

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-512948

(P2022-512948A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 B 0 6 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	Z N A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全51頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-524392(P2021-524392)  
 (86)(22)出願日 令和1年11月8日(2019.11.8)  
 (85)翻訳文提出日 令和3年6月14日(2021.6.14)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2019/060477  
 (87)国際公開番号 WO2020/097466  
 (87)国際公開日 令和2年5月14日(2020.5.14)  
 (31)優先権主張番号 62/757,467  
 (32)優先日 平成30年11月8日(2018.11.8)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/867,499  
 (32)優先日 令和1年6月27日(2019.6.27)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/821,031

最終頁に続く

(71)出願人 518329653  
 ネクシミュン インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド  
 ゲイザースパーク ゲイザー ロード  
 9 1 1 9 スイート エー  
 (74)代理人 110000796  
 特許業務法人三枝国際特許事務所  
 (72)発明者 エールケ マティアス  
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド  
 ゲイザースパーク ゲイザー ロード  
 9 1 1 9 シー/オー ネクシミュン  
 インコーポレイテッド  
 (72)発明者 ジョーンズ クリスティ  
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド  
 ゲイザースパーク ゲイザー ロード

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 表現型特性が向上した T 細胞組成物

(57)【要約】

本発明は、いくつかの実施形態において養子免疫療法に好適な単離された細胞組成物、及び細胞組成物を製造する方法、ならびに細胞組成物を用いる治療方法を提供する。組成物は、薬学的に許容される担体中に、標的ペプチド抗原に特異的な少なくとも約  $10^6$  個の CD8 + T 細胞を含み、Tメモリ幹(TSCM)細胞を含む。種々の実施形態において、組成物は、約1%~約100%がTメモリ幹細胞であり、頑強で耐久性のある養子療法を提供すると共に、T細胞操作の進歩を提供する。

【選択図】図1

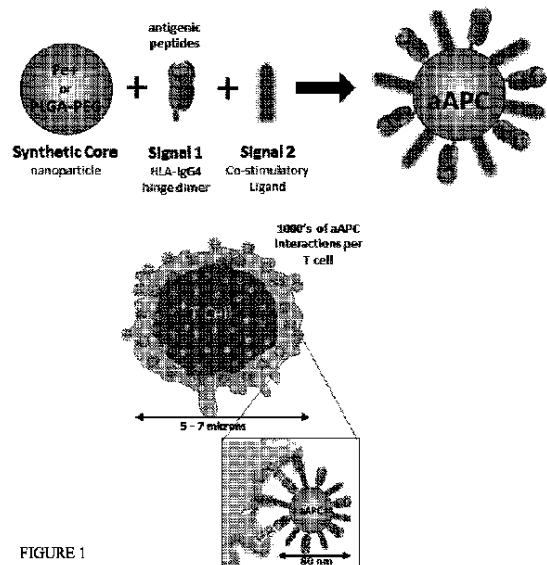


FIGURE 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

養子免疫療法に好適な単離された細胞組成物であって、前記組成物が、薬学的に許容される担体中に、1つ以上の標的ペプチド抗原に特異的な少なくとも $10^6$ 個のCD8+T細胞を含み、Tメモリ幹(TSCM)細胞を含む、前記単離された細胞組成物。

## 【請求項 2】

前記CD8+T細胞が、1~100個の標的ペプチド抗原に特異的である、請求項1に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 3】

前記組成物中の標的ペプチド抗原に対するT細胞特異性は、MHC多量体染色によって定義される、請求項1に記載の単離された細胞組成物。 10

## 【請求項 4】

前記標的ペプチド抗原が、腫瘍関連抗原である、請求項1に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 5】

1つ以上の標的ペプチド抗原が、腫瘍由来ネオ抗原または腫瘍特異的ネオ抗原である、請求項4に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 6】

1つ以上の標的ペプチド抗原が、細菌、ウイルス、真菌、または寄生虫抗原である、請求項1に記載の単離された細胞組成物。 20

## 【請求項 7】

少なくとも5個の標的ペプチド抗原に特異的なCD8+T細胞を含む、請求項1~6のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 8】

前記標的ペプチド抗原のうちの少なくとも1つが、低頻度前駆T細胞によって認識される、請求項7に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 9】

前記細胞組成物は、少なくとも90%がT細胞である、請求項1~8のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 10】

前記CD8+T細胞の少なくとも5%が、標的ペプチド抗原に特異的である、請求項9に記載の単離された細胞組成物。 30

## 【請求項 11】

前記CD8+T細胞の少なくとも10%が、標的ペプチド抗原に特異的である、請求項10に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 12】

前記CD8+T細胞の少なくとも15%が、標的ペプチド抗原に特異的である、請求項11に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 13】

前記CD8+T細胞の少なくとも30%が、標的ペプチド抗原に特異的である、請求項12に記載の単離された細胞組成物。 40

## 【請求項 14】

前記CD8+T細胞の少なくとも50%が、標的ペプチド抗原に特異的である、請求項13に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 15】

前記細胞組成物が、細菌、ウイルス、及び/または真菌病原体に特異的なCD8+T細胞をさらに含む、請求項4または5のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 16】

細菌、ウイルス、及び/または真菌病原体に特異的な前記CD8+T細胞が、インフルエンザ、CMV、EBV、及び/またはアデノウイルスの抗原に特異的なT細胞を含む、請 50

求項 15 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 17】

前記 CD8 + T 細胞は、約 1% ~ 約 100% が T メモリ幹細胞である、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 18】

前記 CD8 + T 細胞は、約 1% ~ 約 50% が T メモリ幹細胞である、請求項 17 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 19】

前記 CD8 + T 細胞は、約 5% ~ 約 25% が T メモリ幹細胞である、請求項 18 に記載の単離された細胞組成物。

10

【請求項 20】

前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 5% が T メモリ幹細胞である、請求項 18 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 21】

前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 20% が T メモリ幹細胞である、請求項 18 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 22】

前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 25% が T メモリ幹細胞である、請求項 18 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 23】

前記 1 つ以上の標的抗原に特異的な前記 T 細胞は、少なくとも 15% が T メモリ幹細胞である、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

20

【請求項 24】

前記 CD8 + T 細胞の 95% より多くが、メモリ表現型を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 25】

前記 CD8 + T 細胞が、セントラルメモリ及びエフェクターメモリ T 細胞を含む、請求項 24 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 26】

前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 30% がセントラル及びエフェクターメモリ T 細胞である、請求項 25 に記載の単離された細胞組成物。

30

【請求項 27】

前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 50% がセントラル及びエフェクターメモリ T 細胞である、請求項 25 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 28】

前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 70% がセントラル及びエフェクターメモリ T 細胞である、請求項 25 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 29】

前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 80% がセントラル及びエフェクターメモリ T 細胞である、請求項 25 に記載の単離された細胞組成物。

40

【請求項 30】

前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 90% がセントラル及びエフェクターメモリ T 細胞である、請求項 25 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 31】

前記 1 つ以上の標的抗原に特異的な前記 CD8 + T 細胞は、少なくとも 50% がセントラル及びエフェクターメモリ T 細胞である、請求項 25 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 32】

前記 1 つ以上の標的抗原に特異的な前記 T 細胞は、少なくとも 80% がセントラル及びエフェクターメモリ T 細胞である、請求項 31 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 33】

50

前記 CD8 + T 細胞は、20%未満が最終分化している、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 34】

前記 T 細胞は、10%未満が最終分化している、請求項 33 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 35】

前記組成物が、30%未満のナイーブ T 細胞 (T<sub>N</sub>) を含む、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 36】

前記組成物が、15%未満のナイーブ細胞を含む、請求項 35 に記載の単離された細胞組成物。 10

【請求項 37】

前記組成物が、5%未満のナイーブ細胞を含む、請求項 35 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 38】

前記組成物が、1.5%未満のナイーブ細胞を含む、請求項 35 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 39】

前記 CD8 + T 細胞の少なくとも 10% が、活性化すると多機能表現型を示す、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。 20

【請求項 40】

前記 CD8 + T 細胞の少なくとも 20% が、活性化すると多機能表現型を示す、請求項 1 ~ 39 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 41】

前記 CD8 + T 細胞の少なくとも 40% が、活性化すると多機能表現型を示す、請求項 40 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 42】

前記細胞組成物は、10%未満が CD4 + T 細胞である、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 43】

前記細胞組成物は、5%未満が CD4 + T 細胞である、請求項 42 に記載の単離された細胞組成物。 30

【請求項 44】

前記細胞組成物は、2%未満が CD4 + T 細胞である、請求項 42 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 45】

前記細胞組成物は、1.5%未満が CD4 + T 細胞である、請求項 42 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 46】

前記細胞組成物は、1%未満が CD4 + T 細胞である、請求項 42 に記載の単離された細胞組成物。 40

【請求項 47】

前記組成物が、T 細胞をさらに含む、請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 48】

少なくとも約 2% の T 細胞を含む、請求項 47 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 49】

少なくとも約 5% の T 細胞を含む、請求項 47 に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 50】

少なくとも約 10% の T 細胞を含む、請求項 47 に記載の単離された細胞組成物。 50

## 【請求項 5 1】

少なくとも約 20% の T 細胞を含む、請求項 4 7 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 5 2】

少なくとも約 25% の T 細胞を含む、請求項 4 7 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 5 3】

前記 T 細胞が、V<sub>1</sub> 及び V<sub>2</sub> 細胞を含む、請求項 4 7 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 5 4】

前記組成物が、実質的に T メモリ幹細胞から構成され、前記細胞が、キメラ抗原受容体または組換え TCR を発現するように操作される、請求項 1 7 に記載の単離された細胞組成物。

10

## 【請求項 5 5】

前記組成物が、供給源細胞由来の標的ペプチド抗原に特異的な CD8 + T 細胞の濃縮、及び/または供給源細胞由来の標的ペプチド抗原に特異的な CD8 + T 細胞の増幅によって産生される、請求項 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 5 6】

供給源細胞が、患者または HLA 適合ドナー由来である、請求項 5 5 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 5 7】

ドナー細胞が、白血球分離によって単離される、請求項 5 6 に記載の単離された細胞組成物。

20

## 【請求項 5 8】

前記供給源細胞が、患者の腫瘍から単離される、請求項 5 5 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 5 9】

前記供給源細胞が、パフィーコート画分である、請求項 5 5 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 6 0】

細胞供給源が、濃縮前または増幅前に、CD4 + T 細胞が枯渇している、請求項 5 5 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

30

## 【請求項 6 1】

前記供給源細胞は、CD8 + が濃縮されている、請求項 5 5 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 6 2】

前記細胞供給源は、NK 細胞が枯渇している、請求項 5 5 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 6 3】

前記抗原特異的 T 細胞が、MHC クラス I リガンドと任意選択で共刺激リガンドを有する aAPC によって濃縮されている、請求項 5 5 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

40

## 【請求項 6 4】

前記 aAPC が、CD28 に結合するリガンドである共刺激リガンドを含む、請求項 6 3 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 6 5】

前記共刺激リガンドが、CD28 のアゴニストであるモノクローナル抗体、またはその一部である、請求項 6 4 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 6 6】

前記濃縮が、常磁性 aAPC を用いた磁気濃縮であり、前記細胞及び aAPC が、任意選択で、磁場存在下で少なくとも 1 分間インキュベートされる、請求項 1 ~ 6 5 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

50

## 【請求項 67】

前記細胞及び a A P C が、磁場存在下で約 5 時間以下インキュベートされる、請求項 66 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 68】

前記濃縮された抗原特異的 T 細胞が、磁場を使用することなく増幅される、請求項 67 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 69】

前記濃縮された前記細胞が、培養物中で 1 ~ 4 週間増幅される、請求項 66 ~ 68 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 70】

前記細胞が、M I P - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 7、I L - 10、I L - 15、I L - 21、及び I N F - から選択される 1 つ以上のサイトカインまたは成長因子存在下、培養物中で増幅される、請求項 69 に記載の単離された細胞組成物。

10

## 【請求項 71】

I L - 15 が、培養物中の前記細胞の増幅のために含まれない、請求項 70 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 72】

前記細胞が、M I P - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 7、I L - 10、I L - 15、I L - 21、及び I N F - から選択されるサイトカインまたは成長因子のうち 2 つ、3 つ、4 つ、または 5 つの存在下、培養物中で増幅される、請求項 70 に記載の単離された細胞組成物。

20

## 【請求項 73】

I L - 15 が、培養物中の前記細胞の増幅のために含まれない、請求項 72 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 74】

前記細胞が、M I P - 1、I L - 1、I L - 6、及び I L - 10 から選択される少なくとも 1 つのサイトカインまたは成長因子存在下、培養物中で増幅される、請求項 70 ~ 73 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 75】

前記細胞が、I L - 4 存在下で増幅される、請求項 70 ~ 74 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

30

## 【請求項 76】

前記細胞が、I L - 4 及び I L - 6 存在下で増幅される、請求項 70 ~ 74 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 77】

前記細胞が、I L - 4 及び I L - 1 存在下で増幅される、請求項 70 ~ 74 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 78】

前記細胞が、I L - 4、I L - 6、及び I L - 1 存在下で増幅される、請求項 70 ~ 74 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

40

## 【請求項 79】

前記細胞が、I L - 2、I L - 4、及び I L - 6 存在下で増幅される、請求項 70 ~ 74 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 80】

前記細胞が、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I N F -、及び I L - 1 存在下、培養物中で増幅される、請求項 70 ~ 74 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 81】

1 つ以上の標的ペプチド抗原が、サバイビン、W T - 1、P R A M E、及びサイクリン A 1 のペプチドエピトープから選択される、請求項 1 ~ 80 のいずれか一項に記載の単離さ

50

れた細胞組成物。

【請求項 8 2】

1つ以上の標的ペプチド抗原が、PR3、XBP1-US、XBP1-SP、CD138、CS1、NY-ESO1、SOX2、EBV、インフルエンザ、CMV、RHAMM、Mart-1/MelanA、gp100、CMVpp65、及びインフルエンザマトリックスタンパク質M1のペプチドエピトープから選択される、請求項1～81のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 8 3】

養子免疫療法に好適な単離された細胞組成物であって、前記組成物が、薬学的に許容される担体中に、

少なくとも70%のCD8+T細胞及び5%未満のCD4+T細胞を含み、

前記CD8+細胞の少なくとも5%が、Tメモリ幹(TSCM)細胞であり、

前記CD8+細胞の少なくとも30%が、セントラル及びエフェクターメモリT細胞であり、

前記CD8+T細胞の10%未満が、最終分化したT細胞であり、

前記CD8+細胞の10%未満が、ナイーブ細胞である、前記単離された細胞組成物。

【請求項 8 4】

少なくとも10<sup>6</sup>個のCD8+T細胞が、標的ペプチド抗原に特異的である、請求項83に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 8 5】

少なくとも10<sup>6</sup>個のCD8+T細胞が、1～20個または1～10個の標的ペプチド抗原に特異的である、請求項84に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 8 6】

前記標的ペプチド抗原に特異的な少なくとも10<sup>7</sup>または10<sup>8</sup>個のCD8+T細胞を含む、請求項83～85のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 8 7】

5%～25%のTメモリ幹細胞を含む、請求項83～86のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 8 8】

5%未満の最終分化T細胞、及び/または5%未満のナイーブ細胞を含む、請求項83～87のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 8 9】

前記標的ペプチド抗原が、腫瘍またはがん関連抗原であり、任意選択で、血液悪性腫瘍に関連している、請求項83～88のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 9 0】

前記標的ペプチド抗原が、血液悪性腫瘍に関連している、請求項89に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 9 1】

1つ以上の標的ペプチド抗原が、サバイビン、WT-1、PRAME、サイクリンA1、及びPR3のペプチドエピトープから選択され、前記ペプチドエピトープが、任意選択で、表1から選択される1つ以上を含む、請求項89または90に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 9 2】

1つ以上の標的ペプチド抗原が、XBP1-US、XBP1-SP、CD138、CS1、NY-ESO1、及びSOX2のペプチドエピトープから選択され、前記ペプチドエピトープが、任意選択で、表2から選択される1つ以上を含む、請求項89または90に記載の単離された細胞組成物。

【請求項 9 3】

前記組成物が、T細胞をさらに含む、請求項83～92のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9 4】

少なくとも約 5 % の T 細胞を含む、請求項 9 3 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 9 5】

少なくとも約 10 % の T 細胞を含む、請求項 9 3 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 9 6】

少なくとも約 25 % の T 細胞を含む、請求項 9 3 に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 9 7】

前記 T 細胞が、V<sub>1</sub> 及び V<sub>2</sub> 細胞を含む、請求項 9 3 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の単離された細胞組成物。

## 【請求項 9 8】

がん患者を治療するための方法であって、請求項 1 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の細胞組成物を、必要とする患者に投与することを含む、前記方法。

## 【請求項 9 9】

前記患者は、血液癌を有する、請求項 9 8 に記載の方法。

## 【請求項 100】

前記血液癌が、同種幹細胞移植後に再発した、請求項 9 9 に記載の方法。

## 【請求項 101】

前記患者が、急性骨髄性白血病 (AML) または骨髄異形成症候群を有する、請求項 9 9 または 100 に記載の方法。

## 【請求項 102】

前記患者が、細胞療法を行う前に、リンパ球除去療法、または細胞減少療法、または免疫調節療法も受けている、請求項 9 8 ~ 101 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 103】

前記細胞療法が、サイトカイン補助後治療を行うか、または行わずにさらに提供されてもよい、請求項 9 8 ~ 102 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 104】

前記患者において、抗原特異的 T 細胞が少なくとも 6 ヶ月持続する、請求項 9 8 ~ 103 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 105】

IL - 2、IL - 4、IL - 6、INF -  $\gamma$ 、及び IL - 1 のうちの 2 つ以上の存在下、CD4 + 枯渴 T 細胞の集合体を増幅することを含む、請求項 1 ~ 9 7 のいずれか一項に記載の細胞組成物を産生するための方法。

## 【請求項 106】

前記 T 細胞は、CD28 + 細胞が濃縮されている、請求項 105 に記載の方法。

## 【請求項 107】

前記細胞が、IL - 4 存在下で増幅される、請求項 105 または 106 に記載の方法。

## 【請求項 108】

前記細胞が、IL - 4 及び IL - 6 存在下で増幅される、請求項 107 に記載の方法。

## 【請求項 109】

前記細胞が、IL - 4 及び IL - 1 存在下で増幅される、請求項 107 に記載の方法。

## 【請求項 110】

前記細胞が、IL - 4、IL - 6、及び IL - 1 存在下で増幅される、請求項 107 に記載の方法。

## 【請求項 111】

前記細胞が、IL - 2、IL - 4 及び IL - 6 存在下で増幅される、請求項 107 に記載の方法。

## 【請求項 112】

前記細胞が、IL - 2、IL - 4、IL - 6、INF -  $\gamma$ 、及び IL - 1 存在下、培養物中で増幅される、請求項 107 に記載の方法。

## 【請求項 113】

10

20

30

40

50

前記細胞が、培養物中で1～4週間増幅される、請求項93～112のいずれか一項に記載の方法。

【請求項114】

T細胞の集合体を作製するための方法であって、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1のうち2つ以上の存在下、T細胞の集合体を増幅することを含む、方法。

【請求項115】

前記T細胞の集合体は、CD28+が濃縮されている、請求項114に記載の方法。

【請求項116】

CD28+細胞の前記集合体は、抗CD28ビーズまたは粒子を用い、陽性選択される、請求項115に記載の方法。

10

【請求項117】

前記T細胞の集合体は、CD4+枯渇している、請求項114～116のいずれか一項に記載の方法。

【請求項118】

前記細胞が、IL-4存在下で増幅される、請求項114～117のいずれか一項に記載の方法。

【請求項119】

前記細胞が、IL-4及びIL-6存在下で増幅される、請求項118に記載の方法。

【請求項120】

前記細胞が、IL-4及びIL-1存在下で増幅される、請求項118に記載の方法。

20

【請求項121】

前記細胞が、IL-4、IL-6、及びIL-1存在下で増幅される、請求項118に記載の方法。

【請求項122】

前記細胞が、IL-2、IL-4及びIL-6存在下で増幅される、請求項118に記載の方法。

【請求項123】

前記細胞が、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1存在下、培養物中で増幅される、請求項118に記載の方法。

30

【請求項124】

前記細胞が、培養物中で1～4週間増幅される、請求項117～123のいずれか一項に記載の方法。

【請求項125】

細胞の前記+集合体を細胞から単離することをさらに含む、請求項114～124のいずれか一項に記載の方法。

【請求項126】

任意選択でTCRであるT細胞受容体を異種発現することをさらに含む、請求項125に記載の方法。

【請求項127】

キメラ抗原受容体(CAR)を異種発現することをさらに含む、請求項125に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権

本出願は、2018年11月8日に出願された米国仮特許出願第62/757,467号、2019年3月20日に出願された米国仮特許出願第62/821,031号の利益、及び2019年6月27日に出願された米国仮特許出願第62/867,499号の利益を主張し、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

