

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7638881号

(P7638881)

(45)発行日 令和7年3月4日(2025.3.4)

(24)登録日 令和7年2月21日(2025.2.21)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

K

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00

A

請求項の数 23 (全47頁)

(21)出願番号 特願2021-550221(P2021-550221)

(86)(22)出願日 令和2年3月20日(2020.3.20)

(65)公表番号 特表2022-524958(P2022-524958
A)

(43)公表日 令和4年5月11日(2022.5.11)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/024059

(87)国際公開番号 WO2020/191378

(87)国際公開日 令和2年9月24日(2020.9.24)

審査請求日 令和5年3月15日(2023.3.15)

(31)優先権主張番号 62/821,768

(32)優先日 平成31年3月21日(2019.3.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 519089657

アロジーン セラピューティクス、イン
コーポレイテッドアメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
0 8 0 サウス サンフランシスコ イー
スト グランド アベニュー 2 1 0

(74)代理人 100094569

弁理士 田中 伸一郎

(74)代理人 100103610

弁理士 ▲吉▼田 和彦

(74)代理人 100109070

弁理士 須田 洋之

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T C R α β +細胞の枯渇効率を向上させる方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

内因性 T C R α / β ヘテロ二量体を発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団を産生する方法であって、

(a) 免疫細胞の集団を抗 T C R 抗体と抗 C D 3 抗体とで標識すること、ここで前記抗 T C R 抗体は、ヒト T C R α 、又はヒト T C R β 、又はヒト T C R α / β ヘテロ二量体に結合して認識する抗体である、及び、

(b) 前記免疫細胞の集団から抗 T C R 抗体で標識された免疫細胞と抗 C D 3 抗体で標識された免疫細胞とを分離すること、を含み、

それによって、内因性 α / β ヘテロ二量体を発現する T 細胞を 0.01% 以下含む免疫細胞の集団を産生する、方法。

【請求項2】

免疫細胞の集団から内因性 T C R α / β ヘテロ二量体を発現する細胞を枯渇させる方法であって、

(a) 前記免疫細胞の集団を抗 T C R 抗体と抗 C D 3 抗体とで標識すること、ここで前記抗 T C R 抗体は、ヒト T C R α 、又はヒト T C R β 、又はヒト T C R α / β ヘテロ二量体に結合して認識する抗体である、

(b) 抗 T C R 抗体で標識された免疫細胞と抗 C D 3 抗体で標識された免疫細胞とを非標識の免疫細胞から分離すること、及び、

(c) 前記非標識の免疫細胞を収集すること、を含み、

それによって、内因性 α / β ヘテロ二量体を発現する T 細胞を 0.01% 以下含む免疫細胞の集団を取得する、方法。

【請求項 3】

前記免疫細胞の集団が、枯渇後 2 日目又は 4 日目に、内因性 α / β ヘテロ二量体を発現する T 細胞を 0.01% 以下含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫細胞の集団が、枯渇後 2 日目又は 4 日目に、内因性 α / β ヘテロ二量体を発現する T 細胞を 0.01% 以下含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

さらに、前記免疫細胞の集団を抗 CD52 抗体で標識すること、及び、前記免疫細胞の集団から抗 CD52 抗体で標識された免疫細胞を枯渇させること、を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 6】

さらに、前記免疫細胞の集団を抗 CD52 抗体で標識すること、及び、抗 CD52 抗体で標識された免疫細胞を非標識の免疫細胞から分離すること、を含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 7】

前記抗 TCR 抗体、前記抗 CD3 抗体、及び／又は前記抗 CD52 抗体が、ビオチン結合体である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記標識された細胞を、ビオチンを特異的に認識する薬剤と接触させることをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ビオチンを特異的に認識する薬剤が、抗ビオチン抗体、アビジン、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記薬剤が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に結合している、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗 TCR 抗体、前記抗 CD3 抗体、及び／又は前記抗 CD52 抗体が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に直接結合している、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記分離は、磁気分離又は音波分離のうちの 1 つを使用して達成される、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記免疫細胞が同種異系免疫細胞である、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記免疫細胞が、内因性 TCR α / β ヘテロ二量体の発現を低減又は排除するため、内因性 TCR α 遺伝子又は TCR β 遺伝子が欠損するように遺伝子改変されている、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記免疫細胞が、内因性 CD52 の発現を低減又は排除するため、内因性 CD52 遺伝子が欠損するように遺伝子改変されている、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

内因性 TCR α / β ヘテロ二量体又は内因性 CD52 の発現、あるいは、内因性 TCR α / β ヘテロ二量体及び内因性 CD52 の両方の発現の前記低減又は排除が、TALEN、CRISPR/Cas9、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、MegaTAL

10

20

30

40

50

、メガヌクレアーゼ、C p f 1、相同組換え、又は一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（s s O D N）を使用して達成される、請求項 1 4 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記免疫細胞が、キメラ抗原受容体を発現する操作された免疫細胞である、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記免疫細胞が T 細胞である、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

免疫細胞の集団から内因性 T C R α / β ヘテロ二量体を発現する細胞を枯渇させるためのキットであって、前記免疫細胞の集団は内因性 α / β ヘテロ二量体を発現する T 細胞を 0. 0 1 % 以下含み、

10

以下：

a) ヒト T C R α 、又はヒト T C R β 、又はヒト T C R α / β ヘテロ二量体に結合して認識する、抗 T C R 抗体、及び

b-1) 抗 C D 3 抗体、又は b-2) 抗 C D 3 抗体及び抗 C D 5 2 抗体、を含む、キット。

【請求項 2 0】

前記抗 T C R 抗体、前記抗 C D 3 抗体、及び／又は前記抗 C D 5 2 抗体が、ビオチンを特異的に認識する薬剤に結合されており、さらに前記ビオチンを特異的に認識する薬剤が、抗ビオチン抗体、ストレプトアビジン、及びアビジンからなる群から任意に選択されてもよい、請求項 1 9 に記載のキット。

20

【請求項 2 1】

前記薬剤が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に結合されている、請求項 2 0 に記載のキット。

【請求項 2 2】

前記抗 T C R 抗体、前記抗 C D 3 抗体、及び／又は前記抗 C D 5 2 抗体が支持体に直接結合している、請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記支持体が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜のうちの 1 つである、請求項 2 2 に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

（関連出願への相互参照）

本出願は、その内容がそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、2 0 1 9 年 3 月 2 1 日に出願された米国仮出願第 6 2 / 8 2 1 , 7 6 8 号に対する優先権の利益を主張する。

【0 0 0 2】

40

本開示は、キメラ抗原受容体（C A R）を含む細胞を含む、操作された免疫細胞の集団から内因性 T C R（例えば、T C R α β ）を発現する細胞を枯渇させるための方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

悪性腫瘍関連抗原を認識するように遺伝子改変された免疫細胞の養子移入は、がんを治療するための新しいアプローチとして有望であることが示されている（例えば、Brennerら、Current Opinion in Immunology、22（2）：251－257（2010）；Rosenbergら、Nature Reviews Cancer、8（4）：299－308（2008）を参照されたい）。免疫細胞は、キ

50

メラ抗原受容体 (CAR) を発現するように遺伝子改変することができる (例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Eshharら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90 (2) : 720-724 (1993)、Sadelainら、Curr. Opin. Immunol、21 (2) : 215-223 (2009) を参照されたい)。CAR を構成する免疫細胞、例えば、CAR-T 細胞 (CAR-T) は、それに抗原特異性を与え、さらに、がん細胞などの標的細胞を認識して死滅させる能力を保持又は強化するように操作されている。しかしながら、移植片対宿主病 (GVHD) 又は宿主対移植片疾患 (HVGD) を発症する可能性は、がん治療に操作された同種異系 CAR-T 細胞を広く使用することに関して、深刻な安全性又は有効性上の障害があることを意味する。したがって、特に同種異系療法に関して、GVHD 及び HVGD のリスクを低減する効果的な方法を開発する必要がある。

10

【発明の概要】

【0004】

本明細書では、免疫細胞の集団から TCR+ (TCR $\alpha\beta$ +) 細胞を枯渇させるための改善された方法、TCR+ 細胞が枯渇した免疫細胞の集団を生成するための方法、そのための試薬を含むキット、高純度の TCR- (TCR $\alpha\beta$ -) 細胞の集団、及び、開示された方法を使用して調製された細胞の集団を使用する治療方法について述べる。例えば、本明細書では、GVHD のリスクを低減することによって同種異系細胞治療に有用な細胞の製造に使用することができ、キメラ抗原受容体を使用する治療 (例えば、同種異系 CAR-T 細胞療法) に使用することができる、TCR+ 細胞枯渇に特に適した方法について述べる。

20

【0005】

一態様では、内因性 TCR を発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団を産生する方法が提供され、一実施形態では、この方法は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び抗 CD3 抗体で標識すること、及び、免疫細胞の集団から抗 TCR 抗体で標識された免疫細胞と抗 CD3 抗体で標識された免疫細胞とを分離することを含む。この方法は、免疫細胞の集団を抗 CD52 抗体で標識すること、及び免疫細胞の集団から抗 CD52 抗体で標識された免疫細胞を枯渇させることをさらに含むことができる。さらに、この方法は、免疫細胞の集団を抗 CD52 抗体で標識すること、及び抗 CD52 抗体で標識された免疫細胞を非標識の免疫細胞から分離することをさらに含むことができる。

30

【0006】

別の態様では、免疫細胞の集団から内因性 TCR を発現する細胞を枯渇させる方法が提供され、一実施形態では、この方法は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び抗 CD3 抗体で標識すること、抗 TCR 抗体で標識された免疫細胞及び抗 CD3 抗体で標識された免疫細胞を非標識の免疫細胞から分離すること、及び、非標識の免疫細胞を収集すること、を含み、それによって内因性 TCR を発現する細胞が枯渇した免疫細胞の集団を取得する。

【0007】

さらなる態様では、内因性 TCR を発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団を産生する方法が提供され、一実施形態では、この方法は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び抗 CD52 抗体で標識すること、及び、抗 TCR 抗体で標識された免疫細胞及び抗 CD52 抗体で標識された免疫細胞を免疫細胞の集団から分離することを含む。

40

【0008】

さらに別の態様では、免疫細胞の集団から内因性 TCR を発現する細胞を枯渇させる方法が提供され、一実施形態では、この方法は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び抗 CD52 抗体で標識すること、抗 TCR 抗体で標識された免疫細胞及び抗 CD52 抗体で標識された免疫細胞を非標識免疫細胞から分離すること、及び、非標識免疫細胞を収集すること、を含み、それによって内因性 TCR を発現する細胞が枯渇した免疫細胞の集団を取得する。

【0009】

いくつかの実施形態では、抗 TCR 抗体、抗 CD3 抗体、及び／又は抗 CD52 抗体は

50

、ビオチン結合体であり、この方法は、標識された細胞を、ビオチンを特異的に認識する薬剤と接触させることをさらに含み得る。ビオチンを特異的に認識する薬剤は、抗ビオチン抗体、アビジン、ストレプトアビジンからなる群から選択でき、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に結合させることができる。他の実施形態では、抗TCR抗体、抗CD3抗体、及び／又は抗CD52抗体は、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に直接結合させることができる。

【0010】

分離を採用する方法では、分離は、磁気分離又は音波分離のいずれかを使用して達成することができる。

10

【0011】

いくつかの実施形態では、開示された方法の免疫細胞は、同種異系免疫細胞であり、当該免疫細胞は、一般に、内因性TCR若しくは内因性CD52、又は内因性TCR及び内因性CD52の両方の発現を減少させ又は排除するために遺伝子改変することができ、内因性TCR、又は内因性CD52、又は内因性TCR及び内因性CD52の両方の発現を減少させることは、TALEN、CRISPR/Cas9、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、MegaTAL、メガヌクレアーゼ、Cpf1、相同組換え、又は一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ssODN）を使用して達成される。

【0012】

開示された方法の免疫細胞は、キメラ抗原受容体を発現する操作された免疫細胞であり得る。

20

【0013】

いくつかの実施形態では、内因性TCRを発現する細胞が枯渇した細胞の集団は、1.0%以下のTCR+細胞、0.9%以下のTCR+細胞、0.8%以下のTCR+細胞、0.7%以下のTCR+細胞、0.6%以下のTCR+細胞、0.5%以下のTCR+細胞、0.4%以下のTCR+細胞、0.3%以下のTCR+細胞、0.2%以下のTCR+細胞、又は0.1%以下のTCR+細胞を含む。いくつかの実施形態では、内因性TCRを発現する細胞が枯渇した細胞の集団は、枯渇直後に0.01~0.001%のTCR+細胞を含む。いくつかの実施形態では、内因性TCRを発現する細胞が枯渇した細胞の集団は、枯渇後に培養した1~10日後に、0.1~0.01%のTCR+細胞を含み、いくつかの実施形態では、内因性TCRを発現する細胞が枯渇した細胞の集団は、枯渇後に培養した1日後に、0.1~1.0%未満のTCR+細胞を含む。いくつかの実施形態では、内因性TCRを発現する細胞が枯渇した細胞の集団は、枯渇後に培養した10日後に、0.1~1.0%未満のTCR+細胞を含む。

30

【0014】

開示された方法の実施形態では、免疫細胞はT細胞である。

【0015】

別の態様では、開示された方法によって産生された内因性TCRを発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団が提供される。

40

【0016】

一態様では、少なくとも99%のTCR-細胞を含む操作されたT細胞の集団が提供され、少なくとも99.9%のTCR-細胞を含む操作されたT細胞の集団が提供され、少なくとも99.99%のTCR-細胞を含む操作されたT細胞の集団が提供され、少なくとも99.999%のTCR-細胞を含む操作されたT細胞の集団が提供される。いくつかの実施形態では、T細胞の集団は、キメラ抗原受容体を発現する。

【0017】

別の態様では、抗TCR抗体及び抗CD3抗体を含む免疫細胞の集団から内因性TCRを発現する細胞を枯渇させるためのキットが提供される。当該キットは、抗CD52抗体をさらに含むことができる。別の態様では、抗TCR抗体及び抗CD52抗体を含む免疫

50

細胞の集団から内因性 T C R を発現する細胞を枯渇させるためのキットが提供される。開示されたキットにおいて、抗 T C R 抗体、抗 C D 3 抗体、及び／又は抗 C D 5 2 抗体は、ビオチンを特異的に認識する薬剤と結合しており、ビオチンを特異的に認識する薬剤は、抗ビオチン抗体、ストレプトアビジン、及びアビジンからなる群から選択することができる。いくつかの実施形態では、薬剤は、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に結合させることができる。

【0018】

開示されたキットにおいて、抗 T C R 抗体、抗 C D 3 抗体、及び／又は抗 C D 5 2 抗体は、支持体に直接結合され、当該支持体は、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜のうちの1つである。

10

【0019】

さらに、固形がん又は血液がんの治療を必要とする対象の固形がん又は血液がんを治療する方法であって、開示された方法を使用して調製された内因性 T C R を発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団の治療量、又は、開示された方法を使用して調製された操作された T 細胞の集団の治療量を、当該対象に投与することを含む、方法が提供される。

【0020】

本明細書で提供される方法は、同種異系療法において顕著な進歩を示す。上述したように、固形がん又は血液がんの治療を必要とする対象の固形がん又は血液がんを治療する方法であって、本明細書で提供される開示された方法のいずれかを使用して調製された、内因性 T C R を発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団を当該対象に投与することを含む、方法も提供される。

20

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1は、異なる単位操作シナリオによる同種異系 C A R T 製造プロセスの概略図を示す。

【図2A】図2Aは、枯渇後のそれぞれの日における枯渇細胞集団の残存 T C R + 細胞頻度を示し、矢印は、枯渇後0日目と比較した枯渇後2日目における、コントロール方法（抗 T C R 抗体のみを使用）と比較した異なる枯渇方法（異なる抗体の組み合わせを使用）の T C R + % の変化倍率を示す。

30

【図2B】図2Bは、枯渇細胞集団における残存 T C R + 細胞頻度を示し、矢印は、対照方法と比較した場合の、異なる枯渇方法間の枯渇後0日目と比較した枯渇後9日目の T C R + % の変化倍率を示す。

【図3A】図3Aは、枯渇後0日目及び1日目の抗 T C R 抗体染色によって測定された異なる抗体を使用した T C R + 細胞枯渇効率のフローサイトメトリープロットを示す。

【図3B】図3Bは、枯渇後0日目及び1日目の枯渇細胞集団における残存 T C R + 細胞頻度を数値バー方式で示す。

【図4】図4は、枯渇後0日目及び1日目に抗 T C R 及び／又は抗 C D 3 抗体の単一染色又は二重染色によって検出された枯渇集団における残存 T C R + 頻度及び残存 C D 3 + 頻度を示すフローサイトメトリープロットを示す。

40

【図5A】図5Aは、凍結前後の枯渇後1日目に抗 T C R 抗体及び／又は抗 C D 3 抗体の単一染色又は二重染色によって測定された枯渇細胞集団の T C R + 、C D 3 + 、C D 3 + / T C R - 、及び C D 3 / T C R + の頻度のフローサイトメトリープロットを示す。

【図5B】図5Bは、凍結前後の枯渇後1日目に抗 T C R 抗体染色によって測定された枯渇細胞集団における T C R + 細胞頻度を数値バー方式で示す。

【図5C】図5Cは、凍結前後の枯渇後1日目に抗 C D 3 抗体染色によって測定された枯渇細胞集団における C D 3 + 細胞頻度を数値バー方式で示す。

【図5D】図5Dは、凍結前後の枯渇後1日目に抗 T C R 抗体及び抗 C D 3 抗体の二重染色によって測定された枯渇細胞集団の C D 3 + / T C R - 細胞頻度を数値バー方式で示す。

50

【図 5 E】図 5 E は、凍結前後の枯渇後 1 日目に抗 T C R 抗体及び抗 C D 3 抗体の二重染色によって測定された枯渇細胞集団の C D 3 + / T C R + 細胞頻度を数値バー方式で示す。

【図 6】図 6 は、枯渇後 1 0 日間の培養期間における抗 T C R 抗体染色を使用した T C R + 頻度のフローサイトメトリープロットを示す。

【図 7】図 7 は、枯渇後 1 0 日間の培養期間における抗 C D 3 抗体染色を使用した C D 3 + 頻度のフローサイトメトリープロットを示す。

【図 8】図 8 は、枯渇後 1 0 日間の培養期間における抗 T C R 抗体染色及び抗 C D 3 抗体染色の両方を使用した、T C R + 及び C D 3 + の二重頻度のフローサイトメトリープロットを示す。

【図 9 A】図 9 A は、枯渇後の培養期間における抗 T C R 抗体染色を使用した T C R + 細胞頻度を数値バー方式で示す。

10

【図 9 B】図 9 B は、枯渇後の培養期間における抗 C D 3 抗体染色を使用した C D 3 + 細胞頻度を数値バー方式で示す。

【図 9 C】図 9 C は、枯渇後の培養期間における抗 T C R 抗体染色及び抗 C D 3 抗体染色の両方を使用した C D 3 + / T C R - 細胞頻度を数値バー方式で示す。

【図 9 D】図 9 D は、枯渇後の培養期間における抗 T C R 抗体染色及び抗 C D 3 抗体染色の両方を使用した C D 3 + / T C R + 細胞頻度を数値バー方式で示す。

【図 1 0 A】図 1 0 A は、枯渇後 1 0 日間の培養期間における生細胞密度の観点から細胞増殖状態を示す。

【図 1 0 B】図 1 0 B は、枯渇後 1 0 日間の培養期間における細胞生存率の観点から細胞増殖状態を示す。

20

【図 1 0 C】図 1 0 C は、枯渇後 1 0 日間の培養期間における細胞直径の観点から細胞増殖状態を示す。

【図 1 0 D】図 1 0 D は、枯渇後 1 0 日間の培養期間における総細胞増殖倍率の観点からの細胞増殖状態を示す。

【図 1 1 A】図 1 1 A は、枯渇後 0 日目及び 1 日目に抗 C D 5 2 染色によって測定された異なる抗体を使用することによる C D 5 2 枯渇効率を実証するフローサイトメトリープロットを示す。

【図 1 1 B】図 1 1 B は、枯渇後 0 日目及び 1 日目に抗 C D 5 2 抗体染色によって測定された枯渇細胞集団における残存 C D 5 2 + 細胞頻度を数値バー方式で示す。

30

【図 1 2】図 1 2 は、抗 C D 5 2 抗体染色によってモニターされた、枯渇後 1 0 日間の培養期間における残存 C D 5 2 + 細胞頻度のフローサイトメトリープロットを示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 2】

