

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7582940号
(P7582940)

(45)発行日 令和6年11月13日(2024.11.13)

(24)登録日 令和6年11月5日(2024.11.5)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783 Z N A
C 1 2 N	1/02 (2006.01)	C 1 2 N	1/02
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
請求項の数 58 (全261頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-523658(P2021-523658)	(73)特許権者	514214106
(86)(22)出願日	令和1年10月30日(2019.10.30)		ジュノ セラピューティクス ゲーエムベ
(65)公表番号	特表2022-512872(P2022-512872		ーハー
	A)		ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 5 ミュンヘ
(43)公表日	令和4年2月7日(2022.2.7)		ン グリルパーザーシュトラーセ 1 0
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/079746	(74)代理人	100102978
(87)国際公開番号	WO2020/089343		弁理士 清水 初志
(87)国際公開日	令和2年5月7日(2020.5.7)	(74)代理人	100160923
審査請求日	令和4年10月27日(2022.10.27)		弁理士 山口 裕孝
(31)優先権主張番号	62/753,911	(74)代理人	100119507
(32)優先日	平成30年10月31日(2018.10.31)		弁理士 刑部 俊
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100142929
(31)優先権主張番号	62/842,511		弁理士 井上 隆一
(32)優先日	令和1年5月2日(2019.5.2)	(74)代理人	100148699
	最終頁に続く		弁理士 佐藤 利光
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞の選択および刺激のための方法ならびにそのための装置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

(a) T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有するオリゴマー刺激試薬を、固定相に固定化された複数のT細胞を含む固定相に加え、それによって、該オリゴマー刺激試薬と該複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、

該固定相が、クロマトグラフィーカラムに含まれ、かつ該複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞によって発現された該選択マーカーへの該選択物質の特異的結合が、該1つまたは複数のT細胞を該固定相上に固定化し、

該オリゴマー刺激試薬が、(i)抗CD3抗体または抗体フラグメントである第1刺激物質と(ii)抗CD28抗体または抗体フラグメントである第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含む、

工程;および

(b) インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数

を該固定相から溶出させるための競合剤または遊離結合剤の添加なしに、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数

を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

【請求項2】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

(a) オリゴマー刺激試薬を固定相に加える工程であって、該オリゴマー刺激試薬が、(i) 抗CD3抗体または抗体フラグメントである第1刺激物質と(ii) 抗CD28抗体または抗体フラグメントである第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含む、工程；

(b) 固定相上に固定化された複数のT細胞を1つまたは複数の刺激物質と共にインキュベートして、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する工程であって、該固定相が、クロマトグラフィーカラムに含まれ、かつ該1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞によって発現された該選択マーカーへの該選択物質の特異的結合が、該1つまたは複数のT細胞を該固定相上に固定化する、工程；および

(c) インキュベーションの開始から24時間以内に、該1つまたは複数のT細胞を該固定相から溶出させるための競合剤または遊離結合剤の添加なしに、該複数のT細胞を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

10

【請求項3】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法：

(a) 複数のT細胞を含む試料を、クロマトグラフィーカラムに含まれた固定相に加える工程であって、該固定相が、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに結合する選択物質を含み、それによって、複数のT細胞のうちの該1つまたは複数のT細胞が該固定相上に固定化される、工程；

(b) (i) 抗CD3抗体または抗体フラグメントである第1刺激物質と(ii) 抗CD28抗体または抗体フラグメントである第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含むオリゴマー刺激試薬を該固定相に加え、それによって、該オリゴマー刺激試薬と該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程；および

20

(c) インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を該固定相から溶出させるための競合剤または遊離結合剤の添加なしに、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

【請求項4】

刺激試薬とのインキュベーションの開始が、複数のT細胞を含む試料を固定相に加えた後、10分以内、20分以内、30分以内、45分以内、60分以内、90分以内、または120分以内に実行される、請求項3記載の方法。

30

【請求項5】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法：

(1) (a) 複数のT細胞を含む試料と (b) 該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面上に発現した選択マーカーに特異的に結合する能力を有する選択物質を含む固定相とを混合する工程であって、該固定相が、クロマトグラフィーカラムに含まれ、選択マーカーに対する該選択物質の特異的結合が、該複数のT細胞のうちの該1つまたは複数のT細胞を該固定相上に固定化する、工程；

(2) (i) 抗CD3抗体または抗体フラグメントである第1刺激物質と(ii) 抗CD28抗体または抗体フラグメントである第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含むオリゴマー刺激試薬を該固定相に加え、それによって、該オリゴマー刺激試薬と該1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程；および

40

(3) インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を該固定相から溶出させるための競合剤または遊離結合剤の添加なしに、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

【請求項6】

オリゴマー刺激試薬が、複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子を含み、該オリゴマー刺激試薬のサイズが、少なくとも100個のストレプトアビジン四量体またはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、請求項1～5のいずれか一項

50

記載の方法。

【請求項 7】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

(a) オリゴマー刺激試薬を、固定相に固定化された複数のT細胞を含む固定相に加え、それによって、該刺激試薬と該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、

該固定相が、クロマトグラフィーカラムに含まれ、かつ1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞によって発現された該選択マーカーへの該選択物質の特異的結合が、該1つまたは複数のT細胞を該固定相に固定化し、

該オリゴマー刺激試薬が、(i) 複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子と (ii) 抗CD3抗体または抗体フラグメントである第1刺激物質と (iii) 抗CD28抗体または抗体フラグメントである第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含み、該オリゴマー刺激試薬のサイズが、(i) 50nm超の半径、(ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量および/または (iii) 少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、

工程；ならびに

(b) インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を該固定相から溶出させるための競合剤または遊離結合剤の添加なしに、複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

【請求項 8】

ストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、請求項6または7記載の方法。

【請求項 9】

前記ストレプトアビジン結合ペプチドが、

Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO: 7),

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8),

Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15),

SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16),

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17),

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18), および

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)、ならびに

SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44~47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはVal⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むストレプトアビジンムテイン

からなる群より選択される、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

前記ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO: 3~6、27~28、および104~105のいずれかに示すアミノ酸配列を含む、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

選択物質が、抗体、抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体、受容体リガンド、および先のいずれかの結合性フラグメントからなる群より選択される物質を含む、

請求項2～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

1つまたは複数の刺激物質および／または選択物質が、独立して、一価抗体フラグメントを含む、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

前記一価抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fvフラグメントおよび一本鎖Fvフラグメント（scFv）からなる群より選択される、請求項12項記載の方法。

【請求項14】

第1刺激物質が、抗CD3 Fabであり、かつ、第2刺激物質が、抗CD28 Fabである、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

複数のT細胞のうちの1つまたは複数固定相から収集することが、インキュベーション開始から2～24、3～24、4～24、5～24、6～24、7～24、8～24、9～24、10～24、11～24、12～24、13～24、14～24、15～24、16～24、17～24、18～24、19～24、20～24、21～24、22～24、23～24、2～23、2～22、2～21、2～20、2～19、2～18、2～17、2～16、2～15、2～14、2～13、2～12、2～11、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4または2～3時間以内に行われる、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

T細胞が、全血試料、パフィーコート試料、末梢血単核球（PBMC）試料、未分画T細胞試料、リンパ球試料、白血球試料、アフエーシス産物、または白血球アフエーシス産物に由来する、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

前記T細胞が、以前にクライオ凍結（cryofrozen）されたアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物に由来する、請求項16記載の方法。

【請求項18】

1つまたは複数の刺激物質および／または選択物質が、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、
Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO: 7),
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8),
Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 15),
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17),
SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16),
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18), および
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)
からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、またはオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、請求項1～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

- 選択マーカーがT細胞補助受容体であり；
- 選択マーカーがT細胞抗原受容体複合体のメンバーであり；
- 選択マーカーがCD3鎖であり；
- 選択マーカーがCD3ゼータ鎖であり；
- 選択マーカーがCD8であり；
- 選択マーカーがCD4であり；

10

20

30

40

50

選択マーカーがCD45RAであり;
選択マーカーがCD27であり;
選択マーカーがCD28であり;および/または
選択マーカーがCCR7である、

請求項1~18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

前記選択マーカーが、CD3、CD4およびCD8からなる群より選択される、

請求項1~19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

選択物質と選択マーカーの間の特異的結合が、T細胞へのシグナルを誘導しないか、または、T細胞への刺激シグナル、活性化シグナルおよび増殖シグナルをいずれも誘導しない、請求項1~20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

選択物質が抗CD3 Fab、抗CD8 Fabまたは抗CD4 Fabである、請求項1~21のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】

オリゴマー刺激試薬が可溶性であり、

オリゴマー刺激試薬が、固形支持体に結合しておらず、かつ/または

オリゴマー刺激試薬が、フレキシブルであり、金属コアも磁気コアも含有せず、完全にもしくは主として有機多量体で構成され、かつ/もしくは剛直ではない、

請求項1~22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

オリゴマー刺激試薬が、

両端の値を含む50nm~150nm、75nm~125nm、80nm~115nmもしくは90nm~110nmの半径、

$5 \times 10^7 \text{ g/mol} \sim 5 \times 10^8 \text{ g/mol}$ 、 $1 \times 10^8 \text{ g/mol} \sim 5 \times 10^8 \text{ g/mol}$ 、もしくは $1 \times 10^8 \text{ g/mol} \sim 2 \times 10^8 \text{ g/mol}$ の分子量、かつ/または

1,000~20,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、1,000~10,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、もしくは2,000~5,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体

を含む、請求項1~23のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

オリゴマー刺激試薬が、 $1 \mu\text{g}/\text{細胞}100\text{万個} \sim 2 \mu\text{g}/\text{細胞}100\text{万個}$ の濃度で固定相に加えられる、請求項1~24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

選択物質が、該選択物質が可逆的に結合する選択試薬を介して間接的に固定相に結合される、請求項1~25のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

前記選択試薬が、ストレプトアビジン;アビジン;ビオチンもしくはビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジンのムテイン;ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンのムテイン;少なくとも2つのキレート基を含む試薬であって、該少なくとも2つのキレート基が、遷移金属イオンに結合する能力を有する、試薬;オリゴヒスチジンアフィニティータグに結合する能力を有する物質;グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合する能力を有する物質;カルモジュリンもしくはその類似体;カルモジュリン結合ペプチド(CBP)に結合する能力を有する物質;FLAGペプチドに結合する能力を有する物質;HAタグに結合する能力を有する物質;マルトース結合タンパク質(MBP)に結合する能力を有する物質;HSVエピトープに結合する能力を有する物質;mycエピトープに結合する能力を有する物質;またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する物質を含む、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

1つもしくは複数の刺激物質と共にインキュベートすることが、複数の固定化T細胞のうちの1つもしくは複数の固定相から遊離させる、かつ／または

重力流によって収集することが、固定相からT細胞を溶出させるための競合剤も遊離結合剤も含まない培地を固定相に加えることを含む、かつ／または

競合剤もしくは遊離結合剤が、ビオチンもしくはビオチン類似体を含む、請求項1～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項 29】

前記競合剤もしくは遊離結合剤が、D-ビオチンを含む、請求項1～28のいずれか一項記載の方法。

【請求項 30】

刺激されたT細胞を含む前記組成物のT細胞に、組換えタンパク質をコードする組換え核酸分子を導入する工程をさらに含む、請求項1～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項 31】

前記組換えタンパク質が、キメラ抗原受容体であり、それによって、操作されたT細胞を含む組成物を作製する、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

前記組成物が、形質導入T細胞を含む、請求項31記載の方法。

【請求項 33】

組換え核酸の導入が、ウイルス粒子を使った形質導入によって達成される、請求項30～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 34】

前記ウイルス粒子が、レトロウイルスベクター粒子である、請求項33記載の方法。

【請求項 35】

前記ウイルス粒子が、レンチウイルス粒子である、請求項34記載の方法。

【請求項 36】

操作されたT細胞を含む組成物を、ウイルス組込みのための条件下で培養する工程をさらに含む、請求項30～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 37】

操作されたT細胞を含む組成物を、 $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で培養する工程をさらに含む、請求項36記載の方法。

【請求項 38】

操作されたT細胞を含む組成物を培養する工程が、導入後、少なくとも18時間かつ最大96時間、最大72時間、最大48時間、または最大24時間にわたって実行される、請求項36または37記載の方法。

【請求項 39】

操作されたT細胞を含む組成物を、T細胞を拡大培養するための条件下で培養する工程をさらに含む、請求項30～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項 40】

培養する工程が14日以下、12日以下、10日以下、8日以下、6日以下または5日以下の時間にわたって実行される、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

操作されたT細胞を採取し、それによって、操作されたT細胞のアウトプット集団を作製する工程をさらに含む、請求項30～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項 42】

操作されたT細胞の採取が、オリゴマー刺激試薬への曝露を開始した後、両端の値を含む48～120時間の時点である、請求項41記載の方法。

【請求項 43】

ナイーブ様細胞のパーセンテージが、採取の時点で、集団中の全T細胞、集団中の全CD4+T細胞、集団中の全CD8+T細胞、または集団中の先のいずれかの組換えタンパク質発

10

20

30

40

50

現細胞のうちの60%超である、請求項41または42記載の方法。

【請求項44】

前記ナイーブ様T細胞がCD27+CCR7+細胞を含む、請求項43記載の方法。

【請求項45】

採取された細胞を、冷凍保存用および/または対象への投与用に製剤化する工程をさらに含む、請求項41～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項46】

採取された細胞を、冷凍保存用および/または対象への投与用に、薬学的に許容される賦形剤または凍結保護物質の存在下で、製剤化する工程をさらに含む、請求項41～45のいずれか一項記載の方法。

【請求項47】

導入、インキュベート、および/または培養する工程が、無血清培地中で実行される、請求項30～46のいずれか一項記載の方法。

【請求項48】

無血清培地が、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-15または組換えヒトIL-7を含まない、請求項47記載の方法。

【請求項49】

T細胞を洗浄する工程をさらに含む、請求項30～48のいずれか一項記載の方法。

【請求項50】

前記洗浄工程が組成物中のオリゴマー刺激試薬および/または1つもしくは複数の刺激物質を低減または除去する、請求項49記載の方法。

【請求項51】

T細胞が、抗原特異的T細胞もしくはその集団、ヘルパーT細胞もしくはその集団、細胞傷害性T細胞もしくはその集団、メモリーT細胞もしくはその集団、または制御性T細胞もしくはその集団を含む；かつ/または

T細胞がCD3+T細胞を含むか、CD4+および/もしくはCD8+T細胞を含む、

請求項1～50のいずれか一項記載の方法。

【請求項52】

前記組成物の刺激されたT細胞からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に請求項30～51のいずれか一項記載の導入が行われ、選択された該T細胞サブセットに組換え核酸分子が導入される；

操作されたT細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に請求項36～51のいずれか一項記載のインキュベーションが行われ、選択された該T細胞サブセットがウイルス組込みのための条件下でインキュベートされる；

操作されたT細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に請求項26～51のいずれか一項記載の培養工程が行われ、選択された該T細胞サブセットが、T細胞を拡大培養するための条件下で培養される；かつ/または

操作されたT細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に請求項41～51のいずれか一項記載の採取が行われ、選択された該T細胞サブセットが、操作されたT細胞のアウトプット集団を作製するために採取される、

請求項1～51のいずれか一項記載の方法。

【請求項53】

前記選択する工程がアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって実行される、請求項52記載の方法。

【請求項54】

T細胞サブセットが、ナイーブ様T細胞である；ナイーブ様T細胞上に発現するマーカーについて表面陽性であるT細胞である；CCR7+CD45RA+、CD27+CCR7+、もしくはCD62L-CCR7+である；かつ/または組換えタンパク質を発現する、請求項52または53記載の方法。

【請求項55】

10

20

30

40

50

固定相がクロマトグラフィーマトリックスを含む；
固定相が非磁性材料もしくは非磁化可能材料である；
固定相が、固定相1mLあたりT細胞7500万～1億2500万個の結合容量を有する；かつ/
または
固定相が20mLである、
請求項1～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項56】

固定相が、細胞20億±5億個の結合容量を有する、請求項55記載の方法。

【請求項57】

クロマトグラフィーマトリックスがカラムクロマトグラフィーのためのものである、請求項55または56記載の方法。

【請求項58】

前記方法が自動で実行される、請求項1～57のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年10月31日に出願された「METHODS FOR SELECTION AND STIMULATION OF CELLS AND KITS AND APPARATUS FOR SAME」と題する米国仮出願第62/753,911号、2019年5月2日に出願された「METHODS FOR SELECTION AND STIMULATION OF CELLS AND KITS AND APPARATUS FOR SAME」と題する米国仮出願第62/842,511号および2019年6月13日に出願された「METHODS FOR SELECTION AND STIMULATION OF CELLS AND KITS AND APPARATUS FOR SAME」と題する米国仮出願第62/861,314号に基づく優先権を主張し、これら米国仮出願の内容は、参照により、あらゆる目的でその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表の参照による組入れ

本出願は電子形式の配列表と共に提出されている。配列表は、2019年10月29日に作成された7350423019240SeqList.txtという名称のファイルとして提供され、そのサイズは94,112バイトである。配列表の電子形式の情報は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0003】

分野

本開示は、カラムクロマトグラフィーを用いて細胞試料中の複数の細胞を選択して刺激し、カラムからの細胞の脱離を促進するための追加の工程も試薬も使用することなく細胞を収集しおよび/または溶出させるための方法を提供する。いくつかの局面において、本明細書において提供される方法は、遺伝子操作に役立ち、ひいては細胞治療に役立つ、選択され刺激された細胞の集団を産生させるのに必要な時間を、既存の方法と比べて低減させる。その製造物品および装置も提供する。

【背景技術】

【0004】

背景

疾患および状態を処置するためにさまざまな細胞治療法を利用することができる。細胞治療法には、T細胞（例えばCD4+T細胞およびCD8+T細胞）などの免疫細胞を使った方法があり、それらの免疫細胞はキメラ抗原受容体などの組換え受容体で遺伝子操作される場合もある。そのような細胞治療において使用するための適切な細胞集団、例えば選択（濃縮）され刺激された細胞集団を産生する方法は、別々の選択工程と刺激工程とを必要とすることが多く、それが製造プロセスを長引かせることになりうる。さらにまた、選択技法には、選択された細胞を選択関連粒子、例えばFabフラグメントなどの選択物質、ならびに固定相からの細胞の脱離を促進するために使用された競合試薬および/または遊離結合

10

20

30

40

50

剤 (free binding agent) で汚染する工程が伴うために、アウトプット組成物を精製するために追加の洗浄工程および/または培地交換が必要になる場合もある。追加の処理工程は細胞ストレスをもたらすことがあり、それは、完了するまでにかなりの時間を要することに加えて、下流の細胞処理に、または細胞生物学にさえ、潜在的に影響を及ぼす。したがって、例えば細胞治療などにおける使用に適した細胞集団を産生するための、細胞ハンドリングおよび処理時間を最小限に抑える改良された方法が必要とされている。そのようなニーズを満たす方法、製造物品および装置が提供される。

【発明の概要】

【0005】

概要

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有するオリゴマー刺激試薬を、複数の固定化T細胞を含有する固定相に加え、それによって、刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、固定相は、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、オリゴマー刺激試薬は、(i) 抗CD3抗体である第1刺激物質と(ii) 抗CD28抗体である第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含む、工程、およびインキュベーション開始から24時間以内に、前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数の重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。提供される方法において、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質は、複数のT細胞を固定相上に固定化する。

【0006】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有するオリゴマー刺激試薬を、固定相上に固定化された複数の固定化T細胞と共にインキュベートし、それによって、刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、固定相は、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、オリゴマー刺激試薬は、(i) 抗CD3抗体である第1刺激物質と(ii) 抗CD28抗体である第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含む、工程、およびインキュベーション開始から24時間以内に、前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数の重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。提供される方法において、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質は、複数のT細胞を固定相上に固定化する。

【0007】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有するオリゴマー刺激試薬を、固定相上に固定化された複数の固定化T細胞と混合し、それによって、刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、固定相は、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、オリゴマー刺激試薬は、(i) 抗CD3抗体である第1刺激物質と(ii) 抗CD28抗体である第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含む、工程、およびインキュベーション開始から24時間以内に、前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数の重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。提供される方法において、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質は、複数のT細胞を固定相上に固定化する。

【0008】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激のための方法が提供される:固定相上に固定化された複数のT細胞を1つまたは複数の刺激物質と共にインキュベートして、前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する工程であって、固定相は、前記1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質

10

20

30

40

50

を含み、前記1つまたは複数のT細胞によって発現された選択マーカーへの選択物質の特異的結合が、固定相への前記1つまたは複数のT細胞の固定化をもたらす、工程、およびインキュベーションの開始から24時間以内に、前記複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく前記1つまたは複数のT細胞を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。T細胞のオンカラム刺激のための方法であって、以下の工程を含む方法が提供される:固定相上に固定化された複数のT細胞を1つまたは複数の刺激物質と共にインキュベートして、前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する工程であって、固定相は、前記1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、前記1つまたは複数のT細胞によって発現された選択マーカーへの選択物質の特異的結合が、前記1つまたは複数のT細胞を固定相上に固定化する、工程、およびインキュベーションの開始から24時間以内に、前記1つまたは複数のT細胞を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。いくつかの態様において、固定相は、前記1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つを含有する。いくつかの態様において、少なくとも1つの刺激物質は、第1刺激物質であり、固定相は、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数を含み、さらに含む。いくつかの態様において、刺激物質は第1刺激物質であり、インキュベートする工程に先立って、固定相には、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数を含む刺激試薬を加える。いくつかの態様において、刺激物質は第1刺激物質であり、インキュベートする工程に先立って、固定相には、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数を含む刺激試薬を加える。いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質は第1刺激物質および第2刺激物質であり、インキュベートする工程に先立って、固定相には、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質を含む刺激試薬を加える。いくつかの態様では、インキュベートする工程に先立って、固定相に、1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つを含有する刺激試薬を加える。

【0009】

いくつかの態様において、少なくとも1つの刺激物質は第1刺激物質であり、1つまたは複数の刺激物質は、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数を含み、さらに含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つ、任意で第1刺激物質は、刺激シグナルを送達する能力を有し、刺激シグナルは、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介した刺激シグナルである。いくつかの態様において、1つまたは複数の第1刺激物質のうちの少なくとも1つは、刺激シグナルを送達する能力を有し、刺激シグナルは、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介した刺激シグナルである。いくつかの態様において、第2刺激物質は、前記1つまたは複数のT細胞上の共刺激分子に特異的に結合する能力を有する。いくつかの態様において、第1刺激物質は、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介して刺激シグナルを送達し、第2刺激物質はT細胞上の共刺激分子に結合する。

【0010】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:複数のT細胞を含有する試料を固定相に加える工程であって、固定相は、前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面上の選択マーカーに結合する選択物質を含有し、それによって、前記複数のT細胞のうちの前記1つまたは複数が固定相上に固定化される、工程、固定相に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含有する刺激試薬を加え、それによって、刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程、およびインキュベーションを開始する工程から24時

10

20

30

40

50

間以内に、前記複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく該複数のT細胞のうちの1つまたは複数を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。

【0011】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:複数のT細胞を含有する試料を固定相に加える工程であって、固定相は、前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面上の選択マーカーに結合する選択物質を含有し、それによって、前記複数のT細胞のうちの前記1つまたは複数が固定相上に固定化される、工程、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含有する刺激試薬を固定相に加え、それによって、刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程、およびインキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。

10

【0012】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:固定相上の複数のT細胞を含有する試料であって、該固定相は、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面上の選択マーカーに結合する選択物質を含有し、それによって、複数のT細胞のうちの該1つまたは複数が該固定相上に固定化されている、試料を、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含有する刺激試薬と共にインキュベートし、それによって、該刺激試薬と該1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程、およびインキュベーション開始から24時間以内に、前記複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく該複数のT細胞のうちの1つまたは複数を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。

20

【0013】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:(1) (a) 複数のT細胞を含有する試料と (b) 前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面に発現した選択マーカーに特異的に結合する能力を有する選択物質を含有する固定相とを混合する工程であって、選択マーカーに対する選択物質の特異的結合が、固定相への該複数のT細胞の固定化をもたらす、工程、(2) T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含有する刺激試薬を固定相に加え、それによって、刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程、および(3) インキュベーション開始から24時間以内に、前記複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく該複数のT細胞のうちの1つまたは複数を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。

30

【0014】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:(1) (a) 複数のT細胞を含有する試料と (b) 前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面に発現した選択マーカーに特異的に結合する能力を有する選択物質を含有する固定相とを混合する工程であって、選択マーカーに対する選択物質の特異的結合が、前記複数のT細胞のうちの該1つまたは複数を固定相に固定化する、工程、(2) T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含有する刺激試薬を固定相に加え、それによって、刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程、および(3) インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。

40

【0015】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:オリゴマー刺激試薬を、複数の固定化T細胞を含有する固定相に加え、それによって、刺激試薬と前記複数の固定化T細胞のうちの1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって

50

、固定相は、1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、前記1つまたは複数のT細胞によって発現された選択マーカーへの選択物質の特異的結合が、固定相への該1つまたは複数のT細胞の固定化をもたらし、オリゴマー刺激試薬は、(i) 複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子と(ii) 1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質とを含有し、オリゴマー刺激試薬のサイズは、i) 50nm超の半径、ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量および/または(iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、工程。いくつかの態様において、本方法は、インキュベーション開始から24時間以内に、前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程を、さらに含む。いくつかの態様において、本方法は、インキュベーション開始から24時間以内に、前記複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程を、さらに含む。

【0016】

いくつかの態様において、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することは、インキュベーション開始から約23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2時間以内に行われる。いくつかの態様において、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することは、インキュベーション開始から約2~24、3~24、4~24、5~24、6~24、7~24、8~24、9~24、10~24、11~24、12~24、13~24、14~24、15~24、16~24、17~24、18~24、19~24、20~24、21~24、22~24、23~24、2~23、2~22、2~21、2~20、2~19、2~18、2~17、2~16、2~15、2~14、2~13、2~12、2~11、2~10、2~9、2~8、2~7、2~6、2~5、2~4または2~3時間以内に行われる。いくつかの態様において、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することは、インキュベーション開始から約12、10、8、6、4または2時間以内に行われる。いくつかの態様において、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することは、インキュベーション開始から6時間以内に行われる。いくつかの態様において、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することは、インキュベーション開始から5時間以内に行われる。いくつかの態様において、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することは、インキュベーション開始から4.5時間以内または約4.5時間以内に行われる。いくつかの態様において、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することは、インキュベーション開始から4時間以内に行われる。いくつかの態様において、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することは、インキュベーション開始から3時間以内に行われる。

【0017】

いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、10分以内もしくは約10分以内、20分以内もしくは約20分以内、30分以内もしくは約30分以内、45分以内もしくは約45分以内、60分以内もしくは約60分以内、90分以内もしくは約90分以内または120分以内もしくは約120分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、20分~100分以内または約20~100分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、30~90分以内または約30~90分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、30分~80分以内または約30~80分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混

合した後、30分～70分以内または約30～70分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、30分～60分以内または約30～60分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、30分～50分以内または約30～50分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、30分～40分以内または約30～40分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、30分以内または約30分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、40分以内または約40分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、50分以内または約50分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、60分以内または約60分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、70分以内または約70分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、80分以内または約80分以内に行われる。いくつかの態様において、刺激試薬とのインキュベーションの開始は、複数のT細胞を含有する試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、90分以内または約90分以内に行われる。

【0018】

いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つは、刺激シグナルを送達する能力を有し、刺激シグナルは、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介した刺激シグナルである。いくつかの態様において、少なくとも1つの刺激物質は第1刺激物質であり、刺激試薬は、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数、さらに含有する。いくつかの態様において、第2刺激物質は、前記1つまたは複数のT細胞上の共刺激分子に特異的に結合する能力を有する。いくつかの態様において、共刺激分子は、CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMの中から選択される。いくつかの態様において、第2刺激物質は、CD28に特異的に結合する能力を有する。いくつかの態様において、第1刺激物質はCD3に特異的に結合し、第2刺激物質はCD28に特異的に結合する。

【0019】

いくつかの態様において、刺激物質は、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、もしくはそれを含有し;および/または刺激物質は抗体フラグメントを含有し;刺激物質はFabフラグメントであるか、もしくはそれを含有し;刺激物質は、(Fab) 2'フラグメントおよび二価一本鎖Fv (scFv) フラグメントからなる二価抗体フラグメントの群から選択され;刺激物質は、Fabフラグメント、FvフラグメントおよびscFvからなる群より選択される一価抗体フラグメントであり;および/または刺激物質は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ (glubody)、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質、結晶スキャフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーからなる群より選択される、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子である。

【0020】

いくつかの態様において、第1刺激物質および第2刺激物質は、独立して、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、もしくはそれを含有し;ならびに/または第1刺激物質および第2刺激物質は、独立して、抗体フラグメントを含有し;第1刺激物質および第2刺激物質は、独立して、Fabフラグメントであるか、もしくはそれを含有し;第1刺激物質および第2刺激物質は、独立して、(Fab) 2'フラグメントおよび二価一本鎖Fv(scFv)フラグメントからなる二価抗体フラグメントの群から選択され;第1刺激物質および第2刺激物質は、独立して、Fabフラグメント、FvフラグメントおよびscFvからなる群より選択される一価抗体フラグメントであり;ならびに/または第1刺激物質および第2刺激物質は、独立して、アプタマー、リボカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質、結晶スキャフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーからなる群より選択される、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子である。

【0021】

いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質は、一価抗体フラグメントを含む。いくつかの態様において、第1刺激物質および第2刺激物質は、独立して、一価抗体フラグメントを含む。いくつかの態様において、第1刺激物質はCD3に結合する一価抗体フラグメントを含み、第2刺激物質はCD28に結合する一価抗体フラグメントを含む。いくつかの態様において、一価抗体フラグメントは、Fabフラグメント、Fvフラグメントおよび一本鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択される。いくつかの態様において、第1刺激試薬は抗CD3 Fabであり、第2刺激物質は抗CD28 Fabである。

【0022】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法が提供される:T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有するオリゴマー刺激試薬を、複数の固定化T細胞を含有する固定相に加え、それによって、刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、固定相は、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する能力を有する選択物質を含有し、前記1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットによって発現された選択マーカーに対する選択物質の特異的結合が、固定相への該少なくとも複数のT細胞の固定化をもたらし、選択物質は、CD3、CD4およびCD8からなる群より選択される選択マーカーに特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり;オリゴマー刺激試薬は、(i) 複数のストレプトアビジンムテイン分子、(ii) CD3に特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり、1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する第1刺激物質、および(iii) CD28に特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり、刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質を含有し、オリゴマー刺激試薬のサイズは、i) 50 nm超の半径、ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量、および/または(iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、工程、ならびに、インキュベーション開始から24時間以内に、前記複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく前記複数のT細胞のうちの1つまたは複数を集重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程。

【0023】

いくつかの態様において、T細胞は、全血試料、パフィーコート試料、末梢血単核球(PBMC)試料、未分画T細胞試料、リンパ球試料、白血球試料、アフエーシス産物または白血球アフエーシス産物であるかそれを含む試料に由来する。いくつかの態様において、試料はアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物である。いくつかの態様において、アフエーシス産物または白血球アフエーシス産物は、以前にクライオ凍結(cryofrozen)されている。

【0024】

いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質と共にインキュベートすることは、複数の固定化T細胞のうちの1つまたは複数の固定相から遊離させる。いくつかの態様において、第1刺激物質および第2刺激物質と共にインキュベートすることは、複数の固定化T細胞のうちの1つまたは複数の固定相から遊離させる。

【0025】

いくつかの態様において、刺激物質は、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15),
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18)
および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグを、さらに含有する。いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質は、

20

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18)
および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

30

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドを、さらに含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質が、配列 SAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (SEQ ID NO: 16)

を有するストレプトアビジン結合ペプチドを、さらに含む。

【0026】

いくつかの態様において、第1刺激物質および第2刺激物質は、独立して、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

40

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグを、さらに含有する。いくつかの態様において、第1刺激物質および第2刺激物質のそれぞれは、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-

Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:

17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-

Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-

His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(SEQ ID NO: 19)

20

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドを、さらに含む。いくつかの態様において、第1刺激物質および第2刺激物質のそれぞれは、配列 SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO: 16)

30

を有するストレプトアビジン結合ペプチドを、さらに含む。

【0027】

いくつかの態様において、選択物質は、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、もしくはそれを含有し;および/または選択物質は抗体フラグメントを含有し;選択物質はFabフラグメントであるか、もしくはそれを含有し;選択物質は、(Fab)₂フラグメントおよび二価一本鎖Fv (scFv) フラグメントからなる二価抗体フラグメントの群から選択され;選択物質は、Fabフラグメント、FvフラグメントおよびscFvからなる群より選択される一価抗体フラグメントであり;および/または選択物質は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質、結晶スキャフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーからなる群より選択される、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子である。

40

【0028】

いくつかの態様において、選択物質は、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

50

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグを、さらに含有する。いくつかの態様において、選択物質は、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

20

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドを、さらに含む。いくつかの態様において、選択物質は、配列 SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO:16)

30

を有するストレプトアビジン結合ペプチドを、さらに含む。

【0029】

いくつかの態様において、選択マーカーはT細胞補助受容体であり;選択マーカーはT細胞抗原受容体複合体のメンバーであるか、もしくはそれを含有し;選択マーカーはCD3鎖であるか、もしくはそれを含有し;選択マーカーはCD3ゼータ鎖であるか、もしくはそれを含有し;選択マーカーはCD8であるか、もしくはそれを含有し;選択マーカーはCD4であるか、もしくはそれを含有し;選択マーカーはCD45RAであるか、もしくはそれを含有し;選択マーカーはCD27であるか、もしくはそれを含有し;選択マーカーはCD28であるか、もしくはそれを含有し;および/または選択マーカーはCCR7であるか、もしくはそれを含有する。いくつかの態様において、選択マーカーはCD3、CD4およびCD8からなる群より選択される。いくつかの態様において、選択マーカーはCD3である。

40

【0030】

いくつかの態様において、選択物質と選択マーカーの間の特異的結合は、T細胞へのシグナルを誘導しないか、または、T細胞への刺激シグナル、活性化シグナルおよび増殖シグナルをいずれも誘導しない。いくつかの態様において、選択物質は、CD3、CD8またはCD4に結合する一価抗体フラグメントを含む。いくつかの態様において、選択物質は抗CD3 Fab、抗CD8 Fabまたは抗CD4 Fabである。いくつかの態様において、選択物質は抗CD3 Fabである。いくつかの態様において、抗CD3 FabはOKT3抗体Fabフラグメントを含む。いくつかの態様において、抗CD3 Fabは、SEQ ID NO:31で示される配列を有する可変重鎖およびSEQ ID NO:32で示される配列を有する可変軽鎖を含む。

50

【0031】

いくつかの態様において、刺激試薬は可溶性である。いくつかの態様において、刺激試薬は、固形支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁気粒子および/もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合も会合もしておらず;ならびに/または、本試薬は、フレキシブルであり、金属コアも磁気コアも含有せず、完全にまたは主として有機多量体で構成され、形状は球状ではなく、実質的に球状または均一ではなく、および/または剛直ではない。いくつかの態様において、刺激試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、またはビオチン、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なそのフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンのムテイン;ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンのムテイン;少なくとも2つのキレート基Kを含有する試薬であって、前記少なくとも2つのキレート基が、遷移金属イオンに結合する能力を有する、試薬;オリゴヒスチジンアフィニティータグに結合する能力を有する物質;グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合する能力を有する物質;カルモジュリンまたはその類似体;カルモジュリン結合ペプチド(CBP)に結合する能力を有する物質;FLAGペプチドに結合する能力を有する物質;HAタグに結合する能力を有する物質;マルトース結合タンパク質(MBP)に結合する能力を有する物質;HSVエピトープに結合する能力を有する物質;mycエピトープに結合する能力を有する物質;またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する物質であるか、またはそれを含有する。

10

【0032】

いくつかの態様において、刺激試薬は、ビオチンもしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含有し;刺激試薬は、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含有し;および/または刺激試薬は、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインまたはアビジンムテインであるか、またはそれを含有する。

20

【0033】

いくつかの態様において、刺激試薬は、複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子を含有するオリゴマー刺激試薬であり、オリゴマー刺激粒子試薬のサイズは、i) 50nm超の半径、ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量および/または(i ii) オリゴマー粒子試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は可溶性である。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、固形支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁気粒子および/もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合も会合もしておらず;ならびに/または、本試薬は、フレキシブルであり、金属コアも磁気コアも含有せず、完全にもしくは主として有機多量体で構成され、かつ/もしくは剛直ではない。

30

【0034】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子は、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するか、または可逆的に結合する能力を有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44~47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val44-Thr45-Ala46-Arg47またはIle44-Gly45-Ala46-Arg47を含有するか、またはストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44~47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val44-Thr45-Ala46-Arg47を含有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、

40

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)³-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)²-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)²Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択される。

【0035】

いくつかの態様において、オリゴマー粒子試薬は、60nm超、70nm超、80nm超または90nm超の半径を含む。いくつかの態様において、オリゴマー粒子試薬は、両端の値を含む50nm～150nm、75nm～125nm、80nm～115nmまたは90nm～110nmの半径、または90nm±15nmもしくは95nm±20～25nmの半径を含む。いくつかの態様において、半径は流体力学的半径である。

【0036】

いくつかの態様において、オリゴマー粒子試薬は以下の分子量を含む:少なくとも 5×10^7 g/molもしくは少なくとも 1×10^8 g/mol;および/または 5×10^7 g/mol～ 5×10^8 g/mol、 1×10^8 g/mol～ 5×10^8 g/mol、もしくは 1×10^8 g/mol～ 2×10^8 g/mol。いくつかの態様において、オリゴマー粒子試薬は、少なくとも500個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、少なくとも1,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、少なくとも1,500個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、または少なくとも2,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体;および/または1,000～20,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、1,000～10,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、または2,000～5,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、約1～約2 μg/細胞100万個の濃度で固定相に加えられる。

20

【0037】

いくつかの態様において、選択物質は、固定相に直接的または間接的に結合される。いくつかの態様において、選択物質は、選択物質が可逆的に結合する選択試薬を介して間接的に、固定相に結合される。いくつかの態様において、選択試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、またはビオチン、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なそのフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンのムテイン;ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンのムテイン;少なくとも2つのキレート基Kを含有する試薬であって、前記少なくとも2つのキレート基が、遷移金属イオンに結合する能力を有する、試薬;オリゴヒスチジンアフィニティータグに結合する能力を有する物質;グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合する能力を有する物質;カルモジュリンまたはその類似体;カルモジュリン結合ペプチド (CBP) に結合する能力を有する物質;FLAGペプチドに結合する能力を有する物質;HAタグに結合する能力を有する物質;マルトース結合タンパク質 (MBP) に結合する能力を有する物質;HSVエピトープに結合する能力を有する物質;mycエピトープに結合する能力を有する物質;またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する物質であるか、またはそれを含有する。いくつかの態様において、選択試薬は、ビオチンもしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含有し;刺激試薬は、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するス

30

40

50

トレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含有し;および/または刺激試薬は、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインまたはアビジンムテインであるか、またはそれを含有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子は、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するか、または可逆的に結合する能力を有する。

【0038】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44~47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val44-Thr45-Ala46-Arg47またはIle44-Gly45-Ala46-Arg47を含有するか、またはストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44~47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val44-Thr45-Ala46-Arg47を含有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、

Trp-Ser-

His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK

(SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-

Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK (SEQ ID

NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(SEQ ID NO: 18) およびTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-

Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択される。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、配列

SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)

を有する。

【0039】

いくつかの態様において、本明細書において提供される方法は、37℃または約37℃で実行される。いくつかの態様において、収集は、固定相からT細胞を溶出させるための競合剤も遊離結合剤も含有しない培地で固定相を洗浄することを含む。いくつかの態様において、重力流によって収集することは、固定相からT細胞を溶出させるための競合剤も遊離結合剤も含まない培地を固定相に加えることを含む。いくつかの態様において、刺激されたT細胞を含有する組成物は、競合剤または遊離結合剤を含有しない。いくつかの態様において、競合剤または遊離結合剤は、ビオチンもしくはビオチン類似体であるか、またはそれを含有し、任意で、ビオチン類似体はD-ビオチンである。いくつかの態様において、競合剤または遊離結合剤はD-ビオチンである。いくつかの態様において、本方法は、該収集後に、刺激されたT細胞を含有する組成物をさらにインキュベートする工程を含む。いくつかの態様において、さらなるインキュベーションは、37℃±2℃または約37℃±2℃で実行され;および/またはさらなるインキュベーションは、T細胞においてシグナルを送達する能力を有するさらなる作用物質の存在下で実行される。いくつかの態様において、さらなる作用物質は、固定相を洗浄するために使用される培地に含有される。いくつかの態様において、さらなる作用物質は、T細胞、CD4+T細胞および/またはCD8+T細胞の増殖を増強または誘導する能力を有する。いくつかの態様において、さらなる作用物質は、IL-2、IL-15およびIL-7の中から選択されるサイトカインである。いくつかの態様において、さらなるインキュベーションは、72時間、48時間以下、24時間以下、または12時間以下の時間にわたって実行される。

【0040】

いくつかの態様において、本方法は、本組成物の刺激されたT細胞に、組換えタンパク質をコードする組換え核酸分子を導入し、それによって、形質導入T細胞を含む組成物を作製する工程をさらに含む。いくつかの態様において、組換えタンパク質は抗原受容体である。いくつかの態様において、組換えタンパク質はキメラ抗原受容体である。

【0041】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体（CAR）は、標的抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含有する。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインはCD3-ゼータ（CD3ζ）鎖の細胞内ドメインを含む。いくつかの態様では、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する膜貫通ドメインがさらに含まれる。いくつかの態様において、膜貫通ドメインはCD28の膜貫通部分を含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインはT細胞共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含有する。いくつかの態様において、T細胞共刺激分子はCD28および41BBからなる群より選択される。いくつかの態様において、核酸は、組換え抗原受容体をコードする核酸に機能的に連結されたプロモータをさらに含有する。

【0042】

いくつかの態様において、組換え核酸の導入はウイルス粒子を使った形質導入によって達成される。いくつかの態様において、ウイルス粒子はレトロウイルスベクター粒子である。いくつかの態様において、ウイルス粒子はレンチウイルスベクター粒子である。

【0043】

いくつかの態様において、本方法は、形質導入細胞を含む組成物を、ウイルス組込みのための条件下、任意で37°±2℃または約37°±2℃において、インキュベートする工程をさらに含む。いくつかの態様において、形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程は、導入後、最大96時間にわたって実行される。いくつかの態様において、形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程は、導入後、最大72時間にわたって実行される。いくつかの態様において、形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程は、導入後、最大48時間にわたって実行される。いくつかの態様において、形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程は、導入後、最大24時間にわたって実行される。いくつかの態様において、形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程は、導入後、少なくとも18時間にわたって実行される。

【0044】

いくつかの態様において、本方法は、形質導入細胞を含有する組成物を、ウイルス組込みのための条件下で培養し、それによって、培養T細胞を含有する組成物を作製する工程をさらに含む。いくつかの態様において、本方法は、形質導入細胞を含有する組成物を、T細胞を拡大培養するための条件下で培養する工程をさらに含む。いくつかの態様において、培養は、14日以下、12日以下、10日以下、8日以下または6日以下の時間にわたって実行される。いくつかの態様では、5日以下である。

【0045】

いくつかの態様において、本方法は、操作されたT細胞を採取し、それによって、操作されたT細胞のアウトプット集団を作製する工程を、さらに含む。いくつかの態様において、本方法は、刺激試薬への曝露を開始した後、両端の値を含む48～120時間の時点で、操作されたT細胞を採取する工程をさらに含む。いくつかの態様において、採取は、刺激物質への曝露を開始した後、120時間以内に実行される。いくつかの態様において、採取は、刺激物質への曝露を開始した後、96時間以内に実行される。いくつかの態様において、採取は、刺激物質への曝露を開始した後、72時間以内に実行される。いくつかの態様において、採取は、刺激物質への曝露を開始した後、48時間以内に実行される。

【0046】

いくつかの態様において、ナイーブ様細胞のパーセンテージは、採取の時点で、集団中の全T細胞、集団中の全CD4+T細胞、または集団中のCD8+T細胞もしくはその組換えタンパク質発現細胞のうちの60%超または約60%超である。いくつかの態様において、ナ

10

20

30

40

50

イーブ様T細胞はCD27+CCR7+細胞を含む。

【0047】

いくつかの態様において、導入は無血清培地中で実行される。いくつかの態様において、インキュベートする工程は無血清培地中で実行される。いくつかの態様において、培養する工程は無血清培地中で実行される。いくつかの態様において、無血清培地は、基本培地中、0.5mM~5mMのジペプチド型L-グルタミン (dipeptide form of L-glutamine)、0.5mM~5mM L-グルタミン、および任意で少なくとも1つのタンパク質を含有し、この培地は血清を含まない。いくつかの態様において、無血清培地は、IL-2、IL-15およびIL-7の中から選択される組換えサイトカイン、任意で、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-15および/または組換えヒトIL-7を含有する。いくつかの態様において、無血清培地は、IL-2、IL-15およびIL-7の中から選択される組換えサイトカイン、任意で、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-15および/または組換えヒトIL-7を含有しない。

10

【0048】

いくつかの態様において、本方法は、形質導入細胞を含有する組成物をインキュベートする工程をさらに含む。いくつかの態様において、インキュベーションは、24時間±6時間、48時間±6時間もしくは72時間±6時間、または約24時間±6時間、48時間±6時間もしくは72時間±6時間にわたって実施される。

【0049】

いくつかの態様において、本方法は、刺激されたT細胞を含有する組成物に競合剤または遊離結合剤を加え、それによって、前記可逆的結合を破壊する工程を、さらに含む。いくつかの態様において、本方法は、形質導入T細胞を含有する組成物に競合剤または遊離結合剤を加え、それによって、前記可逆的結合を破壊する工程を、さらに含む。いくつかの態様において、本方法は、培養T細胞を含有する組成物に競合剤または遊離結合剤を加え、それによって、前記可逆的結合を破壊することを、さらに含む。いくつかの態様において、本方法は、操作された細胞、任意で形質導入T細胞、を含有する組成物に競合剤または遊離結合剤を加える工程をさらに含み、任意で、該剤は、1つまたは複数の刺激物質を組成物中のオリゴマー刺激試薬から解離させるための条件下で加えられる。いくつかの態様において、本方法は、インキュベートされたT細胞を含有する組成物に、任意で、1つまたは複数の刺激物質を組成物中のオリゴマー刺激試薬から解離させるための条件下で、競合剤または遊離結合剤を加える工程を、さらに含む。いくつかの態様において、本方法は、培養T細胞を含有する組成物に、任意で、1つまたは複数の刺激物質を組成物中のオリゴマー刺激試薬から解離させるための条件下で、競合剤または遊離結合剤を加える工程を、さらに含む。いくつかの態様において、競合剤または遊離結合剤を添加する工程は、採取に先立って実行される。

20

30

【0050】

いくつかの態様において、競合剤もしくは遊離結合剤は、T細胞にとって有害ではなく、および/または、該物質の添加は、競合剤も遊離結合剤も使用しない同等もしくは同じ条件下でのT細胞のインキュベーションとの比較で、生残するT細胞のパーセンテージを90%未満、80%未満、70%未満、60%未満もしくは50%未満に低減させることはない。いくつかの態様において、該破壊は、T細胞における刺激シグナルを終結または軽減させる。いくつかの態様において、競合試薬および遊離結合剤は、独立して、ストレプトアビジン結合分子;ビオチン;D-ビオチン;ビオチン類似体;ストレプトアビジン、または野生型ストレプトアビジンの位置44~47に対応する配列位置にアミノ酸配列Val44-Thr45-Ala46-Arg47もしくはIle44-Gly45-Ala46-Arg47を有するストレプトアビジン類似体に特異的に結合するビオチン類似体からなる群からの分子を含有し;または競合試薬および遊離結合剤は、独立して、任意でEDTAまたはEGTAである、金属キレート剤を含む。いくつかの態様において、競合剤または遊離結合剤はD-ビオチン、任意で1mMのD-ビオチンである。いくつかの態様において、本方法は、細胞を洗浄する工程をさらに含み、任意で、この洗浄する工程は組成物中の刺激試薬および/または前記1つもしくは複数の刺激物質を低減または除去する。いくつかの態様において、洗浄する工程は採取前に実行される。

40

50

【0051】

いくつかの態様において、T細胞は、抗原特異的T細胞もしくはその集団、Tヘルパー細胞もしくはその集団、細胞傷害性T細胞もしくはその集団、メモリーT細胞もしくはその集団、または制御性T細胞もしくはその集団を含有する。いくつかの態様において、T細胞はCD3+T細胞を含むか、CD4+および/またはCD8+T細胞を含む。

【0052】

いくつかの態様において、本方法は、組成物の刺激されたT細胞からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に導入工程が行われ、選択されたT細胞サブセットに組換え核酸分子が導入される。いくつかの態様において、本方法は、形質導入細胞を含有する組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後にインキュベーションが行われ、選択されたT細胞サブセットがウイルス組込みのための条件下でインキュベートされる。いくつかの態様において、本方法は、操作された細胞を含有する組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に培養工程が行われ、選択されたT細胞サブセットが、T細胞を拡大培養するための条件下で培養される。いくつかの態様において、本方法は、操作された細胞を含有する組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に採取工程が行われ、選択されたT細胞サブセットが、操作されたT細胞のアウトプット集団を作製するために採取される。いくつかの態様において、T細胞サブセットはナイーブ様T細胞であるか、またはナイーブ様T細胞上に発現するマーカーについて表面陽性であるT細胞は、CCR7+CD45RA+、CD27+CCR7+またはCD62L-CCR7+である。いくつかの態様において、ナイーブ様T細胞はCD27+CCR7+T細胞を含む。いくつかの態様において、ナイーブ様T細胞はCCR7+CD45RA+T細胞を含む。いくつかの態様において、T細胞サブセットは組換えタンパク質、任意でキメラ抗原受容体を発現する。いくつかの態様において、T細胞サブセットを選択する工程は、アフィニティークラムクロマトグラフィーによって実行される。

【0053】

いくつかの態様において、本方法は、採取された細胞を、冷凍保存用および/または対象への投与用に、任意で薬学的に許容される賦形剤の存在下で、製剤化する工程を、さらに含む。いくつかの態様において、採取された細胞は凍結保護物質の存在下で製剤化される。いくつかの態様において、

【0054】

いくつかの態様において、固定相は、クロマトグラフィーマトリックスであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、固定相は、固定相1mLあたりT細胞約7500万〜約1億2500万個の結合容量、任意で静的結合容量または動的結合容量を有する。いくつかの態様において、(a) 固定相は約20mLであり;および/または (b) 固定相は細胞20億±5億個の結合容量を有する。いくつかの態様において、本方法は、2つの固定相を含む。いくつかの態様では、2つの固定相が並列に配置される。いくつかの態様では、2つの固定相が逐次的に配置される。

【0055】

T細胞表面上の第1分子および第2分子にそれぞれ特異的に結合することによってT細胞を刺激する能力を有する第1刺激物質および第2刺激物質と、T細胞上の選択マーカーに特異的に結合することによって固定相上にT細胞を固定化する能力を有する選択物質を含む固定相とを含有する、T細胞のオンカラム刺激のための製造物品が提供される。いくつかの態様において、固定相は、第1刺激物質および第2刺激物質をさらに含有する。いくつかの態様において、第1刺激物質、第2刺激物質および選択物質は、選択試薬を介して間接的に固定相に結合される。いくつかの態様において、本物品は、第1刺激物質および第2刺激物質が可逆的に結合されるまたは可逆的に結合されうる刺激試薬をさらに含む。いくつかの態様において、刺激試薬はオリゴマー刺激試薬である。いくつかの態様において、選択物質は、選択試薬を介して間接的に固定相に結合される。

【0056】

いくつかの態様において、固定相はクロマトグラフィーマトリックスであるか、それを

含み、製造物品はクロマトグラフィーマトリックスの全部または一部を含有する容器を、さらに含有する。いくつかの態様において、製造物品は2つの固定相を含む。いくつかの態様では、2つの固定相が並列に配置される。いくつかの態様では、2つの固定相が逐次的に配置される。

【0057】

前記製造物品およびその態様を含む装置が提供される。いくつかの態様において、装置は、装置の1つまたは複数の構成要素に流体的に接続された流体入口および/あるいは装置の1つまたは複数の構成要素に流体的に接続された流体出口をさらに含む。いくつかの態様において、装置は閉鎖システム内または無菌システム内にある。いくつかの態様において、システムは閉鎖システムかつ無菌システムである。

10

【0058】

自動で実行されてもよい本明細書において提供される方法（その態様を含む）のいずれかにおいて使用するための装置および/または製造物品が提供される。

[本発明1001]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有するオリゴマー刺激試薬を、複数の固定化T細胞を含む固定相に加え、それによって、該刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、

該固定相が、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、

20

該オリゴマー刺激試薬が、(i) 抗CD3抗体である第1刺激物質と(ii) 抗CD28抗体である第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含む、

工程;および

インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

[本発明1002]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

(a) 固定相上に固定化された複数のT細胞を1つまたは複数の刺激物質と共にインキュベートして、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する工程であって、該固定相が、該1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞によって発現された該選択マーカーへの該選択物質の特異的結合が、該1つまたは複数のT細胞を該固定相上に固定化する、工程;および

30

(b) インキュベーションの開始から24時間以内に、該1つまたは複数のT細胞を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

[本発明1003]

固定相が、1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つを含むか、あるいは該1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つと共に固定化される、本発明1002の方法。

40

[本発明1004]

1つまたは複数の刺激物質が第1刺激物質および第2刺激物質であり、インキュベートすることに先立って、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質を含む刺激試薬が固定相に加えられる、本発明1002の方法。

[本発明1005]

インキュベートすることに先立って、1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つを含む刺激試薬を固定相に加える工程を含む、本発明1002の方法。

[本発明1006]

少なくとも1つの刺激物質が第1刺激物質であり、1つまたは複数の刺激物質が、第1刺激

50

物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質をさらに含む、本発明1005の方法。

[本発明1007]

1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つ、任意で第1刺激物質が、刺激シグナルを送達する能力を有し、該刺激シグナルが、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介した刺激シグナルである、本発明1002～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

第2刺激物質が、1つまたは複数のT細胞上の共刺激分子に特異的に結合する能力を有する、本発明1004、1006および1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

(a) 複数のT細胞を含む試料を固定相に加える工程であって、該固定相が、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面上の選択マーカーに結合する選択物質を含み、それによって、複数のT細胞のうちの該1つまたは複数のT細胞が該固定相上に固定化される、工程;

(b) 該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含む刺激試薬を該固定相に加え、それによって、該刺激試薬と該1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程;および

(c) インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

[本発明1010]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

(1) (a) 複数のT細胞を含む試料と (b) 該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面上に発現した選択マーカーに特異的に結合する能力を有する選択物質を含む固定相とを混合する工程であって、選択マーカーに対する該選択物質の特異的結合が、該複数のT細胞のうちの該1つまたは複数のT細胞を該固定相に固定化する、工程;

(2) T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含む刺激試薬を該固定相に加え、それによって、該刺激試薬と該1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程;および

(3) インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

[本発明1011]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

オリゴマー刺激試薬を、複数の固定化T細胞を含む固定相に加え、それによって、該刺激試薬と該複数の固定化T細胞のうちの1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、

該固定相が、1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞によって発現された該選択マーカーへの該選択物質の特異的結合が、該1つまたは複数のT細胞を該固定相に固定化し、

該オリゴマー刺激試薬が、(i) 複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子と (ii) 1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質とを含み、該オリゴマー刺激試薬のサイズが、(i) 50nm超の半径、(ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量および/または (iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、

工程。

[本発明1012]

インキュベーション開始から24時間以内に、複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力

10

20

30

40

50

流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程をさらに含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から約23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2時間以内に行われる、本発明1001～1010または1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から約2～24、3～24、4～24、5～24、6～24、7～24、8～24、9～24、10～24、11～24、12～24、13～24、14～24、15～24、16～24、17～24、18～24、19～24、20～24、21～24、22～24、23～24、2～23、2～22、2～21、2～20、2～19、2～18、2～17、2～16、2～15、2～14、2～13、2～12、2～11、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4または2～3時間以内に行われる、本発明1001～1010、1012または1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から約12、10、8、6、4または2時間以内に行われる、本発明1001～1010または1012～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から5時間以内に行われる、本発明1001～1010または1012～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から4.5時間以内または約4.5時間以内に行われる、本発明1001～1010または1012～1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から4時間以内に行われる、本発明1001～1010または1012～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

刺激試薬とのインキュベーションの開始が、複数のT細胞を含む試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、10分以内もしくは約10分以内、20分以内もしくは約20分以内、30分以内もしくは約30分以内、45分以内もしくは約45分以内、60分以内もしくは約60分以内、90分以内もしくは約90分以内または120分以内もしくは約120分以内に行われる、本発明1001、1009、1010および1013～1017のいずれかの方法。

[本発明1020]

刺激試薬とのインキュベーションの開始が、複数のT細胞を含む試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、60分以内または約60分以内に行われる、本発明1001、1009、1010および1013～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つが、刺激シグナルを送達する能力を有し、該刺激シグナルが、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介した刺激シグナルである、本発明1009～1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

少なくとも1つの刺激物質が第1刺激物質であり、刺激試薬が、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数をさらに含む、本発明1021の方法。

[本発明1023]

第2刺激物質が、1つまたは複数のT細胞上の共刺激分子に特異的に結合する能力を有する、本発明1004、1006、1007および1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

共刺激分子がCD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMの中から選択される、本発明1008または本発明1023の方法。

[本発明1025]

第2刺激物質がCD28に特異的に結合する能力を有し、および/または共刺激分子がCD28である、本発明1008、本発明1023または本発明1024の方法。

10

[本発明1026]

第1刺激物質がCD3に特異的に結合し、第2刺激物質がCD28に特異的に結合する、本発明1014、1006、1007、1008および1020～1023のいずれかの方法。

[本発明1027]

1つまたは複数の刺激物質が、独立して、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、またはそれを含む、本発明1001～1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、またはそれを含む、本発明1004、1006、1007、1008または1013～1020、1022～1264のいずれかの方法。

20

[本発明1029]

1つまたは複数の刺激物質が一価抗体フラグメントを含む、本発明1001～1027のいずれかの方法。

30

[本発明1030]

第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、一価抗体フラグメントを含む、本発明1001、1004、1006、1007、1008、1013～1020、1022～1026および1028のいずれかの方法。

[本発明1031]

第1刺激物質が、CD3に結合する一価抗体フラグメントを含み、第2刺激物質が、CD28に結合する一価抗体フラグメントを含む、本発明1001、1004、1006、1007、1008、1013～1020、1022～1026、1028および1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

一価抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fvフラグメントおよび一本鎖Fvフラグメント (scFv) からなる群より選択される、本発明1027～1031のいずれかの方法。

40

[本発明1033]

第1刺激物質が抗CD3 Fabであり、第2刺激物質が抗CD28 Fabである、本発明1001、1004、1006、1007、1008、1013～1020、1022～1026、1028および1030～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有するオリゴマー刺激試薬を、複数の固定化T細胞を含む固定相に加え、それによって、該刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、

50

該固定相が、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する能力を有する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットによって発現された選択マーカーに対する該選択物質の特異的結合が、該少なくとも複数のT細胞を該固定相に固定化し、該選択物質が、CD3、CD4およびCD8からなる群より選択される選択マーカーに特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり、

該オリゴマー刺激試薬が、(i) 複数のストレプトアビジン分子、(ii) CD3に特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり、1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する第1刺激物質、および (iii) CD28に特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり、刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質を含み、該オリゴマー刺激試薬のサイズが、(i) 50nm超の半径、(ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量、および/または (iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジン分子四量体を含む、

工程;ならびに

インキュベーション開始から24時間以内に、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

[本発明1035]

T細胞が、全血試料、バフィーコート試料、末梢血単核球(PBMC)試料、未分画T細胞試料、リンパ球試料、白血球試料、アフエーシス産物または白血球アフエーシス産物であるかそれを含む試料に由来する、本発明1001~1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

試料がアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物である、本発明1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

アフエーシス産物または白血球アフエーシス産物が以前にクライオ凍結(cryofrozen)されている、本発明1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

1つまたは複数の刺激物質と共にインキュベートすることが、複数の固定化T細胞のうちの1つまたは複数の固定相から遊離させる、本発明1002~1027および1029のいずれかの方法。

[本発明1039]

第1刺激物質および第2刺激物質と共にインキュベートすることが、複数の固定化T細胞のうちの1つまたは複数の固定相から遊離させる、本発明1001、1004、1006、1007、1008、1013~1020、1022~1026、1028、1030~1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

1つまたは複数の刺激物質が、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-

Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-

His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID

NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18)

およびTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-

Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合す

るFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、本発明1001～1027、1029および1035～1028のいずれかの方法。

[本発明1041]

1つまたは複数の刺激物質が、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドをさらに含む、本発明1001～1027、1029および1035～1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

1つまたは複数の刺激物質が、配列

SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

20

を有するストレプトアビジン結合ペプチドをさらに含む、本発明1001～1027、1029および1035～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:

8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ

30

ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、本発明1001、1004、1006、1007、1008、1013～1020、1022～1026、1028、1030～1039のいずれかの方法。

40

[本発明1044]

第1刺激物質および第2刺激物質のそれぞれが、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドをさらに含む、本発明1001、1004、1006、1007、1008、1013～1020、1022～1026、1028、1030～1039および1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

第1刺激物質および第2刺激物質のそれぞれが、配列 SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

を有するストレプトアビジン結合ペプチドをさらに含む、本発明1001、1004、1006、1007、1008、1013～1020、1022～1026、1028、1030～1039、1043および1044のいずれかの方法。

20

[本発明1046]

選択物質が、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、またはそれを含む、本発明1001～1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

選択マーカーがT細胞補助受容体であり;
選択マーカーがT細胞抗原受容体複合体のメンバーであるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD3鎖であるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD3ゼータ鎖であるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD8であるか、もしくはそれを含み;
選択マーカーがCD4であるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD45RAであるか、もしくはそれを含み;
選択マーカーがCD27であるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD28であるか、もしくはそれを含み、および/または
選択マーカーがCCR7であるか、もしくはそれを含む、
本発明1001～1046のいずれかの方法。

30

[本発明1048]

選択マーカーが、CD3、CD4およびCD8からなる群より選択される、本発明1001～1047のいずれかの方法。

40

[本発明1049]

選択マーカーがCD3である、本発明1001～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

選択物質が、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

50

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:

8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、本発明1001～1049のいずれかの方法。

[本発明1051]

選択物質が、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:

8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

20

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチドをさらに含む、本発明1001～1050のいずれかの方法。

[本発明1052]

選択物質が、配列

SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO:16)

30

を有するストレプトアビジン結合ペプチドをさらに含む、本発明1001～1051のいずれかの方法。

[本発明1053]

選択物質と選択マーカーの間の特異的結合が、T細胞へのシグナルを誘導しないか、または、T細胞への刺激シグナル、活性化シグナルおよび増殖シグナルをいずれも誘導しない、本発明1001～1052のいずれかの方法。

[本発明1054]

選択物質が、CD3、CD8またはCD4に結合する一価抗体フラグメントを含む、本発明1001～1053のいずれかの方法。

40

[本発明1055]

選択物質が抗CD3 Fab、抗CD8 Fabまたは抗CD4 Fabである、本発明1001～1054のいずれかの方法。

[本発明1056]

選択物質が抗CD3 Fabである、本発明1001～1055のいずれかの方法。

[本発明1057]

刺激試薬が、複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子を含むオリゴマー刺激試薬であり、該オリゴマー粒子試薬のサイズが、(i) 50nm超の半径

50

、(ii) 少なくとも $5 \times 10^6 \text{ g/mol}$ の分子量および/または(iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、本発明1004～1010、1013～1033および1035～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

オリゴマー刺激試薬が、複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子を含み、該オリゴマー粒子試薬のサイズが、(i) 50nm超の半径、(ii) 少なくとも $5 \times 10^6 \text{ g/mol}$ の分子量および/または(iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、本発明1001の方法。

[本発明1059]

オリゴマー刺激試薬が可溶性である、本発明1001、1011～1058のいずれかの方法。

[本発明1060]

オリゴマー刺激試薬が、固形支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁気粒子および/もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合も会合もしておらず、ならびに/または該試薬が、フレキシブルであり、金属コアも磁気コアも含有せず、完全にもしくは主として有機多量体で構成され、かつ/もしくは剛直ではない、本発明1001、1011～1059のいずれかの方法。

[本発明1061]

ストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するか、または可逆的に結合する能力を有する、本発明1011～1060のいずれかの方法。

[本発明1062]

ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むか、または

ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、

本発明1011～1061のいずれかの方法。

[本発明1063]

ストレプトアビジン結合ペプチドが、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-

Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-

Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID

NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-

Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択される、本発明1061または1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

オリゴマー刺激試薬が、

60nm超、70nm超、80nm超または90nm超の半径

を含む、本発明1001および1011～1063のいずれかの方法。

[本発明1065]

オリゴマー刺激試薬が、

両端の値を含む50nm～150nm、75nm～125nm、80nm～115nmもしくは90nm～1

10

20

30

40

50

10nmの半径、または

90nm±15nmもしくは95nm±20～25nmの半径

を含む、本発明1001および1011～1064のいずれかの方法。

[本発明1066]

前記半径が流体力学的半径である、本発明1164のいずれかの方法。

[本発明1067]

オリゴマー刺激試薬が、

少なくとも 5×10^7 g/molもしくは少なくとも 1×10^8 g/mol、および/または

5×10^7 g/mol～ 5×10^8 g/mol、 1×10^8 g/mol～ 5×10^8 g/mol、もしくは 1×10^8 g/mol～ 2×10^8 g/mol

の分子量を含む、本発明1001および1011～1066のいずれかの方法。

[本発明1068]

オリゴマー刺激試薬が、

少なくとも500個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、少なくとも1,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、少なくとも1,500個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、または少なくとも2,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、および/または

1,000～20,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、1,000～10,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、または2,000～5,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体

を含む、本発明1001および1011～1067のいずれかの方法。

[本発明1069]

オリゴマー刺激試薬が、約1～約2 μg/細胞100万個の濃度で固定相に加えられる、本発明1001および1011～1068のいずれかの方法。

[本発明1070]

選択物質が固定相に直接的または間接的に結合される、本発明1001～1069のいずれかの方法。

[本発明1071]

選択物質が、該選択物質が可逆的に結合する選択試薬を介して間接的に固定相に結合される、本発明1001～1070のいずれかの方法。

[本発明1072]

選択試薬が、ストレプトアビジン;アビジン;ビオチン、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なそのフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンのムテイン;ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンのムテイン;少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬であって、該少なくとも2つのキレート基が、遷移金属イオンに結合する能力を有する、試薬;オリゴヒスチジンアフィニティータグに結合する能力を有する物質;グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合する能力を有する物質;カルモジュリンまたはその類似体;カルモジュリン結合ペプチド(CBP)に結合する能力を有する物質;FLAGペプチドに結合する能力を有する物質;HAタグに結合する能力を有する物質;マルトース結合タンパク質(MBP)に結合する能力を有する物質;HSVエピトープに結合する能力を有する物質;mycエピトープに結合する能力を有する物質;またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する物質であるか、またはそれを含む、本発明1070または本発明1071の方法。

[本発明1073]

選択試薬が、ビオチンもしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含み、

刺激試薬が、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含み、

10

20

30

40

50

および/あるいは

刺激試薬が、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含む、本発明1070～1072のいずれかの方法。

[本発明1074]

ストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するか、または可逆的に結合する能力を有する、本発明1072または本発明1073の方法。

[本発明1075]

ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むか、または

ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、

本発明1072～1074のいずれかの方法。

[本発明1076]

ストレプトアビジン結合ペプチドが、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-

Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

(SEQ ID NO:15), SAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-

His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID

NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-

Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択される、本発明1072～1075のいずれかの方法。

[本発明1077]

ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列

SAWSHQPFEKGGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (SEQ ID NO:16)

を有する、本発明1072～1076のいずれかの方法。

[本発明1078]

重力流によって収集することが、固定相からT細胞を溶出させるための競合剤も遊離結合剤 (free binding agent) も含まない培地を固定相に加えることを含む、本発明1001～1010または1012～1077のいずれかの方法。

[本発明1079]

刺激されたT細胞を含む組成物が競合剤も遊離結合剤も含まない、本発明1001～1010および1012～1078のいずれかの方法。

[本発明1080]

競合剤または遊離結合剤が、ビオチンもしくはビオチン類似体であるか、またはそれを含み、任意で、該ビオチン類似体が、D-ビオチンである、本発明1078または1079の方法。

[本発明1081]

前記組成物の刺激されたT細胞に、組換えタンパク質をコードする組換え核酸分子を導入し、それによって、操作されたT細胞を含む組成物、任意で形質導入T細胞を含む組成物を作製する工程をさらに含む、本発明1001～1078のいずれかの方法。

[本発明1082]

10

20

30

40

50

組換えタンパク質が抗原受容体である、本発明1081の方法。

[本発明1083]

組換えタンパク質がキメラ抗原受容体である、本発明1081または本発明1082の方法。

[本発明1084]

キメラ抗原受容体（CAR）が、標的抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む、本発明1083の方法。

[本発明1085]

細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ゼータ（CD3ζ）鎖の細胞内ドメインを含む、本発明1084の方法。

[本発明1086]

細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する膜貫通ドメインをさらに含む、本発明1084または本発明1085の方法。

[本発明1087]

膜貫通ドメインがCD28の膜貫通部分を含む、本発明1086の方法。

[本発明1088]

細胞内シグナル伝達ドメインがT細胞共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む、本発明1084～1087のいずれかの方法。

[本発明1089]

