を含有する培地を使用して、 m l 当りの細胞数を 2 百万に調節した (培地については、いかなる外因性サイトカインを添加せずに、あるいは I L - 7 、 I L 1 5 を単独で有するか、あるいは別なサイトカインを有するように調製できる) 。

40

C . 細胞の活性化 (ゼロ日目)

単球欠失処理済みアフェレシス生成物を有するフラスコに C l o u d z (登録商標) C D 3 / C D 2 8 T 細胞活性化試薬 (R & D S y s t e m s / B i o t e c h n e) を添加できる。 (可溶性 C D 3 抗体、可溶性 C D 3 / C D 2 8 抗体、 C D 2 8 可溶性抗体を有する、あるいは有しない表面結合 C D 3 抗体、 I m m u n o c u l t (登録商標) (S t

50

emcell Technologies)を始めとする他の活性化試薬やその他のT細胞活性化試薬も使用できる)。

D. 細胞導入 (ゼロ日目)

細胞当りのコピー数が5未満になるように決定した複数の感染を使用して、T細胞活性化試薬の添加直後に単球欠失PBMCを含有する複数のフラスコまたはバッグにウィルスベクターを添加した。細胞は5% (±0.5%) CO₂インキュベータ内で37℃ (±2℃) において17~20時間培養した。

E. 細胞採取 (1日目)

Cloudz試薬を使用して細胞を培養した場合には、活性化/導入した細胞を含有するフラスコまたはバッグに直接GMP-grade 6X Release Buffer (R&D Systems/Biotechne) を添加した。次に、細胞を洗浄し、(複数の場合もある) クリオバッグまたはバイアル中のPlasmalyte-A、5% HSAおよび5% DMSOなどの凍結緩衝液中に再懸濁させた。

迅速な遺伝子組み換えT細胞生成物を使用した、ベクターコピー数および複製能 (レプリケーション能力) を有するウィルスリリース試験を可能にする方法の説明

【0082】

ウィルスベクターが関与する迅速なT細胞製造工程分野において鍵となる障害は必要な生成物リリース試験であるため、以下の方法を採用した。レトロウィルスまたはレンチウィルス導入細胞療法用生成物の現在のリリース試験を対象とする必要条件としては、レプリケーション能力をもつレンチウィルスおよびベクターコピー数の評価がある。いずれの評価においても、従来のqPCRをベースとする評価方法では遊離プラスミドによる汚染が低レベルであっても擬陽性結果が生じ、これが問題となる。293細胞移入からの残留遊離プラスミドはウィルスベクターに存在する。ウィルス導入後の製造初期時点で、ベクターからのプラスミドが残留し、従来の試験方法では擬陽性結果を排除することはほぼ不可能である。この擬陽性の反応性は大きな障害であり、患者に使用できる生成物の迅速製造能力を制限するものである。

【0083】

ウィルス組み込みおよびレプリケーション能力をもつベクター両者にとって対象となるDNAは組み込まれるウィルスDNAであるため、ここで使用する製造工程を遊離残留プラスミドDNA除去方法と併用すると、この擬陽性反応を惹起せずに、ベクターコピー数およびレプリケーション能力をもつレンチウィルス両者を対象としてPCR反応やその他の分子テストを実施できる。特に、遊離プラスミドDNAはゲノムDNAよりもかなり小さい。遠心分離系の方法を使用すると、小さなDNAを完全に取り除いた状態で、より大きなゲノムDNAを維持することができる。この方法を使用すると、プラスミドDNAから生じる擬陽性の反応性がなくなり、迅速CAR-T製造における大きな障害がなくなる上に、ゲノムに組み込まれたDNAを測定することが可能になる。

【0084】

短期間 (例えば0~3日) で膨張したCRT-T生成物中の遊離プラスミドDNAを除去するために、小さなサイズ (例えば10kb未満) のDNAを完全に取り除いた上で、遠心分離を使用して (例えば高分子量DNAを優先的に沈降させる塩/ポリマー溶液を使用して) ゲノムDNAを維持できる。例えば、PacBioショートリードエリミネーターキット (PacBio; Menlo Park, California) を利用すると、この分離を単独の遠心分離工程で実施できる (circulomics.com/store/Short-Read-Eliminator-Kit-p131401036)。この市販試薬に加えて、市販の緩衝液SREの代わりに、下記のプロトコルにおいて4% PVP360, 000、1.2MKCL、20mMトリス-HCL pH8を利用する別な方法も使用可能である。というのは、以前から小さなサイズのフラグメント (例えばトータルDNAから<10kb) を有効に完全除去できることが判明しているからである (11)。精製DNAは次に評価試験 (例えばqPCR評価) に直接使用できる。このキットはこの用途に向けて設計されたものではないが、機能は良好であり、簡単な上にコ