本明細書では、同種異系 C A R T 細胞療法を受けている患者の G V H D リスクを最小化することができる堅牢な T C R α β + 細胞枯渇のための改善された方法、及び開示された方法を使用して調製される細胞集団が提供される。一態様では、本開示は、T C R + 細胞枯渇効率を増加させて、T C R - 細胞集団中の T C R + 細胞の残存レベルを有意に低減する方法を提供する。

【0 0 2 3】

40

本明細書で使用される場合、「a」及び「an」という用語は、1 つ以上を意味するために使用される。例えば、「細胞」又は「抗体」への言及は、「1 つ以上の細胞」又は「1 つ以上の抗体」を意味する。

【0 0 2 4】

本明細書で使用される場合、本開示で提供される方法を使用して産生された細胞の集団に関して使用される場合の「T C R 枯渇」という用語は、内因性 T C R α / β ヘテロ二量体を発現する細胞をドナーから収集された細胞の集団よりもより少なく含む細胞の集団を意味する。例えば、T C R 枯渇細胞群 (T C R α / β が枯渇した細胞群) は、内因性 T C R α / β 複合体を発現する細胞を、1 0 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、又は 1 % 未満含み得る。

50

【0025】

本明細書で使用される場合、細胞又は細胞の集団（本開示で提供される方法を使用して産生された集団を含む）に関して使用される場合の「TCR+」及び「TCR」という用語は、少なくとも内因性TCR α/β ヘテロ二量体を発現する細胞を指す。ただし、CD3複合体の1つ以上の成分が細胞表面に発現している場合と発現していない場合がある。

【0026】

本明細書で使用される場合、細胞又は細胞の集団（本開示で提供される方法を使用して産生された集団を含む）に関して使用される場合の用語「TCR-」は、少なくともTCR α/β ヘテロ二量体を欠く細胞を指す。ただし、CD3複合体の1つ以上の成分が細胞表面に発現している場合と発現していない場合がある。

10

【0027】

本明細書で使用される場合、互換的に使用される「抗TCR抗体」及び「抗TCR」という用語は、ヒトTCR α 鎖のみに、又はヒトTCR β 鎖のみに、又はヒトTCR α/β ヘテロ二量体に結合して認識する抗体を指す。抗TCR抗体は、マウス、ヒト、又はヒト化抗体であり得る。

【0028】

本明細書で使用される場合、互換的に使用される「抗CD3抗体」及び「抗CD3」という用語は、ヒトCD3 γ 鎖、ヒトCD3 δ 鎖、CD3 ζ 鎖、又は、正常なヒト $\epsilon/\epsilon/\zeta/\zeta/\gamma/\delta$ CD3複合体の2つ以上の成分を含むCD3 ϵ 鎖若しくはヒトCD3複合体に結合して認識する抗体、及び結合する抗体を指す。抗CD3抗体は、マウス、ヒト、又はヒト化抗体であり得る。

20

【0029】

「患者」及び「対象」という用語は互換的に使用され、ヒト及び非ヒト動物対象、並びに、正式に診断された障害のある対象、正式に認識された障害のない対象、医療処置を受けている対象、障害を発症するリスクのある対象などを含む。

【0030】

「治療する」及び「治療」という用語は、治癒的治療、予防的治療、及び対象が障害又は他の危険因子を発症するリスクを低減する施用を含む。治療は、障害の完全な治癒を必要とせず、症状又は潜在的な危険因子を低減する実施形態を包含する。「防止する」という用語は、ある事象の可能性を100%排除することを要しない。むしろ、それは、所定の化合物又は方法の存在下でその事象の発生の可能性が減少していることを示す。

30

【0031】

操作されたTCR-細胞ベースの同種異系CAR-T産生物は、次世代のCAR-T治療薬の生成に関する戦略の典型的な例である。しかしながら、移植片対宿主病（GvHD）リスクや宿主対移植片病（HvGD）などの潜在的な免疫応答は、同種異系CAR-T細胞療法の深刻な安全性又は有効性の懸念の1つである。GvHDは、ドナー由来のT細胞がT細胞 $\alpha\beta$ 受容体（TCR $\alpha\beta$ ）を介してHLAミスマッチを認識し、患者の組織を攻撃する可能性があることに起因する。GvHDとHvGDは、HLAが一致するドナーの環境であっても、依然として小さなミスマッチが免疫応答を引き起こす可能性があるため、深刻であり致命的でさえある。

40

【0032】

CliniMACS Prodigy（登録商標）やTCR試薬キットなどのTCR+細胞を除去する（TCR $\alpha\beta$ +細胞を枯渇する）現在の方法は、抗TCR抗体のみを使用してTCR+細胞（TCR $\alpha\beta$ +細胞）をTCR-細胞（TCR $\alpha\beta$ -細胞）から分離し、最終医薬品における99%以上のTCR-細胞純度を達成し得る（例えば、Radestadら、（2014）J Immunol Res、Vol 2014:578741を参照されたい）。しかしながら、最終的な医薬品におけるTCR-に存在する1%未満のTCR+細胞の残存レベルは、依然として、同種異系CAR-T細胞療法に関連するGvHDのリスクを示す可能性があり、特に高用量レベルにおいてはそうである。

【0033】

50

本開示は、内因性 TCR を発現する免疫細胞が枯渇した操作された免疫細胞の集団を産生するための方法を提供し、開示された方法は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び抗 CD3 抗体で標識すること、及び、抗 TCR 抗体で標識された免疫細胞及び抗 CD3 抗体で標識された免疫細胞を操作された免疫細胞の集団から分離することを含む。

【0034】

本開示はまた、免疫細胞の集団から内因性 TCR を発現する細胞を枯渇させる方法を提供し、開示された方法は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び抗 CD3 抗体で標識すること、抗 TCR 抗体で標識された免疫細胞及び抗 CD3 抗体で標識された免疫細胞を非標識の免疫細胞から分離すること、及び、非標識免疫細胞を収集すること、を含み、それによって内因性 TCR を発現する細胞が枯渇した免疫細胞の集団を取得する。この方法はまた、抗 TCR 抗体及び CD3 以外の他の目的の標的（例えば、MHC1、MHC2、CD52、又は PD1）に向けられた1つ以上の抗体で標識された免疫細胞の集団を含むように適合させることができる。

10

【0035】

一態様では、本開示は、免疫細胞の集団を TCR 抗体及び CD3 抗体と接触させることを含む、TCR $\alpha\beta$ + 細胞を枯渇させる方法を提供する。この方法はまた、抗 TCR 抗体及び CD3 以外の他の目的の標的（例えば、MHC1、MHC2、CD52、又は PD1）に向けられた1つ以上の抗体で標識された免疫細胞の集団を含むように適合させることができる。

【0036】

本開示は、内因性 TCR を発現する免疫細胞が枯渇した操作された免疫細胞の集団を産生するための方法を提供し、開示された方法は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び抗 CD52 抗体で標識すること、及び、抗 TCR 抗体で標識された免疫細胞及び抗 CD52 抗体で標識された免疫細胞を操作された免疫細胞の集団から分離することを含む。

20

【0037】

本開示はまた、免疫細胞の集団から内因性 TCR を発現する細胞を枯渇させる方法を提供し、開示された方法は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び抗 CD52 抗体で標識すること、抗 TCR 抗体で標識された免疫細胞及び抗 CD52 抗体で標識された免疫細胞を非標識の免疫細胞から分離すること、及び、非標識の免疫細胞を収集すること、を含み、それによって内因性 TCR を発現する細胞が枯渇した免疫細胞の集団を取得する。

30

【0038】

別の態様では、本開示は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体及び CD52 抗体と接触させることを含む、TCR $\alpha\beta$ + 細胞を枯渇させる方法を提供する。実施例に示されているこれらの方法の有効性は、ヒト細胞において CD52 と TCR が互いに物理的に結合せず、いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、CD52 と TCR は生物学的に直接関連していないと理解されているという事実からして予想外であった。したがって、本開示の別の態様では、開示された方法は、抗 TCR 抗体及び通常は TCR に関連しない目的の標的に向けられた別の抗体の使用を含むことができる。

【0039】

さらに別の態様では、本開示は、免疫細胞の集団を抗 TCR 抗体、抗 CD3 抗体、及び抗 CD52 抗体と接触させることを含む、TCR $\alpha\beta$ + 細胞を枯渇させる方法を提供する。

40

【0040】

本明細書に記載の方法は、TCR $\alpha\beta$ + 細胞の枯渇のために抗 TCR 抗体及び抗 CD3 抗体を一緒に適用し、操作された TCR $\alpha\beta$ - 細胞ベースの同種異系 CAR T 製品の産生に関して特に有用である。本開示の以前においては、操作された T 細胞（未修飾 T 細胞産生物ではない）において、0.1% ~ 0.01% の TCR + 細胞の残存物を残す 99.9% ~ 99.99% の TCR - 細胞純度のレベルの TCR + 細胞の枯渇を臨床規模で行うことは非常に困難であり、同種異系療法を開発する上での課題であった。本開示は、この問題の解決策を提供する。

【0041】

50

この種の低レベルの残存TCR+細胞を達成すること（例えば、枯渇の1日後に測定されたTCR+細胞が0.1%~0.01%の範囲にある）は、操作された同種異系CAR-T産生物（例えば、TCR α/β -CAR T細胞）の顕著な進歩を象徴するものであり、GvHDの可能性を低減することにより、患者の臨床的利益を増進する。

【0042】

GvHD（及びHvGD）のリスクを低減するとともに、抗腫瘍効力を高める効果的な方法は、効果的で安全かつ純度の高い操作された同種異系免疫細胞（例えば、がん抗原に対して標的化されたCARを発現する同種異系CAR-T細胞）の製造に特に有用である。いくつかの実施形態では、本開示は、GvHD及び／又はHvGDのリスクを低減するか、又はその発症を防止する同種異系CAR-T細胞及び製品を産生するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、操作された同種異系CAR-T細胞は、固形腫瘍又は血液がんに対して、増強された抗腫瘍活性を有する。いくつかの実施形態では、CAR-T細胞は、1つ以上の内因性TCR、CD52、MHC1、MHC2、又はPD1遺伝子発現の発現を低減又は排除するように改変された細胞の集団を含む。したがって、いくつかの実施形態では、CAR-T細胞は、TCR+、CD52+、MHC1+、MHC2+、及び／又はPD1+である細胞が枯渇した集団を含む。

【0043】

本明細書では、操作された免疫細胞の集団から、内因的に発現されるTCR、CD3、CD52、MHC1、MHC2、又はPD1のうちの1つ以上を発現する細胞（例えば、TCR+、CD3+、CD52+、MHC1+、MHC2+、及び／又はPD1+である細胞）の集団を枯渇させる方法、及び、そのための抗体試薬を含むキットが提供される。

【0044】

T細胞受容体シグナル伝達

T細胞受容体複合体（本明細書に記載のTCR）は、T細胞の表面上の抗原受容体分子であり、T細胞の活性化及び抗原に対する免疫応答を潜在的にもたらすMHC分子によってT細胞に提示される抗原の認識の動因である。ヒトT細胞受容体は、それぞれがジスルフィド結合によって連結された2つのドメインを持つ α 鎖と β 鎖（少ない割合で γ 鎖も存在する）であるところの2つの膜貫通型ヘテロ二量体糖タンパク質鎖からなるヘテロ二量体である。TCRの細胞質尾部が短いため、それがペプチド-MHC複合体に結合するときに直接シグナルを送ることができない。その代わりに、TCRはCD3と総称されるシグナル伝達分子のグループに関連付けられており、TCRがペプチド-MHC複合体に結合すると細胞内シグナルを伝達する。

【0045】

CD3は、1つの γ 及び δ と2つの ϵ 分子で構成されており、これらはすべて細胞外ドメインに免疫グロブリンドメインとの限られた配列相同性を持っている。これらの分子は、小さな細胞質ドメインと、負に帯電した残基を持つ膜貫通ドメインを持っている。膜では、これらの負に帯電した残基は、TCRの膜貫通領域にある正に帯電した残基と塩橋を形成する。TCR-CD3受容体複合体は、ジスルフィド結合によって結合された二量体を形成する他の2つの不変タンパク質 ζ 及び η によって完成される。したがって、T細胞表面では、TCR-CD3複合体は、細胞内 $\zeta\zeta$ ホモダイマー又は $\zeta\eta$ ヘテロ二量体を伴うCD3 $\gamma\epsilon$ ダイマー及びCD3 $\delta\epsilon$ ダイマーと関連して、 $\alpha\beta$ （又は $\gamma\delta$ ）ヘテロ二量体として発現される。

【0046】

理論に拘束されることを望むものではないが、一部の研究者は、TCR発現が妨害された場合、CD3の表面発現も無効になる可能性があると考えている。しかしながら、本明細書に記載されるように、残存CD3表面発現は、依然として残存TCR+細胞を示し得る可能性があり、抗CD3抗体を抗TCR抗体と組み合わせて使用することによってTCR+枯渇効率を改善し得ることが思いがけなく発見された。

【0047】

免疫細胞を選別し枯渇させる方法

本明細書に記載されるように、一態様では、本開示は、免疫細胞の集団から内因性 T C R α / β の二量体を発現する細胞を枯渇させる方法を提供し、当該方法は、細胞の集団を抗 T C R 抗体及び抗 C D 3 抗体で標識すること（標識は、順々に又は一回の操作で同時に行うことができる）、非標識細胞から抗 T C R 標識細胞及び抗 C D 3 標識細胞を分離すること、及び、非標識の細胞を収集すること、を含み、これによって、内因性 T C R を発現する細胞が枯渇した細胞の集団を取得する。

【0048】

最初に、T C R α 遺伝子又は T C R β 遺伝子について内因性 T C R を欠損するように改変された操作された免疫細胞が T C R 枯渇試薬にさらされる。いくつかの実施形態では、T C R 枯渇試薬は、免疫細胞の表面に内因的に発現する、T C R α ポリペプチド、T C R β ポリペプチド、又は T C R α / β ヘテロ二量体を標的とする抗体を含む。本明細書に記載されるように、抗 T C R 抗体を抗 C D 3 抗体（及び／又は任意選択で抗 C D 5 2 抗体）抗体と組み合わせて使用する T C R 枯渇は、抗 T C R 抗体のみで行われる枯渇と比較して、T C R + 枯渇効率を予想外に増加させる。

【0049】

抗 T C R 抗体、抗 C D 3 抗体、又は抗 C D 5 2 抗体（又は T C R 枯渇操作の対象となる標的に向けられたその他の抗体）をビオチンに結合させることにより、例えば、磁気マイクロビーズ（必ずしもそうではないが、一般に、直径約 50 nm のナノ粒子）といった磁気枯渇剤などの磁気枯渇試薬、又は、例えば、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜といったその他の任意の表面に、直接的又は間接的に結合した二次抗体（例えば、抗ビオチン抗体）を使用した標識及び／又は分離をさらに容易にすることができる。磁性マイクロビーズを使用すると、T C R - 細胞から T C R + 細胞を分離することが容易になり、磁気カラムに接触すると、非標識の T C R - 細胞が通過して収集バッグに至る一方で、T C R + 細胞は、カラム上に保持され得る。音波粒子は、音波にさらしたときに、T C R - 細胞からの T C R + の分離を容易にする。開示された方法の文脈では抗ビオチン抗体が提供されているが、本明細書で提供されるすべての方法においては、例えば、ストレプトアビジン、アビジン、及びビオチンを認識する他のタンパク質といったその他のビオチン結合パートナーを抗ビオチン抗体の代わりに使用することができる。

【0050】

いくつかの実施形態では、提供された細胞は、任意選択で、他の細胞表面マーカーに関して選別され得る。例えば、免疫細胞の集団のサブセットは、それ自体が1つ以上のモノクローナル抗体に特異的な1つ以上のエピトープ（例えば、例示的なミモトープ配列、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2016 / 120216 号を参照のこと）を含む抗原特異的 C A R を発現する操作された免疫細胞を含み得る。この方法は、免疫細胞の集団を上記エピトープに特異的なモノクローナル抗体と接触させること、及び、モノクローナル抗体に結合する免疫細胞を選択して抗原特異的 C A R を発現する操作された免疫細胞に富む細胞の集団を得ることを含む。

【0051】

いくつかの実施形態では、前記エピトープに特異的な前記モノクローナル抗体は、任意選択で、蛍光分子に結合される。この実施形態では、モノクローナル抗体に結合する細胞を選択する工程は、蛍光活性化セルソーティング（F A C S）によって行うことができる。

【0052】

いくつかの実施形態では、前記エピトープに特異的な前記モノクローナル抗体は、任意選択で、磁性粒子に結合される。この実施形態では、モノクローナル抗体に結合する細胞を選択する工程は、磁気活性化セルソーティング（M A C S）によって行うことができる。

【0053】

いくつかの実施形態では、C A R を発現する免疫細胞を選別するための方法で使用されるモノクローナル抗体は、アレムツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、ムロモナブ C D 3、トシツモマブ、アビキシマブ、バシリキシマブ、ブレンツキシマブベドチン、セ

ツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、ベバシマブ、セルトリズマブペゴル、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、ラニビズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アダリムマブ、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オファツムマブ、パニツムマブ、Q B E N D - 1 0、及び／又はウステキヌマブから選択される。いくつかの実施形態では、前記モノクローナル抗体は、リツキシマブである。別の実施形態では、前記モノクローナル抗体は、Q B E N D - 1 0である。

【0054】

フローサイトメトリーは、細胞集団内の特定の細胞タイプを定量化するために使用することができる。一般に、フローサイトメトリーは、主に光学的手段によって細胞の成分又は構造的特徴を定量化するための方法である。構造的特徴を定量化することで様々な細胞タイプを区別できるため、フローサイトメトリーとセルソーティングを使用して、混合物中の様々な表現型の細胞を計数して選別することができる。

【0055】

フローサイトメトリー分析には、2つの主要な工程、すなわち、(1) 選択した細胞タイプを1つ以上の検出可能なマーカーで標識する工程、及び、(2) 集団内の細胞の総数に対する標識した細胞の数を決定する工程が含まれる。いくつかの実施形態では、細胞型を標識する方法は、特定の細胞型によって発現されるマーカーに標識された抗体を結合することを含む。抗体は、蛍光化合物で直接標識するか、又は、例えば、一次抗体を認識する蛍光標識二次抗体を使用して間接的に標識することができる。

【0056】

開示された方法のいくつかの実施形態では、T C R - 細胞から、任意選択でC A Rを発現するT C R + 細胞を選別又は分離することは、磁気活性化セルソーティング(M A C S)を使用して達成し得る。磁気活性化セルソーティング(M A C S)は、超常磁性ナノ粒子とカラムを使用して、表面抗原(C D分子)に応じて様々な細胞集団を分離する方法であるM A C Sを使用することで、非常に純度の高い細胞集団を得ることができる。単一細胞懸濁液中の細胞は、マイクロビーズで磁気標識することができる。サンプルは強磁性体で構成されたカラムに適用され、当該カラムが細胞を破壊しないコーティングで覆われているため、細胞を迅速かつ低刺激で分離することができる。磁気標識された細胞がカラム内に保持される一方で、非標識の細胞はカラムを通過する。通過画分は、非標識細胞画分として収集することができる。洗浄工程の後、カラムをセパレーターから取り外し、磁気標識された細胞をカラムから溶出する。

【0057】

T細胞などの特定の細胞集団を精製するための詳細なプロトコルは、B a s u S ら(2010)(B a s u S、C a m p b e l l H M、D i t t e l B N、R a y A. P u r i f i c a t i o n o f s p e c i f i c c e l l p o p u l a t i o n b y f l u o r e s c e n c e a c t i v a t e d c e l l s o r t i n g (F A C S)、J. V i s. E x p. (41):1546)に記載されている。

【0058】

開示された方法のいくつかの実施形態では、T C R - 細胞から、任意選択でC A Rを発現するT C R + 細胞を選別又は分離することは、磁気ベースの分離方法の代わりに音波分離を使用して達成し得る。理論に拘束されることを望むものではないが、音波分離では、三次元の定在波によって混合物の成分を分離するものと理解されている。開示された方法の文脈においては、抗T C R抗体、抗C D 5 2抗体又は抗C D 3抗体などの抗体は、音波粒子などの表面に結合することができる。音波粒子はビーズであり得る。一実施形態では、細胞を抗T C R抗体、抗C D 5 2抗体、又は抗C D 3抗体のうちの1つ以上を担持する音波粒子に曝露して、音波粒子を目的の標的を発現する任意の細胞と結合させる。次に、細胞は音響チャンバーに配置され、音波に曝露される。ビーズに関連付けられた細胞と抗体ビーズ粒子で標識されていない細胞の異なる特性を前提として、音波が標識細胞と非標識細胞を分離し、標識細胞(例えば、T C R + 細胞又はC D 5 2 + 細胞)を標識細胞から