T細胞共刺激分子が、CD28および41BBからなる群より選択される、本発明1088の方法。

[本発明1090]

前記核酸が、組換え抗原受容体をコードする核酸に機能的に連結されたプロモータをさらに含む、本発明1081～1089のいずれかの方法。

[本発明1091]

組換え核酸の導入が、ウイルス粒子を使った形質導入によって達成される、本発明1081～1090のいずれかの方法。

[本発明1092]

ウイルス粒子がレトロウイルスベクター粒子である、本発明1091の方法。

[本発明1093]

ウイルス粒子がレンチウイルスベクター粒子である、本発明1091または本発明1092の方法。

[本発明1094]

形質導入細胞を含む組成物を、ウイルス組込みのための条件下、任意で37°±2℃または約37°±2℃の温度で、インキュベートする工程をさらに含む、本発明1081～1093のいずれかの方法。

[本発明1095]

形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程が、導入後、最大96時間にわたって実行される、本発明1094の方法。

[本発明1096]

形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程が、導入後、最大72時間にわたって実行される、本発明1094の方法。

[本発明1097]

形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程が、導入後、最大48時間にわたって実行される、本発明1094の方法。

[本発明1098]

形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程が、導入後、最大24時間にわたって実行される、本発明1094の方法。

[本発明1099]

形質導入細胞を含む組成物をインキュベートする工程が、導入後、少なくとも18時間にわたって実行される、本発明1094～1098のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[本発明1100]

操作された細胞を含む組成物、任意で形質導入細胞を含む組成物を、T細胞を拡大培養するための条件下で培養する工程をさらに含む、本発明1081～1099のいずれかの方法。

[本発明1101]

培養する工程が14日以下、12日以下、10日以下、8日以下、6日以下または5日以下の時間にわたって実行される、本発明1100の方法。

[本発明1102]

操作されたT細胞を採取し、それによって、操作されたT細胞のアウトプット集団を作製する工程をさらに含む、本発明1081～1101のいずれかの方法。

[本発明1103]

刺激試薬への曝露を開始した後、両端の値を含む48～120時間の時点で、操作されたT細胞を採取する工程をさらに含む、本発明1081～1099のいずれかの方法。

[本発明1104]

刺激物質への曝露を開始した後、120時間以内に採取が実行される、本発明1081～1099および1103のいずれかの方法。

[本発明1105]

刺激物質への曝露を開始した後、96時間以内に採取が実行される、本発明1081～1099および1103のいずれかの方法。

[本発明1106]

刺激物質への曝露を開始した後、72時間以内に採取が実行される、本発明1081～1099および1105のいずれかの方法。

[本発明1107]

刺激物質への曝露を開始した後、48時間以内に採取が実行される、本発明1081～1099および1106のいずれかの方法。

[本発明1108]

ナイーブ様細胞のパーセンテージが、採取の時点で、集団中の全T細胞、集団中の全CD4+T細胞、または集団中の全CD8+T細胞もしくはその組換えタンパク質発現細胞のうちの60%超または約60%超である、本発明1102～1107のいずれかの方法。

[本発明1109]

ナイーブ様T細胞がCD27+CCR7+細胞を含む、本発明1108の方法。

[本発明1110]

導入が無血清培地中で実行される、本発明1081～1093のいずれかの方法。

[本発明1111]

インキュベートする工程が無血清培地中で実行される、本発明1094～1099のいずれかの方法。

[本発明1112]

培養する工程が無血清培地中で実行される、本発明1100または本発明1101の方法。

[本発明1113]

無血清培地が、

基本培地中、0.5mM～5mMのジペプチド型L-グルタミン、

0.5mM～5mM L-グルタミン、および

任意で少なくとも1つのタンパク質

を含み、該培地が血清を含まない、本発明1110～1112のいずれかの方法。

[本発明1114]

無血清培地が、IL-2、IL-15およびIL-7の中から選択される組換えサイトカイン、任意で、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-15および/または組換えヒトIL-7を含む、本発明1110～1113のいずれかの方法。

[本発明1115]

無血清培地が、IL-2、IL-15およびIL-7の中から選択される組換えサイトカイン、任意で、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-15および/または組換えヒトIL-7を含まない、本発明

10

20

30

40

50

1110～1114のいずれかの方法。

[本発明1116]

操作された細胞を含む組成物、任意で形質導入T細胞を含む組成物に競合剤または遊離結合剤を加える工程をさらに含み、任意で、該剤が、1つまたは複数の刺激物質を該組成物中のオリゴマー刺激試薬から解離させるための条件下で加えられる、本発明1081～1093のいずれかの方法。

[本発明1117]

インキュベートされたT細胞を含む組成物に、任意で、1つまたは複数の刺激物質を該組成物中のオリゴマー刺激試薬から解離させるための条件下で、競合剤または遊離結合剤を加える工程をさらに含む、本発明1094～1099のいずれかの方法。

10

[本発明1118]

培養されたT細胞を含む組成物に、任意で、1つまたは複数の刺激物質を該組成物中のオリゴマー刺激試薬から解離させるための条件下で、競合剤または遊離結合剤を加える工程をさらに含む、本発明1100～1101のいずれかの方法。

[本発明1119]

競合剤または遊離結合剤を添加する工程が、採取に先立って実行される、本発明1116～1118のいずれかの方法。

[本発明1120]

競合剤もしくは遊離結合剤が、T細胞にとって有害ではなく、および/または、該物質の添加が、該競合剤も該遊離結合剤も使用しない同等もしくは同じ条件下でのT細胞のインキュベーションとの比較で、生残するT細胞のパーセンテージを90%未満、80%未満、70%未満、60%未満もしくは50%未満に低減させることはない、本発明1116～1119のいずれかの方法。

20

[本発明1121]

前記解離が、T細胞における刺激シグナルを終結または軽減させる、本発明1116～1120のいずれかの方法。

[本発明1122]

競合試薬および遊離結合剤が、独立して、ストレプトアビジン結合分子;ビオチン;D-ビオチン;ビオチン類似体;ストレプトアビジン、または野生型ストレプトアビジンの位置44～47に対応する配列位置にアミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を有するストレプトアビジン類似体に特異的に結合するビオチン類似体からなる群からの分子を含むか、または

30

競合試薬および遊離結合剤が、独立して、任意でEDTAまたはEGTAである、金属キレート剤を含む、

本発明1116～1121のいずれかの方法。

[本発明1123]

競合試薬および遊離結合剤が、独立して、D-ビオチン、任意で1mMのD-ビオチンを含む、本発明1116～1122のいずれかの方法。

[本発明1124]

細胞を洗浄する工程をさらに含み、任意で、該洗浄工程が組成物中の刺激試薬および/または1つもしくは複数の刺激物質を低減または除去する、本発明1081～1123のいずれかの方法。

40

[本発明1125]

洗浄する工程が採取前に実行される、本発明1124の方法。

[本発明1126]

T細胞が、抗原特異的T細胞もしくはその集団、Tヘルパー細胞もしくはその集団、細胞傷害性T細胞もしくはその集団、メモリーT細胞もしくはその集団、または制御性T細胞もしくはその集団を含む、本発明1001～1125のいずれかの方法。

[本発明1127]

T細胞がCD3+T細胞を含むか、CD4+および/またはCD8+T細胞を含む、本発明1001

50

～1126のいずれかの方法。

[本発明1128]

前記組成物の刺激されたT細胞からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に本発明1081～1093のいずれかの導入が行われ、選択された該T細胞サブセットに組換え核酸分子が導入される、本発明1001～1127のいずれかの方法。

[本発明1129]

形質導入細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に本発明1094～1099のいずれかのインキュベーションが行われ、選択された該T細胞サブセットがウイルス組込みのための条件下でインキュベートされる、本発明1001～1128のいずれかの方法。

[本発明1130]

操作された細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に本発明1100～1101のいずれかの培養工程が行われ、選択された該T細胞サブセットが、T細胞を拡大培養するための条件下で培養される、本発明1001～1129のいずれかの方法。

[本発明1131]

操作された細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に本発明1102～1109のいずれかの採取が行われ、選択された該T細胞サブセットが、操作されたT細胞のアウトプット集団を作製するために採取される、本発明1001～1130のいずれかの方法。

[本発明1132]

T細胞サブセットがナイーブ様T細胞であるか、またはナイーブ様T細胞上に発現するマーカーについて表面陽性であるT細胞がCCR7+CD45RA+、CD27+CCR7+もしくはCD62L-CCR7+である、本発明1129～1131のいずれかの方法。

[本発明1133]

ナイーブ様T細胞がCD27+CCR7+T細胞を含む、本発明1129または本発明1132の方法。

[本発明1134]

ナイーブ様T細胞がCCR7+CD45RA+T細胞を含む、本発明1129または本発明1132の方法。

[本発明1135]

T細胞サブセットが、組換えタンパク質、任意でキメラ抗原受容体を発現する、本発明1129～1134のいずれかの方法。

[本発明1136]

T細胞サブセットを選択する工程がアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって実行される、本発明1129～1135のいずれかの方法。

[本発明1137]

採取された細胞を、冷凍保存用および/または対象への投与用に、任意で薬学的に許容される賦形剤の存在下で、製剤化する工程をさらに含む、本発明1102～1108、1125および1129～1136のいずれかの方法。

[本発明1138]

採取された細胞が凍結保護物質の存在下で製剤化される、本発明1102～1108、1125および1129～1137のいずれかの方法。

[本発明1139]

固定相がクロマトグラフィーマトリックスであるか、またはそれを含む、本発明1001～1138のいずれかの方法。

[本発明1140]

固定相が、固定相1mLあたりT細胞約7500万～約1億2500万個の結合容量、任意で静的結合容量または動的結合容量を有する、本発明1001～1139のいずれかの方法。

[本発明1141]

(a) 固定相が約20mLであり、および/または

10

20

30

40

50

(b) 固定相が細胞20億±5億個の結合容量を有する、
本発明1001～1140のいずれかの方法。

[本発明1142]

2つの固定相を含む、本発明1001～1141のいずれかの方法。

[本発明1143]

2つの固定相が並列に配置される、本発明1142の方法。

[本発明1144]

2つの固定相が逐次的に配置される、本発明1142の方法。

[本発明1145]

(a) T細胞表面上の第1分子および第2分子にそれぞれ特異的に結合することによってT細胞を刺激する能力を有する、第1刺激物質および第2刺激物質と、

(b) T細胞上の選択マーカーに特異的に結合することによって固定相上にT細胞を固定化する能力を有する選択物質を含む、固定相と
を含む、T細胞のオンカラム刺激のための製造物品。

[本発明1146]

固定相が第1刺激物質および第2刺激物質をさらに含む、本発明1145の製造物品。

[本発明1147]

第1刺激物質、第2刺激物質および選択物質が、選択試薬を介して間接的に固定相に結合されている、本発明1145または本発明1146の製造物品。

[本発明1148]

刺激試薬をさらに含み、第1刺激物質および第2刺激物質が、可逆的に結合されているかまたは可逆的に結合される能力を有する、本発明1145の製造物品。

[本発明1149]

選択物質が選択試薬を介して間接的に固定相に結合されている、本発明1145の製造物品。

[本発明1150]

固定相が、クロマトグラフィーマトリックスであるかそれを含み、前記製造物品が、該クロマトグラフィーマトリックスの全部または一部を含有する容器をさらに含む、本発明1145～1149のいずれかの製造物品。

[本発明1151]

2つの固定相を含む、本発明1145～1150のいずれかの製造物品。

[本発明1152]

2つの固定相が並列に配置される、本発明1151の製造物品。

[本発明1153]

2つの固定相が逐次的に配置される、本発明1151の製造物品。

[本発明1154]

本発明1145～1153のいずれかの製造物品を含む、装置。

[本発明1155]

装置の1つまたは複数の構成要素に流体的に接続された流体入口および/あるいは装置の1つまたは複数の構成要素に流体的に接続された流体出口をさらに含む、本発明1154の装置。

[本発明1156]

閉鎖システム内または無菌システム内にある、本発明1154または1155のいずれかの装置。

[本発明1157]

自動で実行されてもよい本発明1001～1144のいずれかの方法において使用するための、本発明1154～1156のいずれかの装置または本発明1145～1153のいずれかの物品。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】 図1は、標的細胞を刺激し選択する工程に関する例示的態様の模式図である。こ

10

20

30

40

50

ここでは、刺激が細胞のインキュベーションによって実行され、細胞のインキュベーションは、少なくとも部分的には、支持体6（ここでは固定相として描かれている）の存在下で行われる。支持体の上には、細胞選択のための選択試薬1の構成要素が固定化されている（パネルA）。選択試薬1は選択物質2のための結合部位を有し、選択物質2は、標的細胞の一部または全部の上に存在する分子（選択マーカー）4と結合する能力を有する。選択物質2は、選択試薬1が固定化されている支持体に、試薬と作用物質とが可逆的に、例えば結合部位を介して結合することでオリゴマー複合体を生成し、作用物質がその上で多量体化するような条件下で、加えられる（パネルB）。選択物質は2種以上の作用物質を含むことができる。あるいは、可逆的に結合している作用物質と試薬の複合体を、固定化のために、複合体として固定相に加えてもよい。図示するように、標的細胞を含む細胞3が、固定相および多量体化した選択物質複合体と混合される。これにより、標的細胞は、選択物質2および試薬（選択試薬）1を介して、支持体6に可逆的に固定化された状態になる（パネルC）。任意で、刺激物質の添加に先立って、またはその後に、結合していない細胞が除去される。刺激物質5が標的細胞上の分子に特異的に結合し、それによって、マーカーを発現している固定化標的細胞におけるシグナルを誘導または調整するような条件下で、オリゴマー刺激試薬7に可逆的に結合した多量体化している刺激物質5を含有する複合体が加えられる（パネルD）。

【図2】図2Aおよび2Bは、バッチの異なるオリゴマー試薬上で多量体化させた抗CD3/抗CD28と共にインキュベートした、3人の異なるドナーからのT細胞のWST代謝アッセイの結果を表す。図2Aは、試験したすべてのバッチ（プール）に関するWST代謝活性を、36nmまたは101nmの平均流体力学的半径を持つオリゴマーバックボーン上で多量体化させた抗CD3/抗CD28を含有するリファレンスバッチと比較して要約している。図2Bには、試験した個々のバッチおよびリファレンス試薬についての、異なるドナーからのT細胞での平均WST代謝活性が示されている。

【図3】図3は、CD3、CD4およびCD8のそれぞれをクロマトグラフィーカラムの固定相上に細胞を固定化するための選択マーカーとして使用した場合に、抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬による24時間オンカラム刺激が各分子の表面発現に及ぼす効果を表す。表面発現パターンが、抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬によるオンカラム刺激を伴わない対照条件と比較されている。固定相に適用したアフエーシス試料から細胞が単離された。

【図4】図4は、細胞をカラムに固定化するための選択マーカーとしてCD3を使用した場合に、抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬を使ってオンカラム刺激した時の、TCR/CD3複合体のダウンレギュレーションおよび再発現の例示的キネティクスを表す。固定相に適用したアフエーシス試料から細胞が単離された。アルファ-ベータTCR鎖に対する抗体を使ってCD3/TCR複合体を評価した。

【図5A】図5A～5Bは、抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬によるオンカラム刺激中に自発的に脱離する培養T細胞の表現型特徴と機能的特徴を表す。図5Aは、オンカラム刺激の24時間後および5日後におけるT細胞のサイズと、CD3、CD69およびCD25発現とを表す。図5Bは、自発的に脱離した培養T細胞の増殖能を表す。固定相に適用したアフエーシス試料から細胞が単離され、洗浄工程を使って収集された。

【図5B】図5Aの説明を参照のこと。

【図6】図6A～6Dは、T細胞を化合物63の存在下または非存在下で抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬と共にインキュベートする工程の、mTorシグナル伝達と生存率および成長のキネティクスとに対する例示的効果を表す。図6Aは、生CD8+T細胞におけるメモリーサブセットによるpS6発現を表す。図6Bは、表示の処理による全CD8 T細胞の平均蛍光強度（mfi）を表す。図6C～6Dは、刺激開始（「インプット」）後の培養における、それぞれ生存率および全T細胞数を、経時的（d1などの日数で示されている）に表す。

【図7】図7A～7Fは、化合物63の存在下または非存在下で抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬とのインキュベーションを使用する方法を使って生成した冷凍保存CAR-T細胞の例示的な機能特性および表現型特性を表す。図7Aは、融解時点でのカスパーゼの細胞内発現を表す。図7Bおよび7Dは、CD27および/またはCCR7のサブセット発現による、それぞ

れCD8 CAR-T細胞およびCD4 CAR-T細胞の表現型プロファイルを表す。図7Cおよび7Eは、抗原を保持する標的で刺激された、それぞれCD8 CAR-T細胞およびCD4 CAR-T細胞での、細胞内のIL2、IFN γ またはTNFを表すか（左側のパネル）、IL2および/またはIFN γ もしくはTNFの組合せを表す（右側のパネル）。図7Fは、抗CARビーズで刺激されたCAR-T細胞について、12日にわたる拡大培養と生残（左側のパネル）および曲線下面積によって算出した総拡大メトリック（total expansion metric）（右側のパネル）を表す。

【図8A】図8Aは、実施例5記載のオンカラム刺激プロセスまたは代替プロセスを使った細胞選択後のCD3+、CD4+およびCD8+T細胞収量を表す。図8B~8Cは、実施例5記載のオンカラム刺激プロセスまたは代替プロセスの使用後に回収された細胞の総数（図8B）および生細胞のパーセンテージ（図8C）を表す。

10

【図8B】図8Aの説明を参照のこと。

【図8C】図8Aの説明を参照のこと。

【図9A】図9A~9Dは、実施例5記載のオンカラム刺激プロセスまたは代替プロセスについて、生細胞のパーセンテージ（例えば純度;図9A）、例示的CARを発現する生細胞のパーセンテージ（図9B）、CD4を発現する生細胞の、プロセスの選択時およびプロセスの8日目におけるパーセンテージ（図9C）、ならびに培養5日目（プロセスの開始時から8日目）における、各ドナーについてのT細胞表現型の分布（パーセンテージ）（図9D）を表す。

【図9B】図9Aの説明を参照のこと。

【図9C】図9Aの説明を参照のこと。

20

【図9D】図9Aの説明を参照のこと。

【図10】図10は、実施例5記載のオンカラム刺激プロセスまたは代替プロセスを使って操作された抗CD19 CAR T細胞と共に、および対照条件下で、培養している間の、経時的なCD19+HEK細胞溶解を表す。

【図11A】図11A~11Cは、実施例5記載のオンカラム刺激プロセスまたは代替プロセスを使って操作されたCD4 T細胞およびCD8 T細胞について、抗原特異的CAR T細胞のIFN γ （図11A）、IL-2（図11B）およびTNF- α （図11C）産生を表す。

【図11B】図11Aの説明を参照のこと。

【図11C】図11Aの説明を参照のこと。

【図12A】図12A~12Cは、実施例5記載のオンカラム刺激プロセスまたは代替プロセスを使って生成した、CD4:CD8比（図12A）、操作されたT細胞の形質導入効率（CD4細胞とCD8細胞を合わせたもの;図12B）および生存細胞のパーセンテージ（図12C）を表す。各プロセスにつき3回の製造ランが示されている。

30

【図12B】図12Aの説明を参照のこと。

【図12C】図12Aの説明を参照のこと。

【図13】図13は、マウスにB細胞リンパ腫細胞株（Raji）を注射（i.v.）した6日後の、処置群での、平均放射輝度による腫瘍サイズを表す。

【図14】図14は、B細胞リンパ腫細胞株（Raji）を注射したマウスにおける腫瘍量を、各処置群について経時的に表す。CAR T細胞処置の効果が、実施例5記載のオンカラム刺激プロセスまたは代替プロセスについて、また3回の製造ランのそれぞれについて、示されている（図12A~12C参照）。

40

【発明を実施するための形態】

【0060】

詳細な説明

本明細書では、標的細胞（例えばT細胞、CD3+、CD4+、CD8+T細胞）を含む試料から細胞を選択して該標的細胞をクロマトグラフィーカラムの固定相上に固定化し、固定相上の固定化された細胞を刺激し（本明細書ではオンカラム刺激ともいう）、そして固定相から自発的に脱離する、選択され刺激された細胞を、脱離を促進するために競合剤または遊離結合剤を使用することなく収集しおよび/または溶出させるための方法が提供される。提供される方法の中には、標的細胞（例えばT細胞、CD3+、CD4+、CD8+T細胞）を含

50

む試料から細胞を選択して該標的細胞をクロマトグラフィーカラムの固定相上に固定化し、固定相上の固定化された細胞を刺激し、そして選択され刺激された細胞を重力流によって収集しおよび/または溶出させる工程を伴う方法がある。提供される態様では、クロマトグラフィーカラムの固定相上の標的細胞（例えばCD3+、CD4+またはCD8+T細胞）を刺激する工程が、細胞選択に使用された分子（すなわち選択マーカー）のダウンレギュレーションを促進して、固定相からの細胞の自発的な脱離または遊離をもたらす。細胞の遊離または脱離は、追加の工程や追加の試薬が一切なくとも、起こりうる。いくつかの局面において、細胞は、クロマトグラフィーカラムに培地または他の溶液を加えることなどにより、重力流によって収集されうる。特定態様において、加えられる培地または他の溶液は、固定相からの細胞の脱離を促進するための競合剤または遊離結合剤を含有しない。

10

【0061】

いくつかの態様において、選択され刺激された細胞は、刺激されたT細胞を含有する組成物であって、複数のT細胞を含有する生物学的試料（例えばアフェレーシス試料または全血試料）からT細胞が選択されたものである。いくつかの態様において、固定相から自発的に脱離する、選択され刺激された細胞の収集および/または溶出は重力流によって、例えば洗浄工程中に、果たされる。本明細書において提供される方法では、細胞の選択、刺激ならびに収集および/または溶出工程が一体化され、選択され刺激された細胞の固定相からの脱離を促進するための工程や、脱離を促進するために使用された作用物質（例えば競合剤および/または遊離結合剤）を除去するための精製工程が、別途必要となることはない。したがって本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養、後続のインキュベーション、刺激および/または選択（例えば初回選択および/またはポリッシング（polishing）））に適した、選択され刺激された細胞の組成物を生成するのに必要な処理工程の数を低減し、それによって製造時間を低減し、潜在的細胞ストレスを最小限に抑え、汚染の可能性を減少させる。

20

【0062】

特定態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば24時間以内に生成する。特定態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば12、11、10、9、8、7、6、5、4、3もしくは2時間以内または約12、11、10、9、8、7、6、5、4、3もしくは2時間以内に生成する。特定態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば6、5、4、3もしくは2時間以内または約6、5、4、3もしくは2時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約6時間以内または約6時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約5.5時間以内または約5.5時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約5時間以内または約5時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約4.5時間以内または約4.5時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約4時間以内または約4時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約3時間以内または約3時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約3～6時間以内または約3～6時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約4～6時間以内または約4～6時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約5

30

40

50

～6時間以内または約5～6時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、一定時間内に、例えば約4～5時間以内または約4～5時間未満以内に生成する。いくつかの態様において、本明細書において提供される方法は、操作されたT細胞の組成物（例えば治療用細胞組成物）を5日以内に生成する。いくつかの態様において、本明細書において提供される方法は、操作されたT細胞の組成物（例えば治療用細胞組成物）を、4～5日で、または約4～5日で、生成する。いくつかの態様において、本明細書において提供される工程は、長さが4もしくは5日または約4もしくは5日である製造プロセスをもたらす。いくつかの態様において、本明細書において提供される工程は、長さが約4～5日である製造プロセスをもたらす。いくつかの態様において、本明細書において提供される工程は、長さが4日もしくは約4日または96±6時間である製造プロセスをもたらす。

10

【0063】

提供される方法には、細胞、例えばCD3+、CD4+およびCD8+T細胞を、他の構成要素、例えば試料中の他の細胞から選択して、クロマトグラフィーカラムの固定相上に前記細胞を固定化し;固定相に固定化された、選択された細胞を刺激し;細胞を固定相から脱離させる処理工程および脱離を促進するために使用された作用物質（例えば競合剤または遊離結合剤）を、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物から除去するための処理工程の非存在下で、選択され刺激された細胞を収集するための方法が含まれる。特定態様において、提供される方法は、細胞、例えばCD3+、CD4+およびCD8+T細胞を他の構成要素、例えば試料中の他の細胞から選択して、それらの細胞をクロマトグラフィーカラムの固定相上に固定化し;固定相上に固定化された、選択された細胞を刺激し;選択され刺激された細胞を重力流によって溶出させおよび/または収集するための方法を含む。

20

【0064】

特定局面において、細胞治療用などの、操作された細胞（例えばT細胞）を生成するための、細胞選択（例えばイムノアフィニティーベースの選択）後に細胞を刺激する工程に先立って1つまたは複数の追加工程を含む多くの既存方法と比べて、ここに提供される方法は改良されている。いくつかの態様において、既存方法に存在する1つまたは複数の追加工程としては、選択された細胞を回収もしくは収集するための競合試薬もしくは遊離結合剤を使った1つもしくは複数の溶出工程および/または選択に使用された試薬（例えば磁気ビーズ試薬もしくは抗体）を除去するための工程を挙げることができる。いくつかの態様において、そのような追加工程は、細胞治療用に細胞を遺伝子操作するためのプロセスを長引かせる場合があり、および/または細胞の分化状態、生存率もしくは細胞数に強い影響を与えうる細胞の操作をプロセス中にもたらす場合がある。特定局面において、別々の選択工程および刺激工程を含み、細胞を固定相から脱離させる追加工程および脱離を促進するために使用された作用物質を除去するための追加工程を必要とする方法と比べて、提供される方法は、短縮された時間で、選択され刺激された細胞の集団を生成する。

30

【0065】

一定の局面において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団（アウトプット組成物ともいう）を、本明細書においてオンカラム刺激ともいうカラム上での刺激を開始してから24時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団（例えばアウトプット組成物）を、カラム上での刺激を開始してから12、11、10、9、8、7、6、5、4、3もしくは2時間以内または約12、11、10、9、8、7、6、5、4、3もしくは2時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、6、5、4、3もしくは2時間以内または約6、5、4、3もしくは2時間以内に生成する。い

40

50

いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、3～6時間以内または約3～6時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、4～6時間以内または約4～6時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、5～6時間以内または約5～6時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、4～5時間以内または約4～5時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、6時間以内または約6時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、5.5時間以内または約5.5時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、5時間以内または約5時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、4.5時間以内または約4.5時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、4時間以内または約4時間以内に生成する。いくつかの態様において、本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養ならびに/または後続のインキュベーション、刺激および/もしくは選択ラウンド（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット集団を、3時間以内または約3時間以内に生成する。

【0066】

いくつかの態様において、本方法は、細胞の表面上の分子に結合することによって細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する刺激物質の使用を伴う。いくつかの態様において、刺激物質は、固定相に加えることができるオリゴマー刺激試薬（例えば抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabにコンジュゲートされたストレプトアビジンオリゴマー）に含まれる。いくつかの態様において、この刺激は、選択された細胞の固定相からの自発的な脱離をもたらし、よって、細胞を固定相から脱離させるための追加処理工程および脱離を促進するために使用された作用物質を刺激された細胞のアウトプット組成物から除去するための追加処理工程の非存在下での、選択され刺激された細胞の収集および/または溶出を可能にする。いくつかの態様において、この刺激は選択された細胞の固定相からの自発的な脱離または遊離をもたらし、よって、選択され刺激された細胞の重力流による収集および/または溶出を可能にする。いくつかの態様において、重力流は、カラム（例えば固定相）から自発的に脱離した細胞を収集しまたは溶出させることに依拠する。いくつかの態様では、自発的に脱離した細胞をカラム（例えば固定相）から溶出させるために、洗浄工程を、例えば重力流との組合せで使用してもよい。いくつかの態様において、洗浄工程は、ただ単に、細胞培地（例えば無血清培地）、例えば固定相に細胞を加えまたは固定化する前に細胞インプット組成物中に存在するものと同じ培地を、カラムに加える工程を含

10

20

30

40

50

みうる。特定局面において、本方法は、さらなる処理、例えば遺伝子操作、拡大培養、インキュベーションまたは後続の刺激および/または選択ラウンド（例えばポリッシング）に適した、選択され刺激された細胞の汚染されていない（例えば脱離に使用した作用物質（例えば競合剤、遊離結合剤）および/または選択物質を含まない）組成物を、オンカラム刺激の開始から24時間以内に、うまく生成する。その製造物品および装置も提供される。

【0067】

細胞治療における使用に適した細胞集団（例えば組換えタンパク質（例えばキメラ抗原受容体）を発現するように操作された、選択（濃縮）され刺激された細胞）を生成するために利用できる方法は種々ある。しかしいくつかの局面において、これらの方法は、少なくとも一つには、複数の処理工程を実施する必要があることから、細胞を生成するのに長い時間または比較的長い時間を必要とする。複数の処理工程は、細胞ストレスももたらし、よって、下流処理における細胞の有用性に影響を及ぼしうる。細胞組成物を生成するためのさらなる方法が必要とされている。

【0068】

特定局面において、提供される方法は、クロマトグラフィーカラムの固定相上で標的細胞（例えばCD3+、CD4+またはCD8+T細胞）を選択し刺激する工程が、細胞選択に使用された分子（すなわち選択マーカー）のダウンレギュレーションをその刺激が促進して、固定相からの細胞の自発的な脱離をもたらすという知見に基づく。いくつかの態様において、クロマトグラフィーカラムの固定相は、標的細胞表面上の分子（例えば選択マーカー）に特異的に結合する能力を有する作用物質（例えば選択物質）で官能化される。こうすることで、選択マーカー（例えばCD3、CD4、CD8）を含有する標的細胞を含む試料を固定相と混合すると（例えば固定相に試料を加えると）、標的細胞（例えばCD3+、CD4+、CD8+T細胞）は、固定相に間接的に固定化される。特定局面において、標的細胞（例えばT細胞）は、例えば刺激物質、刺激物質を含む刺激試薬の添加によって、および/または固定相に直接的もしくは間接的にカップリングされた刺激物質を介して、固定相上に固定化されたまま刺激（例えばオンカラム刺激）される。特定態様において、刺激物質は、T細胞を活性化または刺激する作用物質、例えば抗CD3/抗CD28抗体（例えばFab）作用物質を含む。このように、いくつかの局面において、提供される方法および他の態様は、それらが、複数の処理工程（例えば選択および刺激）を簡約化し、および/または処理工程（例えば脱離を促進するために使用された選択試薬および/または選択物質を除去するための工程）を排除して、簡約化されたプロセスを同じ容器内および/または同じ閉鎖システム内で行うことを可能にし、そのことが、効率と無菌性の向上をもたらす点で、有利である。

【0069】

一定の局面において、本方法は、標的細胞（例えばT細胞）において刺激シグナルを送達する能力を有する刺激物質を含むオリゴマー刺激試薬の使用を伴う。例示的なオリゴマー試薬としては、標的細胞、例えばT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の抗体またはそのフラグメントに可逆的に結合またはコンジュゲートされたストレプトアビジンムテインオリゴマーが挙げられる。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabにコンジュゲートされたストレプトアビジンムテインオリゴマーである。T細胞を、例えば外因性成長因子の非存在下または少量の外因性成長因子の存在下で、インビトロで刺激するのに使用される既存の試薬は、公知である（例えば米国特許第6,352,694号（B1）および欧州特許EP0700430B1参照）。一般に、そのような試薬には、直径1 μ m超のビーズ、例えば磁気ビーズが使用され、そこに、さまざまな結合作用物質（例えば抗CD3抗体および/または抗CD28抗体）が固定化されるだろう。しかし、そのような磁気ビーズは、例えば、臨床試験または治療目的に要求される条件下では、細胞を刺激するための方法に組み込むことが困難な場合もある。というのは、操作されたT細胞を対象に投与する前に、これらの磁気ビーズが実質的にまたは完全に除去されることを確実にする必要があるからである。いくつかの局面において、例えば細胞を磁場にさらすことなどによるそのような除去は、細胞治療に利用できる生存細

10

20

30

40

50

胞の収量を減少させうる。一定の例では、そのような試薬、例えば磁気ビーズを含有する刺激試薬を、刺激試薬からの十分な量のT細胞の脱離が可能になるように、最小限の時間、細胞をインキュベートしなければならない。さらにまた、ビーズなどの試薬は、物理的製薬により、カラムクロマトグラフィーには容易には適合しない。

【0070】

提供される方法では、オリゴマー刺激試薬（例えば抗CD3抗体および抗CD28抗体、例えばFabにコンジュゲートされた、ストレプトアビジンオリゴマー）が利用され、そのような潜在的制限が克服される。例えばいくつかの態様において、提供される方法は、刺激を開始するために、固形支持体（例えばビーズ）に結合していない可溶性オリゴマー試薬を固定相に加える工程を含む。いくつかの態様において、提供される方法は、細胞治療用に細胞を操作するプロセス全体の最後に存在する残存オリゴマー刺激試薬の量を低減または最小限に抑えるための工程を含むことができる。いくつかの態様において、本方法によって生成または作製されるアウトプット細胞中の、例えば操作された細胞中の、残存試薬のリスクは、オリゴマー試薬の使用によって低減または回避される。競合試薬または遊離結合剤の添加を使って、細胞を含有する組成物中の刺激物質からオリゴマー刺激試薬を解離させる（例えば結合を破壊する）ことができるからである。いくつかの態様では、オリゴマー刺激試薬が可溶性であるため、例えば競合試薬または遊離結合剤を加える必要はなく、1つまたは複数の洗浄工程によって組成物中の細胞からオリゴマー刺激試薬を低減または除去するだけで十分な場合もある。いくつかの態様において、これは、他の方法、例えば投与用の最終集団がビーズを含まないことを保証するために追加の措置をとる必要がある方法などと比べて、GMP基準を遵守したプロセスを、より容易に確立できることも意味する。したがっていくつかの局面において、例えば競合剤もしくは遊離結合剤の添加または1つもしくは複数の洗浄工程などによる、細胞からのオリゴマー刺激試薬の除去または分離では、ビーズベースの刺激試薬の除去または分離との比較で、細胞の損失がほとんどまたは全く起こらない。いくつかの局面において、刺激試薬またはオリゴマー刺激試薬の低減、除去または分離のタイミングには制限がないか、ビーズベースの刺激試薬の除去または分離よりも制限が少ない。このように、いくつかの局面では、提供される方法中の任意の時点または工程において、細胞から刺激試薬またはオリゴマー刺激試薬を低減し、除去または分離しうる。

【0071】

特定局面において、提供される方法の継続時間は、細胞、例えばインプット細胞集団またはインプット細胞試料のT細胞を、刺激条件（例えば本明細書の、例えばセクションI-Cなどに記載するもの）に初めて接触または曝露させた時（本明細書ではこれを、刺激物質とのインキュベーションまたは刺激条件下でのインキュベーションの開始ともいう）、例えば刺激試薬への曝露が開始された時などから、測定することができる。いくつかの態様において、刺激された標的細胞（例えばCD3+、CD4+、CD8+T細胞）を含有するアウトプット集団（本明細書ではアウトプット組成物ともいう）を収集する工程についての継続時間は、標的細胞と刺激試薬とのインキュベーション（例えば刺激試薬の添加または刺激試薬への曝露）の開始から、すなわち刺激試薬がカラムに加えられた時から測定される。いくつかの態様において、収集する工程は、インキュベーションの開始後のある時点において、カラムからの細胞の重力流によって実行され、これは、いくつかの例では、自発的に遊離した細胞のカラムからの回収を保証するために、1回または複数回のカラムの洗浄を含むことができる。特定態様において、細胞をカラムから収集するまでのインキュベーションの継続時間は、24時間、23時間、22時間、21時間、20時間、19時間、18時間、17時間、16時間、15時間、14時間、13時間、12時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間、または約24時間、23時間、22時間、21時間、20時間、19時間、18時間、17時間、16時間、15時間、14時間、13時間、12時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間、または24時間、23時間、22時間、21時間、20時間、19時間、18時間、17時間、16時間、15時間、14時間、13時間、12時間、11時間、10時間、9時間

、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間未満である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、12時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間、または約12時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間、または12時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間未満である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間、または約6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間、または6時間、5時間、4時間、3時間もしくは2時間未満である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、6時間、約6時間、または6時間未満である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、5時間、約5時間、または5時間未満である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、4.5時間、約4.5時間、または4.5時間未満である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、4時間、約4時間、または4時間未満である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、3時間、約3時間、または3時間未満である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、3～6時間または約3～6時間である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、4～6時間または約4～6時間である。いくつかの態様において、細胞をカラムから溶出させおよび/または収集するまでのインキュベーションの継続時間は、4～5時間または約4～5時間である。いくつかの態様において、例えば細胞を、例えば形質導入などにより、組換え受容体で遺伝子操作する工程に関連して使用するために、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を作製するなどの目的で、カラムからの収集前に設けられる刺激試薬とのインキュベーションの継続時間は、代替プロセスまたは既存プロセスの、例えば選択および刺激が別々に実行されるかおよび/または刺激がカラム上で実行されない代替プロセスの、75%、60%、50%、40%、30%、25%、15%もしくは10%、または約75%、60%、50%、40%、30%、25%、15%もしくは10%、または75%、60%、50%、40%、30%、25%、15%もしくは10%未満である。

【0072】

選択され刺激された細胞のアウトプット組成物はさらに処理されうると、本明細書では考えられる。例えばアウトプット細胞はキメラ抗原受容体などの組換えタンパク質を発現するように遺伝的に操作されうる、ならびに/またはアウトプット細胞はさらなるインキュベーション、刺激、拡大培養、選択（例えばポリッシング）および/もしくは製剤化を受けうる。いくつかの態様において、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物は、操作された細胞のアウトプット組成物、例えば患者における疾患の処置に有用な治療用細胞組成物を生成するために、さらに処理（例えば操作、ポリッシング）することができる。

【0073】

一定の態様において、提供される方法は、例えばアフエレーシス、バフィーコートまたは全血などの試料で実施される。いくつかの態様において、試料は生物学的試料である。いくつかの態様において、生物学的試料はヒト対象から収集される。いくつかの態様において、生物学的試料は、ある疾患または状態を患っている患者から収集される。いくつかの態様において、本方法は、試料から前もって単離され、濃縮されまたは選択された細胞の集団、例えばCD3+T細胞の集団で、実施される。いくつかの態様において、本方法は、試料から前もって単離され、濃縮されまたは選択された細胞の集団、例えばCD4+T細胞およびCD8+T細胞の集団で、実施される。いくつかの態様において、試料または試料から単離された細胞は冷凍保存されていてもよい。

【0074】

本方法によって調製された細胞および集団、例えば薬学的集団および薬学的製剤、ならびに本方法を実行するためのキット、システムおよびデバイスも提供される。本方法によって調製される細胞および集団の使用法、例えば養子細胞療法の方法などといった治療方法、ならびに対象に投与するための薬学的集団が、さらに提供される。

【0075】

本出願において言及する刊行物は、特許文書、科学論文およびデータベースを含めていずれも、あたかも個々の刊行物が参照により個別に本明細書に組み入れられた場合と同じ程度に、あらゆる目的で、その全体が本明細書に組み入れられる。本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、特許出願、公開特許出願および他の刊行物において示される定義と相反するかまたは他の形で矛盾する場合は、本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる定義に優先する。

【0076】

本明細書において使用されるセクション見出しには構成上の目的しかなく、記載されている主題を限定すると解釈してはならない。

【0077】

I. 細胞を選択し、刺激し操作するための方法

本明細書では、細胞の、例えば選択され刺激されたT細胞、例えばCD3+T細胞、CD4+T細胞およびCD8+T細胞の、アウトプット集団（アウトプット組成物ともいう）を生成するための方法であって、細胞の選択、刺激および収集のための工程を含む方法が提供される。いくつかの態様において、刺激され選択された細胞のアウトプット集団は、治療用細胞組成物を生成するのに適している。一定の局面において、本方法では、選択工程と刺激工程とが一体化され、脱離を促進するために競合剤または遊離結合剤を使用することなく、固定相から自発的に脱離する、選択され刺激された細胞の収集および/または溶出が可能になる。したがって、本明細書において提供される方法では、細胞の選択、刺激ならびに収集/溶出工程が一体化され、選択され刺激された細胞の固定相からの脱離を促進するための工程や、脱離を促進するために使用された作用物質（例えば競合剤および/または遊離結合剤）を除去するための精製工程が、別途必要となることはない。したがって本方法は、下流処理（例えば遺伝子操作、拡大培養、後続のインキュベーション、刺激および/または選択（例えばポリッシング））に適した、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を生成するのに必要な処理工程の数を低減し、それによって製造時間を低減し、潜在的細胞ストレスを最小限に抑え、汚染の可能性を減少させる。特定態様において、本方法は、下流処理に適した、選択され刺激された細胞の組成物を、一定時間内に、例えば24時間以内に生成する。いくつかの態様において、選択され刺激された細胞のアウトプット集団は、後続の工程、例えばセクションI-Eに記載の遺伝子操作などに、インプット集団として使用されるか、またはインプット集団として使用するための供給源である。

【0078】

一定の態様において、本明細書において提供される方法は、細胞治療薬の製造、生成または作製に関連して使用される。いくつかの態様において、アウトプット組成物を生成または作製する方法、例えば選択され刺激されたT細胞を生成または作製する方法は、対象から細胞を単離し、その細胞を刺激条件下でインキュベートするための1つまたは複数の工程を含む。いくつかの局面において、アウトプット組成物は、細胞治療薬を作製するための、例えば細胞を遺伝子操作するための、下流プロセスに、インプット細胞の供給源として使用される。いくつかの態様において、本方法は、順に実行される処理工程であって、細胞、例えば初代CD3+、CD4+およびCD8+T細胞が、単一の工程において、生物学的試料から単離、例えば選択または分離され、刺激条件下でインキュベートされ、収集または溶出され、次に、組換え受容体をコードする組換えポリヌクレオチドを例えば形質導入またはトランスフェクションなどによって細胞に導入するために、遺伝子操作され、次に容器、例えばバッグまたはバイアルに、操作された細胞のアウトプット集団として収集、採取または充填される処理工程を含む。いくつかの態様において、操作された細胞のア

アウトプット集団（例えば治療用細胞組成物）の細胞は、任意で細胞を冷凍保存し貯蔵した後に、同じ対象に再導入される。いくつかの態様において、操作された細胞のアウトプット集団は、治療、例えば自家細胞治療における使用に適している。

【0079】

特定態様において、提供される方法は、細胞の初期集団またはインプット集団から組換え受容体を発現する操作された細胞のアウトプット集団を生成することに関連して使用される。一定の態様では、提供される方法によって、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物として収集された細胞を用意し、混合しおよび/またはプールすることによって、インプット集団が生産、生成および/または作製される。いくつかの態様において、細胞のインプット集団は、濃縮されたT細胞、濃縮されたCD3+T細胞、濃縮されたCD4+T細胞および/または濃縮されたCD8+T細胞（以下、それぞれ濃縮T細胞の集団、濃縮CD3+T細胞の集団、濃縮CD4+T細胞の集団および濃縮CD8+T細胞の集団ともいう）を含有する。いくつかの態様において、細胞のインプット集団は、CD4+T細胞またはCD8+T細胞の集団であるか、CD4+T細胞とCD8+T細胞の混合、混和および/またはプールされた集団である。いくつかの態様において、細胞のインプット集団はCD3+細胞の集団である。一定の態様において、提供される方法は、選択され刺激された細胞を、例えば組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドを形質導入またはトランスフェクションによって導入するなどの目的で、遺伝子操作することに関連して使用される。一定の態様において、本方法は、刺激された濃縮T細胞のインプット集団を生成する目的で、例えば対象から採取、収集および/または取得された生物学的試料などの生物学的試料（例えば全血、アフエレーシス）から、細胞を単離または選択し、刺激するために使用されうる。いくつかの態様において、提供される方法は、細胞を操作し、形質導入しおよび/または培養した後に、濃縮T細胞の集団を採取し、収集しおよび/または製剤化する工程を、さらに含む。

【0080】

一定の態様において、本明細書において提供される方法は、細胞に異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを導入すること、例えば細胞に、例えば本明細書ではセクションI-Eなどに記載する方法によって、形質導入またはトランスフェクトすることに関連して実施される。提供される方法の特定態様では、細胞を遺伝子操作している間に、または細胞を遺伝子操作した後に、例えば組換えタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドの組込みを可能にするか、組換えタンパク質の発現を可能にするのに十分な時間にわたって、細胞をインキュベートする。一定の態様では、細胞が、一定時間または決まった時間、例えば18時間超または4日未満の時間にわたってインキュベートされる。いくつかの態様では、刺激工程が着手または開始された時から一定時間内に、例えば細胞が刺激物質に曝露された時から24時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12時間以内または約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、2、3、4、5もしくは6時間以内または約2、3、4、5もしくは6時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、3もしくは6時間以内または約3もしくは6時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、4もしくは6時間以内または約4もしくは6時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、4もしくは5時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、6時間以内または約6時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、5時間以内または約5時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、4.5時間以内または約4.5時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露された時から、4時間以内または約4時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様では、細胞が刺激物質に曝露さ

れた時から、3時間以内または約3時間以内に、操作工程が着手または開始される。いくつかの態様において、ウイルス（例えばウイルスベクター）に含有されていてもよい異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドの存在下でのインキュベーションは、1時間、約1時間または少なくとも1時間の継続時間にわたって続けられる。いくつかの態様において、前記1つまたは複数のプロセスは、少なくとも部分的には、無血清培地中で実行される。いくつかの態様において、無血清培地は、規定（defined）または既知組成（well-defined）細胞培養培地である。一定の態様において、無血清培地は、処理された、例えば阻害因子および/または成長因子を除去するために濾過された、制限培養培地（controlled culture medium）である。いくつかの態様において、無血清培地はタンパク質を含有する。一定の態様において、無血清培地は、血清アルブミン、加水分解物、成長因子、ホルモン、担体タンパク質、および/または接着因子を含有しうる。いくつかの態様において、無血清培地はサイトカインを含む。いくつかの態様において、無血清培地はサイトカインまたは組換えサイトカインを含む。いくつかの態様において、無血清培地は組換えIL-2、IL-15および/またはIL-7を含む。いくつかの態様において、無血清培地はグルタミンを含む。いくつかの態様において、無血清培地はグルタミンならびに組換えIL-2、IL-15およびIL-7を含む。

【0081】

いくつかの態様において、提供される方法は、例えば養子細胞治療などにおける臨床使用のための細胞の調製における1つ、複数またはすべての工程が細胞を非無菌状態に曝露されることなく実行されるように、実行される。いくつかの態様において、細胞の選択、刺激、形質導入、洗浄および製剤化はすべて閉鎖された無菌のシステムまたはデバイス内で行われる。いくつかの態様では、工程のうちの1つまたは複数が、閉鎖システムまたは閉鎖デバイスではないところで実行される。いくつかのそのような態様において、細胞は、無菌条件下で閉鎖システムまたは閉鎖デバイスから、例えば無菌移送によって、別の閉鎖システムへと移送される。

【0082】

特定態様において、試料および/または試料の単離された一部、例えば本発明の1つまたは複数の工程に関連して細胞を含有する試料（例えばバフィーコート、濃縮T細胞の集団）は、本明細書において提供される方法の任意の段階または工程の前、途中または後に、収集され、凍結保護のために製剤化され、凍結され（例えば凍結保護され）および/または0℃未満、-20℃未満、または-70℃もしくは-80℃、または-70℃もしくは-80℃未満で貯蔵されうる。いくつかの態様において、細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10日未満の時間、または1、2、3、4、5、6、7、8週未満の時間にわたって、または少なくとも1、2、3、4、5、6、7もしくは8週の期間にわたって、または8週超にわたって、貯蔵されうる。貯蔵後に、細胞の試料または試料の単離された一部を融解し、本方法による処理を、プロセスの同じところから再開させうる。特定態様では、培養されおよび/または製剤化された濃縮T細胞（例えば操作T細胞）の集団が、対象への、例えば自家細胞治療薬としての投与に先立って、凍結保護され、貯蔵される。

【0083】

特定態様では、プロセス中の任意の段階または工程において、細胞の一部分を試料採取または収集することができ、例えば細胞を、細胞の集団（例えばT細胞の集団）から、集団を閉鎖システムにとどめたまま、採取しうる。一定の態様では、そのような細胞を、マーカー、特質または特徴、例えば限定するわけではないが、生存率、アポトーシス、活性化、刺激、成長および/または疲弊などについて解析しうる。いくつかの態様において、細胞は、自動化されたプロセスによって試料採取または収集される（例えばセクションI-E-3a参照）。いくつかの態様では、試料採取または収集された細胞の解析が、自動化される。特定態様において、解析は、無菌条件下、閉鎖システムで実施される。

【0084】

いくつかの態様では、提供される方法によって作製されおよび/または処理された細胞または細胞の集団を、例示的および/または代替的なプロセスによって処理または作製された

細胞または細胞集団と比較しうる。一定の態様において、代替的および/または例示的プロセスは、1つまたは複数の具体的局面が異なりうるが、その他の点では、例示的または代替的プロセスとの比較対象である提供される方法の態様または局面と類似するか同じ特質、局面、工程、段階、試薬または状態を含む。例えば、提供される方法によって生成する選択され刺激された細胞、例えば選択され刺激された細胞のアウトプット組成物を、選択された細胞を固定相から脱離させるために競合剤または遊離結合剤の使用を必要とする別々の選択工程と刺激工程とを伴うプロセスで生成した細胞と比較しうる。いくつかの態様において、別段の指定がある場合を除き、提供される方法と例示的または代替的プロセスは、他の点では、類似しおよび/または同一であり、例えば選択、濃縮、刺激、操作、トランスフェクション、形質導入、培養および/または製剤化に関して類似するかまたは同一の工程を伴うだろう。いくつかの態様において、別段の指定がある場合を除き、提供される方法と代替的プロセスは、同じまたは類似するタイプの生物学的試料から細胞を選択しおよび/または濃縮し、ならびに/または同じ細胞タイプの細胞および/もしくはインプット細胞を処理する。

【0085】

本明細書において提供される方法は、操作された細胞のアウトプット組成物（例えば治療用細胞組成物）を生成するのに必要な時間を低減させる。いくつかの態様において、操作された細胞のアウトプット組成物（例えば治療用細胞組成物）を生成するのに必要な時間は、代替的プロセスが必要とする時間より少なくとも40%、50%、60%、70%、80%または90%少ない。いくつかの態様において、本明細書において提供される方法は、操作された細胞のアウトプット組成物（例えば治療用細胞組成物）を5日未満で提供する。いくつかの態様において、本明細書において提供される方法は、操作された細胞のアウトプット細胞組成物（例えば治療用細胞組成物）を、4日もしくは約4日または96時間もしくは約96時間で提供する。いくつかの態様において、本明細書において提供される方法は、操作された細胞のアウトプット細胞組成物（例えば治療用細胞組成物）を、4～5日もしくは約4～5日または96～120時間もしくは約96～120時間で提供する。

【0086】

A. 試料および細胞調製

特定の態様では、提供される方法は、生体試料から細胞を選択および/または濃縮することを含む。いくつかの態様では、提供される方法は、生体試料、例えば、特定の疾患もしくは病状を有する、細胞療法を必要とするまたは細胞療法が投与される対象などの対象から得られるまたは対象に由来する生体試料から、細胞またはその集団を選択することを含む。いくつかの局面では、対象は、ヒト、例えば、細胞がそのために単離、処理および/または操作される養子細胞療法などの特定の治療的介入を必要とする患者である対象である。したがって、細胞は、いくつかの態様では、初代細胞、例えば、初代ヒト細胞である。試料は、組織、体液、および対象から直接採取された他の試料を含む。生体試料は、生物学的供給源から直接得られる試料、または処理される試料であることができる。生体試料は、限定されないが、体液、例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および臓器の試料を含み、これらに由来する処理済み試料も含む。

【0087】

いくつかの局面では、試料は、血液もしくは血液由来試料であるか、またはアフエーシスもしくは白血球アフエーシス産物に由来する。例示的な試料は、全血、末梢血単核細胞（PBMC）、白血球、骨髓、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、腸関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、他のリンパ組織、肝臓、肺、胃、腸、大腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸部、精巣、卵巣、扁桃腺もしくは他の臓器、および/またはそれらに由来する細胞を含む。試料は、細胞療法、例えば、養子細胞療法の状況下では、自己および同種の供給源由来の試料を含む。

【0088】

いくつかの例では、対象の循環血液由来の細胞は、例えば、アフエーシスまたは白血球アフエーシスによって得られる。試料は、いくつかの局面では、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、および/または血小板を含むリンパ球を含
有し、いくつかの局面では、赤血球細胞および血小板以外の細胞を含有する。

【0089】

いくつかの態様では、対象から収集された血液細胞は、例えば、血漿画分を除去するた
めに、かつ、後続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るために、洗
浄される。いくつかの態様では、細胞は、リン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄される。いく
つかの態様では、洗浄溶液は、カルシウムおよび/またはマグネシウムおよび/または多く
のもしくはあらゆる二価カチオンを欠く。いくつかの局面では、洗浄工程は、製造業者の
指示に従って、半自動化された「フロースルー」遠心分離機（例えば、Cobe 2991細胞プ
ロセッサー、Baxter）によって達成される。いくつかの局面では、洗浄工程は、製造業者
の指示に従って、接線流濾過（TFF）によって達成される。いくつかの態様では、細胞は
、洗浄後、例えば、 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ を含まないPBSなどの多種多様な生体適合性緩衝液に再懸
濁される。ある特定の態様では、血液細胞試料の成分が除去され、細胞が培養培地に直接
再懸濁される。

10

【0090】

いくつかの態様では、細胞を含有する試料（例えば、アフエーシス産物または白血球
アフエーシス産物）は、アフエーシスまたは白血球アフエーシスの間に添加された
ヘパリンなどの1つまたは複数の抗凝固剤を除去するために洗浄される。

【0091】

いくつかの態様では、細胞を含有する試料（例えば、全血試料、パフィーコート試料、
末梢血単核細胞（PBMC）試料、未分画T細胞試料、リンパ球試料、白血球細胞試料、アフ
エーシス産物または白血球アフエーシス産物）は、凍結保存および/または凍結保護（
例えば、凍結）され、次いで、細胞の集団の単離、選択、活性化、刺激、操作、形質導入
、トランスフェクション、インキュベーション、培養、採取、製剤化、および/または製剤
化された細胞集団の対象への投与のための任意の工程の前に融解される。

20

【0092】

いくつかの態様では、対象由来の自己末梢血単核細胞（PBMC）を含有する試料は、適
切な製造品質を確保するのに適した方法において収集される。一局面では、PBMCを含有
する試料は、分画された全血に由来する。いくつかの態様では、対象由来の全血は、白血
球アフエーシスによって、遠心力を使用し、細胞表現型間の密度差を利用して分画され
、このとき、自己単核細胞（MNC）が優先的に濃縮される一方で、赤血球細胞などの他の
細胞表現型は、収集された細胞組成物において低減される。いくつかの態様では、自己血
漿がMNC収集の間に同時に収集され、それは、いくつかの局面では、白血球アフエーシ
ス産物の安定性の拡大を可能にすることができる。一局面では、自己血漿が白血球アフ
エーシス産物に加えられ、白血球アフエーシス産物マトリックスの緩衝能が改善される
。いくつかの局面では、白血球アフエーシス産物を生成するために処理される全血の総
体積は、2L、4L、6L、8L、10L、12L、14L、16L、18Lもしくは20Lであるかまたは
約2L、4L、6L、8L、10L、12L、14L、16L、18Lもしくは20Lであるか、あるいは、
前述のいずれかの間の任意の値である。いくつかの態様では、収集された自己血漿の体積
は、10mL、50mL、100mL、150mL、200mL、250mLもしくは300mL以上であるか
または約10mL、50mL、100mL、150mL、200mL、250mLもしくは300mL以上であ
るか、あるいは、前述のいずれかの間の体積である。いくつかの態様では、白血球アフ
エーシス産物は、白血球アフエーシス収集完了の約48時間以内に、手順、例えば、プロ
セス内凍結保存のための洗浄および製剤化に供される。いくつかの態様では、白血球アフ
エーシス産物は、例えば、白血球アフエーシス収集完了の約2時間、6時間、12時間
、18時間、24時間、36時間または48時間以内に、1つまたは複数の洗浄工程に供される
。いくつかの局面では、1つまたは複数の洗浄工程は、白血球アフエーシス収集中の抗
凝固剤、白血球アフエーシス産物中に蓄積され得る細胞廃棄物、残留血小板および/また
は細胞残屑を除去する。いくつかの態様では、1つまたは複数の緩衝液交換は、1つまたは
複数の洗浄工程の間に実施される。

30

40

50

【0093】

特定の態様では、アフエーシス産物または白血球アフエーシス産物は、以下に記載されるように、凍結保存および/または凍結保護（例えば、凍結）され、次いで、細胞の選択または単離工程（例えば、T細胞の選択または単離工程）に供される前に融解される。いくつかの態様では、凍結保存および/または凍結保護されたアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物がT細胞の選択または単離工程に供された後、追加の凍結保存および/または凍結保護工程が、細胞の集団を活性化、刺激、操作、形質導入、トランスフェクション、インキュベーション、培養、採取、製剤化、および/または製剤化された細胞集団を対象に投与する工程などのいずれかの後続の工程の最中または間に実施されることはない。例えば、融解された凍結保存および/または凍結保護されたアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物から選択されたT細胞は、形質導入などの下流プロセスのために融解される前に、再び凍結保存および/または凍結保護されることはない。

10

【0094】

特定の態様では、凍結保存および/または凍結保護されたアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物がバンクされ（例えば、試料を凍結する前の細胞選択を伴わない）、これにより、いくつかの局面では、後続の製造工程にさらに多くの柔軟性を与えることができる。いくつかの局面では、凍結保存および/または凍結保護されたアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物は、産物の処理において各々個別にまたは組み合わせて使用することができる複数の凍結保存容器（バッグなど）に分割される。一局面では、選択前に細胞をバンクすることにより、下流プロセスの細胞収量が増加し、細胞を早期にバンクすることは、それらの健康が向上し、製造成功基準を満たすのがさらに容易になる場合があることを意味し得る。別の局面では、一旦融解されると、凍結保存および/または凍結保護されたアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物は、1つまたは複数の異なる選択方法に供することができる。このアプローチの利点は、とりわけ、試料のドナーおよび/または別のレシピエントなどにおける対象の疾患または病状の治療のための細胞療法の細胞の利用可能性、有効性および/または他の側面を強化することである。

20

【0095】

いくつかの態様では、試料（例えば、アフエーシスまたは白血球アフエーシス試料）は、ドナーが何らかの疾患または病状と診断された後の時点で、細胞選択の前に、または事前の細胞選択を伴わず（例えば、クロマトグラフィーによる選択などの事前のT細胞選択を伴わず）収集され、凍結保存および/または凍結保護される。いくつかの局面では、凍結保存の時期はまた、疾患もしくは病状に対する任意の初期治療、疾患もしくは病状に対する治療のために標識された任意の標的指向型治療もしくは任意の治療、または放射線および/または化学療法以外の任意の治療のうちの1つもしくは複数を経験する前にドナーが受ける前である。いくつかの態様では、試料は、疾患の初期治療後の疾患の最初の再発の後、およびドナーまたは対象が疾患のためのその後の治療を受ける前に収集される。初期治療および/またはその後の治療は、細胞療法以外の療法であり得る。いくつかの態様では、収集された細胞は、初期治療および/またはその後の治療後の細胞療法に使用されてもよい。一局面では、事前の細胞選択を伴わず凍結保存および/または凍結保護された試料は、クロスオーバーして後に治療を必要とし得る無作為化臨床試験の非治療患者に関連するものなどの初期費用の削減に役立ち得る。

30

40

【0096】

いくつかの態様では、試料（例えば、アフエーシスまたは白血球アフエーシス試料）は、疾患の第2選択治療後およびドナーまたは対象が疾患のためのその後の治療を受ける前の疾患の第2の再発後の時点で、細胞選択の前に、または事前の細胞選択を伴わず（例えば、クロマトグラフィーによる選択などの事前のT細胞選択を伴わず）収集され、凍結保存および/または凍結保護される。いくつかの態様では、患者は、例えば、特定の危険因子を評価することによって、第2選択治療の後に再発する可能性が高いと識別される。いくつかの態様では、危険因子は、ダブルヒットリンパ腫、原発性の難治性がん、または活性化B細胞リンパ腫などの疾患タイプおよび/または遺伝的特質に基づく。いくつかの態

50

様では、危険因子は、第1選択治療後の早期再発、または治療後の他の予後不良指標（例えば、IPI（国際予後指数）>2）などの臨床像に基づく。

【0097】

いくつかの態様では、試料（例えば、アフェレーシスまたは白血球アフェレーシス試料）は、ドナーまたは対象が何らかの疾患と診断される前の時点で、細胞選択の前に、または事前の細胞選択を伴わず（例えば、クロマトグラフィーによる選択などの事前のT細胞選択を伴わず）収集され、凍結保存および/または凍結保護される。いくつかの局面では、ドナーまたは対象は、何らかの疾患を発症するリスクがあると判定されてもよい。いくつかの局面では、ドナーまたは対象は、健康な対象であり得る。ある特定の場合では、ドナーまたは対象は、何らかの疾患を発症するリスクまたは何らかの疾患と診断されるリスクがあると考えられることがなくても、細胞療法が人生のさらに後の段階で必要とされる場合に、細胞をバンクまたは保存することを選択してもよい。いくつかの態様では、ドナーまたは対象は、遺伝子変異、遺伝子異常、遺伝子破壊、家族歴、タンパク質異常（タンパク質産生および/またはプロセシングの欠陥など）、および何らかの疾患を発症するリスクを高め得るライフスタイルの選択などの因子に基づいて、何らかの疾患を発症するリスクがあると考えられる場合がある。いくつかの態様では、細胞は、予防薬として収集される。

【0098】

いくつかの態様では、細胞の凍結保存および/または凍結保護された試料（例えば、アフェレーシスまたは白血球アフェレーシス試料）、例えば、事前の細胞選択に供されていない（例えば、クロマトグラフィーによる選択などの事前のT細胞選択を伴わない）細胞の試料は、12時間超、24時間超、36時間超もしくは48時間超または12時間、24時間、36時間もしくは48時に等しい期間にわたり貯蔵またはバンクされる。いくつかの態様では、試料は、1週間超、2週間超、3週間超もしくは4週間超または1週間、2週間、3週間もしくは4週間に等しい期間にわたり貯蔵またはバンクされる。いくつかの態様では、試料は、長期貯蔵または長期バンクされる。いくつかの局面では、試料は、1カ月超、2カ月超、3カ月超、4カ月超、5カ月超、6カ月超、7カ月超、8カ月超、9カ月超、10カ月超、11カ月超、1年超、2年超、3年超、4年超、5年超、6年超、7年超、8年超、9年超、10年超、11年超、12年超、13年超、14年超、15年超、16年超、17年超、18年超、19年超、20年超、25年超、30年超、35年超、40年超もしくはそれ以上、または1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、25年、30年、35年、40年もしくはそれ以上に等しい期間にわたり貯蔵される。

【0099】

いくつかの態様では、ドナーから採取されたアフェレーシスまたは白血球アフェレーシス試料は、冷却環境で貯蔵施設または処理施設に輸送され、かつ/または、貯蔵施設で極低温保存されるか、処理施設で処理される。いくつかの態様では、試料は、輸送前に、例えば、CD4+および/またはCD8+ T細胞などのT細胞を選択することによって処理される。いくつかの態様では、そのような処理は、試料を輸送後および極低温保存する前に実施される。いくつかの態様では、処理は、極低温保存に続いて試料を融解した後に実施される。

【0100】

ドナー、ひいてはその細胞が、疾患に対する広範囲な治療を受けていない段階、および/あるいは、疾患もしくは病状の発症またはその診断の前の段階で、ドナーがその細胞を貯蔵することを可能にすることによって、そのような細胞は、1回または複数回の治療の後に採取された細胞と比較して、細胞療法における使用に対して特定の利点を有し得る。例えば、1回または複数回の治療の前に採取された細胞の方が、数回の治療を受けた細胞よりも健康であり得る、高いレベルの特定の細胞活性を示し得る、迅速に増殖し得る、および/または遺伝子操作に対して受容的であり得る。本明細書に記載される態様による利点の別の例には、利便性が含まれ得る。例えば、細胞療法に必要とされる前にドナーの細胞を収集し、任意で処理し、貯蔵することにより、レシピエントが後にそれらを必要とする場

合に、細胞は容易に利用可能となる。これにより、アフエーシス検査室の容量が増加し、技術者がアフエーシス収集プロセスの予定を決める際の柔軟性が高まる。

【0101】

アフエーシス試料などの試料由来の細胞を極低温保存および処理するための例示的な方法およびシステムには、国際公開出願番号W02018170188に記載されているものが含まれ得る。いくつかの態様では、本方法およびシステムは、患者が細胞療法を必要とする前にアフエーシスを収集する工程、次いで、組換え受容体（例えば、CAR）を用いて細胞（例えば、T細胞）を操作するプロセスで後に使用するために、アフエーシス試料を凍結保存する工程を伴う。場合によっては、そのようなプロセスは、本明細書に記載されるプロセスを含むことができる。いくつかの態様では、対象からアフエーシス試料が収集され、その後のT細胞選択、細胞の集団の活性化、刺激、操作、形質導入、トランスフェクション、インキュベーション、培養、採取、製剤化、および/または製剤化された細胞集団の対象への投与の前に凍結保存される。そのような例では、凍結保存されたアフエーシス試料は、試料を本明細書に記載されるいずれかなどの1つまたは複数の選択工程に供する前に融解される。

10

【0102】

いくつかの態様では、細胞の凍結保存および/または凍結保護された試料（例えば、アフエーシスまたは白血球アフエーシス試料）、例えば、事前の細胞選択に供されていない（例えば、クロマトグラフィーによる選択などの事前のT細胞選択を伴わない）細胞の試料は、細胞療法のための細胞集団、例えば、CAR+ T細胞を含有するT細胞集団を製造するための下流プロセスに使用する前に融解される。いくつかの態様では、そのような細胞の凍結保存および/または凍結保護された試料（例えば、アフエーシス試料または白血球アフエーシス試料）は、CAR+ T細胞療法などの操作されたT細胞療法のための、本明細書において提供されるプロセスに関連して使用される。特定の例では、採取/製剤化工程の前またはその間に、凍結保存のさらなる工程は行われない。

20

【0103】

B. クロマトグラフィーによる細胞選択

本明細書に提供される方法の諸局面において、試料の細胞、例えばT細胞は、クロマトグラフィー単離によって、例えばアフィニティークロマトグラフィーまたはゲル浸透クロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによって、選択される。いくつかの態様において、本方法は、標的細胞、例えば単離、選択または濃縮されるべき細胞の、表面に位置する選択マーカーに結合する選択物質を使用する。そのような方法は、（トレースレス（traceless）な）細胞アフィニティークロマトグラフィー技術（cell affinity chromatography technology: CATCH）と記載されることもあり、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるPCT出願W02013124474およびW02015164675に記載の方法または技法はいずれも、これに含まれる。

30

【0104】

いくつかの態様では、冷凍保存および/または凍結保護されたアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物が融解される。いくつかの態様では、融解した細胞組成物が、希釈（例えば無血清培地による希釈）および/または洗浄（無血清培地による洗浄）に供され、これにより、場合によっては、不要なまたは望ましくない成分を除去または低減することができる。場合により、希釈および/または洗浄は、融解した試料に含有される凍結保護物質、例えばDMSOを除去し、その存在を低減する。そうしなければ、凍結保護物質は、長時間室温に曝露したときの細胞の生存率、収量、回復に悪影響を及ぼしうる。いくつかの態様において、希釈および/または洗浄は、融解した冷凍保存産物の培地を無血清培地、例えば本明細書のセクションIIIまたは参照により本明細書に組み入れられるPCT/US 2018/064627に記載されているものなどに交換することを可能にする。

40

【0105】

いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数のサプリメントが補足された基本培地（例えばOpTmizer（商標）T細胞拡大培養基本培地（T-Cell Expansion Basal

50

Medium) (ThermoFisher) を含む。いくつかの態様において、前記1つまたは複数のサプリメントは無血清である。いくつかの態様において、無血清培地は、細胞（例えばT細胞）の維持、拡大および/または活性化のために1つまたは複数の追加成分、例えば追加のサプリメント（例えばOpTmizer（商標）T細胞拡大培養サプリメント（T-cell Expansion Supplement）（ThermoFisher））によって提供されるものなどが補足された基本培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、血清代替サプリメント、例えば免疫細胞血清代替品、例えばThermoFisher、#A2596101、CTS（商標）免疫細胞血清代替品（Immune Cell Serum Replacement）、またはSmith et al.Clin Transl Immunology.2015 Jan;4（1）:e31に記載の免疫細胞血清代替品を、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、L-グルタミンなどの遊離型アミノ酸を、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、ジペプチド型のL-グルタミン（例えばL-アラニル-L-グルタミン）、例えばGlutamax（商標）（ThermoFisher）中のジペプチドを、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えば組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-7および/または組換えヒトIL-15を、さらに含む。
【0106】

10

いくつかの態様において、細胞、例えば標的細胞は、単離、選択または濃縮されるべき細胞が、少なくとも1つの共通する特異的受容体分子の存在によって規定されるように、細胞表面に、本明細書記載の選択マーカーを有しまたは発現させる。いくつかの態様において、標的細胞を含有する試料は、選択マーカーを欠く余分な細胞も含有しうる。例えばいくつかの態様において、T細胞は、複数の細胞タイプ、例えば赤血球またはB細胞を含有する試料から、選択、単離または濃縮される。