10

20

30

40

50

ストパフォーマンスが高く、操作も迅速である。

【0085】

この方法の一つの使用例では、まず、ヒトゲノムDNAを分離できる任意の市販のトータルゲノム分離キット（例えばDNeasy Blood and Tissue Kit、Qiagen、Hilden、Germany）を使用して、トータルゲノムを分離する。次に、以下の手順が同様なアプローチを使用して低フラグメントDNAを除去する。

1. 広口径ピペットチップを使用して、出発ゲノムDNAサンプルにBuffer SREを加え、ピペット操作によって完全に混合した。PacBioやその他の市販試薬を使用しない場合には、4% PVP 360, 000、1.2 M KCL、20 mM トリス-HCL pH 8 を1:1 容量比でトータルDNAサンプルに添加することができる。
2. 室温で30分間10,000 x g の遠心分離を行った。
3. 上澄み液をピペットで取り除いた。
4. 試験管に70%エタノールを加えた。
5. 室温でほぼ2分間10,000 x g の遠心分離を行った。
6. 上澄み液を取り除き、70%エタノール洗浄を繰り返した。
7. 試験管にBuffer EB（またはPacBio kitを使用しない場合には10 mM トリス-HCL pH 8 を使用する）を加え、50℃で10～30分培養を行い、DNAペレットの再懸濁を行った。

【0086】

低フラグメント除去工程を迅速製造工程と併用することは、培養の初期時点（例えば17時間～3日間）で遺伝子組み換えT細胞生成物に行うリリース試験を可能にする有効なプロセスであることが判明した。例えば、17～20時間の工程を使用して製造したCAR-T生成物を20時間で採取し、サロゲートアリコットを72時間で採取した。DNeasy BloodおよびTissue Kit（Qiagen）を使用してトータルDNAを分離し、ショートリードエリミネーターキット（PacBio）を使用して低フラグメント欠失DNAを調製した。VSV-Gを対象とするリアルタイムPCR評価を使用するレプリケーション能力をもつレンチウイルスに関して、そしてGAUおよびハウスキーパー遺伝子PTBP2を対象とするリアルタイムPCR評価を使用するベクター組み込みに関して低フラグメント欠失DNAだけでなく、トータルDNAサンプルも試験を行った。PCR反応に使用したプライマーおよび蛍光プローブを表6に示す。

【0087】

表6. GAG、VSV-GおよびPTBP2 qPCR評価に使用したPCRプライマーおよびプローブ

10

20

30

40

50

GAG Primers

5'-GGA GCT AGA ACG ATT CGC AGT TA-3'

5' GGT TGT AGC TGT CCC AGT ATT TGT C-3'

GAG Probe

5'-/56-FAM/ACA GCC TTC TGA TGT TTC TAA CAG GCC AGG 3'BHQ-1

PTPB2 Primers

5'-TCT CCA TTC CCT ATG TTC ATG C-3'

5'-GTT CCC GCA GAA TGG TGA GGT G-3'

PTPB2 Probe

5'-/5HEX/ATG TTC CTC /ZEN/GGA CCA ACT TG 3iabfq 3'

VSVG Primers

5'-AGG GAA CTG TGG GAT GAC TG

5'-GAA CAC CTG AGC CTT TGA GC

VSVG Probe

5'-6FAM-GAACACCTGAGCCTTTGAGC MGBNFQ-3'