かわしながら収集することができる。

【0059】

免疫細胞

本明細書に記載のTCR+細胞枯渇法に適した細胞には、免疫細胞が含まれる。

【0060】

インビトロ操作又は遺伝子改変（例えば、本明細書に記載されるような）の前に、本明細書に記載される方法で使用するための細胞（例えば、免疫細胞）を対象から得ることができる。細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含む、多くの非限定的な対象ベースの供給源から得ることができる。いくつかの実施形態では、利用可能であり当業者に既知である任意の数のT細胞株を使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、健康なドナー又はがんと診断された患者に由来し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、異なる表現型特徴を示す細胞の混合集団の一部であり得る。

10

【0061】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、最終的に操作された免疫細胞を受ける対象から得られる（すなわち、自家療法）。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、操作された免疫細胞を受ける対象とは異なる個体であるドナーから得られる（すなわち、同種異系療法）。

【0062】

細胞は、アフエーシスによって個体の循環血液から得ることができる。アフエーシス産生物には、通常、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、その他の有核白血球、赤血球、血小板などのリンパ球が含まれる。特定の実施形態では、アフエーシスによって収集された細胞を洗浄して血漿分画を除去し、その後の処理のために適切な緩衝液又は培地に入れることができる。

20

【0063】

本明細書に記載の方法を使用して、PBMCを遺伝子改変のために直接用いて操作された免疫細胞（CAR又はTCRなど）を生成することができる。特定の実施形態では、PBMCを単離した後、Tリンパ球を任意選択でさらに単離してT細胞のみを含む集団を生成することができ、遺伝子改変及び／又は増殖の前又は後のいずれかにおいて、細胞傷害性Tリンパ球及びヘルパーTリンパ球の両方を、ナイーブT細胞、メモリーT細胞、及びエフェクターT細胞の亜集団にさらに分類することができる。

30

【0064】

特定の実施形態では、T細胞は、例えば、PERCOLL（登録商標）グラジエントによる遠心分離を使用して、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって、PBMCから単離することができる。CD28+T細胞、CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD25+T細胞、CD62L+T細胞、CD5+T細胞、CD45RA-、CCR7+T細胞、CD95+T細胞、IL2Rβ+T細胞、及びCD45RO+T細胞などのT細胞の特定の亜集団は、当技術分野で知られているポジティブセクション法又はネガティブセクション法によってさらに単離することができる。例えば、ネガティブセクションによるT細胞集団の濃縮は、ネガティブセクションされた細胞に特有の表面マーカーを対象とする抗体の組み合わせで成し得る。本明細書で使用する1つの方法は、ネガティブセクションされた細胞上に存在する細胞表面マーカーを対象とするモノクローナル抗体のカクテルを使用するネガティブ磁気免疫接着反応又はフローサイトメトリーによる細胞の選別及び／又は選択である。例えば、ネガティブセクションによってCD4+細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルには通常、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及びCD8に対する抗体が含まれる。フローサイトメトリー及び細胞選別もまた、本開示で使用する目的の細胞集団を単離するために使用され得る。

40

【0065】

いくつかの実施形態では、T細胞の集団は、本明細書で提供される枯渇法を適用する前又は後のいずれかで、CD8+細胞について濃縮される。

50

【0066】

いくつかの実施形態では、T細胞の集団は、本明細書で提供される枯渇法を適用する前又は後のいずれかで、CD4+細胞について濃縮される。

【0067】

いくつかの実施形態では、集団又はCD4+細胞及び／若しくはCD8+細胞は、これらのタイプの細胞のそれぞれに関連する細胞表面抗原を同定することによって、ナイーブ細胞、幹細胞様メモリー細胞、セントラルメモリー細胞、エフェクターメモリー細胞及びエフェクター細胞にさらに分類され得る。いくつかの実施形態では、ナイーブT細胞の表現型マーカーの発現には、CD45RA+、CD95-、IL2Rβ-、CCR7+、及びCD62L+が含まれる。いくつかの実施形態では、幹細胞様メモリーT細胞の表現型マーカーの発現には、CD45RA+、CD95+、IL2Rβ+、CCR7+、及びCD62L+が含まれる。いくつかの実施形態では、セントラルメモリーT細胞の表現型マーカーの発現には、CD45RO+、CD95+、IL2Rβ+、CCR7+、及びCD62L+が含まれる。いくつかの実施形態では、エフェクターメモリーT細胞の表現型マーカーの発現には、CD45RO+、CD95+、IL2Rβ+、CCR7-、及びCD62L-が含まれる。いくつかの実施形態では、TEフェクター細胞の表現型マーカーの発現には、CD45RA+、CD95+、IL2Rβ+、CCR7-、及びCD62L-が含まれる。したがって、CD4+Tヘルパー細胞及び／又はCD8+Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を持つ細胞集団を特定することにより、ナイーブ細胞、幹細胞様メモリー細胞、セントラルメモリー細胞、エフェクターメモリー細胞、及びTEフェクター細胞に分類できる。特定の実施形態では、開示された方法を使用して、T細胞のこれらのサブセットのうちの1つ以上の枯渇を改善することができる。

【0068】

PBMCは、NK細胞やNK T細胞などの他の細胞傷害性リンパ球をさらに含むことができることが理解されるであろう。本明細書に開示されるようなキメラ受容体のコード配列を保有する発現ベクターは、ヒトドナーT細胞、NK細胞又はNK T細胞の集団に導入することができる。ヒト対象で使用するための保存及び／又は調製のために、CARを発現するT細胞を凍結保存する標準的な手順を使用することができる。一実施形態では、T細胞のインビトロ形質導入、培養、及び／又は増殖は、ウシ胎児血清及びウシ胎児血清などの非ヒト動物由来の産生物の非存在下で行われる。様々な実施形態では、凍結保存培地は、例えば、CryoStor（登録商標）CS2、CS5、又はCS10、又はDMSOを含む他の培地、又はDMSOを含まない培地を含み得る。

【0069】

操作された免疫細胞

本明細書に記載のTCR+細胞枯渇法は、操作された免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）で構成される治療を含む、がんを治療するための免疫細胞治療を創出する上で特に有用であり得る。

【0070】

遺伝子操作された免疫細胞は、同種異系又は自家であり得、開示された方法は、自家又は同種異系の治療のいずれかに適用することができる。

【0071】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞（又はその集団）は、T細胞（例えば、炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、調節性Tリンパ球、ヘルパーTリンパ球、腫瘍浸潤リンパ球（TIL））NK細胞、NK-T細胞、TCR発現細胞、樹状細胞、キラー樹状細胞、マスト細胞、若しくはマクロファージのいずれかであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CD4+Tリンパ球、CD8+Tリンパ球、及びそれらの組み合わせからなる群に由来し得る。いくつかの例示的な実施形態では、操作された免疫細胞は、T細胞である。T細胞はまた、γ/δ T細胞であり得る。

【0072】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、例えば、限定するものではないが、

幹細胞に由来し得る。幹細胞は、成人幹細胞、非ヒト胚性幹細胞、より具体的には、非ヒト幹細胞、臍帯血幹細胞、前駆細胞、骨髓幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、全能性幹細胞又は造血幹細胞であり得る。幹細胞はCD34+又はCD34-であり得る。

【0073】

いくつかの実施形態では、細胞は、末梢血から得られるか又は調製される。いくつかの実施形態では、細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）から得られるか又は調製される。いくつかの実施形態では、細胞は、骨髓から得られるか又は調製される。いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ウイルス（レンチウイルス又はガンマレトロウイルス）形質導入、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微粒子銃（例えば、遺伝子銃）、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、又はポリプレックスからなる群から選択される方法を使用して、核酸ベクターによってトランスフェクション又は形質導入される。いくつかの実施形態では、細胞は、非T細胞から再プログラムされたT細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、T細胞から再プログラムされたT細胞である。

【0074】

結合剤（抗体及びそのフラグメントを含む）

いくつかの実施形態では、開示された方法は、抗体又は抗原結合剤（例えば、抗原結合ドメインを含むか、又は抗体又はそのフラグメントを含む）の使用を含む。以下で論じるように、様々な実施形態において、操作された免疫細胞はまた、結合剤を含み得る。

【0075】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、特定の標的抗原への特異的結合を与えるのに十分な標準的な免疫グロブリン配列要素を含むポリペプチドを指す。当技術分野で知られているように、自然界で産生されるインタクトな抗体は、2つの同一の重鎖ポリペプチド（それぞれ約50kD）及び2つの同一の軽鎖ポリペプチド（それぞれ約25kD）からなり、これらが互いに結合して一般に「Y字型」構造と呼ばれるものとなった約150kDの四量体である。各重鎖は、少なくとも4つのドメイン（それぞれが約110アミノ酸長）－アミノ末端可変（VH）ドメイン（Y構造の先端に位置する）と、それに続く3つの定常ドメインであるCH1、CH2、及びカルボキシ末端CH3（Yのステムの基部に位置する）で構成される。「スイッチ」として知られる短い領域は、重鎖の可変領域と定常領域を接続する。「ヒンジ」は、CH2及びCH3ドメインを抗体の残りの部分に接続する。このヒンジ領域の2つのジスルフィド結合は、インタクトな抗体内で2つの重鎖ポリペプチドを互いに接続する。各軽鎖は、アミノ末端可変（VL）ドメインと、それに続くカルボキシ末端定数（CL）ドメインの2つのドメインで構成される。当技術分野の当業者は、抗体の構造及び配列要素に精通しており、提供された配列の「可変」及び「定常」領域を識別するとともに、かかるドメイン間の「境界」の定義にはある程度の柔軟性があり、したがって、同じ抗体鎖配列の様々な提示によっては、例えば、同じ抗体鎖配列のある異なる提示に比べて、1つ又はいくつかの残基分シフトした位置にかかる境界を示しうることを理解する。

【0076】

インタクトな抗体四量体は、重鎖と軽鎖が単一のジスルフィド結合によって互いに結合している2つの重鎖－軽鎖二量体で構成されており、他の2つのジスルフィド結合が重鎖ヒンジ領域を互いに接続し、その結果、上記二量体が互いに接続されて四量体を形成する。自然界で産生される抗体もまた、通常は、CH2ドメインでグリコシル化される。天然抗体の各ドメインは、圧縮された逆平行βバレル内で互いにパックされた2つのβシート（例えば、3本鎖、4本鎖、又は5本鎖シート）から形成される「免疫グロブリンフォールド」を特徴とする構造を持っている。各可変ドメインには、「補体決定領域」（CDR1、CDR2、及びCDR3）と呼ばれる3つの超可変ループと、4つのやや不変の「フレームワーク」領域（FR1、FR2、FR3、及びFR4）が含まれる。天然の抗体が折りたたまれると、FR領域がドメインの構造フレームワークを提供するβシートを形成し、重鎖と軽鎖の両方からのCDRループ領域が3次元空間に集められ、Y構造の先端に

位置する単一の超可変抗原結合サイトを作る。天然に存在する抗体のFc領域は、補体系の要素に結合し、また、例えば、細胞傷害性を媒介するエフェクター細胞を含むエフェクター細胞上の受容体にも結合する。当技術分野で知られているように、Fc受容体に対するFc領域の親和性及び／又は他の結合属性は、グリコシル化又は他の修飾によって調節され得る。いくつかの実施形態では、本発明に従って産生及び／又は利用される抗体は、修飾された又は操作されたかかるグリコシル化を伴うグリコシル化されたFcドメインを含む。

【0077】

本開示では、特定の実施形態において、天然抗体に見られるような十分な免疫グロブリンドメイン配列を含むあらゆるポリペプチド又はポリペプチドの複合体は、かかるポリペプチドが天然に産生される（例えば、抗原に反応する生物によって生成される）かどうかにかかわらず、「抗体」と呼ばれ、かつ／又は、「抗体」として使用され得、又は、それは、組換え工学、化学合成、又は他の人工的なシステム又は方法論によって生成され得る。いくつかの実施形態では、抗体はポリクローナルであり、いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナルである。いくつかの実施形態では、抗体は、マウス、ウサギ、霊長類、又はヒト抗体に特徴的な定常領域配列を有する。いくつかの実施形態では、抗体配列要素は、当技術分野で知られているように、ヒト化、霊長類化、キメラなどである。

【0078】

さらに、本明細書で使用される「抗体」という用語は、別の説明として、抗体の構造的及び機能的特徴を利用するための当技術分野で知られている又は開発された構築物又はフォーマットのいずれかを指し得る。例えば、いくつかの実施形態では、本開示の方法で利用される抗体は、インタクトなIgA、IgG、IgE又はIgM抗体；二重又は多重特異性抗体（例えば、Zybodyes（登録商標）など）；Fabフラグメント、Fabフラグメント、F(ab)2フラグメント、Fdフラグメント、及び単離されたCDR又はそれらのセットなどの抗体フラグメント；単鎖可変フラグメント（scFV）；Fc融合ポリペプチド；単ドメイン抗体（例えば、IgNAR又はそのフラグメントなどのサメ単ドメイン抗体）；ラクダ抗体（本明細書ではナノボディ又はVHHとも呼ばれる）；サメ抗体、マスク抗体（例えば、Probodyes（登録商標））；小型モジュラー免疫医薬品（SMIP（商標））；単鎖又はタンデムダイアボディ（TandAb（登録商標））；VHH；Anticalins（登録商標）；Nanobodies（登録商標）ミニボディ；BiTE（登録商標）；アンキリンリピートタンパク質又はDARPIN（登録商標）；Avimers（登録商標）；DART；TCR様抗体；Adnectins（登録商標）；Affilins（登録商標）；Trans-bodies（登録商標）；Affibodies（登録商標）；TrimerX（登録商標）；マイクロプロテイン；Fynomers（登録商標）、Centyrins（登録商標）；及びKALLBITOR（登録商標）から選択されるフォーマットであるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗体は、それが自然に産生された場合に有するであろう共有結合修飾（例えば、グリカンの付着）を欠く場合がある。いくつかの実施形態では、抗体は、共有結合修飾（例えば、グリカンの付着、ペイロード（例えば、検出可能な部分、治療部分、触媒部分など）の付着、又は他のペンダント基（例えば、ポリエチレングリコールなど）の付着）を含み得る。

【0079】

本明細書で使用される場合、「抗体剤」という用語は、一般に、特定の抗原に特異的に結合する薬剤を指す。いくつかの実施形態では、この用語は、特異的結合を与えるのに十分な免疫グロブリン構造要素を含む任意のポリペプチド又はポリペプチド複合体を包含する。例示的な抗体剤としては、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗体剤は、マウス、ウサギ、霊長類、又はヒト抗体に特徴的な1つ以上の定常領域配列を含み得る。いくつかの実施形態では、抗体剤は、当技術分野で知られているように、ヒト化、霊長類化、キメラなどである1つ以上の配列要素を含み得る。多くの実施形態において、「抗体剤」という用語は、別

10

20

30

40

50

の説明として、抗体の構造的及び機能的特徴を利用するための当技術分野で知られている又は開発された構築物又はフォーマットのうちの1つ以上を指すために使用される。例えば、本発明に従って利用される抗体剤は、インタクトなIgA、IgG、IgE又はIgM抗体；二重又は多重特異性抗体（例えば、Zyboodies（登録商標）など）；Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fdフラグメント、及び単離されたCDR又はそれらのセットなどの抗体フラグメント；単鎖Fvs；Fc融合ポリペプチド；単ドメイン抗体（例えば、IgNAR又はそのフラグメントなどのサメ単ドメイン抗体）；ラクダ抗体；マスク抗体（例えば、Probodies（登録商標））；小型モジュラー免疫医薬品（SMIPs（商標））；単鎖又はタンデムダイアボディ（TandAb（登録商標））；VHH；Anticalins（登録商標）；Nanobodies（登録商標）ミニボディ；BiTE（登録商標）；アンキリンリピートタンパク質又はDARPIN（登録商標）；Avimers（登録商標）；DART；TCR様抗体；Adnectins（登録商標）；Affilins（登録商標）；Trans-bodies（登録商標）；Affibodies（登録商標）；TrimerX（登録商標）；マイクロプロテイン；Fynomers（登録商標）、Centyrins（登録商標）；及びKALBITOR（登録商標）から選択されるフォーマットであるが、これらに限定されない。

【0080】

本開示の方法の実施に使用される抗体又は抗体剤は、一本鎖又は二本鎖であり得る。いくつかの実施形態では、抗体又は抗原結合分子は一本鎖である。特定の実施形態において、抗原結合分子は、scFv、Fab、Fab'、Fv、F(ab')₂、dAb、及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。

【0081】

抗体及び抗体剤には、抗体フラグメントが含まれる。抗体フラグメントは、インタクトな抗体の抗原結合又は可変領域などのインタクトな抗体の一部を含む。抗体フラグメントには、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、ダイアボディ、線状抗体、抗体フラグメント抗体及びscFvフラグメントから形成された多重特異性、及び他のフラグメントが含まれるが、これらに限定されない。抗体には、ポリクローナルモノクローナル、キメラdAb（ドメイン抗体）、単鎖、Fab、Fa、F(ab')₂フラグメント、及びscFvも含まれるが、これらに限定されない。抗体は、抗体全体、免疫グロブリン、又は抗体フラグメントであり得る。抗体フラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解消化、並びに、当技術分野で知られている組換え宿主細胞（例えば、大腸菌、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又はファージ）による産生を含むがこれらに限定されない様々な技術によって作製することができる。

【0082】

いくつかの実施形態では、抗体又は抗体剤は、キメラ抗体であり得る（例えば、米国特許第4,816,567号明細書、及びMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:6851-6855（1984）を参照されたい）。キメラ抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の供給源又は種に由来する一方で、重鎖及び／又は軽鎖の残りの部分が異なる供給源又は種に由来する抗体であり得る。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域）及びヒト定常領域を含むことができる。さらなる例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のそれから変更された「クラススイッチ」抗体であり得る。キメラ抗体には、その抗原結合フラグメントが含まれる。

【0083】

いくつかの実施形態では、キメラ抗体は、ヒト化抗体であり得る（例えば、Almagro及びFransson、Front Biosci.、13:1619-1633（2008）；Riechmannら、Nature、332:323-329（1988）；Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033（1989）；米国特許第5,821,337号明細書、同第7,527,7

10

20

30

40

50

91号明細書、同第6, 982, 321号明細書、及び同第7, 087, 409号明細書；Kashmiriら、Methods 36:25-34 (2005)；Padlan、Mol. Immunol、28:489-498 (1991)；Dall'Acquaら、Methods、36:43-60 (2005)；Osbourneら、Methods、36:61-68 (2005)；並びにKlimkaら、Br. J. Cancer、83:252-260 (2000)を参照のこと。ヒト化抗体は、非ヒト超可変領域からのアミノ酸残基及びヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体である。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、超可変領域（例えば、CDR）のすべて又は実質的にすべてが非ヒト抗体のそれに対応し、フレームワーク領域（FR）のすべて又は実質的にすべてがヒト抗体のそれに対応する。ヒト化抗体は、任意選択で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含み得る。

10

【0084】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体又は抗体剤は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で知られている様々な技術を使用して産生することができる（例えば、van Dijk and van de Winkel、Curr. Opin. Pharmacol、5:368-74 (2001)、及び、Lonberg、Curr. Opin. Immunol、20:450-459 (2008)を参照のこと）。ヒト抗体は、ヒト又はヒト細胞によって産生されるか、又は、ヒト抗体レパートリー又は他のヒト抗体をコードする配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものであり得る。ヒト抗体のこの定義は、厳密に言えば、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外している。ヒト抗体は、当技術分野で周知の方法を使用して調製することができる。