20

【0107】

いくつかの態様において、選択物質は、例えばクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に、直接的または間接的に結合した状態で、クロマトグラフィーカラムに含まれる。いくつかの態様において、選択物質は、試料がカラムに加えられる時点で、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に存在する。いくつかの態様において、選択物質は、試薬、例えば本明細書の例えばセクションII-Aに記載する選択試薬を介して、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に間接的に結合される能力を有する。いくつかの態様において、選択試薬はカラム固定相に共有結合または非共有結合で結合される。いくつかの態様において、選択試薬は、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に、可逆的に固定化される。場合により、選択試薬は、共有結合によって、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に固定化される。いくつかの局面において、選択試薬は、非共有結合により、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に、可逆的に固定化される。

30

【0108】

いくつかの態様において、選択物質は、試料がクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えられる時点で、例えばクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に直接的に（例えば共有結合または非共有結合で）または選択試薬を介して間接的に結合した状態で存在しうる。したがって、試料を加えると、標的細胞は、選択物質によって結合され、カラムのクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に固定化されうる。あるいは、いくつかの態様では、選択物質を試料に加えることができる。こうすると、選択物質は試料中の標的細胞（例えばT細胞）に結合し、次に試料を、選択試薬を含むクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に加えることができる。この場合、標的細胞に既に結合している選択物質は選択試薬に結合し、これにより、標的細胞をクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に固定化する。いくつかの態様において、選択物質は、本明細書の例えばセクションII-AおよびセクションII-B記載の選択試薬に、選択物質に含まれる本明細書記載の結合パートナーCを介して結合する。

40

【0109】

いくつかの局面では、選択物質が試料に加えられる。一定の態様において、選択物質は、細胞、例えば標的細胞の表面上の受容体分子（例えば選択マーカー）に特異的に結合す

50

る結合部位Bを有する。例えばセクションII-B以降を参照されたい。いくつかの局面において、選択物質は、選択試薬の結合部位Zに特異的および可逆的に結合することができる結合パートナーCも含む。

【0110】

一定の局面において、選択試薬は、結合パートナーCによって結合されて、これにより、受容体結合試薬の多量体化をもたらすことができる、2つ以上の結合部位Zも含有しうる。このように、本明細書において使用されるこの選択試薬は、多量体化試薬であることもできる。選択試薬は、例えばストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、アビジンムテイン、またはそれらの混合物でありうる。いくつかの局面では、異なるクロマトグラフィーマトリックスが異なる選択試薬にカップリングされ、それらを層状に重ねてカラムにすることで、分離用の多成分系を形成させうる。

10

【0111】

いくつかの態様では、2つ以上の選択物質が、選択試薬に、例えば選択試薬上に存在する1つまたは複数の結合部位Zを介して、会合、例えば可逆的または不可逆的に結合する。場合により、これは、（少なくとも2コピーの）細胞表面分子（例えば選択マーカー）を有する標的細胞を、その分子（例えば選択マーカー）に結合することができる選択物質と接触させた場合に、アビディティ効果が生じうるように、互いに密に配置された選択物質をもたらす。

【0112】

いくつかの態様では、同じ、すなわち同じ選択マーカー結合特異性を有する、2つ以上の異なる選択物質が、選択試薬に可逆的に結合されうる。いくつかの態様では、異なる選択マーカーに結合する少なくとも2つの異なる選択物質、場合によっては3つまたは4つの異なる選択物質を使用することが可能である。いくつかの局面において、少なくとも2つの選択物質のそれぞれは、例えば第1分子、第2分子など、異なる分子（例えば選択マーカー）に結合することができる。場合によっては、前記異なる分子（例えば選択マーカー）、例えば異なる細胞表面分子が、同じ標的細胞上に存在しうる。別の例では、前記異なる分子（例えば選択マーカー）、例えば異なる細胞表面分子が、同じ細胞集団中に存在する異なる標的細胞上に存在しうる。場合により、第3、第4などの選択物質を、それぞれがさらに異なる結合部位を含有する同じ試薬と会合させることができる。

20

【0113】

いくつかの態様において、前記2つ以上の異なる選択物質は同じ結合パートナーCを含有する。いくつかの態様において、前記2つ以上の異なる選択物質は異なる結合パートナーを含有する。いくつかの局面において、第1選択物質は、選択試薬上に存在する結合部位Z1に特異的に結合することができる結合パートナーC1を有することができる、第2選択物質は、選択試薬上に存在する結合部位Z1または結合部位Z2に特異的に結合することができる結合パートナーC2を有することができる。したがって、いくつかの例では、選択試薬に含まれる複数の結合部位Zは、結合部位Z1およびZ2を含み、それらは、選択物質に含まれる結合パートナーC1およびC2にそれぞれ可逆的に結合する能力を有する。いくつかの態様では、C1とC2が同じであり、および/またはZ1とZ2が同じである。別の局面では、複数の結合部位Zのうちの1つまたは複数が異なりうる。別の例では、複数の結合パートナーCのうちの1つまたは複数が異なってもよい。結合パートナーCのそれぞれが結合部位Zのうちの1つと相互作用すること、例えば特異的に結合することができる限り、結合部位Zを含有する選択試薬と適合する異なる結合パートナーCの任意の組合せを選ぶことは、当業者の水準内である。

30

40

【0114】

一定の態様では、試料、例えば細胞と選択物質とを含有する試料を、取り付けられたまたは固定化された選択試薬を含有するクロマトグラフィーマトリックスに加え、または接触させる。特定局面において、選択試薬は、選択物質の結合パートナーCに特異的に結合する複数の結合部位Zを有する。一定の局面において、選択物質は、結合パートナーCと結合部位Zの間の相互作用によって選択試薬に結合する。したがっていくつかの態様におい

50

て、細胞、例えば標的細胞は、選択試薬の1つまたは複数の結合部位Zと選択物質の結合部位Zとによって形成される複合体を介して、クロマトグラフィーマトリックス上に固定化される。さらなる局面では、例えば残りの試料をクロマトグラフィーマトリックスからすすぎ落とし、遊離させ、または洗い流すことにより、細胞、例えば標的細胞を、試料から枯渇させうる。特定局面において、選択物質は、細胞を含有する試料中に含まれていてもよいし、取り付けられている選択試薬または多量体化試薬に結合させるために、例えば試料をクロマトグラフィーマトリックスに加える前に、クロマトグラフィーマトリックスに適用するかクロマトグラフィーマトリックスと接触させてもよい。

【0115】

いくつかの態様では、結合パートナーCと結合部位Zの間に形成される可逆性結合を、競合剤および/または遊離結合剤によって破壊することができる。いくつかの態様において、競合剤および/または遊離結合剤は、ビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、または1つもしくは複数の結合部位Zに関して結合パートナーCと結合について競合する能力を有するストレプトアビジン結合ペプチドであることができる。いくつかの態様において、結合パートナーCと競合剤および/または遊離結合剤とは異なり、競合剤および/または遊離結合剤は、1つまたは複数の結合部位Zに対して、前記結合パートナーのアフィニティよりも高い結合アフィニティを呈する。本明細書に提供される方法のいずれかの特定局面において、選択試薬への選択物質の結合を破壊するための、クロマトグラフィーカラムの固定相への競合剤および/または遊離結合剤の添加は、標的細胞（T細胞）をクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）から脱離させるためには必要でない。

【0116】

いくつかの態様では、例えば残りの試料をクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）からすすぎ落とし、遊離させ、または洗い流すことにより、細胞、例えば試料の標的細胞を、試料から枯渇させうる。いくつかの態様では、結合していない細胞およびデブリをクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）から除去するために、1つまたは複数の（例えば2、3、4、5、6つの）洗浄工程が使用される。いくつかの態様では、少なくとも2つの洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、1つまたは複数の洗浄工程を実施する前に、少なくとも5、10、15、16、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分、または約5、10、15、16、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分にわたって、試料をマトリックスに浸透させる。いくつかの態様では、試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えた後、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分、または約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分の時点で、洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えた後、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55もしくは60分、または約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55もしくは60分、または少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55もしくは60分の時点で、洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、120、100、90、80、70、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10もしくは5分以内、または約120、100、90、80、70、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10もしくは5分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10もしくは5分以内、または約60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10もしくは5分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、5～60分以内または約5～60分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、5～50分以内または約5～50分以内に、1つま

10

20

30

40

50

たは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、5～40分以内または約5～40分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、5～30分以内または約5～30分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、5～20分以内または約5～20分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、5～10分以内または約5～10分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、10～60分以内または約10～60分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、20～60分以内または約20～60分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、30～60分以内または約30～60分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、40～60分以内または約40～60分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。いくつかの態様では、クロマトグラフィーカラム（例えば固定相）への試料の添加に続いて、50～60分以内または約50～60分以内に、1つまたは複数の洗浄工程が実施される。

【0117】

いくつかの態様では、ある工程で正または負に選択されたフラクションが、別の選択工程、例えば後続の正または負の選択に供されるという、複数ラウンドの細胞選択工程が実行される。一定の態様において、選択、単離および濃縮のための方法、技法および試薬は、例えば参照によりその全体が本明細書に組み入れられるPCT出願WO2015164675に記載されている。

【0118】

いくつかの態様では、単一の選択工程を使って、試料から標的細胞（例えばCD3+T細胞）を単離することができる。いくつかの態様において、単一の選択工程は単一のクロマトグラフィーカラムで実施することができる。いくつかの例では、単一の選択工程で、複数のマーカーを発現する細胞を同時に枯渇させることができる。同様に、複数の細胞タイプを同時に正に選択することができる。一定の態様では、選択工程が繰り返され、および/または2回以上実施され、この場合は、ある工程で正または負に選択されたフラクションが、同じ選択工程、例えば正または負の選択の繰り返しに供される。いくつかの例では、例えば選択された細胞の純度を増加させるために、および/または負に選択されたフラクションから負に選択される細胞をさらに除去しおよび/または枯渇させるために、単一の選択工程が繰り返され、および/または2回以上実施される。一定の態様では、1つまたは複数の選択工程が、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回または10回より多く、実施される。一定の態様では、前記1つまたは複数の選択工程が、1～10回、1～5回または3～5回、実施されおよび/または繰り返される。いくつかの態様では2つの選択工程が実施される。

【0119】

細胞選択は1つまたは複数のクロマトグラフィーカラムを使って実施されうる。いくつかの態様では、1つまたは複数のクロマトグラフィーカラムが閉鎖システム内に含まれる。いくつかの態様では、閉鎖システムは、自動化された閉鎖システムであり、例えばユーザー（例えばヒト）によるインプットがごくわずかしき要求されないか、全く要求されない。いくつかの態様では、細胞選択が逐次的に実施される（例えば逐次的選択技法）。いくつかの態様では、1つまたは複数のクロマトグラフィーカラムが逐次的に配置される。例えば第1カラムは、カラムのアウトプット（例えば溶出液）が、例えば接続された管系を通して、第2クロマトグラフィーカラムに供給されるように配向されうる。いくつかの態様では、複数のクロマトグラフィーカラムが逐次的に配置されうる。いくつかの態様に

において、細胞選択は、逐次的な正および負の選択工程、先の工程からの正および/または負のフラクションをさらなる選択に供する後続の工程を実行することによって達成され、プロセス全体が同じ管または管系のセットで実行されうる。いくつかの態様では、CD4+集団またはCD8+集団のうちの一方を濃縮するために第1選択が行われ、CD4+集団またはCD8+集団のうちの他方を濃縮するための第2選択には、第1選択で選択されなかった細胞が細胞源として使用される逐次的選択に、標的細胞を含有する試料が供される。いくつかの態様では、CD4+集団またはCD8+集団の一方または両方の亜集団、例えばセントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞、ナイーブT細胞、および/または1種もしくは複数種の表面マーカーが陽性であるかそれらを高レベルに発現する細胞、例えばCD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+を濃縮するために、1つまたは複数のさらなる選択を行うことができる。いくつかの態様では、CD3+集団を濃縮するために第1選択が行われ、CD3+集団を濃縮するための第2選択には、選択された細胞が細胞源として使用される逐次的選択に、標的細胞を含有する試料が供される。いくつかの態様では、(例えば第1クロマトグラフカラム中の)第1固定相上にCD3+集団を濃縮するために第1選択が行われ、(例えば第2クロマトグラフカラム中の)第2固定相上にCD3+集団を濃縮するための第2選択には、結合しなかった細胞を含有する素通り画分が細胞源として使用される逐次的選択に、標的細胞を含有する試料が供され、ここでは第1固定相と第2固定相が逐次的に配置される。いくつかの態様では、CD3+集団の亜集団、例えばセントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞、ナイーブT細胞、および/または1種もしくは複数種の表面マーカーが陽性であるかそれらを高レベルに発現する細胞、例えばCD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+を濃縮するために、1つまたは複数のさらなる選択を行うことができる。いくつかの態様では、CD3+集団を濃縮するために第1選択が行われ、CD4+集団を濃縮するための第2選択には、選択された細胞が細胞源として使用される逐次的選択に、標的細胞を含有する試料が供される。いくつかの態様では、CD3+CD4+集団の亜集団、例えばセントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞、ナイーブT細胞、および/または1種もしくは複数種の表面マーカーが陽性であるかそれらを高レベルに発現する細胞、例えばCD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+を濃縮するために、1つまたは複数のさらなる選択を行うことができる。いくつかの局面では、T細胞(例えばCD3+細胞)の特定亜集団、例えば1種または複数種の表面マーカーが陽性であるかそれらを高レベルに発現する細胞、例えばCD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+T細胞が、正または負の逐次的選択技法によって選択されることが企図される。

【0120】

いくつかの態様では、細胞選択は、並行して実施される(例えば、並行選択技法)。いくつかの態様では、1つまたは複数のクロマトグラフィーカラムが並行して配置される。例えば、試料が第1のカラムを通過する必要なしに試料が各カラムに添加されることが可能となる管を介して試料が2つ以上のカラム上に同時に装填されるように、2つ以上のカラムが配置され得る。例えば、並行選択技法を使用して、細胞選択は、陽性および/または陰性選択工程を、例えば、プロセス全体が同じ管または管セット内で行われる閉鎖システムで行うことによって成し遂げられ得る。いくつかの態様では、標的細胞を含有する試料は、各カラムが細胞集団の選択を達成する2つ以上のクロマトグラフィーカラム上に試料が装填される、並行選択に供される。いくつかの態様では、2つ以上のクロマトグラ

フィーカラムが、CD3+、CD4+またはCD8+集団の選択を個別に達成する。いくつかの態様では、アフィニティークロマトグラフィーまたはゲル浸透クロマトグラフィーを含む2つ以上のクロマトグラフィーカラムが、独立して、同じ細胞集団の選択を達成する。例えば、2つ以上のクロマトグラフィーカラムが、CD3+細胞の選択を達成してもよい。いくつかの態様では、アフィニティークロマトグラフィーまたはゲル浸透クロマトグラフィーを含む2つ以上のクロマトグラフィーカラムが、独立して、異なる細胞集団の選択を達成する。例えば、2つ以上のクロマトグラフィーカラムが、独立して、CD3+細胞、CD4+細胞およびCD8+細胞の選択を達成してもよい。いくつかの態様では、例えば連続選択技法を使用した、さらなる1回または複数回の選択を、並行選択を介して選択された1つまたはすべての細胞集団の亜集団を濃縮するために達成することができる。例えば、選択された細胞を、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞、ナイーブT細胞および/または1つもしくは複数の表面マーカーに対して陽性またはそれを高レベルで発現する細胞（例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+）についてさらに選択してもよい。いくつかの態様では、標的細胞を含有する試料は、2つ以上のカラム上でCD3+集団を濃縮するために達成される並行選択に供される。いくつかの態様では、さらなる1回または複数回の選択を、CD3+集団の亜集団、例えば、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞、ナイーブT細胞および/または1つもしくは複数の表面マーカーに対して陽性またはそれを高レベルで発現する細胞（例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+）を濃縮するために達成することができる。いくつかの態様では、標的細胞を含有する試料は、選択が2つ以上のカラム上で独立してCD3+集団およびCD4+集団を濃縮するために達成される、並行選択に供される。いくつかの態様では、さらなる1回または複数回の選択を、CD3+およびCD4+集団の亜集団、例えば、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞、ナイーブT細胞および/または1つもしくは複数の表面マーカーに対して陽性またはそれを高レベルで発現する細胞（例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+）を濃縮するために達成することができる。いくつかの態様では、標的細胞を含有する試料は、CD3+集団およびCD8+集団を濃縮するために達成される並行選択に供される。いくつかの態様では、さらなる1回または複数回の選択を、CD3+およびCD8+集団の亜集団、例えば、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞、ナイーブT細胞および/または1つもしくは複数の表面マーカーに対して陽性またはそれを高レベルで発現する細胞（例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+）を濃縮するために達成することができる。いくつかの態様では、標的細胞を含有する試料は、CD4+集団およびCD8+集団を濃縮するために達成される並行選択に供される。いくつかの態様では、さらなる1回または複数回の選択を、CD4+およびCD8+集団の亜集団、例えば、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞、ナイーブT細胞および/または1つもしくは複数の表面マーカーに対して陽性またはそれを高レベルで発現する細胞（例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+）を濃縮するために達成することができる。いくつかの局面では、T細胞の特定の亜集団（例えば、CD3+、CD4+、CD8+ T細胞）、例えば、1つまたは複数の表面マーカーに対して陽性またはそれを高レベルで発現する細胞（例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+および/またはCD45RO+ T細胞）が、陽性または陰性の並行選択技法によって選択されることが想定される。いくつかの態様では、連続および並行の選択技法を組み合わせで使用することができる。

【0121】

いくつかの態様では、2つのカラムが並列選択に使用される。いくつかの態様では、2つのカラムが同じ細胞タイプ（例えば同じ選択マーカー）を選択する。いくつかの態様では、2つのカラムがそれぞれCD3+T細胞を選択する。

【0122】

一般には、固定相（例えば選択樹脂）の結合容量は、一定の数の標的部分、例えばT細胞

10

20

30

40

50

胞などの標的細胞を選択するために必要となる固定相の量に影響を及ぼす。結合容量、例えば固定相（例えば選択樹脂）1mLあたりに固定化されうる標的細胞の数は、1つまたは複数のカラムに捕捉される標的細胞の数を決定または制御するために使用することができる。本明細書に開示するオンカラムでの細胞選択および細胞刺激には1つまたは複数のクロマトグラフィーカラムを使用することができる。複数のカラムが使用される場合、それらは逐次的に、並列に、またはそれらの任意の好適な組合せで、配置することができる。したがって、固定相（例えば選択樹脂）の結合容量は、単一カラムアプローチでの試薬量または複数カラムアプローチにおける各カラムについての試薬量を標準化するために、使用することができる。

【0123】

いくつかの態様において、本明細書にいう固定相の結合容量は、過剰量の標的細胞を固定相に負荷した場合に、所与の溶媒および細胞濃度条件において固定相に結合される標的細胞の最大数である。いくつかの態様において、結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞（例えばT細胞）1億±2500万個または約1億±2500万個である。いくつかの態様において、本明細書に開示する固定相（例えば選択樹脂）の静的結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞約7500万個～約1億2500万個の範囲にある。一局面において、オンカラムでの細胞選択および細胞刺激に本明細書において使用される固定相の結合容量は、静的結合容量である。いくつかの態様において、静的結合容量は、例えば一定の溶媒および細胞濃度条件において、固定相上に固定化されうる細胞の最大量である。いくつかの態様において、本明細書に開示する固定相（例えば選択樹脂）の静的結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞約5000万個～約1億個の範囲にある。いくつかの態様において、静的結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞（例えばT細胞）1億±2500万個または約1億±2500万個である。いくつかの態様において、本明細書に開示する固定相（例えば選択樹脂）の静的結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞約7500万個～約1億2500万個の範囲にある。いくつかの態様において、固定相（例えば選択樹脂）の静的結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞約1000万個～約2000万個、約2000万個～約3000万個、約3000万個～約4000万個、約4000万個～約5000万個、約5000万個～約6000万個、約6000万個～約7000万個、約7000万個～約8000万個、約8000万個～約9000万個、約9000万個～約1億個、約1億1000万個～約1億2000万個、約1億2000万個～約1億3000万個、約1億3000万個～約1億4000万個、約1億4000万個～約1億5000万個、約1億5000万個～約1億6000万個、約1億6000万個～約1億7000万個、約1億7000万個～約1億8000万個、約1億8000万個～約1億9000万個または約1億9000万個～約2億万個である。

【0124】

いくつかの態様において、本明細書にいう固定相の結合容量は、所与の流動条件下で、結合していない標的細胞の有意な破過が起こるまでに固定相に結合する標的細胞の数である。一局面において、オンカラムでの細胞選択および細胞刺激に関して本明細書にいう固定相の結合容量は、動的結合容量、すなわち試料適用中の充填クロマトグラフィーカラムにおける稼働条件下での結合容量である。いくつかの態様において、動的結合容量は、既知濃度の標的細胞を含有する試料を負荷し、素通り画分をモニタリングすることによって決定される。標的細胞は一定の破過点までは固定相に結合するが、その後は、結合しなかった標的細胞がカラムを素通りすることになる。いくつかの態様において、動的結合容量は固定相1mLあたり標的細胞（例えばT細胞）1億個±2500万個または約1億個±2500万個である。いくつかの態様において、本明細書において開示する固定相（例えば選択樹脂）の動的結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞7500万個～約1億2500万個または約7500万個～約1億2500万個である。いくつかの態様において、本明細書に開示する固定相（例えば選択樹脂）の動的結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞約5000万個～約1億個の範囲にある。いくつかの態様において、固定相（例えば選択樹脂）の動的結合容量は、固定相1mLあたり標的細胞約1000万個～約2000万個、約2000万個～約3000万個、約3000万個～約4000万個、約4000万個～約5000万個、約5000万個～約6000万個、約6000万個～約7000万個、約7000万個～約8000万個、約8000万個～約9000万個、約9

10

20

30

40

50

000万個～約1億個、約1億1000万個～約1億2000万個、約1億2000万個～約1億3000万個、約1億3000万個～約1億4000万個、約1億4000万個～約1億5000万個、約1億5000万個～約1億6000万個、約1億6000万個～約1億7000万個、約1億7000万個～約1億8000万個、約1億8000万個～約1億9000万個または約1億9000万個～約2億万個である。

【0125】

いくつかの態様において、固定相は20mLである。いくつかの態様において、固定相は細胞20億±5億個の結合容量を有する。

【0126】

任意の材料をクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）として使用しうる。一般には、好適なクロマトグラフィー材料は、例えば充填クロマトグラフィーカラムとして望ましい条件下で使用した場合に、本質的に無害である、すなわち細胞の生存能にとって有害でない。いくつかの態様において、試料の位置は変化していても、固定相は所定の場所、例えば所定の位置に留まる。したがっていくつかの態様において、固定相は、クロマトグラフィー系のうち、移動相が（貫流モードまたはバッチモードのいずれかによって）その中を流れる部分であり、相間で液相に（溶解してまたは分散して）含有される成分の分配が起こる。

【0127】

いくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリックスは固体相または半固体相の形態を有し、一方、単離/分離しようとする標的細胞を含有する試料は、流体相である。クロマトグラフィーマトリックスは、（任意の好適なサイズおよび外形の）粒状物質または紙製基材もしくは紙製メンブレンを含むモノリスクロマトグラフィー材料であることができる。したがっていくつかの局面において、クロマトグラフィーはカラムクロマトグラフィーであることも平面クロマトグラフィーであることもできる。いくつかの態様では、標準的クロマトグラフィーカラムだけでなく、双方向流が可能なカラム、例えばPhyNexus, Inc.（米国カリフォルニア州サンノゼ）から入手可能なPhyTip（登録商標）カラムを、カラムベース/貫流モードベースの方法に使用することができる。したがって場合により、双方向流が可能なピペットチップまたはカラムも、本方法において有用なクロマトグラフィーカラムに含まれる。場合により、例えば特定のマトリックス材料が使用される場合に、粒状マトリックスは、例えば約5 μm～約200 μm、または約5 μm～約400 μm、または約5 μm～約600 μmの平均粒径を有しうる。いくつかの局面において、クロマトグラフィーマトリックスは、例えばポリマー樹脂または金属酸化物または半金属酸化物であるか、それらを含みうる。いくつかの局面において、例えば平面クロマトグラフィーが使用される場合に、マトリックス材料は、平面クロマトグラフィーに好適な任意の材料、例えば従来のセルロースベースのまたは有機ポリマーベースのメンブレン（例えば紙製メンブレン、ニトロセルロースメンブレンまたはポリビニリデンジフルオライド（PVDF）メンブレン）またはシリカコートガラスプレートでありうる。一態様において、クロマトグラフィーマトリックス/固定相は、非磁性材料または非磁化可能材料である。

【0128】

いくつかの態様では、本方法において適切である非磁性または非磁化可能クロマトグラフィー固定相として、誘導シリカまたは架橋ゲルが挙げられる。いくつかの局面において、架橋ゲルは天然ポリマーに、例えば自然界に存在するポリマークラスに、基づきうる。例えばクロマトグラフィー固定相の基礎となりうる天然ポリマーは多糖である。場合により、それぞれの多糖は一般に架橋されている。多糖マトリックスの例としては、アガロースゲル（例えばSuperflow（商標）アガロースまたはSepharose（登録商標）材料、例えば様々なビーズ径および孔径で市販されているSuperflow（商標）Sepharose（登録商標））または架橋デキストランのゲルが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。さらなる具体例は、デキストランが共有結合されている粒状架橋アガロースマトリックスであり、これは、Sephadex（登録商標）またはSuperdex（登録商標）としてどちらもGE Healthcareから（様々なビーズ径および様々な孔径で）市販されている。そのようなクロ

10

20

30

40

50

マトグラフィー材料の別の具体例は、同様に様々なビーズ径および孔径でGE Healthcareから市販されているSephacryl（登録商標）である。

【0129】

いくつかの態様において、架橋ゲルは、合成ポリマー、例えば自然には存在しないポリマークラスにも基づく。いくつかの局面において、クロマトグラフィー固定相の基礎となるそのような合成ポリマーは、極性単量体単位を有し、それゆえにそれ自体が極性を示すポリマーである。したがって場合により、そのような極性ポリマーは親水性である。親水性分子は、疎油性とも呼ばれ、いくつかの局面では、水分子との双極子-双極子相互作用を形成することができる部分を含有する。一般には、親油性とも呼ばれる疎水性分子は、水からは離れようとする傾向を有する。

10

【0130】

一般に、クロマトグラフィー法は、流体クロマトグラフィー、典型的には、液体クロマトグラフィーである。いくつかの局面では、クロマトグラフィーは、細胞、例えば、標的細胞を含有する流体試料が、例えば、クロマトグラフィーマトリックスを含有するカラムの一端に重力流によってまたはポンプによって適用され、流体試料がカラムの他端からカラムを出る、フロースルーモードで行うことができる。加えて、クロマトグラフィーは、単離されるべき細胞を含有する流体試料が、例えば、ピペットチップ内に充填されたクロマトグラフィーマトリックスを含有するカラムの一端にピペットによって適用され、流体試料がクロマトグラフィーマトリックス/ピペットチップに入り、カラムの他端から出る、「アップ&ダウン」モードで行うことができる。あるいは、クロマトグラフィーはまた、クロマトグラフィー材料（固定相）を、細胞を含有する試料と、例えば、振盪、回転または反復接触下でインキュベートし、流体試料を例えばピペットを用いて除去する、バッチモードで行うこともできる。

20

【0131】

いくつかの局面では、本発明の文脈におけるクロマトグラフィーマトリックスとして、例えば細胞の選択などのクロマトグラフィー単離に適する限りはどんな材料を利用してもよい。特定の局面では、好適なクロマトグラフィー材料は、少なくとも無害または本質的に無害であり、例えば、細胞単離および/または細胞分離のための所望の条件下で充填クロマトグラフィーカラムにおいて使用されるとき、細胞生存率に有害ではない。いくつかの局面では、クロマトグラフィーマトリックスは、所定の場所に、典型的には所定の位置に留まっているが、分離されるべき試料およびその中に含まれる成分の場所は変化している。したがって、いくつかの局面では、クロマトグラフィーマトリックスは、「固定相」である。

30

【0132】

典型的には、それぞれのクロマトグラフィーマトリックスは、固相または半固相の形態を有するが、単離/分離されるべき標的細胞を含有する試料は流体相である。クロマトグラフィー分離を成し遂げるために使用される移動相は、同様に流体相である。クロマトグラフィーマトリックスは、粒子状材料（任意の好適なサイズおよび形状の）、または紙基材もしくはメンブレンを含むモノリシックなクロマトグラフィー材料であることができる。したがって、クロマトグラフィーは、カラムクロマトグラフィーと平面クロマトグラフィーの両方であることができる。標準的なクロマトグラフィーカラムに加えて、双方向フローを可能にするカラムまたはピペットチップを、ここに記載のようなカラムベース/フロースルーモードベースの細胞のクロマトグラフィー分離に使用することができる。いくつかの局面では、粒子状マトリックス材料が使用され、粒子状マトリックス材料は、例えば、約5 μm ～約200 μm 、または約5 μm ～約400 μm 、または約5 μm ～約600 μm の平均粒径を有し得る。いくつかの局面では、平面クロマトグラフィーが使用され、マトリックス材料は、慣用のセルロース系もしくは有機高分子系のメンブレン（例えば、紙メンブレン、ニトロセルロースメンブレンまたは二フッ化ポリビニリデン（PVDF）メンブレン）またはシリカ被覆ガラスプレートなどの平面クロマトグラフィーに適した任意の材料であり得る。

40

50

【0133】

いくつかの局面では、クロマトグラフィーマトリックス/固定相は、非磁性材料または非磁化可能材料である。そのような材料は、誘導体化シリカまたは架橋ゲルを含み得る。架橋ゲル（典型的にはビーズ形態で製造される）は、架橋多糖などの天然高分子系であり得る。好適な例は、アガロースゲルまたは架橋デキストランのゲルを含むが、それらに限定されない。架橋ゲルはまた、合成高分子系、すなわち、天然に存在しない高分子クラス系であり得る。通常、細胞分離のためのクロマトグラフィー固定相のベースとなるそのような合成高分子は、極性単量体単位を有する高分子であって、それゆえそれ自体極性である高分子である。

【0134】

好適な合成高分子の実例は、ポリアクリルアミド、スチレン-ジビニルベンゼンゲルおよびアクリラートとジオールまたはアクリルアミドとジオールの共重合体である。実例は、Fractogel（登録商標）として市販されているポリメタクリラートゲルである。さらなる例は、Toyopearl（登録商標）として市販されているエチレングリコールとメタクリラートの共重合体である。いくつかの態様では、クロマトグラフィー固定相はまた、天然および合成高分子成分、例えば、多糖とアガロースまたは多糖とN,N'-メチレンビスアクリルアミドの複合マトリックスまたは複合材料または共重合体、例えば、ポリアクリルアミド/アガロース複合材料を含み得る。デキストランとN,N'-メチレンビスアクリルアミドの共重合体の実例は、上述のSephacryl（登録商標）シリーズの材料である。誘導体化シリカは、合成高分子または天然高分子にカップリングされたシリカ粒子を含み得る。そのような態様の例は、多糖グラフトシリカ、ポリビニルピロリドングラフトシリカ、ポリエチレンオキシドグラフトシリカ、ポリ（2-ヒドロキシエチルアスパルトアミド）シリカおよびポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）グラフトシリカを含むが、それらに限定されない。

【0135】

本発明において利用されるクロマトグラフィーマトリックスは、いくつかの態様では、ゲル濾過（サイズ排除としても知られている）マトリックスである。ゲル濾過は、分離されるべき細胞との相互作用を少なくとも本質的に受けないように設計されるという特性を特徴とし得る。よって、ゲル濾過マトリックスは、本明細書において定義されているような細胞または他の生物学的実体の主にそれらのサイズに基づく分離を可能にする。それぞれのクロマトグラフィーマトリックスは、典型的には、上述したような粒子状多孔質材料である。クロマトグラフィーマトリックスは、ある特定の排除限界を有し得、その限界は、典型的には分子量に関して定義され、その分子量を超える分子は、細孔への侵入が完全に遮断される。サイズ排除限界を定義するそれぞれの分子量は、単離されるべき標的細胞（または生物学的実体）の重量に対応する重量を下回るように選択され得る。そのような態様では、標的細胞は、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの細孔への侵入が妨げられる。同様に、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスである固定相は、選択された標的細胞のサイズよりも小さいサイズである細孔を有し得る。例証的な態様では、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスおよび/またはゲル濾過マトリックスは、0～約500nmの平均細孔サイズを有する。

【0136】

試料中に存在する他の成分、例えば刺激物質および/または刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）は細孔の排除限界を下回るサイズを有しうる。そしてこれは、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの細孔に進入することができる。細孔容積に部分的にまたは完全に進入することができるそれらの成分のうち、細孔容積へのアクセスが少ない大きな分子が通常は最初に溶出し、一方、最も小さな分子は最後に溶出することになる。いくつかの態様において、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックスの排除限界は、標的細胞の最大幅を下回るように選択される。したがって、細孔容積にアクセスできる成分は、通常、標的細胞よりも長く、サイズ排除クロマトグラフィーマトリックス中/上に留まることになる。こうして標的細胞を、試料の他の物体/成分とは別に、クロマトグラフィーカラムの溶出液中に収集することができる。それゆえに、刺激試薬などの成分は、標的細胞より

も後の時点でゲルろ過マトリックスから溶出する。ゲル浸透マトリックスが、例えば試料中に存在する選択試薬および/または競合試薬などの試薬に結合することができる結合部位Zなどの結合部位を含む選択試薬を含む（通常はその上に共有結合されている）のであれば、この分離効果はさらに増大するだろう。選択物質および/または競合試薬は、アフィニティー試薬の結合部位Zによって結合され、これにより、ゲル浸透マトリックス上に固定化されるだろう。この方法は、通常は、除去カートリッジ（removal cartridge）で実行され、いくつかの態様において、本発明の方法、組合せおよびキットは、そのようなゲルろ過マトリックスを含みおよび/または使用する。したがって、それぞれの方法では、細胞はサイズに基づいて分離される。

【0137】

本発明において使用されるクロマトグラフィーマトリックスは、磁氣的に誘引可能な物体、例えば1つまたは複数の磁氣的に誘引可能な粒子または磁性流体も含みうる。それぞれの磁氣的に誘引可能な粒子は、クロマトグラフィーマトリックス上で標的細胞に結合して標的細胞を固定化する能力を有する結合部位（例えば選択物質）を持つ選択試薬を含みうる。磁氣的に誘引可能な粒子は反磁性、強磁性、常磁性または超常磁性材料を含有しうる。超常磁性材料は、磁場に応答して誘起磁場を生じるが、永久磁化が起こることはない。酸化鉄に基づく磁性粒子は、例えばDynabeads（登録商標）としてDynaL Biotechから、磁気MicroBeadsとしてMiltenyi Biotecから、磁気多孔性ガラスビーズとしてCPG Inc.から、さらにまた、実例の一部に過ぎないがRoche Applied Science、BIOCLON、BioSource International Inc.、micromod、AMBION、Merck、Bangs Laboratories、PolysciencesまたはNovagen Inc.などといった他の様々な供給源から、市販されている。超常磁性のCoおよびFeCoならびに強磁性のCoナノ結晶に基づく磁性ナノ粒子は、例えばHuetten, A. et al. (J. Biotech. (2004), 112, 47-63) に記載されている。ただしいくつかの態様では、本発明において使用されるクロマトグラフィーマトリックスは磁氣的に誘引可能な物体を何も含まない。

【0138】

選択物質

上述のように、一定の局面において、本明細書に提供される方法では選択物質を使用する。いくつかの態様において、セクションII-B記載の作用物質は、選択物質である。いくつかの態様において、選択物質は、細胞表面上の分子、例えば細胞表面分子に結合する。いくつかの例では、細胞表面分子が選択マーカーである。いくつかの態様において、選択物質は、試料中の細胞の1つまたは複数によって発現される選択マーカーに特異的に結合する能力を有する。いくつかの態様において、細胞表面分子または細胞表面受容体などの分子への特異的結合とは、本開示の全体を通して、作用物質がそのような分子にだけ結合することを必ずしも意味しない。例えば、ある分子に特異的に結合する作用物質は、例えばイムノアッセイ、BIAcore（登録商標）、KinExA3000機器（Sapidyne Instruments、アイダホ州ボイシ）または他のアッセイで決定した場合に、一般にはるかに低いアフィニティーで、他の分子にも結合しうる。場合により、標的分子に特異的結合条件下で結合する作用物質の能力は、そのアフィニティーまたはアビディティーが、十分な統計的サイズのランダムなペプチドまたはポリペプチドの収集物に対する同作用物質の平均アフィニティーまたはアビディティーの少なくとも5倍、例えば少なくとも10、20、30、40、50、100、250もしくは500倍、さらには少なくとも1000倍であるようなものである。

【0139】

いくつかの態様において、細胞、例えば標的細胞（例えばT細胞）は、選択されるべき細胞が、少なくとも1つの共通する特異的分子（例えば選択マーカー）の存在によって規定されるように、細胞表面に分子、例えば選択マーカーを有し、または発現する。いくつかの態様において、標的細胞を含有する試料は、その分子（例えば選択マーカー）を欠く余分な細胞も含有しうる。例えばいくつかの態様において、T細胞は、複数の細胞タイプ、例えば赤血球またはB細胞を含有する試料から、選択されうる。選択マーカーと受容体分子は、細胞表面分子を指す用語として、本明細書では相互可換的に使用されうる。

【0140】

いくつかの態様において、細胞表面上、例えば標的細胞表面上に位置する選択マーカー（例えば受容体分子）は、それが、本発明の方法におけるクロマトグラフィー分離プロセスの間、細胞表面への共有結合または非共有結合を保つ限り、任意の分子でありうる。選択マーカー（例えば受容体分子）は、選択物質の標的となりうる分子である。いくつかの態様において、選択マーカーはペプチドまたはタンパク質、例えば膜受容体タンパク質である。いくつかの態様において、選択マーカーは脂質、多糖または核酸である。タンパク質である選択マーカー（例えば受容体分子）は、表在性膜タンパク質または内在性膜タンパク質でありうる。これは、いくつかの態様では、膜をまたぐ1つまたは複数のドメインを有しうる。一定の態様において、選択マーカーは、免疫細胞の表面タンパク質、例えばCD3、CD4またはCD8である。いくつかの態様において、選択マーカーは、所望の細胞集団または細胞亜集団、例えば血液細胞の集団または亜集団、例えばリンパ球（例えばT細胞、CD4+T細胞またはCD8+T細胞）を規定する抗原でありうる。

10

【0141】

いくつかの局面において、細胞表面分子、例えば選択マーカーは、所望の細胞集団または細胞亜集団、例えば血液細胞の集団または亜集団、例えばリンパ球（例えばT細胞、Tヘルパー細胞、例えばCD3+T細胞、CD8 T細胞、CD4+Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞）、単球、または幹細胞、例えばCD34陽性末梢幹細胞またはNanogもしくはOct-4発現幹細胞を規定する抗原でありうる。いくつかの態様において、選択マーカーは、T細胞またはT細胞サブセットの表面上に発現するマーカー、例えばCD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RAおよび/またはCD45ROであることができる。T細胞の例としては、CMV特異的CD8+Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞および制御性T細胞（Treg）などの細胞が挙げられる。Tregの具体例としてはCD4 CD25 CD45RA Treg細胞が挙げられ、メモリーT細胞の具体例としてはCD62L CD8+特異的セントラルメモリーT細胞が挙げられる。

20

【0142】

上述のように、いくつかの態様において、選択物質は結合部位Bを有しまたは含有する。一定の態様において、結合部位Bは一価である。いくつかの局面において、一価結合部位Bは、一価抗体フラグメントまたは免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、アプタマーもしくはMHC分子であるか、またはそれを含有する。一価抗体フラグメントの例としては、Fabフラグメント、Fvフラグメント、および二価一本鎖Fvフラグメントを含む一本鎖Fvフラグメント（scFv）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。（組換え）抗体フラグメントの例は、Fabフラグメント、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント（scFv）、二価抗体フラグメント、例えば（Fab）₂ フラグメント、ダイアボディ、トリアボディ（Iliades, P., et al., FEBS Lett (1997) 409, 437-441）、デカボディ（Stone, E., et al., Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94）および他のドメイン抗体（Holt, L. J., et al., Trends Biotechnol. (2003) , 21, 11, 484-490）である。いくつかの態様において、選択物質の1つまたは複数の結合部位は、「デュオカリン（duocalin）」としても公知である二量体型リポカリンムテインなどの二価タンパク質性人工結合分子でありうる。いくつかの態様において、受容体結合試薬は単一の第2結合部位を有しうる。すなわちそれは一価でありうる。一価受容体結合試薬の例としては、一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子またはMHC分子が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

40

【0143】

好適なタンパク質性結合分子のさらなる例は、EGF様ドメイン、Krigleドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANDドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、Kunitz/ウシ膵臓トリプシン阻害剤ドメイン、テンダミスタット、カザール型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル（P型）ドメイン、ヴォン・ヴィレブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、チログロブリンI型リピート、LDL受容体クラスAドメイ

50

ン、スシドメイン、リンクドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリン様ドメイン（例えばドメイン抗体またはラクダ重鎖抗体）、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、ヴォン・ヴィレブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアダメイン、F5/8タイプCドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、「カップポディ」（Ill.et al.,Protein Eng（1997）10,949-57参照、いわゆる「ミニポディ」（Martin et al.,EMBO J（1994）13,5303-5309）、ダイアポディ（Holiger et al.,PNAS USA（1993）90,6444-6448参照）、いわゆる「Janusis」（Trautnecker et al.,EMBO J（1991）10,3655-3659またはTrautnecker et al.,Int J Cancer（1992）Suppl 7,51-52参照）、ナノポディ、マイクロポディ、アフィリン、アフィポディ、ノッチン、ユビキチン、ジンクフィンガータンパク質、自己蛍光タンパク質またはロイシンリッチリピートタンパク質である。抗体様機能を持つ核酸分子の一例はアプタマーである。アプタマーは明確な三次元モチーフにフォールディングして、所与の標的構造に対して高いアフィニティーを示す。

【0144】

特定局面において、選択物質は結合パートナーCを含有する。いくつかの局面において、選択物質中に含まれる結合パートナーCは、例えば炭化水素ベース（ポリマーを含む）であって、窒素基、リン基、イオウ基、カルベン基、ハロゲン基または擬ハロゲン基を含む。これは、アルコール、有機酸、無機酸、アミン、ホスフィン、チオール、ジスルフィド、アルカン、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、脂質、糖類、オリゴ糖または多糖であってもよい。さらなる一例として、これは、カチオン、アニオン、ポリカチオン、ポリアニオン、ポリカチオン、電解質、ポリ電解質、カーボンナノチューブまたはカーボンナノフォームであってもよい。一般に、そのような結合パートナーは選択試薬または多量体化試薬の結合部位に対して他の物体よりも高いアフィニティーを有する。それぞれの結合パートナーの例としては、クラウンエーテル、免疫グロブリン、そのフラグメントおよび抗体様機能を持つタンパク質性結合分子が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0145】

いくつかの態様において、選択物質中に含まれる結合パートナーCはビオチンを含み、選択試薬はビオチンに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。いくつかの態様において、選択物質中に含まれる結合パートナーCは、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、選択試薬は、それぞれのビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。いくつかの態様において、選択物質中に含まれる結合パートナーCはストレプトアビジン結合ペプチドまたはアビジン結合ペプチドを含み、選択試薬は、それぞれのストレプトアビジン結合ペプチドまたはアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。

【0146】

いくつかの態様において、選択物質中に含まれる結合パートナーはストレプトアビジン結合ペプチドを含む。いくつかの態様において、ペプチド配列は一般式がHis-Pro-Xaa（式中、Xaaはグルタミン、アスパラギンまたはメチオニンである）である配列を含有し、例えばSEQ ID NO:9に示される配列を含有する。いくつかの態様において、ペプチド配列は、SEQ ID NO:11に示される一般式、例えばSEQ ID NO:12に示される一般式を有する。ある例において、ペプチド配列はTrp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly（Strep-tag（登録商標）とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される）である。ある例において、ペプチド配列はTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys（Strep-tag（登録商標）IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される）であり、これは、例えば米国特許第6,103,493号に記載されており、Strep-Tactin（登録商標）という商標で市販されている。ストレプトアビジン結合ペプチドは、例えば、単一ペプチド、例えば米国特許第5,506,121号に記載の「Strep-tag（

10

20

30

40

50

登録商標)」であってもよいし、例えば国際公開公報WO 02/077018または米国特許第7,981,632号記載の2つ以上の個々の結合モジュールが連続的に配置されているストレプトアビジン結合ペプチドであってもよい。

【0147】

いくつかの態様において、選択物質の結合パートナーCは、当業者にはアフィニティータグとして公知である部分を含む。そのような態様において、選択試薬は、そのアフィニティータグに結合することが公知である対応結合パートナー、例えば抗体または抗体フラグメントを含む。公知のアフィニティータグの具体例をいくつか挙げると、選択物質中に含まれる結合パートナーは、ジニトロフェノールまたはジゴキシゲニン、オリゴヒスチジン、ポリヒスチジン、免疫グロブリンドメイン、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、キチン結合タンパク質 (CBP) またはチオレドキシン、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、FLAG[®]-ペプチド、HAタグ、VSV-Gタグ、HSVタグ、T7エピトープ、マルトース結合タンパク質 (MBP)、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dの配列のHSVエピトープ、配列の転写因子c-mycの「myc」エピトープ、V5タグまたはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を含む。そのような態様において、選択試薬の1つまたは複数の結合部位、この場合は抗体または抗体フラグメントと、抗原との間に形成される複合体は、遊離の抗原、すなわち遊離のペプチド (エピトープタグ) または遊離のタンパク質 (MBPまたはCBPなど) を加えることによって、競合的に破壊することができる。アフィニティータグはオリゴヌクレオチドタグであってもよい。そのようなオリゴヌクレオチドタグを使用することで、例えば、選択試薬に連結されたまたは選択試薬中に含まれる相補的配列を持つオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる。

【0148】

WO 2013/011011として公開された同時係属中の国際特許出願PCT/EP2012/063969 (その内容は全て、参照により、あらゆる目的で本明細書に組み入れられる) と合致して、選択物質と標的細胞上の選択マーカーの間の結合の強さは、選択物質を介した選択試薬への標的細胞の結合の可逆性にとって、それほど重要ではないだろう。むしろ、結合の強さとは無関係に、つまり、結合部位Bを介した選択物質と選択マーカーの間の結合に関する解離定数 (K_D) が、 K_D が例えば約 10^{-3} ~ 約 10^{-7} M の範囲にある低アフィニティのものであるか、 K_D が例えば約 10^{-7} ~ 約 1×10^{-10} M の範囲にある高アフィニティのものであるかに関わらず、結合部位Bを介した選択物質と受容体分子との結合の解離が十分に速く起こる限り、標的細胞は可逆的に染色されうる。この点に関して、結合部位Bを介した選択物質と選択物質の間の結合に関する解離速度定数 (k_{off}) は、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ またはそれ以上の値を有する (この解離速度定数は、選択物質の結合部位Bと標的細胞の表面上の選択マーカーとの間に形成される複合体の解離反応を特徴づける定数である)。選択物質の結合部位Bと標的細胞の表面上の選択マーカーとの間の会合反応に関する会合速度定数 (k_{on}) は、任意の値を有する。選択マーカーと選択物質の間の十分に可逆的な結合を保証するには、結合平衡の k_{off} 値が、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上、約 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上、例えば $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 以上もしくは $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 以上、または約 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 以上、 $1 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 以上もしくは $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 以上の値を有するように選択することが有利である。ここで、本明細書において使用される速度論的定数の値と熱力学的定数の値は、大気圧、すなわち1.013バールおよび室温、すなわち25°Cの条件を指すことに留意されたい。

【0149】

いくつかの態様において、選択物質は、選択マーカーに特異的に結合する能力を有する単一 (一価) の結合部位Bを有する。いくつかの態様において、選択物質は、選択マーカーに結合する能力を有する少なくとも2つ (すなわち3つ、4つ、または5つの同一結合部位Bを含む複数の結合部位) を有する。これらの態様のいずれかにおいて、結合部位B (のそれぞれ) を介した選択マーカーの結合は、約 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の k_{off} 値を有する。し

たがって選択物質は、一価（例えば一価抗体フラグメントまたは一価人工結合分子（タンパク質性その他）、例えばリポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン（「Anticalin（登録商標）」としても公知である）、または二価分子、例えば抗体もしくは両方の結合部位が保持されているフラグメント、例えばF(ab')₂フラグメントであることができる。いくつかの態様において、選択マーカーは、 k_{off} 速度が $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上であれば、五量体型IgE分子などの多価分子でありうる。

【0150】

本発明のいくつかの態様において、ここに記載する可逆的細胞アフィニティークロマトグラフィー技術による生物学的材料の（トレースレスな）単離を可能にするのは、分子レベルでは、少なくとも1つの結合部位Bを介した選択物質と標的細胞上の選択マーカーとの結合の（ $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 以上の） k_{off} 速度ではない。むしろ、そして例えば米国特許第7,776,562号または国際特許出願W002/054065に記載されているとおり、選択マーカーと選択物質の結合部位Bとの間の低アフィニティー結合が、固定化された選択試薬によって媒介されるアビディティー効果と相まって、標的細胞の可逆的かつトレースレスな単離を可能にする。これらの態様では、選択試薬の2つ以上の結合部位Zと少なくとも2つの選択物質の結合パートナーCとの間に複合体の形成が可能であり、アフィニティークロマトグラフィーマトリックスへの標的細胞の可逆的固定化を可能にする。上述のように、そのような低い結合アフィニティーは、結合部位Bを介した選択物質と標的細胞表面上の選択マーカーとの結合に関して、約 $1.0 \times 10^{-3} \text{M}$ ～約 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ の範囲の解離定数（ K_D ）を特徴としうる。

【0151】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD4であってよく、選択物質はCD4に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD4に特異的に結合する選択物質は、抗CD4抗体、抗CD4抗体の二価抗体フラグメント、抗CD4抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD4結合分子からなる群より選択されうる。いくつかの態様において、抗CD4抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えばCD4 Fabフラグメント）は、抗体13B8.2に由来するか、またはCD4に対する特異的結合を保持している13B8.2の機能的に活性な変異体に由来することができる。例えば、抗体13B8.2またはm13B8.2の例示的変異体は米国特許第7,482,000号、米国特許出願公開番号第2014/0295458号または国際特許出願W02013/124474およびBes,C,et al.J Biol Chem 278,14265-14273（2003）に記載されている。「m13B8.2」と呼ばれる変異体Fabフラグメントは、米国特許第7,482,000号に記載されているとおり、CD4結合性マウス抗体13B8.2の可変ドメインと、重鎖についてはガンマ型の定常ヒトCH1ドメインおよびカッパ型の定常ヒト軽鎖ドメインを含有する定常ドメインとを持つ。いくつかの態様において、抗CD4抗体、例えば抗体13B8.2の変異体は、それぞれKabatナンバリングで、可変軽鎖中のアミノ酸置換H91A、可変軽鎖中のアミノ酸置換Y92A、可変重鎖中のアミノ酸置換H35Aおよび/または可変重鎖中のアミノ酸置換R53Aを含有する。いくつかの局面では、m13B8.2中の13B8.2 Fabフラグメントの可変ドメインと比較して、軽鎖の91番目のHis残基（SEQ ID NO:30では93番目）をAlaに変異させ、重鎖の53番目のArg残基（SEQ ID NO:29では55番目）をAlaに変異させる。いくつかの態様において、抗CD4またはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているか、市販の試薬に由来する（例えばカタログ番号6-8000-206または6-8000-205または6-8002-100、IBA GmbH、ドイツ・ゲッティンゲン）。いくつかの態様において、選択物質は抗CD4 Fabフラグメントを含む。いくつかの態様において、抗CD4 Fabフラグメントは、SEQ ID NO:29で示される配列を有する可変重鎖とSEQ ID NO:30で示される配列を有する可変軽鎖とを含む。いくつかの態様において、抗CD4 Fabフラグメントは、SEQ ID NO:29で示される配列を有する可変重鎖のCDRと、SEQ ID NO:30で示される配列を有する可変軽鎖のCDRとを含む。

【0152】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD8であってよく、選択物質はCD8に特異的

に結合する。いくつかの局面において、CD8に特異的に結合する選択物質は、抗CD8抗体、抗CD8抗体の二価抗体フラグメント、抗CD8抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD8結合分子からなる群より選択されうる。いくつかの態様において、抗CD8抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えばCD8 Fabフラグメント）は、抗体OKT8（例えばATCC CRL-8014）に由来するか、またはCD8に対する特異的結合を保持しているその機能的に活性な変異体に由来することができる。いくつかの態様において、抗CD8またはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているか、市販の試薬に由来する（例えばカタログ番号6-8003または6-8000-201、IBA GmbH、ドイツ・ゲッティンゲン）。いくつかの態様において、選択物質は抗CD8 Fabフラグメントを含む。いくつかの態様において、抗CD8 Fabフラグメントは、SEQ ID NO:36で示される配列を有する可変重鎖とSEQ ID NO:37で示される配列を有する可変軽鎖とを含む。いくつかの態様において、抗CD8 Fabフラグメントは、SEQ ID NO:36で示される配列を有する可変重鎖のCDRと、SEQ ID NO:37で示される配列を有する可変軽鎖のCDRとを含む。

【0153】

いくつかの態様において、選択マーカーはCD3であってよく、選択物質はCD3に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD3に特異的に結合する選択物質は、抗CD3抗体、抗CD3抗体の二価抗体フラグメント、抗CD3抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD3結合分子からなる群より選択されうる。いくつかの態様において、抗CD3抗体、例えば二価抗体フラグメントまたは一価抗体フラグメント（例えばCD3 Fabフラグメント）は、抗体OKT3（例えばATCC CRL-8001;例えばStemberger et al.PLoS One.2012;7(4):e35798を参照されたい）に由来するか、またはCD3に対する特異的結合を保持しているその機能的に活性な変異体に由来することができる。いくつかの態様において、抗CD3またはそのフラグメントに可逆的に結合する試薬は、市販されているか、市販の試薬に由来する（例えばカタログ番号6-8000-201、6-8001-100、IBA GmbH、ドイツ・ゲッティンゲン）。いくつかの態様において、選択物質は抗CD3 Fabフラグメントを含む。いくつかの態様において、抗CD3 Fabフラグメントは、SEQ ID NO:31で示される配列を有する可変重鎖とSEQ ID NO:32で示される配列を有する可変軽鎖とを含む。いくつかの態様において、抗CD3 Fabフラグメントは、SEQ ID NO:31で示される配列を有する可変重鎖のCDRと、SEQ ID NO:32で示される配列を有する可変軽鎖のCDRとを含む。

【0154】

上記の例のいずれにおいても、二価抗体フラグメントは（Fab）2'フラグメントまたは二価一本鎖Fvフラグメントであってよく、一方、一価抗体フラグメントはFabフラグメント、Fvフラグメントおよび一本鎖Fvフラグメント（scFv）からなる群より選択されうる。上記の例のいずれにおいても、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキヤフォールドに基づくタンパク質、結晶スキヤフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーであってよい。

【0155】

C. オンカラム刺激

本明細書に提供される方法では、カラムクロマトグラフィー工程による細胞選択が刺激と一体化される。したがって一定の局面において、刺激は、選択工程の少なくとも一部分において、細胞がカラム上に（例えば選択物質によって）固定化されているときに、実施される。2つ以上のカラムが選択に使用されるいくつかの態様では、それぞれのカラムで刺激が実施される。2つ以上のカラムが選択に使用されるいくつかの態様では、カラムの総数より少ないカラムで刺激が実施される。2つ以上のカラムが選択に使用されるいくつかの態様では、少なくとも1つのカラムで刺激が実施される。並列選択が使用されるいくつかの態様では、それぞれのカラムで刺激が実施される。並列選択が使用されるいくつかの態様では、少なくとも1つのカラムで刺激が実施される。逐次的選択が使用されるいく

10

20

30

40

50

つかの態様では、それぞれのカラムで刺激が実施される。逐次的選択が使用されるいくつかの態様では、少なくとも1つのカラムで刺激が実施される。いくつかの態様において、刺激条件は、刺激または活性化する条件を含み、細胞、例えばCD3+、CD4+またはCD8+T細胞において刺激シグナル、例えばTCRおよび/または共刺激分子から生成するシグナルを送達することができる。いくつかの態様において、刺激条件は、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に固定化された標的細胞（例えばT細胞）を、刺激物質、例えば刺激シグナルを送達するか刺激シグナルを送達する能力を有し、これにより、選択された細胞を刺激する作用物質と共に、または刺激物質を含む刺激試薬、例えばオリゴマー刺激試薬と共に、インキュベートすることであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、刺激物質はTCRおよび/または共刺激分子に結合し、および/またはそれらを活性化する。特定態様において、刺激試薬は、例えばセクションI-C-1aに記載するとおり、本明細書に提供されるオリゴマー刺激試薬である。一定の態様において、細胞の集団を刺激条件下で刺激すると、選択され刺激された細胞の集団（本明細書では刺激された細胞集団ともいう）が生成または作製される。選択され刺激された細胞の集団を、本明細書では、刺激され選択された細胞のアウトプット集団という場合もある。場合により、選択され刺激された細胞の集団は、下流処理のための、例えばセクションI-E記載の遺伝子操作のための、インプット集団として役立つ。

【0156】

一定の態様において、試料の細胞は、本明細書の例えばセクションI-Eに記載する方法、工程または技法などによって、細胞中に異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを導入する前に、選択され、刺激される。いくつかの態様において、選択され刺激された細胞のアウトプット集団は、異種タンパク質または組換えタンパク質（例えばキメラ抗原受容体）を発現するように操作される。

【0157】

いくつかの態様において、刺激は、集団の細胞が初めて刺激されたとき、あるいは細胞を活性化もしくは刺激する条件および/または細胞におけるシグナル、例えばTCRおよび/または補助受容体もしくは共刺激分子から生成するシグナルを活性化もしくは刺激することができる条件に、集団の細胞が初めて曝露されたときに、開始されたと見なされる。いくつかの態様において、刺激は、刺激物質、または本明細書の例えばセクションI-C-1aおよび/またはセクションII-Aに記載の刺激物質を含有する刺激試薬、例えばセクションII-Aおよび/またはセクションI-C-1b記載の刺激試薬に、細胞を初めて接触させまたは曝露したときに開始される。特定局面において、刺激の開始（本明細書ではインキュベーションの開始ともいう）は、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に固定化された試料の標的細胞（例えばT細胞）を、刺激物質、または刺激物質を含有する刺激試薬（例えば下記セクションI-C-1b記載のオリゴマー刺激試薬）に、初めて接触させまたは曝露したときに起こる。いくつかの態様では、刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）または刺激物質の添加に先立ち、細胞を、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100または120分にわたって、カラムに浸透させる。いくつかの態様では、刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）または刺激物質の添加に先立って、カラムが少なくとも1（1、2、3、4、5）回洗浄される。いくつかの態様では、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）の添加に先立って、カラムが少なくとも2回洗浄される。

【0158】

いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）は、試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えてから15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分後、または約15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分後、または少なくとも15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分後に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）は、試料をクロマトグラフィーカラム（

10

20

30

40

50

例えば固定相)に加えてから30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分後、または約30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分後、または少なくとも30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100もしくは120分後に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をクロマトグラフィーカラム(例えば固定相)に加えてから30、35、40、45、50、55もしくは60分後、または約30、35、40、45、50、55もしくは60分後、または少なくとも30、35、40、45、50、55もしくは60分後に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約120分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約100分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約90分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約80分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約70分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約60分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約50分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約40分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約15～約30分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約30～約120分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約30～約100分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約30～約90分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約30～約80分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約30～約70分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約30～約60分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約30～約50分の間に加えられる。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)は、試料をカラムに加えた後、両端の値を含む約30～約40分の間に加えられる。いくつかの態様では、少なくとも1つの洗浄工程が、刺激物質または刺激物質を含む試薬(例えばオリゴマー刺激試薬)をカラムに加える前に実施される。

【0159】

いくつかの態様において、刺激、例えば固定化細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、1日、約1日、または1日未満にわたって実施される。いくつかの態様において、刺激、例えば固定化細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3もしくは2時間、または約24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、

10

20

30

40

50

10、9、8、7、6、5、4、3もしくは2時間、または24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3もしくは2時間未満にわたって実施される。いくつかの態様において、刺激、例えば選択された細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、2～24、3～24、4～24、5～24、6～24、7～24、8～24、9～24、10～24、11～24、12～24、13～24、14～24、15～24、16～24、17～24、18～24、19～24、20～24、21～24、22～24、23～24、2～23、2～22、2～21、2～20、2～19、2～18、2～17、2～16、2～15、2～14、2～13、2～12、2～11、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4もしくは2～3時間、または約2～24、3～24、4～24、5～24、6～24、7～24、8～24、9～24、10～24、11～24、12～24、13～24、14～24、15～24、16～24、17～24、18～24、19～24、20～24、21～24、22～24、23～24、2～23、2～22、2～21、2～20、2～19、2～18、2～17、2～16、2～15、2～14、2～13、2～12、2～11、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4もしくは2～3時間にわたって、実施される。いくつかの態様において、刺激、例えば固定化細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、24時間、約24時間、または24時間未満にわたって実施される。いくつかの態様において、刺激、例えば固定化細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、12時間、約12時間、または12時間未満にわたって実施される。いくつかの態様において、刺激、例えば固定化細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、5時間、約5時間、または5時間未満にわたって実施される。いくつかの態様において、刺激、例えば固定化細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、4.5時間、約4.5時間、または4.5時間未満にわたって実施される。いくつかの態様において、刺激、例えば固定化細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、4時間、約4時間、または4時間未満にわたって実施される。いくつかの態様において、刺激、例えば固定化細胞を刺激条件下でインキュベートする工程は、2時間、約2時間、または2時間未満にわたって実施される。

【0160】

特定態様では、試料から選択された 50×10^6 、 100×10^6 、 150×10^6 、 200×10^6 、 250×10^6 、 300×10^6 、 350×10^6 、 400×10^6 、 450×10^6 、 500×10^6 、 550×10^6 、 600×10^6 、 700×10^6 、 800×10^6 、 900×10^6 、 $1,000 \times 10^6$ 、 $1,250 \times 10^6$ 、 $1,500 \times 10^6$ 、 $1,750 \times 10^6$ 、 $2,000 \times 10^6$ 、 $2,250 \times 10^6$ 、 $2,500 \times 10^6$ 、 $2,750 \times 10^6$ 、 $3,000 \times 10^6$ 、 $3,250 \times 10^6$ 、 $3,500 \times 10^6$ 、 $3,750 \times 10^6$ 、 $4,000 \times 10^6$ 、 $4,250 \times 10^6$ 、 $4,500 \times 10^6$ 、 $4,750 \times 10^6$ もしくは $5,000 \times 10^6$ 個、約 50×10^6 、 100×10^6 、 150×10^6 、 200×10^6 、 250×10^6 、 300×10^6 、 350×10^6 、 400×10^6 、 450×10^6 、 500×10^6 、 550×10^6 、 600×10^6 、 700×10^6 、 800×10^6 、 900×10^6 、 $1,000 \times 10^6$ 、 $1,250 \times 10^6$ 、 $1,500 \times 10^6$ 、 $1,750 \times 10^6$ 、 $2,000 \times 10^6$ 、 $2,250 \times 10^6$ 、 $2,500 \times 10^6$ 、 $2,750 \times 10^6$ 、 $3,000 \times 10^6$ 、 $3,250 \times 10^6$ 、 $3,500 \times 10^6$ 、 $3,750 \times 10^6$ 、 $4,000 \times 10^6$ 、 $4,250 \times 10^6$ 、 $4,500 \times 10^6$ 、 $4,750 \times 10^6$ もしくは $5,000 \times 10^6$ 個、または少なくとも 50×10^6 、 100×10^6 、 150×10^6 、 200×10^6 、 250×10^6 、 300×10^6 、 350×10^6 、 400×10^6 、 450×10^6 、 500×10^6 、 550×10^6 、 600×10^6 、 700×10^6 、 800×10^6 、 900×10^6 、 $1,000 \times 10^6$ 、 $1,250 \times 10^6$ 、 $1,500 \times 10^6$ 、 $1,750 \times 10^6$ 、 $2,000 \times 10^6$ 、 $2,250 \times 10^6$ 、 $2,500 \times 10^6$ 、 $2,750 \times 10^6$ 、 $3,000 \times 10^6$ 、 $3,250 \times 10^6$ 、 $3,500 \times 10^6$ 、 $3,750 \times 10^6$ 、 $4,000 \times 10^6$ 、 $4,250 \times 10^6$ 、 $4,500 \times 10^6$ 、 $4,750 \times 10^6$ もしくは $5,000 \times 10^6$ 個の量の細胞、または前記のいずれかの間にある任意の数の細胞が、刺激（例えば刺激条件下でインキュベート）される。いくつかの態様において、選択された細胞は、単一の（例えばクロマトグラフィーマトリックスを含有する）カラム上に固定化される。例えば、試料からの選択された細胞の全量が単一のカラム上に固定化され、単一カラム上の固定化細胞が、刺激条件下でインキュベートされる。いくつかの態様では、選択された細胞が、2つの（例えばそれぞれがクロマトグラフィーマトリックスを含有する）カラム上に固定化される。例えば、試料からの選択された細胞の全量が、2つのカラム上に固定化され（例えば各カラム（例えばクロマトグラフィーマトリックス）が、その上に固定化される細胞の全量のうちの半分または約半分を含有する）、2つのカラム上の固定化細胞が刺激条件下でインキュベ

トされる。一定の態様では、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上の細胞、例えば選択された細胞（例えばT細胞）が、 0.01×10^6 細胞/mL、 0.1×10^6 細胞/mL、 0.5×10^6 細胞/mL、 1.0×10^6 細胞/mL、 1.5×10^6 細胞/mL、 2.0×10^6 細胞/mL、 2.5×10^6 細胞/mL、 3.0×10^6 細胞/mL、 4.0×10^6 細胞/mL、 5.0×10^6 細胞/mL、 10×10^6 細胞/mL、 50×10^6 細胞/mL、 75×10^6 細胞/mL、 100×10^6 細胞/mL、 125×10^6 細胞/mL、 150×10^6 細胞/mLもしくは 200×10^6 細胞/mL、または約 0.01×10^6 細胞/mL、 0.1×10^6 細胞/mL、 0.5×10^6 細胞/mL、 1.0×10^6 細胞/mL、 1.5×10^6 細胞/mL、 2.0×10^6 細胞/mL、 2.5×10^6 細胞/mL、 3.0×10^6 細胞/mL、 4.0×10^6 細胞/mL、 5.0×10^6 細胞/mL、 10×10^6 細胞/mL、 50×10^6 細胞/mL、 75×10^6 細胞/mL、 100×10^6 細胞/mL、 125×10^6 細胞/mL、 150×10^6 細胞/mLもしくは 200×10^6 細胞/mL、または少なくとも 0.01×10^6 細胞/mL、 0.1×10^6 細胞/mL、 0.5×10^6 細胞/mL、 1.0×10^6 細胞/mL、 1.5×10^6 細胞/mL、 2.0×10^6 細胞/mL、 2.5×10^6 細胞/mL、 3.0×10^6 細胞/mL、 4.0×10^6 細胞/mL、 5.0×10^6 細胞/mL、 10×10^6 細胞/mL、 50×10^6 細胞/mL、 75×10^6 細胞/mL、 100×10^6 細胞/mL、 125×10^6 細胞/mL、 150×10^6 細胞/mLもしくは 200×10^6 細胞/mLの密度で、刺激（例えば刺激物質の存在下などといった刺激条件下でインキュベート）される。一定の態様において、固定相上に固定化された細胞、例えば選択された細胞（例えばT細胞）は、1億±2500万細胞/mLまたは約1億±2500万細胞/mLの密度で、刺激され、または刺激に供され、例えば刺激物質の存在下などといった刺激条件下でインキュベートされる。一定の態様において、固定相上に固定化された細胞、例えば選択された細胞（例えばT細胞）は、 3.0×10^6 細胞/mL、約 3.0×10^6 細胞/mLまたは少なくとも 3.0×10^6 細胞/mLの密度で、刺激され、または刺激に供され、例えば刺激物質の存在下などといった刺激条件下でインキュベートされる。一定の態様において、選択される細胞は生存細胞である。

【0161】

いくつかの態様では、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬が、 1×10^6 細胞あたり、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3 μ g、または約0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3 μ g、または少なくとも0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3 μ gの濃度で、カラムに加えられる。いくつかの態様では、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬が、固定化細胞を含有するカラムに、 1×10^6 細胞あたり、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25 μ g、または約0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25 μ g、または少なくとも0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25 μ gの濃度で加えられる。いくつかの態様では、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬が、 1×10^6 細胞あたり1~2 μ gまたは約1~2 μ gの濃度で、カラムに加えられる。いくつかの態様において、刺激試薬はオリゴマー刺激試薬である。いくつかの態様では、オリゴマー刺激試薬が、固定化細胞を含有するカラムに、 1×10^6 細胞あたり1~2 μ gまたは約1~2 μ gの濃度で加えられる。いくつかの態様において、 5×10^8 のオリゴマー刺激試薬が、固定化細胞を含有するカラムに加えられる。刺激のために2つ以上のカラムが固定化細胞を含有する場合は、本明細書記載の濃度または量の刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）が、各カラムに加えられ、または適用される。

【0162】

いくつかの態様において、刺激のための条件は、特定の培地、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオンおよび/または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計された他の任意の作用物質のうちの1つまたは複数を含むことができる。いくつかの態様において、温度は37℃または約37℃である。いくつかの態様では、酸素含量および二酸化炭素含量がガス交換を使って管理される。