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

GAG、VSV-GおよびPTBP2のシングルコピーを発現する直線化プラスミドからなる標準プローブを使用して、PCR生成物の定量化を行った。図7Aから理解できるように、低フラグメント欠失DNAを使用したqPCR反応ではVSV-Gを検出できなかった。即ち20時間で製造した2つの異なる生成物で期待されたレプリケーション能力をもつレンチウイルスについてはネガティブであった。対照的に、低フラグメント欠失のないトータルゲノムDNAを使用した場合には、いずれのサンプルもVSV-Gに対しては擬陽性qPCR結果になったが、これは低フラグメントを含まないプラスミド汚染によるものと考えられる。細胞洗浄や（20時間とは対照的な）3日間培養などの別なアプローチがレプリケーション能力をもつレンチウイルス試験に伴う擬陽性の反応性の問題を解決できるかどうかを見るために、さらに評価を進めた。具体的には、20時間後および72時間後にレンチウイルス導入CD19CAR-T生成物を採取し、細胞を広範囲にわたって洗浄してから、ゲノムDNA分離を行った。72時間サンプルについては15回、そして20時間サンプルについては5回50mLのPBS中で細胞（細胞数 5×10^6 ）を洗浄した。VSV-G qPCR評価では、すべてのケース（両生成物の20時間サンプルおよび72時間サンプル）で、擬陽性の反応性が認められた。即ち、培養時間を3日間に拡大しても、そして細胞洗浄範囲を広げてもこの擬陽性の反応性を抑制するために十分でないことが認められる。

【 0 0 8 9 】

レプリケーション能力をもつレンチウイルス試験に関して留意すべきは、過去10年間17～20時間および72時間での迅速生成物の場合に一貫として認められる陽性の反応性を強化する臨床生成物が擬陽性の反応性によるものとのFDAへの報告がないことである（[fda.gov/media/13790/download](https://www.fda.gov/media/13790/download)）。さらに培養期間を8日に延長した場合、VSV-G qPCR評価はネガティブであり、遊離プラスミドDNAがこの時点で失われ、真のレプリケーション能力をもつレンチウイルスが存在していなかったことを示唆するものである。

【0090】

レプリケーション能力をもつレンチウイルス試験と同様に、ウイルス導入細胞治療生成物にとって別な重要なリリース試験はベクター組み込みであり、これについては、GAG遺伝子に対してqPCRによって測定することが多く、この遺伝子には遊離プラスミド汚染物質がウイルスベクター内に存在し、擬陽性の反応性を誘起する傾向がある。最初に、GAG/PTPB2qPCRを行って、CD19CARレンチウイルス導入T細胞のベクターコピー数を求め、これら細胞の培養を8日間維持し、ベクターの多重感染度(MOI)を評価し、かつ完全ベクター組み込みのベースラインを評価した。図7Bから理解できるように、MOIが10:1になると、導入T細胞当りのベクターコピー数がピークの1.5に達した(即ちCD19CARが発現した)。次に、20時間目、3日目および7日目に細胞を採取する場合を除いて、10:1のCD19CARベクターMOIを使用した場合の、導入細胞(transduced T cell)当りのベクターコピー数(vector copy number)を迅速製造工程により決定した。さらに、SREキット(PacBio)を使用して、低フラグメントDNAを除去した。図7Cから理解できるように、ベクター組み込み結果は全時点を通して同様であった。留意すべきはCD19CAR表面発現であり、20時間ではきわめて低く、完全発現はほぼ72時間経った頃である。

10

【0091】

最後に、低フラグメント除去前後に行った2種類の20時間の迅速製造T細胞生成物のゲル電気泳動から、ゲノムDNAが期待通り維持され、望ましくない低分子量フラグメントのみが欠失したことがわかる(図7D)。さらに、Nanodrop(登録商標)分光光度計(ThermoFisher Scientific)を使用して行ったDNA濃度の定量化は、低フラグメント除去前後でDNA濃度に測定可能な変化がないことを示し、ごく少量のDNAが除去されたことが分かった。

20

【0092】

以上から理解できるように、本発明のCRT-T細胞製造工程を使用すると、従来方法と比較して、限定する意図はないが、以下の意味のある改善を実現できる。

1. 主に個体表面に付着することにより単球欠失を行ったアフエシス生成物またはアフエシス細胞からの未分化細胞を使用して製造を実施できる。さらに、末梢血液から直接分離した末梢血液単球細胞(PBMC)または単球欠失PBMCも利用可能である。従って、ウイルス導入を利用する迅速CAR-T工程にとって重要と考えられていた精製T細胞を必要としない。本発明者の知る限り、これはウイルス導入を利用する迅速な遺伝子組み換えT細胞を製造する出発源として分離T細胞ではなくPBMCを使用する製造1日未満のプロトコルの嚆矢である。