20

【0085】

キメラ抗原受容体（CAR）

本明細書に記載されるように、開示された方法は、免疫細胞の集団からTCR+細胞を枯渇させるために使用され得る。免疫細胞はCAR+細胞であり得、同種異系療法などの治療用途で使用するために操作され得る。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、細胞外抗原結合ドメインを含むCARを含む。本明細書で使用される場合、キメラ抗原受容体（CAR）は、標的抗原（例えば、がん細胞上の標的抗原；がん抗原）を特異的に認識するタンパク質を含む。標的抗原に結合すると、CARは免疫細胞を活性化して、その抗原を担持する細胞（例えば、がん細胞）を攻撃及び破壊することができる。CARはまた、その効力を高めるために、4-1BB、CD28又はOX40などのタンパク質の全部又は一部を含む共刺激ドメイン、及び／又は、CD3ゼータなどのシグナル伝達ドメインを組み込むことができる。Krauseら、J. Exp. Med.、Volume 188、No. 4、1998 (619-626)；Finneyら、Journal of Immunology、1998、161:2791-2797、Songら、Blood 119:696-706 (2012)；Kalosら、Sci. Transl. Med. 3:95 (2011)；Porterら、N. Engl. J. Med. 365:725-33 (2011)、及びGrossら、Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56:59-83 (2016)；米国特許第7, 741, 465号明細書、及び同第6, 319, 494号明細書を参照されたい。

30

【0086】

本明細書に記載のキメラ抗原受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、任意選択で、細胞外ドメインを膜貫通ドメインに結合するヒンジドメイン、及び、細胞外ドメインを含み、当該細胞外ドメインは、標的に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。

【0087】

いくつかの実施形態では、抗原特異的CARは、安全スイッチ及び／又はモノクローナル抗体特異的エピトープをさらに含む。いくつかの実施形態では、抗原選択的CARは、リーダーペプチド又はシグナルペプチドを含む。

50

CAR抗原結合ドメイン

上記のように、本明細書に記載のCARは、抗原結合ドメインを含む。本明細書で使用する「抗原結合ドメイン」は、特定の標的抗原に結合する任意のポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、scFvである。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、腫瘍細胞上の抗原に結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、過剰増殖性疾患（例えば、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、又は他の固形がん又は血液がん）に関与する細胞上の抗原に結合する。開示された方法は、CAR+細胞でもあるTCR+細胞を枯渇させるために使用することができ、その結果、CAR+/TCR-細胞の集団を提供する。

【0088】

いくつかの実施形態では、CARの抗原結合ドメインは、可変重鎖、可変軽鎖、及び／又は本明細書に記載の1つ以上のCDRを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、軽鎖CDR CDR1、CDR2及びCDR3、並びに、重鎖CDR CDR1、CDR2及びCDR3を含む単鎖可変フラグメント（scFv）である。

【0089】

抗原結合ドメインは、あるターゲットに対して、別のターゲットに結合するより強く結合する場合に「選択的」とされる。

【0090】

CARの抗原結合ドメインは、がん抗原を選択的に標的とする。いくつかの実施形態では、がん抗原は、EGFRvIII、WT-1、CD20、CD23、CD30、CD38、CD33、CD133、MHC-WT1、TSPAN10、MHC-PRAME、Liv1、ADAM10、CHRNA2、LeY、NKG2D、CS1、CD44v6、ROR1、Claudin-18.2、Muc17、FAPアルファ、Ly6G6D、c6orf23、G6D、MEGT1、NG25、CD19、BCMA、FLT3、CD70、DLL3、CD52又はCD34から選択される。いくつかの実施形態では、CARは、EGFRvIII、WT-1、CD20、CD23、CD30、CD38、CD33、CD133、MHC-WT1、TSPAN10、MHC-PRAME、Liv1、ADAM10、CHRNA2、LeY、NKG2D、CS1、CD44v6、ROR1、Claudin-18.2、Muc17、FAPアルファ、Ly6G6D、c6orf23、G6D、MEGT1、NG25、CD19、BCMA、FLT3、CD70、DLL3、CD52又はCD34を標的とする抗原結合ドメインを含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、がん抗原は、炭酸アンヒドラーゼIX（CAIX）、がん胚性抗原（CEA）、CDS、CD7、CDIO、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、サイトメガロウイルス（CMV）感染細胞の抗原（例えば、細胞表面抗原）、上皮糖タンパク質（EGP2）、上皮糖タンパク質-40（EGP-40）、上皮細胞接着分子（EpCAM）、受容体チロシンタンパク質キナーゼerbB-2、3、4、葉酸結合タンパク質（FBP）、胎児アセチルコリン受容体（AChR）、葉酸受容体、ガングリオシドG2（GD2）、ガングリオシドG3（GD3）、ヒト表皮成長因子受容体2（HER-2）、ヒテロメラーゼ逆転写酵素（hTERT）、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）、κ-軽鎖、キナーゼ挿入ドメイン受容体（KDR）、ルイスA（CA19.9）、LI細胞接着分子（LICAM）、メラノーマ抗原ファミリーA，1（MAGE-A1）、Mucin16（Muc-16）、Mucin1（Muc-1）、Mesothelin（MSLN）、NKG2Dリガンド、がん精巣抗原NY-ESO-1、がん胎児性抗原（h5T4）、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、腫瘍関連糖タンパク質72（TAG-72）、血管内皮増殖因子R2（VEGF-R2）、及びウィルムス腫瘍タンパク質（WT-1）からなる群から選択される。

【0092】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の抗原結合ドメインのいずれか1つをコードする単離されたポリヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態では、本開示は、CARをコードする単離されたポリヌクレオチドに関する。本明細書では、当該ポリヌクレオチドを含むベクター、及びそれを作製する方法も提供される。

【0093】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を実施することによって生成される細胞集団の構成要素を形成することができるCAR免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）は、例えば、RQR8などの安全スイッチポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2013153391A号を参照されたい。ポリヌクレオチドを含むCAR免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）において、安全スイッチポリペプチドは、CAR免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）の表面で発現され得る。

【0094】

CARヒンジドメイン

本開示のCARの細胞外ドメインは、「ヒンジ」ドメイン（又はヒンジ領域）を含み得る。この用語は、一般に、CARの膜貫通ドメインをCARの細胞外抗原結合ドメインにリンクするように機能する任意のポリペプチドを指す。具体的には、ヒンジドメインを使用することで、細胞外抗原結合ドメインにより多くの柔軟性及びアクセス可能性が提供され得る。

【0095】

ヒンジドメインは、最大で300個のアミノ酸を含むことができ、いくつかの実施形態では、10から100個のアミノ酸を含むことができ、又はいくつかの実施形態では25から50個のアミノ酸を含むことができる。ヒンジドメインは、天然に存在する分子の全部又は一部に由来し得、例えば、CD8、CD4、CD28、4-1BB、又はIgGの細胞外領域の全部若しくは一部（特に、IgGのヒンジ領域；ヒンジ領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、IgM、又はそのフラグメントなどの免疫グロブリンファミリーのメンバーの一部又は全部を含むことが理解されよう）、又は、抗体の重鎖定常領域の全部若しくは一部などに由来し得る。あるいは、ヒンジドメインは、天然に存在する配列に対応する合成配列であり得、又は完全な合成ヒンジ配列であり得る。いくつかの実施形態では、前記ヒンジドメインは、ヒトCD8α鎖（例えば、NP_001139345.1）の一部である。別の特定の実施形態では、前記ヒンジドメイン及び膜貫通ドメインは、ヒトCD8α鎖の一部を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCARのヒンジドメインは、CD8α、IgG1、IgG4、PD-1又はFcγRIIIαの部分配列、具体的には、CD8α、IgG1、IgG4、PD-1又はFcγRIIIαのいずれかのヒンジ領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、ヒトCD8αヒンジ、ヒトIgG1ヒンジ、ヒトIgG4、ヒトPD-1、又はヒトFcγRIIIαヒンジを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるCARは、scFv、CD8αヒトヒンジ及び膜貫通ドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメイン、及び4-1BBシグナル伝達ドメインを含む。

【0096】

CAR膜貫通ドメイン

本明細書で提供されるCARは、CARの細胞外ドメインに融合された膜貫通ドメインを考慮して設計されている。同様に、CARの細胞内ドメインに融合させることができる。場合によっては、膜貫通ドメインは、同じ又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへのかかるドメインの結合を回避して、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するために、アミノ酸置換によって選択又は改変され得る。いくつかの実施形態では、短いリンカーは、CARの細胞外、膜貫通、及び細胞内ドメインのうちのいずれか又はそのいくつかの間の結合を形成し得る。

【0097】

膜貫通領域は、合成のもの（天然に存在しないもの）であり得、又は、CD28、OX

10

20

30

40

50

-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、プログラム細胞死1 (PD-1)、誘導性T細胞共刺激因子 (ICOS)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT (TNFSF14)、NKG2C、Igアルファ (CD79a)、DAP-10、Fcガンマ受容体、MHCクラス1分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、トールリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80 (KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8beta、IL-2R beta、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83と特異的に結合するリガンド、又はそれらの任意の組み合わせに由来するもの (そのフラグメントを含むもの、若しくは、そのフラグメントに相当するもの) であり得る。

【0098】

いくつかの実施形態では、本開示のCARにおける膜貫通ドメインは、CD8α膜貫通ドメインである。

【0099】

いくつかの実施形態では、本開示のCARにおける膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインである。

【0100】

CAR細胞内ドメイン

CARの細胞内 (細胞質) ドメインは、CARを含む免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つを活性化し得る。T細胞のエフェクター機能は、例えば、サイトカインの分泌を含む、細胞溶解活性やヘルパー活性を指す場合がある。

【0101】

当然のことながら、適切な (例えば、活性化する) 細胞内ドメインには、限定するものではないが、CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、プログラム細胞死1 (PD-1)、誘導性T細胞共刺激因子 (ICOS)、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD247、CD276 (B7-H3)、LIGHT (TNFSF14)、NKG2C、Igアルファ (CD79a)、DAP-10、Fcガンマ受容体、MHCクラス1分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、トールリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80 (KLRF1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、I

10

20

30

40

50

TGAD、CD1 1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1 1a、LFA-1、ITGAM、CD1 1b、ITGAX、CD1 1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83と特異的に結合するリガンド、又はそれらの任意の組み合わせに由来する（そのフラグメントを含む、若しくは、そのフラグメントに相当する）シグナル伝達ドメインが含まれる。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内／細胞質ドメインは、それ自体で41BB／CD137ドメインを含むように設計することができ、あるいは、CARとの関連で有用な他の任意の所望の細胞内ドメインと組み合わせることができる。41BB／CD137の完全な天然型アミノ酸配列は、NCBIリファレンスシーケンス：NP_001552.2に記載されている。完全な天然型41BB／CD137核酸配列は、NCBIリファレンスシーケンス：NM_001561.5に記載されている。

【0103】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内／細胞質ドメインは、それ自体でCD28ドメインを含むように設計することができ、あるいは、本開示のCARとの関連で有用な他の任意の所望の細胞内ドメインと組み合わせることができる。CD28の完全な天然型アミノ酸配列は、NCBIリファレンスシーケンス：NP_006130.1に記載されている。完全な天然型CD28核酸配列は、NCBIリファレンスシーケンス：NM_006139.1に記載されている。

20

【0104】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内／細胞質ドメインは、それ自体でCD3ゼータドメインのすべて又は断片を含むように設計することができ、あるいは、CARとの関連で有用な他の任意の所望の細胞内ドメインと組み合わせることができる。

【0105】

いくつかの実施形態では、本開示のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子のドメインを含む。いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、41BB (GenBank: AAA53133.) 及びCD28 (NP_006130.1) のフラグメントからなる群から選択される共刺激分子の一部を含む。

30

【0106】

CARを含む操作された免疫細胞

本明細書では、内因性TCRを発現する細胞が枯渇した、操作された免疫細胞及びCARを発現する操作された免疫細胞の集団（例えば、CAR-T細胞又はCAR+細胞）が提供される。

【0107】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CAR T細胞を含み、各CAR T細胞は、細胞外抗原結合ドメインを含み、内因性TCRの発現を低減又は排除した。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、CAR T細胞の集団を含み、各CAR T細胞は、2つ以上の異なる細胞外抗原結合ドメインを含み、内因性TCRの発現を低減又は排除した。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、CARの集団を含み、各CAR T細胞は、同じ細胞外抗原結合ドメインを含み、内因性TCRの発現を低減又は排除した。

40

【0108】

操作された免疫細胞は、同種異系又は自家であり得る。

【0109】

50

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞又は操作された免疫細胞の集団は、T細胞（例えば、炎症性Tリンパ球細胞傷害性Tリンパ球、調節性Tリンパ球、ヘルパーTリンパ球、腫瘍浸潤リンパ球（TIL））、NK細胞、NK-T細胞、TCR発現細胞、樹状細胞、キラー樹状細胞、マスト細胞、又はB細胞であり、CARを発現する。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD4+Tリンパ球、CD8+Tリンパ球、又はCD4+T細胞及びCD8+T細胞の組み合わせを含む集団からなる群に由来し得る。

【0110】

いくつかの実施形態では、開示された方法を使用して産生される操作された免疫細胞又は操作された免疫細胞の集団は、限定するものではないが、例えば、幹細胞に由来し得る。幹細胞は、成人幹細胞、又は非ヒト胚性幹細胞であり得、より具体的には、非ヒト幹細胞、臍帯血幹細胞、前駆細胞、骨髄幹細胞、人工多能性幹細胞、全能性幹細胞又は造血幹細胞であり得る。

10

【0111】

いくつかの実施形態では、開示された方法を使用して産生される操作された免疫細胞又は免疫細胞の集団は、末梢血から得られるか、又は調製される。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）から得られるか、又は調製される。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、骨髄から得られるか、又は調製される。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、臍帯血から得られるか、又は調製される。いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微粒子銃（例えば、遺伝子銃）、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、ウイルストランスフェクション（例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、AAV）又はポリプレックスからなる群から選択される方法を使用して、核酸ベクターによってトランスフェクト又は形質導入される。

20

【0112】

いくつかの実施形態では、抗原特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%を超える割合の幹細胞様メモリー細胞及びセントラルメモリー細胞を含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原特異的CARをそれらの細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、約10%から約100%、約10%から約90%、約10%から約80%、約10%から約70%、約10%から約60%、約10%から約50%、約10%から約40%、約10%から約30%、約10%から約20%、約15%から約100%、約15%から約90%、約15%から約80%、約15%から約70%、約15%から約60%、約15%から約50%、約15%から約40%、約15%から約30%、約20%から約100%、約20%から約90%、約20%から約80%、約20%から約70%、約20%から約60%、約20%から約50%、約20%から約40%、約20%から約30%、約30%から約100%、約30%から約90%、約30%から約80%、約30%から約70%、約30%から約60%、約30%から約50%、約30%から約40%、約40%から約100%、約40%から約90%、約40%から約80%、約40%から約70%、約40%から約60%、約40%から約50%、約50%から約100%、約50%から約90%、約50%から約80%、約50%から約70%、約50%から約60%、約60%から約100%、約60%から約90%、約60%から約80%、約60%から約70%、約70%から約90%、約70%から約80%、約80%から約100%、約80%から約90%、約90%から約100%、約25%から約50%、約75%から約100%、又は約50%から約75%の割合の幹細胞様メモリー細胞及びセントラルメモリー細胞を含む。

30

40

【0114】

いくつかの実施形態では、抗原特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、10%、20%、30%、40%、50%、又は60%を超える割合の幹細胞

50

様メモリー細胞及びセントラルメモリー細胞を含む。

【0115】

いくつかの実施形態では、抗原特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、約10%から約60%、約10%から約50%、約10%から約40%、約15%から約50%、約15%から約40%、約20%から約60%、又は約20%から約70%の割合の幹細胞様メモリー細胞及びセントラルメモリー細胞を含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、抗原特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞がTCM細胞及びTSCM細胞を合わせて、少なくとも約60%、65%、70%、75%、又は80%含むように、TCM細胞及び／又はTSCM細胞に富む。いくつかの実施形態では、抗原特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞がTCM細胞及びTSCM細胞を合わせて、少なくとも約70%含むように、TCM細胞及び／又はTSCM細胞に富む。いくつかの実施形態では、抗原特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞がTCM細胞及び／又はTSCM細胞を合わせて、少なくとも約75%含むように、TCM細胞及び／又はTSCM細胞に富む。

【0117】

いくつかの実施形態では、本開示の抗原特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞が、少なくとも約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、又は60%のTSCM細胞を含むように、TCM細胞及び／又はTSCM細胞に富む。いくつかの実施形態では、本開示の抗原特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、操作された免疫細胞が、少なくとも約30%、35%、40%、又は45%のTSCM細胞を含むように、TCM細胞及び／又はTSCM細胞に富む。

【0118】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CARを発現する炎症性Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CARを発現する細胞傷害性Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CARを発現する制御性Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CARを発現するヘルパーTリンパ球である。

【0119】

いくつかの実施形態では、本開示による操作された免疫細胞は、1つ以上の破壊された又は不活化された遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、標的抗原の遺伝子（例えば、EGFRvIII、Flt3、WT-1、CD20、CD23、CD30、CD38、CD33、CD133、MHC-WT1、TSPAN10、MHC-PRAME、Liv1、ADAM10、CHRNA2、LeY、NKGD2D、CS1、CD44v6、ROR1、Claudin-18.2、Muc17、FAPアルファ、Ly6G6D、c6orf23、G6D、MEGT1、NG25、CD19、BCMA、FLT3、CD70、DLL3、又はCD34、CD70）をノックアウトして同じ抗原（例えば、EGFRvIII、Flt3、WT-1、CD20、CD23、CD30、CD38、CD33、CD133、MHC-WT1、TSPAN10、MHC-PRAME、Liv1、ADAM10、CHRNA2、LeY、NKGD2D、CS1、CD44v6、ROR1、Claudin-18.2、Muc17、FAPアルファ、Ly6G6D、c6orf23、G6D、MEGT1、NG25、CD19、BCMA、FLT3、CD70、DLL3、又はCD34、CD70 CAR）を標的とするCARを導入し、誘発されたCARの活性化をすることができる。本明細書に記載されるように、いくつかの実施形態では、本開示による操作された免疫細胞は、MHC1（β2M）、MHC2（CIITA）、EGFRvIII、Flt3、WT-1、CD20、CD23、CD30、CD38、CD33、CD133、MHC-WT1、TSPAN10、MHC-PRAME、Liv1、ADAM10、CHRNA2、LeY、NKGD2D、CS1、CD44v6、ROR1、C

L a u d i n-18、2、M u c 17、F A Pアルファ、L y 6 G 6 D、c 6 o r f 2 3、G 6 D、M E G T 1、N G 2 5、C D 19、B C M A、F L T 3、C D 70、D L L 3、又はC D 34、C D 70、T C R α及びT C R βからなる群から選択される1つの破壊された又は不活性化された遺伝子を含み、かつ／又は、C A R又はマルチチェーンC A Rを発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、マルチチェーンC A Rを含む。いくつかの実施形態では、単離された細胞は、C D 52及びT C R α、C D R 52及びT C R β、P D-1及びT C R α、P D-1及びT C R β、M H C-1及びT C R α、M H C-1及びT C R β、M H C 2及びT C R α、M H C 2及びT C R βからなる群から選択される2つの破壊された又は不活性化された遺伝子を含み、かつ／又は、C A R又はマルチチェーンC A Rを発現する。

10

【0120】

いくつかの実施形態では、本方法は、選択的DNA切断によって遺伝子を選択的に不活性化することができるエンドヌクレアーゼを細胞中に導入することによって1つ以上の遺伝子を破壊又は不活性化することを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、メガTALヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALENヌクレアーゼ、若しくはTALEN（登録商標））、又はCRISPR（例えば、Cas9又はCas12）エンドヌクレアーゼであり得る。

【0121】

いくつかの実施形態では、T C R+細胞又はその集団は、内因性T C R α遺伝子及び／又はT C R β遺伝子を破壊又は不活性化することによって、細胞内で非機能化される。本開示の枯渇方法は、T R C α遺伝子の不活性化に続いて、細胞の集団から残りのT C R+T細胞を除去するのに特に有用である。本明細書に開示される方法を使用して生成された操作された免疫細胞は、宿主対移植片（HvGD）拒絶反応及び移植片対宿主病（GvHD）を予防又は低減することによって、それを必要とする患者を治療するために使用することができる。したがって、宿主対移植片（HvG）拒絶反応及び移植片対宿主病（GvHD）を予防又は減少させることによってそれを必要とする患者を治療する方法であって、破壊又は不活性化されたT C R α遺伝子及び／又はT C R β遺伝子を含む操作された免疫細胞の有効量を前記患者に投与することによって前記患者を治療することを含む方法は、本開示の範囲内にある。