【0163】

特定の態様では、刺激条件は、細胞、例えば、試料の選択された細胞を、1つまたは複

数のサイトカインと共におよび/またはその存在下でインキュベートすることを含む。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、組換えサイトカインである。いくつかの態様では、1つまたは複数のサイトカインは、ヒト組換えサイトカインである。ある特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、選択された細胞（例えば、T細胞）によって発現されるおよび/または該細胞に内因性である受容体に結合するおよび/または結合可能である。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、サイトカインの4-アルファ-ヘリックスバンドルファミリーのメンバーであるかそれを含む。いくつかの態様では、サイトカインの4-アルファ-ヘリックスバンドルファミリーのメンバーは、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-7（IL-7）、インターロイキン-9（IL-9）、インターロイキン12（IL-12）、インターロイキン15（IL-15）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を含むが、それらに限定されない。いくつかの態様では、1つまたは複数のサイトカインは、IL-15であるかそれを含む。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、IL-7であるかそれを含む。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、IL-2であるかそれを含む。

【0164】

ある特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインの量または濃度は、国際単位（IU）を用いて測定および/または定量される。国際単位を使用して、ビタミン、ホルモン、サイトカイン、ワクチン、血液製剤および類似の生物活性物質を定量してもよい。いくつかの態様では、IUは、特定の重量および強度の国際参照標準、例えば、ヒトIL-2についてのWHO第1国際標準、86/504と比較することによる生物学的調製物の効力の測定単位であるかそれを含む。国際単位は、公開されておりかつ国際的な共同研究活動から得られた生物活性単位を報告するための唯一認められている標準化された方法である。特定の態様では、サイトカインの集団、試料または供給源についてのIUは、類似のWHO標準品を用いた製品比較試験によって得てもよい。例えば、いくつかの態様では、ヒト組換えIL-2、IL-7またはIL-15の集団、試料または供給源のIU/mgは、WHO標準IL-2製品（NIBSCコード：86/500）、WHO標準IL-17製品（NIBSCコード：90/530）およびWHO標準IL-15製品（NIBSCコード：95/554）とそれぞれ比較される。

【0165】

いくつかの態様では、IU/mg単位の生物活性は、（ng/ml単位のED50） $\cdot 1 \times 10^6$ に等しい。特定の態様では、組換えヒトIL-2またはIL-15のED50は、CTLL-2細胞による細胞増殖の半最大刺激（XTT切断）に必要な濃度に等しい。ある特定の態様では、組換えヒトIL-7のED50は、PHA活性化ヒト末梢血リンパ球の増殖のための半最大刺激に必要な濃度に等しい。IL-2についてのIUのアッセイおよび計算に関する詳細は、Wadhwa et al., Journal of Immunological Methods (2013), 379 (1-2): 1-7；およびGearing and Thorpe, Journal of Immunological Methods (1988), 114 (1-2): 3-9において考察されており；IL-15についてのIUのアッセイおよび計算に関する詳細は、Soman et al. Journal of Immunological Methods (2009) 348 (1-2): 83-94において考察されている。

【0166】

いくつかの態様では、細胞、例えば、試料の選択された細胞は、1IU/mL～1,000IU/mLの間、10IU/mL～50IU/mLの間、50IU/mL～100IU/mLの間、100IU/mL～200IU/mLの間、100IU/mL～500IU/mLの間、250IU/mL～500IU/mLの間、または500IU/mL～1,000IU/mLの間の濃度のサイトカイン、例えば、組換えヒトサイトカインの存在下で、刺激されるか刺激に供される。

【0167】

いくつかの態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、1IU/mL～500IU/mL、10IU/mL～250IU/mL、50IU/mL～200IU/mL、50IU/mL～150IU/mL、75IU/mL～125IU/mL、100IU/mL～200IU/mLまたは10IU/mL～100IU/mLの濃度の組換えIL-2、例えばヒト組換えIL-2の存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、8

10

20

30

40

50

0IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mLもしくは100IU/mL、または約50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mLもしくは100IU/mLの濃度の組換えIL-2の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、100IU/mLまたは約100IU/mLの組換えIL-2、例えばヒト組換えIL-2の存在下で、刺激され、または刺激に供される。

【0168】

いくつかの態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、100IU/mL～2,000IU/mL、500IU/mL～1,000IU/mL、100IU/mL～500IU/mL、500IU/mL～750IU/mL、750IU/mL～1,000IU/mLまたは550IU/mL～650IU/mLの濃度の組換えIL-7、例えばヒト組換えIL-7の存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞、例えばインプット細胞は、50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、750IU/mLもしくは1,000IU/mL、または約50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、750IU/mLもしくは1,000IU/mLの濃度のIL-7の存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、600IU/mLまたは約600IU/mLの組換えIL-7、例えばヒト組換えIL-7の存在下で、刺激され、または刺激に供される。

【0169】

いくつかの態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、1IU/mL～500IU/mL、10IU/mL～250IU/mL、50IU/mL～200IU/mL、50IU/mL～150IU/mL、75IU/mL～125IU/mL、100IU/mL～200IU/mLまたは10IU/mL～100IU/mLの濃度の組換えIL-15、例えばヒト組換えIL-15の存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞、例えばインプット集団の細胞は、50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mLもしくは200IU/mL、または約50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mLもしくは200IU/mLの濃度の組換えIL-15の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、100IU/mLまたは約100IU/mLの組換えIL-15、例えばヒト組換えIL-15の存在下で、刺激され、または刺激に供される。

【0170】

特定態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、IL-2、IL-7および/またはIL-15の存在下、刺激条件下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、IL-2、IL-7および/またはIL-15は組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15である。一定の態様において、IL-2、IL-7および/またはIL-15はヒトのIL-2、IL-7および/またはIL-15である。特定態様において、1つまたは複数のサイトカインはヒト組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15であるか、またはそれらを含む。一定の態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、組換えIL-2、IL-7およびIL-15の存在下、刺激条件下で、刺激され、または刺激に供される。一定の態様において、細胞は、100IU/mLまたは約100IU/mLの組換えIL-2、600IU/mLまたは約600IU/mLの組換えIL-7、および100IU/mLまたは約100IU/mLの組換えIL-15の存在下、刺激条件下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、刺激条件はグルタミンをさらに含む。

【0171】

条件は、特定の培地、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオンおよび/または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞を活性化するように設計された他の任意の作用物質のうちの1つまたは複数を含むことができる。

【0172】

いくつかの局面において、刺激は、Riddellらの米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al. (2012) J Immunother.,35 (9) :651-660、Terakura et al. (2012) Blood, 1:72-82および/またはWang et al. (2012) J Immunother.35 (9) :689-701に記載されている技法などの技法に従って実行される。

【0173】

いくつかの態様において、刺激は無血清培地中で実施される。いくつかの態様において、無血清培地は、規定細胞培養培地および/または既知組成細胞培養培地である。一定の態様において、無血清培地は、処理された、例えば阻害因子および/または成長因子を除去するためにろ過された、制限培養培地である。いくつかの態様において、無血清培地はタンパク質を含有する。一定の態様において、無血清培地は、血清アルブミン、加水分解物、成長因子、ホルモン、担体タンパク質、および/または接着因子を含有する。

【0174】

いくつかの態様において、刺激は、本明細書のセクションIIIまたはPCT/US2018/064627に記載の無血清培地中で実施される。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数のサプリメントが補足された基本培地（例えばOpTmizer（商標）T細胞拡大培養基本培地（ThermoFisher）を含む。いくつかの態様において、前記1つまたは複数のサプリメントは無血清である。いくつかの態様において、無血清培地は、細胞（例えばT細胞）の維持、拡大および/または活性化のために1つまたは複数の追加成分、例えば追加のサプリメント（例えばOpTmizer（商標）T細胞拡大培養サプリメント（ThermoFisher））によって提供されるものなどが補足された基本培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、血清代替サプリメント、例えば免疫細胞血清代替品、例えばThermoFisher、#A2596101、CTS（商標）免疫細胞血清代替品、またはSmith et al.Clin Transl Immunology.2015 Jan;4 (1) :e31に記載の免疫細胞血清代替品を、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、L-グルタミンなどの遊離型アミノ酸を、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、ジペプチド型のL-グルタミン（例えばL-アラニル-L-グルタミン）、例えばGlutamax（商標）（ThermoFisher）中のジペプチドを、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えば組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-7および/または組換えヒトIL-15を、さらに含む。

【0175】

いくつかの態様において、刺激、例えば刺激条件下でのインキュベーションは、室温（例えば23℃または約23℃）で実行される。いくつかの態様において、刺激、例えば刺激条件下でのインキュベーションは、37℃または約37℃で実行される。

【0176】

本明細書に提供される方法は、細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく、選択された細胞をクロマトグラフィーカラムから収集することまたは溶出させることを可能にする。いくつかの態様では、オンカラム刺激により、カラムからの、選択された細胞の脱離が達成される。いくつかの態様において、例えば刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬が、例えば直接的にも間接的にも、クロマトグラフィーカラムの固定相に結合していない場合、脱離した細胞は、刺激物質または刺激物質を含有する刺激試薬に結合したままでありうる。したがっていくつかの態様において、脱離した細胞は、カラムから脱離した後も、ならびに/または収集されおよび/もしくは溶出された場合も、刺激条件下に留まりうる。いくつかの態様において、刺激条件は、カラムからの取り出し（例えば収集または溶出）後、ある期間にわたって維持される。いくつかの態様において、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬の存在下での刺激の少なくとも一部分は、

10

20

30

40

50

国際公開番号W02016/073602に記載されているように、遠心分離チャンバの内部キャビティにおいて、例えば遠心回転下で実行される。

【0177】

いくつかの態様において、カラムからの細胞の収集または溶出後に実行される刺激は、一般に混和条件下で、例えば、一般的には比較的低い力または速度、例えば細胞をペレット化するのに使用されるものより小さい速度、例えば600rpm~1700rpmまたは約600rpm~1700rpm（例えば600rpm、1000rpmもしくは1500rpmもしくは1700rpm、または約600rpm、1000rpmもしくは1500rpmもしくは1700rpm、または少なくとも600rpm、1000rpmもしくは1500rpmもしくは1700rpm）の速度、例えば試料またはチャンバもしくは他の容器の壁におけるRCFが、約80g~100g（例えば80g、85g、90g、95gもしくは100g、または約80g、85g、90g、95gもしくは100g、または少なくとも80g、85g、90g、95gもしくは100g）である速度での、回転運動の下で実行される。いくつかの態様において、回転は、そのような低速での回転後に休止期間を設ける繰り返し間隔、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10秒にわたる回転および/または休止、例えばおよそ1または2秒間の回転とそれに続くおよそ5、6、7または8秒間の休止を使って実行される。いくつかの態様において、カラムからの細胞の収集または溶出後に実行される刺激は、混和条件下、例えば揺動（rocking）下で実行される。一定の態様において、刺激は、静的条件下、例えば遠心分離、振とう、回転、揺動または灌流、例えば培地の連続灌流または半連続灌流を伴わない条件下で、実施される。

【0178】

いくつかの態様では、溶出および/または収集された細胞、例えば刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬にまだ結合している細胞が、バッグまたはバイアルなどの容器に移され（例えば無菌条件下で移され）、インキュベーターに入れられる。特定態様において、インキュベーターは、16℃、24℃もしくは35℃、または約16℃、24℃もしくは35℃、または少なくとも16℃、24℃もしくは35℃に設定される。いくつかの態様において、インキュベーターは、37℃、約37℃、または37℃±2℃、±1℃、±0.5℃もしくは±0.1℃に設定される。特定態様において、静的条件下での刺激は、インキュベーターに入れた細胞培養バッグ中で実施される。いくつかの態様では、揺動条件下での刺激が、インキュベーターに入れた細胞培養バッグ中で実施される。いくつかの態様において、培養バッグは、単球が存在すればそれがバッグ表面に付着することを可能にするシングルウェブ（single-web）ポリオレフィンガス透過性フィルムで構成される。

【0179】

1. オンカラム刺激のための刺激物質および刺激試薬の使用

特定局面において、刺激条件には、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）上に固定化された標的細胞（例えばT細胞）を1つまたは複数の刺激物質と共にインキュベートすることが含まれる。いくつかの態様において、刺激物質は刺激試薬に含まれる。いくつかの態様において、刺激物質は、クロマトグラフィーカラムのクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に、直接的または間接的に結合される。いくつかの態様において、刺激物質は、クロマトグラフィーカラムのクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に、例えば、本明細書の例えばセクションII-Aおよび/もしくはセクションI-Bに記載の選択試薬、または本明細書の例えばセクションII-Aおよび/もしくはセクションI-C-1bに記載の刺激試薬を介して、間接的に結合される。いくつかの態様において、刺激物質は刺激試薬に含まれる。いくつかの態様において、刺激試薬はクロマトグラフィーカラムのクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に結合される。いくつかの態様において、刺激試薬は、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に共有結合される。いくつかの態様において、刺激物質は、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に非共有結合される。

【0180】

いくつかの態様において、刺激試薬は、固形支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁気粒子および/もしくはマトリックス（例えばクロマトグラフィーマトリックス）に結合も会合

もしていない。いくつかの態様において、刺激試薬は、フレキシブルであり、金属コアも磁気コアも含有せず、完全にもしくは主として有機多量体で構成され、かつ/もしくは剛直でない。いくつかの態様において、刺激試薬は可溶性である。いくつかの態様において、刺激試薬はオリゴマー刺激試薬である（例えばセクションI-C-1b参照）。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は可溶性である。

【0181】

一定の態様において、刺激の開始は、細胞を刺激物質と共にインキュベートするか、刺激物質と接触させたときに起こる。したがって、刺激物質が直接的または間接的に、例えば選択試薬または刺激試薬を介して、カラムのクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に結合されるいくつかの態様では、標的細胞を含む試料がカラムのクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に加えられたときに、刺激の開始が起こる。いくつかの態様において、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）と会合（例えば結合）していない刺激試薬に刺激物質が含まれる場合は、試料の標的細胞が固定化されている固定相に刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）が加えられたときに、刺激の開始が起こる。いくつかの態様において、刺激物質がクロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に直接的または間接的に結合しておらず、刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）に含まれてもいない場合は、クロマトグラフィーマトリックス（例えば固定相）に刺激物質が加えられたときに、刺激の開始が起こる。

【0182】

いくつかの態様において、刺激条件または刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）は、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含む。いくつかの態様において、前記1つまたは複数の刺激物質は、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化する能力を有する。いくつかの態様において、本明細書で企図される刺激物質としては、RNA、DNA、タンパク質（例えば酵素）、抗原、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、糖質、脂質、レクチン、または所望の標的に対してアフィニティーを持つ他の任意の生体分子を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、所望の標的はT細胞受容体および/またはT細胞受容体の成分である。一定の態様において、所望の標的はCD3である。一定の態様において、所望の標的はT細胞共刺激分子、例えばCD28、CD137（4-1-BB）、OX40またはICOSである。いくつかの態様において、刺激物質は抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えばFabである。

【0183】

いくつかの態様において、刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）は、細胞（例えばT細胞）上の以下の高分子のうちの1つまたは複数の結合する1つまたは複数の刺激物質を含有する:CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD27、CD28、CD29、CD31、CD44、CD45RA、CD45RO、CD54（ICAM-1）、CD127、MHCI、MHCII、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L（CD70）、4-1BB（CD137）、4-1BBL、CD30L、LIGHT、IL-2R、IL-12R、IL-1R、IL-15R;IFN-ガンマR、TNF-アルファR、IL-4R、IL-10R、CD18/CD11a（LFA-1）、CD62L（L-セレクチン）、CD29/CD49d（VLA-4）、Notchリガンド（例えばデルタ様1/4、Jagged 1/2など）、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7およびCXCR3またはそれらのフラグメント、これらの高分子またはそのフラグメントに対する対応するリガンドを含む。いくつかの態様において、刺激物質は、細胞（例えばT細胞）上の以下の高分子のうちの1つまたは複数の特異的に結合する:CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RAおよび/またはCD45RO。

【0184】

いくつかの態様において、刺激物質は、T細胞受容体の1つまたは複数の成分に結合しおよび/またはそれらを認識する抗体である。特定態様において、刺激物質は抗CD3抗体である。一定の態様において、刺激物質は、共刺激分子に結合しおよび/または共刺激分子を認識する抗体である。一定の態様において、刺激物質は抗CD28抗体である。いくつかの態様において、刺激試薬は抗CD28抗体および抗CD3抗体（例えば刺激物質）を含む。いく

10

20

30

40

50

つかの態様において、刺激試薬は1つまたは複数の刺激物質を含む。いくつかの態様において、刺激試薬は第1刺激物質および第2刺激物質を含む。いくつかの態様において、第1刺激物質は抗CD3抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えば本明細書記載のものであり、第2刺激物質は抗CD28抗体またはその抗原結合性フラグメント、例えば本明細書に記載のものである。いくつかの態様において、第1刺激物質は抗CD3 Fab、例えば本明細書に記載するものであり、第2刺激物質は抗CD28 Fab、例えば本明細書に記載のものである。

【0185】

いくつかの態様において、例えば刺激物質が刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）にも選択試薬にも結合していない場合、刺激物質は抗体、二価抗体フラグメント、F(ab)₂または二価一本鎖Fvフラグメントである。いくつかの態様では、細胞を刺激するためにPMA/イオノマイシンを使用する。

【0186】

いくつかの態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、刺激物質対細胞の比率が3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1もしくは0.2:1または約3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1もしくは0.2:1である状態で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、刺激物質対細胞の比率は、2.5:1~0.2:1、2:1~0.5:1、1.5:1~0.75:1、1.25:1~0.8:1、1.1:1~0.9:1である。特定態様において、刺激物質対細胞の比率は約1:1であるか、1:1である。特定態様において、刺激試薬対細胞の比率は約0.3:1であるか、0.3:1である。特定態様において、刺激試薬対細胞の比率は約0.2:1であるか、0.2:1である。

【0187】

いくつかの態様において、細胞は、10⁶細胞あたり0.01 μg、0.02 μg、0.03 μg、0.04 μg、0.05 μg、0.1 μg、0.2 μg、0.3 μg、0.4 μg、0.5 μg、0.75 μg、1 μg、1.2 μg、1.4 μg、1.6 μg、1.8 μg、2 μg、3 μg、4 μg、5 μg、6 μg、7 μg、8 μg、9 μgもしくは10 μg、または約0.01 μg、0.02 μg、0.03 μg、0.04 μg、0.05 μg、0.1 μg、0.2 μg、0.3 μg、0.4 μg、0.5 μg、0.75 μg、1 μg、1.2 μg、1.4 μg、1.6 μg、1.8 μg、2 μg、3 μg、4 μg、5 μg、6 μg、7 μg、8 μg、9 μgもしくは10 μgの刺激試薬の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞は、10⁶細胞あたり4 μgまたは約4 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり3 μgまたは約3 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり2.5 μgまたは約2.5 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり2 μgまたは約2 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり1.8 μgまたは約1.8 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり1.6 μgまたは約1.6 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり1.4 μgまたは約1.4 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり1.2 μgまたは約1.2 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり1 μgまたは約1 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、10⁶細胞あたり0.8 μgまたは約0.8 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。種々の態様において、細胞は、10⁶細胞あたり0.8 μgまたは約0.8 μgの存在下で、刺激され、または刺激に供される。

【0188】

a. 刺激物質

上述のように、一定の局面において、本明細書に提供される方法では刺激物質を使用す

る。いくつかの態様において、セクションII-B記載の作用物質は、刺激物質である。いくつかの態様において、刺激物質は細胞の表面上の分子に結合し、刺激物質とその分子の結合は、細胞における刺激シグナルを誘導し、送達または調整することができる。いくつかの例では、細胞表面分子（例えば受容体）がシグナル伝達分子である。いくつかのそのような例において、刺激物質は、1つまたは複数の標的細胞（例えばT細胞）によって発現されたシグナル伝達分子に特異的に結合する能力を有する。いくつかの例において、刺激物質は、受容体などの細胞表面分子に結合したときに細胞（例えばT細胞）において刺激シグナルを誘導または送達する能力を有する任意の作用物質である。いくつかの態様において、刺激シグナルは免疫賦活性であることができ、その場合、刺激物質は、細胞（例えばT細胞）による免疫応答に關与するシグナルまたは細胞（例えばT細胞）による免疫応答を刺激するシグナルを誘導、送達または調整する能力を有し、例えば免疫細胞の増殖もしくは拡大、免疫細胞活性化、免疫細胞分化、サイトカイン分泌、細胞傷害活性または免疫細胞の他の1つもしくは複数の機能的活性を増加させる。いくつかの態様において、刺激シグナルは抑制性であることができ、その場合、刺激物質は、細胞（例えばT細胞）において、免疫応答に關与または免疫応答を抑制する刺激シグナルを誘導、送達または調整する能力を有し、例えば免疫細胞の増殖もしくは拡大、免疫細胞活性化、免疫細胞分化、サイトカイン分泌、細胞傷害活性または免疫細胞の他の1つもしくは複数の機能的活性を抑制または減少させる。

【0189】

いくつかの態様において、刺激物質は第1刺激物質である。いくつかの態様において、第1刺激物質は、試料の選択された細胞の表面にある受容体分子に結合する。したがって場合により、第1刺激物質は刺激シグナルを送達し、誘導または調整する。いくつかの局面において、第1刺激物質による刺激シグナルの送達、誘導または調整は、細胞の刺激をもたらす。したがって場合により、第1刺激物質は刺激シグナルを送達し、または細胞に一次活性化シグナルを提供し、これにより、細胞を刺激および/または活性化する。いくつかの態様において、第1刺激物質はさらに、選択マーカーのダウンレギュレーションを誘導する。本明細書にいうダウンレギュレーションは、以前の時点と比べた場合の選択マーカーの発現、例えば細胞表面発現の低減を包含しうる。

【0190】

いくつかの態様において、標的細胞（例えばT細胞）はTCR/CD3複合体と、CD28などの共刺激分子とを含む。この場合、第1刺激物質はTCR/CD3複合体に結合し、これにより、T細胞において刺激シグナル（例えば一次シグナル、例えば一次活性化シグナル）を送達し、第2刺激物質は共刺激CD28分子に結合する。特定局面において、第1刺激物質および/または第2刺激物質はさらに、選択マーカー（例えば標的細胞（例えばT細胞）を固定化するために使用された選択マーカー）のダウンレギュレーションを誘導する。

【0191】

いくつかの態様において、第1刺激物質は、細胞、例えばT細胞においてTCR/CD3複合体関連刺激シグナル（例えば一次シグナル）を送達する。いくつかの態様において、第1刺激物質は、免疫受容体チロシン活性化モチーフ、すなわちITAMを含有する分子に特異的に結合する。いくつかの局面において、第1刺激物質はCD3に特異的に結合する。場合により、CD3に特異的に結合する第1刺激物質は、抗CD3抗体、抗CD3抗体の二価抗体フラグメント、抗CD3抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD3結合分子からなる群より選択されうる。二価抗体フラグメントはF(ab')₂-フラグメントまたは二価一本鎖Fvフラグメントであってよく、一方、一価抗体フラグメントはFabフラグメント、Fvフラグメントおよび一本鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択されうる。場合により、抗体様結合特性を持つタンパク質性CD3結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質、結晶スキャフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンまたはアビマーであってよい。

【0192】

いくつかの態様において、抗CD3 Fabフラグメントは、ハイブリドーマ細胞株OKT3（ATCC（登録商標）CRL-8001（商標）、米国特許第4,361,549号も参照されたい）によって生産されるCD3結合性モノクローナル抗体に由来することができる。抗CD3抗体OKT3の重鎖の可変ドメインおよび軽鎖の可変ドメインは、Arakawa et al J.Biochem.120,657-662（1996）に記載されており、それぞれSEQ ID NO:31および32に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗CD3 Fabは、それぞれSEQ ID NO:31および32に示される可変重鎖および可変軽鎖のCDRを含む。

【0193】

いくつかの態様において、刺激物質は第2刺激物質である。いくつかの態様において、第2刺激物質は、細胞表面上の分子、例えば細胞表面分子、例えば受容体分子に結合する。いくつかの態様において、第2刺激物質は、第1刺激物質によって結合された分子を介して送達される刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する。いくつかの態様において、第2刺激物質は、刺激シグナル、例えば第二または付加的刺激シグナルを送達し、誘導または調整する。いくつかの局面において、第2刺激物質は、第1刺激物質によって誘導される刺激シグナルを増強または強化する。いくつかの態様において、第2刺激物質は、アクセサリー分子に結合し、および/または補助刺激シグナルもしくは二次刺激シグナルを刺激もしくは誘導することができる。いくつかの局面において、第2刺激物質は共刺激分子に結合し、および/または共刺激シグナルを提供する。

【0194】

いくつかの態様において、第2刺激物質であることができる刺激物質は、共刺激分子、アクセサリー分子、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、免疫チェックポイント分子、またはTNFファミリーもしくはTNF受容体ファミリーのメンバーであることができる第2分子に結合、例えば特異的に結合する。

【0195】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子はCD28であってよく、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はCD28に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD28に特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗CD28抗体、抗CD28抗体の二価抗体フラグメント、抗CD28抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD28結合分子からなる群より選択されうる。二価抗体フラグメントはF(ab')₂-フラグメントまたは二価一本鎖Fvフラグメントであってよく、一方、一価抗体フラグメントはFabフラグメント、Fvフラグメントおよび一本鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択されうる。抗体様結合特性を持つタンパク質性CD28結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキヤフォールドに基づくタンパク質、結晶スキヤフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーであってよい。

【0196】

いくつかの態様において、抗CD28 Fabフラグメントは、抗体CD28.3（GenBankアクセッション番号AF451974.1に合成一本鎖Fvコンストラクトとして寄託されている;Vanhove et al,BLOOD,15 July 2003,Vol.102,No.2,pages 564-570も参照されたい）に由来することができ、その可変重鎖および可変軽鎖はそれぞれSEQ ID NO:33および34を含む。いくつかの態様において、抗CD28 Fabは、それぞれSEQ ID NO:33および34に示される可変重鎖および可変軽鎖のCDRを含む。

【0197】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子はCD90であり、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はCD90に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD90に特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗CD90抗体、抗CD90抗体の二価抗体フラグメント、抗CD90抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD90結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。例えば抗CD90抗体G7（Biolegend、カタログ番号105201

10

20

30

40

50

)を参照されたい。

【0198】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子はCD95であり、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はCD95に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD95に特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗CD95抗体、抗CD95抗体の二価抗体フラグメント、抗CD95抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD95結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。例えばいくつかの局面において、抗CD95抗体はモノクローナルマウス抗ヒトCD95 CH11（Upstate Biotechnology、ニューヨーク州レイクブラッド）であるか、抗CD95 mAb 7C11または抗APO-1、例えばPaulsen et al. *Cell Death & Differentiation* 18.4 (2011):619-631記載のものであることができる。

10

【0199】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞またはB細胞上の分子はCD137であってよく、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はCD137に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD137に特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗CD137抗体、抗CD137抗体の二価抗体フラグメント、抗CD137抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD137結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。例えば抗CD137抗体は、Taraban et al. *Eur J Immunol.* 2002 Dec;32 (12):3617-27記載のLOB12、IgG2aまたはLOB12.3、IgG1であることができる。例えばUS6569997、US6303121、Mittler et al. *Immunol Res.* 2004;29 (1-3):197-208も参照されたい。

20

【0200】

いくつかの態様において、細胞、例えばB細胞上の分子はCD40であってよく、刺激物質、例えば刺激物質（例えばこれは第2刺激物質、例えば第2刺激物質であることができる）はCD40に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD40に特異的に結合する刺激物質（これは第2刺激物質、例えば第2刺激物質であることができる）は、抗CD40抗体、抗CD40抗体の二価抗体フラグメント、抗CD40抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD40結合分子からなる群より選択されうる。

30

【0201】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子はCD40L（CD154）であってよく、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はCD40Lに特異的に結合する。いくつかの局面において、CD40Lに特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗CD40L抗体、抗CD40L抗体の二価抗体フラグメント、抗CD40L抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD40L結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。例えば抗CD40L抗体は、いくつかの局面において、Blair et al. *JEM* vol.191 no.4 651-660記載のHu5C8であることができる。例えばWO1999061065、US20010026932、US7547438、WO2001056603も参照されたい。

40

【0202】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は誘導性T細胞共刺激分子（ICOS）であってよく、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はICOSに特異的に結合する。いくつかの局面において、ICOSに特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗ICOS抗体、抗ICOS抗体の二価抗体フラグメント、抗ICOS抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性ICOS結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。例えばUS20080279851およびDeng et al. *Hybrid Hybridomics.* 2004 Jun;23 (3):176-82を参照されたい。

50

【0203】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、T細胞活性化リンカー（Linker for Activation of T cells: LAT）であってよく、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はLATに特異的に結合する。いくつかの局面において、LATに特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗LAT抗体、抗LAT抗体の二価抗体フラグメント、抗LAT抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性LAT結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。

【0204】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子はCD27であってよく、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はCD27に特異的に結合する。いくつかの局面において、CD27に特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗CD27抗体、抗CD27抗体の二価抗体フラグメント、抗CD27抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性CD27結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。例えばWO2008051424参照。

10

【0205】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子はOX40であってよく、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はOX40に特異的に結合する。いくつかの局面において、OX40に特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗OX40抗体、抗OX40抗体の二価抗体フラグメント、抗OX40抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性OX40結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。例えばWO2013038191、Melero et al. Clin Cancer Res. 2013 Mar 1; 19 (5) :1044-53を参照されたい。

20

【0206】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞上の分子は、HVEMであってよく、刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）はHVEMに特異的に結合する。いくつかの局面において、HVEMに特異的に結合する刺激物質（例えばこれは第2刺激物質であることができる）は、抗HVEM抗体、抗HVEM抗体の二価抗体フラグメント、抗HVEM抗体の一価抗体フラグメントおよび抗体様結合特性を持つタンパク質性HVEM結合分子からなる群より選択されうる。抗体または抗原結合性フラグメントは、当技術分野にて公知である任意のものに由来することができる。例えばWO2006054961、WO2007001459、Park et al. Cancer Immunol Immunother. 2012 Feb; 61 (2) :203-14を参照されたい。

30

【0207】

上記の例のいずれにおいても、二価抗体フラグメントは（Fab）₂ フラグメントまたは二価一本鎖Fvフラグメントであってよく、一方、一価抗体フラグメントはFabフラグメント、Fvフラグメントおよび一本鎖Fvフラグメント（scFv）からなる群より選択されうる。上記の例のいずれにおいても、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子は、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質、結晶スキャフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーであってよい。

40

【0208】

いくつかの局面において、刺激物質は、標的細胞の表面上に発現した分子を特異的に標的とし、ここで、分子はTCR、キメラ抗原受容体、または免疫受容体チロシン活性化モチーフ、すなわちITAMを含む分子である。例えば標的細胞の表面上に発現する分子は、T細胞もしくはB細胞抗原受容体複合体、CD3鎖、CD3ゼータ、T細胞受容体もしくはB細胞受容体の抗原結合部分、またはキメラ抗原受容体から選択される。場合により、刺激物質はペプチド:MHCクラスI複合体を標的とする。

50

【0209】

いくつかの態様において、刺激物質は、標的細胞の表面上に発現した分子のHisタグ付きの細胞外ドメインに結合する。場合により、刺激物質は、ニッケルを負荷したトリスNTA (His-STREPPERまたはHis/Strep-tag (登録商標) IIアダプターともいう) とコンジュゲートされたペプチド配列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (Strep-tag (登録商標) IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される) を含有する。いくつかの態様において、Hisタグが付加された標的細胞の表面上に発現した分子はCD19である。

【0210】

いくつかの態様において、刺激物質は、組換え受容体、例えばCARの抗体部分に特異的に結合する。場合により、組換え受容体の抗体部分は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分、例えばヒンジ領域、例えばIgG4ヒンジ領域ならびに/またはCH1/CLおよび/もしくはFc領域を含む。いくつかの態様において、定常領域または定常部分は、ヒトIgG、例えばIgG4またはIgG1のものである。場合により、試薬にはIgG4スペーサを認識するαIgGが装填される。

【0211】

いくつかの態様において、所望の標的はT細胞受容体および/またはT細胞受容体の成分である。一定の態様において、所望の標的はCD3である。一定の態様において、所望の標的はT細胞共刺激分子、例えばCD28、CD137 (4-1-BB)、OX40またはICOSである。

【0212】

いくつかの態様において、例えば刺激物質が刺激試薬 (例えばオリゴマー刺激試薬) にも選択試薬にも結合していない場合、刺激物質は抗体、二価抗体フラグメント、F(ab)₂または二価一本鎖Fvフラグメントである。いくつかの態様において、刺激物質が試薬に結合していない場合、刺激物質は結合パートナーCを含まない。

【0213】

b. オリゴマー刺激試薬

上で示唆したとおり、特定態様において、刺激試薬は、1つまたは複数の刺激物質にコンジュゲートされ、連結されまたは取り付けられたオリゴマー刺激試薬、例えばストレプトアビジンムテイン試薬を含有する。上述のように、いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質には、オリゴマー刺激試薬の特定結合部位 (例えば結合部位Z) に結合する能力を有する結合ドメインまたは結合パートナー (例えば結合パートナーC) が取り付けられている。いくつかの態様では、複数の刺激物質がオリゴマー刺激試薬に可逆的に結合される。種々の態様において、オリゴマー刺激試薬は複数の特定結合部位Zを有し、それらが、一定の態様では、複数の刺激物質の結合ドメイン (例えば結合パートナーC) に可逆的に結合される。いくつかの態様において、結合される作用物質の量は、競合剤、例えば同じく当該結合部位 (例えば結合部位Z) に結合する能力を有する作用物質の存在下では低減または減少する。

【0214】

いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、少なくとも1つの刺激物質 (例えばT細胞などの細胞においてシグナルを生じさせる能力を有する刺激物質) がオリゴマー刺激試薬と会合する、例えば可逆的に会合する、可逆系であるか、そのような可逆系を含む。オリゴマー刺激試薬の非限定的な例は、例えば国際公開されたPCT出願WO 2018/197949に見いだすことができ、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。いくつかの態様において、試薬は、刺激物質に結合する能力、例えば可逆的に結合する能力を有する複数の結合部位を含有する。場合により、試薬は、T細胞などの細胞においてシグナル (例えば刺激シグナル) を生じさせる能力を有する作用物質が少なくとも1つは取り付けられているオリゴマー刺激試薬である。いくつかの態様において、刺激物質は、ある分子 (例えば細胞表面分子または受容体) のエピトープまたは一領域に特異的に結合することができる少なくとも1つの結合部位、例えば結合部位Bを含有し、オリゴマー刺激試薬の少なくとも1つの結合部位、例えば試薬の結合部位Zに特異的に結合する結合パートナー (本明細書では結合パートナーCともいう) も含有する。いくつかの態様において、

10

20

30

40

50

結合パートナーCと少なくとも1つの結合部位Zとの間の結合相互作用は、非共有結合相互作用である。場合により、結合パートナーCと少なくとも1つの結合部位Zとの間の結合相互作用は、共有結合相互作用である。いくつかの態様において、結合パートナーCと少なくとも1つの結合部位Zとの間の、非共有結合相互作用などの結合相互作用は、可逆的である。

【0215】

そのような可逆系においてオリゴマー刺激試薬として使用されうる物質は公知である。例えば米国特許第5,168,049号、同第5,506,121号、同第6,103,493号、同第7,776,562号、同第7,981,632号、同第8,298,782号、同第8,735,540号、同第9,023,604号ならびに国際公開されたPCT出願W02013/124474およびW02014/076277を参照されたい。可逆的相互作用を形成する能力を有する試薬と結合パートナーの非限定的な例、ならびにそのような結合を反転させる能力を有する物質（例えば競合剤）は後述する。

【0216】

いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、ストレプトアビジン類似体、アビジン、アビジンムテイン、もしくはアビジン類似体（例えばニュートラアビジン）のオリゴマーまたはそれらの混合物であり、この場合、そのようなオリゴマー刺激試薬は、刺激物質の結合ドメイン（例えば結合パートナーC）との可逆的会合のために、1つまたは複数の結合部位を含有する。いくつかの態様において、刺激物質の結合ドメインは、ビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、もしくはストレプトアビジン結合ペプチドであるか、またはストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、ストレプトアビジン類似体、アビジン、アビジンムテインもしくはアビジン類似体に特異的に結合することができる他の分子であることができる。

【0217】

一定の態様において、1つまたは複数の刺激物質（例えばT細胞などの細胞においてシグナルを生じさせる能力を有する作用物質、例えば上記セクションI-C-1a記載のもの）は、オリゴマー刺激試薬と、例えばオリゴマー刺激試薬上に存在する複数の特定結合部位（例えば結合部位Z）を介して、会合（例えば可逆的に結合）する。場合によっては、これにより、刺激物質が互いに密に配置されて、刺激物質によって結合されるまたは刺激物質によって認識される（少なくとも2コピーの）細胞表面分子を有する標的細胞を作用物質と接触させた場合に、アビディティー効果が生じうようになる。

【0218】

いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、ストレプトアビジンオリゴマー、ストレプトアビジンムテインオリゴマー、ストレプトアビジン類似体オリゴマー、アビジンオリゴマー、アビジンムテインもしくはアビジン類似体（例えばニュートラアビジン）で構成されるオリゴマー、またはそれらの混合物である。特定態様において、オリゴマー刺激試薬は、刺激物質の結合ドメイン（例えば結合パートナーC）に結合する能力を有する特定結合部位を含有する。いくつかの態様において、結合ドメインは、ビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、もしくはストレプトアビジン結合ペプチドであるか、またはストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、ストレプトアビジン類似体、アビジン、アビジンムテインもしくはアビジン類似体に特異的に結合することができる他の分子であることができる。オリゴマー刺激試薬系に含まれると想定されるストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、ストレプトアビジン類似体、アビジン、アビジンムテインもしくはアビジン類似体（例えばニュートラアビジン）、およびアビジン結合ドメイン分子、例えばビオチン、ビオチン誘導体、ビオチン類似体、もしくはストレプトアビジン結合ペプチド、またはストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、ストレプトアビジン類似体、アビジン、アビジンムテインもしくはアビジン類似体に特異的に結合することができる他の分子の例は、下記セクションII-Aに記載する。さらに、本明細書に提供される方法では、オリゴマー刺激試薬が、オリゴヒスチジンアフィニティータグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、カルモジュリンもしくはその類似体、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、FLAG-ペプチド、HAタグ、マルトース結合タンパク質（MBP）、HS

Vエпитープ、mycエピトープ、および/またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する分子を含みうると考えられる（セクションII-A参照）。

【0219】

特定態様において、本明細書では、複数のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体で構成されるおよび/または複数のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含有するオリゴマー刺激試薬が提供される。一定の態様において、本明細書に提供されるオリゴマー刺激試薬は、1つもしくは複数の刺激物質に可逆的に結合するまたは1つもしくは複数の刺激物質に可逆的に結合する能力を有する複数の結合部位を含有する。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、両端の値を含む70nm~125nmの半径、例えば平均半径、両端の値を含む 1×10^7 g/mol~ 1×10^9 g/molの分子量、および/または両端の値を含む1,000~5,000のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を有する。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、1つまたは複数の刺激物質、例えば細胞の表面上の分子（例えば受容体）に結合する作用物質に結合（例えば可逆的に結合）される。一定の態様において、1つまたは複数の刺激物質は、本明細書の例えばセクションI-C-1aに記載する作用物質である。いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質は一価結合部位（例えば結合部位B）を含有する。いくつかの態様において、一価結合部位はCD3に結合する。いくつかの態様において、一価結合部位は共刺激分子、例えば本明細書に記載するものに結合する。いくつかの態様において、一価結合部位はCD28に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数の刺激物質は、CD3および/またはCD28に結合する能力を有する一価結合部位を含有する。いくつかの態様において、刺激物質は、抗CD3抗体および/もしくは抗CD28抗体またはそれらの抗原結合性フラグメント、例えば結合パートナーC、例えばストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep-tag（登録商標）IIを含有する抗体またはその抗原結合性フラグメントである。特定態様において、1つまたは複数の刺激物質は、結合パートナー、例えばストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep-tag（登録商標）IIを含有する抗CD3 Fabおよび/または抗CD28 Fabである。特定態様において、1つまたは複数の作用物質は、ストレプトアビジンベースのオリゴマー、例えばStrep-tag付きの抗CD3 FabおよびStrep-tag付きの抗CD28 Fabにコンジュゲートされたストレプトアビジンムテインオリゴマーを含む。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、W02015/158868またはW02018/197949記載のいずれかである。

【0220】

いくつかの態様において、本明細書では、複数のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体で構成されるおよび/または複数のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含有するオリゴマー刺激試薬が提供される。一定の態様において、本明細書に提供されるオリゴマー刺激試薬は、1つもしくは複数の刺激物質に可逆的に結合するまたは1つもしくは複数の刺激物質に可逆的に結合する能力を有する複数の結合部位を含有する。いくつかの態様において、オリゴマー粒子は、両端の値を含む80nm~120nmの半径、例えば平均半径、両端の値を含む 7.5×10^6 g/mol~ 2×10^8 g/molの分子量、例えば平均分子量、および/または両端の値を含む500~10,000の量、例えば平均量の、ストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を有する。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、1つまたは複数の刺激物質、例えば細胞の表面上の分子（例えば受容体）に結合する作用物質に結合（例えば可逆的に結合）される。一定の態様において、1つまたは複数の刺激物質は、本明細書の例えばセクションI-B-2-aに記載する作用物質である。いくつかの態様において、刺激物質は、抗CD3抗体および/もしくは抗CD28抗体またはそれらの抗原結合性フラグメント、例えば結合パートナーC、例えばストレプトアビジン結合ペプチド、例えばStrep-tag（登録商標）IIを含有する抗体またはその抗原結合性フラグメントである。特定態様において、1つまたは複数の刺激物質は、結合パートナー、例えばストレプトアビジン結合ペプチド、例えばTwin-Strep-tag（例えばSEQ ID NO:16）を含有する抗CD3 Fabおよび/または抗CD28 Fabである。

[illegible]

50

ゴマー)の存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、 10^6 細胞あたり $1\mu\text{g}$ または約 $1\mu\text{g}$ のオリゴマー刺激試薬(例えばStrep-tag付き抗CD3 FabおよびStrep-tag付き抗CD28 Fabにコンジュゲートされたストレプトアビジンベースのオリゴマー、例えばストレプトアビジンムテインオリゴマー)の存在下で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、細胞は、 10^6 細胞あたり $0.8\mu\text{g}$ または約 $0.8\mu\text{g}$ のオリゴマー刺激試薬(例えばStrep-tag付き抗CD3 FabおよびStrep-tag付き抗CD28 Fabにコンジュゲートされたストレプトアビジンベースのオリゴマー、例えばストレプトアビジンムテインオリゴマー)の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞は、 10×10^8 、 9×10^8 、 8×10^8 、 7×10^8 、 6×10^8 、 5×10^8 、 4×10^8 、 3×10^8 、 2×10^8 、 1×10^8 、または約 10×10^8 、 9×10^8 、 8×10^8 、 7×10^8 、 6×10^8 、 5×10^8 、 4×10^8 、 3×10^8 、 2×10^8 、 1×10^8 のオリゴマー刺激試薬の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞は、 7×10^8 、 6×10^8 、 5×10^8 、 4×10^8 、 3×10^8 、または約 7×10^8 、 6×10^8 、 5×10^8 、 4×10^8 、 3×10^8 のオリゴマー刺激試薬の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞は、 $7\times 10^8\sim 3\times 10^8$ または約 $7\times 10^8\sim 3\times 10^8$ のオリゴマー刺激試薬の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞は、 $6\times 10^8\sim 4\times 10^8$ または約 $6\times 10^8\sim 4\times 10^8$ のオリゴマー刺激試薬の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞は、 $6\times 10^8\sim 5\times 10^8$ または約 $6\times 10^8\sim 5\times 10^8$ のオリゴマー刺激試薬の存在下で、刺激され、または刺激に供される。いくつかの態様において、細胞は、 5×10^8 または約 5×10^8 のオリゴマー刺激試薬の存在下で、刺激され、または刺激に供される。

10

20

【0222】

いくつかの態様において、細胞、例えば試料の選択された細胞は、オリゴマー刺激試薬対細胞の比率が3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1もしくは0.2:1または約3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1もしくは0.2:1である状態で、刺激され、または刺激に供される。特定態様において、オリゴマー刺激試薬対細胞の比率は、2.5:1 $\sim$ 0.2:1、2:1 $\sim$ 0.5:1、1.5:1 $\sim$ 0.75:1、1.25:1 $\sim$ 0.8:1、1.1:1 $\sim$ 0.9:1である。特定態様において、オリゴマー刺激試薬対細胞の比率は約1:1であるか、1:1である。特定態様において、オリゴマー刺激試薬対細胞の比率は約0.3:1であるか、0.3:1である。特定態様において、オリゴマー刺激試薬対細胞の比率は約0.2:1であるか、0.2:1である。

30

【0223】

一定の局面において、オリゴマー刺激試薬内では、オリゴマー粒子と取り付けられた作用物質との間の質量比が約3:1である。一定の局面において、オリゴマー刺激試薬内では、オリゴマー粒子と取り付けられた抗CD3 Fabと取り付けられた抗CD28 Fabの間の質量比が約3:0.5:0.5である。一定の局面において、 $4\mu\text{g}$ のオリゴマー刺激試薬は、 $3\mu\text{g}$ のオリゴマー粒子と $1\mu\text{g}$ の取り付けられた作用物質、例えば $0.5\mu\text{g}$ の抗CD3 Fabと $0.5\mu\text{g}$ の抗CD28 Fabであるか、それらを含む。別の例において、 10^6 細胞あたり $1.2\mu\text{g}$ のオリゴマー刺激試薬は、 10^6 細胞あたり、 $0.9\mu\text{g}$ のオリゴマー粒子と $0.3\mu\text{g}$ の取り付けられた作用物質、例えば $0.15\mu\text{g}$ の抗CD3 Fabおよび $0.15\mu\text{g}$ の抗CD28 Fabであるか、それらを含む。いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は無血清培地に加えられ、刺激は、例えば本明細書のセクションIIIまたはPCT/US2018/064627に記載されているように、無血清培地中で実施される。

40

【0224】

いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数のサプリメントが補足された基本培地(例えばOpTmizer(商標)T細胞拡大培養基本培地(ThermoFisher))を含む。いくつかの態様において、前記1つまたは複数のサプリメントは無血清である。いくつかの態様において、無血清培地は、細胞(例えばT細胞)の維持、拡大および/または活性化のために1つまたは複数の追加成分、例えば追加のサプリメント(例えばOpTmizer(商

50

標) T細胞拡大培養サプリメント (ThermoFisher)) によって提供されるものなどが補足された基本培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、血清代替サプリメント、例えば免疫細胞血清代替品、例えばThermoFisher、#A2596101、CTS (商標) 免疫細胞血清代替品、またはSmith et al.Clin Transl Immunology.2015 Jan;4 (1) :e31に記載の免疫細胞血清代替品を、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、L-グルタミンなどの遊離型アミノ酸を、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、ジペプチド型のL-グルタミン (例えばL-アラニル-L-グルタミン)、例えばGluta max (商標) (ThermoFisher) 中のジペプチドを、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えば組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-7および/または組換えヒトIL-15を、さらに含む。

10

【0225】

D. 溶出

本明細書に提供される方法の諸局面において、刺激物質とのインキュベーションに続く細胞、例えば標的細胞 (例えばT細胞) の、クロマトグラフィーカラムからの溶出は、本明細書に記載するように、競合剤または遊離結合剤を使用することなく果たされる。いくつかの態様では、刺激物質とのインキュベーション中に、選択物質を介してクロマトグラフィーマトリックス (例えば固定相) 上に固定化された細胞が、選択物質から自発的に脱離する。いくつかの態様において、自発的な脱離は、刺激物質とのインキュベーションの着手から1日以内に起こる。いくつかの態様において、自発的な脱離は、刺激物質とのインキュベーションの着手から24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2時間以内に起こる。いくつかの態様において、自発的な脱離は、刺激物質とのインキュベーションの着手後、約2~24、3~24、4~24、5~24、6~24、7~24、8~24、9~24、10~24、11~24、12~24、13~24、14~24、15~24、16~24、17~24、18~24、19~24、20~24、21~24、22~24、23~24、2~23、2~22、2~21、2~20、2~19、2~18、2~17、2~16、2~15、2~14、2~13、2~12、2~11、2~10、2~9、2~8、2~7、2~6、2~5、2~4または2~3時間以内に起こる。いくつかの態様において、カラムからの脱離は、刺激物質とのインキュベーションの着手後、4~5時間以内または約4~5時間以内、例えば4.5時間以内に起こる。いくつかの態様では、選択物質を介してクロマトグラフィーマトリックス (例えば固定相) 上に固定化された複数の標的細胞 (例えばT細胞) の大部分が、刺激物質とのインキュベーションの着手から1日未満で脱離する。いくつかの態様では、選択物質を介してクロマトグラフィーマトリックス (例えば固定相) 上に固定化された複数の標的細胞 (例えばT細胞) の大部分が、刺激物質とのインキュベーションの着手から24時間未満で脱離する。いくつかの態様では、選択物質を介してクロマトグラフィーマトリックス (例えば固定相) 上に固定化された複数の標的細胞 (例えばT細胞) の大部分が、刺激物質とのインキュベーションの着手から12時間未満で脱離する。いくつかの態様では、選択物質を介してクロマトグラフィーマトリックス (例えば固定相) 上に固定化された複数の標的細胞 (例えばT細胞) の大部分が、刺激物質とのインキュベーションの着手から5時間未満で脱離する。いくつかの態様では、選択物質を介してクロマトグラフィーマトリックス (例えば固定相) 上に固定化された複数の標的細胞 (例えばT細胞) の大部分が、刺激物質とのインキュベーションの着手から4時間未満で脱離する。いくつかの態様では、選択物質を介してクロマトグラフィーマトリックス (例えば固定相) 上に固定化された複数の標的細胞 (例えばT細胞) の大部分が、刺激物質とのインキュベーションの着手から2時間未満で脱離する。

20

30

40

【0226】

いくつかの態様では、自発的に脱離した細胞を、重力によって、クロマトグラフィーカラムから溶出させおよび/または収集する。いくつかの態様では、自発的に脱離した細胞を、洗浄工程を使って、クロマトグラフィーカラムから溶出させる。いくつかの態様では、少なくとも1つの洗浄工程が、刺激物質または刺激物質を含有する刺激試薬とのインキュベーションの開始から、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16

50

、17、18、19、20、21、22、23もしくは24時間後、または約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23もしくは24時間後、または少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23もしくは24時間後に実施される。いくつかの態様では、1つまたは複数の洗浄工程が、刺激物質または刺激物質を含有する刺激試薬とのインキュベーションの開始から、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23もしくは24時間後、または約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23もしくは24時間後、または約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23もしくは24時間後に実施される。いくつかの態様では、1つまたは複数の洗浄工程が、刺激物質または刺激物質を含む刺激試薬とのインキュベーションの着手後、約2～24、3～24、4～24、5～24、6～24、7～24、8～24、9～24、10～24、11～24、12～24、13～24、14～24、15～24、16～24、17～24、18～24、19～24、20～24、21～24、22～24、23～24、2～23、2～22、2～21、2～20、2～19、2～18、2～17、2～16、2～15、2～14、2～13、2～12、2～11、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4または2～3時間以内に実施される。

【0227】

いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激工程後の溶出および/または収集工程は、例えばセクションI-Aで述べたように試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えた後、2日または約2日以内に実施される。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激工程後の溶出および/または収集工程は、例えばセクションI-Aで述べたように試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えた後、1～2日または約1～2日以内に実施される。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激工程後の溶出および/または収集工程は、例えばセクションI-Aで述べたように試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えた後、1日または約1日以内に実施される。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激工程後の溶出および/または収集工程は、例えばセクションI-Aで述べたように試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えた後、1日未満で実施される。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激工程後の溶出および/または収集工程は、例えばセクションI-Aで述べたように試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えた後、記載の値を含む48、36、24、12、6、4もしくは2時間以内または約48、36、24、12、6、4もしくは2時間以内に実施される。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激工程後の収集または溶出工程は、試料をクロマトグラフィーカラム（例えば固定相）に加えた後、2～48、2～36、2～24、2～12、2～6、2～4、4～48、4～36、4～24、4～12、4～6、6～48、6～36、6～24、6～12、12～48、12～36、12～24、24～48、24～36もしくは36～48時間以内または約2～48、2～36、2～24、2～12、2～6、2～4、4～48、4～36、4～24、4～12、4～6、6～48、6～36、6～24、6～12、12～48、12～36、12～24、24～48、24～36もしくは36～48時間以内に実施される。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、48、36、24、12、6、4または2時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、36時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、24時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、12時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、7時間、約7時間、または7時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、6、5時間、約6.5時間、または6.5時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、6時間、約6時間

10

20

30

40

50

、または6時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、5.5時間、約5.5時間、または5.5時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、5時間、約5時間、または5時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、4.5時間、約4.5時間、または4.5時間未満である。いくつかの態様において、選択およびオンカラム刺激から溶出または収集までの工程を含むプロセス継続時間は、4時間、約4時間、または4時間未満である。

【0228】

いくつかの態様において、洗浄培地は培養培地である。したがっていくつかの態様において、溶出させた細胞はそのまま下流処理（例えば後続の選択工程、刺激工程、インキュベーション工程、遺伝子操作）に進むことができる。いくつかの態様において、洗浄培地は、グルタミンならびに組換えIL-2、IL-15およびIL-7を含有する無血清基本培地を含む。いくつかの態様において、洗浄培地は、グルタミンを含有し、組換えIL-2、IL-15およびIL-7のうちの1つまたは複数を欠く無血清基本培地を含む。いくつかの態様において、洗浄培地は、グルタミンと組換えIL-2、IL-15およびIL-7のうちの1つまたは複数とを欠く無血清基本培地を含む。

【0229】

いくつかの態様において、溶出液は、刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）を含む。いくつかの態様において、収集された細胞は、依然として、刺激物質（例えばオリゴマー刺激試薬に結合した刺激物質）に結合している。いくつかの態様において、溶出液に含有される刺激物質は、溶出した細胞および刺激試薬（例えばオリゴマー刺激試薬）に結合している。したがって、収集されおよび/または溶出された細胞は、依然として刺激条件下にあると見なしうる。いくつかの態様において、脱離し溶出された細胞は刺激条件下にある（例えば依然として刺激されている）。いくつかの態様において、溶出された細胞は、例えばセクションI-Cで述べたように、刺激条件下にあり続けうる。

【0230】

いくつかの態様において、カラムおよび収集容器は閉鎖システムに接続される。いくつかの態様において、閉鎖システムは無菌である。いくつかの態様において、選択、刺激および溶出工程は、自動化されたシステムによって実施され、手動の、例えば人の、操作または干渉はごくわずかであるか、または全くない。

【0231】

E. 遺伝子操作

いくつかの態様において、提供される方法は、細胞（例えば選択され刺激された細胞のアウトプット組成物）を遺伝子操作する工程、例えば組換えタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを導入する工程を含む。そのような組換えタンパク質としては、組換え受容体、例えばセクションIVに記載するものを挙げることができる。組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドの、細胞への導入は、数ある公知のベクターのいずれかを使って実行しうる。そのようなベクターには、ウイルス系、例えばレンチウイルス系およびガンマレトロウイルス系が含まれる。例示的な方法として、受容体をコードする異種ポリヌクレオチドを移入するための方法が、ウイルス形質導入、例えばレトロウイルスまたはレンチウイルス形質導入によるものを含めて、挙げられる。いくつかの態様では、例えば組換え受容体をコードする異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを導入し、これにより、形質転換細胞の集団（本明細書では形質転換された細胞の集団ともいう）を産生させるために、刺激された細胞の集団（例えば選択され刺激された細胞のアウトプット組成物）が遺伝子操作される。

【0232】

特定態様において、細胞（例えばT細胞、CD3+、CD4+、CD8+T細胞）は、細胞が本明細書の例えばセクションI-Cにおいて提供される方法のいずれかなどによるオンカラム刺

10

20

30

40

50

激を受けた後に、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。特定態様において、1つまたは複数の刺激された集団は、事前に凍結保護され、貯蔵されており、細胞が遺伝子操作、形質転換、トランスフェクトまたは形質導入される前に融解される。

【0233】

特定態様において、細胞（例えばT細胞、CD3+、CD4+、CD8+T細胞）は、細胞が刺激され、または刺激に供され、または刺激条件（例えばオンカラム刺激）下で培養された後に、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。特定態様において、細胞は、刺激の開始から、72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、12時間、5時間、4時間もしくは2時間、または約72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、12時間、5時間、4時間もしくは2時間の時点で、または記載の値を含む72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、12時間、5時間、4時間もしくは2時間以内に、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。いくつかの態様において、細胞はオンカラム刺激の開始から、2、3、4、5もしくは6時間、または約2、3、4、5もしくは6時間の時点で、遺伝子操作される。いくつかの態様において、細胞はオンカラム刺激の開始から、4～5時間または約4～5時間の時点で、遺伝子操作される。いくつかの態様において、細胞は遺伝子操作中も依然として刺激条件下にある。一定の態様において、細胞は、刺激の開始後、2時間～6時間もしくは6時間～12時間または約2時間～6時間もしくは6時間～12時間の間に、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。一定の態様において、細胞は、刺激の開始後、12時間～48時間、16時間～36時間もしくは18時間～30時間または約12時間～48時間、16時間～36時間もしくは18時間～30時間の間に、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。特定態様において、細胞は、刺激の開始後、18時間～30時間または約18時間～30時間の間に、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。特定態様において、細胞は、刺激の開始後、22時間もしくは24時間または約22時間もしくは24時間の時点で、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。特定態様において、細胞は、刺激の開始後、6時間もしくは12時間または約6時間もしくは12時間の時点で、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。特定態様において、細胞は、刺激の開始後、4時間もしくは5時間または約4時間もしくは5時間の時点で、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。特定態様において、細胞は、刺激の開始後、2時間もしくは3時間または約2時間もしくは3時間の時点で、遺伝子操作、形質転換または形質導入される。

【0234】

ある特定の態様では、遺伝子操作のための方法は、集団の1つまたは複数の細胞（例えば、選択され刺激された細胞のアウトプット組成物）を組換えタンパク質、例えば、組換え受容体をコードする核酸分子またはポリヌクレオチドと接触させるかまたはそれを導入することによって行われる。ある特定の態様では、核酸分子またはポリヌクレオチドは、細胞に対して異種である。特定の態様では、異種核酸分子または異種ポリヌクレオチドは、細胞にとって生得的ではない。ある特定の態様では、異種核酸分子または異種ポリヌクレオチドは、細胞によって天然に発現されないタンパク質、例えば、組換えタンパク質をコードする。特定の態様では、異種核酸分子またはポリヌクレオチドは、接触または導入の前に細胞内に見いだされない核酸配列であるかそれを含有する。

【0235】

いくつかの態様では、細胞、例えば、アウトプット組成物は、形質導入アジュバントの存在下で、操作される、例えば、形質導入される。例示的な形質導入アジュバントは、ポリカチオン、フィブロネクチンまたはフィブロネクチン由来断片もしくはバリエント、およびRetroNectinを含むが、それらに限定されない。ある特定の態様では、細胞は、ポリカチオン、フィブロネクチンまたはフィブロネクチン由来断片もしくはバリエント、および/またはRetroNectinの存在下で操作される。特定の態様では、細胞は、ポリブレン、DEAE-デキストラン、硫酸プロタミン、ポリ-L-リジンまたはカチオン性リポソームであるポリカチオンの存在下で操作される。特定の態様では、細胞は、硫酸プロタミンの存在下で操作される。

【0236】

いくつかの態様では、遺伝子操作、例えば、形質導入は、例えば、本明細書のセクションIIIまたはPCT/US2018/064627に記載されるような無血清培地中で行われる。いくつかの態様では、無血清培地は、規定されたまたは正確に規定された細胞培養培地である。ある特定の態様では、無血清培地は、処理されている、例えば、阻害物質および/または成長因子を除去するために濾過されている、制御された培養培地である。いくつかの態様では、無血清培地は、タンパク質を含有する。ある特定の態様では、無血清培地は、血清アルブミン、加水分解物、成長因子、ホルモン、担体タンパク質および/または付着因子を含有し得る。いくつかの態様では、培地はグルタミンを含む。

【0237】

特定の態様では、細胞は、1つまたは複数のサイトカインの存在下で操作される。ある特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、組換えサイトカインである。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、ヒト組換えサイトカインである。ある特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、T細胞によって発現されるおよび/またはT細胞に対して内因性である受容体に結合するおよび/または結合可能である。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、サイトカインの4-アルファ-ヘリックスバンドルファミリーのメンバーであるかそれを含む。いくつかの態様では、サイトカインの4-アルファ-ヘリックスバンドルファミリーのメンバーは、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-9 (IL-9)、インターロイキン12 (IL-12)、インターロイキン15 (IL-15)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を含むが、それらに限定されない。いくつかの態様では、1つまたは複数のサイトカインは、IL-15であるかそれを含む。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、IL-7であるかそれを含む。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、組換えIL-2であるかそれを含む。

【0238】

特定の態様では、細胞、例えば、刺激された細胞は、IL-2、IL-7および/またはIL-15の存在下の刺激条件下で操作される。ある特定の態様では、IL-2、IL-7および/またはIL-15は、組換えである。ある特定の態様では、IL-2、IL-7および/またはIL-15は、ヒトである。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、ヒト組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15であるかそれを含む。ある特定の態様では、細胞は、組換えIL-2、IL-7およびIL-15の存在下の刺激条件下で、操作される、例えば、形質導入される。

【0239】

いくつかの態様では、細胞は、刺激の間に存在していたものと同じまたは類似の培地の存在下で遺伝子操作される、形質転換される、または形質導入される。いくつかの態様では、細胞は、刺激の間に存在していた培地と同じサイトカインを有する培地中で遺伝子操作される、形質転換される、または形質導入される。ある特定の態様では、細胞は、刺激の間に存在していた培地と同じサイトカインを同じ濃度で有する培地中で遺伝子操作される、形質転換される、または形質導入される。

【0240】

1. 形質導入

いくつかの態様では、細胞（例えば、アウトプット組成物）を遺伝子操作することは、ポリヌクレオチド、例えば、異種または組換えポリヌクレオチドを細胞に形質導入によって導入することであるかそれを含む。いくつかの態様では、細胞は、ウイルスベクターを用いて形質導入されるかまたは形質導入に供される。特定の態様では、細胞は、ウイルスベクターを用いて形質導入されるかまたは形質導入に供される。いくつかの態様では、ウイルスは、ガンマレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターである。レンチウイルスによる形質導入法は公知である。例示的な方法は、例えば、Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; およびCavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505に記載されている。

【0241】

いくつかの態様では、形質導入は、集団の1つまたは複数の細胞（例えば、アウトプット組成物）を、組換えタンパク質、例えば、組換え受容体をコードする核酸分子と接触させることによって行われる。いくつかの態様では、接触させることは、遠心分離、例えばスピノキュレーション（例えば、遠心分離接種）を用いて達成することができる。そのような方法は、国際公開番号W02016/073602に記載されているような方法のいずれかを含む。例示的な遠心チャンバは、A-200/FおよびA-200遠心チャンバを含むSepax（登録商標）およびSepax（登録商標）2システムと共に使用するための遠心チャンバ、ならびにそのようなシステムと共に使用するための様々なキットを含む、Biosafe SAによって製造および販売されている遠心チャンバを含む。例示的なチャンバ、システムならびに処理装置およびキャビネットは、例えば、米国特許第6,123,655号、米国特許第6,733,433号および公開された米国特許出願公開番号US2008/0171951、ならびに公開された国際特許出願公開番号W000/38762に記載されている（これらの各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。このようなシステムと共に使用するための例示的なキットは、BioSafe SAによって製品名CS-430.1、CS-490.1、CS-600.1またはCS-900.2で販売されている使い捨てキットを含むが、それらに限定されない。

【0242】

いくつかの態様では、提供される方法は、組換え受容体をコードするポリヌクレオチドを含有するウイルスベクターを、刺激された細胞集団の 300×10^6 個、約 300×10^6 個または 300×10^6 個未満の細胞、例えば、生存T細胞に形質導入することに関連して使用される。ある特定の態様では、刺激された細胞集団の 100×10^6 個または約 100×10^6 個の細胞、例えば、生存T細胞が形質導入されるかまたは形質導入に供される。いくつかの態様では、1mLあたり 1×10^6 個の細胞、例えば刺激された細胞集団の生存可能なT細胞が、形質導入され、または形質導入に供される。いくつかの態様において、ウイルスベクターの用量は、 1×10^6 細胞あたり、10、9、8、7、6、5、4、3、2もしくは $1 \mu\text{L}$ または約10、9、8、7、6、5、4、3、2もしくは $1 \mu\text{L}$ である。いくつかの態様において、ウイルスベクターの用量は、 1×10^6 細胞あたり、6～4 μL または約6～4 μL である。いくつかの態様において、ウイルスベクターの用量は、 1×10^6 細胞あたり、5 μL または約5 μL である。

【0243】

いくつかの態様において、形質導入は無血清培地中で実施される。いくつかの態様において、形質導入は、IL-2、IL-7およびIL-15の存在下で実施される。いくつかの態様において、形質導入用のウイルスベクターは凍結され、使用前に融解され、融解されたウイルスベクターは無血清培地で希釈される。いくつかの態様において、ウイルスベクターの希釈と形質導入のための無血清培地は、本明細書のセクションIIIまたはPCT/US2018/064627に記載のとおりである。

【0244】

いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数のサプリメントが補足された基本培地（例えばOpTmizer（商標）T細胞拡大培養基本培地（ThermoFisher）を含む。いくつかの態様において、前記1つまたは複数のサプリメントは無血清である。いくつかの態様において、無血清培地は、細胞（例えばT細胞）の維持、拡大および/または活性化のために1つまたは複数の追加成分、例えば追加のサプリメント（例えばOpTmizer（商標）T細胞拡大培養サプリメント（ThermoFisher））によって提供されるものなどが補足された基本培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、血清代替サプリメント、例えば免疫細胞血清代替品、例えばThermoFisher、#A2596101、CTS（商標）免疫細胞血清代替品、またはSmith et al.Clin Transl Immunology.2015 Jan;4（1）:e31に記載の免疫細胞血清代替品を、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、L-グルタミンなどの遊離型アミノ酸を、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、ジペプチド型のL-グルタミン（例えばL-アラニル-L-グルタミン）、例えばGluta max（商標）（ThermoFisher）中のジペプチドを、さらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えば組換えヒトIL-2、組換

えヒトIL-7および/または組換えヒトIL-15を、さらに含む。

【0245】

特定態様において、細胞、例えば刺激された細胞集団（例えばアウトプット組成物）の細胞は、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%の、CD4+T細胞またはCD8+T細胞である細胞を含有する。いくつかの態様において、形質導入は、形質導入後のインキュベーションを含めて、24~48時間、36~12時間、18~30時間、または約24時間にわたって実施される。いくつかの態様において、形質導入は、形質導入後のインキュベーションを含めて、72時間±6時間または約72時間±6時間にわたって実施される。いくつかの態様において、形質導入は、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5もしくは5時間または約0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5もしくは5時間10
にわたって実施される。いくつかの態様において、形質導入は、0.5、1、1.5もしくは2時間または約0.5、1、1.5もしくは2時間にわたって実施される。いくつかの態様において、形質導入は、0.5~1.5時間または約0.5~1.5時間にわたって実施される。いくつかの態様において、形質導入は1時間または約1時間にわたって実施される。

【0246】

一定の態様において、形質導入工程は、インキュベーション、例えば刺激条件下でのインキュベーションの着手または開始から、2日以内、36時間以内、30時間以内、24時間以内、12時間以内、6時間以内、5時間以内、4時間以内または2時間以内に開始される。一定の態様において、形質導入工程は、インキュベーション、例えば刺激条件下でのインキュベーションの着手または開始から4~5時間以内に開始される。一定の態様において、形質導入工程は、インキュベーション、例えば刺激条件下でのインキュベーションの着手または開始から約20時間の時点で開始される。一定の態様において、形質導入工程は、インキュベーション、例えば刺激条件下でのインキュベーションの着手または開始から、4~5時間または約4~5時間の時点で開始される。20

【0247】

いくつかの態様では、システムには、本明細書または国際公開番号W02016/073602に記載されているような遠心チャンバシステムと共にまたはそれに関連して行うことができる1つまたは複数の処理工程など、システム内で実施される形質導入工程および1つまたは複数の様々な他の処理工程の局面を操作、自動化、制御および/またはモニタリングするための装置を含む他の装置が含まれ、および/またはシステムは、それに関連して配置される。いくつかの態様では、この装置は、キャビネット内に含有される。いくつかの態様では、装置は、制御回路を含有するハウジング、遠心分離機、カバー、モータ、ポンプ、センサ、ディスプレイおよびユーザインターフェースを含むキャビネットを含む。例示的なデバイスは、米国特許第6,123,655号、米国特許第6,733,433号および米国特許第2008/0171951号に記載されている。30

【0248】

いくつかの態様では、システムは、一連の容器、例えば、バッグ、チューブ、ストップコック、クランプ、コネクタおよび遠心分離チャンバを含む。いくつかの態様では、バッグなどの容器は、同じ容器または別個の容器、例えば、同じバッグまたは別個のバッグ内に、形質導入されるべき細胞とウイルスベクター粒子とを含有する、バッグなどの1つまたは複数の容器を含む。いくつかの態様では、システムはさらに、本方法の間に構成成分および/または集団を希釈、再懸濁および/または洗浄するためにチャンバおよび/または他の構成成分に引き込まれる媒体、例えば、希釈剤および/または洗浄溶液を含有する、バッグなどの1つまたは複数の容器を含む。容器は、システム内の1つまたは複数の位置、例えば、投入ライン、希釈剤ライン、洗浄ライン、廃棄物ラインおよび/または排出ラインに対応する位置に接続することができる。40