50

【背景技術】

【0002】

免疫療法は、増幅された天然で循環するか、または遺伝子操作された細胞障害性リンパ球の養子移入を介して、患者自身の免疫系を開放し、誘導し、強化することを目的とする幅広い数々の戦略を含む、がん療法の基礎となっている。この分野の近年の進歩にもかかわらず、現在の養子免疫療法は、いくつかの課題に直面している。例えば、多くの養子免疫療法は、臨床的もしくは治療的な価値がある操作された細胞障害性リンパ球を末梢血から十分なレベル生成することができず、またはエフェクター細胞を均一に操作することができず、または患者に対して持続的で長期にわたる治療効果を提供することができず、腫瘍の再発及び他の合併症を引き起こす。したがって、白血病またはリンパ腫（急性または慢性の白血病を含む）に罹患している患者、ならびに養子療法から利益を受ける可能性がある他の患者を含め、より効果的であり、耐久性であり、より安全な養子免疫療法の選択肢を提供する細胞組成物の必要性が顕著である。種々の態様および実施形態において、本発明は、これらの必要性に対処するものである。

10

【発明の概要】

【0003】

種々の態様及び実施形態において、本発明は、養子免疫療法及び/またはT細胞の遺伝子操作に好適な単離された細胞組成物を提供する。本発明は、細胞組成物を製造する方法、及び細胞組成物を用いた治療方法をさらに提供する。組成物は、薬学的に許容される担体中に、標的ペプチド抗原（複数可）に特異的な少なくとも約 $10^6$ 個のCD8+T細胞を含み、Tメモリ幹（TSCM）細胞を含む。種々の実施形態において、CD8+T細胞は、少なくとも約1%がTメモリ幹細胞である。いくつかの実施形態において、Tメモリ幹細胞は、単離され、それによって、実質的にTメモリ幹細胞を含む（例えば、70%~100%のTSCM）組成物を調製する。本発明の組成物は、顕著なレベルのTSCMが存在することによって、頑強で耐久性のある養子療法を提供することができる。細胞組成物は、キメラ抗原受容体または組換えTCRを発現するT細胞を含む必要はなく、したがって、種々の実施形態において、より多くの疲弊したT細胞表現型を産生し、より耐久性の低い応答及びより大きな毒性を生成することが多いこれらの技術に対する代替を提供する。他の実施形態において、TSCMを使用して、キメラ抗原受容体または異種TCRを組換え発現し、それによって、高い増殖能力を有し、疲弊した表現型が少ない、操作されたT細胞を調製する。

20

30

【0004】

種々の実施形態において、細胞組成物は、少なくとも1%、または少なくとも15%のTメモリ幹細胞と、約 $10^6$ 個の標的ペプチド抗原に特異的なCD8+T細胞、または少なくとも約 $10^7$ 、または少なくとも約 $10^8$ 、または少なくとも約 $10^9$ 、または少なくとも約 $10^{10}$ 個の標的ペプチド抗原に特異的なCD8+T細胞を含み、標的細胞の強固な破壊とインビボでの長期持続性を提供する。例えば、急性骨髄性白血病（AML）または骨髄異形成症候群の治療のために、細胞組成物は、特に、WT1、PRAME、サイピン、及びサイクリンA1ペプチド抗原に特異的なT細胞を含んでいてもよい。

【0005】

種々の実施形態において、細胞組成物は、約1%~約50%のTメモリ幹細胞、または約5%~約25%のTメモリ幹細胞を含む。種々の実施形態において、T細胞は、少なくとも5%がTメモリ幹細胞であり、またはT細胞は、少なくとも約10%がTメモリ幹細胞であり、またはT細胞は、少なくとも20%がTメモリ幹細胞であり、または少なくとも25%がTメモリ幹細胞であり、顕著な増殖能力、ならびに免疫再構成能力及び寿命を有する養子免疫療法組成物を提供する。

40

【0006】

種々の実施形態において、組成物中のCD8+T細胞の95%より多くが、メモリ表現型を含む。種々の実施形態において、メモリ表現型は、TSCMに加えて、セントラルメモリT細胞（TCM）、エフェクターメモリT細胞（TEM）、及びエフェクターメモリR

50

A + T細胞 (TEMRA) のうちの1つ以上 (または全て) を含む。いくつかの実施形態において、メモリ表現型の少なくとも80%は、TSCM、TCM、及びTEMである。

【0007】

種々の実施形態において、組成物中のCD8 + T細胞は、TSCMに加えて、セントラルメモリ及びエフェクターメモリT細胞を含む。種々の実施形態において、組成物中のT細胞 (及び/または標的抗原に特異的なT細胞) は、少なくとも約30%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞であり、またはいくつかの実施形態において、少なくとも約50%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞であり、またはいくつかの実施形態において、少なくとも約70%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞であり、またはいくつかの実施形態において、少なくとも約80%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞であり、またはいくつかの実施形態において、少なくとも約90%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞である。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原に特異的なCD8 + T細胞は、少なくとも50%がセントラル及びエフェクターメモリT細胞であり、またはいくつかの実施形態において、少なくとも80%がセントラル及びエフェクターメモリT細胞である。いくつかの実施形態において、TSCM及びTCMの組み合わせは、CD8 + T細胞の約40% ~ 約70%である。

10

【0008】

いくつかの実施形態において、細胞組成物は、約20%未満、または約10%未満の最終分化したメモリT細胞 (例えば、TEMRA細胞) と、30%未満のナイーブ細胞とを含み、またはいくつかの実施形態において、約15%未満、またはいくつかの実施形態において、約5%未満、またはいくつかの実施形態において、約1.5%未満のナイーブ細胞を含む。本明細書に開示される細胞表現型は、常磁性人工抗原提示細胞 (aAPC) 及び組換えT細胞成長因子カクテルを用いた濃縮及び増幅プロセスを使用して、作成及び/または制御することができる。

20

【0009】

種々の実施形態において、細胞組成物は、少なくとも約70%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%がCD8 + またはCD4 - T細胞 (例えば、CD3 + CD8 + またはCD3 + CD4 - 細胞) である。例えば、単離された細胞組成物は、約10%未満、または約5%未満のCD4 + T細胞を含むことによって特徴付けされ得る。CD8 + T細胞をエキスビボで増幅するとき、CD4 + 細胞は、CD8 + 細胞を過剰に成長させ、成長シグナルが競合する傾向があり、外因性CD4 + 細胞は、頑強で耐久性のあるインビボ応答にとって必要ではない。

30

【0010】

種々の実施形態において、抗原特異的T細胞は、活性化すると多機能表現型を示す。いくつかの実施形態において、CD8 + T細胞の少なくとも10%、またはいくつかの実施形態においてCD8 + T細胞の少なくとも20%、またはいくつかの実施形態においてCD8 + T細胞の少なくとも40%が、活性化すると多機能表現型を示す。例えば、活性化すると、T細胞は、IL-2の細胞内染色、IFN- $\gamma$  産生、TNF- $\alpha$  の産生、及びCD107Aのうちの2つ以上について陽性である。種々の実施形態において、抗原特異的T細胞の少なくとも20%は、これらのマーカーのうちの少なくとも2つを示す。種々の実施形態において、抗原特異的T細胞の少なくとも20%は、これらのマーカーのうちの少なくとも3つ、またはいくつかの実施形態において、これらのマーカーのうちの4つ全てを示す。種々の実施形態において、CD8 + T細胞の少なくとも5%が、多抗原性であり、このことは、CD8 + T細胞が、インビトロまたはインビボで複数の腫瘍またはウイルス抗原に応答することができることを意味している。

40

【0011】

種々の実施形態において、細胞組成物は、T細胞をさらに含む。T細胞は、それらの表面上に独自のT細胞受容体 (TCR) を有する。T細胞は、脂質抗原及びホスホ抗原の認識において役割を有する場合があります。HLA依存性ではない抗病原体機構及び抗腫瘍機構を提供することができる。さらに、T細胞は、CD8 + 細胞を援助するこ

50

とができる。造血幹細胞移植（H S C T）の観点で T細胞の臨床的意義が見出されており、特に、移植後のより高頻度の T細胞は、望ましい転帰と関連していた。

【 0 0 1 2 】

種々の実施形態に従って細胞組成物は、濃縮及び増幅プロセスによって調製することができる。いくつかの実施形態において、標的抗原（複数可）（例えば、腫瘍関連抗原またはウイルス関連抗原）に特異的な C D 8 + 細胞が濃縮される。この細胞集合体は、供給源であるリンパ球中の主要なナイーブ細胞である場合であっても、培養物中で迅速に増幅し、本明細書に記載の細胞組成物に到達することができる。濃縮は、常磁性ビーズを使用して行い、細胞集合体を陽性選択することができ、T細胞表面受容体の強力な磁気クラスタリングに起因して、ナイーブ細胞及び他のT細胞集合体を活性化するという追加の利点を有し得る。例えば、常磁性ビーズまたはナノ粒子は、同じまたは異なる粒子上の共刺激シグナル、例えば、C D 2 8 のアゴニスト（例えば、C D 2 8 の抗体アゴニスト）と共に、ペプチド抗原を提示する単量体または多量体（例えば、二量体）H L A リガンドを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、C D 2 8 + 細胞も濃縮され、これは、抗原特異的な濃縮と同時であってもよい。

10

【 0 0 1 3 】

種々の実施形態において、標的ペプチド抗原は、腫瘍由来、腫瘍特異的な抗原、及びネオ抗原を含め、腫瘍またはがん関連抗原である。腫瘍関連抗原に特異的なT細胞は、多くは非常に稀であり、多くの場合には、健康な個体の末梢血において検出不可能である。これは、多くは、ウイルス特異的T細胞と腫瘍抗原特異的T細胞との間で観察される区別である。

20

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、標的ペプチド抗原は、病原体、例えば、ウイルス、細菌、真菌、または寄生虫病原体と関連するか、またはこれらに由来する少なくとも1つを含む。例えば、少なくとも1つのペプチド抗原は、H I V、肝炎（例えば、B、C、またはD）C M V、エプスタインバーウイルス（E B V）、インフルエンザ、ヘルペスウイルス（例えば、H S V 1 または 2、または水痘帯状疱疹）、及びアデノウイルスと関連し得る。例えば、C M V は、臓器移植患者にみられる最も一般的なウイルス性病原体であり、骨髄移植または末梢血幹細胞移植を受ける患者における罹患率及び死亡率の主な原因である。ウイルス活性化は、がん生物学に關与することが知られている。

30

【 0 0 1 5 】

さらに他の実施形態において、細胞組成物は、腫瘍関連抗原に特異的なT細胞を含み、病原体関連抗原特異的T細胞が、バスタンダー細胞として提供される。他のバスタンダー細胞としては、T細胞が挙げられる。具体的には、H L A - ペプチド及び抗 C D 2 8 を濃縮することによって、バスタンダー細胞が濃縮され、特に、抗原特異的な活性化を引き起こすことなく、これらの細胞の非特異的な増幅の一部を引き起こすことが可能なT細胞成長因子カクテルを用いる場合に、増幅される。これらの実施形態において、組成物の大部分が、標的ペプチドに特異的なT細胞であるが（例えば、5% ~ 75%）、残りのT細胞（約0.25% ~ 約25%）は、共通の病原体に対する免疫系のいくつかの再構成を提供し、このことは、特に、移植後に有益であるか、またはウイルス病因を有するがんにおいて有益である。

40

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態は、増幅中にT細胞成長因子を使用し、このことが、T細胞の増殖及び/または分化に影響を与える。特に有用なサイトカインとしては、M I P - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L - 7、I L - 10、I L - 21、及びI N F - が挙げられる。これらまたは他の実施形態において、細胞は、M I P - 1、I L - 1、及びI L - 6 から選択される1つ、2つ、または3つのサイトカインを含むサイトカインカクテル存在下、培養物中で増幅される。いくつかの実施形態において、サイトカインは、I L - 10 をさらに含む。いくつかの実施形態において、成長因子は、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I N F -、及びI L - 1 を含むか、またはこれらから本質

50

的になる。細胞は、1～4週間、例えば、約10～約21日間、培養物中で増幅させることができる。

【0017】

他の態様において、本発明は、本明細書に記載のaAPCを用いた濃縮及び増幅によるものを含め、細胞組成物を製造するための方法を提供する。具体的には、供給源であるリンパ球（例えば、健康なドナー由来、または養子免疫療法を必要とする患者由来）からのCD4+細胞の枯渇後、抗原特異的CD8+T細胞は、標的ペプチド抗原に特異的なT細胞及びいくつかの実施形態においてCD28+細胞が濃縮される。標的細胞は、ナノ粒子またはマイクロ粒子aAPC、例えば、磁場によってエキスピボでT細胞を活性化させ、細胞表面受容体のクラスタリングを誘発する超常磁性ナノ粒子を使用して濃縮することができる。ラテックスまたは他のポリマー系ナノ粒子を含む他の材料も、（磁場によって誘導されるクラスタリングを引き起こさず）細胞表面受容体をクラスタリングするために使用することができる。次いで、濃縮されたT細胞を、再構成されたT細胞成長因子（例えば、MIP-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、INF- から選択される因子を含む）の使用によるものを含め、エキスピボで急速に増幅させることができる。いくつかの実施形態において、細胞は、MIP-1、IL-1、IL-6、及びIL-10から選択される1つ、2つ、または3つのサイトカイン存在下、培養物中で増幅される。いくつかの実施形態において、成長因子は、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1を含むか、またはこれらから本質的になる。種々の実施形態において、これらのサイトカインは、人工または天然の抗原提示細胞と組み合わせて使用され、抗原特異的T細胞を増幅させる。

10

20

【0018】

他の態様において、本発明は、がん患者、及び/またはリンパ球除去療法、細胞減少療法、免疫調節療法（細胞療法を行う前）の有無にかかわらず、同種幹細胞移植を受けた患者を治療するための方法を含む、養子細胞療法のための方法を提供する。細胞療法は、サイトカイン補助後治療の有無にかかわらず、さらに提供されてもよい。いくつかの実施形態において、患者は、血液癌を有しており、いくつかの実施形態において、同種幹細胞移植後に再発している。いくつかの実施形態において、患者は、急性骨髄性白血病（AML）または骨髄異形成症候群を有する。例えば、いくつかの実施形態において、細胞組成物は、WT1、PRAME、サバイピン、及びサイクリンA1ペプチド抗原に特異的なT細胞を含む。しかしながら、他の実施形態において、がんは、癌腫、肉腫、及びリンパ腫を含む様々な種類の固形腫瘍を含む。例示的な標的ペプチド抗原は、本明細書に記載されている。

30

【0019】

いくつかの実施形態において、患者は、感染症を有するか、または感染症のリスクにさらされている。例えば、HSCTを受けた患者は、免疫不全状態を考慮すると、感染症の特別なリスクにさらされる。治療または予防することができる感染症としては、細菌、ウイルス、プリオン、真菌、寄生虫、蠕虫などによって引き起こされる感染症が挙げられる。かかる疾患としては、AIDS、B/C型肝炎、CMV感染、エプスタインバーウイルス（EBV）感染、インフルエンザ、ヘルペスウイルス感染（帯状疱疹を含む）、及びアデノウイルス感染が挙げられる。

40

【0020】

さらに他の実施形態において、本発明は、T細胞の集合体を作製するための方法を提供する。本方法は、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1のうち2つ以上の存在下、T細胞を含む細胞の集合体を増幅することを含む。増幅前に、細胞の集合体は、約20%未満または約10%未満または約8%未満のT細胞を含む。いくつかの実施形態において、細胞の集合体は、CD28濃縮される。いくつかの実施形態において、細胞の集合体は、CD4+枯渇している。培養物中の細胞の増幅は、本明細書に記載されるように、例えば、1～4週間行うことができる。T細胞は、細胞選

50

別などの既知の方法を使用して、他の細胞から分離することができ、養子移入または研究使用のための細胞組成物として提供することができ、あるいは、キメラ抗原受容体（CAR）を含む、異種または操作されたT細胞受容体（例えば、TCR）などの1つ以上の異種または操作された遺伝子を発現するように改変することができる。

【0021】

他の態様及び実施形態は、以下の詳細な説明から明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】CD8+抗原特異的T細胞の生成のための人工免疫調節（AIM）プラットフォームを示す画像である。

10

【図2】抗原特異的T細胞の急速なインピトロでの濃縮及び増幅を可能にするAIM ACT（養子細胞療法）ならびに濃縮及び増幅（E+E）細胞増幅システムを示す画像である。

【図3】AIM ACTプラットフォームのための濃縮及び増幅された抗原特異的細胞産物を示す2つのグラフを有する。左のグラフは、AML特異的抗原WT137-45、126-134、PRAME425、及びサイクリンA1227-235、341-351について、T細胞がエキスピボで濃縮及び増幅された後の4人の健康なドナーの新鮮なPBMCから生成されたCD8+T細胞の合計数を示す。右のグラフは、CD8+T細胞がエキスピボで濃縮及び増幅された後の同じ急性骨髄性白血病（AML）特異的抗原の合計割合を示す。

20

【図4A】AIM ACTプラットフォームによって生成されたCD8+T細胞がメモリT細胞を含むことを示す。濃縮後であるが0日目の増幅前（上側）、及び増幅14日目（下側）のAML抗原特異的CD8+T細胞集合体を示す。TCM=セントラルメモリT細胞（CD62L+、CD45RA-）、TN=ナイーブT細胞（CD62L+、CD45RA+）、TEM=エフェクターメモリT細胞（CD62L-、CD45RA-）、TEMRA=エフェクターメモリRA+T細胞（CD62L-、CD45RA+）、TSCM=Tメモリ幹細胞（CD62L+、CD45RA+、CD95+）。

【図4B】AIM ACTプラットフォームによって生成されたCD8+T細胞がメモリT細胞を含むことを示す。AML特異的抗原WT137-45、126-134、PRAME425、サイクリンA1227-235、341-351について、AML特異的濃縮及び増幅の後14日目のTSCM、TCM、TEM、及びTEMRAについてのメモリT細胞表現型を示す。

30

【図5A】エキスピボで濃縮及び増幅されたAML特異的T細胞が、IL-2の細胞内染色（増殖及び記憶）、IFN-（他の細胞を活性化する、記憶、MHCの上方制御）、TNF-（炎症促進性）、及びCD107A（グランザイム放出、細胞障害活性）を含む、高度の多機能表現型を有することを示す。AML特異的T細胞の大部分（すなわち、約62%）は、非特異的刺激を受けたときに3~4個のエフェクター機能を示した（上側）。（下側）において、グラフは、IL-2、TNF-、IFN-、及びCD107Aを発現するT細胞の割合を示す。T細胞は、ペプチドパルスしたT2細胞の非特異的刺激によって刺激された。

40

【図5B】エキスピボで濃縮及び増幅されたAML特異的T細胞が、IL-2の細胞内染色（増殖及び記憶）、IFN-（他の細胞を活性化する、記憶、MHCの上方制御）、TNF-（炎症促進性）、及びCD107A（グランザイム放出、細胞障害活性）を含む、高度の多機能表現型を有することを示す。AML特異的抗原WT137-45、126-134、PRAME425、及びサイクリンA1227-235、341-351を用いて健康なドナーの新鮮なPBMCから生成したCTLを用い、2つのエフェクターと標的（E:T）の比率10:1（左側の棒）及び20:1（右側の棒）でのAML細胞株U266のT細胞媒介性腫瘍特異的殺傷のグラフが示される。

【図6】黒色腫患者由来のPBMC（上側）と健康なドナー由来のPBMC（下側）との間で、濃縮及び増幅プロセスによって生成されるMart-1特異的T細胞の特異性を比

50

較する4つのグラフからなる。濃縮及び増幅プロセスは、ドナー供給源にかかわらず、一貫した細胞組成物を産生する。この実験におけるデータは、凍結PBM Cから生成した。

【図7】AIMACTに基づくE+Eプロセスが、天然の免疫応答を模倣するTCRレパートリーを生成し、それによって、自然選択を受けた天然T細胞レパートリーから頑強な養子療法を提供することを示すグラフである。ポリクローナルTCRレパートリーの広さは、天然で耐久性のある免疫応答を可能にする。

【図8】E+Eプロセスが有意な量の多発性骨髄腫抗原特異的Tメモリ幹(TSCM)細胞(CD62L<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD95<sup>+</sup>)を生成したことを示すグラフを有する。このグラフは、健康なドナーのleucopakからの増幅の前及び後の多発性骨髄腫特異的抗原T細胞の表現型を示す。

【図9A】健康なドナーのleucopakからの多発性骨髄腫抗原特異的T細胞のためのバッチ中、エクスピボで濃縮及び増幅されたT細胞の表現型を示す。このグラフは、E+Eプロセスが、Tメモリ幹(TSCM)細胞、セントラルメモリT細胞TCM、及びエフェクターメモリT(TEM)細胞を含む有意な量の抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞(ヒンジ二量体染色に基づき、約 $1.6 \times 10^9$ 個のCD8<sup>+</sup>T細胞)を生成したことを示す。

【図9B】4人の異なる臨床的な多発性骨髄腫患者に由来する多発性骨髄腫抗原特異的T細胞のためのバッチ中、エクスピボで濃縮及び増幅されたT細胞の表現型を示す。このグラフは、濃縮及び増幅プロセスが、Tメモリ幹(TSCM)細胞、セントラルメモリT細胞TCM、及びエフェクターメモリT(TEM)細胞を含む有意な量の抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を生成したことを示す。