30

2. 異なる方法を使用して細胞活性化を行う。磁気ビーズの場合、細胞が剥落するまでに数日を要するため、これらビーズを使用する方法では、生成物の採取日に遅れが生じ、および/またはビーズ結合細胞が失われるため、収量がかなり低くなる。さらに、予期しないことに、本発明者らは特定の非磁気ビーズ系のT細胞活性化試薬を使用すると、導入効率が改善することを見出した。本発明の活性化アプローチを採用すると、導入効率が改善するだけでなく、コスト増大や従来方法で必要とされてきた磁気ビーズ使用に伴う製造工程の煩雑化を避けることができる。

40

3. 本発明の製造プロセスは第一に以上説明してきた迅速なCAR-T製造工程を要旨とし、この工程は外因性サイトカインの不在下で効率的に実施できる。製造時にサイトカインを使用すると、コストが大幅に増加するだけでなく、T細胞が変質する。迅速な製造工程の大きな作用効果として、患者から最初に集めた細胞に対してT細胞(例えばナイーブT細胞)の出発集団をできるだけ近い状態で維持できることを挙げることができる。外因性サイトカインを使用しなくても済むことが大きな作用効果である。

4. 上記のようにバッグを使用してT細胞生成物を製造する完全密閉システムを使用すると、便利なキットをベースとする生成物を提供できる。即ち、ウイルス/培地/活性化試薬等を容れ、次にアフエシス生成物と混合する。この方法を採用すると、クリーンル

50

ームの外部で生成物を製造できるため、生成物を広く一般に使用することが容易になり、また生成物の製造も簡単になるため、コストを削減できる上にアクセシビリティを確保できる。

5. 本発明方法を採用すると、必要な生成物リリース試験を実施する分野において鍵となるハードルを乗り越えることができる。現在必要とされるレトロウィルスやレンチウィルス導入細胞治療生成物の場合、レプリケーション能力をもつレンチウィルスおよびベクターコピー数を評価している。いずれの評価においても、従来のqPCR系の評価を行うさいに遊離プラスミドの汚染レベルが低くても有意な擬陽性結果が生じる。293細胞などのウィルス発生細胞からの遊離プラスミドがウィルスベクターに残留する。ウィルス導入後の製造時の早い時点で、ベクターからのプラスミドが残留し、擬陽性結果を従来の試験法を使用して排除することはほぼ不可能である。この擬陽性の反応性は他のグループに対しても大きな障害であり、患者に使用できる迅速な製造生成物の能力を阻害するものである。ウィルス組み込みおよびレプリケーション能力をもつベクターの両者の対象となるDNAは組み込まれるウィルスDNAであるため、本発明の製造工程は遊離残留プラスミドDNAを除去する方法と併用できるため、ベクターコピー数およびレプリケーション能力をもつレンチウィルスの両者に対してqPCRを実施でき、この擬陽性反応を惹起することはない。特に、遊離プラスミドDNAはゲノムDNAよりもかなり小さい。遠心分離に基づく方法を使用して、より大きなゲノムDNAを維持した状態で、より小さなDNAの欠失させることができる。この方法を使用すると、プラスミドDNAからの擬陽性の反応性が生じないため、ゲノムに組み込まれるDNAの測定が実行可能な状態で、迅速CAR-T製造の大きな障害をクリアできる。

10

20

【0093】

特に断らない限り、本明細書で使用する技術的な用語および科学的用語は、本発明が属する分野における当業者が普通に理解するのと同じ意味をもつ。

【0094】

本明細書全体を通して言及するすべての特許文献、特許出願明細書、公開出願および公報、GenBank配列、データベース、ウェブサイトおよび他の公開資料は、特に断らない限り、本明細書に援用するものとする。

【0095】

URLやその他の識別子やアドレスに言及する場合、このような識別子は変更可能であり、インターネット上では具体的な情報が行き交うが、インターネット探索により等価な情報を発見できる。以上の言及はこのような情報の普及性の証左である。