【0249】

いくつかの態様では、チャンバは、その回転軸の周りなどでチャンバの回転を達成可能である遠心分離機と関連付けられる。回転は、細胞の形質導入に関連するインキュベーションの前、その間および/もしくはその後に、および/または他の処理工程のうちの1つも50

しくは複数において行われ得る。したがって、いくつかの態様では、様々な処理工程の1つまたは複数が、回転下で、例えば、特定の力で行われる。チャンバは、典型的には垂直方向またはほぼ垂直方向に回転可能であり、その結果、チャンバは遠心分離中に垂直に位置し、側壁および軸は垂直またはほぼ垂直であり、端壁は水平またはほぼ水平である。

【0250】

いくつかの態様では、集団をキャビティに提供する前に、細胞を含有する集団およびウイルスベクター粒子を含有する集団および任意で空気を組み合わせるか混合することができる。いくつかの態様では、細胞を含有する集団およびウイルスベクター粒子を含有する集団および任意で空気を別個に提供し、キャビティ内で組み合わせる混合する。いくつかの態様では、細胞を含有する集団、ウイルスベクター粒子を含有する集団および任意で空気を任意の順序で内部キャビティに提供することができる。そのようないくつかの態様のいずれかにおいて、細胞およびウイルスベクター粒子を含有する集団は、遠心チャンバの内部または外部で組み合わせられているまたは混合されているかどうか、かつ/または、細胞およびウイルスベクター粒子が、遠心チャンバに一緒にまたは別個に、例えば同時または連続して提供されるかどうかにかかわらず、一度一緒に組み合わせられるか混合されたインプット集団である。

10

【0251】

いくつかの態様では、空気などの気体の体積の取り込みは、形質導入法での回転など、細胞およびウイルスベクター粒子をインキュベートする前に行われる。いくつかの態様では、空気などの気体の体積の取り込みは、形質導入法での回転など、細胞およびウイルスベクター粒子のインキュベーションの間に行われる。

20

【0252】

いくつかの態様では、形質導入集団を構成する細胞またはウイルスベクター粒子の液体体積、および任意で空気の体積は、所定の体積であることができる。体積は、システムに関連する回路にプログラムされた体積および/またはその回路によって制御された体積であることができる。

【0253】

いくつかの態様では、形質導入集団、および任意で空気などの気体の取り込みは、所望または所定の体積がチャンバの内部キャビティに取り込まれるまで、手動、半自動および/または自動で制御される。いくつかの態様では、システムに関連付けられたセンサは、遠心分離チャンバに出入りする液体および/または気体を、その色、流量および/または密度などを介して検出することができ、関連する回路と通信して、そのような所望または所定の体積の取り込みが達成されるまで、必要に応じて取り込みを停止または続行させることができる。いくつかの局面では、気体（例えば、空気）ではなくシステム内の液体のみを検出するようにプログラムされているかそれが可能であるセンサを作製して、取り込みを停止することなく、空気などの気体をシステムに通過させることができる。いくつかのそのような態様では、空気などの気体の取り込みが望まれている間、非透明なチューブ片をセンサ近くのラインに配置することができる。いくつかの態様では、空気などの気体の取り込みを手動で制御することができる。

30

【0254】

提供される方法の局面では、遠心分離チャンバの内部キャビティが高速回転に供される。いくつかの態様では、回転は、液体インプット集団および任意で空気の取り込みの前に、それと同時に、それに続いて、またはそれと断続的に達成される。いくつかの態様では、回転は、液体インプット集団および任意で空気の取り込みが続いて達成される。いくつかの態様では、回転は、内部キャビティの側壁の内面でのおよび/または細胞の表面層での200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、1000g、1100g、1500、1600g、1800g、2000g、2200g、2500g、3000g、3200g、3500gもしくは4000g、または約200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、1000g、1100g、1500、1600g、1800g、2000g、2200g、2500g、3000g、3200g、3500gもしくは4000g、または少なくとも200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、1000g、1

40

50

100g、1500、1600g、1800g、2000g、2200g、2500g、3000g、3200g、3500gもしくは4000g、または少なくとも約200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、1000g、1100g、1500、1600g、1800g、2000g、2200g、2500g、3000g、3200g、3500gもしくは4000gの相対遠心力での遠心チャンバの遠心分離によるものである。いくつかの態様では、回転は、1200g超もしくは約1200g超、1400g超もしくは約1400g超、1600g超もしくは約1600g超、1800g超もしくは約1800g超、2000g超もしくは約2000g超、2400g超もしくは約2400g超、2800g超もしくは約2800g超、3000g超もしくは約3000g超、または3200g超もしくは約3200g超などによる、1100g超または約1100gである力での遠心分離によるものである。特定の態様では、遠心分離による回転は、600g～800gの間の力での回転である。特定の態様では、遠心分離による回転は、693gまたは約693gの力での回転である。いくつかの態様では、遠心分離による回転は、1600gであるまたは約1600gである力での回転である。

【0255】

いくつかの態様では、チャンバのキャビティ内の空気などの気体は、チャンバから排出される。いくつかの態様では、空気などの気体は、閉鎖システムの一部として遠心チャンバと動作可能に連結された容器に排出される。いくつかの態様では、容器は、空いている、または空の容器である。いくつかの態様では、チャンバのキャビティ内の気体などの空気は、無菌の管路を介してチャンバの内部キャビティに動作可能に接続されたフィルターを通して排出される。いくつかの態様では、空気は、手動、半自動または自動プロセスを使用して排出される。いくつかの態様では、チャンバのキャビティから、インキュベートされた細胞およびウイルスベクター粒子を含有するアウトプット集団、例えば、形質導入が開始された細胞またはウイルスベクターにより形質導入された細胞を圧搾する前に、それと同時に、それと断続的に、またはそれに続いて、チャンバから空気が排出される。

【0256】

いくつかの態様では、形質導入および/または他のインキュベーションは、連続的または半連続的なプロセスとして、またはその一部として実施される。いくつかの態様では、連続的なプロセスは、インキュベーションの少なくとも一部の間、例えば遠心分離しながら、細胞およびウイルスベクター粒子、例えば形質導入組成物の連続的な取り込み（単一の既存の組成物として、または同じ容器、例えばキャビティに連続的に引き込み、それによってその部分を混合することによって）、ならびに/または、液体の連続的な圧搾もしくは排除、および任意で容器からの気体（例えば、空気）の排出を伴う。いくつかの態様では、連続的な取り込みおよび連続的な圧搾は、少なくとも部分的に同時に行われる。いくつかの態様では、連続的な取り込みは、インキュベーションの一部の間に、例えば、遠心分離の一部の間に行われ、連続的な圧搾は、インキュベーションの別の部分の間に行われる。2つは交互に行われ得る。したがって、連続的な取り込みおよび圧搾により、インキュベーションを行いながら、試料のさらに大きな全体積を処理する、例えば形質導入することができる。

【0257】

いくつかの態様では、インキュベーションは、連続的なプロセスの一部であり、本方法は、インキュベーションの少なくとも一部の間に、キャビティへの形質導入組成物の連続的な取り込みをチャンバの回転の間およびインキュベーションの一部の間に達成する工程、液体の連続的な圧搾を達成する工程、および任意で、チャンバの回転の間に、少なくとも1つの開口部を通じてキャビティから気体（例えば、空気）を排出する工程を含む。

【0258】

いくつかの態様では、半連続的なインキュベーションは、キャビティへの組成物の取り込み、インキュベーション、キャビティからの液体の圧搾、および任意で、アウトプット容器などへのキャビティからの気体（例えば、空気）の排出、次いで、さらに多くの細胞および処理のための他の試薬、例えばウイルスベクター粒子を含有する後続の（例えば、第2、第3などの）組成物の取り込み、ならびにプロセスの反復を交互に達成することによって行われる。例えば、いくつかの態様では、インキュベーションは、半連続的なプロセ

スの一部であり、本方法は、インキュベーションの前に、少なくとも1つの開口部を通じた形質導入組成物のキャビティへの取り込みを達成する工程、インキュベーションに続いて、キャビティからの流体の圧搾を達成する工程；細胞およびウイルスベクター粒子を含む別の形質導入組成物の内部キャビティへの取り込みを達成する工程；ならびに別の形質導入組成物中の細胞がベクターにより形質導入されるかまたは形質導入に供される条件下で、内部キャビティ内で別の形質導入組成物をインキュベートする工程を含む。このプロセスは、いくつかの追加ラウンドにわたり反復的に継続され得る。この点で、半連続的または連続的な方法は、さらに大きな体積および/または数の細胞の産生を可能にし得る。

【0259】

いくつかの態様では、形質導入インキュベーションの一部は、遠心チャンバ内で実施され、回転または遠心分離を含む条件下で実施される。

【0260】

特定の態様では、ウイルスベクターによる細胞の形質導入は、細胞およびウイルス粒子を含有する混合物のスピノキュレーション、例えば、遠心分離であるかそれを含む。いくつかの態様では、細胞およびウイルス粒子を含有する組成物は、一般に、細胞をペレット化するために使用される速度よりも遅い速度、例えば、600rpm～1700rpmまたは約600rpm～1700rpm（例えば、600rpm、1000rpm、もしくは1500rpmもしくは1700rpm、または約600rpm、1000rpm、もしくは1500rpmもしくは1700rpm、または少なくとも600rpm、1000rpm、もしくは1500rpmもしくは1700rpm）などの比較的低い力または速度で回転させることができる。いくつかの態様では、回転は、例えば、チャンバまたはキャビティの内壁または外壁で測定した場合、100g～4000gまたは約100g～4000g（例えば、100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000gもしくは3500g、または約100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000gもしくは3500g、または少なくとも100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000gもしくは3500g）の力、例えば、相対遠心力で行われる。

【0261】

いくつかの態様では、細胞は、ウイルスベクターと共に、100g～4000g、200g～1,000g、500g～1200g、1000g～2000g、600g～800g、1200g～1800gもしくは1500g～1800gまたは約100g～4000g、200g～1,000g、500g～1200g、1000g～2000g、600g～800g、1200g～1800gもしくは1500g～1800gの力、例えば、相対遠心力でスピノキュレートされる。ある特定の態様では、細胞は、ウイルスベクター粒子と共に、100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1000g、1200g、1500g、1600g、2000g、2500g、3000g、3200gもしくは3500g、少なくとも100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1000g、1200g、1500g、1600g、2000g、2500g、3000g、3200gもしくは3500g、または約100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1000g、1200g、1500g、1600g、2000g、2500g、3000g、3200gもしくは3500gでスピノキュレートされる。いくつかの態様では、細胞は、ウイルスベクターにより692gまたは約692gの力で形質導入されるかまたは形質導入に供される。特定の態様では、細胞は、ウイルスベクターにより1600gまたは約1600gの力で形質導入されるかまたは形質導入に供される。いくつかの態様では、力は、内部キャビティの側壁の内面でのおよび/または細胞の表面層での力である。

【0262】

ある特定の態様では、細胞は、スピノキュレートされる、例えば、細胞およびウイルスベクターを含有する細胞組成物は、5分間超または約5分間、例えば、10分間超もしくは約10分間、15分間超もしくは約15分間、20分間超もしくは約20分間、30分間超もしくは

10

20

30

40

50

は約30分間、45分間超もしくは約45分間、60分間超もしくは約60分間、90分間超もしくは約90分間、または120分間超もしくは約120分間；あるいは、5分～120分、30分～90分、15分～60分、15分～45分、30分～60分、もしくは45分～60分、または約5分～120分、30分～90分、15分～60分、15分～45分、30分～60分、もしくは45分～60分（両端の値を含む）にわたり回転される。いくつかの態様では、細胞は、ウイルスベクターと共に30分間または約30分間スピノキュレートされる。ある特定の態様では、細胞は、ウイルスベクターと共に60分間または約60分間スピノキュレートされる。

【0263】

いくつかの態様では、形質導入の方法は、形質導入組成物および任意で空気を、遠心チャンバ内で、5分間超もしくは約5分間、例えば、10分間超もしくは約10分間、15分間超もしくは約15分間、20分間超もしくは約20分間、30分間超もしくは約30分間、45分間超もしくは約45分間、60分間超もしくは約60分間、90分間超もしくは約90分間、または120分間超もしくは約120分間にわたりスピノキュレーション、例えば、回転または遠心分離することを含む。いくつかの態様では、形質導入組成物および任意で空気は、5分を超えるが60分以下、45分以下、30分以下または15分以下にわたり遠心チャンバ内で回転または遠心分離される。特定の態様では、形質導入は、60分間または約60分間にわたり回転または遠心分離することを含む。

【0264】

いくつかの態様では、形質導入の方法は、形質導入組成物および任意で空気を、遠心チャンバ内で、10分～60分、15分～60分、15分～45分、30分～60分、もしくは45分～60分、または約10分～60分、約15分～60分、約15分～45分、約30分～60分、もしくは約45分～60分（両端の値を含む）にわたり、かつ、内部キャビティの側壁の内面でおよび/または細胞の表面層で1000g、1100g、1200g、1400g、1500g、1600g、1800g、2000g、2200g、2400g、2800g、3200gもしくは3600g、約1000g、1100g、1200g、1400g、1500g、1600g、1800g、2000g、2200g、2400g、2800g、3200gもしくは3600g、または1000g、1100g、1200g、1400g、1500g、1600g、1800g、2000g、2200g、2400g、2800g、3200gもしくは3600gの力で回転または遠心分離することを含む。特定の態様では、形質導入の方法は、形質導入組成物、例えば、細胞およびウイルスベクター粒子を、1600gまたは約1600gで60分間または約60分間にわたり回転または遠心分離することを含む。

【0265】

いくつかの態様では、形質導入の方法は、回転または遠心分離を含まない。

【0266】

2. ウイルスベクター粒子

いくつかの態様では、組換え核酸は、組換え感染性ウイルス粒子、例えば、シミアンウイルス40（SV40）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）に由来するベクターを使用して細胞に移送される。いくつかの態様では、組換え核酸は、組換えレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクター、例えばガンマ-レトロウイルスベクターを使用してT細胞に移送される（例えば、Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557を参照のこと）。

【0267】

いくつかの態様では、レトロウイルスベクター、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMLV）、骨髄増殖性肉腫ウイルス（MPSV）、マウス胚性幹細胞ウイルス（MESV）、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）、脾フォーカス形成ウイルス（SFFV）またはアデノ随伴ウイルス（AAV）に由来するレトロウイルスベクターは、長末端反復配列（LTR）を有する。ほとんどのレトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルスに由来する。いくつかの態様では、レトロウイルスは、任意の鳥類または哺乳類の細胞源に由来するものを含む。レトロウイルスは、典型的には兩種指向性であり、これは、ヒトを含む数種の宿主

10

20

30

40

50

細胞に感染可能であることを意味する。一態様では、発現されるべき遺伝子は、レトロウイルスのgag、polおよび/またはenv配列と置き換わる。多数の例示的なレトロウイルス系が記載されている（例えば、米国特許第5,219,740号；第6,207,453号；第5,219,740号；Miller and Rosman (1989) Bio Techniques 7:980-990；Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14；Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852；Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037；およびBoris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109）。

【0268】

ウイルスベクターゲノムは、典型的には、パッケージング細胞株または産生細胞株にトランスフェクトできるプラスミドの形態で構築される。そのような例のいずれでも、組換え受容体などの組換えタンパク質をコードする核酸は、一般にウイルスゲノムの非必須領域などのウイルスベクターの領域に挿入または配置される。いくつかの態様では、核酸は、ある特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入されて、複製欠損であるウイルスを産生する。

【0269】

多種多様な公知の方法のいずれかを使用して、ゲノムがウイルスベクターゲノムのRNAコピーを含有するレトロウイルス粒子を産生することができる。いくつかの態様では、少なくとも2つの成分（第1に、構造タンパク質と、ウイルスベクター粒子を生成するのに必要な酵素とを包含するパッケージングプラスミド、第2に、ウイルスベクターそれ自体、すなわち、導入されるべき遺伝物質）がウイルスベースの遺伝子送達系の作製に参与する。これらの成分の一方または両方の設計に、バイオセーフティのためのセーフガードを導入することができる。

【0270】

いくつかの態様では、パッケージングプラスミドは、エンベロープタンパク質以外のHIV-1などのあらゆるレトロウイルスタンパク質を含有することができる（Naldini et al., 1998）。他の態様では、ウイルスベクターは、病原性に関連するものなどの追加のウイルス遺伝子、例えば、HIVの一次トランスアクチベーターであるvpr、vif、vpuおよびnef、ならびに/またはTatを欠損し得る。いくつかの態様では、HIVベースのレンチウイルスベクターなどのレンチウイルスベクターは、親ウイルスの3つの遺伝子、gag、polおよびrevのみを含み、これにより、組換えによる野生型ウイルスの再構成の可能性が減少するか排除される。

【0271】

いくつかの態様では、ウイルスベクターゲノムは、ウイルスベクターゲノムから転写されたウイルスゲノムRNAをウイルス粒子にパッケージングするのに必要なあらゆる成分を含有するパッケージング細胞株に導入される。あるいは、ウイルスベクターゲノムは、関心対象の1つまたは複数の配列、例えば組換え核酸に加えて、ウイルス成分をコードする1つまたは複数の遺伝子を含み得る。ただし、いくつかの局面では、標的細胞内でのゲノムの複製を防ぐために、複製に必要な内因性ウイルス遺伝子が除去され、パッケージング細胞株に別個に提供される。

【0272】

いくつかの態様では、パッケージング細胞株は、粒子を生成するために必要な成分を含有する1つまたは複数のプラスミドベクターによりトランスフェクトされる。いくつかの態様では、パッケージング細胞株は、LTR、シス作用パッケージング配列および関心対象の配列、すなわちCARなどの抗原受容体をコードする核酸を含む、ウイルスベクターゲノムを含有するプラスミドと；Gag、polおよび/またはrevなどのウイルスの酵素的および/または構造的成分をコードする1つまたは複数のヘルパープラスミドによりトランスフェクトされる。いくつかの態様では、レトロウイルスベクター粒子を生成する様々な遺伝的成分を分離するために複数のベクターが利用される。いくつかのそのような態様では、パッケージング細胞に別個のベクターを提供することにより、普通なら複製能力のあるウイルスを生成する可能性がある組換え事象の可能性が減少する。いくつかの態様では、あら

ゆるレトロウイルス成分を有する単一のプラスミドベクターを使用することができる。

【0273】

いくつかの態様では、レンチウイルスベクター粒子などのレトロウイルスベクター粒子は、宿主細胞の形質導入効率を高めるために偽型化される。例えば、いくつかの態様では、レンチウイルスベクター粒子などのレトロウイルスベクター粒子は、VSV-G糖タンパク質を用いて偽型化され、これにより、広い細胞宿主範囲が提供され、形質導入できる細胞タイプを拡大する。いくつかの態様では、パッケージング細胞株は、例えば、シンドビスウイルスエンベロープ、GALVまたはVSV-Gなどの異種指向性、ポリトロピックまたは両種指向性のエンベロープを含むように、非天然エンベロープ糖タンパク質をコードするプラスミドまたはポリヌクレオチドによりトランスフェクトされる。

10

【0274】

いくつかの態様では、パッケージング細胞株は、ウイルスゲノムRNAをレンチウイルスベクター粒子にパッケージングするためにトランスで必要とされる、ウイルス調節タンパク質および構造タンパク質を含む成分を提供する。いくつかの態様では、パッケージング細胞株は、レンチウイルスタンパク質を発現して機能的なレンチウイルスベクター粒子を産生することができる、任意の細胞株であり得る。いくつかの局面では、好適なパッケージング細胞株は、293細胞（ATCC CCL X）、293T細胞、HeLA細胞（ATCC CCL 2）、D17細胞（ATCC CCL 183）、MDCK細胞（ATCC CCL 34）、BHK細胞（ATCC CCL -10）およびCf2Th細胞（ATCC CRL 1430）を含む。

【0275】

いくつかの態様では、パッケージング細胞株は、ウイルスタンパク質を安定に発現する。例えば、いくつかの局面では、gag、pol、revおよび/または他の構造遺伝子を含有するが、LTRおよびパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株を構築することができる。いくつかの態様では、パッケージング細胞株は、異種タンパク質をコードする核酸分子および/またはエンベロープ糖タンパク質をコードする核酸を含有するウイルスベクターゲノムと共に、1つまたは複数のウイルスタンパク質をコードする核酸分子により一過性にトランスフェクトされ得る。

20

【0276】

いくつかの態様では、ウイルスベクターおよびパッケージングプラスミドおよび/またはヘルパープラスミドは、トランスフェクションまたは感染を介してパッケージング細胞株に導入される。パッケージング細胞株は、ウイルスベクターゲノムを含有するウイルスベクター粒子を産生する。トランスフェクションまたは感染のための方法は周知である。非限定的な例は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランおよびリポフェクション法、エレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションを含む。

30

【0277】

組換えプラスミドならびにレトロウイルスLTRおよびパッケージング配列を特別な細胞株に（例えば、リン酸カルシウム沈殿によって）導入すると、パッケージング配列は、組換えプラスミドのRNA転写物をウイルス粒子にパッケージングすることを可能にし得、その後、これが培養培地に分泌され得る。次いで、いくつかの態様では、組換えレトロウイルスを含有する培地を収集し、任意で濃縮し、遺伝子導入に使用する。例えば、いくつかの局面では、パッケージング細胞株へのパッケージングプラスミドおよび導入ベクターのコトランスフェクションの後、ウイルスベクター粒子が培養培地から回収され、当業者が使用している標準的な方法によって滴定される。

40

【0278】

いくつかの態様では、レンチウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターは、レンチウイルス粒子の生成を可能にするプラスミドの導入により、例示的なHEK 293T細胞株などのパッケージング細胞株内で産生させることができる。いくつかの態様では、パッケージング細胞は、gagおよびpolをコードするポリヌクレオチドにより、ならびに抗原受容体（例えば、CAR）などの組換え受容体をコードするポリヌクレオチドによりトランスフェクトされ、かつ/または、前記ポリヌクレオチドを含有する。いくつかの態様では、パッ

50

ケーシング細胞株は、revタンパク質をコードするポリヌクレオチドにより任意でおよび/または追加でトランスフェクトされ、かつ/または、前記ポリヌクレオチドを含有する。いくつかの態様では、パッケージング細胞株は、VSV-Gなどの非天然エンベローブ糖タンパク質をコードするポリヌクレオチドにより任意でおよび/または追加でトランスフェクトされ、かつ/または、前記ポリヌクレオチドを含有する。いくつかのそのような態様では、細胞、例えばHEK 293T細胞のトランスフェクションの約2日後、細胞上清は、組換えレンチウイルスベクターを含有し、これを回収し、滴定することができる。

【0279】

回収および/または産生されたレトロウイルスベクター粒子を使用し、記載されるような方法を使用して標的細胞を形質導入することができる。標的細胞に入ると、ウイルスRNAは逆転写され、核に輸送され、宿主ゲノムに安定して組み込まれる。ウイルスRNAの組み込みの1日後または2日後に、組換えタンパク質、例えば、CARなどの抗原受容体の発現を検出することができる。

【0280】

3. 細胞のインキュベーション

特定の態様では、細胞（例えば、アウトプット組成物）をウイルスベクターにより形質転換する（例えば、形質導入する）などによる遺伝子操作はさらに、細胞にウイルスベクターを導入または接触させた後に細胞をインキュベートする1つまたは複数の工程を含む。いくつかの態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞集団の細胞は、細胞を遺伝子操作、形質転換、形質導入またはトランスフェクトしてウイルスベクターを細胞に導入するためのプロセスに続いて、インキュベートされる。特定の態様では、インキュベーションは、インキュベートされた細胞の集団（本明細書においてインキュベートされ細胞集団とも称される）をもたらす。

【0281】

いくつかの態様では、細胞は、異種または組換えポリヌクレオチド、例えば、ウイルスベクター粒子の導入が細胞のさらなる処理なしに行われた後に、インキュベートされる。特定の態様では、インキュベートする前に、細胞を洗浄して、例えば、異種または組換えポリヌクレオチド、例えば、ウイルスベクター粒子をコードする外因性または残留ポリヌクレオチド、例えば、スピノキュレーションに続く遺伝子操作プロセス後に培地中に残留しているものを除去するかまたは実質的に除去する。

【0282】

いくつかのそのような態様では、さらなるインキュベーションは、1つまたは複数の細胞の宿主ゲノムへのウイルスベクターの組み込みをもたらす条件下で達成される。インキュベーションが宿主ゲノムへのウイルスベクター粒子の組み込みをもたらしたかどうかを評価または判定し、ひいてはさらなるインキュベーションの条件を経験的に判定することは、当業者のレベルの範囲内である。いくつかの態様では、宿主ゲノムへのウイルスベクターの組み込みは、インキュベーション後にウイルスベクター粒子のゲノムに含有される核酸によってコードされる異種タンパク質などの組換えタンパク質の発現レベルを測定することによって評価することができる。組換え分子の発現レベルを評価するための多数の周知の方法、例えば、親和性ベースの方法、例えば、免疫親和性ベースの方法による検出（例えば、細胞表面タンパク質の関連では、フローサイトメトリなどによる）が使用されてもよい。いくつかの例では、発現は、形質導入マーカーおよび/またはレポーター構築物の検出によって測定される。いくつかの態様では、切断型表面タンパク質をコードする核酸がベクター内に含まれ、発現および/またはその増強のマーカーとして使用される。

【0283】

ある特定の態様では、インキュベーションは、静的条件、例えば、培地の遠心分離、振盪、回転、揺動、または灌流、例えば、連続もしくは半連続灌流を伴わない条件下で実施される。いくつかの態様では、インキュベーションの開始の前またはその直後、例えば、5分、15分または30分以内に、バッグまたはバイアルなどの容器に細胞が移送され（例えば、無菌条件下で移送され）、インキュベーター内に入れられる。

【0284】

いくつかの態様では、インキュベーションの少なくとも一部は、国際公開番号W02016/073602に記載されているように遠心チャンバの内部キャビティ内で行われる。

【0285】

いくつかの態様では、異種または組換えポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、例えば、ウイルスベクターが導入された細胞が、インキュベーションのための容器に移送される。いくつかの態様では、容器は、バイアルである。特定の態様では、容器は、バッグである。いくつかの態様では、細胞、および任意で異種または組換えポリペプチドが、閉鎖または無菌条件下で容器に移送される。いくつかの態様では、次いで、容器、例えば、バイアルまたはバッグは、インキュベーションの全部または一部のためにインキュベーター内に入れられる。特定の態様では、インキュベーターは、16°C、24°Cもしくは35°C、約16°C、24°Cもしくは35°C、または少なくとも16°C、24°Cもしくは35°Cに設定される。いくつかの態様では、インキュベーターは、37°C、約37°C、または37°C±2°C、±1°C、±0.5°Cもしくは±0.1°Cに設定される。

【0286】

いくつかの局面では、インキュベーションのための条件は、特定の培地、温度、酸素含有量、二酸化炭素含有量、時間、作用物質、例えば、栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオンおよび/または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、ならびに細胞を活性化するように設計された任意の他の作用物質の1つまたは複数を含むことができる。

【0287】

いくつかの態様では、インキュベーションは、無血清培地中で実施される。いくつかの態様では、無血清培地は、規定されたおよび/または正確に規定された細胞培養培地である。ある特定の態様では、無血清培地は、処理されている、例えば、阻害物質および/または成長因子を除去するために濾過されている、制御された培養培地である。いくつかの態様では、無血清培地は、タンパク質を含有する。ある特定の態様では、無血清培地は、血清アルブミン、加水分解物、成長因子、ホルモン、担体タンパク質および/または付着因子を含有し得る。

【0288】

特定の態様では、細胞は、1つまたは複数のサイトカインの存在下でインキュベートされる。ある特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、組換えサイトカインである。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、ヒト組換えサイトカインである。ある特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、T細胞によって発現されるおよび/またはT細胞に対して内因性である受容体に結合するおよび/または結合可能である。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、サイトカインの4-アルファ-ヘリックスバンドルファミリーのメンバーであるかそれを含む。いくつかの態様では、サイトカインの4-アルファ-ヘリックスバンドルファミリーのメンバーは、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-9 (IL-9)、インターロイキン12 (IL-12)、インターロイキン15 (IL-15)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) を含むが、それらに限定されない。いくつかの態様では、1つまたは複数のサイトカインは、IL-15であるかそれを含む。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、IL-7であるかそれを含む。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、組換えIL-2であるかそれを含む。

【0289】

特定の態様では、細胞は、IL-2、IL-7および/またはIL-15の存在下でインキュベートされる。ある特定の態様では、IL-2、IL-7および/またはIL-15は、組換えである。ある特定の態様では、IL-2、IL-7および/またはIL-15は、ヒトである。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、ヒト組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15であるかそれを含む。ある特定の態様では、細胞は、組換えIL-2、IL-7およびIL-15の存在下でインキュベ-

トされる。

【0290】

いくつかの態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、1IU/mL~1,000IU/mLの間、10IU/mL~50IU/mLの間、50IU/mL~100IU/mLの間、100IU/mL~200IU/mLの間、100IU/mL~500IU/mLの間、250IU/mL~500IU/mLの間、または500IU/mL~1,000IU/mLの間の濃度のサイトカイン、例えば、組換えヒトサイトカインとインキュベートされる。

【0291】

いくつかの態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、1IU/mL~500IU/mLの間、10IU/mL~250IU/mLの間、50IU/mL~200IU/mLの間、50IU/mL~150IU/mLの間、75IU/mL~125IU/mLの間、100IU/mL~200IU/mLの間、または10IU/mL~100IU/mLの間の濃度のIL-2、例えば、ヒト組換えIL-2とインキュベートされる。特定の態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mLもしくは100IU/mL、または約50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mLもしくは100IU/mLの濃度の組換えIL-2とインキュベートされる。いくつかの態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、100IU/mLまたは約100IU/mLの組換えIL-2、例えば、ヒト組換えIL-2の存在下でインキュベートされる。

【0292】

いくつかの態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、100IU/mL~2,000IU/mLの間、500IU/mL~1,000IU/mLの間、100IU/mL~500IU/mLの間、500IU/mL~750IU/mLの間、750IU/mL~1,000IU/mLの間、または550IU/mL~650IU/mLの間の濃度の組換えIL-7、例えば、ヒト組換えIL-7とインキュベートされる。特定の態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mLもしくは1,000IU/mL、または約50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mLもしくは1,000IU/mLの濃度のIL-7とインキュベートされる。特定の態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、600IU/mLまたは約600IU/mLのIL-7の存在下でインキュベートされる。

【0293】

いくつかの態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、1IU/mL~500IU/mLの間、10IU/mL~250IU/mLの間、50IU/mL~200IU/mLの間、50IU/mL~150IU/mLの間、75IU/mL~125IU/mLの間、100IU/mL~200IU/mLの間、または10IU/mL~100IU/mLの間の濃度の組換えIL-15、例えば、ヒト組換えIL-15とインキュベートされる。特定の態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mLもしくは200IU/mL、または約50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mLもしくは200IU/mLの濃度の組換えIL-15とインキュベートされる。いくつかの態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、100IU/mLまたは約100IU/mLの組換えIL-15、例えば、ヒト組換えIL-2の存在下でインキュベートされる。

【0294】

特定の態様では、細胞、例えば、形質転換された細胞は、IL-2、IL-7、および/またはI

L-15の存在下でインキュベートされる。いくつかの態様では、IL-2、IL-7、および/またはIL-15は、組換えである。ある特定の態様では、IL-2、IL-7、および/またはIL-15は、ヒトである。特定の態様では、1つまたは複数のサイトカインは、ヒト組換えIL-2、IL-7、および/またはIL-15であるかそれを含む。ある特定の態様では、細胞は、組換えIL-2、IL-7、およびIL-15の存在下でインキュベートされる。

【0295】

いくつかの態様では、例えば、非拡大増殖プロセスのインキュベーションの全部または一部は、基礎培地（例えば、CTS OpTmizer基礎培地（Thermofisher））、グルタミン、ならびに1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えば組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15を含む培地中で実施される。いくつかの態様では、培地は、セクションIII.Bに記載されているような1つまたは複数の追加の成分を含有することができる。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加の成分は、L-グルタミンのジペプチド形態（例えば、L-アラニル-L-グルタミン）を含み得る。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加の成分は、追加のサプリメント、例えば、OpTmizer（登録商標）サプリメント（Thermofisher）によって提供される。いくつかの態様では、培地は、無血清培地であり、いかなる血清成分も含有しない。いくつかの局面では、培地は、1つまたは複数の血清代替タンパク質、例えば、アルブミン、インスリンまたはトランスフェリンの1つまたは複数を含むことができる（例えば、CTS（商標）Immune Cell Serum Replacement）。例示的な無血清培地またはその成分は、セクションIIに記載される。

【0296】

いくつかの態様では、細胞は、上記の刺激の方法またはプロセス（例えば、オンカラム刺激）に関連して行われるような、細胞の刺激の間に存在していたものと同じまたは類似の培地の存在下でインキュベートされる。いくつかの態様では、細胞は、上記の刺激の方法またはプロセスに関連して行われるような、細胞の刺激の間に存在していた培地と同じサイトカインを有する培地中でインキュベートされる。ある特定の態様では、細胞は、上記の刺激の方法またはプロセスに関連して行われるような、細胞の刺激の間に存在していた培地と同じサイトカインを同じ濃度で有する培地中でインキュベートされる。

【0297】

いくつかの態様では、細胞は、組換えサイトカインの非存在下でインキュベートされる。いくつかの態様では、細胞は、本明細書に記載されるような1つまたは複数のサイトカインの非存在下でインキュベートされる。いくつかの態様では、細胞は、本明細書に記載されるサイトカインすべての非存在下でインキュベートされる。

【0298】

いくつかの態様では、インキュベーションの全部または一部は、基礎培地、例えば、1つまたは複数の組換えサイトカインを含まないかいはなる組換えサイトカインも含まない基礎培地中で実施される。いくつかの態様では、培地は、1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えば、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-7、および/または組換えヒトIL-15を含まない。いくつかの局面では、インキュベーションは、いかなる組換えサイトカインも含まずに行われる。ある特定の態様では、基礎培地に、追加の添加物が補充される。いくつかの態様では、基礎培地に、いかなる追加の添加物も補充されない。細胞培養培地への添加物は、栄養素、糖、例えばグルコース、アミノ酸、ビタミン、またはATPおよびNADHなどの添加物を含み得るが、それらに限定されない。他の添加物を加えることもできるが、一般に、具体的な添加物および量は、培地と細胞のインキュベーションが、細胞の維持を促進するが、インキュベーションの間の細胞の代謝活性を最小化する、制限するおよび/または誘導しないようなものである。

【0299】

特定の態様では、培地は、1つまたは複数の組換えサイトカインを含有せずかつ血清成分を含有しない基礎培地、すなわち、無血清培地であるが、セクションIII.Bに記載されているような1つまたは複数の追加の成分を含有し得る。特定の態様では、そのような無血清培地の、例えば、セクションI-E-3に従う、例えば、非拡大増殖プロセスのインキュベ-

10

20

30

40

50

シヨンの全部または一部における使用は、細胞の維持を提供するが、細胞を活性化するかまたは代謝的に活性にすることによって細胞を休止もしくは静止状態であるまたはその可能性が高い状態に促進し得る特定の因子を含まない、希薄培地を提供する。いくつかの局面では、そのような無血清培地の存在下でのインキュベーション（例えば、セクションI-E-3に従う）は、刺激および遺伝子操作（例えば、形質導入）後に、細胞が回復するのを可能にする。いくつかの局面では、そのような無血清培地の存在下でのインキュベーション（例えば、セクションI-E-3に従う）は、例えば、製造プロセスの間またはその後、および採取/製剤化された細胞が凍結保存され、次いで、使用直前に融解されたとき、生存率の損失または喪失の影響を受けにくい細胞を含有するアウトプット組成物（例えば、治療用細胞組成物）をもたらす。いくつかの態様では、融解されたときのアウトプット組成物（例えば、治療用細胞組成物）中の細胞は、類似の培地であるがアウトプット組成物（例えば、治療用細胞組成物）の凍結保存時に細胞をより代謝的に活性にし得る1つまたは複数の組換えサイトカイン、血清または他の因子を含有する培地中でインキュベートされた細胞よりも低いレベルのカスパーゼまたは他のアポトーシスマーカーを有する。

【0300】

いくつかの態様では、基礎培地は、無機塩、糖、アミノ酸、および任意で、ビタミン、有機酸および/もしくは緩衝液または他の周知の細胞培養栄養素の混合物を含有する。栄養素に加えて、培地は、pHと浸透圧を維持するのにも役立つ。いくつかの局面では、基礎培地の試薬は、細胞の成長、増殖および/または拡大増殖を支援する。多種多様な市販の基礎培地が当業者に周知であり、これには、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、ロズウェルパーク記念研究所培地（RPMI）、イスコフ改変ダルベッコ培地およびハム培地が含まれる。いくつかの態様では、基礎培地は、イスコフ改変ダルベッコ培地、RPMI-1640または α -MEMである。

【0301】

いくつかの態様では、基礎培地は、平衡塩類溶液（例えば、PBS、DPBS、HBSS、EBSS）である。いくつかの態様では、基礎培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、F-10、F-12、RPMI 1640、グラスゴー最小必須培地（GMEM）、アルファ最小必須培地（アルファMEM）、イスコフ改変ダルベッコ培地、およびM199から選択される。いくつかの態様では、基礎培地は、複合培地（例えば、RPMI-1640、IMDM）である。いくつかの態様では、基礎培地は、OpTmizer（商標）CTS（商標）T-Cell Expansion Basal Medium（ThermoFisher）である。

【0302】

いくつかの態様では、基礎培地は、タンパク質を含まない。いくつかの態様では、基礎培地は、ヒトタンパク質（例えば、ヒト血清タンパク質）を含まない。いくつかの態様では、基礎培地は、無血清である。いくつかの態様では、基礎培地は、ヒトに由来する血清を含まない。いくつかの態様では、基礎培地は、組換えタンパク質を含まない。いくつかの態様では、基礎培地は、ヒトタンパク質および組換えタンパク質を含まない。いくつかの態様では、基礎培地は、本明細書に記載されるような1つまたは複数またはすべてのサイトカインを含まない。

【0303】

いくつかの態様では、例えば、非拡大増殖プロセスのインキュベーションの全部または一部は、いかなる追加の添加物または組換えサイトカインも含まない基礎培地中で実施される。いくつかの態様では、基礎培地は、いかなる追加の添加物または組換えサイトカインも含まないCTS OpTmizer基礎培地（Thermofisher）である。いくつかの態様では、例えば、非拡大増殖プロセスのインキュベーションの全部または一部は、基礎培地およびグルタミンを含む培地、例えば、グルタミン含有のCTS OpTmizer基礎培地（Thermofisher）中で実施される。

【0304】

いくつかの態様では、例えば、非拡大増殖プロセスのインキュベーションの全部または

10

20

30

40

50

一部は、1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えば、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-7、および/または組換えヒトIL-15を含まない基礎培地（例えば、CTS OpTmizer基礎培地（Thermofisher））を含む培地中で実施される。いくつかの態様では、培地に、セクションIII.Bに示されるような1つまたは複数の追加の非血清成分が補充される。いくつかの態様では、1つまたは複数のサプリメントは、無血清である。いくつかの態様では、無血清培地はさらに、L-グルタミンなどのアミノ酸の遊離形態を含む。いくつかの態様では、無血清培地は、血清代替サプリメントを含まない。いくつかの態様では、無血清培地は、L-グルタミンのジペプチド形態（例えば、L-アラニル-L-グルタミン）を含まない。いくつかの態様では、無血清培地は、いかなる組換えサイトカインも含まない。いくつかの態様では、無血清培地は、T細胞サプリメントおよび遊離形態のL-グルタミンが補充された基礎培地を含むが、いかなる免疫細胞血清代替物、いかなるL-グルタミンのジペプチド形態、またはいかなる組換えサイトカインも含有しない。いくつかの態様において、無血清培地は、T細胞サプリメントおよび遊離型のL-グルタミンが補足された基本培地を含み、免疫細胞血清代替品、ジペプチド型のL-グルタミン、組換えサイトカインをいずれも含有しない。いくつかの態様において、無血清培地は、基本培地（例えば、補足されたOpTmizer（商標）T細胞拡大培養基本培地）、L-グルタミンおよび1つまたは複数のさらなる成分、例えばサプリメント（例えばOpTmizer（商標）T細胞拡大培養サプリメント）によって提供されるものを含む。

【0305】

特定態様において、細胞は、無血清培地中、 0.25×10^6 細胞/mL、 0.5×10^6 細胞/mL、 0.75×10^6 細胞/mL、 1.0×10^6 細胞/mL、 1.25×10^6 細胞/mL、 1.5×10^6 細胞/mL、 1.75×10^6 細胞/mLもしくは 2.0×10^6 細胞/mL、または約 0.25×10^6 細胞/mL、 0.5×10^6 細胞/mL、 0.75×10^6 細胞/mL、 1.0×10^6 細胞/mL、 1.25×10^6 細胞/mL、 1.5×10^6 細胞/mL、 1.75×10^6 細胞/mLもしくは 2.0×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、無血清培地中、 0.25×10^6 細胞/mL～ 1.0×10^6 細胞/mLまたは約 0.25×10^6 細胞/mL～ 1.0×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、無血清培地中、 0.25×10^6 細胞/mL～ 0.75×10^6 細胞/mLまたは約 0.25×10^6 細胞/mL～ 0.75×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、無血清培地中、 0.5×10^6 細胞/mL～ 0.75×10^6 細胞/mLまたは約 0.5×10^6 細胞/mL～ 0.75×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、無血清培地中、 0.25×10^6 細胞/mL～ 0.5×10^6 細胞/mLまたは約 0.25×10^6 細胞/mL～ 0.5×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、無血清培地中、 0.75×10^6 細胞/mLまたは約 0.75×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、無血清培地中、 0.5×10^6 細胞/mLまたは約 0.5×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。いくつかの態様において、インキュベートする工程は18時間～30時間または約18時間～30時間にわたる。特定態様において、インキュベートする工程は24時間もしくは約24時間または1日もしくは約1日にわたる。

【0306】

特定態様において、細胞はサイトカインの不在下でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、任意の組換えサイトカインの不在下でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えば組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15の不在下でインキュベートされる。

【0307】

いくつかの態様において、例えば非拡大（non-expanded process）プロセスのための、インキュベーションの全部または一部分は、基本培地、グルタミンおよび1つまたは複数の組換えサイトカインを含む培地中で、例えばグルタミンならびに組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15を含むCTS OpTmizer基本培地（Thermofisher）中で、実施される。いくつかの態様において、例えば非拡大プロセスのための、インキュベーションの全部または一部分は、基本培地、グルタミン、1つまたは複数の組換えサイトカインおよびT細胞

サプリメントを含む培地中で、例えばグルタミン、組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15ならびにOpTmizer（登録商標）サプリメント（Thermofisher）を含むCTS OpTmizer基本培地（Thermofisher）中で、実施される。いくつかの態様において、例えば非拡大プロセスのための、インキュベーションの全部または一部分は、基本培地、グルタミン、1つまたは複数の組換えサイトカイン、T細胞サプリメントおよび1つまたは複数の血清代用タンパク質（serum-substituting protein）を含む培地中で、例えばグルタミン、組換えIL-2、IL-7および/またはIL-15、OpTmizer（登録商標）サプリメント（Thermofisher）、ならびにアルブミン、インスリンまたはトランスフェリンなどの血清代用タンパク質を含むCTS OpTmizer基本培地（Thermofisher）中で、実施される。

【0308】

いくつかの態様では、基礎培地はさらに、グルタミン、例えばL-グルタミンを含む。いくつかの局面では、グルタミンは、グルタミン、例えばL-グルタミンの遊離形態である。いくつかの態様では、基礎培地中のグルタミン、例えばL-グルタミンの濃度は、約0.5mM～1mM、0.5mM～1.5mM、0.5mM～2mM、0.5mM～2.5mM、0.5mM～3mM、0.5mM～3.5mM、0.5mM～4mM、0.5mM～4.5mM、0.5mM～5mM、1mM～1.5mM、1mM～2mM、1mM～2.5mM、1mM～3mM、1mM～3.5mM、1mM～4mM、1mM～4.5mM、1mM～5mM、1.5mM～2mM、1.5mM～2.5mM、1.5mM～3mM、1.5mM～3.5mM、1.5mM～4mM、1.5mM～4.5mM、1.5mM～5mM、2mM～2.5mM、2mM～3mM、2mM～3.5mM、2mM～4mM、2mM～4.5mM、2mM～5mM、2.5mM～3mM、2.5mM～3.5mM、2.5mM～4mM、2.5mM～4.5mM、2.5mM～5mM、3mM～3.5mM、3mM～4mM、3mM～4.5mM、3mM～5mM、3.5mM～4mM、3.5mM～4.5mM、3.5mM～5mM、4mM～4.5mM、4mM～5mMもしくは4.5mM～5mMであるか、または約0.5mM～1mM、0.5mM～1.5mM、0.5mM～2mM、0.5mM～2.5mM、0.5mM～3mM、0.5mM～3.5mM、0.5mM～4mM、0.5mM～4.5mM、0.5mM～5mM、1mM～1.5mM、1mM～2mM、1mM～2.5mM、1mM～3mM、1mM～3.5mM、1mM～4mM、1mM～4.5mM、1mM～5mM、1.5mM～2mM、1.5mM～2.5mM、1.5mM～3mM、1.5mM～3.5mM、1.5mM～4mM、1.5mM～4.5mM、1.5mM～5mM、2mM～2.5mM、2mM～3mM、2mM～3.5mM、2mM～4mM、2mM～4.5mM、2mM～5mM、2.5mM～3mM、2.5mM～3.5mM、2.5mM～4mM、2.5mM～4.5mM、2.5mM～5mM、3mM～3.5mM、3mM～4mM、3mM～4.5mM、3mM～5mM、3.5mM～4mM、3.5mM～4.5mM、3.5mM～5mM、4mM～4.5mM、4mM～5mMもしくは4.5mM～5mM未満（両端の値を含む）である。いくつかの態様では、基礎培地中のグルタミン、例えばL-グルタミンの濃度は、少なくとも約0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、または5mMである。いくつかの態様では、基礎培地中のグルタミン、例えばL-グルタミンの濃度は、最大約2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mMである。いくつかの態様では、基礎培地中のグルタミン、例えばL-グルタミンの濃度は、約2mMである。

【0309】

いくつかの態様では、基礎培地はさらに、タンパク質またはペプチドを含み得る。いくつかの態様では、少なくとも1つのタンパク質は、非哺乳動物起源のものではない。いくつかの態様では、少なくとも1つのタンパク質は、ヒトであるかまたはヒトに由来する。いくつかの態様では、少なくとも1つのタンパク質は、組換えである。いくつかの態様では、少なくとも1つのタンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、インスリン、フィブロネクチン、アプロチニンまたはフェツインを含む。いくつかの態様では、タンパク質は、アルブミン、インスリンまたはトランスフェリンの1つまたは複数、任意でヒトまたは組換えアルブミン、インスリンまたはトランスフェリンの1つまたは複数を含む。

【0310】

いくつかの態様では、タンパク質は、アルブミンまたはアルブミン代替物である。いくつかの態様では、アルブミンは、ヒト由来アルブミンである。いくつかの態様では、アルブミンは、組換えアルブミンである。いくつかの態様では、アルブミンは、天然ヒト血清

10

20

30

40

50

アルブミンである。いくつかの態様では、アルブミンは、組換えヒト血清アルブミンである。いくつかの態様では、アルブミンは、非ヒト供給源由来の組換えアルブミンである。アルブミン代替物は、任意のタンパク質またはポリペプチド供給源であり得る。そのようなタンパク質またはポリペプチド試料の例は、ウシ脳下垂体抽出物、植物加水分解物（例えば、コメ加水分解物）、ウシ胎児アルブミン（フェツイン）、タマゴアルブミン、ヒト血清アルブミン（HSA）、または別の動物由来アルブミン、ニワトリ抽出物、ウシ胚抽出物、AlbuMAX（登録商標）I、およびAlbuMAX（登録商標）IIを含むが、それらに限定されない。いくつかの態様では、タンパク質またはペプチドは、トランスフェリンを含む。いくつかの態様では、タンパク質またはペプチドは、フィブロンекチンを含む。いくつかの態様では、タンパク質は、フェツインを含む。

10

【0311】

いくつかの態様では、1つまたは複数の追加のタンパク質は、基礎培地に加えられる血清代替サプリメントの一部である。血清代替サプリメントの例は、例えば、Immune Cell Serum Replacement (ThermoFisher、#A2598101) またはSmith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan;4(1):e31に記載されているものを含む。

【0312】

ある特定の態様では、細胞は、異種または組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、ウイルスベクターを導入した後、18時間、24時間、30時間、36時間、40時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間もしくは96時間超、約18時間、24時間、30時間、36時間、40時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間もしくは96時間超、または少なくとも18時間、24時間、30時間、36時間、40時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間もしくは96時間超にわたりインキュベートされる。ある特定の態様では、細胞は、異種または組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチド、例えば、ウイルスベクターを導入した後、1日、2日、3日、4日もしくは4日超、約1日、2日、3日、4日もしくは4日超、または少なくとも1日、2日、3日、4日もしくは4日超にわたりインキュベートされる。いくつかの態様では、インキュベートすることは、遺伝子操作の前の30分間～2時間、1時間～8時間の間、6時間～12時間の間、12時間～18時間の間、16時間～24時間の間、18時間～30時間の間、24時間～48時間の間、24時間～72時間の間、42時間～54時間の間、60時間～120時間の間、96時間～120時間の間、90時間の間、1日～7日の間、3日～8日の間、1日～3日の間、4日～6日の間、または4日～5日の間の時間にわたり実施される。いくつかの態様では、インキュベートすることは、18時間～30時間または約18時間～30時間の間である。特定の態様では、インキュベートすることは、24時間もしくは約24時間または1日もしくは約1日である。

20

30

【0313】

ある特定の態様では、総インキュベーション期間は、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間もしくは120時間、約12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間もしくは120時間、または少なくとも12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間もしくは120時間である。ある特定の態様では、総インキュベーション期間は、1日、2日、3日、4日もしくは5日、約1日、2日、3日、4日もしくは5日、または少なくとも1日、2日、3日、4日もしくは5日である。特定の態様では、インキュベーションは、120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、54時間、48時間、42時間、36時間、30時間、24時間、18時間もしくは12時間、約120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、54時間、48時間、42時間、36時間、30時間、24時間、18時間もしくは12時間以内完了する。特定の態様では、インキュベーションは

40

50

、1日、2日、3日、4日もしくは5日、約1日、2日、3日、4日もしくは5日、または1日、2日、3日、4日もしくは5日以内に完了する。いくつかの態様では、総インキュベーション期間は、12時間～120時間、18時間～96時間、24時間～72時間、もしくは24時間～48時間、または約12時間～120時間、18時間～96時間、24時間～72時間、もしくは24時間～48時間（両端の値を含む）である。いくつかの態様では、総インキュベーション期間は、1時間～48時間、4時間～36時間、8時間～30時間、もしくは12時間～24時間、または約1時間～48時間、4時間～36時間、8時間～30時間、もしくは12時間～24時間（両端の値を含む）である。特定の態様では、インキュベーションは、それぞれ、24時間、48時間もしくは72時間または約24時間、48時間もしくは72時間、または1日、2日もしくは3日または約1日、2日もしくは3日にわたり実施される。特定の態様では、インキュベーションは、24時間±6時間、48時間±6時間、または72時間±6時間にわたり実施される。特定の態様では、インキュベーションは、72時間もしくは約72時間または3日もしくは約3日にわたり実施される。いくつかの態様では、インキュベーションは、異種または組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドを細胞のゲノムへ組み込むのに十分な期間にわたり実施される。

【0314】

特定の態様では、インキュベーションは、刺激の開始後、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間、約12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、48時間の時点で開始される。特定の態様では、インキュベーションは、刺激の開始後、0.5日、1日、1.5日もしくは2日、約0.5日、1日、1.5日もしくは2日、または少なくとも0.5日、1日、1.5日もしくは2日の時点で開始される。特定の態様では、インキュベーションは、刺激の開始の120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、54時間、48時間、42時間、36時間、30時間、24時間、18時間もしくは12時間、約120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、54時間、48時間、42時間、36時間、30時間、24時間、18時間もしくは12時間、または120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、54時間、48時間、42時間、36時間、30時間、24時間、18時間もしくは12時間以内に開始される。特定の態様では、インキュベーションは、刺激の開始の11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、もしくは4時間、刺激の開始の約11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、もしくは4時間、刺激の開始の11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、もしくは4時間以内に開始される。特定の態様では、インキュベーションは、刺激の開始の5日、4日、3日、2日、1日もしくは0.5日、約5日、4日、3日、2日、1日もしくは0.5日、または5日、4日、3日、2日、1日もしくは0.5日以内に開始される。

【0315】

いくつかの態様では、インキュベーションは、刺激の開始後、24時間～120時間、36時間～108時間、48時間～96時間、もしくは48時間～72時間、または約24時間～120時間、36時間～108時間、48時間～96時間、もしくは48時間～72時間（両端の値を含む）に完了する。いくつかの態様では、インキュベーションは、刺激の開始から、120時間、108時間、96時間、72時間、48時間もしくは36時間、約120時間、108時間、96時間、72時間、48時間もしくは36時間、または120時間、108時間、96時間、72時間、48時間もしくは36時間以内に完了する。いくつかの態様では、インキュベーションは、刺激の開始から、5日、4.5日、4日、3日、2日もしくは1.5日、約5日、4.5日、4日、3日、2日もしくは1.5日、または5日、4.5日、4日、3日、2日もしくは1.5日以内に完了する。特定の態様では、インキュベーションは、刺激の開始後、24時間±6時間、48時間±6時間、または72時間±6時間の時間後に完了する。いくつかの態様では、インキュベーションは、72時間後もしくは約72時間後、または3日後もしくは約3日後に完了する。

【0316】

上記いずれかの態様の一部において、操作された細胞は、細胞集団（例えば生存T細胞数）を拡大するための培養条件下ではインキュベートされない。上記いずれかの態様の一

10

20

30

40

50

部において、細胞は、インキュベーションまたは培養中に生存細胞の量を増加させる培養条件下ではインキュベートされない。例えばいくつかの局面において、細胞は、インキュベーション終了時の全生存細胞の量をインキュベーション開始時の全生存細胞の数と比較して増加させる条件（例えば培養条件）下ではインキュベートされない。いくつかの態様において、細胞は、拡大をもたらさうる条件下でインキュベートされるが、そのインキュベーション条件は細胞集団を拡大する目的では実行されない。いくつかの態様において、拡大および増殖を促進または助長しない条件下でインキュベートされた細胞を、非拡大（non-expanded）細胞または低拡大（minimally expanded）細胞ということもある（セクションI-G参照）。

【0317】

いくつかの態様において、形質導入細胞または操作された細胞は、遺伝子操作工程、例えば形質導入またはトランスフェクションによって細胞に組換えポリペプチドを導入する工程に続く、増殖および/または拡大を促進する培養条件下でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、組換えポリヌクレオチド、例えば組換え受容体をコードするポリヌクレオチドが細胞に形質導入またはトランスフェクトされた後に、培養される。いくつかの態様では、培養により、操作されたT細胞の1つまたは複数の培養組成物が生産される。いくつかの態様において、そのような培養条件は、集団内の細胞の増殖、拡大、活性化および/または生存を誘導するように設計しうる。特定態様において、培養条件は、特定の培地、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、作用物質、例えば栄養素、アミノ酸、抗生物質、イオンおよび/または刺激因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、および細胞の成長、分裂および/または拡大を促進するように設計された他の任意の作用物質のうちの1つまたは複数を含むことができる。いくつかの態様において、増殖および/または拡大を促進する条件化でインキュベートされた細胞を、拡大細胞（expanded cell）ということもある（セクションI-G参照）。

【0318】

特定態様において、細胞は、培養条件下、 0.25×10^6 細胞/mL、 0.5×10^6 細胞/mL、 0.75×10^6 細胞/mL、 1.0×10^6 細胞/mL、 1.25×10^6 細胞/mL、 1.5×10^6 細胞/mL、 1.75×10^6 細胞/mLもしくは 2.0×10^6 細胞/mL、または約 0.25×10^6 細胞/mL、 0.5×10^6 細胞/mL、 0.75×10^6 細胞/mL、 1.0×10^6 細胞/mL、 1.25×10^6 細胞/mL、 1.5×10^6 細胞/mL、 1.75×10^6 細胞/mLもしくは 2.0×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベート（例えば培養）される。特定態様において、細胞は、培養条件下、 0.25×10^6 細胞/mL～ 1.0×10^6 細胞/mLまたは約 0.25×10^6 細胞/mL～ 1.0×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、培養条件下、 0.25×10^6 細胞/mL～ 0.75×10^6 細胞/mLまたは約 0.25×10^6 細胞/mL～ 0.75×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、培養条件下、 0.5×10^6 細胞/mL～ 0.75×10^6 細胞/mLまたは約 0.5×10^6 細胞/mL～ 0.75×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、培養条件下、 0.25×10^6 細胞/mL～ 0.5×10^6 細胞/mLまたは約 0.25×10^6 細胞/mL～ 0.5×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、培養条件下、 0.75×10^6 細胞/mLまたは約 0.75×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。特定態様において、細胞は、培養条件下、 0.5×10^6 細胞/mLまたは約 0.5×10^6 細胞/mLの濃度でインキュベートされる。

【0319】

いくつかの態様において、操作された細胞は、加えられた細胞を培養するための、細胞培地および/または細胞を例えば供給口から充填することができる容器において、培養（cultivate）（例えば培養（culture））される。細胞は、例えば細胞の拡大および/または増殖などのために細胞の培養が望まれる任意の細胞供給源に由来することができる。

【0320】

いくつかの局面において、培養培地は、T細胞などの細胞の成長、拡大または増殖をサポートする適合した培養培地である。いくつかの局面において、培地は、塩、アミノ酸、

10

20

30

40

50

ビタミン、糖類またはそれらの任意の組合せの混合物を含有する液状物であることができる。いくつかの態様において、培養培地は、例えばインキュベーション中の細胞の拡大または増殖を刺激するために、1つまたは複数の刺激条件または刺激物質を、さらに含有する。いくつかの態様において、刺激条件は、1つまたは複数のサイトカイン、例えばIL-2、IL-7またはIL-15から選択されるものであるか、それらを含む。いくつかの態様において、サイトカインは組換えサイトカインである。特定態様において、1つまたは複数のサイトカインはヒト組換えサイトカインである。一定の態様において、1つまたは複数のサイトカインは、T細胞によって発現されおよび/またはT細胞にとって内在性である受容体に結合しおよび/または結合する能力を有する。特定態様において、1つまたは複数のサイトカインは、4-アルファ-ヘリックスバンドルサイトカインファミリー (4-alpha-helix bundle family of cytokines) のメンバーであるか、それらを含む。いくつかの態様において、4-アルファヘリックスバンドルサイトカインファミリーのメンバーとしては、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-9 (IL-9)、インターロイキン12 (IL-12)、インターロイキン15 (IL-15)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) および顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、1つまたは複数のサイトカインはIL-15であるか、IL-15を含む。特定態様において、1つまたは複数のサイトカインはIL-7であるか、IL-7を含む。特定態様において、1つまたは複数のサイトカインは組換えIL-2であるか、組換えIL-2を含む。

【0321】

いくつかの態様において、培養中の培養培地における1つまたは複数のサイトカインの濃度は、独立して、1IU/mL~1500IU/mLまたは約1IU/mL~1500IU/mL、例えば1IU/mL~100IU/mL、2IU/mL~50IU/mL、5IU/mL~10IU/mL、10IU/mL~500IU/mL、50IU/mL~250IU/mLもしくは100IU/mL~200IU/mL、50IU/mL~1500IU/mL、100IU/mL~1000IU/mLもしくは200IU/mL~600IU/mL、または約1IU/mL~100IU/mL、2IU/mL~50IU/mL、5IU/mL~10IU/mL、10IU/mL~500IU/mL、50IU/mL~250IU/mLもしくは100IU/mL~200IU/mL、50IU/mL~1500IU/mL、100IU/mL~1000IU/mLもしくは200IU/mL~600IU/mLである。いくつかの態様において、1つまたは複数のサイトカインの濃度は、独立して、少なくとも1IU/mL、5IU/mL、10IU/mL、50IU/mL、100IU/mL、200IU/mL、500IU/mL、1000IU/mLもしくは1500IU/mL、または少なくとも約1IU/mL、5IU/mL、10IU/mL、50IU/mL、100IU/mL、200IU/mL、500IU/mL、1000IU/mLもしくは1500IU/mLである。

【0322】

いくつかの態様において、操作された細胞の組成物は、25~38℃、例えば30~37℃、例えば37℃±2℃または約37℃±2℃の温度で培養される。いくつかの態様において、この培養条件は、培養 (culture)、例えば培養 (cultivation) または拡大 (expansion) が、細胞の所望のまたは閾値である密度、濃度、数または用量をもたらすまで、ある期間にわたって実行される。いくつかの態様において、インキュベーションは、培養、例えば培養または拡大が、細胞の所望のまたは閾値である密度、濃度、数または用量をもたらすまで、ある期間にわたって実行される。いくつかの態様において、インキュベーションは、24時間、48時間、72時間、96時間、5日、6日、7日、8日、9日もしくはそれ以上より長い、または約24時間、48時間、72時間、96時間、5日、6日、7日、8日、9日もしくはそれ以上より長い、または約24時間、48時間、72時間、96時間、5日、6日、7日、8日、9日もしくはそれ以上、または24時間、48時間、72時間、96時間、5日、6日、7日、8日、9日もしくはそれ以上にわたる。

【0323】

いくつかの態様において、細胞は、細胞培養中の二酸化炭素の標的量が維持される条件下で、インキュベートまたは培養される。いくつかの局面において、これにより、成長中の細胞の最適な培養、拡大および増殖が保証される。いくつかの局面において、二酸化炭素 (CO₂) の量は、10%~0% (v/v) の該ガス、例えば8%~2% (v/v) の該ガス、例

例えば5%または約5% (v/v) CO₂の量である。

【0324】

特定態様において、培養は閉鎖システムにおいて実施される。一定の態様において、培養は無菌条件下の閉鎖システムにおいて実施される。いくつかの態様において、操作された細胞の組成物は閉鎖システムから取り出され、培養のためのバイオリアクタに入れられおよび/または接続される。培養のための好適なバイオリアクタの例としては、GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius BioSTAT RM 20 | 50、Finesse SmartRockerバイオリアクタシステムおよびPall XRSバイオリアクタシステムが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、バイオリアクタを使って、培養工程の少なくとも一部分の間は、細胞を灌流および/または混和する。

10

【0325】

いくつかの態様において、バイオリアクタに封入され、接続されおよび/またはバイオリアクタの制御を受けつつ培養された細胞は、バイオリアクタを使わずに培養された細胞、例えば静的条件下で培養された細胞、例えば混和、揺動、運動 (motion) および/または灌流を伴わずに培養された細胞よりも、迅速な拡大を培養中に起こす。いくつかの態様において、バイオリアクタに封入され、接続されおよび/またはバイオリアクタの制御を受けつつ培養された細胞は、14日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日、2日、60時間、48時間、36時間、24時間または12時間以内に、閾値である拡大、細胞数および/または細胞密度に到達し、またはそれを達成する。いくつかの態様において、バイオリアクタに封入され、接続されおよび/またはバイオリアクタの制御を受けつつ培養された細胞は、細胞がバイオリアクタに封入され、接続されおよび/またはバイオリアクタの制御を受けつつ培養されない例示的および/または代替プロセスで培養された細胞よりも、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、閾値である拡大、細胞数および/または細胞密度に到達し、またはそれを達成する。

20

【0326】

いくつかの態様において、混和は、揺動および/または運動 (motioning) であるか、それらを含む。いくつかの態様において、細胞は、バイオリアクタに関連して使用される容器、例えばバッグを使ってインキュベートされる。場合により、バイオリアクタは振動または揺動に供することができ、これは、いくつかの局面では、酸素移動を増加させることができる。バイオリアクタの運動には、バイオリアクタの水平軸に沿った回転、垂直軸に沿った回転、傾斜した (tiltedまたはinclined) 水平軸に沿った揺動運動、またはそれらの任意の組合せが含まれるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、インキュベーションの少なくとも一部分は、揺動しながら実行される。揺動速度および揺動角度は、望ましい攪拌が達成されるように調節されうる。いくつかの態様において、揺動角度は、20°、19°、18°、17°、16°、15°、14°、13°、12°、11°、10°、9°、8°、7°、6°、5°、4°、3°、2°もしくは1°、または約20°、19°、18°、17°、16°、15°、14°、13°、12°、11°、10°、9°、8°、7°、6°、5°、4°、3°、2°もしくは1°である。一定の態様において、揺動角度は6~16°である。別の態様において、揺動角度は7~16°である。別の態様において、揺動角度は8~12°である。いくつかの態様において、揺動速度は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40rpmである。いくつかの態様において、揺動速度は、両端の値を含む4~12rpm、例えば4~6rpmである。細胞培養拡大の少なくとも一部分は、例えば5°~10°、例えば6°の角度、一定した揺動速度、例えば5~15RPM、例えば6RPMまたは10RPMの速度での、揺動運動を伴って実施される。

30

40

【0327】

いくつかの態様において、細胞、例えば操作された細胞、例えば操作されたT細胞、操

50

作されたCD3+T細胞、操作されたCD4+T細胞または操作されたCD8+T細胞を含む組成物は、界面活性剤の存在下で培養される。特定態様において、組成物の細胞の培養は、例えば混和、揺動、運動および/または灌流ゆえに培養中に生じるせん断ストレスの量を低減する。特定態様では、細胞、例えば操作された細胞、例えば操作されたT細胞、操作されたCD3+T細胞、操作されたCD4+T細胞または操作されたCD8+T細胞の組成物が界面活性剤と共に培養され、培養中に、または培養の完了から少なくとも1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日もしくは7日後または7日超後に、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%または少なくとも99.9%のT細胞が生残する、例えば生存しおよび/または壊死、プログラム細胞死、もしくはアポトーシスを起こさない。特定態様では、細胞、例えば操作されたT細胞、例えば操作されたCD3+T細胞、操作されたCD4+T細胞または操作されたCD8+T細胞の組成物が界面活性剤の存在下で培養され、例えばせん断またはせん断誘発性ストレスなどにより細胞死、例えばプログラム細胞死、アポトーシス、および/または壊死を起こす細胞は、50%未満、40%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、5%未満、1%未満、0.1%未満または0.01%未満である。

【0328】

特定態様において、細胞、例えば操作されたT細胞、例えば操作されたCD4+T細胞または操作されたCD8+T細胞の組成物は、0.1 $\mu\text{l/ml}$ ~10.0 $\mu\text{l/ml}$ 、0.2 $\mu\text{l/ml}$ ~2.5 $\mu\text{l/ml}$ 、0.5 $\mu\text{l/ml}$ ~5 $\mu\text{l/ml}$ 、1 $\mu\text{l/ml}$ ~3 $\mu\text{l/ml}$ または2 $\mu\text{l/ml}$ ~4 $\mu\text{l/ml}$ の界面活性剤の存在下で培養される。いくつかの態様において、細胞、例えば操作されたT細胞、例えば操作されたCD4+T細胞または操作されたCD8+T細胞の組成物は、0.1 $\mu\text{l/ml}$ 、0.2 $\mu\text{l/ml}$ 、0.4 $\mu\text{l/ml}$ 、0.6 $\mu\text{l/ml}$ 、0.8 $\mu\text{l/ml}$ 、1 $\mu\text{l/ml}$ 、1.5 $\mu\text{l/ml}$ 、2.0 $\mu\text{l/ml}$ 、2.5 $\mu\text{l/ml}$ 、5.0 $\mu\text{l/ml}$ 、10 $\mu\text{l/ml}$ 、25 $\mu\text{l/ml}$ もしくは50 $\mu\text{l/ml}$ 、または約0.1 $\mu\text{l/ml}$ 、0.2 $\mu\text{l/ml}$ 、0.4 $\mu\text{l/ml}$ 、0.6 $\mu\text{l/ml}$ 、0.8 $\mu\text{l/ml}$ 、1 $\mu\text{l/ml}$ 、1.5 $\mu\text{l/ml}$ 、2.0 $\mu\text{l/ml}$ 、2.5 $\mu\text{l/ml}$ 、5.0 $\mu\text{l/ml}$ 、10 $\mu\text{l/ml}$ 、25 $\mu\text{l/ml}$ もしくは50 $\mu\text{l/ml}$ 、または少なくとも0.1 $\mu\text{l/ml}$ 、0.2 $\mu\text{l/ml}$ 、0.4 $\mu\text{l/ml}$ 、0.6 $\mu\text{l/ml}$ 、0.8 $\mu\text{l/ml}$ 、1 $\mu\text{l/ml}$ 、1.5 $\mu\text{l/ml}$ 、2.0 $\mu\text{l/ml}$ 、2.5 $\mu\text{l/ml}$ 、5.0 $\mu\text{l/ml}$ 、10 $\mu\text{l/ml}$ 、25 $\mu\text{l/ml}$ もしくは50 $\mu\text{l/ml}$ の界面活性剤の存在下で培養される。一定の態様において、細胞の組成物は、2 $\mu\text{l/ml}$ または約2 $\mu\text{l/ml}$ の界面活性剤の存在下で培養される。

【0329】

いくつかの態様において、界面活性剤は、液体および/または固体の表面張力を低減する作用物質であるか、それを含む。例えば界面活性剤としては、脂肪アルコール（例えばステリルアルコール）、ポリオキシエチレングリコールオクチルフェノールエーテル（例えばTriton X-100）またはポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル（例えばポリソルベート20、40、60）が挙げられる。一定の態様において、界面活性剤は、ポリソルベート80（PS80）、ポリソルベート20（PS20）、ポロキサマー188（P188）からなる群より選択される。ある例示的態様において、合成フィード培地（chemically defined feed media）中の界面活性剤の濃度は、約0.0025%~約0.25%（v/v）のPS80、約0.0025%~約0.25%（v/v）のPS20、または約0.1%~約5.0%（w/v）のP188である。