20

【0122】

本開示は、内因性T C R発現を欠くか又はそれが低減された操作された免疫細胞の集団の純度を高める方法を提供する。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、1.0%未満のT C R+細胞、0.9%未満のT C R+細胞、0.8%未満のT C R+細胞、0.7%未満のT C R+細胞、0.6%未満のT C R+細胞、0.5%未満のT C R+細胞、0.4%未満のT C R+細胞、0.3%未満のT C R+細胞、0.2%未満のT C R+細胞、又は0.1%未満のT C R+細胞を含む。かかる集団は、開示された方法の産生物であり得る。

30

【0123】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、0.1%未満のT C R+細胞を含む。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、0.09%未満のT C R+細胞、0.08%未満のT C R+細胞、0.07%未満のT C R+細胞、0.06%未満のT C R+細胞、0.05%未満のT C R+細胞、0.04%未満T C R+細胞、0.03%未満のT C R+細胞、0.02%未満のT C R+細胞、0.01%未満のT C R+細胞を含む。かかる集団は、開示された方法の産生物であり得る。

40

【0124】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、約0.01~0.001%のT C R+細胞を含む。かかる集団は、開示された方法の産生物であり得る。

【0125】

本開示はまた、本明細書に記載のC A Rのいずれかを含む操作された免疫細胞を提供し

50

、併せて、1つ以上の内因性遺伝子の発現の低減又は排除を特徴とすることができる。いくつかの実施形態では、CARは、プラスミドベクターを介して導入遺伝子として免疫細胞中に導入することができる。いくつかの実施形態では、プラスミドベクターはまた、例えば、ベクターを受けた細胞の同定及び／又は選択を可能にする選択マーカーを含むことができる。

【0126】

T CRで操作された免疫細胞の製造及びT CRで操作された免疫細胞の集団（CAR T細胞を含む）

本明細書では、免疫細胞の集団（CAR+細胞などの操作された免疫細胞を含む）から内因性T CRを発現する細胞を枯渇させる方法が提供される。本明細書に記載されるように、細胞集団を抗T CR抗体及び抗CD3抗体で標識し、抗T CRで標識された細胞及び抗CD3で標識された細胞を非標識細胞から分離し、非標識細胞を収集することにより、内因性T CRを発現する細胞が枯渇している細胞集団の取得が促される。様々な実施形態において、分離は、一般に、磁気ビーズ、音波粒子、膜（これらはすべて、標識された細胞によって認識される部分に結合され得る）、FACS、及び他の既知の分離方法を使用して達成し得る。この方法を使用して産生された細胞もまた、本開示の一態様を形成する。

【0127】

本明細書では、免疫細胞の集団（CAR+細胞などの操作された免疫細胞を含む）から内因性T CRを発現する細胞を枯渇させる方法が提供される。本明細書に記載されるように、細胞集団を抗T CR抗体及び抗CD52抗体で標識し、抗T CR及び抗CD52で標識された細胞を非標識細胞から分離し、非標識細胞を収集することにより、内因性T CRを発現する細胞が枯渇している細胞集団の取得が促される。様々な実施形態において、分離は、一般に、磁気ビーズ、音波粒子、膜（これらはすべて、標識された細胞によって認識される部分に結合され得る）、FACS、及び他の既知の分離方法を使用して達成し得る。この方法を使用して産生された細胞もまた、本開示の一態様を形成する。

【0128】

本明細書では、免疫細胞の集団（CAR+細胞などの操作された免疫細胞を含む）から内因性T CRを発現する細胞を枯渇させる方法も提供される。本明細書に記載されるように、細胞の集団を抗T CR抗体及び抗CD3抗体及び抗CD52抗体で標識し、抗T CR、抗CD3で標識された細胞及び抗CD52で標識された細胞を非標識細胞から分離し、非標識細胞を収集することにより、内因性T CRを発現する細胞が枯渇した細胞集団の取得が促される。様々な実施形態において、分離は、一般に、磁気ビーズ、音波粒子、膜（これらはすべて、標識された細胞によって認識される部分に結合され得る）、FACS、及び他の既知の分離方法を使用して達成し得る。この方法を使用して産生された細胞もまた、本開示の一態様を形成する。

【0129】

本明細書に記載の操作された免疫細胞のインビトロ操作又は遺伝子改変に先立って、細胞は対象から得ることができる。CARを発現する細胞の集団は、本明細書に記載されるように、同種異系プロセス又は自家プロセスに由来し得、本明細書に記載されるように、内因性T CRを枯渇させることができる。

単離された免疫細胞の遺伝子改変

【0130】

本明細書に記載されるように、T細胞などの免疫細胞は、本明細書に提供される方法を実行する前に、既知の方法を使用して遺伝子改変を行うことができ、あるいは、遺伝子改変を行う前に、当該免疫細胞をインビトロで活性化及び増殖する（若しくは、iPSCや前駆細胞の場合は分化する）ことができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、内因性のT CR（TRAC）、MHC1（β2M）、MHC2、PD1、及び／又はCD52の発現を低減又は排除するように遺伝子改変される。いくつかの実施形態では、2つ以上の内因性タンパク質の発現を低減又は排除することができる。例えば、TRAC及びCD52の発現を低減又は排除することができる。別の例では、TRAC及び形質導入された

CARによって標的とされるタンパク質の発現を低減又は排除することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、遺伝子編集技術（例えば、CRISPR/Cas9、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEN（登録商標）、MegaTALE、メガヌクレアーゼ）を使用して、1つ以上の内因性タンパク質（例えば、TCR α 、MHC1、MHC2、PD1、CD52）の発現を低減又は排除するように遺伝子改変される。別の実施形態では、T細胞などの免疫細胞は、本明細書に記載のキメラ抗原受容体で遺伝子改変され（例えば、CARをコードする1つ以上のヌクレオチド配列を含むウイルスベクターで形質導入されるか、又は非ウイルス手段を使用することによって）、その後、インビトロで活性化及び／又は増殖される。

【0131】

本開示の構築物及び操作された免疫細胞を作製するための特定の方法は、国際公開第2015/120096号（PCT/US15/14520）に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0132】

一実施形態では、本開示は、CARを発現する遺伝子操作された細胞を保存する方法を提供する。これには、解凍時に細胞が生存し続けるように免疫細胞を凍結保存することが含まれる。CARを発現する免疫細胞の一部は、悪性腫瘍に苦しむ患者の将来の治療のためにかかる細胞の恒久的な供給源を提供するべく、当技術分野で知られている方法によって凍結保存することができる。必要に応じて、凍結保存された形質転換免疫細胞を解凍し、増殖させ、さらに多くのそのような細胞のために増殖させることができる。実施例及び図面によって示されるように、本明細書で提供される枯渇法を使用して産生された細胞の集団は、凍結保存され、後に治療用途のために解凍され得る。

【0133】

同種異系CAR T細胞

同種異系CAR T療法を創出するプロセス、又はAlloCARs（商標）は、健康なドナーから、健康で、選定され、スクリーニングされ、テストされたT細胞を採取することを含む。次に、T細胞は、血液腫瘍又は固形腫瘍で発現する特定の細胞表面タンパク質（例えば、EGFRvIII、WT-1、CD20、CD23、CD30、CD38、CD33、CD133、MHC-WT1、TSPAN10、MHC-PRAME、Liv1、ADAM10、CHRNA2、LeY、NKGD2D、CS1、CD44v6、RO R1、Claudin-18.2、Muc17、FAPアルファ、Ly6G6D、c6orf23、G6D、MEGT1、NG25、CD19、BCMA、FLT3、CD70、DLL3、CD52、又はCD34のような標的抗原）を認識するCARを発現するように操作される。同種異系T細胞は、移植片対宿主病（GVHD）のリスクを低減し、ドナーとは異なる患者に与えられる場合の同種異系拒絶反応（HVGD）を予防するために、TALEN（登録商標）、ジンクフィンガー、CRISPR、又はその他の遺伝子編集技術などの遺伝子編集ツールを使用して遺伝子編集される。

【0134】

GVHDを回避するために、内因性T細胞受容体遺伝子（例えば、TCR α 、TCR β ）の発現を低減又は排除することができる。宿主免疫細胞が移植細胞上のMHC1及びMHC2を外来抗原として認識するのを妨げてHVGDを回避するように、内因性のMHC1（ β 2M）、MHC2及び／又はPD1の発現を低減又は排除することもできる。CAR T産生物を抗CD52抗体治療に耐性にするために、内因性発現CD52（分化のクラスター52）遺伝子を低減又は排除することもできる。このように、抗CD52抗体治療のリンパ球枯渇を使用して、宿主の免疫系を抑制し、CAR Tの移植を維持して、完全な治療効果を得ることができる。本明細書に記載されるように、同種異系療法で使用するための操作された免疫細胞又はその集団は、少なくとも上記で例示された目的のために、複数のノックアウトを含むことができる。

【0135】

いくつかの実施形態では、CD279としても知られる、プログラム細胞死タンパク質

1 (PD1) をコードする遺伝子の内因性発現は、抗腫瘍効力を増強するために低減又は排除され得る。

【0136】

自家CAR T細胞

自己キメラ抗原受容体 (CAR) T細胞療法は、患者自身の細胞 (例えば、T細胞を含む白血球) を収集すること、及び、1つ以上の特定のがん細胞の細胞表面に発現する標的抗原を認識してがん細胞を死滅させるCARを発現するようにT細胞を遺伝子操作することを含む。次いで、操作された細胞は凍結保存され、その後に患者に投与される。

【0137】

医薬組成物及び治療

開示された方法を使用して調製された細胞の集団を含む医薬組成物は、がんを有する患者を治療するために有用であり得る。本明細書で提供される方法を使用して生成された集団の操作された細胞の所望の治療量は、一般に、少なくとも2つの細胞 (例えば、少なくとも1つのCD8+セントラルメモリーT細胞、若しくは少なくとも1つのCD4+ヘルパーT細胞サブセット、若しくはCD8+細胞及びCD4+細胞それぞれのうちの1つ) であり得、又は、より典型的には、 10^2 個より多い細胞であって、最大で 10^6 個、最大で 10^8 個若しくは 10^9 個の細胞であり、 10^{10} 個以上の細胞であり得る。細胞の数は、組成物の意図される所望の用途、及びそこに含まれる細胞のタイプに依存するであろう。所望の細胞の密度は、典型的には、 10^6 細胞/mlより大きく、一般に 10^7 細胞/mlより大きく、一般的には、 10^8 細胞/ml以上である。臨床的に適切な数の免疫細胞は、複数回の注入に割り当てることができ、それは、累積的に見て 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、若しくは 10^{12} 個の細胞に等しいか又はこれを超える。本開示の方法を使用して産生された細胞集団のいくつかの用途では、特に、注入されたすべての細胞がある特定の標的抗原にリダイレクトされるため、 10^6 個/kg (患者あたり $10^6 \sim 10^{11}$ 個) の範囲で、投与する細胞の数をより少なくすることができる。CAR治療は、この範囲内の投与量で複数回投与することができる。細胞は、治療を受けている患者に対して自家、同種異系、又は異種であり得る。

【0138】

本明細書に記載されるように、操作された免疫細胞の集団は、内因性TCRを発現する細胞を枯渇させることができる (例えば、細胞は、TCR+細胞であり、かつ/又は、残存レベルのTCR+細胞を含む)。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、1.0%未満のTCR+細胞、0.9%未満のTCR+細胞、0.8%未満のTCR+細胞、0.7%未満のTCR+細胞、0.6%未満のTCR+細胞、0.5%未満のTCR+細胞、0.4%未満のTCR+細胞、0.3%未満のTCR+細胞、0.2%未満のTCR+細胞、又は0.1%未満のTCR+細胞を含む。上記のレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0139】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、0.09%未満のTCR+細胞、0.08%未満のTCR+細胞、0.07%未満のTCR+細胞、0.06%未満のTCR+細胞、0.05%未満のTCR+細胞、0.04%未満TCR+細胞、0.03%未満のTCR+細胞、0.02%未満のTCR+細胞、0.01%未満のTCR+細胞を含む。上記のレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して達成することができる。

【0140】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、約0.01~0.001%のTCR+細胞を含む。上記のレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0141】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、検出不可能なレベルのTCR+細胞を含む。上記のレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される

10

20

30

40

50

方法を使用して得ることができる。

【0142】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、99%を超えるTCR-細胞、99.9%を超えるTCR-細胞、99.91%を超えるTCR-細胞、99.92%を超えるTCR-細胞、99.93%を超えるTCR-細胞、99.94%を超えるTCR-細胞、99.95%を超えるTCR-細胞、99.96%を超えるTCR-細胞、99.97%を超えるTCR-細胞、又は99.98%を超えるTCR-細胞を含む。上記のレベルのTCR-細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0143】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、約99.99~99.999%のTCR-細胞を含む。上記のこれらのレベルのTCR-細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0144】

本開示の方法を使用して産生されたTCR枯渇CAR発現細胞集団は、単独で、又は、IL-2若しくは他のサイトカイン若しくは他の細胞集団などの他の成分と組み合わせて投与することができる。本開示の医薬組成物は、本明細書に記載される操作されたT細胞などのCAR発現TCR-細胞集団を含むことができる。本開示の組成物は、好ましくは、注入又は静脈内投与用に製剤される。

治療法

【0145】

本開示は、患者の疾患（例えば、がん）を治療又は予防するための方法であって、それを必要とする患者に、内因性TCRを発現する細胞が枯渇している（例えば、細胞は、TCR-細胞であり、かつ／又は、残存レベルのTCR+細胞を含む）CARを含む操作された免疫細胞（例えば、患者からではなく、健康なドナーから得た細胞）の集団の有効量を投与することを含む方法を提供する。

【0146】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、1.0%未満のTCR+細胞、0.9%未満のTCR+細胞、0.8%未満のTCR+細胞、0.7%未満のTCR+細胞、0.6%未満のTCR+細胞、0.5%未満のTCR+細胞、0.4%未満のTCR+細胞、0.3%未満のTCR+細胞、0.2%未満のTCR+細胞、又は0.1%未満のTCR+細胞を含む。上記のレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0147】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、0.09%未満のTCR+細胞、0.08%未満のTCR+細胞、0.07%未満のTCR+細胞、0.06%未満のTCR+細胞、0.05%未満のTCR+細胞、0.04%未満のTCR+細胞、0.03%未満のTCR+細胞、0.02%未満のTCR+細胞、0.01%未満のTCR+細胞を含む。上記のレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0148】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、約0.01~0.001%のTCR+細胞を含む。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、検出不可能なレベルのTCR+細胞を含む。上記のこれらのレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0149】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、99%を超えるTCR-細胞、99.9%を超えるTCR-細胞、99.91%を超えるTCR-細胞、99.92%を超えるTCR-細胞、99.93%を超えるTCR-細胞、99.94%を超えるTCR-細胞、99.95%を超えるTCR-細胞、99.96%を超えるTCR-細胞、9

10

20

30

40

50

9.97%を超えるTCR-細胞、又は99.98%を超えるTCR-細胞を含む。上記のこれらのレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0150】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞の集団は、約99.99~99.999%のTCR-細胞を含む。上記のこれらのレベルのTCR+細胞を有する細胞集団は、本明細書に開示される方法を使用して得ることができる。

【0151】

本明細書では、がんを含む疾患又は障害を治療するための方法が提供される。これらの方法は、同種異系療法で治療されたときに患者がGVHDに直面する可能性を低減する。いくつかの実施形態では、本開示は、本開示の方法を使用して調製された、有効量のTCR枯渴操作免疫細胞の集団を、それを必要とする対象に投与することに関する。いくつかの実施形態では、T細胞媒介性免疫応答は、標的細胞又はがん抗原を発現する細胞に対して向けられる。いくつかの実施形態では、TCR枯渴操作免疫細胞の集団は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する細胞を含む。いくつかの実施形態では、標的細胞は、固形又は血液学的腫瘍細胞である。いくつかの態様では、本開示は、悪性腫瘍を治療又は予防するための方法を含み、前記方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載の方法を使用して調製された有効量のTCR枯渴操作免疫細胞の集団を投与することを含む。いくつかの態様では、本開示は、悪性腫瘍を治療又は予防するための方法を含み、前記方法は、それを必要とする対象に、本明細書に提供される方法を使用して調製された有効量のTCR枯渴操作免疫細胞の集団を投与することを含み、TCR枯渴免疫細胞の集団は、少なくとも1つのキメラ抗原受容体、及び／又は、本明細書に記載される単離された抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して調製されたTCR枯渴CAR含有免疫細胞の集団は、血液悪性腫瘍又は固形腫瘍を治療するために使用することができる。

【0152】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して調製されたTCR枯渴CAR含有免疫細胞の集団は、小細胞肺癌、黒色腫、低悪性度神経膠腫、神経膠芽細胞腫、甲状腺髄様がん、カルチノイド、膵臓内分散性神経内分泌腫瘍、膀胱と前立腺、精巣がん、及び神経内分泌機能を伴う肺腺がんを治療するために使用され得る。いくつかの実施形態では、TCR枯渴CAR含有免疫細胞(例えば、本開示の方法を使用して調製されたCAR-T細胞)の集団は、固形腫瘍がんを治療するために使用される。いくつかの実施形態では、TCR枯渴CAR含有免疫細胞(例えば、本開示の方法を使用して調製されたCAR-T細胞)の集団は、非ホジキンリンパ腫(NHL)、腎細胞がん(RCC)、急性リンパ性白血病(ALL)、多発性骨髄腫(MM)、又は急性骨髄性白血病(AML)を治療するために使用される。

【0153】

対象の腫瘍のサイズを縮小するための方法であって、本開示の方法を使用して調製されたTCR枯渴操作細胞の集団を対象に投与することを含み、当該細胞が腫瘍上の抗原に結合する抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体を含む、方法も提供される。

【0154】

いくつかの実施形態では、対象は、固形腫瘍、又はリンパ腫又は白血病(血液がん)などの血液悪性腫瘍を有する。いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して調製されたTCR枯渴操作細胞の集団は、腫瘍床に送達される。いくつかの実施形態では、がんは対象の骨髄に存在し、本開示の方法を使用して調製された細胞の集団がそこに送達される。いくつかの実施形態では、がんは患者の免疫細胞又は血液細胞に存在し、本開示の方法を使用して調製された細胞の集団がそこに送達される。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、自己免疫細胞(例えば、自己T細胞)である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、同種異系免疫細胞(例えば、同種異系T細胞)であり、そのために、開示された方法の使用が特に有益である。

【0155】

治療薬（例えば、本開示の方法を使用して生成されたTCR枯渴操作CAR T細胞の集団）の「治療有効量」、「有効用量」、「有効量」、又は「治療有効投与量」は、単独で又は他の治療薬と組み合わせて使用されたときに、対象を疾患の発症から保護する任意の量、又は、疾患症状の重症度の低下や疾患無症状期間の頻度及び期間の増加によって証明される疾患の退行、若しくは、病気の苦痛による機能障害又は身体障害の予防を促進する任意の量である。疾患の退縮を促進する治療薬の効果は、臨床試験中のヒト対象やヒトでの有効性を予測する動物モデルシステムなどにおいて当業者に知られている様々な方法を使用して評価することができ、又は、インビトロアッセイにおける薬剤の活性をアッセイすることによって評価することができる。

10

【0156】

組成物中のTCR枯渴操作細胞の望ましい治療量は、少なくとも2つの細胞（例えば、少なくとも1つのCD8+セントラルメモリーT細胞及び少なくとも1つのCD4+ヘルパーT細胞のサブセット、又は、少なくとも2つのCD4+細胞若しくは少なくとも2つのCD8+細胞）を含み、あるいは、 10^2 個より多い細胞であって、最大で 10^6 個、最大で 10^8 個若しくは 10^9 個の細胞であり、 10^{10} 個以上の細胞であり得る。細胞の数は、組成物の意図される所望の用途、及びそこに含まれる細胞のタイプに依存するであろう。本明細書で提供される方法は、CD4+細胞のみを含む、又はCD8+細胞のみを含む、又はCD4+細胞とCD8+細胞の両方を含むTCR枯渴操作免疫細胞の集団を産生するために使用することができることに留意されたい。望ましい細胞の密度は、典型的には、 10^6 細胞/mlより大きく、一般的には、 10^7 細胞/mlより大きく、一般的には、 10^8 細胞/ml以上である。臨床的に適切な数の免疫細胞は、複数回の注入に割り当てることができ、それは、累積的に見て 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、 10^{10} 個、 10^{11} 個、若しくは 10^{12} 個の細胞に等しいか又はこれを超える。本開示のいくつかの態様では、特に、注入されたすべての細胞がある特定の標的抗原にリダイレクトされるため、 10^6 個/kg（患者あたり $10^6 \sim 10^{11}$ 個）の範囲で、投与する細胞の数をより少なくすることができる。CAR治療は、これらの範囲内の投与量で複数回投与することができる。細胞は、治療を受けている患者に対して自家、同種異系、又は異種であり得る。