30

【0096】

本明細書で使用する任意の保護基、アミノ酸や他の化合物を指す略語は、特に断らない限り、慣用略語、広く認められている略語、あるいはIUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (Biochem. (1972) 11 (9) : 1726-1732を参照) に一致するものである。

【0097】

本明細書に記載するものと同様な、あるいは等価な任意の方法、装置および材料は本発明の要旨を実施するさいに、あるいは試験を行うさいに使用できるが、代表的な方法、装置および材料を本明細書に開示する。

40

【0098】

場合にもよるが、本明細書に開示するヌクレオチド類やポリペプチド類は一般に公開されているGENBANK（登録商標）およびSWISSPROTなどのデータベースに含まれている。このような一般に公開されているデータベースに含まれるヌクレオチド類やポリペプチド類に関する配列やその他の情報を始めとする情報は本明細書に援用するものとする。特に断らない限り、あるいは自明なように、このような一般に公開されているデータベースへの言及は、本出願の出願日と同時期の最新のデータベースへの言及である。

【0099】

特に断らない限り、本明細書および請求項に使用する成分量、反応条件などの特性など

50

はいずれも“約”で修飾されていると理解すべきである。従って、反対のことに言及しない限り、本明細書および請求項に記載されている数値パラメーターは近似値であり、本発明の要旨によって実現することが求められている目的の特性に応じて変更可能である。

【0100】

本明細書において“例えば”、“など”、“を有する”などを使用するさいには、明示してはいないが、“これに限るものではない”の語句が付随していると理解すべきである。同様に、“例”あるいは“例示”も非制限的であると理解すべきである。“実質的に”という修飾語は意図する目的に否定的な意味を与えない記述子からの逸脱を許容する用語である。記述的な用語は“実質的に”が明示されていない場合でも、用語“実質的に”によって修飾されているものと理解すべきである。従って、例えば“レバーが垂直に伸展する”は、正確な垂直配列が、レバーがその機能を発揮するために必ずしも必要ない限り、“レバーが実質的に垂直に伸展する”ことを意味する。

【0101】

用語“有する”(comprising、including、having、involving、comprises、includes、has、involves)などは相互変換可能であり、同じ意味を有する。具体的に、各用語は定義すると、一般の米国特許法における“有する”の定義に一致し、従って“少なくとも以下の”を意味する開放用語と理解すべきであり、また付加的な特徴、制限、態様などを排除するものではないと解釈すべきである。従って、例えば“工程a、bおよびcを有するプロセス”は、このプロセスは少なくとも工程a、bおよびcを有することを意味する。単数表現がある場合にはいつも、“一つかそれ以上”を意味し、これはこのような解釈が文脈に存在しなくても該当する。用語“有する”(comprise、include、have、contain)(およびこれらの異形)は制限のない連結動詞であり、文脈が逆のことを意味しない限り、請求項に使用する場合には、他の要素の付加を可能にするものである。

【0102】

請求項または明細書で用語“有する”に単数表現を使用する場合には、これは文脈が逆のことを指示していない限り、一つかそれ以上を意味する。

【0103】

本明細書で使用するように、用語“約”が質量、重量、時間、容積・容量、濃度または百分率などの数値または数量の前にある場合には、示した値から一部の実施態様では±20%、一部の実施態様では±10%、一部の実施態様では±5%、一部の実施態様では±1%、一部の実施態様では±0.5%、一部の実施態様では±0.1%、一部の実施態様では±0.01%、一部の実施態様では±0.001%を意味する。このような変動は本発明方法の実施に適切であるからである。請求項に用語“または、あるいは”を使用する場合、別なものを明示していない限り、あるいはこれら別なものが相互に排除する者でない限り、“および/または”を意味する。

【0104】

本明細書で使用するように、範囲は一つの具体的な“約”値から別な具体的な“約”値までの範囲として表現できる。本明細書には多数の値を開示し、各値はその値に加えて“約”に含まれる値として与えられている。例えば、値“10”が開示されている場合、その値は“約10”である。また、2つの具体的な値間にはその間に含まれる値がある。例えば、10および15を開示する場合、11、12、13および14も開示していることになる。