【図10】V<sub>1</sub>及びV<sub>2</sub>TCRサブタイプを含むT細胞の産生を示す。

【図11】種々の抗原特異的T細胞(AML、MM、EBV、MART-1)について増幅させた後14日目のT細胞の割合を示す。14日目のT細胞の割合は、0日目のT細胞の数と広く相関関係にある。

【発明を実施するための形態】

【0023】

T細胞の記憶は、刺激を受けると固有の機能応答が可能な表面マーカーの安定し、休止し、表現型が異なるサブセットで構成され、組成物中で不均一である。分化によって関連するサブセットには、セントラルメモリT細胞(TCM)、エフェクターメモリT細胞(TEM)、エフェクターメモリRA<sup>+</sup>T細胞(TEMRA)、及びTメモリ幹細胞(TSCM)が含まれる。メモリT細胞は、抗原特異的なナイーブCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>T細胞が抗原曝露して活性化されたときに発達し、その後、増殖増幅及び分化を受ける。したがって、永続的な記憶は、感染及び悪性腫瘍に対する長期的な保護に不可欠である。Tメモリ細胞のTSCMサブセット細胞のみが、セントラルメモリT細胞(TCM)、エフェクターメモリ(TEM)、及びターミナルエフェクターT細胞(TTE)へと分化することが示されている。しかしながら、Tメモリ幹細胞は、稀であり、循環リンパ球のわずかな割合を表す。例えば、養子免疫療法のために臨床的に関連する量のTメモリ幹細胞を生成することは、現時点で実行可能ではない。したがって、がん及び感染症抗原に対するTSCM細胞を生成し、増幅させ、及びリダイレクションを可能にする技術が必要である。

【0024】

標的ペプチド抗原(複数可)に特異的な少なくとも約 $10^6$ 個のCD8<sup>+</sup>T細胞を含み、TSCM細胞を含む、単離された細胞組成物が本明細書に開示される。本開示のTSCM細胞は、ナイーブT細胞と同様の表面マーカーを発現するが、上昇したレベルのCD95表面マーカーを発現する。かかるTSCM細胞は、分化及び増幅が最も少ないメモリサブセットである。他のメモリサブセットと比較して、本開示のTSCM細胞は、巨大な増幅能力を示し、メモリT細胞及びエフェクターT細胞の完全なレパートリーを再構成することができ、優れた恒常性及び分化能力を与えられた長期間安定した細胞の集合体である。したがって、標的ペプチド抗原(複数可)に特異的な少なくとも約 $10^6$ 個のCD8<sup>+</sup>T細胞を含み、TSCM細胞を含む、本明細書に開示される組成物は、治療用途のために臨床的に関連する量でがん細胞に対するTSCM細胞を生成し、増幅させ、及びリダイレク

10

20

30

40

50

ションを可能にする非常に効果的な抗腫瘍組成物を提供する。

【0025】

種々の態様及び実施形態において、本発明は、単離された細胞組成物、ならびに細胞組成物を製造する方法、及び細胞組成物を用いた治療方法を提供する。いくつかの実施形態において、細胞組成物は、養子細胞療法に使用される。組成物は、薬学的に許容される担体中に、標的ペプチド抗原（複数可）に特異的な少なくとも約 $10^6$ 個のCD8+T細胞を含み、TSCM細胞を含む。種々の実施形態において、CD8+T細胞は、少なくとも約1%がTSCM細胞である。いくつかの実施形態において、TSCM細胞は、単離され、それによって、ほぼ100%のTメモリ幹細胞を含む（例えば、少なくとも90%がTSCM細胞）組成物を調製する。いくつかの実施形態において、約70%～約100%がTメモリ幹細胞である組成物が作成される。本発明の組成物は、顕著なレベルのTメモリ幹細胞が存在することによって、頑強で耐久性のある養子療法を提供する。細胞組成物は、キメラ抗原受容体（CAR）または組換えTCRを発現するT細胞を含む必要はなく、したがって、種々の実施形態において、より多くの疲弊したT細胞表現型を産生し、より耐久性の低い応答を生成することが多いこれらの技術に対する代替を提供する。他の実施形態において、TSCMを使用して、キメラ抗原受容体または異種TCR（例えば、TCRまたはTCR）を組換え発現し、それによって、既に記載されたものよりも高い増殖能力を有し、疲弊した表現型が少ない、操作されたT細胞を調製する。したがって、TSCM細胞は、CARまたは異種TCRを用いてT細胞を操作するために使用され得る。

10

20

【0026】

本明細書で使用される場合、「標的ペプチド抗原（複数可）」または「標的抗原」という用語は、例えば、人工抗原提示細胞（aAPC）またはプロフェッショナル抗原提示細胞（pAPC）プラットフォーム（例えば、樹状細胞）と組み合わせて、所望なCD8+細胞集合体を濃縮し、及び/または増幅させるためにエキスピボで使用されるペプチド抗原を指す。aAPCまたはpAPCを使用して、ドナーまたは患者のリンパ球由来のCTLを活性化し、増幅させる。いくつかの実施形態において、標的ペプチド抗原は、特定のCD8+T細胞のエキスピボでの濃縮及び増幅のためにaAPC上にロードされるペプチドエピトープである。したがって、「標的ペプチド抗原に特異的」という用語は、T細胞が、標的抗原を経験した抗原であることを意味する。

30

【0027】

種々の実施形態において、細胞組成物は、標的ペプチド抗原に特異的な少なくとも約 $10^6$ 個のCD8+T細胞、または標的ペプチド抗原に特異的な少なくとも約 $10^7$ 個のCD8+T細胞、または標的ペプチド抗原に特異的な少なくとも約 $10^8$ 個、少なくとも約 $10^9$ 個、または少なくとも約 $10^{10}$ 個のCD8+T細胞を含み、標的細胞の強固な破壊を提供する。いくつかの実施形態において、細胞組成物は、標的抗原に特異的な $1 \times 10^7$ 個～ $1 \times 10^9$ 個のCD8+T細胞、またはいくつかの実施形態において、標的抗原に特異的な $5 \times 10^7$ 個～ $5 \times 10^8$ 個のCD8+T細胞を含む。例えば、組成物は、50～200mLの体積で、1mLあたり約 $5 \times 10^5$ 個～約 $5 \times 10^6$ 個の細胞を含み得る。特定の実施形態において、組成物の体積は、100mL以下（例えば、50～100mL）である。種々の実施形態における組成物の細胞は、少なくとも70%が生存可能であるが、または少なくとも約80%または約90%が生存可能であり、滅菌培地中で提供され、低温保存剤培地（例えば、10%DMSO）であってもよい。培地は、例えば、静脈内注入に好適な水性媒体であってもよく、例えば、水及び電解質を含む。例示的な培地は、PLASMA LYTEである。

40

【0028】

CD8+細胞障害性リンパ球（CTL）とメモリT細胞とを含む細胞組成物が、本明細書に開示される。本開示のCTLは、以下のT細胞集合体（ナイーブ、Tメモリ幹細胞、セントラルメモリ、エフェクターメモリ、及び最終分化したメモリ細胞）を含む。本発明の実施形態によれば、標的抗原に特異的なT細胞は、有意な量のTSCM細胞を含む。種々

50

の実施形態において、標的抗原に特異的なT細胞は、セントラルメモリT細胞及びエフェクターメモリT細胞をさらに含む。細胞組成物は、いくつかの実施形態において、少なくとも約6ヶ月、または少なくとも約12ヶ月、または少なくとも約18ヶ月、または少なくとも約2年の抗原特異的T細胞のインビボでの持続を含む、耐久性のある応答を提供する。

#### 【0029】

ナイーブT細胞は、骨髄で分化しており、胸腺における中枢選択の正及び負のプロセスを成功させる。ナイーブT細胞は、成熟しているとみなされ、活性化T細胞またはメモリT細胞とは異なり、その同種抗原には出会っていない。ナイーブT細胞は、L-セレクチン(CD62L)の表面発現及び活性化表面マーカーの不存在によって特徴付けることができる。ナイーブ状態において、T細胞は、ほぼ静止しており、分裂していない。本開示によれば、ナイーブT細胞は、CD62L+及びCD45RA+であると定義される。

10

#### 【0030】

メモリT細胞には、Tメモリ幹細胞(TSCM)、セントラルメモリ及びエフェクターメモリT細胞が含まれる。メモリT細胞は、それらの同種抗原に以前に応答している。同種抗原との2回目の出会いにおいて、メモリT細胞は、より速く、より強い免疫応答を開始するように再生成し得る。メモリT細胞には、少なくとも、Tメモリ幹細胞、エフェクターメモリT細胞、及びセントラルメモリT細胞が含まれる。メモリT細胞サブタイプは、長寿命であり、それらの同種抗原に再曝露されると、多数のエフェクターT細胞へと迅速に増幅することができる。

20

#### 【0031】

Tメモリ幹細胞(TSCM)は、本明細書ではCD45RA+であると定義され、少なくとも以下の表面マーカー(CD62L+、CD45RA+、及びCD95+)を有すると定義される。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるTメモリ幹細胞は、CD62L+、CD45RA+、CD95+であり、以下の表面マーカー(CD28+、CD27+、CXCR3+、CD11a+、IL-2R+、CD58+、及びCD57-)のうちの1つ以上を有していてもよい。いくつかの実施形態において、Tメモリ幹細胞は、CD62L+、CD45RA+、CD28+、CD27+、及びCD95+である細胞を含む。いくつかの実施形態において、Tメモリ幹細胞は、CD62L+、CD45RA+、CD95+及びCXCR3+である細胞を含む。いくつかの実施形態において、Tメモリ幹細胞は、CD62L+、CD45RA+、CD95+及びCD11a+である細胞を含む。いくつかの実施形態において、Tメモリ幹細胞は、CD62L+、CD45RA+、CD95+及びIL-2R+である細胞を含む。いくつかの実施形態において、Tメモリ幹細胞は、CD62L+、CD45RA+、CD95+及びCD58+である細胞を含む。いくつかの実施形態において、Tメモリ幹細胞は、CD62L+、CD45RA+、CD95+及びCD57-である細胞を含む。このメモリ部分集合体は、自己複製のための幹細胞様能力、及びメモリ及びエフェクターT細胞の部分集合体を再構成するための多能性能力を有する。TSCM細胞は、典型的には、ほんのわずかな循環Tリンパ球を表し(例えば、5%を超える)、抗原再曝露に応答して急速に増殖し、炎症性サイトカインを放出する能力を有する。したがって、TSCM細胞は、メモリT細胞の部分集合体のサブセットである。TSCM細胞は、本明細書に開示されるように、常磁性人工抗原提示細胞(aAPC)及び組換えT細胞成長因子カクテルを用いた濃縮及び増幅プロセスを使用して、作成及び/または制御することができる。

30

40

#### 【0032】

本開示によれば、セントラルメモリT細胞(TCM細胞)は、本明細書でCD62L+及びCD45RA-であると定義される。このメモリ部分集合体は、一般的に、リンパ節及び末梢循環中に見出される。エフェクターメモリT細胞(TEM細胞)は、本明細書でCD62L-及びCD45RA-であると定義される。これらのメモリT細胞は、リンパ節ホーミング受容体を欠き、したがって末梢循環及び組織に見られる。TEMRAは、CD45RAを再発現する最終分化したエフェクターメモリ細胞(TEMRA)を表す。これ

50

らの細胞は分裂する能力を有しておらず、CD62L<sup>-</sup>及びCD45RA<sup>+</sup>である。

【0033】

Tセントラルメモリ(TCM)細胞は、自己複製のための能力を示し、本発明の実施形態によれば、長く生存する効果を得るためにも重要である。TEM細胞も、自己複製のための能力をある程度有しており、細胞障害性機能にとって不可欠な遺伝子を強力に発現する。TEMRA細胞も、強固な細胞障害性機能を提供するが、自己複製のための能力を示さない。

【0034】

種々の実施形態における組成物は、悪性腫瘍細胞または他の標的細胞の強力な破壊に対する効果の持続時間を均衡させるために、TSCM、TCM及びTEM細胞から実質的に構成されるCTLを含む。例えば、いくつかの実施形態において、これらの細胞は、メモリ表現型の少なくとも約75%、または少なくとも約80%、または少なくとも約90%までを構成する。

10

【0035】

種々の実施形態において、組成物中のT細胞は、少なくとも約30%がセントラル及びエフェクターメモリ細胞であり、または少なくとも約40%がセントラルもしくはエフェクターメモリ細胞であり、または少なくとも約50%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞であり、またはいくつかの実施形態において、少なくとも約70%がセントラルもしくはエフェクターメモリ細胞であり、または少なくとも約80%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞であり、または少なくとも約90%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞である。

20

【0036】

細胞組成物は、いくつかの実施形態において、約20%未満の最終分化したメモリT細胞(例えば、TEMRA細胞)であり、または約10%未満もしくは約5%未満もしくは約4%未満の最終分化したメモリT細胞を含む。種々の実施形態において、CD8<sup>+</sup>T細胞は、約30%以下のナイーブ細胞、またはいくつかの実施形態において、約15%以下のナイーブ細胞、または約10%以下のナイーブ細胞、または約5%以下のナイーブ細胞、または約4%以下のナイーブ細胞、または約3%以下のナイーブ細胞、または約2%以下のナイーブ細胞、または約1.5%以下のナイーブ細胞、または約1%以下のナイーブ細胞を含む。

30

【0037】

種々の実施形態において、CD8<sup>+</sup>T細胞は、約1%~約100%のTメモリ幹細胞、またはいくつかの実施形態において、約1%~約50%のTメモリ幹細胞、またはいくつかの実施形態において、約1%~約25%のTメモリ幹細胞、または約5%~約25%のTメモリ幹細胞、または約5%~約15%のTメモリ幹細胞を含む(すなわち、ナイーブ、TSCM、TCM、TEM、Temra細胞の合計を100%として)。

【0038】

いくつかの実施形態において、TSCM及びTCM細胞は、メモリ表現型の約30%~約80%、またはいくつかの実施形態において、メモリ表現型の約40%~約80%、またはいくつかの実施形態において、メモリ表現型の約40%~約70%を構成する。

40

【0039】

種々の実施形態において、標的抗原に特異的なT細胞は、少なくとも約30%がセントラル及びエフェクターメモリ細胞であり、または少なくとも約40%がセントラルもしくはエフェクターメモリ細胞であり、または少なくとも約50%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞であり、またはいくつかの実施形態において、少なくとも約70%がセントラルもしくはエフェクターメモリ細胞であり、または少なくとも約80%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞であり、または少なくとも約90%がセントラルもしくはエフェクターメモリT細胞である。いくつかの実施形態において、これらのメモリ細胞は、セントラルとエフェクターメモリ細胞が約10:90~約90:10である。いくつかの実施形態において、これらのT細胞は、セントラルとエフェクターメモリ細胞

50

が約 25 : 75 ~ 約 75 : 25 である。いくつかの実施形態において、メモリ T 細胞は、セントラルとエフェクターメモリ T 細胞が約 40 : 60 ~ 約 60 : 40 である。標的抗原（複数可）に特異的な T 細胞は、約 20 % 未満が最終分化したメモリ T 細胞（例えば、T E M R A 細胞）、または約 10 % 未満、または約 5 % 未満、または約 4 % 未満が最終分化したメモリ T 細胞である。種々の実施形態において、標的抗原に特異的な T 細胞は、約 30 % 以下のナイーブ細胞、またはいくつかの実施形態において、約 20 % 以下のナイーブ細胞、またはいくつかの実施形態において、約 15 % 以下のナイーブ細胞、または約 10 % 以下のナイーブ細胞、または約 5 % 以下のナイーブ細胞、または約 2 % 以下、または 1 . 5 %、または 1 % のナイーブ細胞を含む。種々の実施形態において、抗原特異的 T 細胞は、約 1 % ~ 約 100 % の T メモリ幹細胞、またはいくつかの実施形態において、約 1 % ~ 約 50 % の T メモリ幹細胞、またはいくつかの実施形態において、約 5 % ~ 約 25 % の T メモリ幹細胞、または約 5 % ~ 約 15 % の T メモリ幹細胞を含む。これらのメモリ T 細胞は、常磁性人工抗原提示細胞（a A P C）を用いた濃縮及び増幅プロセスによって作成することができる。主に T S C M 細胞を含有する集合体は、磁気濃縮または細胞選別を含む既知の技術を使用して、T S C M 細胞について作成され、さらに単離または濃縮されてもよい。

10

#### 【0040】

種々の実施形態において、細胞組成物は、少なくとも 90 % が T 細胞であり、または少なくとも 95 % が T 細胞であり、または少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % が T 細胞である。この開示の目的のために、T 細胞は、C D 3 + 細胞によって特徴付けられる。T 細胞は、ほぼ C D 8 + または C D 4 - である。本明細書で使用される場合、「C D 8 +」及び「C D 4 -」という用語は、別途記載されない限り、相互に置き換え可能である。例えば、単離された細胞組成物は、約 10 % 未満、または約 5 % 未満の C D 4 + T 細胞、またはいくつかの実施形態において、約 2 % 未満、約 1 . 5 % 未満、または約 1 % 未満の C D 4 + T 細胞を含むことによって特徴付けされ得る。C D 8 + T 細胞をエクスピボで増幅するとき、C D 4 + 細胞は、C D 8 + 細胞を過剰に成長させ、成長シグナルが競合する傾向があり、外因性 C D 4 + T 細胞は、養子移入時の頑強で耐久性のある応答にとって必要ではない。

20

#### 【0041】

多機能 C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞の存在が、ペプチドネオ抗原を用いたがんワクチン療法に対する応答と相関関係にあることが記載されてきた。O t t P A , e t a l . , A n i m m u n o g e n i c p e r s o n a l n e o a n t i g e n v a c c i n e f o r p a t i e n t s w i t h m e l a n o m a , N a t u r e 5 4 7 ( 7 6 6 2 ) : 2 1 7 - 2 2 1 ( 2 0 1 7 ) 。 C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞は、腫瘍細胞破壊を媒介するのに重要であることがさらに記載されている。T r a n E , C a n c e r i m m u n o t h e r a p y b a s e d o n m u t a t i o n - s p e c i f i c C D 4 + T c e l l s i n a p a t i e n t w i t h e p i t h e l i a l c a n c e r . S c i e n c e 3 4 4 , 6 4 1 - 6 4 5 ( 2 0 1 4 ) 、 S a h i n U , e t a l . , P e r s o n a l i z e d R N A m u t a n o m e v a c c i n e s m o b i l i z e p o l y - s p e c i f i c t h e r a p e u t i c i m m u n i t y a g a i n s t c a n c e r , N a t u r e 5 4 7 ( 7 6 6 2 ) : 2 2 2 - 2 2 6 ( 2 0 1 7 ) を参照。本開示に関して、特に、その表現型が、頑強で耐久性のある応答を補助することができる場合、また、特に、抗原特異的 C D 8 + T 細胞が十分な数で提供される場合、養子細胞組成物が、かなりの数の抗原特異的 C D 8 + T 細胞のみを提供する必要があると考えられる。

30

40

#### 【0042】

種々の実施形態において、細胞組成物は、実質的に C D 28 + である。例えば、種々の実施形態において、細胞組成物は、少なくとも約 25 %、または少なくとも約 50 %、または少なくとも約 75 %、または少なくとも約 90 % が C D 28 + である。

#### 【0043】

50

種々の実施形態において、抗原特異的 T 細胞は、活性化すると多機能表現型を示す。例えば、活性化すると、T 細胞は、増殖及び記憶のマーカーである IL - 2 の細胞内染色、他の T 細胞を活性化し、MHC の記憶及び上方制御を誘導する IFN - 産生、炎症促進性マーカーである TNF - の産生、及びグランザイム放出及び細胞障害活性のマーカーである CD 1 0 7 A のうちの 2 つ以上について陽性である。種々の実施形態において、抗原特異的 T 細胞の少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、または少なくとも 8 0 % が、これらのマーカーのうちの少なくとも 3 つを示す。種々の実施形態において、抗原特異的 T 細胞の少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 7 0 %、または少なくとも 8 0 % が、これらのマーカーのうちの 4 つ全てを示す。いくつかの実施形態において、多機能性は、標的殺傷アッセイを用いて評価または定量化され、標的殺傷アッセイは、CD 8 + 細胞障害性 T 細胞が、MHC との複合体中でペプチド抗原を提示する標的細胞を溶解する能力を評価するものである。

10

【 0 0 4 4 】

種々の実施形態において、細胞組成物は、T 細胞をさらに含む。T 細胞は、それらの表面上に独自の T 細胞受容体 ( TCR ) を有する。T 細胞とは対照的に、T 細胞は、1 つの鎖と 1 つの鎖で構成される TCR を有する。T 細胞は、活性化のために抗原処理及びペプチドエピトープの主要組織適合遺伝子複合体 ( MHC ) の提示を必要としないと考えられる。T 細胞は、脂質抗原及びホスホ抗原の認識において役割を有する場合があります。抗ウイルス保護及び抗腫瘍保護において役割を果たすことができる。Kalyan and Kabelitz, Defining the nature of human T cells: a biographical sketch of the highly empathetic, Cellular & Molecular Immunology ( 2 0 1 3 ) 1 0 , 2 1 - 2 9 を参照。