20

【0157】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して調製されたTCR枯渴CAR T細胞の治療有効量は、約 1×10^5 細胞/kg、約 2×10^5 細胞/kg、約 3×10^5 細胞/kg、約 4×10^5 細胞/kg、約 5×10^5 細胞/kg、約 6×10^5 細胞/kg、約 7×10^5 細胞/kg、約 8×10^5 細胞/kg、約 9×10^5 細胞/kg、 2×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg、約 6×10^6 細胞/kg、約 7×10^6 細胞/kg、約 8×10^6 細胞/kg、約 9×10^6 細胞/kg、約 1×10^7 細胞/kg、約 2×10^7 細胞/kg、約 3×10^7 細胞/kg、約 4×10^7 細胞/kg、約 5×10^7 細胞/kg、約 6×10^7 細胞/kg、約 7×10^7 細胞/kg、約 8×10^7 細胞/kg、又は約 9×10^7 細胞/kgである。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、CAR+/TCR-T細胞の目標用量は、 1×10^6 から 2×10^8 細胞/kgの範囲であり、例えば、 2×10^6 細胞/kgである。当然のことながら、この範囲の上下の用量が特定の対象に適切である場合があり、適切な用量レベルは必要に応じて医療提供者によって決定され得る。さらに、本開示に従って、細胞を複数回投与することができる。

40

【0159】

いくつかの実施形態では、患者への投与時に、本明細書に記載の抗原特異的CARのいずれか1つを細胞表面で発現する本開示の方法を使用して調製されたTCR枯渴操作免疫細胞の集団は、患者の内因性抗原発現細胞を、減少させ、死滅させ、又は溶解することができる。一実施形態では、抗原発現内因性細胞、又は、本明細書に記載の抗原特異的CA

50

Rのいずれか1つを発現する操作された免疫細胞によって抗原を発現する細胞株の細胞の減少又は溶解の割合は、少なくとも、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、若しくは約95%であるか、又はそれより大きい。一実施形態では、抗原発現内因性細胞、又は、抗原特異的CARを発現する操作された免疫細胞によって抗原を発現する細胞株の細胞の減少又は溶解の割合は、約5%から約95%、約10%から約95%、約10%から約90%、約10%から約80%、約10%から約70%、約10%から約60%、約10%から約50%、約10%から約40%、約20%から約90%、約20%から約80%、約20%から約70%、約20%から約60%、約20%から約50%、約25%から約75%、又は約25%から約60%である。一実施形態では、内因性抗原発現細胞は、内因性抗原発現骨髓細胞である。

10

【0160】

様々な追加の治療薬を、本明細書に記載の組成物と組み合わせて使用することができる。例えば、潜在的に有用な追加の治療薬としては、ニボルマブ（Opdivo（登録商標））、ペムブロリズマブ（Keytruda（登録商標））、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、及びアテゾリズマブなどのPD-1阻害剤を挙げられる。これらの化合物は、本明細書で提供される方法を使用して調製されたTCR枯渇操作免疫細胞の集団を投与する前、又はそれと同時に、又はその後に投与することができる。

【0161】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法を使用して調製されたTCR枯渇CAR発現免疫細胞の集団を含む組成物は、サイトカイン放出症候群（CRS）又は神経毒性を予防又は治療するように設計された治療レジメン（抗IL6抗体など）の前、又はそれと同時に、又はその後に投与することができる。

20

【0162】

特定の実施形態では、本明細書で提供される方法を使用して調製されたTCR枯渇CAR含有免疫細胞の集団の組成物は、サイトカインと組み合わせて対象に投与することができる。サイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインの中には、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；サイロキシン；インスリン；プロインスリン；リラキシン；プロレラキシン；卵巣刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）などの糖タンパク質ホルモン；肝細胞増殖因子（HGF）；線維芽細胞成長因子（FGF）；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；ミューラー管抑制物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF-ベータなどの神経成長因子（NGF）；血小板成長因子；TGF-アルファやTGF-ベータなどのトランスフォーミング成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-I及び因子-II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン-アルファ、ベータ、ガンマなどのインターフェロン；マクロファージCSF（M-CSF）などのコロニー刺激因子（CSF）；顆粒球マクロファージCSF（GM-CSF）；及び、顆粒球-CSF（G-CSF）；IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-21などのインターロイキン（IL）；TNF-アルファやTNF-ベータなどの腫瘍壊死因子；及び、LIF及びキットリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書で使用される場合、サイトカインという用語は、天然源又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な同等物を含む。

30

40

【0163】

キット及び製造物

本開示は、抗TCR抗体、抗CD3抗体、及び抗CD52抗体のうちの1つ以上を含むTCR枯渇試薬を含むキットを提供する。本キットは、本明細書で提供される枯渇方法で

50

使用することができる。

【0164】

一実施形態では、本明細書で提供されるキットは、抗TCR抗体及び抗CD3抗体を含む。本キットでは、抗TCR及び／又は抗CD3抗体の一方又は両方を、所望により、ビオチンに結合させることができる。特定の実施形態では、抗TCR抗体及び抗CD3抗体の両方がビオチンに結合される。

【0165】

一実施形態では、本明細書で提供されるキットは、抗TCR抗体及び抗CD52抗体を含む。本キットでは、抗TCR及び／又は抗CD52抗体の一方又は両方を、所望により、ビオチンに結合することができる。特定の実施形態では、抗TCR抗体及び抗CD52抗体の両方がビオチンに結合される。

10

【0166】

一実施形態では、本明細書で提供されるキットは、抗TCR抗体、抗CD3抗体、及び抗CD52抗体を含む。本キットでは、抗TCR及び／又は抗CD3及び／又は抗CD52抗体の1つ又はすべてを、所望により、ビオチンに結合することができる。特定の実施形態では、抗TCR抗体、抗CD3抗体、及び抗CD52抗体はすべてビオチンに結合している。

【0167】

別の態様では、本明細書で提供されるキットは、磁性ナノマトリックスマイクロビーズ、細胞サイズのビーズ、又は、膜、音波粒子若しくはビーズ、プラスチックプレート若しくはカラムなどの他の支持体に結合する抗ビオチン抗体をさらに含むことができる。抗ビオチン抗体は、結合形態で提供することができ、あるいは、任意選択で、磁性ナノマトリックスマイクロビーズ、細胞サイズのビーズ、若しくは他の支持体に付着させるのに役立つ材料とともに裸の抗体として提供することができる。

20

【0168】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるキットは、抗TCR抗体及び抗CD3抗体を含む。本キットでは、抗TCR及び／又は抗CD3抗体の一方又は両方を、所望により、磁性ビーズ、膜、音波粒子、プラスチックプレート又はカラムに直接結合させることができる。

【0169】

特定の実施形態では、本明細書で提供されるキットは、抗TCR抗体、抗CD3抗体、及び抗CD52抗体を含む。本キットでは、抗TCR及び／又は抗CD3及び／又は抗CD52抗体のうちの1つ又はすべてを、所望により、磁性ビーズ、膜、音波粒子、プラスチックプレート又はカラムに直接結合させることができる。

30

【0170】

抗ビオチン抗体の使用が本明細書に開示される方法の一実施形態を形成する一方で、ビオチン標識部分を捕捉する他の手段を使用することができることに留意されたい。例えば、ストレプトアビジン、アビジン及び他のビオチン結合部分は、開示された方法において抗ビオチン抗体の代わりに使用することができる。

【0171】

本開示はまた、本明細書に記載の治療用組成物及びキットのいずれかを含む製造物を提供する。製造物の品目の例としては、治療薬（例えば、本明細書に開示される方法を使用して調製された、CARをさらに含み得るTCR枯渇細胞の集団）を含む容器（例えば、密封バイアル）が挙げられる。

40

【実施例】

【0172】

以下の実施例に示されるように、開示された組み合わせ抗体のアプローチは、残存TCR+レベル(%)を、TCR抗体単独と比較して、0.1~1%から0.1~0.01%に予想外に減少させ（枯渇後1日目に測定した）、TCR+細胞枯渇効率の有意な改善をもたらした。これらの実施例は、TCR+細胞を枯渇させるための現在のアプローチに勝

50

る、開示された枯渇方法によって提供される顕著な利点を示す。これらの利点は、患者が G v H D を示す可能性が低くなるという形で、同種異系治療を受けている患者に利益をもたらし得る。

【0173】

実施例 1. 抗 T C R 抗体と抗 C D 3 抗体の組み合わせにより、T C R + 細胞の枯渇効率が向上する

C A R で操作された免疫細胞を使用して、内因性 T C R 遺伝子及び内因性 C D 5 2 遺伝子の発現を、T R A C 遺伝子及び C D 5 2 遺伝子に向けられた T A L E N (登録商標) のエレクトロポレーションによってノックアウトした。次に、T C R 及び C D 5 2 ノックアウト細胞を T C R 枯渇試薬に曝露した。表 1 に示すように、細胞を、ビオチンと単独に結合した又は抗 C D 3 抗体若しくは抗 C D 5 2 抗体と組み合わせて結合した一次抗 T C R 抗体と接触させた。

次いで、さらに、磁性マイクロビーズ (直径約 5 0 n m のナノ粒子) と結合した二次抗ビオチン抗体を、一次抗 T C R ビオチン部分を介して磁性マイクロビーズを残存 T C R + 細胞に結合させるために、一次抗体標識細胞に添加した。次に、C l i n i M A C S P r o d i g y (登録商標) 機器を使用して、標識した細胞を磁気カラムにアプライした。T C R + 細胞は磁気カラム内に保持される一方で、非標識 T C R - 細胞は産生物収集バッグに通抜けした。T C R + 細胞は、後にカラムから廃棄物バッグに放出した。T C R + 細胞枯渇効率を本開示で提供される様々な枯渇方法を使用して調査し、枯渇後の様々な日において、抗 T C R α 抗体、抗 T C R β 抗体及び／又は C D 3 抗体を使用して、T C R - 細胞集団画分に存在する残存 T C R + 細胞を観察した。図 1 は、異なる単位操作シナリオによる同種異系 C A R T 製造プロセスの概略図を示す。

【表 1】

表 1. 抗体条件の実験計画

条件	C 1	C 2	C 3	C 4	C 5	C 6	C 7	C 8
一次抗体 (抗 T C R、 抗 C D 3、 抗 C D 5 2 及び それらの組み 合わせ) と量	T C R 0. 2 u l / 細胞百万個	T C R + C D 3 (1) 0. 2 u l + 0. 2 u l / 細胞百万個	T C R + C D 3 (2) 0. 2 u l + 0. 2 u l / 細胞百万個	T C R + C D 3 (1) + C D 5 2 0. 2 u l + 0. 2 u l + 0. 2 u l + 0. 2 u l / 細胞百万個	T C R + C D 3 (2) + C D 5 2 0. 2 u l + 0. 2 u l + 0. 2 u l / 細胞百万個	T C R + C D 5 2 0. 2 u l + 0. 2 u l / 細胞百万個	3 x T C R 0. 6 u l / 細胞百万個	C D 5 2 0. 2 u l / 細胞百万個
二次 (抗ビオチン) 抗体の量	0. 4 u l / 細胞百万個	0. 8 u l / 細胞百万個	0. 8 u l / 細胞百万個	1. 2 u l / 細胞百万個	1. 2 u l / 細胞百万個	0. 8 u l / 細胞百万個	1. 2 u l / 細胞百万個	0. 4 u l / 細胞百万個

【表 2】

表 2. 抗体情報

抗体標的	起源	サブタイプ	クローン	結合	濃度
一次					
T C R α β G M P	マウス	I g G 2 b	N A	ビオチン	N A
C D 5 2 R D	組換えヒト I g G	I g G 1	R E A 1 6 4	ビオチン	N A
C D 3 (1) R D	マウス	I g G 2 a k	B W 2 6 4 / 5 6	ビオチン	N A
C D 3 (2) R D	組換えヒト I g G	I g G 1	R E A 6 1 3	ビオチン	N A
C D 3 (3) R D	マウス	I g G 2 a k	O K T 3	ビオチン	1 0 0 u g / m l
C D 3 (4) G M P	マウス	I g G 2 a k	O K T 3	N A	1 m g / m l
二次					
抗ビオチン G M P	マウス	N A	N A	磁性マイクロビーズ	N A

【0174】

図 2 A に示すように、様々な異なる枯渇方法を使用して枯渇した T C R - 産生物集団に存在する T C R + 細胞の割合は、実質的に 1 % 以下である。図 2 A は、枯渇後 2 日目に検出したときに、1 倍の低い T C R 抗体濃度を使用したコントロールの枯渇法に対して、抗 T C R 抗体と抗 C D 3 抗体を本枯渇法で併用した場合の T C R + 細胞頻度が予想外に 1 / 2 0 4 に減少したことを示しており、細胞を抗 T C R 抗体、抗 C D 3 抗体及び抗 C D 5 2 抗体で処理した場合にも、同等の減少が観察された。図 2 A はまた、抗 T C R 抗体及び抗

CD52抗体の使用、並びに、3倍濃度の抗TCR抗体の使用が、抗TCR抗体及び抗CD3抗体の組み合わせよりも効果が低かったことを示しており、3倍のTCR抗体治療は、1/6.2倍の減少を示し、抗TCR及び抗CD52抗体の組み合わせは、1/2.7倍の減少を示している。興味深いことに、図2Aは、抗CD52抗体及び抗TCR抗体を使用した枯渇が、抗TCR抗体を単独で使用的場合よりも効率的であることを示している。この結果は、本明細書に記載したように、CD52がTCR又はTCR複合体と生物学的関連性を持たないという事実からして驚くべきものであり、したがって、これら2つの抗体と一緒に使用する枯渇法が、TCR+細胞の枯渇において、単に抗TCR抗体を単独で使用するそれよりも効率的であったことは予想外であった。図2Aに示す結果は、また、予期せぬことに、抗TCR抗体の濃度を単に増加させても、抗CD3抗体と組み合わせ

10

【0175】

枯渇集団は、枯渇後9日目にも調査され、結果は図2Bに示されている。図2Bは、枯渇法で抗TCR及び抗CD3抗体を使用的場合、TCR+細胞頻度が1/8の減少を示しており、細胞を抗TCR抗体、抗CD3抗体及び抗CD52抗体で処置した場合にも、同等の減少が観察された。図2Bはまた、抗TCR抗体及び抗CD52抗体の使用、並びに、3倍濃度の抗TCR抗体の使用が、抗TCR及び抗CD3抗体の組み合わせよりも効果が低かったことを示しており、3倍のTCR抗体治療は、1/5倍の減少を示し、抗TCR抗体と抗CD52抗体の組み合わせは、1/2倍の減少を示している。これらの結果は、抗TCR抗体の濃度を単に増加させるだけでは、抗CD3抗体と組み合わせ

20

【0176】

図3AのFACSプロットは、抗TCR抗体と抗CD3抗体を使用中枯渇法を實施した場合のTCR+細胞の最小限の存在を、抗TCR抗体単独、又は抗CD3及び/若しくは抗CD52抗体との組み合わせ、又は濃度を増加した(3倍)抗TCR抗体と比較して、視覚化したものである。枯渇後0日目と1日目にデータを取得し、枯渇前の細胞サンプルと比較した。この結果はさらに、抗TCR抗体の濃度を単に増加させるだけでは、実験を行った日全体にわたって、抗CD3抗体と組み合わせ

30

【0177】

図3Bの数値棒グラフは、本枯渇法で抗TCR及び抗CD3抗体を使用的場合の枯渇後0日目と1日目において、1倍の低いTCR抗体濃度を使用するコントロールの枯渇法に対して、TCR+細胞頻度が1/151倍及び1/23~1/32倍に減少したことを示しており、細胞を抗TCR抗体、抗CD3抗体及び抗CD52抗体で処置した場合にも、1/70倍の同等の減少が観察された。現在のTCR枯渇操作は、単に標準的な1倍のTCR抗体濃度を使用しており、このことが開示された方法と異なる点であって、現在の最先端技術であると理解されていることに留意されたい。図3Bはまた、抗TCR抗体及び抗CD52抗体、並びに、3倍濃度の抗TCR抗体の使用が、1/19倍及び1/7倍の減少を示す抗TCR抗体及び抗CD3抗体と3倍のTCR抗体とを組み合わせ

40

【0178】

図4は、枯渇後0日目と1日目に収集したデータのFACSプロットであり、抗TCR抗体と抗CD3抗体の組み合わせが、抗TCR抗体を単独で高い濃度(3倍)又は低い濃度(1倍)で使用的場合、及び、抗CD52抗体と組み合わせ

50

た場合よりも、高レベルのTCR枯渇をもたらすことをさらに示している。枯渇後の残存TCR+細胞は、抗TCR若しくは抗CD3の単一染色、又は抗TCR/CD3の二重染色によって視覚化され、TCR+若しくはCD3+、又はCD3+/TCR+のいずれかで陽性に染色されると予想された。CD3+/TCR-で染色された細胞の小集団は、TCR $\gamma\delta$ T細胞が抗CD3抗体によって除去されることが期待されるので、枯渇したTCR-の細胞集団に存在する残存TCR $\gamma\delta$ T細胞を反映している。

【0179】

実施例2．枯渇後の培養

この実施例は、枯渇した免疫細胞の集団が、枯渇後の培養中に同じ低い残存TCR+レベルを保持したことを示している。枯渇後1日目に、枯渇した細胞を凍結し、その後、枯渇後の培養のために解凍した。TCR及びCD3の発現レベルを、凍結前及び解凍直後に検出した。図5A～5Eに示すように、TCR及びCD3のいずれの頻度においても凍結－解凍サイクルによる有意な差はなかった。図5Aは、抗TCR若しくは抗CD3の単一染色又は抗TCR/CD3二重染色を使用したFACSプロットによる凍結前及び解凍後のTCR+細胞、CD3+細胞、CD3+/TCR-細胞、及びCD3+/TCR+細胞の頻度を示しており、図5Bは、抗TCR抗体を使用した凍結前及び解凍後のTCR+細胞の頻度を数値で示しており、図5Cは、抗CD3抗体を使用した凍結前及び解凍後のCD3+細胞の頻度を数値で示しており、図5Dは、抗TCR/CD3抗体を使用した凍結前及び解凍後のCD3+/TCR-細胞の頻度を数値で示しており、図5Eは、抗TCR/CD3抗体を使用した凍結前及び解凍後のCD3+/TCR+細胞の頻度を数値で示している。

【0180】

枯渇したTCR-細胞の集団における残存TCR+細胞頻度が培養時間とともに増加するか否かを判断するために、枯渇した細胞を枯渇後10日間培養した。TCR及びCD3細胞の頻度は、培養プロセス全体を通して2～3日ごとに、抗TCR抗体の単一染色（図6）及び抗CD3抗体の単一染色（図7）、又は抗TCR/CD3抗体の二重染色（図8）を使用して検出した。具体的には、図6、図7、及び図8のFACSプロットは、すべての枯渇方法において、TCR+細胞頻度、CD3+細胞頻度、又はCD3+/TCR+細胞頻度の漸増傾向の後に、枯渇後の培養期間の約5～7日目でピークに達したにもかかわらず、抗TCR抗体、抗CD3抗体及び／又は抗CD52抗体の組み合わせを使用して枯渇した培養物は、低濃度又は高濃度の抗TCR抗体のみで処置した、又は抗CD52抗体と組み合わせる抗TCR抗体で処置した培養物よりも、TCR+細胞又はCD3+細胞の頻度を経時的に同じように低く維持した。

【0181】

続いて、図9A、図9B、図9C、及び図9Dの棒グラフは、枯渇後の培養期間におけるTCR+、CD3+、CD3+/TCR-、又はCD3+/TCR+の頻度を数値で示している。

【0182】

加えて、生存細胞密度（図10A）、生存率（図10B）、各継代での細胞直径（図10C）、及び総増殖倍率（図10D）を含む細胞増殖状態も、枯渇後の培養期間中にモニターした。全体として、同等の細胞増殖特性が、研究されたすべての除去方法で観察された。