【0105】

本明細書で使用するように、“場合によっては”、“場合に応じて”は次に記載する事象や事例が起こってもよく、起らなくてもよいことを意味し、即ち当該事象が生じた場合およびそれが生じなかった場合も包含する。例えば、場合に応じて使用する変形部分は変形部分でもよく、非変形部分でもよい。

【0106】

なお、本発明要旨の各種細部については、本明細書に開示した要旨の範囲から逸脱しなくても変更可能である。さらに、以上の説明は例示のみを目的とし、限定を意図するものではない。本明細書に開示した教示に照らして自明な変更および変形は実施可能である。

このような変更および変形はすべてこれらに公正かつ法的に、そして公平に認められる範囲に従って解釈する限り請求項の記載範囲内に含まれるものである。

【0107】

文献

1. Rodriguez J, Caballero MD, Gutierrez A, Solano C, Arranz R, Lahuerta JJ, Sierra J, Gandarillas M, Perez-Simon JA, Zuazu J, Lopez-Guillermo A, Sureda A, Carreras E, Garcia-Larana J, Marin J, Garcia JC, Fernandez De Sevilla A, Rifon J, Varela R, Jarque I, Albo C, Leon A, SanMiguel J, Con de E. Autologous stem-cell transplantation in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma not achieving complete response after induction chemotherapy: the GEL/TAMO experience. *Ann Oncol.* 2004;15(10): 1504-9. Epub 2004/09/16. doi:10.1093/annonc/mdh391. PubMed PMID: 15367411. 10
2. Vose JM, Zhang MJ, Rowlings PA, Lazarus HM, Bolwell BJ, Freytes CO, Pavlovsky S, Keating A, Yanes B, van Besien K, Armitage JO, Horowitz M M, Autologous B, Marrow Transplant Registry Lymphoma Working C. Autologous transplantation for diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma in patients never achieving remission: a report from the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):406-13. Epub 2001/02/24. doi: 10.1200/JCO.2001.19.2.406. PubMed PMID: 11208832. 20
3. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, Link BK, Hay A, Cerhan JR, Zhu L, Boussetta S, Feng L, Maurer MJ, Navale L, Wiecek J, Go WY, Gisselbrecht C. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood.* 2017;130(16): 1800-8. Epub 2017/08/05. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620. PubMed PMID: 28774879; PMCID: PMC5649550.
4. Westin JR, Kersten MJ, Salles G, Abramson JS, Schuster SJ, Locke FL, Andreadis C. Efficacy and Safety of CD19-Directed CAR-T Cell Therapies in Patients With Relapsed/Refractory Aggressive B-Cell Lymphomas: Observations From the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND Trials. *American journal of hematology.* 2021. Epub 2021/07/27. doi: 10.1002/ajh.26301. PubMed PMID: 34310745. 30
5. Harrison RP, Zylberberg E, Ellison S, Levine BL. Chimeric antigen receptor-T cell therapy manufacturing: modelling the effect of offshore production on aggregate cost of goods. *Cytotherapy.* 2019;21(2):224-33. Epub 2019/02/17. doi:10.1016/j.jcyt.2019.01.003. PubMed PMID: 30770285.
6. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiecek J, Go WY. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531-44. Epub 2017/12/12. doi: 10.1056/NEJMoa1707447. PubMed PMID: 29226797; PMCID: PMC5882485. 40
7. Kersten MJ, Spanjaart AM, Thieblemont C. CD19-directed CAR T-cell therapy in B-cell NHL. *Curr Opin Oncol.* 2020;32(5):408-17. Epub 2020/08/03. doi: 10.1097/CCO.0000000000000668. PubMed PMID: 32740094. 50

8. Zhang H, Zhao P, Huang H. Engineering better chimeric antigen receptor T cells. *Exp Hematol Oncol*. 2020;9(1):34. Epub 2020/12/10. doi: 10.1186/s40164-020-00190-2. PubMed PMID: 33292660; PMCID: PMC7709221.

9. Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *Journal of translational medicine*. 2010;8: 104. Epub 2010/10/28. doi: 10.1186/1479-5876-8-104. PubMed PMID: 20977748; PMCID: PMC2987859.