【0330】

いくつかの態様において、界面活性剤は、そこに加えられたアニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、双性イオン性界面活性剤または非イオン性界面活性剤であるか、それを含む。好適なアニオン性界面活性剤としては、アルキルスルホネート、アルキルホスフェート、アルキルホスホネート、ラウリン酸カリウム、トリエタノールアミンステアレート、ラウリル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、アルキルポリオキシエチレンサルフェート、アルギン酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウム、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシン、ホスファチジルイノシトール、ジホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸およびそれらの塩、カ

ルボキシメチルセルロースナトリウム、コール酸および他の胆汁酸（例えばコール酸、デオキシコール酸、グリココール酸、タウロコール酸、グリコデオキシコール酸）ならびにそれらの塩（例えばデオキシコール酸ナトリウム）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0331】

いくつかの態様において、好適な非イオン性界面活性剤として、グリセリルエステル、ポリオキシエチレン脂肪アルコールエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（ポリソルベート）、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ソルビタンエステル、グリセロールモノステアレート、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、セチルアルコール、セトステアリルアルコール、ステアリルアルコール、アリアルアルキルポリエーテルアルコール、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマー（ポロキサマー）、ポロキサミン、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、非結晶セルロース、デンプンおよびデンプン誘導体を含む多糖、例えばヒドロキシエチルデンプン（HES）、ポリビニルアルコール、ならびにポリビニルピロリドンが挙げられる。一定の態様において、非イオン性界面活性剤はポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのコポリマーであり、好ましくはプロピレングリコールとエチレングリコールのブロックコポリマーである。そのようなポリマーは、ポロキサマーという商標で販売されており、PLURONIC（登録商標）F68またはKolliphor（登録商標）P188と呼ばれる場合もある。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルには、短いアルキル鎖を有するものが含まれる。そのような界面活性剤の一例はSOLUTOL（登録商標）HS15、ポリエチレン-660-ヒドロキシステアレートである。

【0332】

いくつかの態様において、好適なカチオン性界面活性剤としては、天然リン脂質、合成リン脂質、四級アンモニウム化合物、塩化ベンザルコニウム、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、キトサン、ラウリルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、アシルカルニチン塩酸塩、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（DDAB）、ジオレイオールトリメチルアンモニウムプロパン（dioleyoltrimethyl ammonium propane）（DOTAP）、ジミリストイルトリメチルアンモニウムプロパン（DMTAP）、ジメチルアミノエタンカルバモイルコレステロール（DC-Chol）、1,2-ジアシルグリセロ-3-（O-アルキル）ホスホコリン、O-アルキルホスファチジルコリン、アルキルピリジニウムハライド、または長鎖アルキルアミン、例えばn-オクチルアミンおよびオレイルアミン☆を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。

【0333】

双性イオン性界面活性剤は電氣的に中性であるが、同じ分子内に局所的に正電荷と負電荷を有する。好適な双性イオン性界面活性剤としては双性イオン性リン脂質が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。好適なリン脂質として、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ジアシル-グリセロ-ホスホエタノールアミン（例えばジミリストイル-グリセロ-ホスホエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイル-グリセロ-ホスホエタノールアミン（DPPE）、ジステアロイル-グリセロ-ホスホエタノールアミン（DSPE）およびジオレオリル-グリセロ-ホスホエタノールアミン（dioleoyl-glycero-phosphoethanolamine）（DOPE））が挙げられる。本発明ではアニオン性リン脂質と双性イオン性リン脂質とを含むリン脂質の混合物を使用する。そのような混合物としては、リゾリン脂質、卵リン脂質もしくはダイズリン脂質またはそれらの任意の組合せが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。リン脂質は、アニオン性であれ、双性イオン性であれ、リン脂質の混合物であれ、塩もしくは脱塩物、水素化物もしくは部分水素化物、または天然半合成物もしくは合成物でありうる。

【0334】

一定の態様において、界面活性剤はポロキサマー、例えばポロキサマー188である。いくつかの態様において、細胞の組成物は、0.1 $\mu\text{l/ml}$ ~10.0 $\mu\text{l/ml}$ 、0.2 $\mu\text{l/ml}$ ~2.5 $\mu\text{l/ml}$ 、0.5 $\mu\text{l/ml}$ ~5 $\mu\text{l/ml}$ 、1 $\mu\text{l/ml}$ ~3 $\mu\text{l/ml}$ 、または2 $\mu\text{l/ml}$ ~4 $\mu\text{l/ml}$ のポロキサ

マーの存在下で培養される。いくつかの態様において、細胞の組成物は、 $0.1\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.2\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.4\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.6\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.8\ \mu\text{l/ml}$ 、 $1\ \mu\text{l/ml}$ 、 $1.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $2.0\ \mu\text{l/ml}$ 、 $2.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $5.0\ \mu\text{l/ml}$ 、 $10\ \mu\text{l/ml}$ 、 $25\ \mu\text{l/ml}$ もしくは $50\ \mu\text{l/ml}$ 、または約 $0.1\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.2\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.4\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.6\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.8\ \mu\text{l/ml}$ 、 $1\ \mu\text{l/ml}$ 、 $1.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $2.0\ \mu\text{l/ml}$ 、 $2.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $5.0\ \mu\text{l/ml}$ 、 $10\ \mu\text{l/ml}$ 、 $25\ \mu\text{l/ml}$ もしくは $50\ \mu\text{l/ml}$ 、または少なくとも $0.1\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.2\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.4\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.6\ \mu\text{l/ml}$ 、 $0.8\ \mu\text{l/ml}$ 、 $1\ \mu\text{l/ml}$ 、 $1.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $2.0\ \mu\text{l/ml}$ 、 $2.5\ \mu\text{l/ml}$ 、 $5.0\ \mu\text{l/ml}$ 、 $10\ \mu\text{l/ml}$ 、 $25\ \mu\text{l/ml}$ もしくは $50\ \mu\text{l/ml}$ の界面活性剤の存在下で培養される。一定の態様において、細胞の組成物は、 $2\ \mu\text{l/ml}$ または約 $2\ \mu\text{l/ml}$ のポロキサマーの存在下で培養される。

【0335】

いくつかの局面において、操作されたT細胞集団（例えばCD4、CD8）は、それぞれが閾値である量または細胞密度に到達するまで、別々に拡大されるか、一緒に拡大されうる。特定態様において、培養は、細胞が閾値である量、濃度および/または拡大に到達したときに、細胞を採取することなどによって終わる。特定態様において、培養は、細胞が、例えば培養の着手時または開始時における細胞の密度の量を基準にしておよび/またはそれと比べて、1.5倍の拡大、2倍の拡大、2.5倍の拡大、3倍の拡大、3.5倍の拡大、4倍の拡大、4.5倍の拡大、5倍の拡大、6倍の拡大、7倍の拡大、8倍の拡大、9倍の拡大、10倍の拡大、もしくは10倍超の拡大、または約1.5倍の拡大、2倍の拡大、2.5倍の拡大、3倍の拡大、3.5倍の拡大、4倍の拡大、4.5倍の拡大、5倍の拡大、6倍の拡大、7倍の拡大、8倍の拡大、9倍の拡大、10倍の拡大、もしくは10倍超の拡大、または少なくとも1.5倍の拡大、2倍の拡大、2.5倍の拡大、3倍の拡大、3.5倍の拡大、4倍の拡大、4.5倍の拡大、5倍の拡大、6倍の拡大、7倍の拡大、8倍の拡大、9倍の拡大、10倍の拡大、もしくは10倍超の拡大を達成したときに終わる。いくつかの態様において、閾値拡大は、例えば培養の着手時または開始時における細胞の密度の量を基準にしておよび/またはそれと比べて、4倍の拡大である。いくつかの態様において、培養は、細胞が閾値総細胞量、例えば閾値細胞数を達成したときに、細胞を採取することなどによって終わる。いくつかの態様において、培養は、細胞が閾値総有核細胞（threshold total nucleated cell:TNC）数を達成したときに終わる。いくつかの態様において、培養は、細胞が閾値である細胞の生存量、例えば閾値生存細胞数を達成したときに終わる。いくつかの態様において、閾値細胞数は、 50×10^6 細胞、 100×10^6 細胞、 200×10^6 細胞、 300×10^6 細胞、 400×10^6 細胞、 600×10^6 細胞、 800×10^6 細胞、 1000×10^6 細胞、 1200×10^6 細胞、 1400×10^6 細胞、 1600×10^6 細胞、 1800×10^6 細胞、 2000×10^6 細胞、 2500×10^6 細胞、 3000×10^6 細胞、 4000×10^6 細胞、 5000×10^6 細胞、 $10,000\times 10^6$ 細胞、 $12,000\times 10^6$ 細胞、 $15,000\times 10^6$ 細胞もしくは $20,000\times 10^6$ 細胞、または約 50×10^6 細胞、 100×10^6 細胞、 200×10^6 細胞、 300×10^6 細胞、 400×10^6 細胞、 600×10^6 細胞、 800×10^6 細胞、 1000×10^6 細胞、 1200×10^6 細胞、 1400×10^6 細胞、 1600×10^6 細胞、 1800×10^6 細胞、 2000×10^6 細胞、 2500×10^6 細胞、 3000×10^6 細胞、 4000×10^6 細胞、 5000×10^6 細胞、 $10,000\times 10^6$ 細胞、 $12,000\times 10^6$ 細胞、 $15,000\times 10^6$ 細胞もしくは $20,000\times 10^6$ 細胞、または少なくとも 50×10^6 細胞、 100×10^6 細胞、 200×10^6 細胞、 300×10^6 細胞、 400×10^6 細胞、 600×10^6 細胞、 800×10^6 細胞、 1000×10^6 細胞、 1200×10^6 細胞、 1400×10^6 細胞、 1600×10^6 細胞、 1800×10^6 細胞、 2000×10^6 細胞、 2500×10^6 細胞、 3000×10^6 細胞、 4000×10^6 細胞、 5000×10^6 細胞、 $10,000\times 10^6$ 細胞、 $12,000\times 10^6$ 細胞、 $15,000\times 10^6$ 細胞もしくは $20,000\times 10^6$ 細胞であるか、上記閾値のいずれかの生存細胞である。

【0336】

特定態様において、培養は、細胞が閾値細胞数を達成したときに終わる。いくつかの態様において、培養は、閾値細胞数が達成された後、6時間、12時間、24時間、36時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日超、または約6時間、12時間、24時間、36時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日超の時点、または6時間、12時間、24時間、36時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日超以内に終わる。特

定態様において、培養は、閾値細胞数が達成された後、1日または約1日の時点で終了される。一定の態様において、閾値密度は、 0.1×10^6 細胞/ml、 0.5×10^6 細胞/ml、 1×10^6 細胞/ml、 1.2×10^6 細胞/ml、 1.5×10^6 細胞/ml、 1.6×10^6 細胞/ml、 1.8×10^6 細胞/ml、 2.0×10^6 細胞/ml、 2.5×10^6 細胞/ml、 3.0×10^6 細胞/ml、 3.5×10^6 細胞/ml、 4.0×10^6 細胞/ml、 4.5×10^6 細胞/ml、 5.0×10^6 細胞/ml、 6×10^6 細胞/ml、 8×10^6 細胞/mlもしくは 10×10^6 細胞/ml、または約 0.1×10^6 細胞/ml、 0.5×10^6 細胞/ml、 1×10^6 細胞/ml、 1.2×10^6 細胞/ml、 1.5×10^6 細胞/ml、 1.6×10^6 細胞/ml、 1.8×10^6 細胞/ml、 2.0×10^6 細胞/ml、 2.5×10^6 細胞/ml、 3.0×10^6 細胞/ml、 3.5×10^6 細胞/ml、 4.0×10^6 細胞/ml、 4.5×10^6 細胞/ml、 5.0×10^6 細胞/ml、 6×10^6 細胞/ml、 8×10^6 細胞/mlもしくは 10×10^6 細胞/ml、または少なくとも 0.1×10^6 細胞/ml、 0.5×10^6 細胞/ml、 1×10^6 細胞/ml、 1.2×10^6 細胞/ml、 1.5×10^6 細胞/ml、 1.6×10^6 細胞/ml、 1.8×10^6 細胞/ml、 2.0×10^6 細胞/ml、 2.5×10^6 細胞/ml、 3.0×10^6 細胞/ml、 3.5×10^6 細胞/ml、 4.0×10^6 細胞/ml、 4.5×10^6 細胞/ml、 5.0×10^6 細胞/ml、 6×10^6 細胞/ml、 8×10^6 細胞/mlもしくは 10×10^6 細胞/mlであるか、上記閾値のいずれかの生存細胞である。特定態様において、培養は細胞が閾値密度を達成したときに終わる。いくつかの態様において、培養は、閾値密度が達成された後、6時間、12時間、24時間、36時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日もしくは7日超、または約6時間、12時間、24時間、36時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日もしくは7日超の時点で、または6時間、12時間、24時間、36時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日もしくは7日超以内に終わる。特定態様において、培養は、閾値密度が達成された後、1日または約1日の時点で終了される。

10

20

【0337】

いくつかの態様において、培養の少なくとも一部分は静的条件下で実行される。いくつかの態様において、培養の少なくとも一部分は、例えば培養中に消耗した培地を流し出し新鮮な培地を流し入れるために、灌流しながら実行される。いくつかの態様において、本方法は、新鮮な培養培地を例えば供給口を通して細胞培養に灌流する工程を含む。いくつかの態様において、灌流中に加えられる培養培地は、1つまたは複数の刺激物質、例えば1つまたは複数の組換えサイトカイン、例えばIL-2、IL-7および/またはIL-15を含有する。いくつかの態様において、灌流中に加えられる培養培地は静的インキュベーション中に使用されるものと同じ培養培地である。

30

【0338】

いくつかの態様において、インキュベーションに続いて、容器、例えばバッグは、細胞治療薬を製造し、生成させ、または作製するための1つまたは複数の他の処理工程を実行するためのシステムに再接続され、例えば遠心分離チャンバを含有するシステムに再接続される。いくつかの局面において、培養された細胞は、培養された細胞を製剤化するために、バッグからチャンバの内部キャビティに移される。

【0339】

a. インキュベーション中の細胞のモニタリング

いくつかの態様において、細胞は、例えば拡大（例えば培養）下または低拡大/非拡大（例えばインキュベーション）下でのインキュベーション工程中に、モニターされる。モニタリングは、例えば、細胞形態、細胞表現型、細胞生存率、細胞死、および/または細胞濃度（例えば生存細胞濃度）を確認（例えば測定、定量）するために実施しうる。いくつかの態様において、モニタリングは、手動で、例えば人間オペレーターによって実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、自動化されたシステムによって実施される。自動化されたシステムは培養された細胞への手動インプットをごくわずかしかな必要としないか、または全く必要としない。いくつかの態様において、モニタリングは、手動でも、自動化されたシステムによっても実施される。

40

【0340】

一定の態様において、細胞は、手動インプットを何も必要としない自動化されたシステムによってモニターされる。いくつかの態様において、自動化されたシステムは、インキ

50

ュベーションを例えば拡大条件下または低拡大条件下で受けている細胞を、バイオリアクタまたはインキュベーターから取り出し、モニターした後、バイオリアクタまたはインキュベーターに戻すことができるように、バイオリアクタ、例えば本明細書記載のバイオリアクタ、またはインキュベーター、例えば本明細書に記載するものに適合している。いくつかの態様において、モニタリングおよびインキュベーションは、閉じたループ構成で行われる。いくつかの局面では、閉じたループ構成において、自動化されたシステムおよびバイオリアクタまたはインキュベーターは無菌を保つ。諸態様において、自動化されたシステムは無菌である。いくつかの態様において、自動化されたシステムはインラインシステムである。

【0341】

いくつかの態様において、自動化されたシステムは、細胞形態、細胞表現型、細胞生存率、細胞死および/または細胞濃度（例えば生存細胞濃度）を検出するために、光学的技法（例えば顕微鏡法）の使用を含む。細胞の特質、生存率および濃度などを決定するのに好適な光学的技法はいずれも、本明細書で企図される。有用な光学的技法の非限定的な例として、明視野顕微鏡法、蛍光顕微鏡法、微分干渉（DIC）顕微鏡法、位相差顕微鏡法、デジタルホログラフィー顕微鏡法（DHM）、微分デジタルホログラフィー顕微鏡法（differential digital holography microscopy）（DDHM）またはそれらの組合せが挙げられる。微分デジタルホログラフィー顕微鏡法、DDHMおよび微分DHMは、本明細書では相互可換的に使用される。一定の態様において、自動化されたシステムは、微分デジタルホログラフィー顕微鏡を含む。一定の態様において、自動化されたシステムは、照明手段（例えばレーザー、led）を含む微分デジタルホログラフィー顕微鏡を含む。DDHM法の説明および使用は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるUS 7,362,449、EP 1,631,788、US 9,904,248およびUS 9,684,281に見いだしうる。

【0342】

DDHMは細胞のラベルフリー非破壊イメージングを可能にし、高コントラストのホログラフィー像をもたらす。撮像された物体（例えば培養細胞、細胞デブリ）を定量的に記述する複数の形態学的特質を得るために、像には物体セグメンテーションおよびさらなる解析を行いうる。したがって、例えば画像取得、画像処理、画像セグメンテーションおよび特質抽出の工程を使って、様々な特質（例えば細胞形態、表現型、細胞生存率、細胞濃度）をDDHMから直接評価または算出しうる。いくつかの態様において、自動化されたシステムは、ホログラフィー像を記録するためのデジタル記録デバイスを含む。いくつかの態様において、自動化されたシステムは、ホログラフィー像を解析するためのアルゴリズムを含むコンピュータを含む。いくつかの態様において、自動化されたシステムは、ホログラフィー像解析の結果を表示するためのモニターおよび/またはコンピュータを含む。いくつかの態様において、解析は自動化される（すなわちユーザーによるインプットなしで実施することができる）。培養工程中に細胞をモニターするための好適な自動化されたシステムの例として、Ovizio iLine F（Ovizio Imaging Systems NV/SA、ベルギー・ブリュッセル）が挙げられるが、それに限定されるわけではない。

【0343】

一定の態様において、モニタリングはインキュベーションの継続時間中、絶え間なく実施される。いくつかの態様において、モニタリングはリアルタイムに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは離散した時点で実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも15分ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも30分ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも45分ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも1時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも2時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも4時間ごとに実施される。いくつか

10

20

30

40

50

の態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも6時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも8時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも10時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも12時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも14時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも16時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも18時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも20時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも22時間ごとに実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも1日1回は実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも2日に1回は実施される。いくつかの態様において、モニタリングは、インキュベーション工程の継続時間中、少なくとも1回は実施される。

10

【0344】

いくつかの態様において、DHMまたはDDHMなどの光学的技法の使用を含めて、モニタリングによって決定することができる細胞の特質としては、細胞生存率、細胞濃度、細胞数および/または細胞密度が挙げられる。いくつかの態様では、細胞生存率が特徴づけられまたは決定される。いくつかの態様では、細胞の濃度、密度および/または数が特徴づけられまたは決定される。いくつかの態様では、生存細胞濃度、生存細胞数および/または生存細胞密度が特徴づけられまたは決定される。

20

【0345】

いくつかの態様では、例えば細胞が拡大のために培養条件下でのインキュベーションを受けているときに、細胞は、拡大の閾値、例えば1、2、3、4回またはそれ以上の集団倍加に到達するまで、自動化されたシステムによってモニターされる。いくつかの態様において、拡大の閾値に到達したら、細胞は、例えば自動的方法または手動的方法によって、例えば人間オペレーターによって採取される。拡大の閾値は、自動化されたシステムによって決定される培養された細胞の総濃度、総密度および/または総数に依存する。あるいは、拡大の閾値は生存細胞の濃度、密度および/または数に依存する。

30

【0346】

いくつかの態様において、採取された細胞は、例えば薬学的に許容される担体の存在下で、記載のとおり製剤化される。いくつかの態様において、採取された細胞は凍結保護物質の存在下で製剤化される。

【0347】

F. プロセス中の低分子

いくつかの態様では、本明細書において提供されるのは、操作された細胞（例えば、CAR-T細胞）を調節剤の存在下で製造または産生することを含む方法であって、それによって、製造または産生された操作された細胞の持続性、消耗の欠如および/または有効性が改善される方法である。いくつかの局面では、提供される方法は、例えば細胞療法において使用するための、(i) より少ない消耗した細胞および/または消耗に関連するマーカーもしくは表現型を呈するより少ない細胞を含有する；(ii) 割合が増加したメモリー様T細胞、例えば寿命の長いメモリーT細胞を含有する；(iii) あまり分化していない；(iv) 改善されたまたは増強された生存、拡大増殖、持続性および/または抗腫瘍活性を示す；(v) 改善された治療有効性を示す；ならびに/あるいは(vi) 代替法、例えば、調節剤の存在下で行われない代替法によって産生される操作された細胞の組成物と比較して改善された臨床応答持続期間を示す、組換え受容体を発現するように操作された初代T細胞を含む細胞の組成物を産生する。いくつかの態様では、代替プロセスとの比較は、調節剤の存在下で

40

50

行われないう点だけが異なる同じプロセスに対してなされる。

【0348】

いくつかの態様では、調節剤は、細胞を収集、採取または製剤化する前に、細胞または細胞集団と接触させる（例えば、調節剤は、細胞内にあるかまたは1つもしくは複数の細胞表面分子と相互作用する）。いくつかの態様では、調節剤は、細胞が刺激、例えば、T細胞活性化に供される前、その間またはその後に存在する。いくつかの態様では、調節剤は、刺激、例えば、セクションI-Cなどにおける本明細書に記載される刺激の前またはその間に、細胞または細胞集団と接触させる（例えば、調節剤は、細胞内にあるかまたは1つもしくは複数の細胞表面分子と相互作用する）。いくつかの態様では、調節剤は、細胞が操作、例えば、形質導入に供される前、その間またはその後に存在する。いくつかの態様では、調節剤は、操作、例えば、セクションI-Eなどにおける本明細書に記載される操作の前またはその間に、細胞または細胞集団と接触させる（例えば、調節剤は、細胞内にあるかまたは1つもしくは複数の細胞表面分子と相互作用する）。いくつかの態様では、調節剤は、インキュベーション、例えば、セクションI-E-3などにおける本明細書に記載されるインキュベーションの間またはその後に、細胞または細胞集団と接触させる（例えば、調節剤は、細胞内にあるかまたは1つもしくは複数の細胞表面分子と相互作用する）。いくつかの態様では、調節剤は、刺激（例えば、セクションI-Cなどにおける本明細書に記載される刺激）の間、操作（セクションI-Eなどにおける本明細書に記載される操作）の間、および/またはインキュベーション（例えば、セクションI-E-3などにおける本明細書に記載されるインキュベーション）の間に、細胞または細胞集団と接触させる（例えば、調節剤は、細胞内にあるかまたは1つもしくは複数の細胞表面分子と相互作用する）。ある特定の態様では、細胞または細胞集団は、インキュベーション後であるが細胞を収集、採取または製剤化するための工程の前に、調節剤の存在下でプロセス、手順、工程または技法を受ける。特定の態様では、細胞または細胞集団は、インキュベーション後に、調節剤の存在下でプロセス、手順、工程または技法を受ける。

【0349】

いくつかの態様では、操作される（例えば、形質導入される）べき細胞は、操作の前に、調節剤と、例えば、培養培地中で接触させる（例えば、インキュベートさせる）。いくつかの態様では、細胞は、調節剤の存在下で操作される。いくつかの態様では、1つまたは複数の操作される細胞は、調節剤と、例えば、1つまたは複数の組換えサイトカインを含まないかいはなる組換えサイトカインも含まない基礎培地などの培養培地中で接触させる（例えば、インキュベートさせる）。また、いくつかの態様では、操作された細胞の製造または産生の間に、例えば細胞に基づく治療のための、(i) 調節剤と(ii) 操作されるべき細胞および/または操作に供された細胞（操作された細胞を含む）、例えば初代免疫細胞（例えば、T細胞）とを含む組成物も提供される。

【0350】

いくつかの態様では、調節剤は、PI3K阻害剤、Akt経路、mTOR阻害剤、Ras/ERK阻害剤、NF- κ B阻害剤、BET阻害剤、CDK阻害剤、CRACチャネル阻害剤、Cox阻害剤、ドーパミン拮抗剤、ERK5阻害剤、グルココルチコイド、IGF-1R阻害剤、IKK阻害剤、JAK阻害剤、Lck阻害剤、PDK1阻害剤、Raf阻害剤、およびSyk阻害剤からなる群より選択される。いくつかの態様では、Src阻害剤は、ダサチニブ、サラカチニブ、ボスチニブ、KX01、およびレバステチニブ（DCC-2036）を含むが、それらに限定されない。いくつかの態様では、Src阻害剤は、レバステチニブ（DCC-2036）を含む。本開示の調節剤として有用な特定の作用物質は、WO2019018603、WO2018106595およびPCT/US2018/058812に開示されており、これらの特許は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0351】

いくつかの態様では、調節剤は、mTORなどの標的の1つまたは複数の活性を阻害する、低減する、防止するおよび/または阻害する、低減するもしくは防止することが可能である、化合物、低分子、例えば、有機低分子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、siRNAもしくはポリペプチド、またはその断片、アイソフォーム、バリエーション、類似体もしくは

は誘導体であるかそれを含む。特定の態様では、作用物質は、10kD未満、9kD未満、8kD未満、7kD未満、6kD未満、5kD未満、4kD未満、3kD未満、2kD未満、1kD未満、0.5kD未満または0.1kD未満の分子量を有する低分子である。

【0352】

いくつかの態様では、調節剤は、mTOR活性を阻害する作用物質であるかそれを含む。いくつかの態様では、操作される（例えば、形質導入される）べき細胞は、操作の前に、mTOR阻害剤と接触させる（例えば、インキュベートさせる）。いくつかの態様では、細胞は、mTOR阻害剤の存在下で操作される。いくつかの態様では、1つまたは複数の操作される細胞は、mTOR阻害剤と、例えば、1つまたは複数の組換えサイトカインを含まないかいはなる組換えサイトカインも含まない基礎培地などの培養培地中で接触させる（例えば、インキュベートさせる）。また、いくつかの態様では、操作された細胞の製造または産生の間に、(i) mTOR阻害剤と(ii) 操作されるべき細胞および/または操作に供された細胞（操作された細胞を含む）とを含む組成物も提供される。

【0353】

いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、mTORの少なくとも1つの活性を阻害する、低減するおよび/または減少させる、かつ/あるいは、阻害する、低減するおよび/または減少させることが可能である。特定の態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、mTORキナーゼ活性を阻害する、低減するおよび/または減少させる、かつ/あるいは、阻害する、低減するおよび/または減少させることが可能である。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、mTORC1活性、例えば、mTORC1キナーゼ活性および/またはmTORC2活性を阻害する、低減するおよび/または減少させる、かつ/あるいは、阻害する、低減するおよび/または減少させることが可能である。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、mTORC1複合体の形成を防止するおよび/または前記複合体を不安定化させる。特定の態様では、活性を阻害する作用物質は、mTORC2複合体の形成を防止するおよび/または前記複合体を不安定化させる。

【0354】

特定の態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、少なくとも1つの追加のキナーゼの活性を阻害する。ある特定の態様では、少なくとも1つの追加のキナーゼは、PI3Kである。特定の態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、(i) PI3K活性を阻害しない；(ii) mTOR活性のIC₅₀でPI3K活性を検出可能に阻害しない；および/または(iii) mTOR活性を検出可能に阻害するすべての濃度でPI3Kを検出可能に阻害しない。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、mTORC1およびmTORC2キナーゼ活性を、PI3K活性と比べて阻害する、例えば、選択的に阻害する。ある特定の態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、mTORC1およびmTORC2キナーゼ活性を阻害する。特定の態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、mTORC1活性、例えばmTORC1キナーゼ活性を選択的に阻害する。

【0355】

ある特定の態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、(i) mTORC2活性を阻害しない；(ii) mTORC1活性のIC₅₀でmTORC2活性を検出可能に阻害しない；および/または(iii) mTORC1活性を検出可能に阻害するすべての濃度でmTORC2を検出可能に阻害しない。

【0356】

いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、CC214-1 (Celgene)、CC214-2 (Celgene)、CC0470324、GDC0980、SAR245409、VS5584、PI-103、SF1126、BGT226、XL765、PF-04691502、ダクトリシブ (NVP-BEZ235およびBEZ-235とコード名が付けられた)、ピラゾロピリミジン、トリニル (Torin I)、トルキニブ (Torkinib) (PP242)、PP30、Ku-0063794、WAY-600 (Wyeth)、WAY-687 (Wyeth)、WAY-354 (Wyeth)、DS3078a、ラパマイシン (シロリムス)、テムシロリムス (CC1779)、エベロリムス (RAD001)、デフォロリムス (AP23573)、AZD8055 (AstraZeneca)、およびOSI-027 (OSI) を含むが、それらに限定されない。いくつか

10

20

30

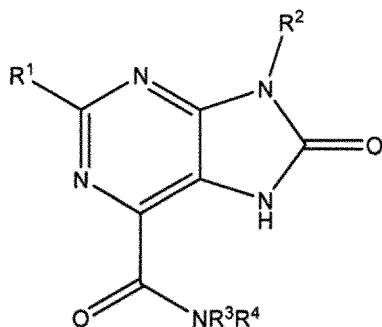
40

50

の態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、式 (I)、式 (II) または式 (III) に提供される式を有するかそれを含む。いくつかの態様では、作用物質は、化合物155、化合物246または化合物63である。

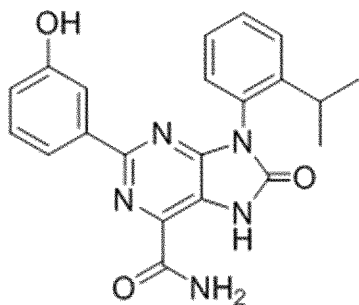
【0357】

特定の態様では、作用物質は、式 (I)



式 (I)

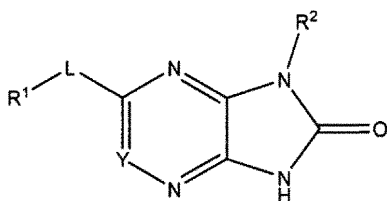
〔式中、R¹は、置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、または置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルであり、R²は、置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、または置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルであり、R³およびR⁴は、独立して、HまたはC₁₋₈アルキルである〕に示される式を含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、式 (I) の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であるかそれを含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、式 (I) の化合物またはその薬学的に許容される塩であるかそれを含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、2-(3-ヒドロキシフェニル)-9-(2-イソプロピルフェニル)-8-オキソ-8,9-ジヒドロ-7H-プリン-6-カルボキサミドまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であるかそれを含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、



またはその薬学的に許容される塩であるかそれを含む。

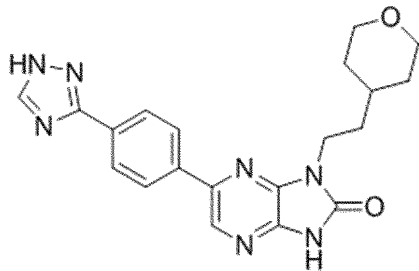
【0358】

いくつかの態様では、作用物質は、式 (II)



式 (II)

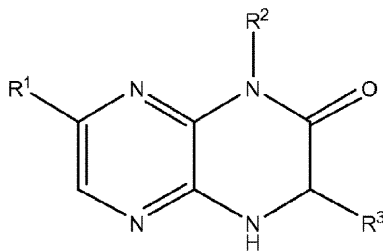
[式中、Lは、直接の結合、NHまたはOであり、Yは、NまたはCR³であり、式中、R¹は、H、置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキル、置換もしくは非置換のC₂₋₈アルケニル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキルまたは置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルであり、R²は、H、置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、または置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルであり、R³は、H、置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキル、-NHR⁴または-N(R⁴)₂であり、R⁴は、出現毎に、独立して、置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のヘテロアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、または置換もしくは非置換のヘテロシクロアルキルである]に示される式を含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、式(II)の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であるかそれを含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、6-(4-(2H-1,2,4-トリアゾール-3-イル)フェニル)-1-(2-(テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル)エチル)-1H-イミダゾ[4,5-b]ピラジン-2(3H)-オンまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であるかそれを含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、



またはその薬学的に許容される塩であるかそれを含む。

【0359】

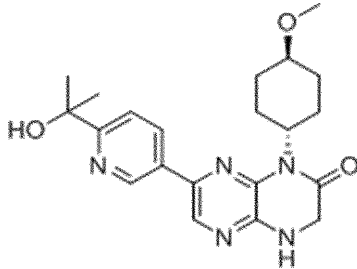
特定の態様では、作用物質は、式(III)



式(III)

[式中、R¹は、置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキル、置換もしくは非置換のアリール、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクリル、または置換もしくは非置換のヘテロシクリルアルキルであり、R²は、H、置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキル、置換もしくは非置換のシクロアルキル、置換もしくは非置換のヘテロシクリル、置換もしくは非置換のヘテロシクリルアルキル、置換もしくは非置換のアラルキル、または置換もしくは非置換のシクロアルキルアルキルであり、R³は、H、または置換もしくは非置換のC₁₋₈アルキルである]に示される式を含む。ある特定の態様では、R¹は、置換もしくは非置換のアリールまたは置換もしくは非置換のヘテロアリールである。いくつかの態様では、R¹は、置換されているピリジルである。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、式(III)の化合物またはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であるかそれを含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、式(I

II) の化合物またはその薬学的に許容される塩であるかそれを含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、7-(6-(2-ヒドロキシプロパン-2-イル)ピリジン-3-イル)-1-((1*r*,4*r*)-4-メトキシシクロヘキシル)-3,4-ジヒドロピラジノ[2,3-*b*]ピラジン-2(1*H*)-オンまたはその薬学的に許容される塩もしくは溶媒和物であるかそれを含む。いくつかの態様では、mTOR活性を阻害する作用物質は、



またはその薬学的に許容される塩であるかそれを含む。

【0360】

当業者に理解されるように、本発明の範囲はまた、標的に基づいてそれぞれのクラスに機能的に分類される他の作用物質すべての類似体または誘導体も含み、その類似体または誘導体は、塩、エステル、エーテル、溶媒和物、水和物、立体異性体またはプロドラッグを含むが、それらに限定されない。

【0361】

G. 細胞の採取および収集

いくつかの態様では、細胞は、採取または収集される。特定の態様では、細胞は、セクションI-E-3に記載の通り、インキュベーションの完了後に収集または採取される。ある特定の態様では、収集または採取された細胞は、アウトプット集団の細胞である。いくつかの態様では、アウトプット集団は、生存のCD3⁺、CD4⁺、CD8⁺である細胞、および/または、組換え受容体、例えば、CAR⁺に対して陽性である細胞を含む。特定の態様では、採取されたCD4⁺ T細胞および製剤化されたCD8⁺ T細胞は、アウトプットCD4⁺およびCD8⁺ T細胞である。特定の態様では、製剤化された細胞集団、例えば、濃縮されたCD4⁺およびCD8⁺細胞の製剤化された集団は、アウトプット細胞集団、例えば、濃縮されたCD4⁺およびCD8⁺細胞のアウトプット集団である。

【0362】

いくつかの態様では、採取、収集または製剤化される細胞または細胞集団は、いかなる拡大増殖も、例えば、インキュベーションまたは培養の間に生存細胞の量を増加させる条件下で細胞がインキュベートまたは培養されるいかなる条件も受けていない。例えば、いくつかの局面では、採取される細胞は、インキュベーションまたは培養の開始時の総生存細胞の数と比較してインキュベーションまたは培養の終了時に総生存細胞の量が増加するいかなるインキュベーションまたは培養も受けていない。いくつかの態様では、採取される細胞は、インキュベーションまたは培養プロセスの開始時と比較してインキュベーションまたは培養プロセスの終了時に生存細胞の総数を増加させる（例えば、拡大増殖させる）ことを明確に目的としたいかなるインキュベーションまたは培養工程も受けていない。いくつかの態様では、細胞は、拡大増殖をもたらす可能性のある条件下でインキュベートまたは培養されるが、インキュベートまたは培養条件は、細胞集団を拡大増殖させる目的で行われない。いくつかの態様では、採取される細胞は、拡大増殖工程を含まないプロセスで製造されたにもかかわらず、拡大増殖を受けている可能性がある。いくつかの態様では、拡大増殖工程を含まない製造プロセスは、非拡大増殖プロセスまたは最小拡大増殖プロセスと称される。「非拡大増殖」プロセスはまた、「最小拡大増殖」プロセスとも称される場合がある。いくつかの態様では、非拡大増殖プロセスまたは最小拡大増殖プロセスは、拡大増殖のための工程を含まないプロセスにもかかわらず、拡大増殖を受けた細胞をもたらす可能性がある。いくつかの態様では、採取される細胞は、細胞集団の拡大増殖を全体として低減、抑制、最小化または排除するように設計された培地組成物を含むインキ

ュベーションまたは培養工程を受けている可能性がある。いくつかの態様では、収集、採取または製剤化される細胞は、バイオリアクタ内であるいはインキュベーションまたは培養の全部または一部で細胞が揺動、回転、振盪または還流される条件下で実施される、インキュベーションまたは培養を過去に受けていない。

【0363】

いくつかの態様において、採取され、収集されまたは製剤化される細胞または細胞集団は拡大を経ており、例えばインキュベーションまたは培養中に生存細胞の量を増加させる条件下で細胞がインキュベートまたは培養される条件に付されている。例えばいくつかの局面において、採取される細胞は、インキュベーションまたは培養の終了時に全生存細胞の量がインキュベーションまたは培養の開始時における全生存細胞の数と比較して増加するインキュベーションまたは培養を経ている。いくつかの態様において、採取される細胞は、インキュベーションプロセスまたは培養プロセスの終了時における生存細胞の総数をインキュベーションプロセスまたは培養プロセスの開始時と比較して増加させる（例えば拡大する）ことを明示的に目的として、インキュベーション工程または培養工程を経ている。いくつかの態様において、採取される細胞は、細胞集団全体の拡大を助長または促進するように設計された培地組成物を含むインキュベーション工程または培養工程を経ている。いくつかの態様において、収集、採取または製剤化される細胞は、バイオリアクタ中で実施された、またはインキュベーションもしくは培養の全部または一部分で細胞が揺動、回転、振とうまたは灌流される条件下で実施された、インキュベーションまたは培養を事前に経ている。

【0364】

いくつかの態様において、細胞の選択、単離、分離、濃縮および/または精製工程は、細胞または細胞集団が採取、収集または製剤化される前に実施される。いくつかの態様において、細胞の選択、単離、分離、濃縮および/または精製工程は、本明細書に開示するクロマトグラフィーを使って実行される。いくつかの態様において、クロマトグラフィーによるT細胞選択工程は、T細胞形質導入後、ただし細胞を採取する前、細胞を収集する前および/または細胞を製剤化する前に実施される。いくつかの態様において、クロマトグラフィーによるT細胞選択工程は、細胞を採取する直前に実施される。

【0365】

一定の態様において、刺激（例えばオンカラム刺激）の開始から細胞を収集、採取または製剤化するまでの時間は、24時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間もしくは120時間、または約24時間、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間もしくは120時間未満である。いくつかの態様において、刺激の開始から、操作された細胞を生成させるために細胞を収集、採取または製剤化するまで、刺激の開始から細胞を収集、採取または製剤化するまでの時間は、両端の値を含む12時間～24時間、36時間～120時間、48時間～96時間もしくは48時間～72時間、または約12時間～24時間、36時間～120時間、48時間～96時間もしくは48時間～72時間である。特定態様において、インキュベーションの開始から細胞を採取、収集または製剤化するまでの時間は、48時間、72時間もしくは96時間、または約48時間、72時間もしくは96時間、または48時間、72時間もしくは96時間未満である。特定態様において、インキュベーションの開始から細胞を採取、収集または製剤化するまでの時間は、48時間±6時間、72時間±6時間または96時間±6時間である。特定態様において、インキュベーションの開始から細胞を採取、収集または製剤化するまでの時間は、96時間もしくは4日または約96時間もしくは4日である。

【0366】

特定態様において、細胞は、無血清培地に、例えば本明細書のセクションIIIまたは参照により本明細書に組み入れられるPCT/US2018/064627に記載されているものなどに、採取、収集または製剤化される。いくつかの態様において、細胞は、例えば本明細書のセ

10

20

30

40

50

クションI-E-3で述べたインキュベーション中に使用したものと同一無血清培地中に採取、収集または製剤化される。

【0367】

特定態様において、細胞は、1つまたは複数の組換えサイトカインを含有せず、血清成分を含有しない、すなわち無血清培地であるが、セクションIII.B記載のものなど、1つまたは複数の追加成分を含有してもよい基本培地に、採取、収集または製剤化される。特定態様において、そのような無血清培地の使用は、細胞の維持には対応するが、細胞を活性化または細胞を代謝的に活性にしようする一定の因子を含まず、これにより、細胞を休止状態もしくは静止状態となる状態または休止状態もしくは静止状態となる可能性が高い状態にする、栄養に乏しい培地を提供する。いくつかの局面において、そのような無血清培地の存在下でのインキュベーションは、刺激（例えばセクションI-Cによるもの）および遺伝子操作（例えば形質導入）後の細胞の回復を可能にする。いくつかの局面では、そのような無血清培地の存在下で細胞を採取、収集または製剤化することで、例えば採取/製剤化された細胞を冷凍保存した後、使用直前に融解した場合に、損傷または生存率の低下を起こしにくい細胞を含有するアウトプット組成物（例えば治療用細胞組成物）の製剤がもたらされる。いくつかの態様において、アウトプット組成物（例えば治療用細胞組成物）中の細胞は、融解されたときに、カスパーゼまたはアポトーシスの他のマーカーのレベルが、類似する培地であるが1つまたは複数の組換えサイトカイン、血清、またはアウトプット組成物（例えば治療用細胞組成物）の冷凍保存時に細胞を代謝的により活性にしようする他の因子を含有する培地中でインキュベートされた細胞よりも低い。

【0368】

一定の態様では、濃縮T細胞の1つまたは複数の集団が製剤化される。特定態様では、濃縮T細胞の1つまたは複数の集団が、当該1つまたは複数の集団が操作および/または培養された後に、製剤化される。特定態様において、前記1つまたは複数の集団はインプット集団またはアウトプット組成物（例えば選択され刺激された細胞）である。いくつかの態様では、1つまたは複数のインプット集団またはアウトプット組成物が、事前に凍結保護され貯蔵されており、インキュベーション（例えばセクションI-E-3記載のインキュベーション）に先立って融解される。

【0369】

一定の態様において、細胞は、例えばインキュベート中に生じる倍加など、1回、2回、3回、4回、5回、6回、8回、10回、20回以上の細胞倍加の前に、約1回、約2回、約3回、約4回、約5回、約6回、約8回、約10回、約20回以上の細胞集団の細胞倍加の前に、または少なくとも1回、少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも8回、少なくとも10回、少なくとも20回以上の細胞倍加の前に採取される。

【0370】

特定の態様では、細胞は、細胞の総数、例えば、インキュベートされた細胞またはインキュベーション（例えば、セクションI-E-3に記載の通りのインキュベーション）を受けた細胞の総数が、インプット集団の細胞の数、例えば、刺激試薬と接触させた細胞の総数の1、2、3、4、5、6、8、10、20倍もしくは20倍より多くを超える前または約1、2、3、4、5、6、8、10、20倍もしくは20倍より多くを超える前の時間に採取または収集される。いくつかの態様では、細胞は、インキュベートされた細胞の総数が、形質転換、形質導入またはスピノキュレートされた細胞の総数、例えば、ウイルスベクターと接触させた細胞の総数の1、2、3、4、5、6、8、10、20倍もしくは20倍より多くを超える前または約1、2、3、4、5、6、8、10、20倍もしくは20倍より多くを超える前の時間に採取または収集される。ある特定の態様では、細胞は、T細胞、生存T細胞、CD3+ T細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、CARを発現するT細胞、または前記のいずれかの組み合わせである。特定の態様では、細胞は、細胞の総数がインプット集団の細胞の総数を超える前の時間に採取または収集される。様々な態様では、細胞は、生存CD3+ T細胞の総数がインプット集団の生存CD3+細胞の総数を超える前の時間に採取または収集される。特定の

態様では、細胞は、細胞の総数が、形質転換、形質導入またはスピノキュレートされた細胞の細胞総数を超える前の時間に採取または収集される。様々な態様では、細胞は、生存CD3+ T細胞の総数が、形質転換、形質導入またはスピノキュレートされた細胞の生存CD3+細胞の総数を超える前の時間に採取または収集される。

【0371】

ある特定の態様では、製剤化された細胞は、アウトプット細胞である。いくつかの態様では、濃縮されたT細胞の製剤化された集団は、濃縮されたT細胞のアウトプット集団である。特定の態様では、製剤化されたCD4+ T細胞および製剤化されたCD8+ T細胞は、アウトプットCD4+およびCD8+ T細胞である。特定の態様では、製剤化された細胞集団、例えば、濃縮されたCD4+およびCD8+細胞の製剤化された集団は、アウトプット細胞集団、例えば、濃縮されたCD4+およびCD8+細胞のアウトプット集団である。

10

【0372】

いくつかの態様では、細胞は、バッグまたはバイアルなどの容器内に製剤化することができる。

【0373】

いくつかの態様において、細胞は、いくつかの局面では、薬学的に許容される担体または賦形剤を含みうる薬学的に許容される緩衝液中に製剤化される。いくつかの態様において、処理は、対象への投与のために薬学的に許容されるかまたは望ましい媒体または製剤化緩衝液への媒体の交換を含む。いくつかの態様において、処理する段階は、形質導入および/または拡大増殖された細胞を洗浄して、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体または賦形剤を含みうる薬学的に許容される緩衝液の中に細胞を置き換える段階を伴うことができる。薬学的に許容される担体または賦形剤を含むそのような薬学的形態の例は、細胞および組成物を対象に投与するために許容される形態に関連して以下に記述される任意のものでありうる。いくつかの態様における薬学的組成物は、疾患または状態を処置または予防するのに有効な量、例えば治療上有効または予防上有効な量の細胞を含有する。

20

【0374】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒性である、活性成分以外の、薬学的製剤中の成分をいう。薬学的に許容される担体は、緩衝液、賦形剤、安定剤、または保存料を含むが、これらに限定されることはない。

30

【0375】

いくつかの局面において、担体の選択は、一部には特定の細胞によって、および/または投与方法によって決定される。したがって、種々の適当な製剤が存在する。例えば、薬学的組成物は保存料を含みうる。適当な保存料としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、および塩化ベンザルコニウムが挙げられうる。いくつかの局面において、2つまたはそれ以上の保存料の混合物が用いられる。保存料またはその混合物は、典型的には全組成物の約0.0001重量%から約2重量%の量で存在する。担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)によって記述されている。薬学的に許容される担体は一般に、用いられる投与量および濃度でレシピエントに無毒性であり、以下のものが含まれるが、これらに限定されることはない: リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝剤; アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤; 保存料(塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール、メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノールおよびm-クレゾールなど); 低分子量(約10残基未満)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリンなどのタンパク質; ポリビニルピロリドンなどの親水性重合体; グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリジンなどのアミノ酸; 単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む他の炭水化物; EDTAなどのキレート剤; スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなど

40

50

の糖類; ナトリウムなどの塩形成対イオン; 金属錯体(例えばZn-タンパク質錯体); ならびに/またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン界面活性剤。

【0376】

いくつかの局面において緩衝剤が組成物に含まれる。適当な緩衝剤としては、例えばクエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに他のさまざまな酸および塩が挙げられる。いくつかの局面において、2つまたはそれ以上の緩衝剤の混合物が用いられる。緩衝剤またはその混合物は、典型的には全組成物の約0.001重量%~約4重量%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製するための方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)においてより詳細に記述されている。

10

【0377】

製剤は水溶液を含むことができる。製剤または組成物はまた、各活性が互いに悪影響を及ぼさない場合、細胞で処置される特定の適応症、疾患、または状態に有用な2つ以上の活性成分、好ましくは細胞に補完的な活性を有するものを含有しうる。そのような活性成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせて適当に存在する。したがって、いくつかの態様において、薬学的組成物は、化学療法剤、例えばアスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、および/またはビンクリスチンのような他の薬学的に活性な作用物質または薬物をさらに含む。

20

【0378】

いくつかの態様において組成物は、いくつかの局面では、選択されたpHに緩衝されうる、滅菌液体調製物、例えば等張水溶液、懸濁液、乳濁液、分散液、または粘性組成物として提供される。液体組成物は担体を含むことができ、担体は、例えば水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール)およびそれらの適当な混合物を含む溶媒または分散媒体であることができる。滅菌注射溶液は、適当な担体、希釈剤、または賦形剤、例えば滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどとの混合物などの溶媒中に細胞を組み込むことによって調製することができる。組成物は、所望される投与経路および製剤に依存して、湿潤剤、分散剤または乳化剤(例えばメチルセルロース)、pH緩衝剤、ゲル化または増粘添加剤、保存料、香味剤、および/または着色剤のような補助物質を含有することができる。いくつかの局面において標準的なテキストを参考にして適当な調製物を調製してもよい。

30

【0379】

抗菌保存料、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝液を含む、組成物の安定性および無菌性を高めるさまざまな添加剤を添加することができる。微生物の作用の防止は、さまざまな抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、およびソルビン酸によって確実にすることができる。注射可能な薬学的形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたすことができる。

【0380】

40

いくつかの態様において、製剤化緩衝液は凍結保存料を含有する。いくつかの態様において、細胞は、5%~20% DMSO溶液または5%~10% DMSO溶液のような、1.0%~30% DMSO溶液を含有する凍結保存溶液で製剤化される。いくつかの態様において、凍結保存溶液は、例えば、20% DMSOおよび8%ヒト血清アルブミン(HSA)を含有するPBS、または他の適当な細胞凍結培地であるか、またはそれを含有する。いくつかの態様において、凍結保存溶液は、例えば、少なくともまたは約7.5% DMSOであるか、またはそれを含有する。いくつかの態様において、処理段階は、形質導入および/または拡大増殖された細胞を洗浄して、凍結保存料溶液中の細胞と置き換える段階を伴うことができる。いくつかの態様において、細胞は、12.5%、12.0%、11.5%、11.0%、10.5%、10.0%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.0%、5.5%もしくは5.0% DMS

50

0または約12.5%、12.0%、11.5%、11.0%、10.5%、10.0%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.0%、5.5%もしくは5.0% DMSO、あるいは1%～15%、6%～12%、5%～10%または6%～8% DMSOの終濃度を有する培地および/または溶液の中で、凍結、例えば、凍結保護または凍結保存される。特定の態様において、細胞は、例えば、5.0%、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.25%、1.0%、0.75%、0.5%もしくは0.25% HSAまたは約5.0%、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.25%、1.0%、0.75%、0.5%もしくは0.25% HSA、あるいは0.1%～5%、0.25%～4%、0.5%～2%または1%～2% HSAの終濃度を有する培地および/または溶液の中で、凍結、例えば、凍結保護または凍結保存される。

【0381】

特定の態様において、濃縮されたT細胞、例えば、刺激され、操作され、および/または培養されたT細胞の組成物は、製剤化され、凍結保護され、その後にある量の時間の間、貯蔵される。ある種の態様において、製剤化された凍結保護細胞は、細胞が注入のために放出されるまで貯蔵される。特定の態様において、製剤化された凍結保護細胞は、1日～6ヶ月、1ヶ月～3ヶ月、1日～14日、1日～7日、3日～6日、6ヶ月～12ヶ月、または12ヶ月よりも長い間貯蔵される。いくつかの態様において、細胞は1日、2日、3日、4日、5日、6日もしくは7日間、約1日、2日、3日、4日、5日、6日もしくは7日間、または1日、2日、3日、4日、5日、6日もしくは7日未満の間、凍結保護および貯蔵される。ある種の態様において、貯蔵後に細胞は融解され、対象に投与される。ある種の態様において、細胞は5日間または約5日間貯蔵される。いくつかの態様において、製剤化された細胞は凍結保護されない。

【0382】

いくつかの態様において、製剤化は、培養細胞または拡大増殖細胞のような、細胞の洗浄、希釈または濃縮を含む1つまたは複数の処理段階を用いて実行される。いくつかの態様において、処理は、所与の用量またはその一部での投与のための細胞の数を含む単位用量形態組成物のような、所望の濃度または数への細胞の希釈または濃度を含むことができる。いくつかの態様において、処理段階は、容量低減を含み、それにより、必要に応じて細胞の濃度を増加させることができる。いくつかの態様において、処理段階は、容量追加を含み、それにより、必要に応じて細胞の濃度を減少させることができる。いくつかの態様において、処理は、形質導入および/または拡大増殖された細胞にある量の製剤化緩衝液を加えることを含む。いくつかの態様において、製剤化緩衝液の容量は、少なくとも50 mL、100 mL、200 mL、300 mL、400 mL、500 mL、600 mL、700 mL、800 mL、900 mL、もしくは1000 mL、または少なくとも約50 mL、100 mL、200 mL、300 mL、400 mL、500 mL、600 mL、700 mL、800 mL、900 mL、もしくは1000 mL、または約50 mL、100 mL、200 mL、300 mL、400 mL、500 mL、600 mL、700 mL、800 mL、900 mL、もしくは1000 mL、または50 mL、100 mL、200 mL、300 mL、400 mL、500 mL、600 mL、700 mL、800 mL、900 mL、もしくは1000 mLのような、10 mL～1000 mLまたは約10 mL～1000 mLである。

【0383】

いくつかの態様において、細胞組成物を製剤化するためのそのような処理段階は、閉鎖システムで実行される。そのような処理段階の例は、Sepax（登録商標）またはSepax 2（登録商標）細胞処理システムを伴う使用のためのものを含む、Biosafe SAによって製造され販売されている遠心分離チャンバのような、細胞処理システムに関連する1つまたは複数のシステムまたはキットと組み合わせた遠心分離チャンバを用いて実施されうる。例示的なシステムおよび方法は、国際公開WO2016/073602に記述されている。いくつかの態様において、方法は、上述の態様のいずれかにおいて、遠心分離チャンバの内部キャビティからの、薬学的に許容される緩衝液などの製剤化緩衝液中に製剤化された細胞の成果組成物である製剤化組成物の取り出しを行うことを含む。いくつかの態様において、製剤化組成物の取り出しは、閉鎖システムの一部として遠心分離チャンバと機能的に連結されているバッグなどの容器に対するものである。いくつかの態様において、バッグなどの

10

20

30

40

50

容器は、アウトプットラインまたはアウトプット位置でシステムに接続されている。

【0384】

いくつかの態様において、遠心分離チャンバまたは細胞処理システムに関連するものなどの閉鎖システムは、チューブラインの各端部に、ポートと接続された多方向のチューブマニホールドを含む多ポートアウトプットキットを含み、製剤化組成物の取り出しのために、ポートに1つまたは複数の容器を接続することができる。いくつかの局面において、所望の数または複数のアウトプット容器、例えばバッグを、少なくとも3、4、5、6、7、8つまたはそれ以上のような、1つまたは複数、一般には2つまたはそれ以上の多ポートアウトプットのポートに、滅菌して接続することができる。例えば、いくつかの態様において、1つまたは複数の容器、例えばバッグをポートに取り付けることができ、または全ポートよりも少ないポートに取り付けることができる。したがって、いくつかの態様において、システムは、アウトプット組成物の複数のアウトプットバッグ内への取り出しを行うことができる。

10

【0385】

いくつかの局面において、単回投与量の投与または複数回投与量の投与などの投与量の投与の量で、細胞は複数のアウトプットバッグの1つまたは複数に取り出されることができる。例えば、いくつかの態様において、アウトプットバッグはそれぞれ、所与の用量またはその分割量で投与するための細胞数を含有しうる。したがって、いくつかの局面において、各バッグは、投与のための単回用量を含んでいても、2つのアウトプットバッグ、または3つのアウトプットバッグのような、複数のアウトプットバッグのうちの2つ以上が、総合して投与のための1用量を構成するように、所望の用量の分割量を含有していてもよい。

20

【0386】

したがって、容器、例えばアウトプットバッグは、一般に、投与される細胞、例えばその1つまたは複数のその単位用量を含む。単位用量は、対象に投与されるべき細胞の量もしくは数、または投与されるべき細胞の数の2倍(もしくはそれ以上)でありうる。それは、対象に投与される細胞の最低の用量または最低可能用量でありうる。

【0387】

いくつかの態様において、容器、例えば、バッグの各々は、単位用量の細胞を個別に含む。したがって、いくつかの態様において、各容器は、同じ、またはほぼ同じ、もしくは実質的に同じ数の細胞を含む。いくつかの態様において、各単位用量は、少なくともまたは少なくとも約 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、または 1×10^8 個の操作された細胞、全細胞、T細胞、またはPBMCを含む。いくつかの態様において、各バッグの製剤化細胞組成物の容量は、10 mL~100 mL、例えば少なくともまたは少なくとも約20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、60 mL、70 mL、80 mL、90 mLもしくは100 mLである。

30

【0388】

いくつかの態様において、この方法によって産生されたそのような細胞、またはそのような細胞を含む組成物は、疾患または状態を処置するために対象に投与される。

【0389】

40

H. 刺激試薬の除去

いくつかの態様において、刺激試薬(例えば、オリゴマー刺激試薬)は、細胞を収集、採取、または製剤化した後に、収集された細胞または細胞集団から除去または分離される。いくつかの態様において、刺激試薬は、例えばセクションI-D記載の溶出工程および細胞収集工程後などクロマトグラフィーカラムからの収集後に、細胞または細胞集団から除去または分離される。いくつかの態様において、刺激試薬は、本明細書においてセクションI-E-3など記載のインキュベーションなどのインキュベーション後またはインキュベーション中に、細胞または細胞集団から除去または分離される。一定の態様において、刺激試薬(例えば、オリゴマー刺激試薬)を除去するため、細胞または細胞集団は、インキュベーション後ではあるが、細胞の収集、採取、または製剤化工程に先立ち、プロセス、手順、

50

工程、または技法を受ける。特定態様において、刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬）を除去するため、細胞または細胞集団は、インキュベーション後にプロセス、手順、工程、または技法を受ける。いくつかの局面において、刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬）がインキュベーション中に細胞から分離または除去された場合、インキュベーションの残りの期間、細胞は、分離または除去前と同じインキュベーション条件へと戻される。
【0390】

一定の態様において、刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬）は、細胞から除去および/または分離される。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、特定態様は、刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬）と細胞との間の結合および/または会合が、いくつかの状況では、インキュベーション中に経時的に低減されてよいことを企図する。一定の態様において、1つまたは複数の作用物質が加えられ、刺激試薬と細胞との間の結合および/または会合を低減させてよい。特定態様において、例えば、作用物質（例えば、競合剤または遊離結合剤といった物質）の添加といった細胞培養条件における変更によって、刺激試薬と細胞との間の結合および/または会合を低減させてよい。したがって、いくつかの態様において、刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬）は、細胞とは別に、例えばインキュベーション、細胞培養系、および/または溶液から細胞を除去せずに、インキュベーション、細胞培養系、および/または溶液から除去されてよい。

【0391】

一定の態様において、刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬）は、一定時間後に細胞から分離および/または除去される。特定態様において、一定時間は、刺激開始からの一定時間である。特定態様において、インキュベーションの開始は、細胞を刺激試薬および/または刺激試薬を含有する培地もしくは溶液と接触させた時点またはそのおおよその時点だと考えられる。特定態様において、刺激試薬は、刺激開始の120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、12時間、6時間、5時間、4時間、3時間、もしくは2時間以内（記載した値を含む）、または約120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、12時間、6時間、5時間、4時間、3時間、もしくは2時間以内（記載した値を含む）に細胞から除去または分離される。特定態様において、刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬）は、刺激が開始された48時間後または約48時間後に、細胞から除去または分離される。一定の態様において、刺激試薬は、刺激が開始された72時間後または約72時間後に、細胞から除去または分離される。いくつかの態様において、刺激試薬は、刺激が開始された96時間後または約96時間後に、細胞から除去または分離される。

【0392】

1. オリゴマー刺激試薬の除去

いくつかの態様において、本明細書において提供された方法のうちいずれかに従い作製または産生された刺激細胞の集団（すなわち、本明細書において記載のカラムクロマトグラフィーおよびオンカラム刺激による選択を受けた細胞）は、例えば1つまたは複数の刺激物質のシグナル伝達を軽減および/または終止させるため、競合剤または遊離結合剤といった物質の添加を受けた。いくつかの態様において、競合剤または遊離結合剤の添加は、本明細書において記載の溶出工程後に行われた（セクションI-Dを参照されたい）。いくつかの態様において、競合剤または遊離結合剤の添加は本明細書において記載の遺伝子操作工程後に行われた。いくつかの態様において、競合剤または遊離結合剤の添加は本明細書において記載の採取工程後に行われた。したがって、いくつかの態様において、刺激された細胞の集団は、例えばビオチンまたは例えばD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合剤といった物質の存在を含有する。いくつかの態様において、例えば、ビオチンまたは例えばD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合剤といった物質は、上述の工程のうち1つの間に物質が外因的に添加されなかった培養細胞（例えば、T細胞）の参照集団または調製物における物質の量よりも少なくとも1.5倍多く、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、またはそれ以上より多い量で存在している。いくつかの態様において、刺激細胞

の集団における、例えば、ビオチンまたは例えばD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合剤といった物質の量は、 $10\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ 、 $100\mu\text{M}\sim 500\mu\text{M}$ 、もしくは $10\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ 、または約 $10\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ 、 $100\mu\text{M}\sim 500\mu\text{M}$ 、もしくは $10\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ である。いくつかの態様において、 $10\mu\text{M}$ または約 $10\mu\text{M}$ のビオチンまたは例えばD-ビオチンなどのビオチン類似体は、細胞または細胞集団に加えられ、細胞または細胞集団からオリゴマー刺激試薬を分離または除去する。いくつかの態様において、 1mM または約 1mM のビオチンまたは例えばD-ビオチンなどのビオチン類似体は、細胞または細胞集団に加えられ、細胞または細胞集団からオリゴマー刺激試薬を分離または除去する。いくつかの態様において、 1mM または約 1mM のD-ビオチンは、細胞または細胞集団に加えられ、細胞または細胞集団からオリゴマー刺激試薬を分離または除去する。

10

【0393】

一定の態様において、1つまたは複数の刺激物質（例えば、TCRおよび/または共刺激因子を刺激または活性化する作用物質）は、オリゴマー試薬上に存在する複数の特定の結合部位（例えば、結合部位Z）を介するなどして、オリゴマー試薬に可逆的に結合されるなどして会合する。場合によっては、これにより、刺激物質が互いに密に配置されて、刺激物質によって結合されるまたは刺激物質によって認識される（少なくとも2コピーの）細胞表面分子を有する標的細胞を作用物質と接触させた場合に、アビディティー効果が生じうようになる。いくつかの局面において、刺激物質は結合部位Bで細胞の分子に対して低いアフィニティーを有し、結果、受容体結合試薬は、競合試薬の存在下にて細胞から分離する。したがって、いくつかの態様において、刺激物質は競合試薬の存在下にて細胞から除去される。

20

【0394】

いくつかの態様において、オリゴマー刺激試薬は、可逆的に接着された抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabを有するストレプトアビジンムテインオリゴマーである。いくつかの態様において、接着されているFabは、例えばストレプトアビジンムテインオリゴマーに可逆的に接着可能であるストレプトアビジン結合ドメインを含有する。抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabは互いに密に配置され、CD3および/またはCD28を発現しているT細胞が、可逆的に接着されたFabを有するオリゴマー刺激試薬と接触する状態となった場合に、アビディティー効果が生じうようになる。いくつかの局面において、FabはCD3およびCD28に対して低いアフィニティーを有し、結果、Fabは例えばビオチンまたはビオチンバリアントまたはビオチン類似体などの競合試薬の存在下で細胞から分離される。したがって、いくつかの態様において、Fabは例えばD-ビオチンといった競合試薬の存在下にて細胞から除去または分離される。

30

【0395】

いくつかの態様において、例えばオリゴマー刺激ストレプトアビジンムテイン試薬などのオリゴマー刺激試薬は、細胞を採取または製剤化するに先立って細胞または細胞集団から除去または分離される。いくつかの態様において、オリゴマー刺激ストレプトアビジンムテイン試薬などのオリゴマー刺激試薬は、例えばセクションI-FまたはセクションI-E-3といった本明細書において記載のインキュベーションなどのインキュベーション後、またはインキュベーション中に、例えばビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合試薬に接触または曝露させることにより、細胞または細胞集団から除去または分離される。一定の態様において、細胞または細胞集団は、例えばビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合試薬と接触またはこれに曝露され、インキュベーション後ではあるが細胞の遺伝子操作工程、採取工程、または製剤化工程に先立ち、例えば刺激性オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬などのオリゴマー刺激試薬を除去する。特定態様において、細胞または細胞集団は、例えばビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合試薬と接触またはこれに曝露され、インキュベーション後に、例えばオリゴマー刺激ストレプトアビジンムテイン試薬などのオリゴマー刺激試薬を除去する。いくつかの局面において、例えばオリゴマー刺激ストレプトアビジンムテイン試薬

40

50

などのオリゴマー刺激試薬が、例えばビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合試薬と例えば接触またはこれに曝露されることにより、インキュベーション中に細胞から分離または除去される場合（セクションI-E-3を参照されたい）、インキュベーションの残りの期間、細胞は、分離または除去前と同じインキュベーション条件へと戻される。

【0396】

いくつかの態様において、細胞からオリゴマー刺激試薬を除去または分離するために、細胞を、0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、10 μ M、100 μ M、500 μ M、0.01 μ M、1mM、もしくは10mMの競合試薬と、約0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、10 μ M、100 μ M、500 μ M、0.01 μ M、1mM、もしくは10mMの競合試薬と、または少なくとも0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、10 μ M、100 μ M、500 μ M、0.01 μ M、1mM、もしくは10mMの競合試薬と接触させる。種々の態様において、可逆的に接着された抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabを有する刺激性ストレプトアビジンムテインオリゴマーを細胞から除去または分離するために、細胞を、0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、10 μ M、100 μ M、500 μ M、0.01 μ M、1mM、もしくは10mMのビオチンもしくはD-ビオチンといったビオチン類似体と、約0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、10 μ M、100 μ M、500 μ M、0.01 μ M、1mM、もしくは10mMのビオチンもしくはD-ビオチンといったビオチン類似体と、または少なくとも0.01 μ M、0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、10 μ M、100 μ M、500 μ M、0.01 μ M、1mM、もしくは10mMのビオチンもしくはD-ビオチンといったビオチン類似体と接触させる。種々の態様において、可逆的に接着された抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabを有するストレプトアビジンムテインオリゴマーといった刺激性オリゴマー試薬を細胞から除去または分離するために、細胞を、例えば1mMなど、100 μ M～10mMまたは約100 μ M～10mMのビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体と接触させる。種々の態様において、細胞を、例えば1mMなど、100 μ M～10mMまたは約100 μ M～10mMのビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体と接触させ、D-ビオチンへの接触または曝露後、2時間、6時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間もしくは48時間にわたって、または約2時間、6時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間もしくは48時間にわたって接触させる。

【0397】

特定態様において、例えばオリゴマー刺激ストレプトアビジンムテイン試薬などのオリゴマー刺激試薬は、刺激開始の120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、もしくは12時間以内（記載した値を含む）、または約120時間、108時間、96時間、84時間、72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、もしくは12時間以内（記載した値を含む）に細胞から除去または分離される。特定態様において、オリゴマー刺激ストレプトアビジンムテイン試薬などのオリゴマー刺激試薬は、刺激が開始された48時間後または約48時間後に、細胞から除去または分離される。一定の態様において、オリゴマー刺激ストレプトアビジンムテイン試薬などのオリゴマー刺激試薬は、刺激が開始された72時間後または約72時間後に、細胞から除去または分離される。いくつかの態様において、オリゴマー刺激ストレプトアビジンムテイン試薬などのオリゴマー刺激試薬は、刺激が開始された96時間後または約96時間後に、細胞から除去または分離される。

【0398】

一定の態様において、細胞または細胞集団は、例えばビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合試薬と接触またはこれに曝露され、例えば、セクションI-E-3といった本明細書において記載のインキュベーション中またはインキュベーション後、刺激が開始された48時間後もしくは約48時間後または2日後もしくは約2日後に、例えば刺激性オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬などの刺激性オリゴマー試薬を除去する

。いくつかの局面において、例えば刺激性オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬などの刺激性オリゴマー試薬が、例えばビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合試薬と例えば接触またはこれに曝露されることによりインキュベーション中に細胞から分離または除去される場合、インキュベーションの残りの期間、細胞は、分離または除去前と同じインキュベーション条件へと戻される。別の局面では、例えば刺激性オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬などの刺激性オリゴマー試薬が、例えばビオチンまたはD-ビオチンといったビオチン類似体などの競合試薬と例えば接触またはこれに曝露されることによりインキュベーション後に細胞から分離または除去される場合、細胞は、競合試薬への接触または曝露後、2時間、6時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、もしくは48時間にわたり、または約2時間、6時間、12時間、18時間、24時間、30時間、36時間、42時間、もしくは48時間にわたりさらにインキュベートされる。いくつかの態様において、D-ビオチン処理を伴う形質導入細胞は、D-ビオチン添加後 24 ± 6 時間にわたり、または約 24 ± 6 時間にわたりさらにインキュベートされる。いくつかの態様において、D-ビオチン処理を伴う形質導入細胞は、D-ビオチン添加後48時間にわたり、または約48時間にわたりさらにインキュベートされる。