20

T 細胞は、サイトカインの放出によって CD 8 + 細胞に対する補助を提供することができ、例えば、CD 8 + 細胞の活性化、増殖、及び分化に寄与する。さらに、造血幹細胞移植 ( H S C T ) の観点で T 細胞の臨床的意義が見出されており、特に、移植後のより高頻度の T 細胞は、望ましい転帰と関連していた。Berglund et al., Expansion of Gammadelta T cells from Cord Blood: A Therapeutic Possibility. Stem Cells International Vol. 2 0 1 8 を参照。

30

【 0 0 4 5 】

種々の実施形態において、細胞組成物は、少なくとも約 2 % の T 細胞、または少なくとも約 5 % の T 細胞を含む。いくつかの実施形態において、細胞組成物は、少なくとも約 1 0 % の T 細胞、または少なくとも約 2 0 % の T 細胞を含む。いくつかの実施形態において、細胞組成物は、少なくとも約 2 5 % の T 細胞、または少なくとも約 3 0 %、または少なくとも約 3 5 %、または少なくとも約 4 0 % の T 細胞、または少なくとも約 4 5 % の T 細胞を含む。これらの実施形態において、T 細胞は、V 1 及び V 2 細胞の片方または両方を含んでもよい。いくつかの実施形態において、T 細胞の一部は、CD 8 + である。種々の実施形態において、T 細胞は、主に CD 2 8 + である。

40

【 0 0 4 6 】

種々の実施形態に従って細胞組成物は、標的抗原 ( 複数可 ) ( 例えば、腫瘍関連抗原またはウイルス関連抗原 ) に特異的な CD 8 + 細胞の濃縮によって調製することができる。この細胞集合体は、供給源であるリンパ球中の主要なナイーブ細胞である場合であっても、培養物中で迅速に増幅し、本明細書に記載の細胞組成物に到達することができる。CD 4 + 細胞は、CD 4 + 細胞枯渇マイクロビーズを使用して、リンパ球から枯渇させることができる ( 抗原特異的濃縮の前または後 ) 。

【 0 0 4 7 】

CD 8 + 細胞の抗原特異的濃縮は、常磁性ビーズを使用して行い、細胞集合体を陽性選択

50

することができ、T細胞表面受容体の強力な磁気クラスタリングに起因して、ナイーブ細胞を活性化するという追加の利点を有し得る。例えば、常磁性ビーズまたはナノ粒子は、いくつかの実施形態において共刺激シグナル、例えば、CD28のアゴニスト（例えば、CD28の抗体アゴニスト）と共に、ペプチド抗原を提示する単量体または多量体（例えば、二量体）HLAリガンドを含んでいてもよい。これらの実施形態による例示的な方法は、WO2016/044530、PCT/US2017/22663、及びUS10,908,939に記載されており、これらはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0048】

いくつかの実施形態において、CD28+細胞も濃縮され、これは、抗原特異的な濃縮と同時であってもよい。CD28は、T細胞上で発現され、T細胞の活性化及び生存に必要とされる共刺激シグナルである。CD28は、ナイーブT細胞上で構成的に発現される唯一のB7受容体である。CD28共刺激を伴わないナイーブT細胞のTCRとMHC抗原複合体との会合によって、免疫不応答性であるT細胞を生じる場合がある。いくつかの実施形態において、CD28+細胞は濃縮されないが、CD28アゴニストは、濃縮プロセス中に可溶性形態で添加されるか、または非常磁性ビーズに接合したものとして添加される。いくつかの実施形態において、CD28（接合した形態または接合していない形態で）は、増幅期のために細胞を活性化するために、抗原特異的な濃縮の後に細胞に添加される。

10

#### 【0049】

種々の実施形態において、標的抗原に特異的なT細胞（例えば、aAPCまたはpAPCによって示されるペプチドの観点で）は、1～約100個の標的抗原、または1～約75個の標的抗原、または1～約50個の標的抗原、または1～約25個の標的抗原、または1～約20個の標的抗原、または1～約15個の標的抗原、または1～10個の標的抗原、または1～5個の標的抗原に特異的である。種々の実施形態において、少なくとも3個、または少なくとも4個、または少なくとも5個の標的抗原が存在する。異なる標的抗原は、いくつかの実施形態において、重複するペプチドエピトープを含むことができる。これらのペプチド抗原に特異的なT細胞をバッチで濃縮及び増幅することができ、細胞組成物の迅速な並列製造を可能にする。いくつかの実施形態において、組成物は、5～15個、または5～10個のペプチド抗原に特異的なT細胞を含有する。組成物中の標的ペプチド抗原に対するT細胞特異性は、当該技術分野で周知であるように、MHC多量体染色（例えば、二量体または四量体染色）によって定義される。

20

30

#### 【0050】

例えば、各aAPCが異なる別個の標的抗原を提示するナノ-aAPCのカクテルを使用して、複数の抗原に対してT細胞を同時に濃縮することができる。例えば、2～10個の抗原に特異的なT細胞を、リンパ球供給源から同時に濃縮することができる。この実施形態において、各々が異なるMHC-ペプチドを有するいくつかの異なるナノ-aAPCバッチを組み合わせ、これを使用して、目的の抗原の各々に対してT細胞を同時に濃縮する。得られたT細胞プールは、これらの抗原各々に対して活性化され、培養物中で一緒に増幅される。これらの抗原は、単一の治療介入、例えば、単一の腫瘍または悪性細胞に存在する複数の抗原に関連し得る。

40

#### 【0051】

標的ペプチド抗原は、一般的に、HLA-A、B、またはC分子複合体、及びいくつかの実施形態において、HLA-A2分子複合体による提示に好適である。

#### 【0052】

種々の実施形態において、標的ペプチド抗原は、腫瘍由来または腫瘍特異的な抗原を含め、腫瘍またはがん関連抗原である。腫瘍関連抗原に特異的なT細胞は、多くは非常に稀であり、多くの場合には、健康な個体の末梢血において検出不可能である。さらに、この細胞は、特にドナーTリンパ球を使用する場合、しばしばナイーブ表現型である。Quintarelli et al., Cytotoxic T lymphocytes d

50

irected to the preferentially expressed antigens of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. Blood 2008; 112: 1876-1885 を参照。これは、多くは、ウイルス特異的 T 細胞と腫瘍抗原特異的 T 細胞との間で観察される区別である。

【0053】

「腫瘍関連抗原」または「がん特異的抗原」としては、その由来となる腫瘍または悪性腫瘍細胞によって排他的に発現される独自の腫瘍またはがん抗原、多くの腫瘍で発現されるが、正常な成人組織では発現されない共通の腫瘍抗原（がん胎児抗原）、及びそこから腫瘍が生じた正常組織によっても発現される腫瘍特異的抗原が挙げられる。腫瘍関連抗原は、例えば、胚抗原、異常な翻訳後修飾を有する抗原、分化抗原、変異がん遺伝子もしくは腫瘍抑制因子の産物、融合タンパク質、またはがんウイルスタンパク質であってもよい。

10

【0054】

いくつかの実施形態において、標的ペプチド抗原は、血液癌、例えば、白血病、リンパ腫、または骨髄腫と関連するか、またはこれらに由来する 1 つ以上を含む。例えば、血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、症二球形白血病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、悪性皮膚 T 細胞、菌状息肉腫、非 MF 皮膚 T 細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、及び T 細胞を豊富に含む皮膚リンパ組織過形成であってもよい。他の実施形態において、標的ペプチド抗原は、黒色腫、結腸癌、十二指腸癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腺管癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、子宮内膜癌、精巣癌、胃癌、異形成性口腔粘膜、ポリポーシス、頭頸部癌、浸潤性口腔癌、非小細胞肺癌腫、小細胞肺癌腫、中皮腫、移行性及び扁平上皮細胞尿癌腫、脳癌、神経芽腫、ならびに神経膠腫を含む固形腫瘍に関連するか、またはこれらに由来する 1 つ以上を含む。

20

【0055】

種々の腫瘍関連抗原が、当該技術分野で既知である。がん胎児抗原及び胚抗原としては、がん胎児性抗原及びアルファ - フェトプロテイン（通常、発生中の胚でのみ高度に発現するが、それぞれ肝臓及び結腸の腫瘍によって頻りに高度に発現する）、MAGE - 1 及び MAGE - 3（黒色腫、乳癌、及び神経膠腫で発現する）、胎盤アルカリホスファターゼシアリル - ルイス X（腺癌で発現する）、CA - 125 及び CA - 19（胃腸、肝臓、及び婦人科の腫瘍で発現する）、TAG - 72（大腸腫瘍で発現する）、上皮糖タンパク質 2（多くの癌腫で発現する）、膵臓癌胎児抗原、5T4（胃癌腫で発現する）、アルファフェトプロテイン受容体（複数の腫瘍型、特に、乳腺腫瘍で発現する）、ならびに M2A（胚細胞新形成で発現する）が挙げられる。

30

【0056】

腫瘍関連分化抗原としては、チロシナーゼ（黒色腫で発現する）及び特定の表面免疫グロブリン（リンパ腫で発現する）が挙げられる。

【0057】

変異がん遺伝子または腫瘍抑制因子産物としては、両方とも多くの腫瘍型で発現する Ras 及び p53、Her - 2 / neu（乳癌及び婦人科のがんで発現する）、EGF - R、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、網膜芽細胞腫遺伝子産物、myc（肺癌に関連する）、ras、p53、乳房腫瘍に関連する非変異体、MAGE - 1、及び MAGE - 3（黒色腫、肺癌、及び他のがんに関連する）が挙げられる。融合タンパク質としては、慢性骨髄性白血病で発現する BCR - ABL が挙げられる。がんウイルスタンパク質としては、子宮頸癌腫にみられる HPV 16 型、E6、及び E7 が挙げられる。

40

【0058】

組織特異的抗原としては、メラントランスフェリン及び MUC 1（膵臓癌及び乳癌で発現する）、CD 10（以前は一般的な急性リンパ芽球性白血病抗原、または CALLA として知られる）、または表面免疫グロブリン（B 細胞白血病及びリンパ腫で発現する）、IL - 2 受容体の鎖、T 細胞受容体、CD 45 R、CD 4 + / CD 8 +（T 細胞白血病及

50

びリンパ腫で発現する)、前立腺特異的抗原及び前立腺酸 - ホスファターゼ(前立腺癌腫で発現する)、GP100、MelanA/Mart-1、チロシナーゼ、gp75/brown、BAGE、及びS-100(黒色腫で発現する)、サイトケラチン(種々の癌腫で発現する)、ならびにCD19、CD20、及びCD37(リンパ腫で発現する)が挙げられる。

【0059】

腫瘍関連抗原としては、改変された糖脂質及び糖タンパク質抗原、例えば、ノイラミン酸を含有する糖スフィンゴ脂質(例えば、GM2及びGD2、黒色腫及びいくつかの脳腫瘍で発現する)、癌腫において以上に発現し得る血液群抗原、特に、T及びシアル酸化Tn抗原、及びムチン、例えば、CA-125及びCA-19-9(卵巣癌腫で発現される)、または不十分なグリコシル化MUC-1(乳房及び膵臓癌腫で発現する)も挙げられる。

10

【0060】

例えば、いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原、例えば、NY-ESO-1、MAGE-A10、及びMUC-1抗原のうち1つ以上が、膀胱癌に関連している。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が脳癌に関連しており、NY-ESO-1、サバイピン、及びCMV抗原のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が乳癌に関連しており、MUC-1、スリビン(Survivin)、WT-1、HER-2、及びCEA抗原のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が子宮頸癌に関連しており、HPV抗原を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が大腸癌に関連しており、NY-ESO-1、サバイピン、WT-1、MUC-1、及びCEA抗原のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が食道癌に関連しており、NY-ESO-1抗原を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が頭頸部癌に関連していてもよく、HPV抗原を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、標的抗原が腎臓癌または肝臓癌に関連しており、NY-ESO-1抗原を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、標的抗原が肺癌に関連しており、NY-ESO-1、サバイピン、WT-1、MAGE-A10、及びMUC-1抗原のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が黒色腫に関連しており、NY-ESO-1、サバイピン、MAGE-A10、MART-1、及びGP-100のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上のペプチド抗原が卵巣癌に関連しており、NY-ESO-1、WT-1、及びメソテリン抗原のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が前立腺癌に関連しており、サバイピン、hTERT、PSA、PAP、及びPSMA抗原のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、標的抗原が肉腫に関連しており、NY-ESO-1抗原を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原がリンパ腫に関連しており、EBV抗原を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原が多発性骨髄腫に関連しており、NY-ESO-1、WT-1、XBP1-US、XBP1-SP、CD138、CS1(SLAMF7)、及びSOX2抗原のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、多発性骨髄腫と関連する標的抗原は、US9,096,681に開示されるペプチド抗原のうち2個以上(または3個、4個、5個、または6個)であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。抗原エピトープを含む例示的なペプチドとしては、XBP1非スプライス(UN)185-193、XBP1-US184-192、XBP1スプライス(SP)223-231、XBP1-SP367-375、CD138265-273、CD138260-268、CS1240-248、CS1239-247、NY-ESO1157-165A、及びSOX2118-127が挙げられる。いくつかの実施形態において、標的抗原は、NY-ESO-1、WT-1、SOX-2、CD138、及びCS1を含む。いくつかの実施形態において、標的抗原は、NY-ESO-1、WT-1、SOX-2、CD1

20

30

40

50

38、CS1、及びXBP1-US及び/またはXBP1-SPを含む。いくつかの実施形態において、ペプチド抗原は、NY-ESO-1、WT-1、及びSOX-2を含む。表2を参照。

【0061】

いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原は、急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群に関連しており、サバイビン、WT-1、PRAME、RHAMM、PR3、及びサイクリンA1抗原のうち1つ以上（そのうち1つ、2つ、3つ、4つ、または5つを含む）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、標的抗原は、以下の表1からの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または全ての標的抗原を含む。

10

【表1】

表1：例示的なAML標的ペプチド抗原

抗原	ペプチド名称/位置	配列	配列番号
WT-1	126-134	RMFPNAPYL	配列番号1
	235-243	CMTWNQMNL	配列番号2
	37-45	VLDFAAPGA	配列番号3
	187-195	SLGEQQYSV	配列番号4
Pr ame	P100	VLDGLDVLL	配列番号5
	P435	NLTHVLYPV	配列番号6
	P142	SLYSFPEPEA	配列番号7
	P300	ALYVDSLFFL	配列番号8
	P425	SLLQHLLIGL	配列番号9
サバイビン	ELT 95-104	ELTLGEFLKL	配列番号10
	LDR 104-113	LDRERAKNKI	配列番号11
サイクリンA1	227-235	FLDRFLSCM	配列番号12
	341-351	SLIAAAAFCLA	配列番号13

20

30

【0062】

いくつかの実施形態において、1つ以上の標的抗原は、XBP1-US、XBP1-SP、CD138、CS1、NY-ESO1、SOX2、EBV、インフルエンザ、CMV、RHAMM、PR3、Mart-1/Melan A、gp100、CMVpp65、及びインフルエンザマトリックスタンパク質M1抗原のうち1つ以上を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、標的抗原は、以下の表2からの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の標的抗原を含み、これらは、多発性骨髄腫、黒色腫、または様々なウイルス性疾患もしくは感染症を標的とするのに有用である。

40

50

## 【表 2】

表 2：例示的な標的ペプチド抗原

抗原	ペプチド 名称/位置	配列	配列番号	制限
XBP1-US	184-192	YISPWILAV	配列番号14	-
XBP1-SP	367-375	YLFPQLISV	配列番号15	-
CD138	260-268	GLVGLIFAV	配列番号16	-
CS1	239-247	SLFVLGLFL	配列番号17	-
NY-ESO1	157-165A	SLLMWITQA	配列番号18	-
SOX2	118-127	ALSPASSRSV	配列番号19	-
LAMP2	-	CLGGLLTMV	配列番号20	A2
LAMP2	-	FLYALALLL	配列番号21	A2
BMLF1	-	GLCTLVAML	配列番号22	A2
BRLF1	-	YVLDHLIVV	配列番号23	A2
EBNA3	-	LLDFVRFMGV	配列番号24	A2
LMP1	-	YLQQNWWTL	配列番号25	A2
LMP2	-	IYVLVMLVL	配列番号26	A24
BRLF1	-	TYPVLEEMF	配列番号27	A24
BMLF1	-	DYNFVKQLF	配列番号28	A24
EBNA3A	-	RYSIFFDYM	配列番号29	A24
EBNA3B	-	TYSAGIVQI	配列番号30	A24
EBNA-3A	-	RPPIFIRRL	配列番号31	B7
EBNA-3C	-	QPRAPIRPI	配列番号32	B7
BMRF1	-	RPQGGSRPEFVKL	配列番号33	B7
M1	-	GILGFVFTL	配列番号34	A2
PB1	-	QPEWFRNVL	配列番号35	B7
NP	-	SPIVPSFDM	配列番号36	B7
pp65	341-349	QYDPVAALF	配列番号37	A24
pp65	113-121	VYALPLKML	配列番号38	A24
IE-1	248-256	AYAQKIFKI	配列番号39	A24
pp65	417-426	TPRVTTGGGAM	配列番号40	B7
pp65	265-275	RIPHERNGFTVL	配列番号41	B7
RHAMM	R3	ILSLELMKL	配列番号42	-
RHAMM	R5	SLEENIVIL	配列番号43	-
RHAMM	R1	KLLEYIEEI	配列番号44	-
RHAMM	R2	KLQEEELNKV	配列番号45	-
RHAMM	R8	KLKGKEAEL	配列番号46	-
PR3	PR-1 <sub>169-177</sub>	VLQEELNVTV	配列番号47	-
Mart-1/ MelanA	Mart-1 <sub>A27L</sub>	ELAGIGILTV	配列番号48	-
gp100	G209-2M, gp100 (209-217)	IMDQVPFSV	配列番号49	-
NY-ESO1	157-165	SLLMWITQC	配列番号50	-
NY-ESO1	165A	SLLMWITQA	配列番号51	-
CMVpp65	pp65	NLVPMVATV	配列番号52	-
XBP1-UN	185-193	ISPWILAVL	配列番号53	A24
XBP1-SP	223-231	VYPEGSSL	配列番号54	A24
CD138	265-273	IFAVCLVGF	配列番号55	A24
CS1	240-248	LFVLGLFLW	配列番号56	A24

10

20

30

40

## 【0063】

いくつかの実施形態において、1つ以上の標的ペプチド抗原は、ネオ抗原である。例えば、いくつかの実施形態において、患者に特異的なネオ抗原が同定され、aAPCをローディングするために合成される。いくつかの実施形態において、3~10個のネオ抗原が、患者の悪性腫瘍の遺伝子解析（例えば、悪性腫瘍細胞の核酸配列決定によって）、次いで予測バイオインフォマティクスによって同定される。いくつかの実施形態において、抗原は、天然の変異していないがん抗原であり、その多くは既知である。

## 【0064】

種々の実施形態において、標的ペプチド抗原のうちの少なくとも1つが、低頻度前駆T細胞

50

胞によって認識される。これらの実施形態によれば、本発明は、養子療法のためのこれらの細胞の迅速な活性化及び増幅を可能にする。

【0065】

いくつかの実施形態において、標的ペプチド抗原は、病原体、例えば、ウイルス、細菌、真菌、または寄生虫病原体と関連するか、またはこれらに由来する少なくとも1つを含む。例えば、少なくとも1つのペプチド抗原は、HIV、肝炎（例えば、A、B、C、またはD）CMV、エプスタインバーウイルス（EBV）、インフルエンザ、ヘルペスウイルス（例えば、HSV1または2、または水痘帯状疱疹）、及びアデノウイルスと関連し得る。例えば、CMVは、臓器移植患者にみられる最も一般的なウイルス性病原体であり、骨髄移植または末梢血幹細胞移植を受ける患者における罹患率及び死亡率の主な原因である。このことは、これらの患者の免疫不全状態に起因するものであり、血清反応陽性患者における潜在ウイルスの再活性化または血清反応陰性個体における日和見感染を可能にする。これらの実施形態において、患者は、病原体抗原に特異的なT細胞を含む養子免疫療法を受けてもよい。この方法は、移植手技の開始前に、患者または適切なドナーに由来するウイルス特異的CTLの生成を伴い得る。

10

【0066】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つの標的抗原は、原虫、細菌、真菌（単細胞及び多細胞の両方）、ウイルス、プリオン、細胞内寄生虫、蠕虫、及び他の感染剤に関連する抗原を含む、病原体関連抗原である。

【0067】

細菌抗原としては、グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌、グラム陰性細菌、嫌気性細菌、例えば、Actinomycetaceae、Bacillaceae、Bartonellaceae、Bordetellae、Captophagaceae、Corynebacteriaceae、Enterobacteriaceae、Legionellaceae、Micrococcaceae、Mycobacteriaceae、Nocardiaceae、Pasteurellaceae、Pseudomonadaceae、Spirochaetaceae、Vibrionaceaeの科の生物、ならびにAcinetobacter、Brucella、Campylobacter、Erysipelothrix、Ewingella、Francisella、Gardnerella、Helicobacter、Levinea、Listeria、Streptobacillus及びTropherymaの属の生物の抗原が挙げられる。