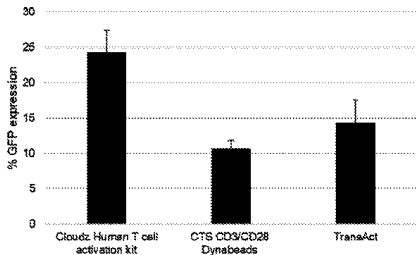
10. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jager U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak O, Salles G, Maziarz RT, Investigators J. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B- Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2019;380(1):45-56. Epub 2018/12/07. doi: 10.1056/NEJMoal 804980. PubMed PMID: 30501490.

11. Jones A, Torkel C, Stanley D, Nasim J, Borevitz J, Schwessinger B. High- molecular weight DNA extraction, clean-up and size selection for long-read sequencing. *PloS one*. 2021;16(7):e0253830. Epub 2021/07/16. doi: 10.1371/journal.pone.0253830. PubMed PMID: 34264958; PMCID: PMC8282028.

【図面】

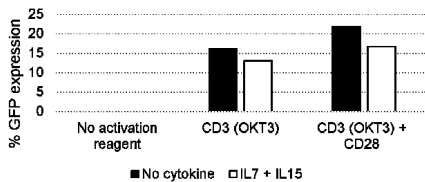
【図 1 A】

FIG. 1A



【図 1 B】

FIG. 1B



10

20

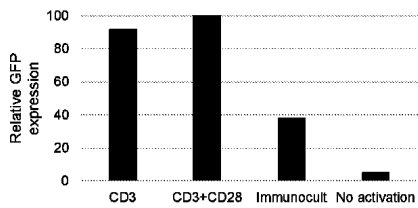
30

40

50

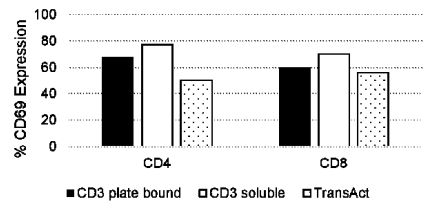
【 図 1 C 】

FIG. 1C



【 図 1 D 】

FIG. 1D



【 図 2 】

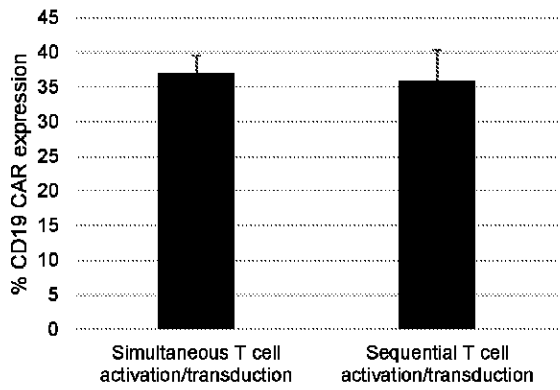


FIG. 2

【 図 3 】

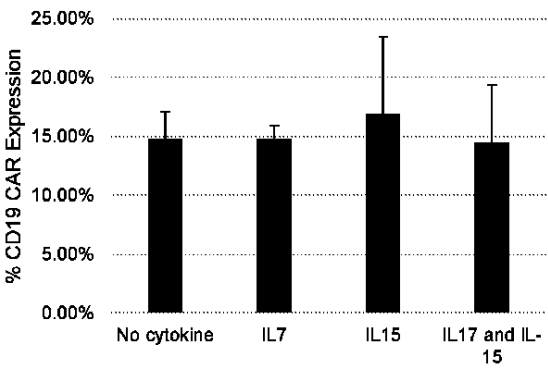


FIG. 3

【 図 4 】

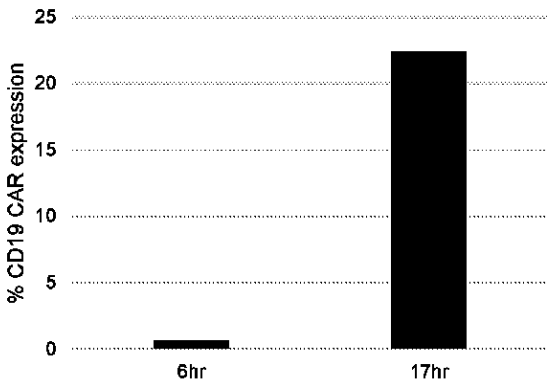
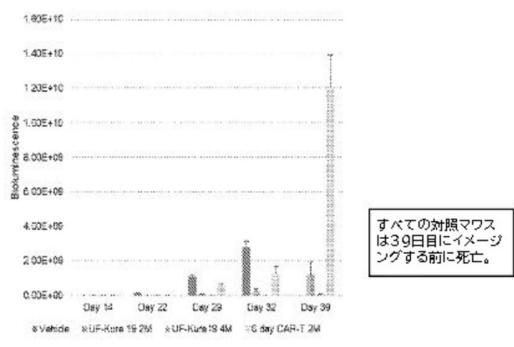