【0183】

本明細書に開示される抗体の異なる組み合わせを使用するCD52枯渇の効率も調査した。具体的には、抗CD52抗体を単独で、又は他の抗体と組み合わせるCD52枯渇に使用し、TCR+細胞枯渇に使用した抗TCR及び／又は抗CD3抗体がCD52+細胞の除去に及ぼす影響も調べた。図11AのFACSプロットは、枯渇後0日目と1日目の枯渇後の残存CD52+細胞頻度を示している。図11Bの棒グラフは、残存CD52+細胞頻度を数値で示している。最後に、図12のFACSプロットは、枯渇後10日間の培養期間における残存CD52+細胞頻度を示している。

【0184】

要約すると、実施例2からのデータは、抗TCR抗体及び抗CD3抗体の両方を使用することにより、TCR+細胞枯渇効率が向上することを示した。抗TCR抗体に加えて抗CD3抗体を使用すると、抗TCR抗体を単独で使用する場合よりもより大規模にCD3+/TCR+細胞が除去された。この枯渇メカニズムは、TCR+細胞枯渇効率を改善し、治療的同種異系用途にとって重要な利点となる可能性がある。枯渇後の細胞は、枯渇後の培養期間のすべての条件で同様の増殖を示し、本枯渇方法が細胞の生存率及び増殖に影響を与えなかったことを示している。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕内因性TCRを発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団を産生する方法であって、

（a）免疫細胞の集団を抗TCR抗体と抗CD3抗体とで標識すること、及び、

（b）前記免疫細胞の集団から抗TCR抗体で標識された免疫細胞と抗CD3抗体で標識された免疫細胞とを分離すること、を含む方法。

〔2〕免疫細胞の集団から内因性TCRを発現する細胞を枯渇させる方法であって、

（a）前記免疫細胞の集団を抗TCR抗体と抗CD3抗体とで標識すること、

（b）抗TCR抗体で標識された免疫細胞と抗CD3抗体で標識された免疫細胞とを非標識の免疫細胞から分離すること、及び、

（c）前記非標識の免疫細胞を収集すること、を含み、

それによって、内因性TCRを発現する細胞が枯渇した免疫細胞の集団を取得する、方法。

〔3〕内因性TCRを発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団を産生する方法であって、

（c）前記免疫細胞の集団を抗TCR抗体と抗CD52抗体とで標識すること、及び、

（d）前記免疫細胞の集団から抗TCR抗体で標識された免疫細胞と抗CD52抗体で標識された免疫細胞とを分離すること、を含む方法。

〔4〕免疫細胞の集団から内因性TCRを発現する細胞を枯渇させる方法であって、

（d）前記免疫細胞の集団を抗TCR抗体と抗CD52抗体とで標識すること、

（e）抗TCR抗体で標識された免疫細胞と抗CD52抗体で標識された免疫細胞とを非標識の免疫細胞から分離すること、及び、

（f）前記非標識の免疫細胞を収集すること、を含み、

それによって、内因性TCRを発現する細胞が枯渇した免疫細胞の集団を取得する、方法。

〔5〕さらに、前記免疫細胞の集団を抗CD52抗体で標識すること、及び、前記免疫細胞の集団から抗CD52抗体で標識された免疫細胞を枯渇させること、を含む、前記〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

〔6〕さらに、前記免疫細胞の集団を抗CD52抗体で標識すること、及び、抗CD52抗体で標識された免疫細胞を非標識の免疫細胞から分離すること、を含む、前記〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

〔7〕前記抗TCR抗体、前記抗CD3抗体、及び／又は前記抗CD52抗体が、ビオチン結合体である、前記〔1〕～〔6〕のいずれか一項に記載の方法。

〔8〕前記標識された細胞を、ビオチンを特異的に認識する薬剤と接触させることをさらに含む、前記〔7〕に記載の方法。

〔9〕前記ビオチンを特異的に認識する薬剤が、抗ビオチン抗体、アビジン、及びストレプトアビジンからなる群から選択される、前記〔8〕に記載の方法。

〔10〕前記薬剤が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に結合している、前記〔8〕又は〔9〕に記載の方法。

〔11〕前記抗TCR抗体、前記抗CD3抗体、及び／又は前記抗CD52抗体が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレ

10

20

30

40

50

ート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に直接結合している、前記〔１〕～〔６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１２〕前記分離は、磁気分離又は音波分離のうちの１つを使用して達成される、前記〔１〕～〔１１〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１３〕前記免疫細胞が同種異系免疫細胞である、前記〔１〕～〔１２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１４〕前記免疫細胞が、内因性ＴＣＲの発現を低減又は排除するように遺伝子改変されている、前記〔１〕～〔１３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１５〕前記免疫細胞が、内因性ＣＤ５２の発現を低減又は排除するように遺伝子改変されている、前記〔１〕～〔１３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１６〕前記免疫細胞が、内因性ＴＣＲ及び内因性ＣＤ５２の両方の発現を低減又は排除するように遺伝子改変されている、前記〔１〕～〔１３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１７〕内因性ＴＣＲ又は内因性ＣＤ５２の発現、あるいは、内因性ＴＣＲ及び内因性ＣＤ５２の両方の発現の前記低減又は排除が、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ９、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＭｅｇａＴＡＬ、メガヌクレアーゼ、Ｃｐｆ １、相同組換え、又は一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド（ｓｓＯＤＮ）を使用して達成される、前記〔１４〕～〔１６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８〕前記免疫細胞が、キメラ抗原受容体を発現する操作された免疫細胞である、前記〔１〕～〔１７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１９〕前記内因性ＴＣＲを発現する細胞が枯渇した細胞の集団が、１．０％以下のＴＣＲ＋細胞、０．９％以下のＴＣＲ＋細胞、０．８％以下のＴＣＲ＋細胞、０．７％以下のＴＣＲ＋細胞、０．６％以下のＴＣＲ＋細胞、０．５％以下のＴＣＲ＋細胞、０．４％以下のＴＣＲ＋細胞、０．３％以下のＴＣＲ＋細胞、０．２％以下のＴＣＲ＋細胞、又は０．１％以下のＴＣＲ＋細胞を含む、前記〔１〕～〔１８〕のいずれか一項に記載の方法。

〔２０〕前記内因性ＴＣＲを発現する細胞が枯渇した細胞の集団が、枯渇直後に０．０１～０．００１％のＴＣＲ＋細胞を含む、前記〔１〕～〔１９〕のいずれか一項に記載の方法。

〔２１〕前記内因性ＴＣＲを発現する細胞が枯渇した細胞の集団が、枯渇後の培養の１～１０日後に０．１～０．０１％のＴＣＲ＋細胞を含む、前記〔１〕～〔１９〕のいずれか一項に記載の方法。

〔２２〕前記内因性ＴＣＲを発現する細胞が枯渇した細胞の集団が、枯渇後１日培養した後、０．１～１．０％未満のＴＣＲ＋細胞を含む、前記〔２１〕に記載の方法。

〔２３〕前記内因性ＴＣＲを発現する細胞が枯渇した細胞の集団が、枯渇後の培養の１０日後に０．１～１．０％未満のＴＣＲ＋細胞を含む、前記〔２１〕に記載の方法。

〔２４〕前記免疫細胞がＴ細胞である、前記〔１〕～〔２３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔２５〕前記〔１〕～〔２４〕のいずれか一項に記載の方法によって産生された、内因性ＴＣＲを発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団。

〔２６〕少なくとも９９％のＴＣＲ－細胞を含む、操作されたＴ細胞の集団。

〔２７〕少なくとも９９．９％のＴＣＲ－細胞を含む、操作されたＴ細胞の集団。

〔２８〕少なくとも９９．９９％のＴＣＲ－細胞を含む、操作されたＴ細胞の集団。

〔２９〕少なくとも９９．９９９％のＴＣＲ－細胞を含む、操作されたＴ細胞の集団。

〔３０〕前記Ｔ細胞の集団がキメラ抗原受容体を発現する、前記〔２６〕～〔２９〕のいずれか一項に記載の操作されたＴ細胞の集団。

〔３１〕抗ＴＣＲ抗体及び抗ＣＤ３抗体を含む免疫細胞の集団から内因性ＴＣＲを発現する細胞を枯渇させるためのキット。

〔３２〕抗ＣＤ５２抗体をさらに含む、前記〔３１〕に記載のキット。

〔３３〕抗ＴＣＲ抗体及び抗ＣＤ５２抗体を含む免疫細胞の集団から内因性ＴＣＲを発現する細胞を枯渇させるためのキット。

〔３４〕前記抗ＴＣＲ抗体、前記抗ＣＤ３抗体、及び／又は前記抗ＣＤ５２抗体が、バイオ

10

20

30

40

50

チンを特異的に認識する薬剤に結合されている、前記〔31〕～〔33〕のいずれか一項に記載のキット。

〔35〕前記ビオチンを特異的に認識する薬剤が、抗ビオチン抗体、ストレプトアビジン、及びアビジンからなる群から選択される、前記〔34〕に記載のキット。

〔36〕前記薬剤が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜に結合されている、前記〔34〕又は〔35〕に記載のキット。

〔37〕前記抗TCR抗体、前記抗CD3抗体、及び／又は前記抗CD52抗体が支持体に直接結合している、前記〔31〕～〔35〕のいずれか一項に記載のキット。

〔38〕前記支持体が、磁気ビーズ、アガロースビーズ、音波粒子、プラスチックウェルプレート、ガラスウェルプレート、セラミックウェルプレート、カラム、細胞培養バッグ、又は膜のうちの1つである、前記〔37〕に記載のキット。

〔39〕固形がん又は血液がんの治療を必要とする対象の固形がん又は血液がんを治療する方法であって、前記〔19〕～〔23〕のいずれか一項に記載の内因性TCRを発現する免疫細胞が枯渇した免疫細胞の集団、又は前記〔26〕～〔30〕のいずれか一項に記載の操作されたT細胞の集団の治療量を、前記対象に投与することを含む、方法。

【図面】

【図1-1】

【図1-2】

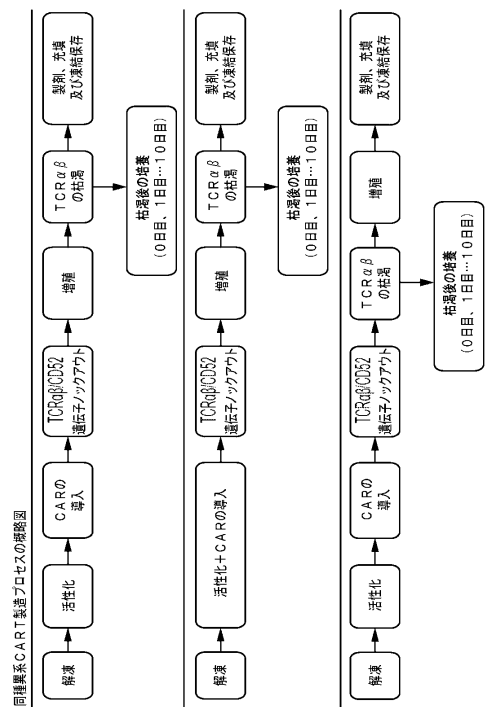


図1

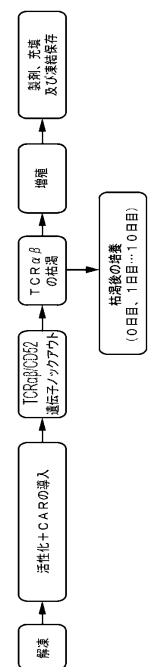


図1 続き

10

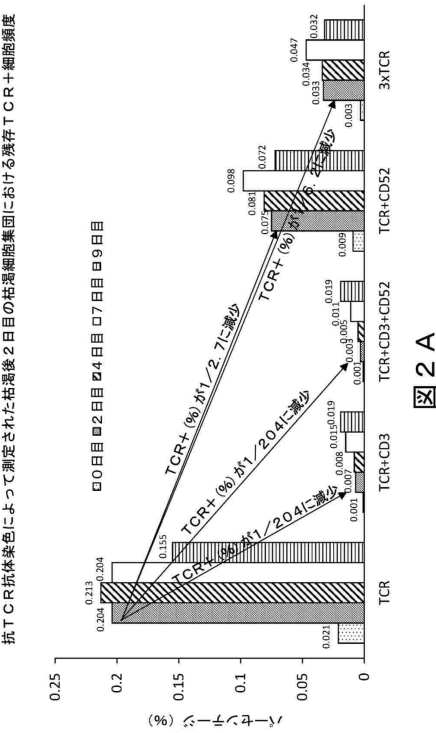
20

30

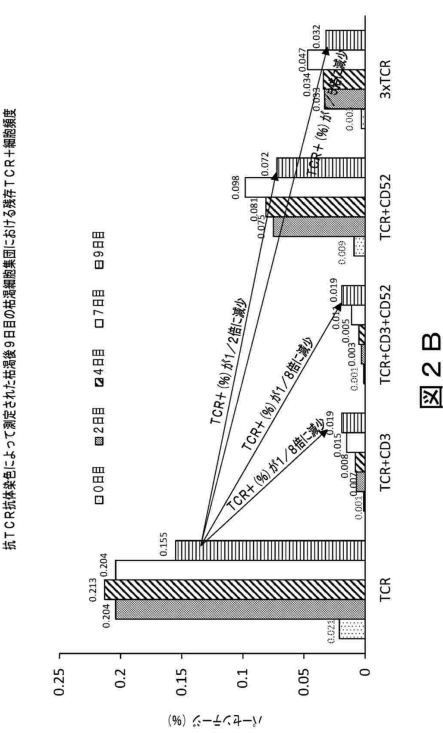
40

50

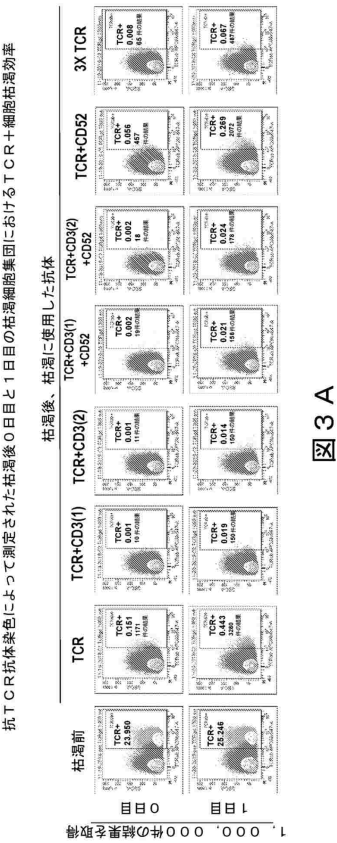
【図 2 A】



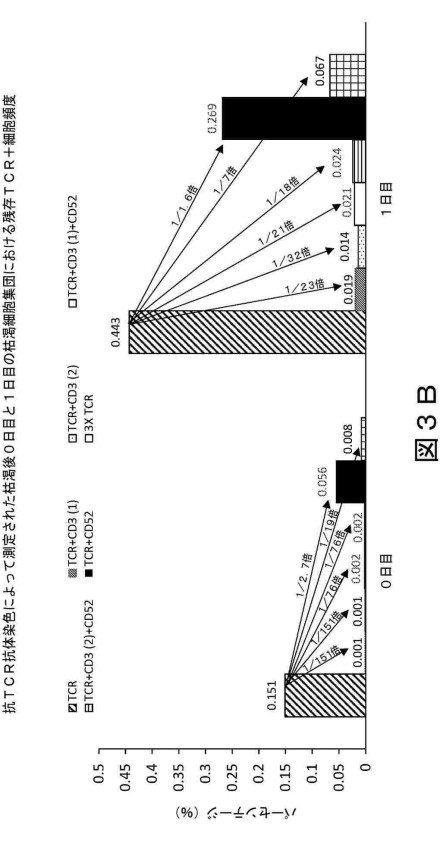
【図 2 B】



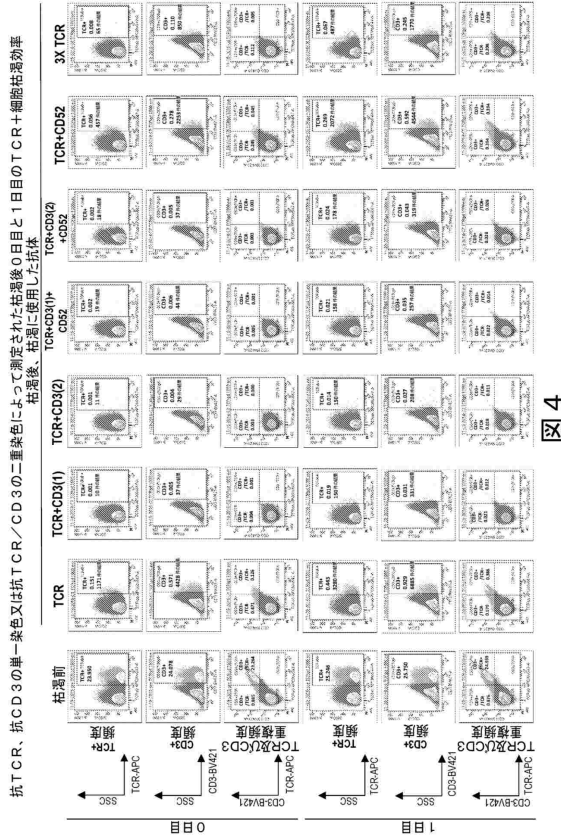
【図 3 A】



【図 3 B】



【図 4】



【図 5 A - 1】

抗 TCR、抗 CD3 単一染色又は抗 TCR/CD3 二重染色によって測定された凍結前後の枯渇後 1 日目の枯渇細胞集団における TCR+細胞枯渇効率
枯渇後、枯渇に使用した抗体

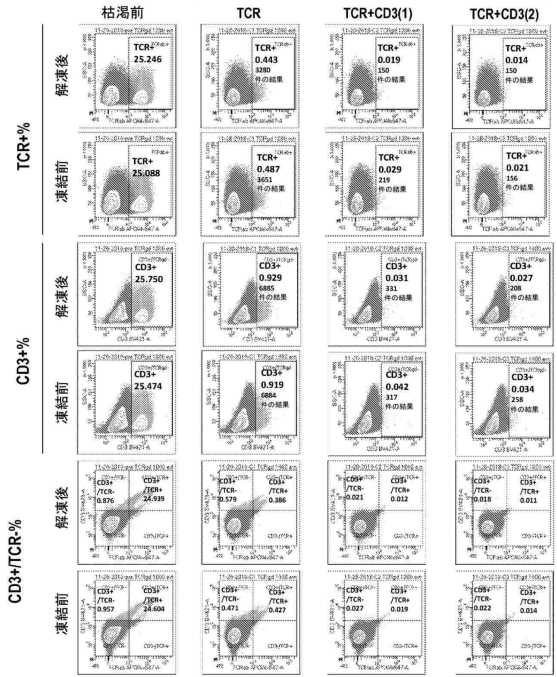


図 5 A

【図 5 A - 2】

抗 TCR、抗 CD3 単一染色又は抗 TCR/CD3 二重染色によって測定された凍結前後の枯渇後 1 日目の枯渇細胞集団における TCR+細胞枯渇効率
枯渇後、枯渇に使用した抗体