20

30

【0068】

原虫感染剤の抗原としては、malarial plasmodia、Leishmania種、Trypanosoma種及びSchistosoma種の抗原が挙げられる。

【0069】

真菌抗原としては、Aspergillus、Blastomyces、Candida、Coccidioides、Cryptococcus、Histoplasma、Paracoccidioides、Sporothrix、Mucorales目の生物、黒色真菌症及びマイセトーマを誘導する生物、ならびにTrichophyton、Microsporum、Epidermophyton、及びMalasseziaの属の生物の抗原が挙げられる。

40

【0070】

ウイルスペプチド抗原としては、限定されないが、アデノウイルス、ヘルペス単純ウイルス、パピローマウイルス、呼吸器多核体ウイルス、ポックスウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、EBV、肝炎、及びCMVの抗原が挙げられる。特に有用なウイルスペプチド抗原としては、HIVタンパク質、例えば、HIV gagタンパク質（限定されないが、膜アンカー（MA）タンパク質、コアカプシド（CA）タンパク質及びヌクレオカプシド（NC）タンパク質を含む）、HIVポリメラーゼ、インフルエンザマトリックス（M1）タンパク質及びインフルエンザウイルスヌクレオカプシド（NP）タンパク質

50

、 B 型肝炎表面抗原 ( H B s A g )、 B 型肝炎コアタンパク質 ( H B c A g )、 肝炎タンパク質 ( H B e A g )、 B 型肝炎 D N A ポリメラーゼ、 C 型肝炎抗原などが挙げられる。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態において、標的ペプチド抗原は、 1 つ以上の腫瘍関連抗原と、 1 つ以上のウイルス関連抗原 ( 例えば、 C M V、 E B V、 インフルエンザ、またはアデノウイルス ) とを含み、 H S C T 後の回復を複雑にする一般的な病原体から保護しつつ、抗腫瘍応答を提供する。

【 0 0 7 2 】

H S C T を受けた患者は、免疫不全状態を考慮すると、感染症の特別なリスクにさらされる。これらの患者の免疫不全状態が、血清反応陽性患者における潜在ウイルスの再活性化または血清反応陰性個体における日和見感染を可能にする。例えば、移植後リンパ増殖性疾患 ( P T L D ) は、移植患者のかなりの割合で発生し、エプスタインバーウイルス ( E B V ) 感染から生じる。 E B V 感染は、米国において、成人集合の約 9 0 % に存在すると考えられる。活性ウイルス複製及び感染は、免疫系によって抑制されるが、 C M V の場合と同様に、移植療法によって免疫不全状態にされた個体は、制御する T 細胞集合体を失い、ウイルスの再活性化を可能にしてしまう。このことは、移植プロトコルの深刻な障害を示す。 E B V は、種々の血液癌及び非血液癌における腫瘍促進にも関与し得る。

【 0 0 7 3 】

さらに他の実施形態において、細胞組成物は、腫瘍関連抗原に特異的な T 細胞を含み、病原体関連 T 細胞が、バースタンダー細胞として提供される。具体的には、 H L A - ペプチド複合体及び抗 C D 2 8 を両方とも用いた選択に基づいて C D 8 + T 細胞を濃縮することによって、バースタンダー細胞が濃縮され、特に、抗原特異的な活性化を引き起こすことなく、これらの細胞の非特異的な増幅の一部を引き起こすことが可能な T 細胞成長因子カクテルを用いる場合に、増幅される。これらの実施形態において、組成物の大部分が、標的ペプチドに特異的な T 細胞であるが ( 例えば、 5 % ~ 7 5 %、または 1 0 ~ 5 0 % )、残りの T 細胞は、共通の病原体に対する免疫系のいくつかの再構成を提供し、このことは、特に、移植後に有益である。例えば、組成物は、 C M V、 E B V、 インフルエンザ、及びアデノウイルスに特異的な T 細胞を含んでいてもよい。各場合において、病原体特異的な T 細胞は、組成物の 0 . 1 % ~ 約 4 % で存在していてもよい。

【 0 0 7 4 】

種々の実施形態において、本発明は、抗原特異的な C D 8 + T 細胞の濃縮及び増幅によって調製される組成物を伴う。前駆 T 細胞は、患者から、または好適な H L A 適合ドナーから得ることができる。供給源の T 細胞は、新鮮な試料または凍結した試料のいずれかであってもよい。前駆 T 細胞は、末梢血単核細胞 ( P B M C )、骨髄、リンパ節組織、脾臓組織、パフィーコート画分、及び腫瘍を含む、 W B C を含むいくつかの供給源から得ることができる。いくつかの実施形態において、前駆 T 細胞は、当業者に知られる任意の数の技法を使用して、対象から回収した血液単位から得られる。例えば、個体の循環血液由来の前駆 T 細胞は、アフレスリスまたは白血球分離によって得ることができる。アフレスリス産物は、典型的には、 T 細胞及び前駆 T 細胞、単球、顆粒球、 B 細胞、他の有核白血球細胞、赤血球細胞、及び血小板を含むリンパ球を含有する。白血球分離は、白血球細胞が血液試料から分離される実験手順である。

【 0 0 7 5 】

アフレスリスにより回収された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、その後の処理工程のために、細胞を適切な緩衝液または培地に入れてもよい。洗浄工程は、当業者に既知の方法によって、例えば、半自動「フロースルー」遠心分離機の使用によって達成することができる。洗浄後、細胞は、種々の生体適合性緩衝液、例えば、 C a を含まず、 M g を含まない P B S に再懸濁されてもよい。あるいは、アフレスリス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁させてもよい。

【 0 0 7 6 】

所望な場合、前駆 T 細胞は、赤血球細胞を溶解させ、例えば、 P E R C O L L ( 商標 ) グ

10

20

30

40

50

ラジエントによる遠心分離によって単球を枯渇させることによって、末梢血リンパ球から単離することができる。

【0077】

特定の実施形態において、白血球は、白血球分離によって回収され、その後、例えば、CD4+細胞の試料を枯渇させ、及び/またはCD8+細胞を陽性濃縮することによって、CD8+T細胞を濃縮してもよい。いくつかの実施形態において、NK細胞などの他の細胞型が枯渇している。次いで、CD8濃縮された細胞を、抗原特異的T細胞についてさらに濃縮してもよい。

【0078】

種々の実施形態において、免疫細胞（例えば、CD8+T細胞）を含む試料を、磁気特性を有する人工抗原提示細胞（aAPC）と接触させる。常磁性材料は、磁場に対して小さな陽性感受性を有する。これらの材料は、磁場によって引き寄せられ、外的な磁場が除去されると、この材料は、磁気特性を保持しない。例示的な常磁性材料としては、限定されないが、マグネシウム、モリブデン、リチウム、タンタル、及び酸化鉄が挙げられる。磁気濃縮に好適な常磁性ビーズは、市販されている（DYNABEADS（商標）、MACS MICROBEADS（商標）、Miltenyi Biotec）。いくつかの実施形態において、aAPC粒子は、鉄デキストランビーズ（例えば、デキストランコーティングされた酸化鉄ビーズ）である。

【0079】

抗原提示複合体は、抗原結合溝を含み、一般的にMHCクラスIであり、連結されるか、またはつながれ、二量体または多量体のMHCを提供することができる。いくつかの実施形態において、MHCは単量体であるが、ナノ粒子上でのそれらの密接な会合は、アビディティ及び活性化に十分である。いくつかの実施形態において、MHCは二量体である。二量体MHCクラスIリガンドは、免疫グロブリン重鎖配列への融合によって構築することができ、次いで、（会合する軽鎖の有無にかかわらず）1つ以上のジスルフィド結合によって会合する。MHC多量体は、ペプチドまたは化学リンカーを介した直接的な連結によって作製することができ、またはビオチン部分を介したストレプトアビジンとの会合による多量体であってもよい。いくつかの実施形態において、抗原提示複合体は、免疫グロブリン配列との融合を伴うMHCクラスI複合体である。

【0080】

免疫グロブリン配列を有するMHCクラスI分子複合体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,268,411号に記載される。これらのMHCクラスI分子複合体は、免疫グロブリン重鎖の末端で構造的にインタクトな様式で形成され得る。抗原ペプチドが結合しているMHCクラスI分子複合体は、抗原特異的リンパ球受容体（例えば、T細胞受容体）に安定して結合することができる。種々の実施形態において、免疫グロブリン重鎖配列は、全長ではないが、Igヒンジ領域と、CH1、CH2、及び/またはCH3ドメインのうちの一つ以上とを含む。Ig配列は、可変領域を含んでいてもよく、または含んでいなくてもよいが、可変領域配列が存在する場合、可変領域は、完全であってもよく、または部分的であってもよい。複合体は、免疫グロブリン軽鎖をさらに含んでいてもよい。可変鎖配列を欠く（及び任意の軽鎖を欠く）MHCクラスIリガンド（例えば、HLA-Ig）を、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWO2016/105542に記載されるように、粒子への部位特異的接合と共に使用してもよい。

【0081】

例示的なMHCクラスI分子複合体は、少なくとも2つの融合タンパク質を含む。第1の融合タンパク質は、第1のMHCクラスI鎖と、第1の免疫グロブリン重鎖（またはヒンジ領域を含むその一部）とを含み、第2の融合タンパク質は、第2のMHCクラスI鎖と、第2の免疫グロブリン重鎖（またはヒンジ領域を含むその一部）とを含む。第1及び第2の免疫グロブリン重鎖が会合し、MHCクラスI分子複合体を形成し、これは2つのMHCクラスIペプチド結合溝を含む。免疫グロブリン重鎖は、IgM、IgD、Ig

10

20

30

40

50

G 1、I g G 3、I g G 2、I g G 2、I g G 4、I g E、またはI g Aの重鎖であってもよい。いくつかの実施形態において、I g G重鎖を使用して、M H CクラスI分子複合体を形成する。多価M H CクラスI分子複合体が望ましい場合、I g MまたはI g A重鎖を使用して、それぞれ五価分子または四価分子を提供することができる。

【0082】

例示的なクラスI分子は、H L A - A、H L A - B、H L A - C、H L A - Eを含み、これらは、個別に、または任意の組み合わせで使用され得る。いくつかの実施形態において、抗原提示複合体は、H L A - A 2リガンドである。本明細書で使用される場合、M H Cという用語は、各事例においてH L Aによって置き換えることができる。

【0083】

いくつかの実施形態において、免疫グロブリン配列は、ヒト化モノクローナル抗体配列である。

【0084】

a A P Cは、抗C D 2 8リガンドなどの「シグナル2」を含有し得る。シグナル2は、一般的に、T細胞に影響を与える分子であり、すなわち、前駆T細胞または抗原特異的T細胞に対して生物学的効果を有する分子である。特定の実施形態において、シグナル2は、T細胞共刺激分子である。T細胞共刺激分子は、抗原特異的T細胞の活性化に寄与する。かかる分子としては、限定されないが、C D 2 8（抗体を含む）、C D 8 0（B 7 - 1）、C D 8 6（B 7 - 2）、B 7 - H 3、4 - 1 B B、4 - 1 B B L、C D 2 7、C D 3 0、C D 1 3 4（O X - 4 0 L）、B 7 h（B 7 R P - 1）、C D 4 0に特異的に結合する分子、L I G H T、H V E Mに特異的に結合する抗体、C D 4 0 Lに特異的に結合する抗体、及びO X 4 0に特異的に結合する抗体が挙げられる。いくつかの実施形態において、共刺激分子（シグナル2）は、抗体（例えば、モノクローナル抗体）またはその一部、例えば、F（a b'）2、F a b、s c F v、または一本鎖抗体、または他の抗原結合断片である。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト化モノクローナル抗体、もしくは抗原結合活性を有するその一部であるか、または完全ヒト抗体、もしくは抗原結合活性を有するその一部である。

【0085】

（同じまたは別個のナノ粒子上で）用いられ得る共刺激リガンドの組み合わせとしては、抗C D 2 8 / 抗C D 2 7及び抗C D 2 8 / 抗4 1 B Bが挙げられる。これらの共刺激リガンドの比は、増幅をもたらすように変化させることができる。

【0086】

例示的なシグナル1及びシグナル2リガンドは、W O 2 0 1 4 / 2 0 9 8 6 8に記載されており、遊離スルフヒドリル（例えば、対形成していないシステイン）を有し、その結果、定常領域が、適切な化学官能性を有するナノ粒子支持体と連結し得るリガンドを記載している。

【0087】

ナノa A P Cに有用な接着分子を使用して、T細胞またはT細胞前駆体へのナノa A P Cの接着を媒介することができる。有用な接着分子として、例えば、I C A M - 1及びL F A - 3が挙げられる。

【0088】

いくつかの実施形態において、シグナル1は、ペプチド - H L A - A 2複合体によって提供され、シグナル2は、B 7 . 1 - I gまたは抗C D 2 8によって提供される。例示的な抗C D 2 8モノクローナル抗体は、9 . 3 m A bであり（T a n e t a l . , J . E x p . M e d . 1 9 9 3 1 7 7 : 1 6 5）、特定の実施形態においてヒト化されていてもよく、及び/または完全なインタクト抗体またはその抗原結合断片としてビーズに接合されてもよい。

【0089】

磁気活性化は、いくつかの実施形態において、2分間～5時間、または5分間～2時間行われ、その後、少なくとも5日間、2週間まで、または3週間まで、培養物中で増幅させ

10

20

30

40

50

てもよい。いくつかの実施形態において、磁気活性化は、少なくとも2分間であるが、30分未満、または15分未満（例えば、約5または10分間）起こる。得られるCD8+ T細胞は、表現型が特性決定され、Tメモリ幹細胞（T<sub>scm</sub>）の存在、及び高いセントラル及びエフェクターメモリ表現型を確認してもよい。

#### 【0090】

いくつかの実施形態は、増幅中にT細胞成長因子を使用し、このことが、T細胞の増殖及び/または分化に影響を与える。T細胞成長因子の例としては、サイトカイン（例えば、インターロイキン、インターフェロン）及びスーパー抗原が挙げられる。所望な場合、サイトカインは、融合タンパク質を含む分子複合体中に存在していてもよく、またはaAPCによってカプセル化されていてもよく、または可溶性形態で提供されてもよい。特に有用なサイトカインとしては、MIP-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、INF-、及びCXCL10が挙げられる。いくつかの実施形態において、成長因子は、MIP-1、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、及びINF-からの3個、4個、5個、または6個を含む。これらまたは他の実施形態において、細胞は、MIP-1、IL-1、IL-6、及びIL-10から選択される1つ、2つ、または3つのサイトカインを含むサイトカイン存在下、培養物中で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-7及び/またはIL-21及び/またはIL-15の存在下で培養されない。細胞は、培養物中で1~4週間、例えば、約2週間（約14日）、または約3週間、増幅させることができる。

#### 【0091】

いくつかの実施形態において、細胞は、4~8個のサイトカインの存在下、培養物中で増幅され、T細胞増幅（抗原特異的T細胞増幅を含む）、活性化、及びメモリ表現型の間での均衡を達成する。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-4存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-4及びIL-6存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-4及びIL-1存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-4、IL-6、及びIL-1存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-2、IL-4及びIL-6存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1存在下、培養物中で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-10存在下でさらに増幅される。種々の実施形態において、これらのサイトカインは、人工または天然の抗原提示細胞と組み合わせて使用され、抗原特異的T細胞を増幅させる。

#### 【0092】

いくつかの実施形態において、成長因子は、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、IL-1と、任意選択でIL-10からなるか、またはこれらから本質的になる。

#### 【0093】

いくつかの実施形態において、IL-2は、培養開始時に、1mLあたり10~200国際単位（IU）、例えば、約20~約100IU/mL、または約20~約60IU/mLで存在する。いくつかの実施形態において、IL-2は、培養開始時に、約30~約50IU/mL（例えば、約40IU/mL）で存在する。IL-2のIU（86/500NIBSC）は、例えば、Gearing and Bird（1987）のLymphokines and Interferons, A Practical Approach. Clemens, M J et al.（編集）：IRL Press. 295によって記載されるように、増殖アッセイを用いて（例えば、CTL-2細胞株を用いて）決定することができる。いくつかの実施形態において、IL-2は、培養開始時に、約2~約25ng/mLで、または約2~約15ng/mL、例えば、約5~約15ng/mLで存在する。

#### 【0094】

これらまたは独立した実施形態において、IL-4は、培養開始時に、1mLあたり0 .

2 ~ 25 国際単位 (IU)、例えば、約 0.5 ~ 約 10 IU/mL、または約 0.5 ~ 約 5 IU/mL で存在する。いくつかの実施形態において、IL-4 は、培養開始時に、約 1 IU/mL で存在する。IL-4 の IU (88/656 NIBSC) は、例えば、Kitamura T. et al., (1991) IL-1 up-regulates the expression of cytokine receptors on a factor-dependent human hemopoietic cell line, TF-1. Int. Immunol. 3: 571-577 によって記載されるように、増殖アッセイを用いて (例えば、TF-1 細胞株を用いて) 決定することができる。いくつかの実施形態において、IL-4 は、培養開始時に、約 0.2 ~ 約 2 ng/mL、例えば、約 0.2 ~ 約 1 ng/mL (例えば、約 0.5 ng/mL) で存在する。

10

【0095】

これらまたは独立した実施形態において、IL-6 は、培養開始時に、1 mL あたり 10 ~ 200 国際単位 (IU)、例えば、約 25 ~ 約 100 IU/mL、例えば、25 ~ 75 IU/mL で存在してもよい。いくつかの実施形態において、IL-6 は、培養開始時に、約 40 ~ 約 60 IU/mL (例えば、約 50 IU/mL) で存在する。IL-6 の IU (89/548 NIBSC) は、例えば、Gaines-Das RE and Poole S. (1993) The international standard for interleukin-6. Evaluation in an international collaborative study. J. Immunol. Methods 160: 147-153 に記載されるように、増殖アッセイを使用して (例えば、B9 細胞株を使用して) 定義することができる。いくつかの実施形態において、IL-6 は、培養開始時に、約 0.2 ~ 約 10 ng/mL、例えば、約 0.2 ~ 約 5 ng/mL (例えば、約 0.2 ~ 1 ng/mL、または約 0.5 ~ 2 ng/mL) で存在する。

20

【0096】

これらまたは独立した実施形態において、インターフェロンガンマ (INF- $\gamma$ ) は、培養開始時に、1 mL あたり 10 ~ 200 国際単位 (IU)、例えば、約 20 ~ 約 100 IU/mL、例えば、20 ~ 60 IU/mL で存在してもよい。いくつかの実施形態において、INF- $\gamma$  は、培養開始時に、約 30 ~ 約 50 IU/mL (例えば、約 40 IU/mL) で存在する。INF- $\gamma$  の IU (87/586 NIBSC) は、例えば、Meager A. (1987) の Lymphokines and interferons, a Practical Approach. Clemens, MJ, et al. (編集): IRL Press. 129 によって記載されるように、抗ウイルスアッセイを用いて (例えば、EMC で感染した HeLa 細胞を用いて) 定義することができる。いくつかの実施形態において、INF- $\gamma$  は、培養開始時に、約 0.5 ~ 約 20 ng/mL、例えば、約 0.5 ~ 約 10 ng/mL、または約 0.5 ~ 約 5 ng/mL、または約 1 ~ 約 10 ng/mL (例えば、1 ~ 5 ng/mL) で存在する。

30

【0097】

IL-1 は、培養開始時に、1 mL あたり 5 ~ 100 国際単位 (IU)、例えば、約 10 ~ 約 50 IU/mL、例えば、約 10 ~ 30 IU/mL で存在してもよい。いくつかの実施形態において、IL-1 は、培養開始時に、約 10 ~ 約 20 IU/mL (例えば、約 15 IU/mL) で存在する。IL-1 の IU (86/680 NIBSC) は、例えば、Poole, S. and Gaines-Das, RE (1991) The international standards for interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. Evaluation in an international collaborative study. J. Immunol. Methods 142: 1-13 に記載されるように、増殖アッセイを使用して (例えば、D.10.G4.1 細胞株を使用して) 定義することができる。いくつかの実施形態において、IL-1 は、培養開始時に、約 0.1 ~ 5 ng/mL で、または約 0.2 ~ 約 5 ng/mL、例えば、約 0.2 ~ 約 2 ng/mL、または約 0.2 ~ 約 1 ng/mL で存在する。

40

50

## 【0098】

種々の実施形態において、細胞は、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1を含むか、またはこれらからなる成長因子カクテルの存在下で培養される。いくつかの実施形態において、IL-2及びINF-の相対活性（それぞれのIUによって定義される）は、約0.5：1～約1：0.5（例えば、約1：1）である。これらまたは独立した実施形態において、IL-2及びIL-6の相対活性（それぞれのIUによって定義される）は、約0.5：1～約1：0.5である。これらまたは独立した実施形態において、IL-2、IL-6、及び/またはIFN-に対するIL-1の相対活性（それぞれのIUによって定義される）は、1：4～1：2（例えば、約1：3）である。これらまたは独立した実施形態において、IL-2、IL-6、及び/またはIFN-に対するIL-4の相対活性（それぞれのIUによって定義される）は、1：30～1：60である。これらまたは独立した実施形態において、IL-1に対するIL-4の相対活性（それぞれのIUによって定義される）は、約1：5～約1：25、例えば、約1：10～約1：20である。