【0399】

I. 連続選択、並行選択、およびポリッシング

本明細書に提供される方法は、標的細胞集団(例えば、T細胞、CD3+、CD4+、CD8+ T細胞)を単離および/または濃縮するための、例えばカラムクロマトグラフィーによる複数の選択工程を可能にする。いくつかの態様において、1つまたは複数の選択工程は、操作された細胞のアウトプット組成物(例えば、治療用細胞組成物)を創出するためのプロセス、例えば、上述のIA~H項に記述されるようなプロセスの1つもしくは複数時点で、またはその一定の工程の後に行われる。いくつかの態様において、例えばI-BおよびI-C項に記述されるような初期細胞選択の後に行われる選択工程は、ポリッシング工程と呼ばれる。ポリッシング工程は、細胞組成物のさらなる精製、特異的細胞サブタイプの選択(例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+、および/またはCD45RO+ T細胞)、死細胞の除去(例えば、生存細胞の選択)、成功裏に操作された細胞(例えば、導入遺伝子(例えば、キメラ抗原受容体(CAR)、T細胞受容体(TCR)などを発現している細胞)の選択、または特異的細胞タイプの比、総数、もしくは濃度の調整(例えば、CD4+に対するCD8+細胞、CAR+もしくはTCR+細胞に対するCAR-もしくはTCR-細胞、またはCD4+、CD8+、CAR+、TCR+、および/もしくは生存細胞の総数もしくは濃度)のためを含むが、それに限定されるわけではない様々な目的で行われる場合がある。いくつかの態様において、選択工程(例えば、ポリッシング工程)は、産物制御を増加させるために、および/または患者間の変動を減少させるために有用である。

【0400】

いくつかの態様において、選択工程(例えば、初期選択工程および/またはポリッシング工程)は、例えば、細胞組成物をさらに精製すること、特異的細胞サブタイプの選択、生存細胞の選択、操作された細胞の選択、および/または細胞の比、総数、もしくは濃度を調整することのための、複数の選択工程を含む。いくつかの態様において、選択工程(例えば、ポリッシング工程)は、インキュベーション、例えばI-E-3および/またはI-F項に記述されるようなインキュベーションの前に行われる。いくつかの態様において、選択工程(例えば、ポリッシング工程)は、収集および回収の前に、例えばI-Hに記述されるような収集および回収の前に行われる。

【0401】

いくつかの局面では、そのような方法(例えば、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程))は、本明細書において提供されるような、サンプルからの複数の異なる細胞集団(例えば、刺激および/または操作された細胞のアウトプット組成物)が濃縮および/または単離される連続選択を用いることによって、閉鎖システムの中などの単一のプロセス流れにより達成される。いくつかの局面では、分離または単離を同じ容器または容器セット、例えば、チューブセットの中で実行することは、連続する陽性および陰性選択

工程、先行する工程からの陰性および/または陽性の画分をさらなる選択に供する後続の工程を実行することによって達成され、そこでは全プロセスが同じチューブまたはチューブセットの中で行われる。1つの態様において、標的細胞を含有するサンプル(例えば、刺激および/または操作された細胞のアウトプット組成物)は、第1の選択を行ってCD4+またはCD8+集団の一方について濃縮し、第1の選択から選択されなかった細胞を第2の選択のための細胞供給源として使用して、CD4+またはCD8+集団の他方について濃縮する、連続選択に供される。いくつかの態様において、さらなる1つまたは複数の選択を行って、CD4+またはCD8+集団の一方または両方のサブ集団、例えば、セントラルメモリーT(T_{CM})細胞またはナイーブT細胞について濃縮することができる。いくつかの態様において、1つまたは複数の表面マーカーが陽性の細胞またはそれを高レベル発現している細胞、例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+、および/またはCD45RO+ T細胞などのT細胞の特異的サブ集団(例えば、CD3+、CD4+、CD8+細胞)は、選択工程(例えば、初期選択工程および/またはポリッシング工程)の間、陽性または陰性選択技法により選択される。いくつかの態様において、標的細胞を含有する細胞集団(例えば、刺激および/または操作された細胞のアウトプット組成物)は、ポリッシング工程が生存細胞について選択する連続選択に供される。いくつかの態様において、ポリッシング工程は、細胞組成物中の細胞の比または総数を制御または調整することを可能にする。

【0402】

1つの態様において、標的細胞を含有するサンプル(例えば、刺激および/または操作された細胞のアウトプット組成物)は、第1の選択がCD3+集団について濃縮するために行われる連続選択に供される。いくつかの態様において、さらなる1つまたは複数の選択を行って、CD3+集団のサブ集団、例えば、CD4+細胞について濃縮することができる。いくつかの態様において、さらなる1つまたは複数の選択を行って、CD3+集団のサブ集団、例えば、CD8+細胞について濃縮することができる。いくつかの態様において、さらなる1つまたは複数の選択を行って、生存細胞について濃縮することができる。いくつかの態様において、さらなる1つまたは複数の選択を行って、CD3+細胞のサブ集団、例えば生存しているCD3+CD4+および/またはCD3+CD8+細胞を濃縮することができる。いくつかの態様において、生存細胞を選択することは、細胞集団(例えば、刺激および/もしくは操作された細胞またはそれらのサブ集団のアウトプット組成物)から死細胞を除去することを含む、またはそれからなる。

【0403】

いくつかの態様において、本項に開示される方法(例えば、選択工程(例えば、初期選択工程および/またはポリッシング工程))を、連続選択技法を用いて行う必要はない。いくつかの態様において、本項に開示される方法(例えば、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程))を、並行選択技法と組み合わせられた連続選択技法を用いて行うことができる。いくつかの態様において、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程)は、連続選択を用いない、または閉鎖システムの中もしくは同じチュービングを使用する容器セットの中で行われない連続選択を用いる場合がある。いくつかの態様において、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程)は、単一の工程で、例えば単一のクロマトグラフィーカラムを使用して達成される。いくつかの態様において、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程)は、並行選択技法を用いて達成される。例えば、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程)は、例えば全プロセスが同じチューブまたはチューブセットの中で行われる閉鎖システムにおいて、陽性および/または陰性選択工程を同時に実行することによって達成される。いくつかの態様において、標的細胞を含有するサンプル(例えば、刺激および/または操作された細胞のアウトプット組成物)は、サンプル(例えば、刺激および/または操作された細胞のアウトプット組成物)が2つ以上のクロマトグラフィーカラム上にロードされる並行選択に供され、そこで各カラムは細胞集団の選択を行う。いくつかの態様において、2つ以上のクロマトグラフィーカラムは、CD3+、CD4+、またはCD8+集団の選択を個別に行う。いくつかの態様において、2つ以上のクロマトグラフィーカラムは、同じ細胞集団の選択を行う

10

20

30

40

50

。例えば、2つ以上のクロマトグラフィーカラムは、CD3+細胞の選択を行う場合がある。いくつかの態様において、アフィニティークロマトグラフィーまたはゲル浸透クロマトグラフィーを含む2つ以上のクロマトグラフィーカラムは、同じ細胞集団の選択を独立して行う。いくつかの態様において、アフィニティークロマトグラフィーまたはゲル浸透クロマトグラフィーを含む2つ以上のクロマトグラフィーカラムは、異なる細胞集団の選択を独立して行う。いくつかの態様において、さらなる1つまたは複数の選択は、並行選択を介して選択された1つまたは全部の細胞集団のサブ集団について濃縮するように行うことができる。例えば、選択された細胞は、セントラルメモリーT(T_{CM})細胞またはナイーブT細胞についてさらに選択される場合がある。いくつかの態様において、標的細胞(例えば、CD3+細胞)を含有するサンプル(例えば、刺激および/または操作された細胞のアウトプット組成物)は、並行選択に供され、その際、並行選択はCD4+集団およびCD8+集団について濃縮するために行われる。いくつかの態様において、CD4+およびCD8+集団のサブ集団、例えば、セントラルメモリーT(T_{CM})細胞またはナイーブT細胞について濃縮するために、さらなる1つまたは複数の選択を行うことができる。いくつかの局面では、1つまたは複数の表面マーカーが陽性またはそれを高レベル発現している細胞、例えば、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+、および/またはCD45RO+ T細胞などのT細胞の特定のサブ集団(例えば、CD3+、CD4+、CD8+ T細胞)が陽性または陰性選択技法により選択されることが企図される。いくつかの態様において、標的細胞(例えば、CD3+細胞)を含有するサンプル(例えば、刺激および/または操作された細胞のアウトプット組成物)は、並行選択に供され、その際、並行選択はセントラルメモリーT(T_{CM})細胞またはナイーブT細胞について濃縮するために行われる。いくつかの態様において、セントラルメモリーT(T_{CM})細胞またはナイーブT細胞のサブ集団、例えば、CD4+、CD3+、またはCD8+細胞について濃縮するためにさらなる1つまたは複数の選択を行うことができる。いくつかの態様において、さらなる選択は、並行選択が達成された後に連続選択技法を介して行われる。

【0404】

いくつかの態様において、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程)を、本明細書において記述される選択物質により標識されたビーズを使用して行うことができ、第1の選択工程からの陽性および陰性の画分を保持し、続いて第2の選択物質により標識されたビーズを使用することによって、または陽性の画分を上記のようなカラムクロマトグラフィーに供することによって、陽性の画分の陽性選択をさらに行って、第2の選択マーカーについて濃縮することができる。いくつかの態様において、1つまたは複数のポリッシング工程は、本明細書において記述されるカラムクロマトグラフィー、例えばI-B項に記述されるようなクロマトグラフィーならびに/またはI-B項およびII項に記述されるような薬剤および試薬系を含むクロマトグラフィーを用いて行われる。いくつかの態様において、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程)は、ビーズ分離およびカラムクロマトグラフィーを含む1つまたは複数の方法を用いて達成される。いくつかの態様において、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程)は、カラムクロマトグラフィーを用いて達成される。

【0405】

いくつかの局面では、単一もしくは同じ単離もしくは分離容器もしくは容器セット、例えば単一のカラムもしくはカラムのセット、および/もしくは同じチューブもしくはチューブセットの中に、または同じ分離マトリックスもしくは媒体もしくは試薬、例えば、同じ磁性マトリックス、親和性標識固体支持体、もしくは抗体もしくは他の結合パートナーを使用して、複数の集団を単離することは、単離を合理化する特徴を含み、例えば、コスト、時間、複雑さ、サンプルの取り扱いの必要性、資源、試薬、または設備の使用の低減をもたらす。いくつかの局面では、そのような特徴は、それらが方法に関連するコスト、効率、時間、および/または複雑さを最小限にし、かつ/または細胞産物への潜在的な害、例えば感染、混入、および/もしくは温度変化によって起こる害を回避する点で有利である。本明細書に提供される方法は、複数の選択工程がオンカラム刺激と組み合わせた細胞選択

10

20

30

40

50

の前または後の両方で標的集団を濃縮することを可能にする。

【0406】

本明細書に提供される方法は、成功裏に刺激および操作された細胞の選択および濃縮をさらに可能にする。例えば、いくつかの態様において、上記の連続選択、並行選択、または単一選択手順は、組み換え受容体(例えば、CAR、TCR)を発現している、刺激された細胞を同定するために使用される場合がある。いくつかの態様において、成功裏に操作された細胞は、代理マーカーに特異的に結合することができる選択物質を用いることによって選択することができる(例えば、IV-A-1項を参照のこと)。いくつかの態様において、組み換え受容体(例えば、CAR)を発現している細胞は、サブ集団細胞、例えば、CD4+ CAR+ T細胞、CD8+ CAR+ T細胞、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD45RA+、CD45RO+ T細胞、および/または生存細胞についてさらに濃縮する(例えば、ポリッシングする)ことができる。いくつかの態様において、選択工程(例えば、初期選択および/またはポリッシング工程)は、組み換え受容体(例えば、CAR、TCR)を発現している細胞および/またはそのサブ集団の比、濃度、または総数の制御または調整を可能にする。いくつかの態様において、濃縮された(例えば、ポリッシングされた)集団は、細胞療法に使用(例えば、投与)するために製剤化することができる。

10

【0407】

J. プロセスおよび/またはアウトプット集団の例示的な特徴

特定の態様において、提供される方法は、1つまたは複数のインプット集団から、例えば単一の生体サンプルから得られ、選択され、または濃縮されたインプット集団から、操作されたT細胞のアウトプット集団(例えば、治療用細胞集団)を産生または作製するプロセスに関連して使用される。ある種の態様において、アウトプット集団は、組み換え受容体、例えばTCRまたはCARを発現する細胞を含有する。特定の態様において、アウトプット集団の細胞は、治療、例えば自己細胞療法として対象に投与するのに適している。

20

【0408】

特定態様において、提供された方法は、単一の工程でカラムクロマトグラフィーを使用して細胞を選択および刺激する工程;競合試薬の使用なしに自発的に脱離した細胞を収集する工程;例えば、CARといった組換え受容体をコードするポリヌクレオチドなどの異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを発現または含有させるため、刺激細胞を操作、形質転換、形質導入またはトランスフェクトする工程;細胞をインキュベートし、刺激試薬(例えば、オリゴマー刺激試薬)を細胞から除去または分離し、細胞を採取および収集し、いくつかの局面においてはこれにより操作T細胞のアウトプット集団を生成する工程のうち、いくつかまたは全てを含むプロセスといった、アウトプット細胞および/または操作されたT細胞のアウトプット集団をそれによって生成または作製するためのプロセス全体に関連して使用される。

30

【0409】

いくつかの態様において、提供された方法は、生物学的試料を収集または取得する工程;生物学的試料からインプット細胞を単離、選択、または濃縮する工程;クライオ凍結および貯蔵し、次いでインプット細胞を融解する工程;単一の工程でカラムクロマトグラフィーを使用して細胞を選択および刺激する工程;競合試薬の使用なしに自発的に脱離した細胞を収集する工程;例えば、CARといった組換え受容体をコードするポリヌクレオチドなどの異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを発現または含有させるため、刺激細胞を遺伝子操作する工程;アウトプット組成物中へ培養細胞を製剤化する工程;ならびに、製剤化されたアウトプット細胞を、対象へと注入および/または投与するために細胞が放出されるまで、クライオ凍結および貯蔵する工程のうち、いくつかまたは全てを含むプロセスといった、アウトプット細胞および/または濃縮T細胞のアウトプット組成物を生成または作製するためのプロセス全体に関連して使用される。いくつかの態様において、提供された方法は、インプット集団と比較して少なくとも3倍、4倍、5倍、またはそれよりも多い倍数の量、レベルまたは濃度の細胞である閾値量まで例えば細胞を拡大培養させる条件下でバイオリアクタにて細胞を培養することにより、プロセス中の細胞数を拡大培養または

40

50

増加させる工程を含まない。いくつかの態様において、提供された方法は、インプット集団と比較して少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、またはそれよりも多い倍数の量、レベルまたは濃度の細胞である閾値量まで例えば細胞を拡大培養させる条件下でバイオリアクタにて細胞をインキュベーションまたは培養することにより、プロセス中の細胞数を拡大培養または増加させる工程を含む。いくつかの態様において、細胞を遺伝子操作することは、例えばウイルス粒子の存在下にて細胞をスピノキュレート (spinoculating) し、次いでウイルス粒子の存在下で静的条件下にて細胞をインキュベートすることにより、ウイルスベクターを用いて細胞を形質導入するための工程であるか、またはこれを含む。

【0410】

一定の態様において、操作された細胞の生成のために提供されたプロセス全体の継続時間は、刺激開始から細胞の収集、採取、または製剤化まで、36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、もしくは120時間であるか、約36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、もしくは120時間であるか、または36時間、42時間、48時間、54時間、60時間、72時間、84時間、96時間、108時間、もしくは120時間未満である。いくつかの態様において、操作された細胞の生成のために提供されたプロセス全体の継続時間は、刺激開始から細胞の収集、採取、または製剤化まで、36時間～120時間、48時間～96時間、もしくは48時間～72時間（両端の値を含む）、または約36時間～120時間、48時間～96時間、もしくは48時間～72時間（両端の値を含む）を含む。特定態様において、インキュベーションの開始から細胞の採取、収集または製剤化までを計測した、提供されたプロセスを完了するための一定時間は、48時間、72時間もしくは96時間であるか、約48時間、72時間もしくは96時間であるか、または48時間、72時間もしくは96時間未満である。特定態様において、インキュベーションの開始から細胞の採取、収集または製剤化までを計測した、提供されたプロセスを完了するための一定時間は、48時間±6時間、72時間±6時間、または96時間±6時間である。

【0411】

いくつかの態様において、インキュベーションは、刺激開始後、24時間～120時間、36時間～108時間、48時間～96時間、もしくは48時間～72時間（両端の値を含む）で、または約24時間～120時間、36時間～108時間、48時間～96時間、もしくは48時間～72時間（両端の値を含む）で完了する。いくつかの態様において、インキュベーションは、刺激開始から120時間、108時間、96時間、72時間、48時間、もしくは36時間で、約120時間、108時間、96時間、72時間、48時間、もしくは36時間で、または120時間、108時間、96時間、72時間、48時間、もしくは36時間以内に完了する。特定態様において、インキュベーションは24時間±6時間後、48時間±6時間後、または72時間±6時間後に完了する。

【0412】

いくつかの態様において、全体のプロセスは、例えばCD3+T細胞、CD4+T細胞、およびCD8+T細胞などの濃縮T細胞の単一集団を用いて実施される。一定の態様において、プロセスは、濃縮T細胞の単一アウトプット集団を生成もしくは作製するためのプロセスに先立ち、および/またはこのプロセス中に組み合わせられた、濃縮T細胞の2つまたは複数のインプット集団を用いて実施される。いくつかの態様において、濃縮T細胞は例えば組換え受容体を発現するために形質導入されたT細胞などの操作されたT細胞であるか、またはこれを含む。

【0413】

いくつかの態様において、例えば操作されたT細胞の集団などのアウトプット集団は、(i) 24時間未満の間、クロマトグラフィーカラムにおける刺激条件下（例えば、オンカラム刺激）で、T細胞の試料またはT細胞を含有する試料をインキュベートすること、(ii) 組換え受容体をコードする異種ポリヌクレオチドまたは組換えポリヌクレオチドを、刺激された集団のT細胞中へと導入すること、(iii) 細胞をインキュベートすること、および次いで (iv) インキュベートされた細胞を収集または採取することにより、生成される。

【0414】

一定の態様において、例えば、操作されたT細胞の集団などのアウトプット集団は、(i) 単一の工程でカラムクロマトグラフィーを用いてT細胞を選択および刺激する（例えば、オンカラム刺激）こと、ならびに24時間未満で競合試薬の使用なしに自発的に脱離した細胞を収集する工程、(ii) 例えば刺激されたT細胞をウイルスベクターの存在下でスピノキュレートすることにより、刺激されたT細胞を、組換え受容体をコードするウイルスベクターを用いて形質導入する工程、(iii) 18時間～96時間にわたり、または18時間～96時間で（両端の値を含む）、静的条件下にて、形質導入されたT細胞をインキュベートする工程、ならびに(iv) 刺激条件下でのインキュベーションが開始された後、36～108時間以内でまたは約36～108時間以内で、形質転換された集団のT細胞を採取する工程により、生成される。

10

【0415】

一定の態様において、例えば、操作されたT細胞の集団などのアウトプット集団は、(i) 単一の工程でカラムクロマトグラフィーを用いてT細胞を選択および刺激（例えば、オンカラム刺激）し、6時間未満でまたは約6時間未満で競合試薬の使用なしに自発的に脱離した細胞を収集する工程、(ii) 1時間または約1時間にわたり、組換え受容体をコードするウイルスベクターを用いて、刺激されたT細胞を形質導入する工程、(iii) 72時間または約72時間にわたり、形質導入されたT細胞をインキュベートする工程、ならびに(iv) 刺激条件下でのインキュベーションが開始された後、90±10時間以内でまたは約90±10時間以内で、形質転換された集団のT細胞を採取する工程により、生成される。

20

【0416】

いくつかの態様において、提供された方法に関連するプロセスは、代替プロセスと比較される。例えば、いくつかの態様において、本明細書に提供された方法は、細胞を拡大培養するための工程を含有する代替プロセスと比較される。いくつかの態様において、代替プロセスは、細胞選択および細胞刺激のための別々の工程を含むプロセスである。特定態様において、代替プロセスは1つまたは複数の具体的局面において異なっている。ただしそれ以外の場合では、類似または同様の特徴、局面、工程、段階、試薬および/または提供された方法に関連するプロセスの条件を含有する。いくつかの態様において、代替プロセスは、例えば拡大培養を欠くまたはそれを含まないなど、提供された方法に関連するプロセスと類似であるが、以下のうちの1つまたは複数を含むがこれに限定されない様式で異なる：選択および刺激のための別々の工程、異なる試薬ならびに/または培地製剤を含むこと；インキュベーション中、形質導入中、トランスフェクション中、および/または培養中の血清の存在；例えば、CD4+T細胞対CD8+T細胞の比率など、インプット集団の異なる細胞構成；異なる刺激条件および/または異なる刺激試薬；刺激試薬対細胞の異なる比率；異なるベクターおよび/または異なる形質導入の方法；細胞をインキュベート、形質導入、および/またはトランスフェクトするための異なるタイミングおよび順序；インキュベーションまたは形質導入中に存在する1つまたは複数の組換えサイトカインの不在もしくはその違い（例えば、異なるサイトカインまたは異なる濃度）、または細胞を採取もしくは収集するための異なるタイミング。

30

【0417】

いくつかの態様において、生物学的試料からのインプット細胞（例えば、CD4+T細胞またはCD8+T細胞）の単離、濃縮、および/または選択から、アウトプット細胞が収集、製剤化、および/または凍結保護される時間までで計測された、提供されたプロセスを完了するために必要とされる継続時間または時間量は、48時間、72時間、96時間、120時間、4日間、5日間、7日間、もしくは10日間、約48時間、72時間、96時間、120時間、4日間、5日間、7日間、もしくは10日間、または48時間、72時間、96時間、120時間、4日間、5日間、7日間、もしくは10日間未満である。いくつかの態様において、生物学的試料からのインプット細胞（例えば、CD4+またはCD8+T細胞）の単離、濃縮、および/または選択から、アウトプット細胞が収集、製剤化、および/または凍結保護される時間までで計測された、提供されたプロセスを完了するために必要とされる継続時間または時間

40

50

量は、4～5日間、約4～5日間である。いくつかの態様において、生物学的試料からのインプット細胞（例えば、CD4+またはCD8+T細胞）の単離、濃縮、および/または選択から、アウトプット細胞が収集、製剤化、および/または凍結保護される時間までで計測された、提供されたプロセスを完了するために必要とされる継続時間または時間量は、5日間または約5日間である。いくつかの態様において、生物学的試料からのインプット細胞（例えば、CD4+またはCD8+T細胞）の単離、濃縮、および/または選択から、アウトプット細胞が収集、製剤化、および/または凍結保護される時間までで計測された、提供されたプロセスを完了するために必要とされる継続時間または時間量は、5日間未満である。いくつかの態様において、生物学的試料からのインプット細胞（例えば、CD4+またはCD8+T細胞）の単離、濃縮、および/または選択から、アウトプット細胞が収集、製剤化、および/または凍結保護される時間までで計測された、提供されたプロセスを完了するために必要とされる継続時間または時間量は、4日間または約4日間である。いくつかの態様において、単離された細胞、選択された細胞または濃縮された細胞は、刺激に先立ち凍結保護されず、インプット細胞の単離、濃縮、および/または選択から、アウトプット細胞が収集、製剤化、および/または凍結保護される時間までで計測された、提供されたプロセスを完了するために必要とされる継続時間または時間量は、48時間、72時間、96時間、もしくは120時間、約48時間、72時間、96時間、もしくは120時間、または48時間、72時間、96時間、もしくは120時間未満である。

【0418】

一定の態様において、提供されたプロセスは、生物学的試料から単離、濃縮、または選択された、例えばCD4+およびCD8+T細胞またはCD3+T細胞などの細胞の集団において実施される。いくつかの局面において、提供された方法は、生物学的試料が対象から収集されるときから、他の方法またはプロセスと比較して短縮された時間以内で、操作されたT細胞の組成物を作製または生成することができる。いくつかの態様において、提供された方法は、生物学的試料、または濃縮された細胞、単離された細胞、もしくは選択された細胞が、形質導入のための工程に先立ち冷凍保存および貯蔵される任意の時間または全ての時間を含めて、生物学的試料が対象から収集されるときから、操作されたT細胞が収集、採取、または製剤化される（例えば、冷凍保護または投与のため）ときまで、10日間、9日間、8日間、7日間、6日間、5日間以内もしくは約10日間、9日間、8日間、7日間、6日間、5日間以内で、または120時間、96時間、72時間、もしくは48時間以内で、または約120時間、96時間、72時間、もしくは48時間以内で、操作されたT細胞を作製または生成することができる。いくつかの態様において、提供された方法は、生物学的試料、または濃縮された細胞、単離された細胞、もしくは選択された細胞が、形質導入のための工程に先立ち冷凍保存および貯蔵される任意の時間または全ての時間を含めて、生物学的試料が対象から収集されるときから、操作されたT細胞が収集、採取、または製剤化される（例えば、冷凍保護または投与のため）ときまで、5日間以内もしくは約5日間以内、または約4日間以内で、操作されたT細胞を作製または生成することができる。

【0419】

一定の態様において、提供された方法は、アウトプット細胞および/または濃縮T細胞のアウトプット集団を生成または作製するためのプロセスに関連して使用される。特定態様において、アウトプット細胞および/または濃縮T細胞のアウトプット集団は、血液試料または白血球アフェレーシス試料といった生物学的試料から収集、取得、単離、選択および/もしくは濃縮された細胞;刺激条件下でインキュベートされた細胞;例えば、CARといった組換え受容体をコードするポリヌクレオチドなどの組換えポリヌクレオチドを発現もしくは含有するために、例えば形質導入など、操作された細胞;閾値量、閾値密度、もしくは閾値拡大培養まで培養された細胞;および/または製剤化された細胞であるか、またはこれを含む。いくつかの態様において、アウトプット集団の細胞は、例えば、プロセスの1つもしくは複数の工程中、プロセスの1つもしくは複数の工程に先立ち、および/またはプロセスの1つもしくは複数の工程後に、凍結保護され融解されている。いくつかの態様において、アウトプット集団（例えば、治療用細胞組成物）は、例えばCARなどの組換え受容体

10

20

30

40

50

を発現する、例えばCD4+T細胞およびCD8+T細胞などのT細胞を含有する。

【0420】

いくつかの態様において、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%、少なくとも95%のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、組換え受容体を発現する。一定の態様において、少なくとも50%のアウトプット組成物の細胞は、組換え受容体を発現する。一定の態様において、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のアウトプット組成物のCD3+T細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、組換え受容体を発現する。いくつかの態様において、少なくとも50%のアウトプット組成物のCD3+T細胞は、組換え受容体を発現する。特定態様において、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または99%よりも多いアウトプット組成物のCD4+T細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、組換え受容体を発現する。特定態様において、少なくとも50%のアウトプット組成物のCD4+T細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、組換え受容体を発現する。いくつかの態様において、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または99%よりも多いアウトプット組成物のCD8+T細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、組換え受容体を発現する。一定の態様において、少なくとも50%のアウトプット組成物のCD8+T細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、組換え受容体を発現する。

【0421】

特定態様において、アウトプット組成物（例えば、治療用細胞組成物）の細胞は、例えば、細胞を拡大培養する1つまたは複数の工程を含むプロセスなどの代替プロセスにより作製されたアウトプット細胞と比較すると、組換え受容体により結合されたおよび/またはこれにより認識された抗原を発現する細胞（例えば、標的細胞）に対する細胞溶解活性を向上させる。いくつかの態様において、アウトプット組成物（例えば、治療用細胞組成物）の細胞が、例えば標的細胞などの、抗原を発現する細胞に曝露される場合、アウトプット組成物の細胞は、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは100%の、約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは100%の、または少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは100%の、抗原を発現する細胞を死滅させる。一定の態様において、アウトプット組成物（例えば、治療用細胞組成物）の細胞は、類似条件または同様の条件下にて代替プロセスにより作製されたアウトプット細胞よりも、少なくとも25%、50%、75%、100%、150%、または1倍、2倍、3倍、4倍、もしくは5倍多量の、抗原を発現する細胞、例えば標的細胞を死滅させる。

【0422】

特定態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、例えば、細胞を拡大培養する1つまたは複数の工程を含むプロセスなどの代替プロセスにより作製されたアウトプット細胞と比較すると、インビボにおける抗腫瘍活性を向上させる。いくつかの態様において、アウトプット組成物の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、例えば腫瘍またはがんを有する対象などの対象に投与される場合、アウトプット集団の細胞は、対象において、例えば抗原を発現するがんまたは腫瘍細胞など、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは

は100%の、約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは100%の、または少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%もしくは100%の腫瘍細胞を死滅させる。一定の態様において、アウトプット組成物（例えば、治療用細胞組成物）の細胞は、類似条件または同様の条件下にて代替プロセスにより作製されたアウトプット細胞よりも、少なくとも25%、50%、75%、100%、150%、または1倍、2倍、3倍、4倍、もしくは5倍多い量の、腫瘍細胞をインビボで死滅させる。

【0423】

特定態様において、大部分のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、ナイーブ様細胞、セントラルメモリー細胞、および/またはエフェクターメモリー細胞である。特定態様において、大部分のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、ナイーブ様細胞またはセントラルメモリー細胞である。いくつかの態様において、大部分のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、1つまたは複数のCCR7発現またはCD27発現に対して陽性である。一定の態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、拡大培養を含むプロセスといった代替プロセスから生成したアウトプット集団よりも大きな分量のナイーブ様細胞またはセントラルメモリー細胞を有する。

10

【0424】

一定の態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、消耗した（exhausted）および/または老化した細胞の分量および/または頻度が低い。特定態様において、アウトプット集団の細胞は、消耗および/または老化した細胞の分量および/または頻度が低い。いくつかの態様において、40%未満の、35%未満の、30%未満の、25%未満の、20%未満の、15%未満の、10%未満の、5%未満の、または1%未満のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、消耗および/または老化している。一定の態様において、25%未満のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、消耗および/または老化している。一定の態様において、10%未満のアウトプット集団の細胞が、消耗および/または老化している。特定態様において、細胞は低い分量を有する。

20

【0425】

いくつかの態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、例えば表面発現などのCD27発現およびCCR7発現に対して陰性である細胞の分量および/または頻度が低い。特定態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、CD27-CCR7-細胞の分量および/または頻度が低い。いくつかの態様において、40%未満の、35%未満の、30%未満の、25%未満の、20%未満の、15%未満の、10%未満の、5%未満の、または1%未満のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CD27-CCR7-細胞である。一定の態様において、25%未満のアウトプット集団の細胞が、CD27-CCR7-細胞である。一定の態様において、10%未満のアウトプット集団の細胞が、CD27-CCR7-細胞である。態様において、5%未満のアウトプット集団の細胞が、CD27-CCR7-細胞である。

30

【0426】

いくつかの態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、例えば表面発現などのCD27およびCCR7発現のうち一方または両方に対して陽性である細胞の分量および/または頻度が高い。いくつかの態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、CD27およびCCR7のうち一方または両方に対して陽性である細胞の分量および/または頻度が高い。いくつかの態様において、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%超のアウトプット集団の細胞が、CD27およびCCR7のうち一方または両方に対して陽性である。種々の態様において、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%超のアウトプット集団の

40

50

CD4+CAR+細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CD27およびCCR7のうち一方または両方に対して陽性である。いくつかの態様において、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%超のアウトプット集団のCD8+CAR+細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CD27およびCCR7のうち一方または両方に対して陽性である。

【0427】

一定の態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、例えば表面発現などのCD27発現およびCCR7発現に対して陽性である細胞の分量および/または頻度が高い。いくつかの態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、CD27+CCR7+細胞の分量および/または頻度が高い。いくつかの態様において、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%超のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CD27+CCR7+細胞である。種々の態様において、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%超のアウトプット集団のCD4+CAR+細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CD27+CCR7+細胞である。いくつかの態様において、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または95%超のアウトプット集団のCD8+CAR+細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CD27+CCR7+細胞である。

【0428】

一定の態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、例えば表面発現などのCCR7発現に対して陰性でありCD45RA発現に対して陽性である細胞の分量および/または頻度が低い。いくつかの態様において、アウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）は、CCR7-CD45RA+細胞の分量および/または頻度が低い。特定態様において、40%未満の、35%未満の、30%未満の、25%未満の、20%未満の、15%未満の、10%未満の、5%未満の、または1%未満のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CCR7-CD45RA+細胞である。いくつかの態様において、25%未満のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CCR7-CD45RA+細胞である。特定態様において、10%未満のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CCR7-CD45RA+細胞である。一定の態様において、5%未満のアウトプット集団の細胞（例えば、治療用細胞組成物）が、CCR7-CD45RA+細胞である。

【0429】

上の態様のいずれかにおいて、選択工程（例えば、ポリッシング工程;セクションI-Iを参照されたい）は、アウトプット集団（例えば、治療用細胞組成物）において、特定の表現型または機能である細胞の部分、発生頻度、濃度および/またはパーセンテージを達成するために使用され得る。上の態様のいずれかにおいて、選択工程（例えば、ポリッシング工程;セクションI-Iを参照されたい）は、所望の集団用に選択するために使用され得る。

【0430】

特定態様において、細胞は、細胞集団の細胞倍加、例えばインキュベート中に生じる倍加など、1回、2回、3回、4回、5回、6回、8回、10回、20回、もしくはそれより多い細胞倍加に先立って、約1回、2回、3回、4回、5回、6回、8回、10回、20回、もしくはそれより多い細胞倍加に先立って、または少なくとも1回、2回、3回、4回、5回、6回、8回、10回、20回、もしくはそれより多い細胞倍加に先立って採取される。一定の態様において、細胞は例えば、インキュベーション中に生じる倍加など、集団の任意の倍加に先立ち採取される。いくつかの局面において、操作プロセス中に生じることがある倍加を減少させることで、いくつかの態様において、ナイーブ株である操作T細胞の部分を増加させる。いくつかの態様において、操作プロセス中の倍加を増加させることで、操作プロセス中に生じることがあるT細胞の分化を増加させる。

【0431】

いくつかの局面において、操作された細胞組成物（例えば、治療用細胞組成物）を生成または作製するためのプロセスにとって、例えばインキュベーション中など、プロセス中に生じる拡大培養または細胞倍加を減少させることで、生じた操作細胞組成物のナイーブ様T細胞の量またはその部分が増加することが企図される。特定局面において、プロセス中に生じる拡大培養または細胞倍加を増加させることで、生じた操作細胞組成物の分化T細胞の量またはその部分が増加する。いくつかの局面において、生じた操作細胞組成物中にて、ナイーブ様細胞の部分を増加または拡大する本明細書において提供されたプロセスなどのプロセスは、例えば投与後インビボにて、操作された細胞組成物の有効性、効力、および持続性を増加させ得ることが企図される。

【0432】

II. 作用物質および試薬系

特定局面において、方法は、細胞の表面上の分子（細胞表面分子）に結合する能力を有する少なくとも1つの作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）が試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）と可逆的に会合する可逆系を使用する。場合によっては、試薬は、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に可逆的に結合する能力を有する複数の結合部位を含有する。いくつかの場合において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、多量体化試薬である。いくつかの態様において、少なくとも1つの作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、エピトープまたは分子の領域に特異的に結合することができる少なくとも1つの結合部位Bを含有し、かつ試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）の少なくとも1つの結合部位Zに特異的に結合する結合パートナーCもまた含有する。場合により、結合パートナーCと少なくとも1つの結合部位Zとの間の結合相互作用は、非共有結合相互作用である。いくつかの態様において、結合パートナーCと少なくとも1つの結合部位Zとの間の、非共有結合相互作用などの結合相互作用は、可逆的である。

【0433】

いくつかの態様において、可逆的会合は、少なくとも1つの結合部位Zに結合可能でもある結合部位であるか、またはこれを含有する、競合剤または遊離結合剤といった物質の存在下にて媒介されうる。一般に、物質（例えば、競合剤または遊離結合剤）は、試薬中に存在する結合部位Zに対する、結合パートナーCよりも高い結合アフィニティにより、および/または結合パートナーCよりも高い濃度で存在していることにより、コンペティター（competitor）として作用することができ、それによって、試薬から結合パートナーCを脱離および/または解離させる。いくつかの態様において、少なくとも1つの結合部位Zに対する物質（例えば、競合剤または遊離結合剤）は、少なくとも1つの結合部位Zに対する作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）の結合パートナーCのアフィニティよりも大きい。したがって、場合によっては、試薬の結合部位Zと作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）の結合パートナーCとの間の結合は、物質（例えば、競合剤または遊離結合パートナー）の添加により破壊することができる。それによって、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）および試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）の会合を可逆的なものとする。

【0434】

そのような可逆系において使用されうる試薬は当技術分野にて記載かつ公知であり、例えば米国特許第5,168,049号、同第5,506,121号、同第6,103,493号、同第7,776,562号、同第7,981,632号、同第8,298,782号、同第8,735,540号、同第9,023,604号ならびに国際公開されたPCT出願W02013/124474号およびW02014/076277号を参照されたい。可逆的相互作用を形成する能力を有する試薬と結合パートナーの非限定的な例、ならびにそのような結合を反転させる能力を有する物質（例えば、競合剤または遊離結合剤）は後述する。

【0435】

A. 試薬

本明細書において企図される試薬は、選択試薬および刺激試薬を含む。いくつかの態様において、選択試薬および刺激試薬は同一である。いくつかの態様において、選択試薬お

10

20

30

40

50

および刺激試薬は異なる。ただし、選択試薬および刺激試薬の両方は、同じ材料から製剤化されてもよい。いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に含まれる結合パートナーCに可逆的に結合する能力を有する1つまたは複数の結合部位Zを含有する。いくつかの態様において、試薬は複数の結合部位Zを含有するが、このそれぞれは作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に含まれる結合パートナーCに特異的に結合することができ、結果、試薬は、例えば多量体化試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）などの複数の作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に可逆的に結合する能力を有する。いくつかの態様では、試薬はオリゴマー、または個々の分子のポリマー（例えば、単量体）または個々の分子を構成する複合体（例えば、四量体）であり、それぞれ少なくとも1つの結合部位Zを含有する。いくつかの態様において、試薬は少なくとも2つの結合部位Z、少なくとも3つの結合部位Z、少なくとも4つの結合部位Z、例えば少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72個以上の結合部位Zを含有する。結合部位は、全て同じものでありうるか、または複数の結合部位は1つまたは複数の異なる結合部位（例えば、Z1、Z2、Z3など）を含有することができる。

【0436】

いくつかの態様において、2つ以上の作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）上に存在する1つまたは複数の結合部位Zを介して、例えば試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）に可逆的に結合するなどして、会合する。場合により、これは、（少なくとも2コピーの）細胞表面分子を有する標的細胞を、その特定の分子に結合することができる1つまたは複数の結合部位Bを有する作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）と接触させた場合に、アビディティ効果が生じるように、互いに密に配置された作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）をもたらす。

【0437】

いくつかの態様において、同じである、すなわち同じ結合部位Bを含有する、2つ以上の異なる作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）が、試薬に可逆的に結合されうる。いくつかの態様において、少なくとも2つの異なる（種類の）作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）、場合により、例えば、2つ以上の異なる選択物質および/または刺激物質などの3つまたは4つの異なる（種類の）作用物質を使用することが可能である。例えば、いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、結合部位B1、B2、B3またはB4などを含有する第1作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）および例えば、結合部位B1、B2、B3またはB4の別のものなどの別の結合部位を含有する第2作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に可逆的に結合されうる。場合により、第1作用物質および第2作用物質の結合部位は、同じでありうる。例えば、いくつかの局面において、少なくとも2つの作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）のそれぞれは同じ分子に結合しうる。場合により、第1作用物質および第2作用物質の結合部位は、異なるものでありうる。いくつかの局面において、少なくとも2つの作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）のそれぞれは、例えば第1分子、第2分子など、異なる分子に結合することができる。場合によっては、異なる分子、例えば異なる細胞表面分子が、同じ標的細胞上に存在しうる。別の例では、異なる分子、例えば異なる細胞表面分子が、同じ細胞の集団中に存在する異なる標的細胞上に存在しうる。場合により、第3、第4などの作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）を、それぞれがさらに異なる結合部位を含有する同じ試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）と会合させることができる。

【0438】

いくつかの態様において、2つ以上の異なる作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、同じ結合パートナーCを含有する。いくつかの態様において、2つ以上の異なる作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、異なる結合パートナーを含有する。いくつかの局面において、第1作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、試薬（例え

ば、選択試薬または刺激試薬）上に存在する結合部位Z1に特異的に結合することができる結合パートナーC1を有することができ、第2作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）上に存在する結合部位Z1または結合部位Z2に特異的に結合することができる結合パートナーC2を有することができる。したがって、いくつかの例では、試薬に含まれる複数の結合部位Zは、結合部位Z1およびZ2を含み、それらは、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に含まれる結合パートナーC1およびC2にそれぞれ可逆的に結合する能力を有する。いくつかの態様では、C1とC2が同じであり、および/またはZ1とZ2が同じである。別の局面では、複数の結合部位Zのうちの1つまたは複数の異なるものがある。別の例では、複数の結合パートナーCのうちの1つまたは複数の異なるものがある。結合パートナーCのそれぞれが結合部位Zのうちの1つと相互作用すること、例えば特異的に結合することができる限り、結合部位Zを含有する試薬と適合する異なる結合パートナーCとの任意の組合せを選ぶことは、当業者の水準内である。

【0439】

いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテインまたはその類似体、アビジン、アビジンムテインまたはその類似体（ニュートラアビジン）またはこれらの混合物であり、こうした試薬は、結合パートナーCと可逆的に会合する1つまたは複数の結合部位Zを含有する。いくつかの態様において、結合パートナーCは、ビオチン、ビオチン誘導体もしくはその類似体、またはストレプトアビジン結合ペプチドまたはストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテインもしくはその類似体、アビジンもしくはアビジンムテインもしくはその類似体に特異的に結合することができる別の分子でありうる。いくつかの態様において、試薬は、ストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン、またはビオチン、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性であるそのフラグメントに可逆的に結合するアビジンの類似体もしくはムテインであるか、またはこれらを含有する。いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、ストレプトアビジンの類似体もしくはムテイン、またはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するアビジンの類似体もしくはムテインであるか、またはこれらを含有する。いくつかの態様において、物質（例えば、競合剤または遊離結合剤）は、ビオチン、ビオチン誘導体もしくはビオチン類似体、または1つまたは複数の結合部位Zのための結合パートナーCとの結合に関して競合する能力を有するストレプトアビジン結合ペプチドであることができる。いくつかの態様において、結合パートナーCと物質（例えば、競合剤および/または遊離結合剤）は異なり、物質（例えば、競合剤および/または遊離結合剤）は、結合パートナーのアフィニティと比較すると、1つまたは複数の結合部位Zに対し、より高い結合アフィニティを呈する。

【0440】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンは野生型ストレプトアビジン、ストレプトアビジン様ポリペプチドといったストレプトアビジンムテインまたはその類似体でありうる。同様に、アビジンはいくつかの局面において、野生型アビジンまたはニュートラアビジンといったアビジンのムテインもしくは類似体、より大きい中性電荷を通常は呈し、ナイーブ型アビジンにとって代替として利用可能である修飾されたアルギニンを含む。一般に、脱グルコシル化アビジンを含む。一般に、脱グルコシル化された中性型アビジンは、例えばSigma Aldrichから入手可能である「エクストラアビジン」、またはThermo ScientificもしくはInvitrogenから入手可能である「ニュートラアビジン」といった市販で入手可能な形態のものを含む。

【0441】

いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインもしくはその類似体である。いくつかの態様において、野生型ストレプトアビジン（wt-ストレプトアビジン）は、Argarana et al, Nucleic Acids Res.14 (1986) 1871-1882 (SEQ ID NO:1) に開示されたアミノ酸配列を有する。一般には、ストレプトアビジンは4つの同一のサブユニットの四量体、すなわ

ちホモ四量体として自然に発生し、この場合それぞれのサブユニットは、ビオチン、ビオチン誘導体もしくはその類似体、またはビオチン模倣物に対する単一の結合部位を含有する。ストレプトアビジンのサブユニットの例示的な配列は、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列であるが、こうした配列はまた、別のストレプトマイセス種由来のその相同物中に存在する配列を含みうる。特に、ストレプトアビジンのそれぞれのサブユニットは、約 10^{-14} Mの桁で平衡解離定数 (K_D) を有する、ビオチンに対する強い結合アフィニティを呈しうる。場合によっては、ストレプトアビジンは、4つの結合部位のうち1つのみが機能的である一価の四量体 (Howarth et al. (2006) Nat.Methods,3:267-73;Zhang et al. (2015) Biochem.Biophys.Res.Comm.,463:1059-63)) として、4つの結合部位のうち2つが機能的である二価の四量体 (Fairhead et al. (2013) J.Mol.Biol.,426:199-214) として存在しうるか、または単量体型または二量体型 (Wu et al. (2005) J.Biol.Chem., 280:23225-31;Lim et al. (2010) Biochemistry, 50:8682-91) に存在しうる。

【0442】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンは、例えば、SEQ ID NO:1に示されるストレプトマイセス・アビジニ (*Streptomyces avidinii*) 由来の野生型ストレプトアビジンの少なくとも1つの機能的サブユニット、またはその機能的活性フラグメントを一般には含有する、ストレプトマイセス種由来のストレプトアビジンまたはビオチン、ビオチン誘導体もしくはその類似体、またはビオチン模倣物に対する結合部位を含有する、少なくとも1つの機能的サブユニットを含むそれらの機能的活性フラグメントといった、野生型または非修飾ストレプトアビジンなどの、任意の形態であってよい。例えば、いくつかの態様において、ストレプトアビジンは、N末端および/またはC末端にて短縮された、野生型ストレプトアビジンのフラグメントを含みうる。こうした最小ストレプトアビジンは、SEQ ID NO:1のアミノ酸位置10~16の領域中のN末端にて開始し、SEQ ID NO:1のアミノ酸位置133~142の領域において、C末端にて終端する任意のものを含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンの機能的活性フラグメントは、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸の配列を含有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジンの機能的活性フラグメントは、SEQ ID NO:103に示されるアミノ酸の配列を含有する。いくつかの態様において、SEQ ID NO:2に示されるストレプトアビジンは、SEQ ID NO:1に示されるナンバリングを有するAla13に対応する位置にて、N末端メチオニンをさらに含有しうる。いくつかの態様において、SEQ ID NO:103に示されるストレプトアビジンの機能的活性フラグメントは、SEQ ID NO:1に示されるナンバリングを有するAla13に対応する位置にて、N末端メチオニンを有さない。ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインにおける残基の位置の参照は、SEQ ID NO:1における残基のナンバリングに準拠する。

【0443】

いくつかの局面において、ストレプトアビジンムテインは、1つまたは複数のアミノ酸置換、アミノ酸欠失、またはアミノ酸添加による非修飾ストレプトアビジンまたは野生型ストレプトアビジンの配列と区別されるが、ビオチン、ビオチン誘導体もしくはその類似体、またはストレプトアビジン結合ペプチドに対する結合部位を含有する、少なくとも1つの機能的サブユニットを含む、ポリペプチドを含む。いくつかの局面において、ストレプトアビジン様ポリペプチドおよびストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンと本質的に免疫学的に同等であり、特にwt-ストレプトアビジンと同じまたは異なるアフィニティを有するビオチン、ビオチン誘導体またはビオチン類似体と結合する能力を有するポリペプチドでありうる。場合によっては、ストレプトアビジン様ポリペプチドもしくはストレプトアビジンムテインは、野生型ストレプトアビジンの一部ではないアミノ酸を含有してよい、または野生型ストレプトアビジンの一部のみを含んでよい。いくつかの態様において、ストレプトアビジン様ポリペプチドは、野生型ストレプトアビジンと同一ではないポリペプチドである。これは、宿主が、野生型ストレプトアビジンの構造へと宿主生産ポリペプチドを形質転換するために必要とされる酵素を有しないことが理

10

20

30

40

50

由である。いくつかの態様において、ストレプトアビジンはまた、ストレプトアビジン四量体およびストレプトアビジン二量体、特にストレプトアビジンホモ四量体、ストレプトアビジンホモ二量体、ストレプトアビジンヘテロ四量体およびストレプトアビジンヘテロ二量体として存在してもよい。一般には、それぞれのサブユニットは、ビオチンもしくはビオチン類似体に対する、またはストレプトアビジン結合ペプチドに対する結合部位を通常有する。ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインの例は例えば、国際公開公報第86/02077号、ドイツ国特許第19641876 AI号、米国特許第6,022,951号、国際公開公報第98/40396号または同第96/24606号にて言及される。

【0444】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、非修飾ストレプトアビジンまたは野生型ストレプトアビジンの一部ではないアミノ酸を有しうるか、または野生型ストレプトアビジンまたは非修飾状態のストレプトアビジンの一部のみを含有しうる。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、例えばSEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンのサブユニットまたは例えばSEQ ID NO:2またはSEQ ID NO:103に示されるその機能的活性フラグメントと比較すると、非修飾ストレプトアビジンまたは野生型ストレプトアビジンのサブユニットと比較した場合に1つまたは複数のアミノ酸置換（置換え）を有しうる、少なくとも1つのサブユニットを含有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインの少なくとも1つのサブユニットは、野生型ストレプトアビジンまたは非修飾ストレプトアビジンと比較すると、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20のアミノ酸差異を有しうるおよび/またはこうしたストレプトアビジンムテインが、ビオチン、ビオチン誘導体もしくはその類似体、またはビオチン模倣物を結合する機能的活性を呈する場合、SEQ ID NO:1、2または103に示されるアミノ酸の配列と、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を呈するアミノ酸配列を含む、少なくとも1つのサブユニットを含有する。いくつかの態様において、アミノ酸の置換え（置換）は、保存的変異または非保存的変異である。ストレプトアビジンムテインの例は当技術分野において公知である。例えば、米国特許第5,168,049号;同5,506,121号;同6,022,951号;同6,156,493号;同6,165,750号;同6,103,493号;もしくは同6,368,813号;または国際公開されたPCT出願WO 2014/076277号を参照されたい。

【0445】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、例えば2個以上、3個以上、4個以上、場合によっては5、6、7、8、9、10、11、12個以上の機能的サブユニットといった、ビオチン、ビオチン誘導体もしくは類似体、またはストレプトアビジン結合ペプチドに対する1つまたは複数の結合部位Zを含有する1つまたは複数の機能的サブユニットを含有するタンパク質を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインは、単量体;ヘテロ二量体もしくはホモ二量体を含む二量体;ホモ四量体、ヘテロ四量体、一価の四量体または二価の四量体を含む四量体を含むことができるか;または高次多量体もしくはそのオリゴマーを含むことができる。

【0446】

いくつかの態様において、ペプチドリガンド結合パートナーに対するストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインの結合アフィニティーは、 1×10^{-4} M未満、 5×10^{-4} M未満、 1×10^{-5} M未満、 5×10^{-5} M未満、 1×10^{-6} M未満、 5×10^{-6} M未満または 1×10^{-7} M未満であるが、一般には 1×10^{-13} M超、 1×10^{-12} M超、または 1×10^{-11} M超である。例えば、米国特許第5,506,121号に開示されたようなペプチド配列（Strep-tag）は、ビオチン模倣物として作用し、例えば約 10^{-4} M~ 10^{-5} Mの K_D を有する、ストレプトアビジンに対する結合アフィニティーを実証する。場合によっては、結合アフィニティーは、ストレプトアビジン分子内部で変異を作製することでさらに改良されうる。例えば、米国特許第6,103,493号または国際公開されたPCT出願WO 2014/076277号を参照されたい

。いくつかの態様において、結合アフィニティーは、以下に記載されるいずれかのものといった、当技術分野において公知である方法によって測定されうる。

【0447】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンムテインといった試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、ペプチドリガンド結合パートナーに対する結合アフィニティーを呈する。ペプチドリガンド結合パートナーは、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に存在する結合パートナーCでありうる。いくつかの態様において、ペプチド配列はSEQ ID NO:9に示される一般式の配列を含有し、例えばSEQ ID NO:10に示す配列を含有する。いくつかの態様において、ペプチド配列は、SEQ ID NO:11に示される一般式、例えばSEQ ID NO:12に示される一般式を有する。ある例において、ペプチド配列はTrp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly（Strep-tag（登録商標）とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される）である。ある例において、ペプチド配列はTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys（Strep-tag（登録商標）IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される）である。いくつかの態様において、ペプチドリガンドは少なくとも2つのストレプトアビジン結合モジュールの連続配列を含有し、2モジュール間の距離は、少なくとも0アミノ酸および50より少ないアミノ酸であり、1つの結合モジュールは3～8アミノ酸を有し、少なくとも配列His-Pro-Xaa（SEQ ID NO:9）を含有し、この場合、Xaaはグルタミン、アスパラギンまたはメチオニンである。別の結合モジュールは、SEQ ID NO:11に示されるような同じストレプトアビジンペプチドリガンドまたは異なるストレプトアビジンペプチドリガンドである（例えば、国際公開されたPCT出願WO02/077018号；米国特許第7,981,632号を参照されたい）。いくつかの態様において、ペプチドリガンドはSEQ ID NO:13または14のいずれかに示される式を有する配列を含有する。いくつかの態様において、ペプチドリガンドはSEQ ID NO:15～19のいずれかに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0448】

いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、ストレプトアビジンムテインであるか、またはこれを含有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性である部分（例えば、SEQ ID NO:2またはSEQ ID NO:103）と比較すると、1つまたは複数の変異（例えば、アミノ酸置換え）を含有する。例えば、ストレプトアビジンの生物学的に活性である部分は、N末端および/またはC末端にて短縮されたストレプトアビジンバリエーションを含みうる。これは場合によっては、最小ストレプトアビジンと呼ばれる。いくつかの態様において、変異のうちいずれかはこれに作製される、N末端にて短縮された最小ストレプトアビジンは、SEQ ID NO:1に示される配列と比較すると、アミノ酸位置10～16の領域のN末端にて開始し、アミノ酸位置133～142の領域中のC末端にて終端する。いくつかの態様において、N末端にて短縮され、いずれかの変異がこれへと作製される最小ストレプトアビジンは、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列を含有する。いくつかの態様において、最小ストレプトアビジンは、位置Ala13～Ser139までのアミノ酸配列を含有し、任意でこれはAla13の代わりにN末端メチオニン残基を有する。本明細書における目的のために、アミノ酸位置のナンバリングは、SEQ ID NO:1に示されるwt-ストレプトアビジンのナンバリングを全体的に指す（例えば、Argarana et al., *Nucleic Acids Res.* 14 (1986), 1871-1882、図3もまた参照されたい）。

【0449】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、米国特許第6,103,493号記載の変異体である。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示されるように、野生型ストレプトアビジンのアミノ酸配列に基づき、アミノ酸位置44～53の領域内における少なくとも1つの変異体を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、1つまたは複数の残基である44、45、46および/または47における変異体を含む。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、例えば、Val、Ala、IleもしくはLeuなどの疎水性脂肪族アミノ酸を有する野生型スト

レプトアビジンの位置44にてGlu、位置45にて任意のアミノ酸、位置46にて疎水性脂肪族アミノ酸などの脂肪族アミノ酸の置換え、および/または一般にはArgといった、例えばArgもしくはLysなどの塩基性アミノ酸を有する位置47にてValの置換えを含有する。いくつかの態様において、Alaは位置46にあり、および/またはArgは位置47にあり、および/またはValまたはIleは位置44にある。いくつかの態様において、ストレプトアビジン変異体は、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4（ストレプトアビジン変異1、SAM1としても公知である）、またはSEQ ID NO:104に示されるアミノ酸の配列を含有する例示的なストレプトアビジンムテインに示されるような残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6（SAM2としても公知である）またはSEQ ID NO:105に示されるアミノ酸の配列を含有する例示的なストレプトアビジンに示されるような残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含有する。場合によっては、こうしたストレプトアビジンムテインは例えば、米国特許第6,103,493号に記載され、登録商標Strep-Tactin（登録商標）の下で市販されている。

【0450】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、国際公開されたPCT出願W02014/076277号に記載される変異体である。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸位置に準拠して、アミノ酸位置44～53の領域中の少なくとも2つのシステイン残基を含有する。いくつかの態様において、システイン残基は、これらのアミノ酸とのジスルフィド架橋接続を生成するために、位置45および位置52にて存在する。そのような態様において、アミノ酸44は通常グリシンまたはアラニンであり、アミノ酸46は通常アラニンまたはグリシンであり、アミノ酸47は通常アルギニンである。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸位置に準拠した、アミノ酸残基115～121の領域中の少なくとも1つの変異またはアミノ酸の違いを含有する。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、アミノ酸位置117、120および121における少なくとも1つの変異、ならびに/またはアミノ酸118および119の欠失ならびに少なくともアミノ酸位置121の置換を含有する。

【0451】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、位置117に対応する位置にて変異を含有し、この変異はTrp、TyrもしくはPheといった大きな疎水性残基またはGlu、AspもしくはArgといった荷電性残基またはAsnもしくはGlnといった親水性残基、または場合によっては疎水性残基であるLeu、MetもしくはAla、または極性残基であるThr、SerまたはHisに対するものでありうる。いくつかの態様において、位置117における変異は、位置120に対応する位置における変異であって、この変異がSerまたはAlaまたはGlyといった小残基に対するものでありうるものと、位置121に対応する位置における変異であって、この変異がTrp、TyrまたはPheといった嵩高い疎水性残基といった疎水性残基に対するものでありうるものと組み合わせられる。いくつかの態様において、位置117における変異は、SEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性であるフラグメントの位置120に対応する位置における変異であって、この変異がLeu、Ile、MetもしくはVal、または一般にはTyrもしくはPheといった疎水性変異に対するものでありうるものと、SEQ ID NO:1に示される野生型ストレプトアビジンまたはその生物学的に活性のあるフラグメントの位置と比較すると位置121に対応する位置における変異であって、この変異がGly、AlaもしくはSerといった小残基に対するものでありうるものと組み合わせられるか、Glnと組み合わせられるか、またはLeu、Val、Ile、Trp、Tyr、PheもしくはMetといった疎水性残基と組み合わせられる。いくつかの態様において、こうしたムテインはまた、残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷または残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含有しうる。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、残基Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰およびTyr¹²¹を含有する。いくつかの態様において、ムテインストレプトアビジンは、SEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:28に示されるアミノ酸の配列を含有するか、またはSEQ ID NO:27もしくはSEQ ID NO:

10

20

30

40

50

28に示されるアミノ酸の配列に対し、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を呈するアミノ酸の配列は、残基Val44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120およびTyr121を含有し、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに結合する機能的活性を呈する。

【0452】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、任意の組合せで上の変異のいずれかを含有することができ、生じたストレプトアビジンムテインは、ペプチドリガンド (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; Strep-tag (登録商標) とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される) に対しては 2.7×10^{-4} M未満であり、および/またはペプチドリガンド (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; Strep-tag (登録商標) IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される) に対しては 1.4×10^{-4} M未満、および/または 1×10^{-4} M、 5×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 5×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 5×10^{-6} Mもしくは 1×10^{-7} M未満であるが、SEQ ID NO:7~19のいずれかにて示されるいずれかのペプチドリガンドに対して 1×10^{-13} M、 1×10^{-12} Mまたは 1×10^{-11} Mより一般には大きい結合アフィニティを呈してよい。

【0453】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、SEQ ID NO:3~6、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:104もしくはSEQ ID NO:105のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:3~6、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:104もしくはSEQ ID NO:105のいずれかに示されるアミノ酸の配列に対し、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を呈するアミノ酸の配列を呈し、かつペプチドリガンド (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; Strep-tag (登録商標) とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される) に対しては 2.7×10^{-4} M未満であり、および/またはペプチドリガンド (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; Strep-tag (登録商標) IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される) に対しては 1.4×10^{-4} M未満、および/または 1×10^{-4} M、 5×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 5×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 5×10^{-6} Mもしくは 1×10^{-7} M未満であるが、SEQ ID NO:7~19のいずれかにて示されるいずれかのペプチドリガンドに対して 1×10^{-13} M、 1×10^{-12} Mまたは 1×10^{-11} Mより一般には大きい結合アフィニティを呈してよい。

【0454】

いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインはまた、例えばビオチン、イミノビオチン、リポ酸、デスチオビオチン、ジアミンビオチン、HABA (ヒドロキシアゾベンゼン-安息香酸) および/またはジメチル-HABAなどであるがこれに限定されない、別のストレプトアビジンリガンドへの結合を呈する。いくつかの態様において、ストレプトアビジンムテインは、ビオチンまたはデスチオビオチンなど、例えばSEQ ID NO:7~19のいずれかに示される、ビオチン模倣物ペプチドリガンドに対するストレプトアビジンムテインの結合アフィニティよりも大きい、別のストレプトアビジンリガンドに対する結合アフィニティを呈する。したがって、いくつかの態様において、ビオチンまたはビオチン類似体または誘導体 (例えば、デスチオビオチン) は、提供された方法にて競合剤として使用されうる。例えば、一例として、Strep-tag (登録商標) II (例えば、SEQ ID NO:8に示される) を示したペプチドリガンドを有する、Strep-tactin (登録商標) (例えば、SEQ ID NO:4に示される配列を含有している) を示したムテインストレプトアビジンは、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用に対して約 10^{-13} Mの K_D であるのと比較すると、約 10^{-6} Mの K_D を有する結合アフィニティにより特徴づけられる。場合によっては、 $10^{-10} \sim 10^{-13}$ Mまたは約 $10^{-10} \sim 10^{-13}$ Mである K_D でStrep-tactin (登録商標) へ高いアフィニティで結合可能であるビオチンは、結合部位に対してStrep-tag (登録商標) IIと競合しうる。

【0455】

場合によっては、試薬 (例えば、選択試薬または刺激試薬) は、遷移金属イオンに結合する能力を有しうる少なくとも2つのキレート基Kを含有する。いくつかの態様において、

試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、オリゴヒスチジンアフィニティータグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、カルモジュリンまたはその類似体、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、FLAG-ペプチド、HAタグ、マルトース結合タンパク質（MBP）、H SVエピトープ、mycエピトープ、および/またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する。

【0456】

いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、オリゴマーまたはポリマーである。いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、天然に存在するタンパク質の個々の分子と直接的にまたは間接的に結合する工程、単量体の個々の分子または個々の分子を構成するサブユニットの複合体と直接的にまたは間接的に結合する（例えば、天然に存在するタンパク質の二量体、三量体、四量体に直接的にまたは間接的に結合する）工程のいずれかで、生成されうる。例えば、ストレプトアビジンまたはアビジンの四量体のホモ二量体またはヘテロ二量体は、それぞれのオリゴマーまたはポリマーの個々の分子または最小の基本単位と呼ばれてよい。いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、タンパク質の少なくとも2つの個々の分子（例えば、2量体）の結合を含有可能であるか、またはタンパク質（例えば、単量体、四量体）の個々の分子の少なくとも3量体、4量体、5量体、6量体、7量体、8量体、9量体、10量体、11量体、12量体、13量体、14量体、15量体、16量体、17量体、18量体、19量体、20量体、25量体、30量体、35量体、40量体、45量体もしくは50量体でありうる。

【0457】

オリゴマーは、例えば、米国特許出願公開第2004/0082012号記載のいずれかなど、当技術分野において公知である任意の方法を用いて生成されうる。いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、多糖または二機能性リンカーなどによって架橋されうる、2つ以上の個々の分子を含有する。

【0458】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、個々の分子または多糖の存在下にて個々の分子を構成するサブユニットの複合体を架橋することによって得られる。いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、カルボキシル残基を例えばデキストランといった多糖へと導入することで調製されうる。いくつかの局面において、試薬の個々の分子（例えば、単量体、四量体）は、内部リジン残基の一級アミノ基および/または遊離N末端を介し、従来のカルボジイミド化学を用いて、デキストラン骨格におけるカルボキシル基へと結合されうる。いくつかの態様において、カップリング反応は、デキストラン1molあたり約60molである、個々の分子の試薬（例えば、単量体、四量体）の分子比にて実施される。

【0459】

いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、1つまたは複数のストレプトアビジン（例えば、Strep-Tactin（登録商標）またはStrep-Tactin（登録商標）XT）、またはアビジンもしくはアビジンの任意の類似体もしくはアビジンのムテイン（例えば、ニュートラアビジン）のオリゴマーまたはポリマーである。いくつかの態様において、結合部位Zは、アビジンまたはストレプトアビジンの天然ビオチン結合部位であり、この天然ビオチン結合部位にとって、個々の分子において最大4個の結合部位（例えば、四量体は4個の結合部位Zを含有する）が存在しうる。このことから、ホモ四量体は同じ最大4個の結合部位、すなわちZ1を含有しうるが、その一方でヘテロ四量体は、例えばZ1およびZ2を含有する異なりうる4個の結合部位を含有しうる。いくつかの態様において、オリゴマーは同じストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジン、またはアビジンムテインの複数の個々の分子（例えば、複数のホモ四量体）から生成または作製され、この場合、例えばZ1といったオリゴマーのそれぞれの結合部位Zは同じである。例えば、場合によっては、オリゴマーは少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、3

2個、33個、34個、35個、40個、45個、50個以上の結合部位Z1といった、複数の結合部位Z1を含有しうる。いくつかの態様において、オリゴマーは、ストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンもしくはアビジンムテインのヘテロ四量体でありうる複数の個々の分子、および/または例えば、Z1およびZ2などのそれらの結合部位Zとは異なるストレプトアビジン、ストレプトアビジンムテイン、アビジンもしくはアビジンムテインの2つ以上の異なる個々の分子（例えば、異なるホモ四量体）から生成または作製され、この場合、例えばZ1およびZ2などの複数の異なる結合部位Zは、オリゴマー内に存在しうる。例えば、場合によっては、オリゴマーは複数の結合部位Z1、および少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、40個、45個、50個以上の組み合わせられた結合部位Z1およびZ2を組み合わせた状態で含みうる、複数の結合部位Zを含有しうる。

10

【0460】

場合によっては、それぞれのオリゴマーまたはポリマーは、多糖によって架橋されうる。一態様において、ストレプトアビジン、またはアビジン、またはストレプトアビジンの類似体、またはアビジンの類似体（例えば、ニュートラアビジン）のオリゴマーまたはポリマーは、第1工程にて、本質的にはNoguchi, A, et al, Bioconjugate Chemistry (1992) 3,132-137に記載されるように、カルボキシル残基を例えばデキストランなどの多糖へと導入することで調製されうる。いくつかのこうした局面において、次にストレプトアビジンまたはアビジンまたはこれらの類似体は、第2工程にて、内部リジン残基の一級アミノ基および/または遊離N末端を介し、従来のカルボジイミド化学を用いて、デキストラン骨格のカルボキシル基へと連結されうる。場合によっては、ストレプトアビジンまたはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの類似体の架橋されたオリゴマーまたはポリマーは、グルタルアルデヒドなど、リンカーとして働く二機能性分子を介した架橋によって、または当技術分野記載の他の方法によっても得られうる。

20

【0461】

いくつかの態様において、オリゴマーまたはポリマーは、個々の分子または二機能性リンカーもしくはグルタルアルデヒドなどの他の化学リンカーを使用し、個々の分子を構成するサブユニットの複合体を架橋することによって、または当技術分野において公知である他の方法によって得られる。いくつかの局面において、ストレプトアビジンまたはアビジンまたはストレプトアビジンもしくはアビジンの任意のムテイン、またはストレプトアビジンもしくはアビジンの類似体の架橋されたオリゴマーまたはポリマーは、グルタルアルデヒドなど、リンカーとして働く二機能性分子を介し、個々のストレプトアビジン分子もしくはアビジン分子を架橋することによって、または当技術分野記載の他の方法によっても得られうる。例えば、チオール基をストレプトアビジンムテインへと導入することによってストレプトアビジンムテインのオリゴマーを生成することが可能である（これは例えば、ストレプトアビジンと2-イミノチオラン（Trauts試薬）を反応させることによって、および例えば別個の反応にて、ストレプトアビジンムテインに利用可能なアミノ基を活性化させることによって行われうる）。いくつかの態様において、アミノ基のこうした活性化は、ストレプトアビジンムテインと、スルホスクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホSMCC）、またはスクシンイミジル-6-[（β-マレイミドプロピオンアミド）ヘキサノアート]（SMPH）といった市販のヘテロ二機能性架橋リンカーとを反応させることによって達成されうる。いくつかのこうした態様において、このように得られた2つの反応生成物は共に混和され、通常、修飾されたストレプトアビジンムテインのあるバッチに含有されたチオール基と、修飾されたストレプトアビジンムテインの他方のバッチの（例えばマレイミド官能基によって）活性化されたアミノ酸との反応を引き起こす。場合によっては、この反応によって、ストレプトアビジンムテインの多量体/オリゴマーが形成される。これらのオリゴマーは、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16

30

40

50

個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、40個、45個、50個以上といった任意の好適な数の個々の分子を有し、オリゴマー化度は、反応条件に従って変化する。