FIG. 4

【 図 5 】



10

20

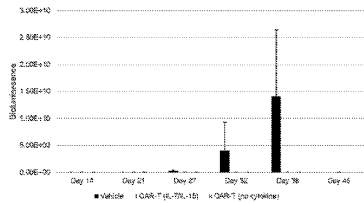
30

40

50

【 図 6 】

FIG. 6



【 図 7 A 】

FIG 7A

VSV-G

	Total Genomic DNA	Total Genomic DNA + SRE
Product 1	+	-
Product 2	+	-

【 図 7 B 】

FIG 7B

	Copy Number
Non-Transduced T cells	0
2:1	0.25
5:1	0.93
7.5:1	1.2
10:1	1.5

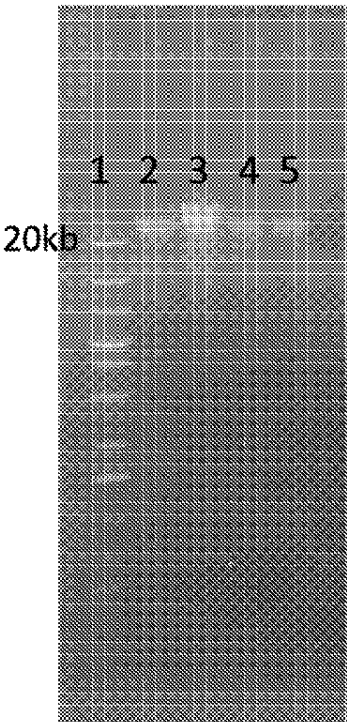
【 図 7 C 】

FIG 7C

	20hr	3 day	7 day
% CAR expression	0.3	33	31
VCN/transduced cell	1.4	1.3	1.5

【 図 7 D 】

FIG 7D



【 配列表 】

2024546145000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/053815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C12N 5/0783; C12N 5/10; C12N 15/86 (2023.01)

ADD.

CPC - INV. - A61K 35/17; C12N 15/63; C12N 5/0636; C12N 15/86 (2023.05)

ADD. - C12N 2510/00; C12N 2501/23; C12N 2501/50 (2023.05)

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 database consulted during the international search (name of database 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 — Y	US 2021/0317408 A1 (EXUMA BIOTECH CORP.) 14 October 2021 (14.10.2021) entire document	1-12, 14-21 13
Y	US 5,244,806 A (BANG et al.) 14 September 1993 (14.09.1993) entire document	13
A	US 2017/0296678 A1 (F1 ONCOLOGY SEZC et al.) 19 October 2017 (19.10.2017) entire document	1-21
A	FESHITAN et al., Microbubble size isolation by differential centrifugation, Journal of Colloid and Interface Science, 01 October 2008, Vol. 329, Iss. 2, Pgs. 316-324. entire document	1-21
A	JACKSON et al., Automated Manufacture of Autologous CD19 CAR-T Cells for Treatment of Non-hodgkin Lymphoma, Frontiers in Immunology, 07 August 2020, Vol. 11, Art. 1941, Pgs. 1-13. entire document	1-21

☐ 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 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

08 May 2023

Date of mailing of the international search report

JUL 07 2023

Name and mailing address of the ISA/

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1460, Alexandria, VA 22313-1460
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Taina Matos

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/053815

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 filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing 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:

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/86 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/86

Z

テーマコード (参考)

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,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,I
T,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

，シェイカー ハイツ，シェルバーン ロード 1 9 0 1 5

F ターム (参考)

4B029 AA01 AA23 BB11 CC01 GA02 GA08 GB01

4B065 AA94X AB01 BA02 BB19 CA44