10

## 【0099】

いくつかの実施形態において、培養開始時の各成長因子（IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1）の特異的活性（単位IU）は、培養物中の全ての成長因子の合計IUが100%とみなされるときに割合として示すことができる。例えば、いくつかの実施形態において、培養物中の各成長因子の割合は、以下の通りであってもよい。20%～40%のIL-2（例えば、20～30%のIL-2）、0.5%～5%のIL-4（例えば、1～3%のIL-4）、25%～50%のIL-6（例えば、30～40%のIL-6）、20%～40%のIFN-（例えば、20～30%のIFN-）、及び5%～20%のIL-1（例えば、5～15%のIL-1）。

20

## 【0100】

a APCナノ粒子は、任意の材料から作製することができ、材料は、所望の磁気特性について適切に選択することができ、例えば、鉄、ニッケル、コバルト、または希土類金属の合金などの金属を含んでもよい。常磁性材料には、マグネシウム、モリブデン、リチウム、タンタル、及び酸化鉄も含まれる。材料（細胞を含む）の濃縮に好適な常磁性ビーズは、市販されており、鉄デキストランビーズ、例えば、デキストランコーティングされた酸化鉄ビーズが含まれる。磁気特性が必要とされない本発明の態様において、ナノ粒子は、セルロース、セラミック、ガラス、ナイロン、ポリスチレン、ゴム、プラスチック、またはラテックスなどの非金属または有機（例えば、ポリマー）材料から作製することもできる。ナノ粒子の調製のための例示的な材料において、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）（PLGA）またはPLA、及びこれらのコポリマーであり、これらの実施形態と関連して使用され得る。使用され得るポリマー及びコポリマーを含む他の材料としては、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT/US2014/25889に記載されるものが挙げられる。

30

## 【0101】

種々の実施形態において、粒子は、約10～約500nm以内、または約40～約400nm以内、または約40nm～200nm以内のサイズ（例えば、平均直径）を有する。磁気クラスタリングの場合、ナノ粒子が、いくつかの実施形態において、10～250nm、または50～200nm、または80～200nm、または20～100nmの範囲のサイズ（平均直径）を有することが好ましい。細胞-ナノ粒子界面における受容体-リガンド相互作用は、十分に理解されていない。しかしながら、ナノ粒子結合及び細胞活性化は膜空間組織に対して感受性であり、これはT細胞活性化中に特に重要であり、磁場を使用してクラスター結合したナノ粒子を操作して活性化を増強することができる。例えば、T細胞活性化は、持続的に増強されたナノスケールTCRクラスタリングの状態を誘導し、ナノ粒子は、より大きな粒子がそうでない方法でこのクラスタリングに感受性を有する。

40

50

## 【0102】

さらに、TCRクラスターとのナノ粒子相互作用が、受容体トリガーを強化するために利用され得る。T細胞活性化は、シグナル伝達タンパク質の凝集によって媒介され、数百ナノメートルにわたって「シグナル伝達クラスター」が存在し、最初はT細胞 - APC接触部位の周辺に形成され、内側に移動する。本明細書に記載されるように、外部磁場を使用して、抗原特異的T細胞（稀少なナイーブ細胞を含む）を濃縮し、TCRに結合した磁気ナノAPCの凝集を促進することができ、TCRクラスターの凝集が生じ、ナイーブT細胞の活性化が増強された。磁場は、常磁性粒子に対して適切に強い力を発揮することができるが、それ以外は生物学的に不活性であり、粒子挙動を制御するための強力なツールとなる。常磁性ナノ - APCに結合したT細胞は、外部から適用される磁場の存在下で活性化される。ナノ - APC自体が磁化され、磁場源及び磁場内の近くのナノ粒子に引き寄せられ、ピーズ、したがってTCR凝集が誘導され、APC媒介性活性化を促進する。

10

## 【0103】

活性化化学を使用して、ナノ粒子の表面に対する分子の特異的かつ安定な接続を可能にすることができる。タンパク質を官能基に接続するために使用することができる多くの方法がある。例えば、一般的な架橋剤であるグルタルアルデヒドを使用して、2工程プロセスでタンパク質アミン基をアミノ化ナノ粒子表面に接続することができる。得られた結合は、加水分解に安定である。他の方法としては、タンパク質上のアミンと反応するn - ヒドロスクシンイミド (NHS) エステルを含む架橋剤、アミン、スルフヒドリル、またはヒスチジンを含有するタンパク質と反応する活性ハロゲンを含む架橋剤、アミンまたはスルフヒドリル基と反応するエポキシドを含有する架橋剤、マレイミド基とスルフヒドリル基との間の接合、及びペンダント糖部分の過ヨウ素酸酸化、次いで、還元的アミノ化による、タンパク質アルデヒド基の形成の使用を含む。

20

## 【0104】

同じまたは異なる粒子上で同時に使用される場合の特定のリガンドの比率を変更して、抗原中のナノ粒子または共刺激リガンド提示の有効性を増加させることができる。例えば、ナノ粒子は、HLA - A2 - Ig及び抗CD28（または他のシグナル2リガンド）と、約30 : 1、約25 : 1、約20 : 1、約15 : 1、約10 : 1、約5 : 1、約3 : 1、約2 : 1、約1 : 1、約0.5 : 1、約0.3 : 1、約0.2 : 1、約0.1 : 1、または約0.03 : 1などの種々の比率で結合することができる。いくつかの実施形態において、この比率は、2 : 1 ~ 1 : 2である。支持体に結合するタンパク質の合計量は、例えば、約250 mg / ml、約200 mg / ml、約150 mg / ml、約100 mg / ml、または約50 mg / mlの粒子であってもよい。サイトカイン放出及び成長などのエフェクター機能は、T細胞活性化及び分化よりも、シグナル2に対するシグナル1について、異なる要求を有する場合があるため、これらの機能を別個に決定することができる。

30

## 【0105】

特定の実施形態において、APCは、50 ~ 150 nmの範囲の常磁性粒子であり、PDI（サイズ分布）は、0.2未満、またはいくつかの実施形態において、0.1未満である。APCは、0 ~ - 10 mV、例えば、約 - 2 ~ - 6 mVの表面電荷を有してもよい。APCは、粒子あたり10 ~ 120個のリガンド、例えば、粒子あたり約25 ~ 約100個のリガンドを有してもよく、リガンドは、免疫グロブリン配列のFc領域に導入された遊離システインを介して粒子に接合している。粒子は、約1 : 1の比率のHLA二量体：抗CD28を含有してもよく、これは、粒子の同じまたは異なる集合体に存在してもよい。ナノ粒子は、ペプチド抗原の受動的ローディングが有する場合であっても、同種T細胞の強力な増幅を提供しつつ、非同種TCRの刺激を示さない。粒子は、少なくとも2または3年間、凍結乾燥形態で安定である。

40

## 【0106】

濃縮及び増幅の後、試料の抗原特異的T細胞成分は、少なくとも約5%、または少なくとも約10%、または少なくとも約15%、または少なくとも約20%、または少なくとも

50

約 25% が抗原特異的 T 細胞であろう。さらに、これらの T 細胞は、T メモリ幹細胞を含み、セントラル及びエフェクターメモリー T 細胞も含んでいてもよい。患者またはドナーから単離された元の試料から、種々の実施形態において、抗原特異的 T 細胞は、約 100 倍～約 10,000 倍、例えば、少なくとも約 100 倍、または少なくとも約 200 倍増幅される（約 7 日間で）。2 週間後、抗原特異的 T 細胞は、種々の実施形態において、少なくとも約 1000 倍、または少なくとも約 2000 倍、少なくとも約 3,000 倍、少なくとも約 4,000 倍、または少なくとも約 5,000 倍増幅される。いくつかの実施形態において、抗原特異的 T 細胞は、2 週間後に、5000 倍より多く、または 10,000 倍より多く増幅される。1 週間または 2 週間の増幅後、少なくとも約  $10^6$  個、または少なくとも約  $10^7$  個、または少なくとも約  $10^8$  個、または少なくとも約  $10^9$  個の抗原特異的 T 細胞が得られる。 10

#### 【0107】

好適なインキュベーション条件（培養培地、温度など）としては、T 細胞または T 細胞前駆体を培養するために使用されるもの、ならびに DC または人工抗原提示細胞を使用して抗原特異的 T 細胞の形成を誘導するための当該技術分野で既知のものが挙げられる。

#### 【0108】

細胞組成物は、静脈内注入、動脈内投与、リンパ内投与、及び腫瘍内投与を含む任意の適切な経路によって患者に投与することができる。

#### 【0109】

いくつかの実施形態において、患者は、養子移入によって細胞組成物を受ける前に（または任意選択でその後）、1 つ以上のチェックポイント阻害剤を用いた免疫療法を受けるか、または開始する。種々の実施形態において、チェックポイント阻害剤（複数可）は、CTLA-4 または PD-1 / PD-L1 のうちの 1 つ以上を標的とし、このような標的に対する抗体、例えば、モノクローナル抗体、またはその一部、またはそのヒト化もしくは完全ヒト態様を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、チェックポイント阻害剤療法は、イピリマブもしくは Keytruda（ペンブロリズマブ）、または同等のモノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態において、患者は、以前 PD1 遮断療法を受けており、その治療に対して難治性であったか、または部分的にしか応答性ではなかった。このような実施形態において、本明細書に記載の細胞組成物は、任意選択で第 2 ラウンドの免疫療法（例えば、抗 CTLA4 または PD-1 遮断療法）と組み合わせて、頑強な T 細胞応答を復活させることができる。 20 30

#### 【0110】

いくつかの実施形態において、患者は、約 1～5 ラウンドの養子免疫療法（例えば、1 回、2 回、3 回、4 回、または 5 回のラウンド）を受ける。いくつかの実施形態において、養子免疫療法の各投与は、1 ラウンドのチェックポイント阻害剤療法と同時に、またはその後（例えば、約 1 日または約 1 週間後）に行われる。いくつかの実施形態において、養子免疫療法は、チェックポイント阻害剤投与から約 1 日後、約 2 日後、約 3 日後、約 4 日後、約 5 日後、約 6 日後、または約 1 週間後に提供される。いくつかの実施形態において、患者は、細胞組成物の単回投与のみを受ける。

#### 【0111】

いくつかの態様において、本発明は、個別化されたがん免疫療法のための方法を提供する。本方法は、aAPC を使用して達成され、患者が応答する抗原を特定し、その後適切なペプチドローディングされた aAPC を患者に投与するか、またはその後抗原特異的 T 細胞をエクスピボで濃縮及び増幅する。 40

#### 【0112】

ゲノム全体の配列決定は、がん生物学の理解を劇的に変化させた。がんの配列決定は、多くのヒトのがんの発達に關与する分子プロセスに関する重要なデータをもたらした。引き起こされる変異は、(1) 細胞運命、(2) 細胞生存及び (3) ゲノム維持の 3 つの主な細胞プロセスを調節する経路に關与する主要な遺伝子において同定されている。Vogelstein et al., Science 339, 1546-58 (2013)。 50

## 【0113】

ゲノム全体の配列決定はまた、がん免疫療法に対する本願発明者らのアプローチに革命をもたらす可能性を有する。配列決定データは、がん免疫療法のための共有標的及び個別化された標的の両方に関する情報を提供することができる。原則として、変異体タンパク質は、免疫系にとって異物であり、推定腫瘍特異的抗原である。実際に、配列決定の努力は、数千ではないにしても数百の潜在的に関連する免疫標的を定義している。限定された研究により、これらのネオエピトープに対するT細胞応答が、がん患者において見出され得るか、またはがんワクチンによって誘導され得ることが示された。しかしながら、特定のがんに対するこのような応答の頻度及びこのような応答が患者間で共有される程度は、よく知られていない。腫瘍特異的免疫応答の理解が限られている主な理由の1つは、潜在的な免疫学的に関連する標的を検証するための現在のアプローチが煩雑で時間がかかることである。

10

## 【0114】

中枢性トレランスは、自己タンパク質に対するT細胞応答を無効化するが、がん原性変異は、T細胞応答を形成し得るネオエピトープを誘導する。全エクソーム配列決定に由来する変異カタログは、かかるネオエピトープを同定するための開始点を提供する。HLA結合予測アルゴリズム (Srivastava, PLoS One 4, e6094 (2009)) を使用して、各がんが、7~10個までのネオエピトープを有し得ることが予測されている。同様のアプローチによって、数百個の腫瘍ネオエピトープを推定した。しかしながら、かかるアルゴリズムは、T細胞応答の予測において低い精度を有する場合があります。予測されたHLA結合エピトープの10%のみが、HLAの観点で結合すると予測される (Lundegaard C, Immunology 130, 309-18 (2010))。したがって、予測されるエピトープは、それらの潜在的なネオエピトープに対するT細胞応答の存在について検証されなければならない。

20

## 【0115】

特定の実施形態において、ナノ-aAPC系を使用して、種々のがんにおいて、または特定の患者のがんにおいて、T細胞応答を誘導するネオエピトープについてスクリーニングする。がんは、例えば、全エクソーム配列決定によって、遺伝子解析され得る。

## 【0116】

候補ペプチドのリストは、変異タンパク質中の9個のアミノ酸ウィンドウを重ね合わせることから生成することができる。変異したアミノ酸を含有する9個の全てのAAウィンドウと、各タンパク質からの2つの変異していない「対照」を選択する。これらの候補ペプチドは、Net MHC及び安定化マトリックス法 (SMM) を含むMHC結合予測アルゴリズムのコンセンサスを使用して、MHC結合について計算によって評価される。主にHLA-A2対立遺伝子のためにナノ-aAPC及びMHC結合アルゴリズムが開発されてきた。コンセンサス予測の感度カットオフは、扱うことが可能な数の変異を含有するペプチド (約500) 及び変異していない対照ペプチド (約50) が同定されるまで、調整することができる。

30

## 【0117】

例示的な実施形態において、細胞組成物は、薬学的に許容される担体中に、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%のCD8+またはCD4-T細胞と、5%未満のCD4+T細胞と、少なくとも5%のTSCM細胞とを含み、CD8+細胞は、1~10個の標的ペプチド抗原に特異的な少なくとも10<sup>6</sup>個のT細胞を含む。任意選択で、CD8+またはCD4-T細胞は、細菌、ウイルス、真菌及び/または寄生虫病原体に特異的なT細胞を含んでいてもよい。種々の実施形態において、CD8+またはCD4-T細胞の少なくとも30%が、TSCM、セントラル、及びエフェクターメモリT細胞であり、CD8+またはCD4-T細胞の10%未満が、最終分化したT細胞であり、CD8+またはCD4-T細胞の10%未満が、ナイーブ細胞である。種々の実施形態において、標的ペプチド抗原に特異的なCD8+またはCD4-T細胞の少なくとも50%が、TSCM、セントラル及びエフェクターメモリT細胞である。いくつかの実施形態にお

40

50

いて、細胞組成物は、約 5 % ~ 約 25 % の T メモリ幹細胞 ( T s c m )、または約 5 % ~ 約 20 % の T メモリ幹細胞を含む。

【 0 1 1 8 】

種々の実施形態において、細胞組成物は、 T 細胞をさらに含む。例えば、細胞組成物は、少なくとも約 2 % の T 細胞、または少なくとも約 5 % の T 細胞を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、細胞組成物は、少なくとも約 10 % の T 細胞、または少なくとも約 20 % の T 細胞を含む。いくつかの実施形態において、細胞組成物は、少なくとも約 25 % の T 細胞、または少なくとも約 30 %、または少なくとも約 35 %、または少なくとも約 40 % の T 細胞を含む。これらの実施形態において、 T 細胞は、 V 1 及び V 2 細胞の片方または両方を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、 T 細胞は、主に V 2 (例えば、少なくとも約 60 %、または少なくとも約 75 %) である。いくつかの実施形態において、 T 細胞の一部は、 C D 8 + である。種々の実施形態において、 T 細胞は、主に C D 2 8 + である。

10

【 0 1 1 9 】

いくつかの実施形態において、細胞組成物は、静脈内注入に好適であり、凍結保護剤として好適であり得る薬学的に許容される担体をさらに含む。例示的な担体は、 D M S O (例えば、約 10 %) である。細胞組成物は、単位バイアルまたはバッグの状態を提供され、使用まで凍結して保管されてもよい。単位用量は、 50 ~ 200 m L の体積で、 1 m L あたり約  $5 \times 10^5$  個 ~ 約  $5 \times 10^6$  個の細胞を含み得る。特定の実施形態において、組成物の体積は、 100 m L 以下 (例えば、 50 ~ 100 m L) である。

20

【 0 1 2 0 】

いくつかの態様において、本発明は、本明細書に記載の細胞組成物を、必要とする患者に投与することを含む、がん患者を治療するための方法を提供する。

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施形態において、患者は、血液癌を有しており、いくつかの実施形態において、同種幹細胞移植後に再発している。いくつかの実施形態において、患者は、急性骨髄性白血病 ( A M L ) または骨髄異形成症候群を有する。

【 0 1 2 2 】

本開示に従って治療され得る他のがんとしては、歴史的に不正な免疫応答不良であるか、または高い再発率を有するがんが挙げられる。例示的ながんとしては、癌腫、肉腫、及びリンパ腫を含む様々な種類の固形腫瘍が挙げられる。種々の実施形態において、がんは、黒色腫 ( 転移性黒色腫を含む )、結腸癌、十二指腸癌、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、腺管癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、子宮内膜癌、精巣癌、胃癌、異形成性口腔粘膜、ポリポーシス、頭頸部癌、浸潤性口腔癌、非小細胞肺癌腫、小細胞肺癌腫、中皮腫、移行性及び扁平上皮細胞尿癌腫、脳癌、神経芽腫、ならびに神経膠腫である。種々の実施形態において、がんは、ステージ I、ステージ II、ステージ III、またはステージ IV である。いくつかの実施形態において、がんは、転移性及び / または再発性であり、及び / または切除不可能である。

30

【 0 1 2 3 】

いくつかの実施形態において、患者は、化学療法及び / またはチェックポイント阻害剤療法に対して難治性である。

40

【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態において、患者は、持続性及びインビボ応答を改善し得る低用量サイトカイン療法をさらに受ける。

【 0 1 2 5 】

いくつかの実施形態において、がんは、血液悪性腫瘍であり、白血病、リンパ腫、または骨髄腫を含む。例えば、血液悪性腫瘍は、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、症二球形白血病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、悪性皮膚 T 細胞、菌状息肉腫、非 M F 皮膚 T 細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、及び T 細胞を豊富に含む皮膚リンパ組織過形成であってもよい。例示的な実施形態におい

50

て、患者は、急性骨髄性白血病（AML）または骨髄異形成症候群などの血液癌を有しており、いくつかの実施形態において、患者は、同種幹細胞移植後に再発している。いくつかの実施形態において、この療法は、GVHDを誘導しない。

【0126】

いくつかの実施形態において、患者は、同種幹細胞移植に加えて、リンパ球除去療法、細胞減少療法、または免疫調節療法も受けている（細胞療法を行う前に）。いくつかの実施形態において、細胞療法は、サイトカイン補助後治療の有無にかかわらず、さらに提供されてもよい。

【0127】

いくつかの実施形態において、患者は、感染症を有するか、または感染症のリスクにさらされている。例えば、HSC Tを受けた患者は、免疫不全状態を考慮すると、感染症の特別なリスクにさらされる。治療または予防することができる感染症としては、細菌、ウイルス、プリオン、真菌、寄生虫、蠕虫などによって引き起こされる感染症が挙げられる。かかる疾患としては、AIDS、B/C型肝炎、CMV感染、エプスタインバーウイルス（EBV）感染、インフルエンザ、ヘルペスウイルス感染（帯状疱疹を含む）、及びアデノウイルス感染が挙げられる。例えば、CMVは、臓器移植患者にみられる最も一般的なウイルス性病原体であり、骨髄移植または末梢血幹細胞移植を受ける患者における罹患率及び死亡率の主な原因である。このことは、これらの患者の免疫不全状態に起因するものであり、血清反応陽性患者における潜在ウイルスの再活性化または血清反応陰性個体における日和見感染を可能にする。これらの実施形態において、患者は、病原体抗原に特異的なT細胞を含む養子免疫療法を受けてもよい。この方法は、移植手技の開始前に、患者または適切なドナーに由来するウイルス特異的CTLの生成を伴い得る。

【0128】

PTLDは、移植患者のかなりの割合で発生し、エプスタインバーウイルス（EBV）感染から生じる。EBV感染は、米国において、成人集合の約90%に存在すると考えられる。活性ウイルス複製及び感染は、免疫系によって抑制されるが、CMVの場合と同様に、移植療法によって免疫不全状態にされた個体は、制御するT細胞集合体を失い、ウイルスの再活性化を可能にしてしまう。このことは、移植プロトコルの深刻な障害を示す。EBVは、種々の血液癌及び非血液癌における腫瘍促進にも関与し得る。

【0129】

さらに他の実施形態において、本発明は、T細胞の集合体を作製するための方法を提供する。本方法は、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1のうち2つ以上の存在下、T細胞の集合体を増幅することを含む。T細胞の集合体は、CD28+濃縮された細胞を濃縮してもよく、例えば、本明細書に記載のaAPCを含め、抗CD28含有ビーズまたは粒子を用いて陽性選択されてもよい。いくつかの実施形態において、細胞の集合体は、CD4+枯渇しているか、またはCD8+選択されている。種々の実施形態において、開始組成物は、約20%未満または約10%未満または約8%未満、または約5%未満のT細胞を含む。いくつかの実施形態において、供給源細胞は、末梢血由来である。