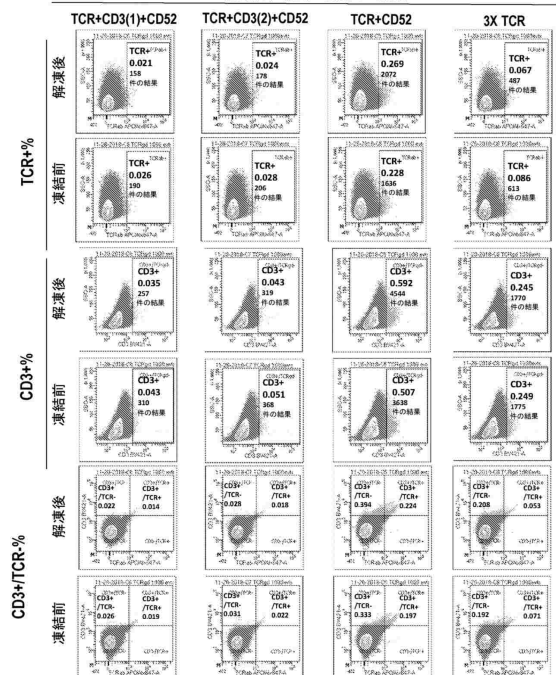


図 5 A 続き

【図 5 B】

凍結前後の枯渇後 1 日目の枯渇細胞集団における TCR+細胞枯渇効率

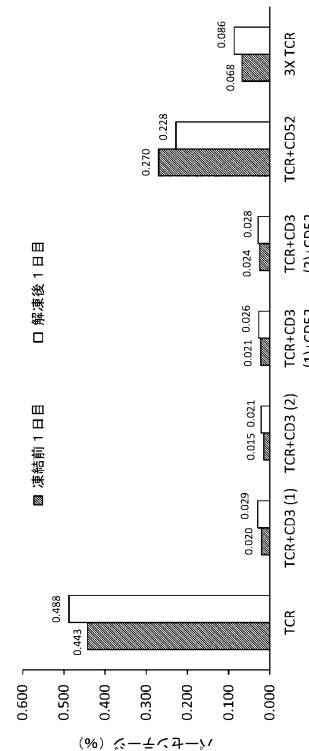


図 5 B

10

20

30

40

50

【図 5 C】

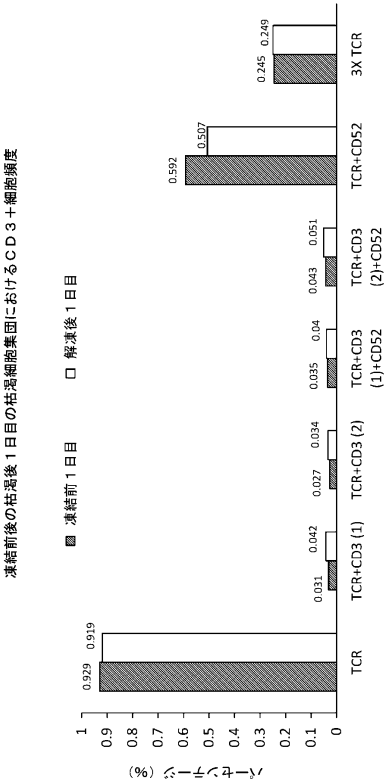


図 5 C

【図 5 D】

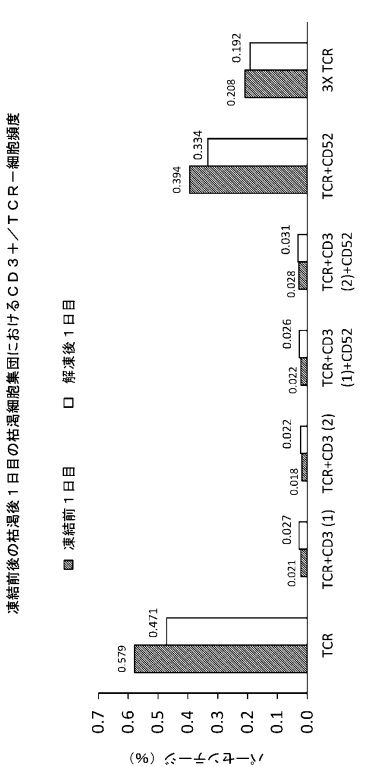


図 5 D

【図 5 E】

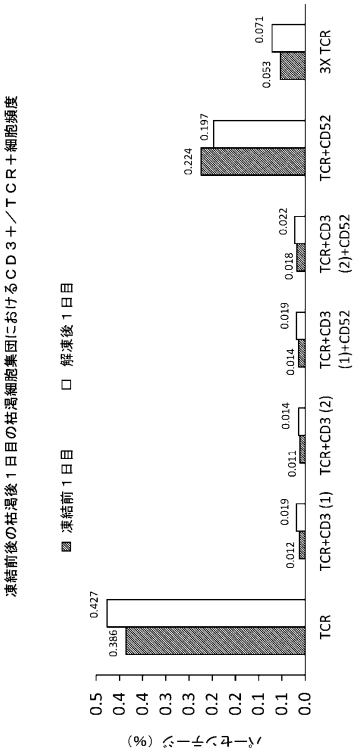


図 5 E

【図 6】

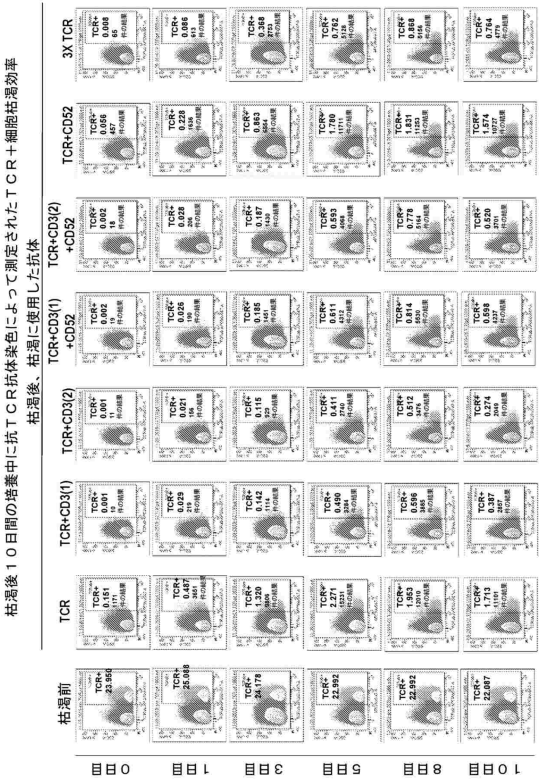


図 6

【図 7】

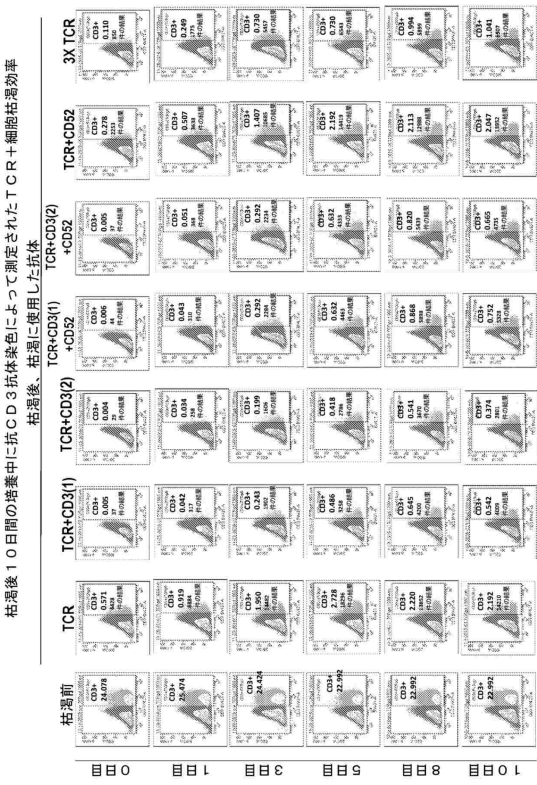


図 7

【図 8】

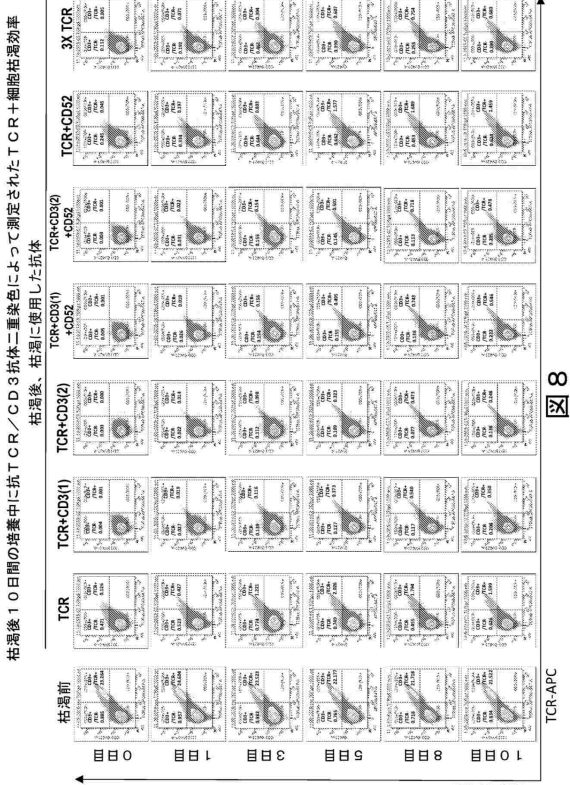


図 8

【図 9 A】

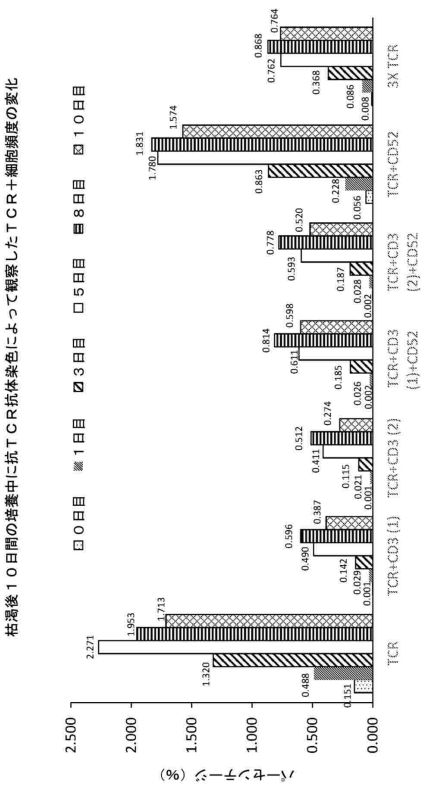


図 9 A

【図 9 B】

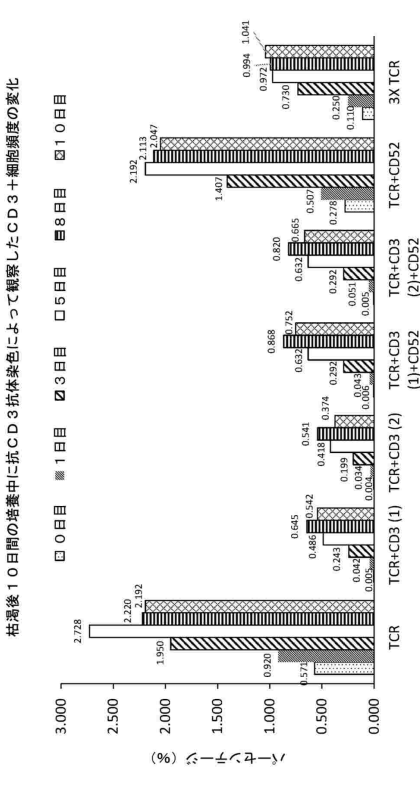
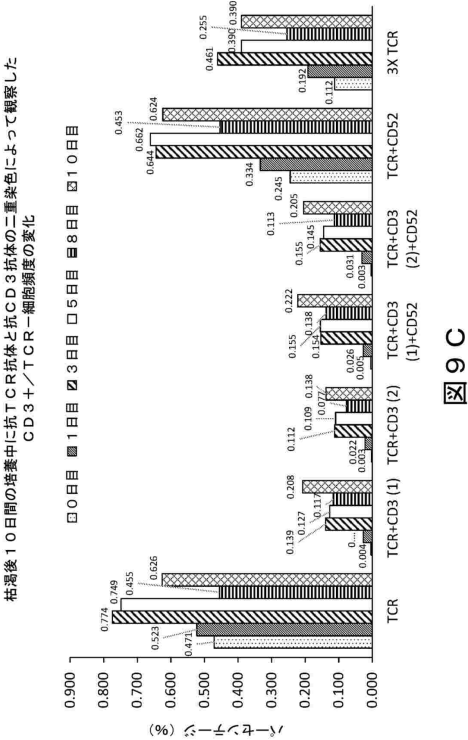
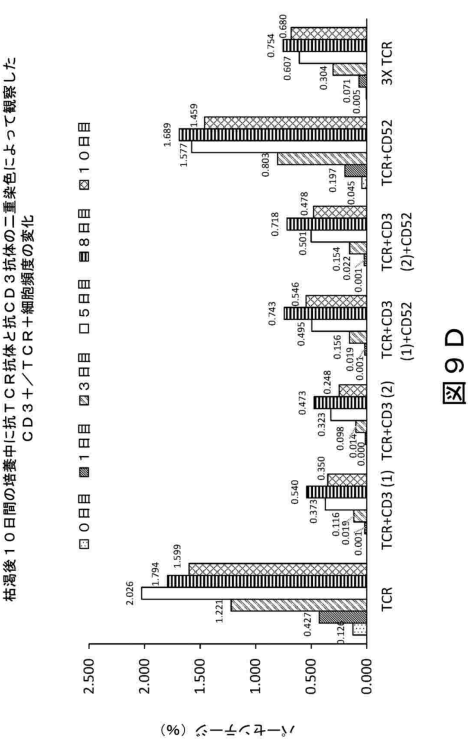


図 9 B

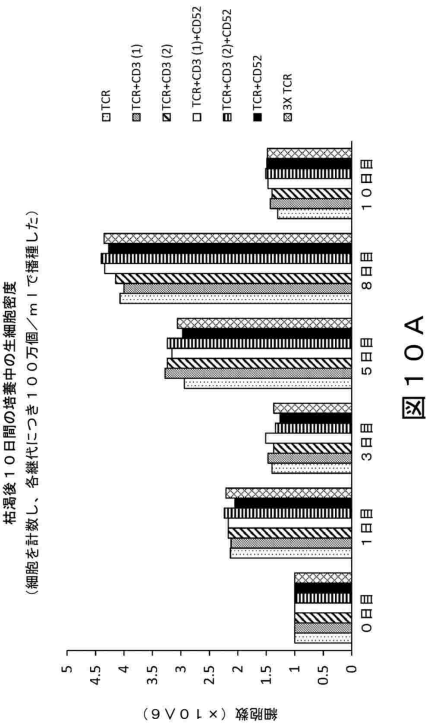
【図 9 C】



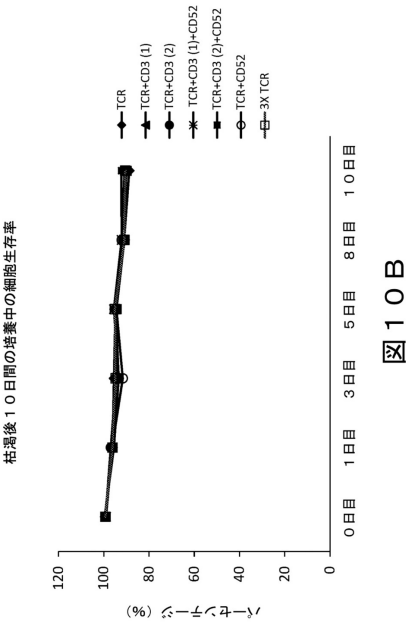
【図 9 D】



【図 10 A】



【図 10 B】



【図 10 C】

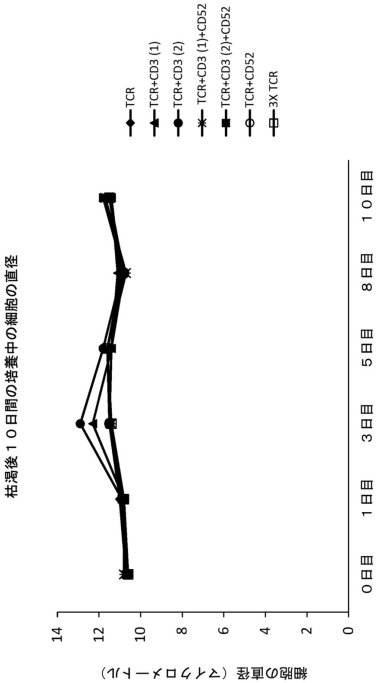


図 10 C

【図 10 D】

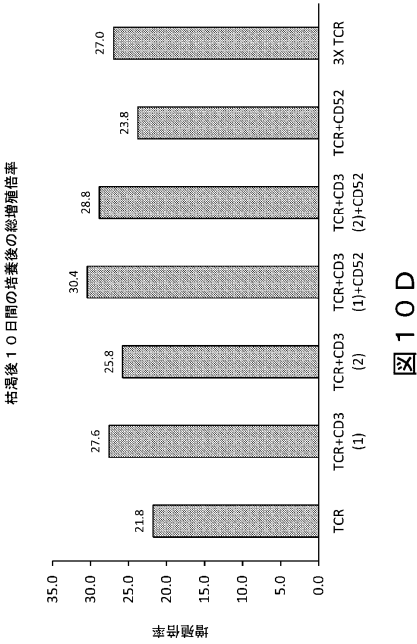


図 10 D

【図 11 A】

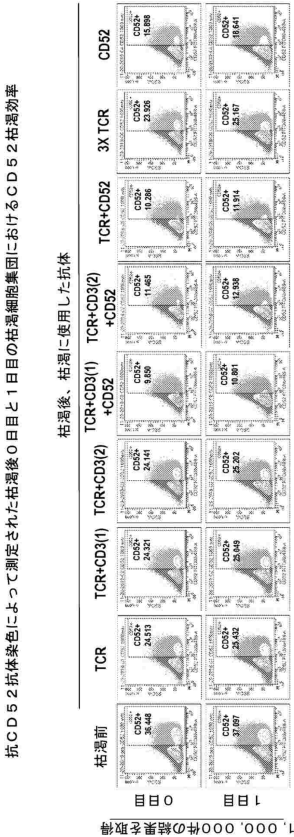


図 11 A

【図 11 B】

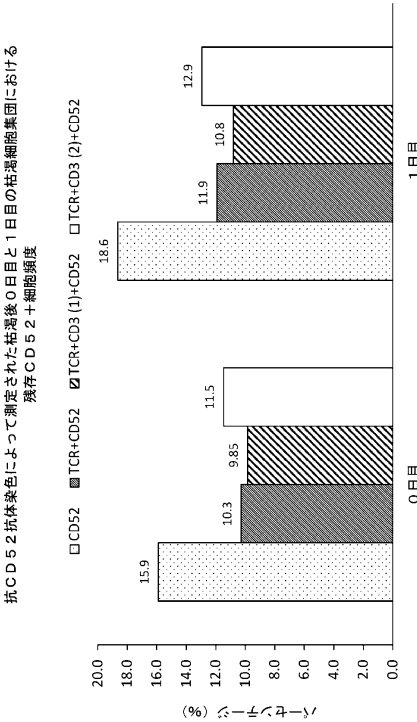
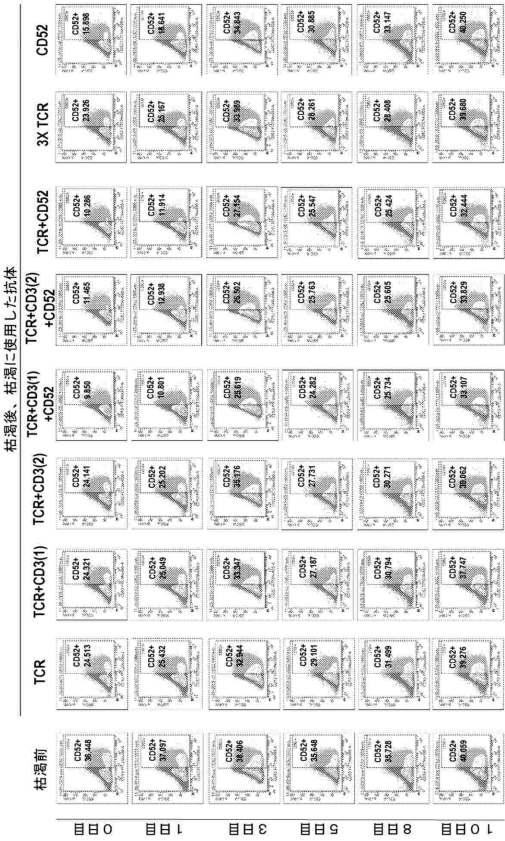


図 11 B

【図 1 2】

枯渇後 10 日間の培養中に抗 CD52 抗体染色によって測定された枯渇細胞集団における CD52 枯渇効率



フロントページの続き

- 弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
(74)代理人 100215670
弁理士 山崎 直毅
(72)発明者 ニ ヤジン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
ベニュー 210 アロジーン セラピューティクス インコーポレイテッド内
(72)発明者 ニン ホンシュウ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
ベニュー 210 アロジーン セラピューティクス インコーポレイテッド内
(72)発明者 リー ジャネット エム
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
ベニュー 210 アロジーン セラピューティクス インコーポレイテッド内
(72)発明者 レオナルド マーク ダブリュ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
ベニュー 210 アロジーン セラピューティクス インコーポレイテッド内
審査官 戸来 幸男
(56)参考文献 特表2017-535261 (JP, A)
特表2015-523064 (JP, A)
国際公開第2013/074916 (WO, A1)
Blood, 2015年, vol.126, no.23, pp.2046(1-3)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 5/00-5/28
C12N 15/00-15/90
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)
Google