【0130】

種々の実施形態において、T細胞の集合体は、IL-4の存在下で増幅されるか、またはIL-4及びIL-6の存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-4及びIL-1存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-4、IL-6、及びIL-1存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-2、IL-4及びIL-6存在下で増幅される。いくつかの実施形態において、細胞は、IL-2、IL-4、IL-6、INF-、及びIL-1存在下、培養物中で増幅される。培養物中の細胞の増幅は、本明細書に記載のように、例えば1~4週間行われ得る。増幅期の後、である細胞の割合は、約5%~約60%、例えば、約10%~約60%、または約15%~約60%であってもよく、この数のT細胞が、細胞の開始時の集合体と比較して、少なくとも約100または少なくとも約1000、また

10

20

30

40

50

は少なくとも約 10,000 まで増幅される。

【0131】

T細胞は、既知の方法、例えば、FACSまたは磁気細胞選別を使用して、他の細胞から分離することができる。T細胞は、養子移入または研究用途のための細胞組成物として提供されてもよく、あるいは、1つ以上の異種遺伝子（例えば、T細胞受容体、任意選択でTCRである）を発現するように操作されていてもよい。いくつかの実施形態において、T細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を異種発現するように操作される。

【0132】

本発明の他の態様及び実施形態は、当業者には明白であろう。

10

【実施例】

【0133】

抗原特異的CD8+T細胞を生成するため、図2に概略的に示されるように、新鮮なPBMCをドナーから白血球分離によって得た。細胞を、抗CD4マイクロビーズで陰性選択することによって、CD4+細胞を枯渇させた。得られた細胞を、常磁性ナノ粒子（すなわち、デキストランコーティングされた酸化鉄ナノ粒子またはPLGA-PEGナノ粒子、直径が約80~200nmの範囲）と共にインキュベートすることによって、抗原特異的T細胞を濃縮した。図1に示されるように、ナノ粒子は、複数の腫瘍特異的抗原ペプチドを組み込むことができる表面（標的ペプチド抗原を提示する）に接合された二量体HLAリガンドを有する。二量体HLAリガンドは、2つのHLA-A2ドメインを含有し、ペプチド結合溝を含み、それぞれがIgヒンジ領域のアームに融合している。二量体HLA-Igは、2マイクログロブリンと共に発現される。HLA-IgG4ヒンジ二量体などの二量体HLAリガンドは、複数のHLAサブタイプに対して容易に改変され、標的T細胞との直接的な係合を提供することができる。図1に示すように、抗CD28モノクローナル抗体などの共刺激リガンドまたは阻害リガンドもナノ粒子に接合している。共刺激リガンドまたは阻害リガンドは、治療目的に対して、T細胞（すなわち、ナイーブT細胞またはメモリT細胞）を標的とするための特定の命令（例えば、活性化、抑制）を提供する。リガンド及びaAPC構築物は、WO2016/044530及びWO2016/105542に開示されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0134】

細胞を、常磁性aAPCの存在下で、次いで、磁場の存在下で約5分間インキュベートした。次いで、粒子と会合した細胞を回収し、様々な長さの時間（一般に1~2週間）、エクスピドで増幅させた。増幅は、成長因子存在下で実施した。2週間の培養期間について、成長因子を1日目及び7日目に添加した。細胞を、7日目にナノaAPCを用いて再刺激した。治療レベルの腫瘍特異的CD8+T細胞になるまでの増幅を、ドナー細胞単離から2週間以内で観察した。いくつかの実施形態において、濃縮及び増幅プロセスは、閉じられた自動化細胞増幅システム中で行うことができる。かかるシステムは、単純であり、スケール変更可能であり、費用対効果の高い製造を提供することができ、かつ、異なる抗原ペプチドカクテル（すなわち、患者またはドナーのPBMCを由来とする）抗原特異的CD8+T細胞の一貫した迅速な生成を提供することができる。

30

40

【0135】

増幅に使用されるサイトカインの組成を表3に示す。

## 【表 3】

表 3：増幅期用サイトカイン

サイトカイン	最終培養培地における特異的活性 (IU/ml)	原料溶液 50 倍中の特異的活性 (IU/ml)
IL-2	80	4000
IL-4	2.5	250
IL-6	160	8000
IFN $\gamma$	40	2000
IL-1 $\beta$	30	1500

10

## 【0136】

増幅期のサイトカインを含め、濃縮及び増幅プロセスを使用する細胞表現型は、PCT/US2018/051971 (表題 CELL COMPOSITIONS COMPRISING ANTIGEN-SPECIFIC T CELLS FOR ADOPTIVE THERAPY) に開示されている。PCT/US2018/051971 は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0137】

本開示の方法を使用した急性骨髄性白血病 (AML) 特異的 T 細胞の濃縮及び増幅を図 3 に示す。図 3 の左のグラフは、AML 特異的抗原 WT137-45、WTI126-134、PRAME425、サイクリン A1227-235、及びサイクリン A1341-351 について、T 細胞がエクスピボで濃縮及び増幅された後の 4 人の健康なドナーの新鮮な PBMC から生成された CD8+ T 細胞の合計数を示す。図 3 の右のグラフは、CD8+ T 細胞がエクスピボで濃縮及び増幅された後の急性骨髄性白血病 (AML) 特異的抗原の合計割合を示す。図 3 の結果は、他の内因性 T 細胞療法由来の細胞組成物と比較して、有意に高い割合の AML 特異的 CD8+ T 細胞が本開示の方法によって生成されることを示す。

20

## 【0138】

次いで、細胞を、図 4 A 及び図 4 B において、それらの表現型、ナイーブ T 細胞 (TN) (CD62L+、CD45RA+)、セントラルメモリ T 細胞 (TCM) (CD62L+、CD45RA-)、エフェクターメモリ T 細胞 (TEM) (CD62L-、CD45RA-)、エフェクターメモリ RA+ T 細胞 (TEMRA) (CD62L-、CD45RA+)、及び Tメモリ幹細胞 (TSCM) (CD62L+、CD45RA+、CD95+) のいずれかについて特性決定した。ドナーリンパ球からエクスピボで濃縮及び増幅された AML 特異的 T 細胞の 95% より多くが、メモリ T 細胞表現型を有していた。E+E によって生成した T 細胞の 60% より多くが、Tメモリ幹細胞表現型及びセントラルメモリ T 細胞表現型を有していた。また、図 4 B に示されるように、E+E 系は、全てのドナーにわたって一貫したメモリ T 細胞表現型を生成した。E+E プロセスは、有意な量の 2 人の異なる健康なドナー leukopak からの多発性骨髄腫特異的 Tメモリ幹細胞も生成した。(図 8 及び図 9 A を参照。) 図 9 A 及び図 9 B において、多発性骨髄腫特異的抗原 T 細胞が、ヒンジ二量体染色に基づき、バッチ中で、濃縮され、約  $1.6 \times 10^9$  個の CD8+ T 細胞へと増幅された。

30

40

## 【0139】

図 5 A 及び図 5 B は、エクスピボで濃縮及び増幅された AML 特異的 T 細胞が、IL-2 の細胞内染色 (増殖及び記憶)、IFN- (他の細胞を活性化する、記憶、MHC の上方制御)、TNF- (炎症促進性)、及び CD107A (グランザイム放出、細胞障害活性) を含む、高度の多機能表現型を有することを示す。AML 特異的 T 細胞の大部分 (すなわち、約 62%) は、非特異的刺激を受けたときに 3~4 個のエフェクター機能を示した (図 5 A、上側)。図 5 A (下側) において、グラフは、IL-2、TNF-、I

50

FN-、及びCD107Aを発現するT細胞の割合を示す。図5Aにおいて、T細胞は、ペプチドパルスしたT2細胞の非特異的刺激によって生成した。この実験の結果は、E+Eによって生成したAML特異的CD8+T細胞の大部分について、少なくとも3つまたは4つのサイトカインエフェクター機能が観察されたことを示す。図5Bにおいて、AML細胞株U266のT細胞媒介性腫瘍特異的殺傷が、2つのエフェクターと標的(E:T)の比率10:1(左側の棒)及び20:1(右側の棒)で、AML特異的抗原について健康なドナーの新鮮なPBMCから示される。この実験の結果は、健康なドナーからE+Eによって生成したCD8+T細胞組成物が、複数のE:T比にわたって頑強な殺傷活性を有することを示す。

#### 【0140】

10

図6は、黒色腫患者由来のPBMC(上側)と健康なドナー由来のPBMC(下側)との間で、本明細書に開示される濃縮及び増幅プロセスによって生成されるMart-1特異的T細胞の特異性を比較する4つのグラフからなる。濃縮及び増幅プロセスは、ドナー供給源にかかわらず、一貫した細胞組成物を産生する。この実験におけるデータは、凍結PBMCから生成した。

#### 【0141】

図7は、AIMACTに基づくE+Eプロセスが、天然の免疫応答を模倣するTCRレパートリーを生成し、それによって、自然選択を受けた天然T細胞レパートリーから頑強な養子療法を提供することを示すグラフである。ポリクローナルTCRレパートリーの広さは、天然で耐久性のある免疫応答を可能にする。

20

#### 【0142】

図8は、E+Eプロセスが有意な量の多発性骨髄腫抗原特異的Tメモリ幹(TSCM)細胞(CD62L+、CD45RA+、CD95+)を生成したことを示す。このグラフは、健康なドナーのleucopakからの増幅の前及び後の多発性骨髄腫特異的抗原T細胞の表現型を示す。図9Aは、健康なドナーのleucopakからの多発性骨髄腫抗原特異的T細胞のためのバッチ中、エキスピボで濃縮及び増幅されたT細胞の表現型を示す。このグラフは、E+Eプロセスが、Tメモリ幹(TSCM)細胞、セントラルメモリT細胞TCM、及びエフェクターメモリT(TEM)細胞を含む有意な量の抗原特異的CD8+T細胞(ヒンジ二量体染色に基づき、約 $1.6 \times 10^9$ 個のCD8+T細胞)を生成したことを示す。図9Bは、4人の異なる臨床的な多発性骨髄腫患者に由来する多発性骨髄腫抗原特異的T細胞のためのバッチ中、エキスピボで濃縮及び増幅されたT細胞の表現型を示す。このグラフは、E+Eプロセスが、Tメモリ幹(TSCM)細胞、セントラルメモリT細胞TCM、及びエフェクターメモリT(TEM)細胞を含む有意な量の抗原特異的CD8+T細胞を生成したことを示す。このデータは、臨床患者由来のPBMCが、ドナー由来のPBMCと同じ表現型特徴を有し、顕著なことに、E+Eプロセスが、Tメモリ細胞(例えば、Tメモリ幹(TSCM)細胞、セントラルメモリT細胞TCM、及びエフェクターメモリT(TEM)細胞)を含む有意な量の抗原特異的CD8+T細胞を生成するのに有効であることを示す。

30

#### 【0143】

図10は、E+Eプロセスを使用したT細胞の産生を示す。V1及びV2TCRサブタイプが両方とも観察された。造血幹細胞移植(HSCT)の観点でT細胞の臨床的意義が報告されており、特に、移植後のより高頻度のT細胞は、望ましい転帰と関連している。Berglund et al., Expansion of Gamma delta T cells from Cord Blood: A Therapeutic Possibility. Stem Cells International Vol. 2018を参照。図11に示されるように、14日目の%T細胞は様々であり、その平均は、約15%~約50%のT細胞である。14日目のT細胞の数は、0日目のT細胞の数と広く相関関係にある。

40

#### 【0144】

以下の実験では、増幅されたT細胞の特徴を、同一性、純度、表現型、及び特異性の観点

50

から評価する。抗多発性骨髄腫（MM）抗原ペプチドが濃縮されたロット及び抗白血病抗原ペプチドが濃縮されたロットについての特徴のまとめを以下に示す。

【表 4 - 1】

表 4：同一パラメータのロットごとの比較及び $\alpha\beta$ 及び $\gamma\delta$ T細胞の部分集合体の寄与\*

Leukopak	%CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	%CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	% $\alpha\beta$ T細胞	% $\gamma\delta$ T細胞
多発性骨髄腫				
L163	98.1	79.5	85.8	14.6
L165	91.2	59.8	60.5	38.9
L179	96.6	48.3	48.9	49.5
SV12	98.0	29.7	29.0	71.5
SV13	98.0	42.7	37.0	59.0
SV14	94.5	38.8	46.7	47.4
L136-1	93.2	87.9	89.3	4.9
L136-2	92.4	86.7	89.8	6.3
L137-1	98.3	57.0	53.5	44.0
L137-2	98.6	58.6	55.7	42.0
L138-1	96.5	59.2	57.2	38.2
L138-2	97.2	55.7	50.6	44.4
L144-1	93.1	89.8	90.9	3.2
L144-2	90.1	87.2	87.8	3.5
L145-1	97.0	56.0	52.4	44.0
L145-2	98.0	63.0	60.4	39.5
L146-1	97.0	56.0	56.0	37.1
L146-2	97.0	57.0	56.0	41.3
AML				
L162	98.7	61.9	66.4	26.4
L164	99.2	68.8	46.5	37.8
L167	99.6	54.1	48.8	48.6
SV9	97.6	82.9	78.8	17.3
SV10	86.0	30.6	38.3	41.1
SV11	98.5	81.4	87.1	10.0
L132-1	94.2	72.3	69.6	20.2
L132-2	93.4	71.6	70.3	22.0
L133-1	93.2	74.3	63.5	19.7
L133-2	92.8	75.2	64.3	17.5
L134-1	99.0	80.9	78.5	18.5
L134-2	99.3	83.6	78.3	18.9

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

Leukopak	%CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	%CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	%αβT細胞	%γδT細胞
L140-1	97.2	41.7	33.3	65.3
L140-2	96.4	48.5	41.0	55.0
L141-1	97.5	58.0	54.0	42.7
L141-2	99.2	57.0	52.0	45.0
L143-1	98.3	60.5	76.7	23.8
L143-2	97.7	69.0	69.1	30.3
L147-1	95.4	68.4	60.9	37.0
L147-2	96.0	66.0	58.2	39.0
L161-1	98.4	87.7	85.0	12.9
L161-2	98.3	86.7	85.0	12.1

\*CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の数及びTCRサブタイプ分析は、異なる試料から生成した。CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>とαβT細胞との間の差は、異なる試料及び異なるFCMゲーティング戦略に起因する。

10

20

## 【0145】

以下の実験において、表現型は、CD3<sup>+</sup>細胞に対するメモリT細胞の合計%の尺度である。特性決定されるメモリT細胞集合体は、両方とも増殖及び自己複製する能力を保持しているT幹細胞メモリ(Tscm)及びTセントラルメモリ(Tcm)集合体と、Tエフェクターメモリ(Tem)細胞を含む。特性決定される残りの集合体は、Temra及びTナイーブ細胞を含む。

## 【表 5 - 1】

表5 表現型のロットごとの比較：Tナイーブ、Tscm、Tcm、Tem、Temra

Leukopak	メモリT細胞合計%	Tナイーブ%	Tscm%	Tcm%	Tem%	Temra%
多発性骨髄腫						
L163	97.8	0.04	9.4	27.9	60.4	2.2
L165	97.7	0.06	11.4	39.5	46.9	2.2
L179	95.1	1.07	9.89	53.12	32.1	3.81
SV12	99.0	0.01	11.0	41.0	47.0	1.0
SV13	98.0	0.90	11.0	58.0	29.0	1.8
SV14	94.4	0.14	20.9	47.3	26.2	3.4
L136-1	96.26	0.2	5.06	38.7	52.5	3.54
L136-2	95.88	0.1	4.58	37	54.3	4.02
L137-1	92.40	4.6	5.0	33.6	53.8	3.0
L137-2	93.40	4.0	4.2	32.1	57.1	2.6
L138-1	94.78	0.6	15.4	37.82	41.56	4.65
L138-2	95.13	0.5	16.5	40.47	38.16	5.02
L144-1	93.71	5.7	8.52	44.57	40.62	0.56
L144-2	96.91	0.7	3.3	35.15	58.46	2.37

30

40

50

【表 5 - 2】

Leukop ak	メモリT細 胞合計%	Tナイ ーブ%	T s c m %	T c m %	T e m %	T e m r a %
L 1 4 5 - 1	9 6 . 5 6	0 . 1	3 . 0 1	3 8 . 3	5 5 . 2 5	3 . 3 1
L 1 4 5 - 2	9 7 . 3 9	0 . 0 7	3 . 0 4	4 4 . 8 6	4 9 . 4 9	2 . 5 3
L 1 4 6 - 1	8 6 . 9 1	4 . 4 2	6 . 5 8	1 5 . 1 8	6 5 . 1 5	8 . 6 7
L 1 4 6 - 2	8 8 . 9 5	3 . 7 6	3 . 4 4	8 . 1 0	7 7 . 4 1	7 . 2 9
AML						
L 1 6 2	9 4 . 8 6	0 . 0 9	6 . 8 6	4 2 . 4 3	4 5 . 5 7	3 . 0 2
L 1 6 4	7 1 . 5	0 . 0 5	1 3 . 3 3	3 3 . 2 4	4 3 . 9 4	9 . 4 5
L 1 6 7	9 5 . 8	0 . 3	9 . 3 5	2 9 . 1 9	5 7 . 2 6	3 . 8 7
S V 9	9 8 . 5 4	0 . 2 6	6 . 1 9	5 7 . 4 0	3 4 . 9 5	1 . 2 0
S V 1 0	9 7 . 8 9	0 . 4 3	5 . 7 3	3 1 . 8 8	6 0 . 2 8	0 . 7 0
S V 1 1	9 5 . 4 8	0 . 0 8	2 3 . 7 5	2 3 . 9 9	4 7 . 7 4	4 . 4 3
L 1 3 2 - 1	9 2 . 8 2	0 . 2	5 . 3 4	2 4 . 3	6 3 . 1 8	7 . 1 7
L 1 3 2 - 2	9 3 . 3 3	0 . 2	5 . 1 3	2 2 . 7 6	6 5 . 4 4	6 . 6 8
L 1 3 3 - 1	9 2 . 9 2	0 . 7	8 . 9 3	2 7 . 5 2	5 6 . 4 7	7 . 0 7
L 1 3 3 - 2	9 2 . 9 7	1 . 1	7 . 6 6	2 8 . 4 3	5 6 . 8 8	7 . 0 3
L 1 3 4 - 1	9 4 . 4	0 . 2	3 . 4	1 1 . 3	7 9 . 7	5 . 4
L 1 3 4 - 2	9 2 . 2	0 . 1	3 . 6	8 . 8	7 9 . 8	7 . 7
L 1 4 0 - 1	9 5 . 8	1 . 8	1 . 6	4 3 . 7	5 0 . 5	2 . 4
L 1 4 0 - 2	9 6 . 1	1 . 8	1 . 7	4 2 . 8	5 1 . 6	2 . 1
L 1 4 1 - 1	9 6 . 9 3	1 . 1 5	2 . 0 7	4 7 . 4 7	4 7 . 3 9	1 . 9 4
L 1 4 1 - 2	9 5 . 2 2	1 . 8 5	2 . 3 3	3 9 . 1 3	5 3 . 7 6	2 . 9 2
L 1 4 3 - 1	9 3 . 5	0 . 0 3	6 . 1	2 4 . 3 4	6 3 . 0 6	6 . 4 7
L 1 4 3 - 2	9 3 . 4 7	0 . 0 3	7 . 7 9	2 8 . 5 7	5 7 . 1 1	6 . 5
L 1 4 7 - 1	9 3 . 8	0 . 3 4	3 . 4	2 6 . 5	6 3 . 9	5 . 8
L 1 4 7 - 2	9 4 . 2	0 . 5 2	3 . 2	2 3 . 5	6 7 . 5	5 . 5
L 1 6 1 - 1	9 7 . 2 1	0 . 2 2	7 . 2	4 3 . 4 9	4 6 . 5 2	2 . 5 6
L 1 6 1 - 2	9 5 . 9 7	0 . 1 3	7 . 3	3 4 . 8 6	5 3 . 8 1	3 . 9

10

20

30

40

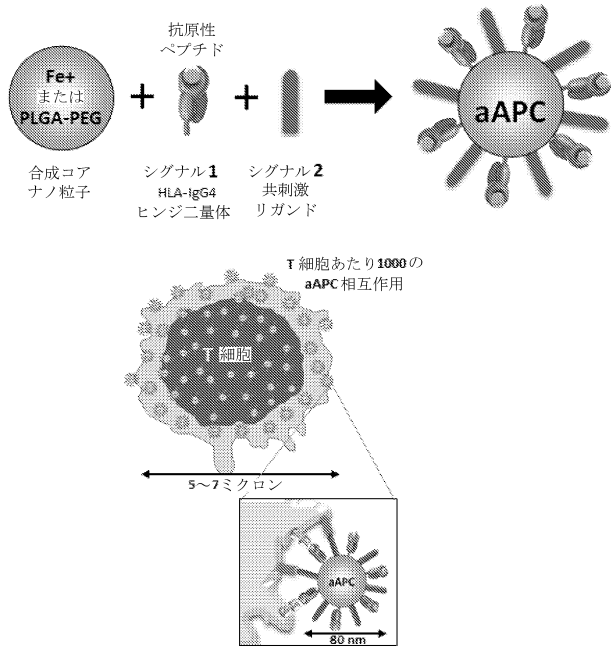
50

## 【 0 1 4 6 】

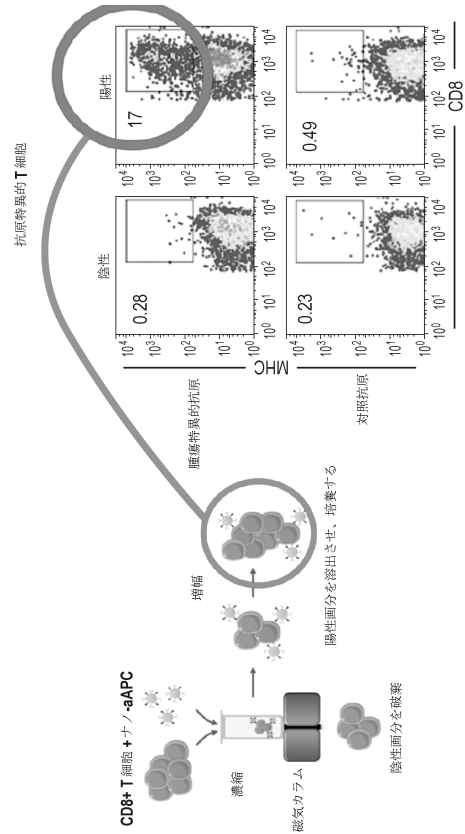
上述の実験によって示されるように、本明細書に開示されるCD8+T細胞組成物は、ナイーブ及びメモリT細胞上のT細胞受容体と直接係合して、所望な免疫応答のトリガーとなる。濃縮及び増幅プロセスによって生成されたCD8+T細胞組成物は、内因性レパートリーに由来する多抗原特異的なCD8+制限されたT細胞から構成される。抗原特異的CD8+T細胞組成物は、Tメモリ幹細胞を含む。Tメモリ幹細胞及びセントラルメモリT細胞は、初期及び長期間の臨床応答の両方にとって有用であり、重要である。抗原特異的CD8+T細胞組成物は、エフェクターサイトカイン産生及び標的細胞殺傷によって評価されるように、多機能表現型を有する。E+Eプロセスは、多様なTCRレパートリーによって引き起こされる天然の免疫応答も生成した。T細胞の頑強な集合体に加えて、T細胞の有意な集合体が、増幅された集合体中にも存在し、V1及びV2細胞の両方を含んでいた。T細胞は、病原体またはがん細胞殺傷のさらなる機構を提供すると考えられ、これはHLA依存性ではない。

【 図 面 】

【 図 1 】



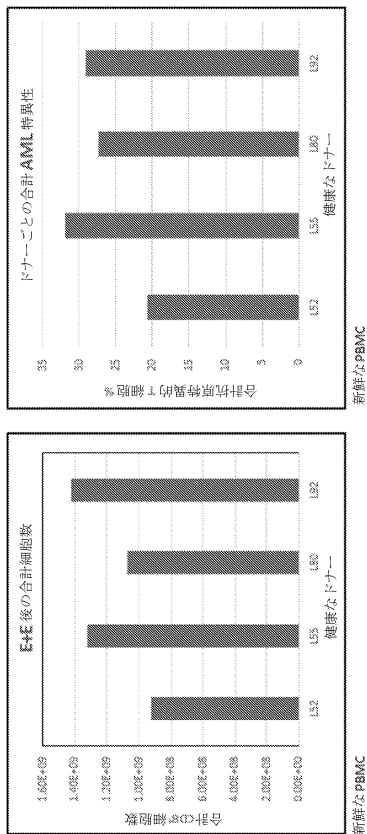
【 図 2 】



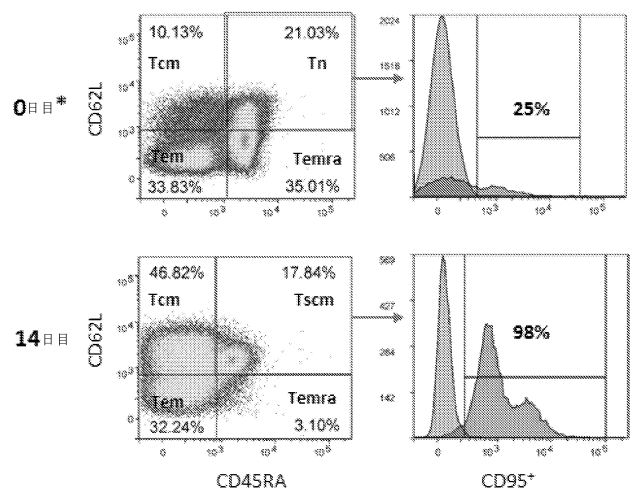
10

20

【 図 3 】



【 図 4 A 】

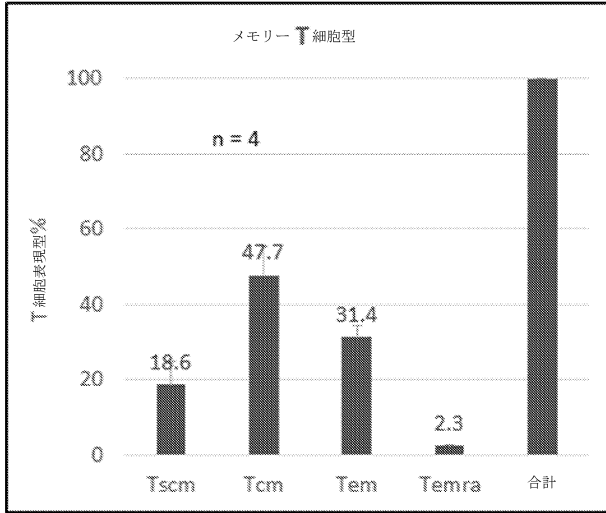


30

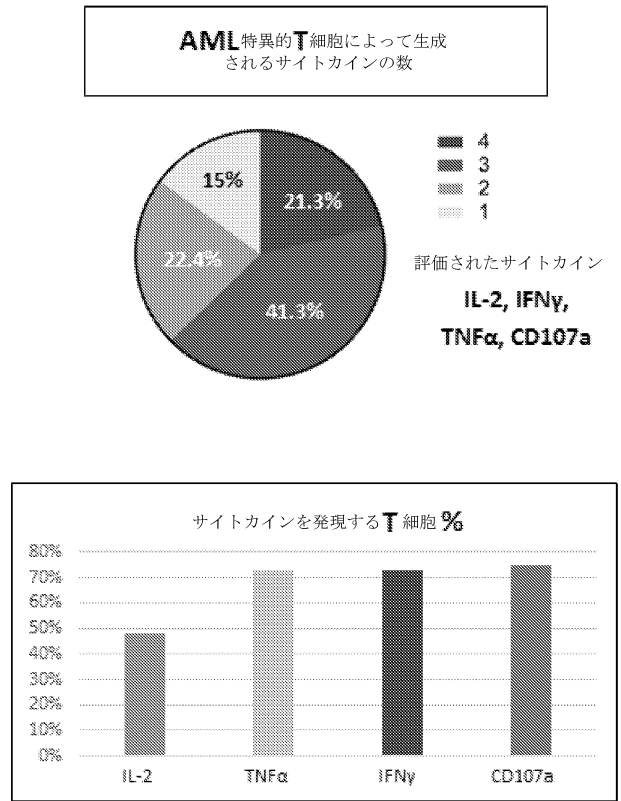
40

50

【 図 4 B 】



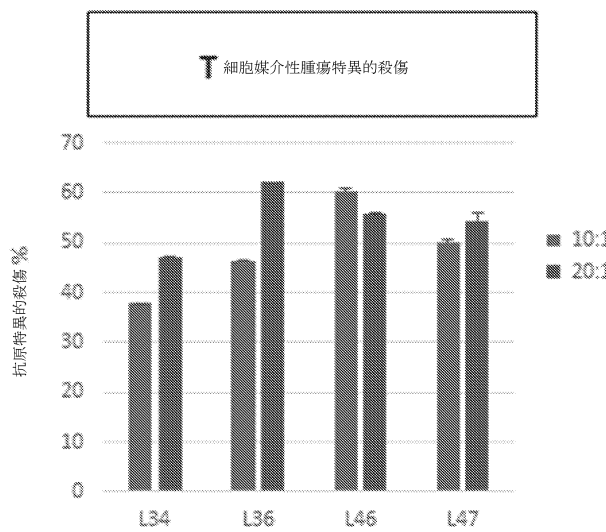
【 図 5 A 】



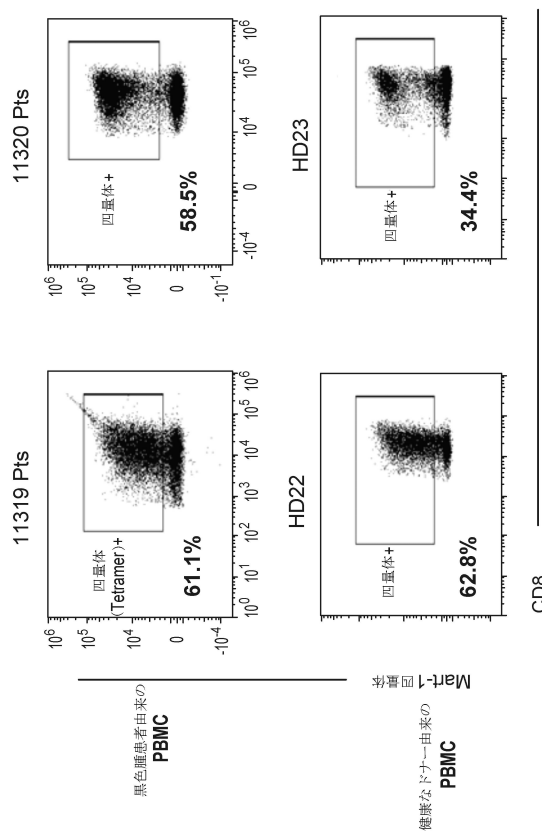
10

20

【 図 5 B 】



【 図 6 】

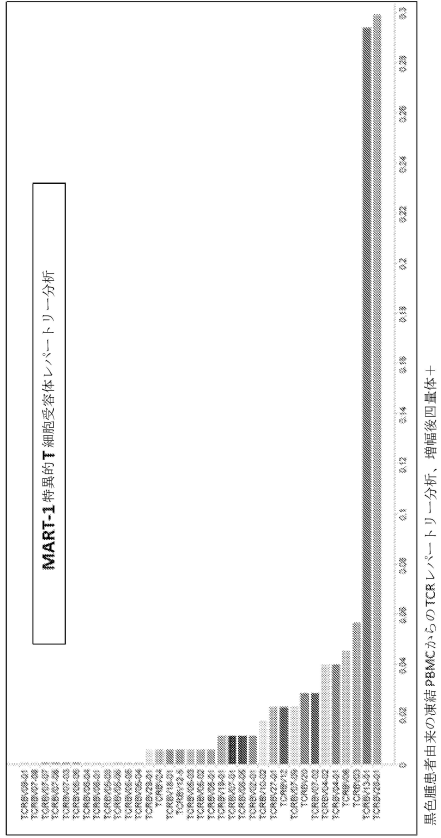


30

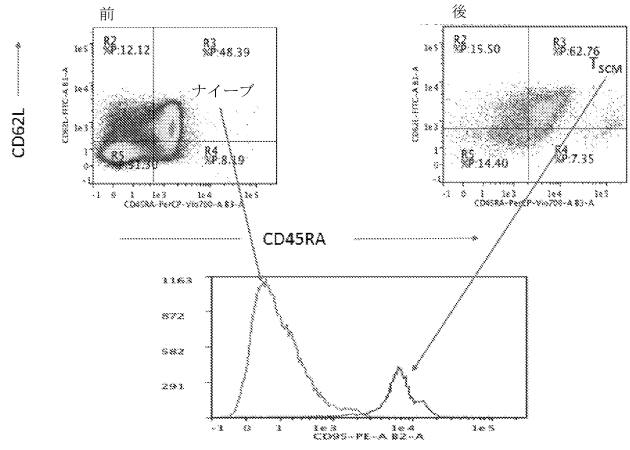
40

50

【 図 7 】



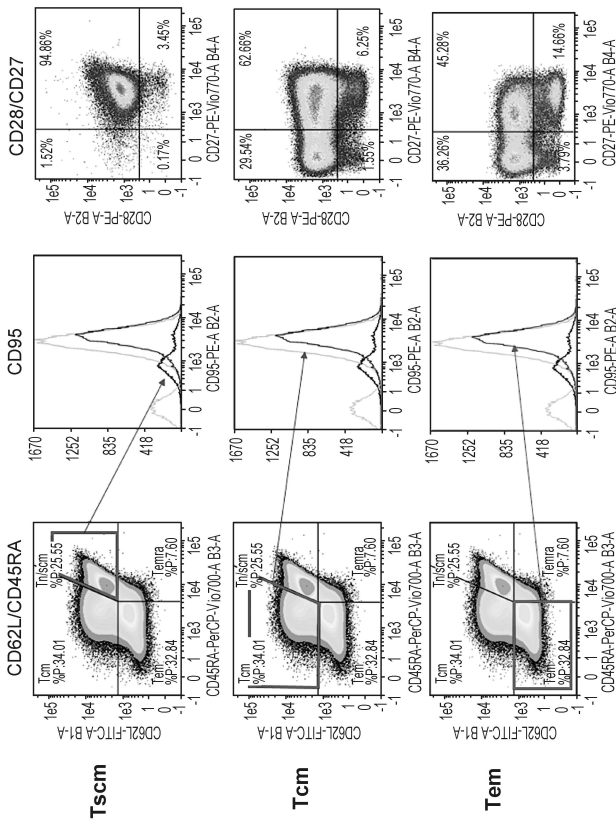
【 図 8 】



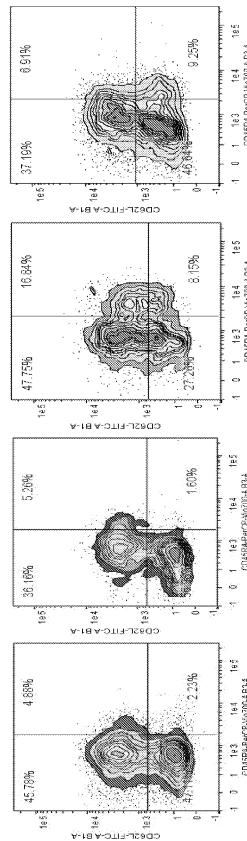
10

20

【 図 9 A 】



【 図 9 B 】

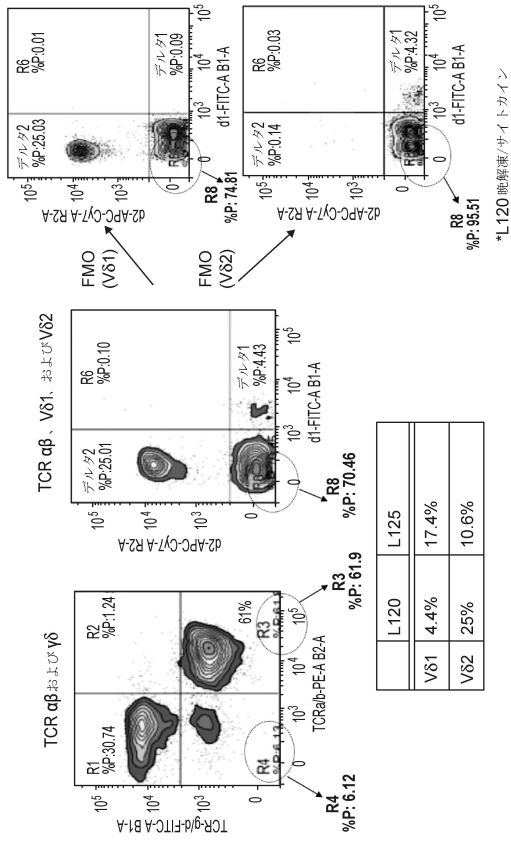


30

40

50

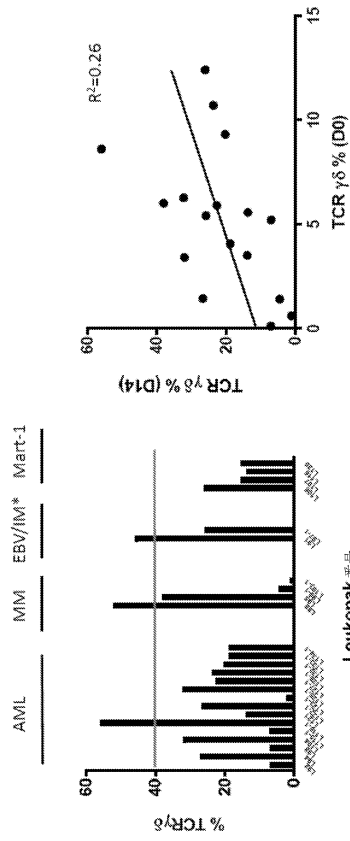
【 図 1 0 】



【 配列表 】

202251294800001.app

【 図 1 1 】



\*IM: 免疫優勢  
 \*L118、L88、およびL91は、異なるトナーである

10

20

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/60477

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC - A61K 39/00; A61K 35/17; C07K 16/28; C12N 5/0783 (2020.01) CPC - A61K 39/0011; A61K 35/17; C07K 16/00; C07K 16/2818; C12N 5/0638; C12N 5/0636; G01N 33/505; G01N 2333/0539		10
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2017/0246277 A1 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 31 August 2017 (31.08.2017). Especially para [0006], [0009], [0032], [0037], [0038], [0060], [0086], [0097], [0114], [0118], [0122], [0127], [0130], [0152], claims 1, 13, 16, 18, 39, 47, 48	1-8, 15, 16, 83-86
Y	US 2017/0065690 A1 (ARGOS THERAPEUTICS, INC.) 9 March 2017 (09.03.2017). Especially para [0046]	1-8, 15, 16, 83-86
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 February 2020		Date of mailing of the international search report <b>08 APR 2020</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 19/60477

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 9-14, 17-82, 87-113, 118-127  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
---Go to Extra Sheet for continuation---

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1-8, 15, 16, 83-86

30

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/US 19/60477

Continuation of Box III: Observations where Unity of Invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

10

Group I: Claims 1-8, 15, 16, 83-86, drawn to a composition comprising CD8+ T cells specific for one or more target antigens, and comprising T memory stem (Tscm) cells.

Group II: Claims 114-117, drawn to a method of making gamma-delta T cells by expanding a population of cells in the presence of at least two interleukins and/or cytokines.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group I has the special technical feature of a composition of CD8+ specific for one or more target antigens, T-cells and comprising T memory stem (Tscm) cells, not required by Group II.

Group II has the special technical feature of method steps of making gamma-delta T cells [T.gamma.delta are CD4-CD8-] by supplying two or more interleukins or cytokines, not required by Group I.

Common Technical Features:

20

Groups I and II share the common technical feature of T cells.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is previous disclosed by US 2017/0246277 A1 to The Johns Hopkins University (hereinafter "JHU").

As to the common technical feature, T cells, JHU discloses (para [0006]: "In some aspects, the invention provides a method for preparing an antigen-specific T-cell population. The method comprises providing a sample comprising T-cells from a patient. In some embodiments the patient is in need of adoptive transfer of antigen-specific T-cells. The sample may be a PBMC sample, or sample obtained by leukapheresis. The sample can be enriched for T cells of interest, such as CD8+ T cells").

As the common technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a common special technical feature that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I and II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (cont). Claims 9-14, 17-82, 87-113, 118-127 are held unsearchable because they are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

30

40

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	7/06 (2006.01)	C 0 7 K	7/06
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08

(32)優先日 平成31年3月20日(2019.3.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

9 1 1 9 シーノオー ネクシミュン インコーポレイテッド

(72)発明者 キム ソジョン

アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド ゲイザースパーク ゲイザー ロード 9 1 1 9 シーノオー ネクシミュン インコーポレイテッド

(72)発明者 スアレス ローレン

アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド ゲイザースパーク ゲイザー ロード 9 1 1 9 シーノオー ネクシミュン インコーポレイテッド

(72)発明者 カーター ケン

アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド ゲイザースパーク ゲイザー ロード 9 1 1 9 シーノオー ネクシミュン インコーポレイテッド

(72)発明者 カーメル スコット

アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド ゲイザースパーク ゲイザー ロード 9 1 1 9 シーノオー ネクシミュン インコーポレイテッド

(72)発明者 ベドナリック ダン

アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド ゲイザースパーク ゲイザー ロード 9 1 1 9 シーノオー ネクシミュン インコーポレイテッド

(72)発明者 エダヴァナ ヴィニータ

アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド ゲイザースパーク ゲイザー ロード 9 1 1 9 シーノオー ネクシミュン インコーポレイテッド

(72)発明者 ルー エミリー

アメリカ合衆国 2 0 8 7 7 メリーランド ゲイザースパーク ゲイザー ロード 9 1 1 9 シーノオー ネクシミュン インコーポレイテッド

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 CA24 CA25 CA44

4C085 AA13 BB50 CC03 EE01

4C087 AA01 AA02 BB44 BB65 NA14 ZB26 ZB27

4H045 AA30 BA15 BA16 CA40 DA86 EA20