【0462】

いくつかの態様において、オリゴマー試薬またはポリマー試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、サイズ排除クロマトグラフィーによって単離されることができ、任意の所望の画分を試薬として使用しうる。例えば、いくつかの態様において、2-イミノチオランおよびスルホSMCCといったヘテロ二機能性架橋リンカーの存在下で修飾されたストレプトアビジンムテインを反応させた後、オリゴマー試薬またはポリマー試薬は、サイズ排除クロマトグラフィーによって単離されることができ、任意の所望の画分を試薬として使用しうる。いくつかの態様において、オリゴマーは、単一分子量を有さない（および有する必要がない）が、オリゴマーはガウス分布といった統計的重み分布を観察することができる。場合によっては、例えば、ホモ四量体またはヘテロ四量体などの3つ超のストレプトアビジン四量体またはムテイン四量体を有する任意のオリゴマーは、一般には例えばホモ四量体もしくはヘテロ四量体などの3～50個の四量体、例えばホモ四量体もしくはヘテロ四量体などの10～40個の四量体、またはホモ四量体またはヘテロ四量体などの25～35個の四量体といった可溶性試薬として使用されうる。オリゴマーは、例えばホモ四量体またはヘテロ四量体などの、例えば3～25個のストレプトアビジンムテイン四量体を有することがある。いくつかの局面において、ストレプトアビジンムテインに対して約50 kDaの分子量を有しており、可溶性オリゴマーは約150 kDa～約2000 kDa、約150 kDa～約1500 kDa、約150 kDa～約1250 kDa、約150 kDa～1000 kDa、約150 kDa～約500 kDaまたは約150 kDa～約300 kDa、約300 kDa～約2000 kDa、約300 kDa～約1500 kDa、約300 kDa～約1250 kDa、約300 kDa～1000 kDa、約300 kDa～約500 kDa、約500 kDa～約2000 kDa、約500 kDa～約1500 kDa、約500 kDa～約1250 kDa、約500 kDa～1000 kDa、約1000 kDa～約2000 kDa、約1000 kDa～約1500 kDa、約1000 kDa～約1250 kDa、約1250 kDa～約2000 kDaまたは約1500 kDa～約2000 kDaの分子量を有しうる。一般には、それぞれのストレプトアビジン分子/ムテインが4つのビオチン結合部位を有するので、こうした試薬は12～160結合部位Z、例えば12～100結合部位Zを提供しうる。

【0463】

B. 作用物質

本明細書において企図される作用物質は、選択物質および刺激物質を含む。いくつかの態様において、選択物質および刺激物質は同一である。いくつかの態様において、選択物質および刺激物質は異なっている。ただし、選択試薬および刺激試薬の両方は、同じ物質から製剤化されてよい。いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、例えば細胞表面分子など、細胞表面上の分子へと結合させるための、1つまたは複数の結合部位Bを有する。したがって、いくつかの例では、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、結合部位Bまたは複数の結合部位Bを含有し、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）と標的細胞の表面上の分子との特異的な結合は、Bと分子との間の相互作用を含有する。いくつかの態様において、作用物質は、単一の結合部位、すなわち一箇の結合部位のみを含有する。いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、細胞表面分子に結合する能力を有する3つ、4つ、または5つの結合部位Bを含む複数の結合部位Bなどの少なくとも2つの結合部位Bを有する。いくつかのこうした局面において、少なくとも2つまたは複数の結合部位Bは、同一であってよい。いくつかの態様において、少なくとも2つまたは複数の結合部位Bのうち1つまたは複数は、異なっていてよい（例えば、B1およびB2）。

【0464】

いくつかの態様において、1つまたは複数の異なる作用物質（例えば、1つまたは複数の異なる、例えば選択物質または刺激物質または細胞上の分子に結合する他の作用物質）は、試薬（例えば、選択物質または刺激試薬）に可逆的に結合される。いくつかの態様にお

いて、少なくとも2つ、3つ、4つ以上の異なる作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、同じ試薬へと可逆的に結合される。いくつかの態様において、少なくとも2つの異なる作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、同じ試薬に可逆的に結合される。それにより、それぞれの作用物質は、作用物質と分子との間の特異的な結合に対する結合部位Bまたは複数の結合部位Bを含む。いくつかの態様において、少なくとも2つ以上の作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、例えば同じ分子または実質的に同じ分子に結合するための同じ結合部位Bを含有する。いくつかの態様において、少なくとも2つ以上の作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、異なる分子に結合するための異なる結合部位Bを含有する。いくつかの態様において、第1作用物質（例えば、第1選択物質または第1刺激物質）は、結合部位B1、B2、B3、B4などを含有し、第2作用物質（例えば、第2選択物質または第2刺激物質）は、結合部位B1、B2、B3、B4などのうち別のものを含有する。いくつかの態様において、第1作用物質（例えば、第1選択物質）は結合部位B1を含有し、第2作用物質（例えば、第2選択物質）は結合部位B3を含有する。いくつかの態様において、第1作用物質（例えば、第1刺激物質）は結合部位B2を含有し、第2作用物質（例えば、第2刺激物質）は、結合部位B4を含有する。こうした態様のうちいずれかにおいて、第1作用物質および第2作用物質は、結合パートナーC1または結合パートナーC2を含有しうる。いくつかの態様において、C1およびC2は同じでありうる。いくつかの態様において、C1およびC2は異なる。いくつかの態様において、第1作用物質および第2作用物質は、同じ結合パートナーC1を含有する。

【0465】

場合によっては、作用物質（例えば、結合部位Bを介する）と試薬の結合部位Zとの間の結合の解離定数（ K_D ）は、約 $10^{-2}M$ ～約 $10^{-13}M$ 、または約 $10^{-3}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、または約 $10^{-4}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、または約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-10}M$ の範囲である値を有しうる。いくつかの態様において、結合作用物質と分子との間の結合に関する解離定数（ K_D ）は、例えば、約 10^{-3} ～約 $10^{-7}M$ の K_D の範囲では低いアフィニティーであるものである。いくつかの態様において、結合作用物質と分子との間の結合に関する解離定数（ K_D ）は、約 10^{-7} ～約 $1 \times 10^{-10}M$ の K_D の範囲では高いアフィニティーであるものである。

【0466】

いくつかの態様において、結合部位Bおよび分子を介した作用物質の結合の解離は十分速く発生し、例えば標的細胞を一過的にのみ染色するか、または試薬と作用物質との間で可逆的結合を破壊した後に作用物質と会合させることができる。場合によっては、（結合部位Bを介した）作用物質と分子との間の結合に対する k_{off} 速度（解離速度定数とも呼ばれる）に関して表される場合、 k_{off} 速度は、約 $0.5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ もしくは約 $0.5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 超、約 $1 \times 10^{-4}sec^{-1}$ もしくは約 $1 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 超、約 $2 \times 10^{-4}sec^{-1}$ もしくは約 $2 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 超、約 $3 \times 10^{-4}sec^{-1}$ もしくは約 $3 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 超、約 $4 \times 10^{-4}sec^{-1}$ もしくは約 $4 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 超、約 $5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ もしくは約 $5 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 超、約 $1 \times 10^{-3}sec^{-1}$ もしくは約 $1 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 超、約 $1.5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ もしくは約 $1.5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 超、約 $2 \times 10^{-3}sec^{-1}$ もしくは約 $2 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 超、約 $3 \times 10^{-3}sec^{-1}$ もしくは約 $3 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 超、約 $4 \times 10^{-3}sec^{-1}$ もしくは約 $4 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 超、約 $5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ もしくは約 $5 \times 10^{-3}sec^{-1}$ 超、約 $1 \times 10^{-2}sec$ もしくは約 $1 \times 10^{-2}sec$ 超、または約 $5 \times 10^{-1}sec^{-1}$ もしくは約 $5 \times 10^{-1}sec^{-1}$ 超である。経験的に特定の作用物質および細胞分子相互作用に好適な k_{off} 速度範囲を決定することは、当業者の水準内である（例えば、米国特許出願公開第2014/0295458号を参照されたい）。例えば、ある程度高い、例えば $4.0 \times 10^{-4}sec^{-1}$ 超の k_{off} 速度を有する作用物質は、結合複合体の破壊後、大半の作用物質が1時間以内に除去または分離されうるように使用されてよい。別の場合によっては、例えば $1.0 \times 10^{-4}sec^{-1}$ の k_{off} 速度を有する作用物質は、結合複合体の破壊後、大半の作用物質が約3時間半以内に細胞から除去または分離されうるように使用されてよい。

【0467】

いくつかの態様において、この結合の K_D 、ならびに作用物質（例えば、例えば、選択物質または刺激物質）の結合部位Bと細胞表面分子との間に形成されたこの結合の K_D 速度、 k_{off} 速度および k_{on} 速度は、例えば、蛍光滴定、平衡透析または表面プラズモン共鳴といっ

た任意の好適な手段によって決定されうる。

【0468】

いくつかの局面において、細胞表面分子は、それに対して作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）が方向づけられうる分子である。いくつかの態様において、細胞表面分子はペプチドまたはタンパク質、例えば膜受容体タンパク質といった受容体である。いくつかの態様において、受容体は脂質、多糖または核酸である。いくつかの態様において、タンパク質である細胞表面分子は、表在性膜タンパク質または内在性膜タンパク質でありうる。この細胞表面分子は、いくつかの態様において、膜をまたぐ1つまたは複数のドメインを有しうる。少数の具体例としては、膜貫通ドメインを有する膜タンパク質は、嗅覚受容体、ロドプシン受容体、ロドプシンフェロモン受容体、ペプチドホルモン受容体、味覚受容体、GABA受容体、オピエート受容体、セロトニン受容体、Ca²⁺受容体、メラノプシンといったG-タンパク質結合受容体、アセチルコリン受容体、ニコチン受容体、アドレナリン受容体、ノルアドレナリン受容体、カテコールアミン受容体、L-DOPA受容体、ドーパミンおよびセロトニン（生体アミン、エンドルフィン/エンケファリン）神経ペプチド受容体を含む、リガンド開口型受容体、電位開口型受容体または機械的開口型受容体といった神経伝達物質受容体、セリンキナーゼ/スレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼといった受容体キナーゼ、クロライドチャネル、カリウムチャネル、ナトリウムチャネルといったポリリン/チャネル、OMPタンパク質、アミノ酸トランスポータ、Na-グルコーストランスポータ、Na/ヨードトランスポータといったABCトランスポータ（ATP結合カセットトランスポータ）、集光性複合体、シトクロムc酸化酵素、ATPアーゼNa/K、ATPアーゼH/K、ATPアーゼCaといったイオントランスポータ、メタロプロテアーゼ、インテグリンまたはカトヘリン（catherin）といった細胞接着受容体であってよい。

【0469】

いくつかの態様において、細胞表面分子は、所望の細胞集団または細胞亜集団、例えば血液細胞の集団または亜集団、例えば、リンパ球（例えば、T細胞、Tヘルパー細胞、例えばCD4+Tヘルパー細胞、B細胞またはナチュラルキラー細胞）、単球、または幹細胞、例えばCD34陽性末梢幹細胞またはNanogもしくはOct-4発現幹細胞を規定する抗原でありうる。T細胞の例としては、CMV特異的CD8+Tリンパ球、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞および制御性T細胞（Treg）などの細胞が挙げられる。Tregの具体例としてはCD4 CD25 CD45RA Treg細胞があり、メモリーT細胞の具体例としてはCD62L CD8+特異的セントラルメモリーT細胞がある。細胞表面分子は、腫瘍細胞に対するマーカーであってよい。

【0470】

上に記載されるように、いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、細胞表面分子に結合可能である結合部位Bに加え、結合パートナーCを有する。いくつかの局面において、この結合パートナーCは、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬））の結合部位Zに結合可能であり、試薬は結合パートナーCに対して1つまたは複数の結合部位を有する。いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に含まれる結合パートナーCと、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬））の結合部位Z（複数可）との間に形成されうる非共有結合は、任意の所望の強度およびアフィニティーであってよく、これは方法が実施される条件下にて破壊可能または可逆的であってよい。作用物質（例えば、受容体結合作用物質または選択物質）は、少なくとも1つ、2つ、3つ以上を含む、追加の結合パートナーCを含むことができ、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬（例えば、オリゴマー刺激試薬））は、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に含まれる結合パートナーCに対する、少なくとも2つ、例えば3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ以上の結合部位Zを含むことができる。米国特許第7,776,562号、同8,298,782号または国際特許出願第2002/054065号に記載されるように、例えば、結合パートナーCおよび結合部位Zは複体内で可逆的に結合可能であり、結果例えばアビディティー効果を引き起こすように、結合パートナーCおよび試薬と、1つまたは複数の対応する結合部位Zの任

10

20

30

40

50

意の組合せが選択されることができる。

【0471】

作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に含まれる結合パートナーCは、例えば炭化水素ベース（ポリマーを含む）であって、窒素基、リン基、イオウ基、カルベン基、ハロゲン基または擬ハロゲン基を含みうる。いくつかの局面において、これは、アルコール、有機酸、無機酸、アミン、ホスフィン、チオール、ジスルフィド、アルカン、アミノ酸、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、脂質、糖類、オリゴ糖または多糖であってもよい。さらなる例として、これは、カチオン、アニオン、ポリカチオン、ポリアニオン、ポリカチオン、電解質、ポリ電解質、カーボンナノチューブまたはカーボンナノフォームであってもよい。一般に、そのような結合パートナーCは試薬の結合部位に対して他の物体よりも高いアフィニティを有する。それぞれの結合パートナーCの例としては、クラウンエーテル、免疫グロブリン、そのフラグメントおよび抗体様機能を持つタンパク質性結合分子が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0472】

いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に含まれる結合パートナーCはビオチンを含み、試薬はビオチンに可逆的に結合するストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に含まれる結合パートナーCは、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体を含み、試薬は、それぞれのビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）に含まれる結合パートナーCはストレプトアビジン結合ペプチドまたはアビジン結合ペプチドを含み、試薬は、それぞれのストレプトアビジン結合ペプチドまたはアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジン、アビジン、ストレプトアビジン類似体またはアビジン類似体を含む。

【0473】

いくつかの態様において、試薬（例えば、選択試薬または刺激試薬）は、上記のいずれかを含むストレプトアビジンムテイン（例えば、SEQ ID NO:3~6、104、105に示される）といったストレプトアビジンであり、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に含まれる結合パートナーCは、ストレプトアビジン結合ペプチドを含んでよい。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、SEQ ID NO:9に示される一般式の配列を含んでよく、例えばSEQ ID NO:10に示す配列を含有する。いくつかの態様において、ペプチド配列は、SEQ ID NO:11に示される一般式、例えばSEQ ID NO:12に示される一般式を有する。ある例において、ペプチド配列はTrp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly（Strep-tag（登録商標）とも呼ばれ、SEQ ID NO:7に示される）である。ある例において、ペプチド配列はTrp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys（Strep-tag（登録商標）IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される）である。いくつかの態様において、ペプチドリガンドは少なくとも2つのストレプトアビジン結合モジュールの連続配列を含有し、2モジュール間の距離は、少なくとも0アミノ酸および50より少ないアミノ酸であり、1つの結合モジュールは3~8アミノ酸を有し、少なくとも配列His-Pro-Xaa（SEQ ID NO:9）を含有し、この場合、Xaaはグルタミン、アスパラギンまたはメチオニンである。別の結合モジュールは、SEQ ID NO:11に示されるような同じストレプトアビジンペプチドリガンドまたは異なるストレプトアビジンペプチドリガンドである（例えば、国際公開されたPCT出願WO02/077018号;米国特許第7,981,632号を参照されたい）。いくつかの態様において、ペプチドリガンドはSEQ ID NO:13または14のいずれかに示される式を有する配列を含有する。いくつかの態様において、ペプチドリガンドはSEQ ID NO:15~19のいずれかに示されるアミノ酸の配列を有する。多くの場合によっては、これらのストレプトアビジン結合ペプチド全ては、同じ結合部位、すなわちストレプトアビジンのビオチン結合部位に結合する。こうした1つまたは複数のストレプトアビジン結合ペプチドが、例えばC1およびC2などの結合パートナーCとして使用される場合、多量体化試薬は、通常はス

10

20

30

40

50

トレプトアビジンムテインである。

【0474】

いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、さらに修飾されてよい。いくつかの態様において、ストレプトアビジン結合ペプチドは、ニッケルを負荷したトリスNTA (His-STREPPERまたはHis/Strep-tag (登録商標) IIアダプターともいう) とコンジュゲートされたペプチド配列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (Strep-tag (登録商標) IIとも呼ばれ、SEQ ID NO:8に示される) を含んでよい。

【0475】

いくつかの態様において、作用物質 (例えば、受容体結合作用物質または選択物質) の結合パートナーCは、当業者にはアフィニティータグとして公知である部分を含む。そのような態様において、試薬は、そのアフィニティータグに結合することが公知である対応する結合パートナー、例えば抗体または抗体フラグメントを含みうる。公知のアフィニティータグのいくつかの具体例として、作用物質 (例えば、選択物質または刺激物質) 内に含まれる結合パートナーCは、ジニトロフェノールまたはジゴキシゲニン、オリゴヒスチジン、ポリヒスチジン、免疫グロブリンドメイン、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、キチン結合タンパク質 (CBP) またはチオレドキシン、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、FLAG'-ペプチド、HAタグ (配列:Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) (SEQ ID NO:20)、VSV-G-タグ (配列:Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys) (SEQ ID NO:21)、HSV-タグ (配列:Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp) (SEQ ID NO:22)、T7エピトープ (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly) (SEQ ID NO:23)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、単純ヘルペスウイルスグリコタンパク質Dの配列Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp (SEQ ID NO:24) のHSVエピトープ、配列Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (SEQ ID NO:25) の転写制御因子c-mycの「myc」エピトープ、V5-タグ (配列:Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) (SEQ ID NO:26)、またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を含んでよい。そのような態様において、抗体または抗体フラグメントでありうる試薬の1つまたは複数の結合部位Zと、抗原との間に形成される複合体は、遊離の抗原、すなわち遊離のペプチド (エピトープタグ) または遊離のタンパク質 (MBPまたはCBPなど) を加えることによって、競合的に破壊することができる。いくつかの態様において、アフィニティータグはオリゴヌクレオチドタグであってもよい。場合によっては、そのようなオリゴヌクレオチドタグを使用することで、例えば、試薬に連結されたまたは試薬に含まれる相補的配列を持つオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる。

【0476】

好適な結合パートナーCのさらなる例には、レクチン、プロテインA、プロテインG、金属、金属イオン、ニトリロ三酢酸誘導体 (NTA)、RGDモチーフ、デキストラン、ポリエチレンジイミン (PEI)、レドックスポリマー、グリコタンパク質、アプタマー、染料、アミロース、マルトース、セルロース、キチン、グルタチオン、カルモジュリン、ゼラチン、ポリミキシン、ヘパリン、NAD、NADP、リジン、アルギニン、ベンゾアミジン、ポリUまたはオリゴ-dTを含むがこれに限定されない。コンカナバリンAなどのレクチンは、多糖またはグリコシル化タンパク質に結合することで公知である。染料の具体例としては、チバクロンブルーF3G-A (CB) またはレッドHE-3Bといったトリアジン染料であるが、これはNADH-依存酵素と特異的に結合する。通常、Green AはCo Aタンパク質、ヒト血清アルブミン、およびデヒドロゲナーゼに結合する。場合によっては、染料である7-アミノアクチノマイシンDおよび4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドールはDNAに結合する。一般には、Ni、Cd、Zn、CoまたはCuといった金属のカチオンは、ヘキサヒスチジンまたはHis-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cysタグ (MATタグ) (SEQ ID NO:35) およびN-メタクリロイル-(L)-システインメチルエステルを含む、オリゴヒスチジン含有配列といったアフィニティータグと結合させるのに通常は使用される。

【0477】

いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に含まれる結合パートナーCと、試薬の1つまたは複数の結合部位Zの間の結合は、二価カチオン、三価カチオンまたは四価カチオンの存在下にて発生する。この点については、いくつかの態様において、試薬は二価カチオン、三価カチオンまたは四価カチオンを含み、通常は好適なキレート剤の使用により、例えば組み合わせられて保持される。いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に含まれる結合パートナーCは、例えば、錯体、二価カチオン、三価カチオンまたは四価カチオンを含む部分を含んでよい。それぞれの金属キレート剤の例としては、エチレンジアミン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、グリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、N,N-ビス（カルボキシメチル）グリシン（ニトリロ三酢酸、NTAとも呼ばれる）、1,2-ビス（o-アミノフェノキシ）エタン-N,N,N',N'-四酢酸（BAPTA）、2,3-ダイマー-カプト-1-プロパノール（ジメルカプロル）、ポルフィンおよびヘムが含まれるがこれに限定されない。一例として、EDTAは、例えば銀（ Ag^+ ）、カルシウム（ Ca^{2+} ）、マンガニン（ Mn^{2+} ）、銅（ Cu^{2+} ）、鉄（ Fe^{2+} ）、コバルト（ Co^+ ）およびジルコニウム（ Zr^{4+} ）といった、最大一価、最大二価、最大三価および最大四価の金属イオンを有する錯体を形成するが、BAPTAは Ca^{2+} に対して特異的である。具体例としては、当技術分野において使用される標準的な方法は、オリゴヒスチジンタグおよび銅（ Cu^{2+} ）イオン、ニッケル（ Ni^{2+} ）イオン、コバルト（ Co^{2+} ）イオン、または亜鉛（ Zn^{2+} ）イオンとの間で錯体を形成するものであるが、これはキレート剤であるニトリロ三酢酸（NTA）によって提示される。

【0478】

いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に含まれる結合パートナーCは、カルモジュリン結合ペプチドを含み、試薬は例えば、米国特許第5,985,658号記載の多量体のカルモジュリンを含む。いくつかの態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に含まれる結合パートナーCはFLAGペプチドを含み、試薬はFLAGペプチドに結合する抗体を含む。例えばFLAGペプチドは、米国特許第4,851,341号記載のモノクローナル抗体4E11に結合する。一態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に含まれる結合パートナーCはオリゴヒスチジンタグを含み、試薬はオリゴヒスチジンタグと結合する抗体または遷移金属イオンを含む。場合によっては、これらの結合複合体の全ての破壊は、EDTAまたはEGTAを加えることによってなど、例えばカルシウムのキレート化といった金属イオンのキレート化によって達成されてよい。いくつかの態様において、カルモジュリン、4E11といった抗体またはキレート化された金属イオンまたは遊離型キレート剤は、従来の方法によって多量体化されてよい。これは例えば、ストレプトアビジンまたはアビジンまたはそれらのオリゴマーを用いたビオチン標識化または複合化によって、または第1工程にて、本質的にはNoguchi, A, et al、Bioconjugate Chemistry (1992) 3、132-137に記載されるように、例えばデキストランといったカルボキシル残基を多糖へと導入し、第2工程にて、一級アミノ基を介し、カルモジュリンまたは抗体またはキレート化された金属イオンまたは遊離キレート剤を、従来のカルボジイミド化学を用いて例えばデキストランといった多糖骨格におけるカルボキシル基に結合する。いくつかのこうした態様において、作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）中に含まれる結合パートナーCと、試薬の1つまたは複数の結合部位Zの間の結合は、金属イオンのキレート化によって破壊することができる。金属キレート化は例えば、EGTAまたはEDTAの添加によって達成されてよい。

【0479】

いくつかの態様において、細胞表面分子に特異的に結合する作用物質（例えば、選択物質または刺激物質）は、例えば、抗体、そのフラグメントまたは抗体様機能を有するタンパク質性結合分子に含まれてよい。いくつかの態様において、作用物質の結合部位Bは抗体の結合部位であり、例えば抗体の1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）であるか、またはこれを含む。（組換え）抗体フラグメントの例には、Fabフラグメント、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント（scFv）、二価抗体フラグメント、例えば（Fab）₂、

フラグメント、ダイアボディ、トリアボディ (Iliades, P., et al., FEB S Lett (1997) 409, 437-441)、デカボディ (Stone, E., et al., Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94) および他のドメイン抗体 (Holt, L.J., et al., Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490) が含まれるが、これに限定されない。いくつかの態様において、作用物質 (例えば、受容体結合作用物質または選択物質) は、「デュオカリン (duocalin)」としても公知である二量体型リポカリンムテインなどの二価タンパク質性人工結合分子を含んでよい。

【0480】

いくつかの態様において、作用物質 (例えば、選択物質または刺激物質) は、単一の結合部位Bを有してよく、すなわちこれは一価であってよい。一価の作用物質 (例えば、選択物質または刺激物質) の例としては、一価抗体フラグメント、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子またはMHC分子が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。一価抗体フラグメントの例としては、Fabフラグメント、Fvフラグメント、および二価一本鎖Fvフラグメントを含む一本鎖Fvフラグメント (scFv) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0481】

いくつかの態様において、作用物質 (例えば、選択物質または刺激物質) は、抗体、または例えば、Fabフラグメント、Fvフラグメント、一本鎖Fvフラグメント (scFv)、 $F(ab')_2$ -フラグメントといった二価抗体フラグメントといった抗体の抗原結合フラグメントである。いくつかの態様において、作用物質 (例えば、選択物質または刺激物質) は、関心対象の細胞分子に結合することで公知である親抗体であるか、またはこれを由来とする。細胞表面分子に対する種々の抗体分子またはそれらのフラグメントは、当技術分野では周知であり、種々のこうしたものの任意のものは、本明細書における方法では作用物質として使用されうる。いくつかの態様において、作用物質 (例えば、選択物質または刺激物質) は、親抗体または参照抗体の可変重鎖において、1つまたは複数のアミノ酸置換を含有する抗体またはそのフラグメントであり、例えば、変性されたアフィニティーを有するか、または上に記載されるように十分速いOff速度を呈する抗体を生成する。例えば、こうした変異の例示的なものは、抗CD4抗体である13B8.2 (例えば、米国特許第7,482,000号、米国特許出願公開第2014/0295458号または国際特許出願第2013/124474号を参照されたい) の変異体の文脈で公知であり、こうした変異のいずれかは、別の親抗体または参照抗体に生成されうる。

【0482】

いくつかの局面において、一価でありうる作用物質 (例えば、選択物質または刺激物質) は例えば、リポカリンファミリーのポリペプチド (「Anticalin」 (登録商標) としても公知) に基づくムテインといった一価の抗体フラグメントまたは一価の人口結合分子 (タンパク質性または別のもの)、または抗体もしくは $F(ab')_2$ フラグメントなど、双方の結合部位が保持されるフラグメントなどの二価の分子を含む。

【0483】

抗体様機能を有するタンパク質性結合分子の一例は、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテインを含む (例えば、国際公開公報第03/029462号、Beste et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903を参照されたい)。一般には、例えば、ビリリン結合タンパク質、ヒト好中球リポカリンゼラチナーゼ関連リポカリン、ヒトApoリポタンパク質Dまたはヒト涙リポカリンは、これらが所与の標的に結合するように修飾されうる天然リガンド結合部位を持つ。細胞表面分子に特異的に結合する作用物質 (例えば、選択物質または刺激物質) として使用され得る抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子のさらなる例には、いわゆるグルボディ (例えば、国際特許出願第96/23879号を参照されたい)、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質 (Mosavi, L.K., et al, Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448) または結晶スキャフォールド (例えば、国際特許出願第01/04144号)、Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187, AdNectins記載のタンパク質、アドネクチン、テトラネクチンおよびアビマーが含まれるがこれに

10

20

30

40

50

限定されない。一般には、ヒト受容体ドメインのファミリーのエクソンシャッフリングによって開発された多価アビマータンパク質を含むアビマーは、複数の細胞表面受容体における複数のドメインの紐 (string) として発生する、いわゆるAドメインを含有する (Silverman, J., et al, Nature Biotechnology (2005) 23,1556-1561)。アドネクチンは、一般にはヒトフィブロネクチンのドメインを由来とするが、通常は標的への免疫グロブリン様結合のために操作されうる3つのループを含有する (Gill, D.S. & Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17,653-658)。テトラネクチンは、一般にはそれぞれのヒトホモ三量体タンパク質を由来とするが、通常、所望の結合のために操作されうるC型レクチンドメインにおけるループ領域を同様に含有する。ペプトイドは、場合によってはタンパク質リガンドとして作用しうるが、通常はその側鎖が炭素原子よりもアミド窒素に結合されるといった点でペプチドとは異なるオリゴ (N-アルキル) グリシンである。ペプトイドは通常、プロテアーゼおよび別の修飾酵素に対して耐性があり、よりペプチドよりもかなり高い細胞透過性を有しうる (例えば、Kwon, Y.-U., and Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129,1508-1509を参照されたい)。

【0484】

好適なタンパク質性結合分子のさらなる例は、EGF様ドメイン、Krigleドメイン、フィブロネクチンI型ドメイン、フィブロネクチンII型ドメイン、フィブロネクチンIII型ドメイン、PANDドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、Kunitz/ウシ膵臓トリプシン阻害剤ドメイン、テンダミスタット、カザール型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル (P型) ドメイン、ヴォン・ヴィレブランド因子C型ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、チログロブリンI型リピート、LDL受容体クラスAドメイン、スシドメイン、リンクドメイン、トロンボスポンジンI型ドメイン、免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリン様ドメイン (例えばドメイン抗体またはラクダ重鎖抗体)、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、ヴォン・ヴィレブランド因子A型ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアダドメイン、F5/8タイプCドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、「カップボディ」 (Ill. et al., Protein Eng (1997) 10,949-57を参照、いわゆる「ミニボディ」 (Martin et al., EMBO J (1994) 13,5303-5309)、ダイアボディ (Holliger et al., PNAS USA (1993) 90,6444-6448を参照されたい)、いわゆる「Janusis」 (Traunecker et al., EMBO J (1991) 10,3655-3659またはTraunecker et al., Int J Cancer (1992) Suppl 7,51-52を参照されたい)、ナノボディ、マイクロボディ、アフィリン、アフィボディ、ノッチン、ユビキチン、ジンクフィンガータンパク質、自己蛍光タンパク質またはロイシンリッチリピートタンパク質を含むが、これに限定されない。いくつかの態様において、抗体様機能を持つ核酸分子の一例はアプタマーである。一般には、アプタマーは明確な三次元モチーフにフォールディングして、所与の標的構造に対して高いアフィニティを示す。

【0485】

III. 無血清培地配合物および関連構成成分

提供される方法の1つまたは複数の工程は、基礎培地中にグルタミンの遊離形態 (すなわち、L-グルタミン) を含有する無血清培地の存在下で行うことができる。血清代替タンパク質のような少なくとも1つのタンパク質、または細胞の維持、成長および/もしくは拡大増殖を指示する1つもしくは複数の他の構成成分を含有する1つまたは複数のサプリメントを含む、1つまたは複数のさらなるサプリメントを添加することができる。いくつかの態様において、無血清培地は、合成アミノ酸 (例えば、L-グルタミンのジペプチド形態、例えば、L-アラニル-L-グルタミン) を含有する。いくつかの態様において、合成アミノ酸 (例えば、L-グルタミンのジペプチド形態、例えば、L-アラニル-L-グルタミン) の濃度は、0.5 mM または約0.5 mM ~ 5 mM または約5 mM (例えば2 mM) である。いくつかの態様において、L-グルタミンの濃度は、0.5 mM または約0.5 mM ~ 5 mM または約5 mM (例えば2 mM) である。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は、ヒトタンパク質または組み換えタンパク質、例えば血清代替タンパク質、例えばアルブミンである。いくつかの態様

において、無血清培地は、1つまたは複数の組み換えサイトカイン(例えばIL-2、IL-7、またはIL-15)をさらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数の組み換えサイトカイン(例えばIL-2、IL-7、またはIL-15)をさらに含まない。いくつかの態様において、無血清培地は、フェノールレッドを含まない。

【0486】

いくつかの態様において、提供される無血清培地は、液体基礎培地および1つまたは複数のサプリメントから生成または調製される。

【0487】

いくつかの態様において、無血清培地は、L-グルタミンのジペプチド形態、例えば、L-アラニル-L-グルタミンである合成アミノ酸などの、細胞培養においてL-グルタミンに変換されることができる合成アミノ酸を含有することができる。場合によっては、合成アミノ酸は、L-グルタミンおよびタンパク質を含まない基礎培地中に提供される。いくつかの態様において、合成アミノ酸(例えば、L-グルタミンのジペプチド形態、例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、0.5 mMまたは約0.5 mMから5 mMまたは約5 mM (例えば2 mM)である。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質はヒト由来タンパク質、組換えタンパク質、または両方である。いくつかの態様において、基礎培地はフェノールレッドを含まない。

【0488】

いくつかの態様において、無血清培地を調製するためのサプリメントの中には、サプリメントが凍結されているか、またはL-グルタミンがその構成成分になった後に凍結されている、少なくとも1つのタンパク質と、グルタミンの遊離形態、例えばL-グルタミンとを含むサプリメントがある。いくつかの態様において、サプリメント中のL-グルタミンの濃度は、200 mM未満、例えば150 mM未満、100 mMまたはそれ以下、例えば20 mM~120 mM、または40 mM~100 mM、例えば約80 mMである。いくつかの態様において、サプリメントが基礎培地と組み合わせられた後のL-グルタミンの濃度は、約0.5 mM~約5 mM (例えば2 mM)である。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は非哺乳動物起源のものではない。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は、ヒトタンパク質もしくはヒト由来タンパク質であるか、または組換えである。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質はアルブミン、例えばヒトまたは組換えヒトアルブミンを含む。

【0489】

A. 基礎培地

いくつかの態様において、基礎培地は、グルコースなどの炭素源、水、1種または複数種の塩、ならびにアミノ酸および窒素の供給源を含む。

【0490】

いくつかの態様において、基礎培地はアミノ酸を含む。いくつかの態様において、アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、セリン、グルタミン、ヒスチジン、グリシン、スレオニン、アルギニン、アラニン、チロシン、システイン、バリン、メチオニン、ノルバリン、トリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシン、ロイシン、リシン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、および/またはプロリンを含む。

【0491】

いくつかの態様において、基礎培地は、少なくとも1つの合成アミノ酸を含む。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、細胞を含む細胞培養物中でグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)に変換することができる。いくつかの態様において、細胞はヒト細胞を含む。いくつかの態様において、細胞は免疫細胞を含む。いくつかの態様において、細胞は遺伝子操作された細胞である。いくつかの態様において、細胞はT細胞である。いくつかの態様において、細胞は遺伝子操作されたT細胞である。いくつかの態様において、細胞は、組換え受容体(例えば、キメラ抗原受容体)を発現するように遺伝子操作されている。いくつかの態様において、細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)発現T細胞である。

【0492】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、合成アミノ酸は、グルタミンの安定化形態(すなわち、L-グルタミン)である。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、水溶液(例えば、基礎培地)中でグルタミン(すなわち、L-グルタミン)よりも安定である。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に有意な量のグルタミンを生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に有意な量のピロリドンカルボン酸またはアンモニアを生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に少なくとも約1、3、5、7、9、11、13、または14日間、有意な量のグルタミン(すなわち、L-グルタミン)を生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、または8週間、有意な量のグルタミン(すなわち、L-グルタミン)を生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月間、有意な量のグルタミン(すなわち、L-グルタミン)を生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に少なくとも約1、2、3、4、または5年間、有意な量のグルタミン(すなわち、L-グルタミン)を生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に少なくとも約1、3、5、7、9、11、13、または14日間、有意な量のピロリドンカルボン酸またはアンモニアを生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、または8週間、有意な量のピロリドンカルボン酸またはアンモニアを生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12ヶ月間、有意な量のピロリドンカルボン酸またはアンモニアを生成しない。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、基礎培地中に少なくとも約1、2、3、4、または5年間、有意な量のピロリドンカルボン酸またはアンモニアを生成しない。

【0493】

いくつかの態様において、合成アミノ酸は、水溶液(例えば、基礎培地)に可溶性である。いくつかの態様において、水溶液中の合成アミノ酸の溶解度は、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)よりも高い。

【0494】

いくつかの態様において、合成アミノ酸は細胞に輸送されることができ、そこで合成アミノ酸はグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)に変換されることができる。いくつかの態様において、細胞は免疫細胞を含む。いくつかの態様において、細胞は遺伝子操作された細胞である。いくつかの態様において、細胞はT細胞である。いくつかの態様において、細胞は遺伝子操作されたT細胞である。いくつかの態様において、細胞は、組換え受容体(例えば、キメラ抗原受容体)を発現するように遺伝子操作されている。いくつかの態様において、細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)発現T細胞である。

【0495】

いくつかの態様において、合成アミノ酸はジペプチドである。いくつかの態様において、合成アミノ酸はトリペプチドである。いくつかの態様において、合成アミノ酸は、L-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)、例えば基礎培地中で自発的に分解しないGlutamax(商標)におけるジペプチドである。

【0496】

いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、約0.5 mM~5 mMである。いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、2 mMまたは約2 mMである。いくつかの態様において、L-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、0.5 mM~1 mM、0.5 mM~1.5 mM、0.5 mM~2 mM、0.5 mM~2.5 mM、0.5 mM~3 mM、0.5 mM~3.5 mM、0.5 mM~4 mM、0.5 mM~4.5 mM、0.5 mM~5 mM、1 mM~1.5 mM、1 mM~2 mM、1 mM~2.5 mM、1 mM~3 mM、1 mM~3.5 mM、1 mM~4 mM、1 mM~4.5 mM、1 mM~5 mM、1.5 mM~2 mM、1.5 mM~2.5 mM、1.5 mM~3 mM、1.5 mM~3.5 mM、1.5 mM~4 mM、1.5 mM~4.5 mM、1.5 mM~5 mM、2 mM~2.5 mM、2 mM

～3 mM、2 mM～3.5 mM、2 mM～4 mM、2 mM～4.5 mM、2 mM～5 mM、2.5 mM～3 mM、2.5 mM～3.5 mM、2.5 mM～4 mM、2.5 mM～4.5 mM、2.5 mM～5 mM、3 mM～3.5 mM、3 mM～4 mM、3 mM～4.5 mM、3 mM～5 mM、3.5 mM～4 mM、3.5 mM～4.5 mM、3.5 mM～5 mM、4 mM～4.5 mM、4 mM～5 mMもしくは4.5 mM～5 mM、または約0.5 mM～1 mM、約0.5 mM～1.5 mM、約0.5 mM～2 mM、約0.5 mM～2.5 mM、約0.5 mM～3 mM、約0.5 mM～3.5 mM、約0.5 mM～4 mM、約0.5 mM～4.5 mM、約0.5 mM～5 mM、約1 mM～1.5 mM、約1 mM～2 mM、約1 mM～2.5 mM、約1 mM～3 mM、約1 mM～3.5 mM、約1 mM～4 mM、約1 mM～4.5 mM、約1 mM～5 mM、約1.5 mM～2 mM、約1.5 mM～2.5 mM、約1.5 mM～3 mM、約1.5 mM～3.5 mM、約1.5 mM～4 mM、約1.5 mM～4.5 mM、約1.5 mM～5 mM、約2 mM～2.5 mM、約2 mM～3 mM、約2 mM～3.5 mM、約2 mM～4 mM、約2 mM～4.5 mM、約2 mM～5 mM、約2.5 mM～3 mM、約2.5 mM～3.5 mM、約2.5 mM～4 mM、約2.5 mM～4.5 mM、約2.5 mM～5 mM、約3 mM～3.5 mM、約3 mM～4 mM、約3 mM～4.5 mM、約3 mM～5 mM、約3.5 mM～4 mM、約3.5 mM～4.5 mM、約3.5 mM～5 mM、約4 mM～4.5 mM、約4 mM～5 mMもしくは約4.5 mM～5 mM（それぞれ両端の値を含む）である。いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、5 mM～7.5 mM、5 mM～10 mM、5 mM～12.5 mM、5 mM～15 mM、5 mM～17.5 mM、5 mM～20 mM、7.5 mM～10 mM、7.5 mM～12.5 mM、7.5 mM～15 mM、7.5 mM～17.5 mM、7.5 mM～20 mM、10 mM～12.5 mM、10 mM～15 mM、10 mM～17.5 mM、10 mM～20 mM、12.5 mM～15 mM、12.5 mM～17.5 mM、12.5 mM～20 mM、15 mM～17.5 mM、15 mM～20 mMもしくは17.5 mM～20 mM、または約5 mM～7.5 mM、約5 mM～10 mM、約5 mM～12.5 mM、約5 mM～15 mM、約5 mM～17.5 mM、約5 mM～20 mM、約7.5 mM～10 mM、約7.5 mM～12.5 mM、約7.5 mM～15 mM、約7.5 mM～17.5 mM、約7.5 mM～20 mM、約10 mM～12.5 mM、約10 mM～15 mM、約10 mM～17.5 mM、約10 mM～20 mM、約12.5 mM～15 mM、約12.5 mM～17.5 mM、約12.5 mM～20 mM、約15 mM～17.5 mM、約15 mM～20 mMもしくは約17.5 mM～20 mM（それぞれ両端の値を含む）である。いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、少なくとも0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、2.5 mM、3 mM、3.5 mM、4 mM、4.5 mMもしくは5 mM、または少なくとも約0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、2.5 mM、3 mM、3.5 mM、4 mM、4.5 mMもしくは5 mMである。いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、2 mMであるか、または約2 mMである。いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、多くても2 mM、2.5 mM、3 mM、3.5 mM、4 mM、4.5 mM、5 mM、5.5 mM、6 mM、6.5 mM、7 mM、7.5 mM、8 mM、8.5 mM、9 mM、9.5 mM、10 mM、12.5 mM、15 mM、17.5 mMもしくは20 mM、または約2 mM、約2.5 mM、約3 mM、約3.5 mM、約4 mM、約4.5 mM、約5 mM、約5.5 mM、約6 mM、約6.5 mM、約7 mM、約7.5 mM、約8 mM、約8.5 mM、約9 mM、約9.5 mM、約10 mM、約12.5 mM、約15 mM、約17.5 mMもしくは約20 mMである。

【0497】

いくつかの態様において、基礎培地は、L-グルタミンを含まないか、または有意な量のL-グルタミンを含まない。

【0498】

いくつかの態様において、基礎培地はL-グルタミンを含む。いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンの濃度は、0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mMもしくは0.5 mMであるか、または約0.1 mM、約0.2 mM、約0.3 mM、約0.4 mMもしくは約0.5 mMであるか、または0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mMもしくは0.5 mM未満であるか、または約0.1 mM、0.2 mM、0.3 mM、0.4 mMもしくは0.5 mM未満である。い

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンの濃度は、1 mM、2 mM、3 mM、4 mMもしくは5 mMであるか、約1 mM、約2 mM、約3 mM、約4 mMもしくは約5 mMであるか、または1 mM、2 mM、3 mM、4 mMもしくは5 mM未満であるか、または約1 mM、2 mM、3 mM、4 mMもしくは5 mM未満である。いくつかの態様において、基礎培地中のL-グルタミンの濃度は、2 mMまたは約2 mMである。

【0499】

いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸、例えばグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)に変換されることができる少なくとも1つの合成アミノ酸、例えばL-アラニル-L-グルタミンなどの、L-グルタミンのジペプチド形態が、基礎培地中に提供される。いくつかの態様において、基礎培地は人工または合成培地である。いくつかの態様において、基礎培地は平衡塩類溶液(例えば、PBS、DPBS、HBSS、EBSS)であるか、それらを含む。いくつかの態様において、基礎培地は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、最小必須培地(MEM)、イーグル基礎培地(BME)、F-10、F-12、RPMI 1640、グラスゴー最小必須培地(GMEM)、アルファ最小必須培地(アルファMEM)、イスコフ改変ダルベッコ培地およびM199から選択される。いくつかの態様において、基礎培地は複合培地(例えば、RPMI-1640、IMDM)である。いくつかの態様において、基礎培地は、OpTmizer(商標) CTS(商標) T細胞拡大増殖基礎培地(ThermoFisher)である。

【0500】

いくつかの態様において、基礎培地は、無機塩、糖、アミノ酸の栄養混合物を含み、ビタミン、有機酸、抗酸化剤、および/または緩衝液を任意で含有してもよい。

【0501】

いくつかの態様において、基礎培地は、 CO_3^{2-} および HCO_3^- を含む。いくつかの態様において、基礎培地の $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ 含量は、気体 CO_2 (例えば、5~10%)で平衡化され、それによって培地中の最適pHを維持する。いくつかの態様において、基礎培地は、両性イオン、例えばHEPESを含む。いくつかの態様において、基礎培地はフェノールレッドを含む。いくつかの態様において、基礎培地はフェノールレッドを含まない。

【0502】

いくつかの態様において、基礎培地は無機塩を含む。いくつかの態様において、無機塩は浸透圧平衡を促進する。いくつかの態様において、無機塩は、ナトリウム、カリウム、およびカルシウムイオンを提供することによって膜電位を調節する。

【0503】

いくつかの態様において、基礎培地は、1つまたは複数の炭水化物を含む。いくつかの態様において、炭水化物はグルコースを含む。いくつかの態様において、炭水化物はガラクトースを含む。いくつかの態様において、炭水化物はマルトースを含む。いくつかの態様において、炭水化物はフルクトースを含む。

【0504】

いくつかの態様において、基礎培地は脂肪酸を含む。いくつかの態様において、基礎培地は脂質を含む。いくつかの態様において、基礎培地はビタミン(例えば、ビタミンA、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンC、ビタミンE)を含む。いくつかの態様において、基礎培地は微量元素を含む。いくつかの態様において、微量元素は銅を含む。いくつかの態様において、微量元素は亜鉛を含む。いくつかの態様において、微量元素はセレンを含む。いくつかの態様において、微量元素はトリカルボン酸中間体を含む。

【0505】

いくつかの態様において、基礎培地は、無機塩、糖、アミノ酸、および任意で、ビタミン、有機酸および/もしくは緩衝液または他の周知の細胞培養栄養素の混合物を含有する。栄養素に加えて、培地はpHと浸透圧を維持するのに役立つ。いくつかの局面において、基礎培地の試薬は、細胞の成長、増殖および/または拡大増殖を支持する。多種多様な基礎培地が入手可能であり、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ロズウェルパーク記念研究所培地(RPMI)、イスコフ改変ダルベッコ培地およびハム培地を含む。いくつかの態様において、基礎培地は、イスコフ改変ダルベッコ培地、RPMI-1640、または α -MEMであ

10

20

30

40

50

る。

【0506】

いくつかの態様において、基礎培地はタンパク質を含まない。いくつかの態様において、基礎培地は、ヒトタンパク質(例えば、ヒト血清タンパク質)を含まない。いくつかの態様において、基礎培地は無血清である。いくつかの態様において、基礎培地は、ヒト由来の血清を含まない。いくつかの態様において、基礎培地は組み換えタンパク質を含まない。いくつかの態様において、基礎培地は、ヒトタンパク質および組み換えタンパク質を含まない。

【0507】

いくつかの態様において、基礎培地はタンパク質またはペプチドを含む。いくつかの態様において、タンパク質はアルブミンまたはアルブミン代替物である。いくつかの態様において、アルブミンはヒト由来アルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは組み換えアルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは天然のヒト血清アルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは組み換えヒト血清アルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは非ヒト供給源からの組み換えアルブミンである。アルブミン代替物は、任意のタンパク質またはポリペプチド源であり得る。そのようなタンパク質またはポリペプチドサンプルの例としては、ウシ下垂体抽出物、植物加水分解物(例えば、米加水分解物)、ウシ胎児アルブミン(フェチュイン)、卵アルブミン、ヒト血清アルブミン(HSA)、または別の動物由来アルブミン、ニワトリ抽出物、ウシ胚抽出物、AlbuMAX(登録商標)I、およびAlbuMAX(登録商標)IIが挙げられるが、それに限定されるわけではない。いくつかの態様において、タンパク質またはペプチドはトランスフェリンを含む。いくつかの態様において、タンパク質またはペプチドはフィブロネクチンを含む。いくつかの態様において、タンパク質またはペプチドはアプロチニンを含む。いくつかの態様において、タンパク質はフェチュインを含む。

【0508】

いくつかの態様において、基礎培地(例えば、OpTmizer(商標)CTS(商標)T細胞拡大増殖基礎培地)は液体配合物である。いくつかの態様において、基礎培地は、意図された使用前に、凍結されていないか、または(例えば、そのプロトコルに従って)凍結されないように指示される。いくつかの態様において、基礎培地は、2℃～8℃または約2℃～8℃で貯蔵される。いくつかの態様において、基礎培地は室温で貯蔵される。いくつかの態様において、基礎培地は、2℃～8℃で貯蔵された場合、少なくとも1、2、3、4、5もしくは6週間または約1、2、3、4、5もしくは6週間安定である。いくつかの態様において、基礎培地は、2℃～8℃で貯蔵された場合、少なくとも1、2、3、4、5もしくは6ヶ月間、または少なくとも約1、2、3、4、5もしくは6ヶ月間安定である。

【0509】

B. 付加的な構成成分およびサプリメント

いくつかの態様において、無血清培地は、基礎培地と、1つまたは複数のサプリメントによって提供することができる1つまたは複数の付加的な構成成分とを含む。いくつかの態様において、1つまたは複数のサプリメントは、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)を含む少なくとも第1のサプリメントを含む。いくつかの態様において、そのようなサプリメントは、使用および/または基礎培地への組み入れの前に凍結される。いくつかの態様において、本明細書において記述されるものなどのサプリメントは、培地サプリメント(例えば、基礎培地のための培地サプリメント)として用いられることが意図されている。いくつかの態様において、第1のサプリメントおよび/またはさらなるサプリメントは、細胞の維持を提供する。いくつかの態様において、細胞は初代細胞である。いくつかの態様において、細胞は免疫細胞である。いくつかの態様において、細胞はT細胞である。いくつかの態様において、細胞はCD3 T細胞、CD4 T細胞またはCD8 T細胞である。いくつかの態様において、細胞はヒト由来の細胞である。いくつかの態様において、細胞はヒト由来の免疫細胞である。いくつかの態様において、細胞はヒト由来のT細胞である。いくつかの態様において、細胞はヒト由来の初代免疫細胞である。いくつかの態様におい

10

20

30

40

50

て、細胞は遺伝子操作された細胞である。いくつかの態様において、細胞はヒトに由来する遺伝子操作された細胞である。いくつかの態様において、細胞は、ヒト由来の遺伝子操作されたT細胞(例えば、キメラ抗原受容体(CAR)発現T細胞)である。

【0510】

いくつかの態様において、第1のサプリメントは、その意図された使用の前に、 -20°C ～ 0°C または約 -20°C ～約 0°C で貯蔵されるか、または貯蔵されることが推奨される。いくつかの態様において、サプリメントは、約 0°C 未満で貯蔵されるか、または貯蔵されることが推奨される。いくつかの態様において、サプリメントは、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)がその構成成分になった直後にまたはすぐ後に、サプリメントがその意図された用途に用いられる時まで凍結される。いくつかの態様において、サプリメントは、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)がその構成成分になった後に大部分の時間、サプリメントがその意図された用途に用いられる時まで凍結される。いくつかの態様において、サプリメントは、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)がその構成成分になった後に1、2、3、4、5、6、または7日超の間、サプリメントがその意図された用途に用いられる時まで液体として保持されない。いくつかの態様において、サプリメントは、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)がその構成成分になった後に4、8、12、16、20もしくは24時間超または約4、8、12、16、20もしくは24時間超の間、サプリメントがその意図された用途に用いられる時まで液体として保持されない。いくつかの態様において、サプリメントは、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)がその構成成分になる前と後の両方の大部分の時間、サプリメントがその意図された用途に用いられる時まで凍結される。いくつかの態様において、サプリメントは、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)がサプリメントの構成成分になる時に室温であるか、または室温未満である(例えば、サプリメントの温度は 20°C 、 15°C 、 10°C 、 5°C もしくは 0°C よりも下または約 20°C 、 15°C 、 10°C 、 5°C もしくは 0°C よりも下である)。一局面において、L-グルタミンの不安定性のせいで起こる可能性がある、無血清培地配合物中の変わりやすいグルタミン濃度および/または増加し続けるアンモニア濃度を最小限にするために、凍結したサプリメント中のL-グルタミンの存在は、基礎培地の添加前にその安定性を確実にした。

【0511】

いくつかの態様において、サプリメントが解凍された場合、サプリメント中の遊離形態L-グルタミンは沈殿しない。いくつかの態様において、サプリメントが液体である場合、サプリメント中の遊離形態L-グルタミンは沈殿しない。いくつかの態様において、サプリメントが室温下で解凍される場合、サプリメント中の遊離形態L-グルタミンは沈殿しない。いくつかの態様において、サプリメント中のL-グルタミンの遊離形態の濃度は、 400 mM 、 300 mM 、 200 mM 、 180 mM 、 160 mM 、 140 mM 、 120 mM 、 100 mM もしくは 80 mM であるか、または約 400 mM 、 300 mM 、 200 mM 、 180 mM 、 160 mM 、 140 mM 、 120 mM 、 100 mM もしくは 80 mM であるか、または 400 mM 、 300 mM 、 200 mM 、 180 mM 、 160 mM 、 140 mM 、 120 mM 、 100 mM もしくは 80 mM 未満であるか、または約 400 mM 、 300 mM 、 200 mM 、 180 mM 、 160 mM 、 140 mM 、 120 mM 、 100 mM もしくは 80 mM 未満である。いくつかの態様において、サプリメント中のL-グルタミンの濃度は約 200 mM である。

【0512】

いくつかの態様において、サプリメント中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、サプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度が 0.5 mM ～ 5 mM または約 0.5 mM ～ 5 mM であるようなものである。いくつかの態様において、基礎培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、 2 mM または約 2 mM である。いくつかの態様において、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、 0.5 mM ～ 1 mM 、 0.5 mM ～ 1.5 mM 、 0.5 mM ～ 2 mM 、 0.5 mM ～ 2.5 mM 、 0.5 mM ～ 3 mM 、 0.5 mM ～ 3.5 mM 、 0.5 mM ～ 4 mM 、 0.5 mM ～ 4.5 mM 、 $0.$

5 mM～5 mM、1 mM～1.5 mM、1 mM～2 mM、1 mM～2.5 mM、1 mM～3 mM、1 mM～3.5 mM、1 mM～4 mM、1 mM～4.5 mM、1 mM～5 mM、1.5 mM～2 mM、1.5 mM～2.5 mM、1.5 mM～3 mM、1.5 mM～3.5 mM、1.5 mM～4 mM、1.5 mM～4.5 mM、1.5 mM～5 mM、2 mM～2.5 mM、2 mM～3 mM、2 mM～3.5 mM、2 mM～4 mM、2 mM～4.5 mM、2 mM～5 mM、2.5 mM～3 mM、2.5 mM～3.5 mM、2.5 mM～4 mM、2.5 mM～4.5 mM、2.5 mM～5 mM、3 mM～3.5 mM、3 mM～4 mM、3 mM～4.5 mM、3 mM～5 mM、3.5 mM～4 mM、3.5 mM～4.5 mM、3.5 mM～5 mM、4 mM～4.5 mM、4 mM～5 mMもしくは4.5 mM～5 mM、または約0.5 mM～1 mM、約0.5 mM～1.5 mM、約0.5 mM～2 mM、約0.5 mM～2.5 mM、約0.5 mM～3 mM、約0.5 mM～3.5 mM、約0.5 mM～4 mM、約0.5 mM～4.5 mM、約0.5 mM～5 mM、約1 mM～1.5 mM、約1 mM～2 mM、約1 mM～2.5 mM、約1 mM～3 mM、約1 mM～3.5 mM、約1 mM～4 mM、約1 mM～4.5 mM、約1 mM～5 mM、約1.5 mM～2 mM、約1.5 mM～2.5 mM、約1.5 mM～3 mM、約1.5 mM～3.5 mM、約1.5 mM～4 mM、約1.5 mM～4.5 mM、約1.5 mM～5 mM、約2 mM～2.5 mM、約2 mM～3 mM、約2 mM～3.5 mM、約2 mM～4 mM、約2 mM～4.5 mM、約2 mM～5 mM、約2.5 mM～3 mM、約2.5 mM～3.5 mM、約2.5 mM～4 mM、約2.5 mM～4.5 mM、約2.5 mM～5 mM、約3 mM～3.5 mM、約3 mM～4 mM、約3 mM～4.5 mM、約3 mM～5 mM、約3.5 mM～4 mM、約3.5 mM～4.5 mM、約3.5 mM～5 mM、約4 mM～4.5 mM、約4 mM～5 mMもしくは約4.5 mM～5 mM（それぞれ両端の値を含む）である。いくつかの態様において、基礎培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、5 mM～7.5 mM、5 mM～10 mM、5 mM～12.5 mM、5 mM～15 mM、5 mM～17.5 mM、5 mM～20 mM、7.5 mM～10 mM、7.5 mM～12.5 mM、7.5 mM～15 mM、7.5 mM～17.5 mM、7.5 mM～20 mM、10 mM～12.5 mM、10 mM～15 mM、10 mM～17.5 mM、10 mM～20 mM、12.5 mM～15 mM、12.5 mM～17.5 mM、12.5 mM～20 mM、15 mM～17.5 mM、15 mM～20 mMもしくは17.5 mM～20 mM、または約5 mM～7.5 mM、約5 mM～10 mM、約5 mM～12.5 mM、約5 mM～15 mM、約5 mM～17.5 mM、約5 mM～20 mM、約7.5 mM～10 mM、約7.5 mM～12.5 mM、約7.5 mM～15 mM、約7.5 mM～17.5 mM、約7.5 mM～20 mM、約10 mM～12.5 mM、約10 mM～15 mM、約10 mM～17.5 mM、約10 mM～20 mM、約12.5 mM～15 mM、約12.5 mM～17.5 mM、約12.5 mM～20 mM、約15 mM～17.5 mM、約15 mM～20 mMもしくは約17.5 mM～20 mM（それぞれ両端の値を含む）である。いくつかの態様において、基礎培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、少なくとも0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、2.5 mM、3 mM、3.5 mM、4 mM、4.5 mMもしくは5 mM、または少なくとも約0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、2.5 mM、3 mM、3.5 mM、4 mM、4.5 mMもしくは5 mMである。いくつかの態様において、基礎培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、多くても2 mMまたは約2 mMである。

【0513】

いくつかの態様において、第1のサプリメントは、1つまたは複数のさらなる構成成分を含有する。いくつかの態様において、第2のサプリメントのような、さらなるサプリメントが、1つまたは複数のさらなる構成成分を提供するために提供される。いくつかの態様において、サプリメント、すなわち第1のサプリメントおよび任意で1つまたは複数のさらなるサプリメント、例えば第2のサプリメントは、基礎培地と組み合わせられて、基礎培地に1つまたは複数のさらなる構成成分を提供する。

【0514】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、少なくとも1つのタンパク質を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は非哺乳動物起源のものではない。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は、ヒトのものであるか、またはヒトに由来する。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は組換えである。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は、アルブミ

10

20

30

40

50

ン、トランスフェリン、インスリン、フィブロネクチン、アプロチニンまたはフェチュインを含む。いくつかの態様において、タンパク質は、アルブミン、インスリンまたはトランスフェリンの1つまたは複数、任意でヒトまたは組換えアルブミン、インスリンまたはトランスフェリンの1つまたは複数を含む。

【0515】

いくつかの態様において、タンパク質はアルブミンまたはアルブミン代替物である。いくつかの態様において、アルブミンはヒト由来アルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは組換えアルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは天然のヒト血清アルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは組換えヒト血清アルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは非ヒト供給源からの組換えアルブミンである。アルブミン代替物は、任意のタンパク質またはポリペプチド源であり得る。そのようなタンパク質またはポリペプチド試料の例としては、ウシ下垂体抽出物、植物加水分解物(例えば、米加水分解物)、ウシ胎児アルブミン(フェチュイン)、卵アルブミン、ヒト血清アルブミン(HSA)、または別の動物由来アルブミン、ニワトリ抽出物、ウシ胚抽出物、AlbuMAX(登録商標) I、およびAlbuMAX(登録商標) IIが挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0516】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、アルブミンを含む。いくつかの態様において、アルブミンはヒトアルブミンであるか、またはヒトアルブミンに由来する。いくつかの態様において、アルブミンはヒト血清またはヒト血漿に由来する。いくつかの態様において、アルブミンは組換えアルブミンである。いくつかの態様において、組換えアルブミンはヒトに由来する。いくつかの態様において、組換えアルブミンはヒトに由来しない。いくつかの態様において、サプリメントは天然アルブミンを含む。いくつかの態様において、天然アルブミンはヒトに由来する。いくつかの態様において、天然アルブミンはヒトに由来しない。いくつかの態様において、サプリメント中のアルブミンの濃度は、サプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、培地中のアルブミンの濃度またはおおよその濃度が、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、2 mg/mLもしくは約2 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、4 mg/mLもしくは約4 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、6 mg/mLもしくは約6 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、8 mg/mLもしくは約8 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、4 mg/mLもしくは約4 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、6 mg/mLもしくは約6 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、8 mg/mLもしくは約8 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、4 mg/mLもしくは約4 mg/mLから、6 mg/mLもしくは約6 mg/mL、4 mg/mLもしくは約4 mg/mLから、8 mg/mLもしくは約8 mg/mL、4 mg/mLもしくは約4 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、4 mg/mLもしくは約4 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、6 mg/mLもしくは約6 mg/mLから、8 mg/mLもしくは約8 mg/mL、6 mg/mLもしくは約6 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、6 mg/mLもしくは約6 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、8 mg/mLもしくは約8 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、8 mg/mLもしくは約8 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、10 mg/mLもしくは約10 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、または10 mg/mLもしくは約10 mg/mLから、15 mg/mLもしくは約15 mg/mL(それぞれ両端の値を含む)であるようなものである。いくつかの態様において、培地中のアルブミンは、5 mg/mLまたは約5 mg/mLである。

【0517】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、トランスフェリンまたはトランスフェリン代替物を含む。いくつかの態様において、トランスフェリン代替物

10

20

30

40

50

は、サプリメント中のトランスフェリンを置き換えて、トランスフェリンと実質的に同様の結果を与え得る化合物である。トランスフェリン代替物の例としては、任意の鉄キレート化合物が挙げられるが、これに限定されることはない。用いられ得る鉄キレート化合物は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレングリコール-ビス(β -アミノエチルエーテル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、メシル酸デフェロキサミン、ジメルカプトプロパノール、ジエチレントリアミン五酢酸(DPTA)、およびトランス-1,2-ジアミノシクロヘキサン-N,N,N',N'-四酢酸(CDTA)の鉄キレート、ならびにクエン酸第二鉄キレートおよび硫酸第一鉄キレートを含むが、これらに限定されることはない。いくつかの態様において、トランスフェリンは鉄飽和トランスフェリンである。いくつかの態様において、トランスフェリンは鉄飽和ヒトトランスフェリンである。

【0518】

いくつかの態様において、トランスフェリンまたはトランスフェリン代替物は、ヒトトランスフェリンであるか、またはヒトトランスフェリンに由来する。いくつかの態様において、トランスフェリンまたはトランスフェリン代替物は、ヒト血清または血漿に由来する。いくつかの態様において、トランスフェリンまたはトランスフェリン代替物は、組換えトランスフェリンである。いくつかの態様において、トランスフェリンの濃度は、サプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、培地中のトランスフェリンの濃度が10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、50 mg/Lもしくは約50 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、100 mg/Lもしくは約100 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、150 mg/Lもしくは約150 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、200 mg/Lもしくは約200 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、250 mg/Lもしくは約250 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、300 mg/Lもしくは約300 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、350 mg/Lもしくは約350 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、400 mg/Lもしくは約400 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、450 mg/Lもしくは約450 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、500 mg/Lもしくは約500 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、550 mg/Lもしくは約550 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、600 mg/Lもしくは約600 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、650 mg/Lもしくは約650 mg/L、または10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、750 mg/Lもしくは約750 mg/Lである。いくつかの態様において、トランスフェリンの濃度は、サプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、培地中のトランスフェリンの濃度が100 mg/Lまたは約100 mg/Lであるようなものである。いくつかの態様において、トランスフェリンの濃度は、サプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、培地中のトランスフェリンの濃度が50 mg/Lもしくは約50 mg/Lから、150 mg/Lもしくは約150 mg/Lであるようなものである。

【0519】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、インスリンまたはインスリン代替物を含む。いくつかの態様において、インスリン代替物は、インスリンの代わりに用いられて、インスリンと実質的に同様の結果をもたらす得る亜鉛含有化合物である。インスリン代替物の例としては、塩化亜鉛、硝酸亜鉛、臭化亜鉛、および硫酸亜鉛が挙げられるが、これらに限定されることはない。いくつかのインスリンが当業者に知られている。Gilman, A.G. et al, Eds., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, 1990, pp. 1463-1495を参照されたい。いくつかの態様において、インスリン代替物ではなく、インスリンがサプリメントおよび培地において用いられる。いくつかの態様において、インスリンは亜鉛インスリンである。いくつかの態様において、インスリンはヒト亜鉛インスリンである。

【0520】

いくつかの態様において、インスリンはヒトインスリンであるか、またはヒトインスリンに由来する。いくつかの態様において、インスリンは組換えインスリンである。いくつかの態様において、インスリンは組換えヒトインスリンである。いくつかの態様において

10

20

30

40

50

、インスリン(またはインスリン代替物)の濃度は、サプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、培地中のインスリン(またはインスリン代替物)のおおよその濃度が約1 mg/Lから、2.5 mg/Lもしくは約2.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、5 mg/Lもしくは約5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、7.5 mg/Lもしくは約7.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、10 mg/Lもしくは約10 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、12.5 mg/Lもしくは約12.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、15 mg/Lもしくは約15 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、17.5 mg/Lもしくは約17.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、20 mg/Lもしくは約20 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、22.5 mg/Lもしくは約22.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、25 mg/Lもしくは約25 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、27.5 mg/Lもしくは約27.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、30 mg/Lもしくは約30 mg/Lである。いくつかの態様において、培地中のインスリンまたはインスリン代替物の濃度は、10 mg/Lまたは約10 mg/Lである。いくつかの態様において、培地中のインスリンまたはインスリン代替物の濃度は、7.5 mg/Lもしくは約7.5 mg/Lから、12.5 mg/Lもしくは約12.5 mg/Lである。

【0521】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は成長因子を含む。いくつかの態様において、成長因子は上皮成長因子(EGF)を含む。いくつかの態様において、成長因子は線維芽細胞成長因子(FGF)を含む。いくつかの態様において、成長因子はインスリン様成長因子(IGF)を含む。いくつかの態様において、成長因子は神経成長因子(NGF)を含む。いくつかの態様において、成長因子は血小板由来成長因子(PDGF)を含む。いくつかの態様において、成長因子は形質転換成長因子(TGF)を含む。

【0522】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、ホルモン(例えば、成長ホルモン、インスリン、ヒドロコルチゾン、トリヨードチロニン、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、プロラクチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン放出ペプチド)を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、アルファグロブリンまたはベータグロブリンを含む。いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、ペプチドまたはペプチド画分(例えば、動物、微生物または植物に由来するタンパク質加水分解物)を含む。

【0523】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は脂質を含む。いくつかの態様において、脂質はコレステロールを含む。いくつかの態様において、脂質はステロイドを含む。いくつかの態様において、脂質は脂肪酸(例えば、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸)を含む。いくつかの態様において、脂質はエタノールアミンを含む。いくつかの態様において、脂質はコリンを含む。いくつかの態様において、脂質はイノシトールを含む。

【0524】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は遷移金属を含む。いくつかの態様において、遷移金属は鉄を含む。いくつかの態様において、遷移金属は亜鉛を含む。いくつかの態様において、遷移金属は銅を含む。いくつかの態様において、遷移金属はクロムを含む。いくつかの態様において、遷移金属はヨウ素を含む。いくつかの態様において、遷移金属はコバルトを含む。いくつかの態様において、遷移金属はセレンを含む。いくつかの態様において、遷移金属はマグネシウムを含む。いくつかの態様において、遷移金属は、モリブデンを含む。

【0525】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分はビタミンを含む。いくつかの態様において、ビタミンは脂溶性ビタミン(例えば、ビタミンA、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK)を含む。いくつかの態様において、ビタミンは水溶性ビタミン(例えば、B1、B2、B6、B₁₂、C、葉酸)を含む。

10

20

30

40

50

【0526】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分はポリアミンを含む。いくつかの態様において、ポリアミンはプトレシンを含む。いくつかの態様において、ポリアミンはスペルミジンを含む。いくつかの態様において、ポリアミンはスペルミンを含む。

【0527】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は還元剤を含む。いくつかの態様において、還元剤は2-メルカプトエタノールを含む。いくつかの態様において、還元剤はアルファ-チオグリセロールを含む。いくつかの態様において、還元剤は還元グルタチオンを含む。

【0528】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は保護添加剤を含む。いくつかの態様において、保護添加剤はカルボキシメチルセルロースを含む。いくつかの態様において、保護添加剤はポリビニルピロリドンを含む。いくつかの態様において、保護添加剤はプルロニックF-68を含む。いくつかの態様において、保護添加剤はTween 80を含む。

【0529】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、接着因子を含む。いくつかの態様において、接着因子はフィブロネクチンを含む。いくつかの態様において、接着因子はラミニンを含む。

【0530】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数の脂質剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の微量元素、および1つまたは複数のグルココルチコイドの1つまたは複数である。いくつかの態様において、抗酸化剤は、N-アセチル-L-システイン、2-メルカプトエタノールもしくはD,L-酢酸トコフェロール、またはそれらの誘導体もしくは混合物を含む。いくつかの態様において、アルブミンはヒト血清アルブミンである。いくつかの態様において、脂質剤は、Human Ex-Cite(登録商標)もしくはエタノールアミンまたはそれらの誘導体および混合物を含む。いくつかの態様において、インスリンはヒト亜鉛インスリンである。いくつかの態様において、トランスフェリンはヒト鉄飽和トランスフェリンである。いくつかの態様において、微量元素はSe⁴⁺である。いくつかの態様において、グルココルチコイドはヒドロコルチゾンである。いくつかの態様において、サプリメントは濃縮される。

【0531】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、1つまたは複数の抗酸化剤、ならびに1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数の脂質剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の微量元素、および1つまたは複数のグルココルチコイドからなる群より選択される1つまたは複数の成分を含む。

【0532】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、N-アセチル-L-システイン、ヒト血清アルブミン、Human Ex-Cyte(登録商標)、エタノールアミン、ヒト亜鉛インスリン、ヒト鉄飽和トランスフェリン、Se⁴⁺、ヒドロコルチゾン、D,L-酢酸トコフェロール、および/または2-メルカプトエタノールの1つまたは複数を含む。

【0533】

いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、N-アセチル-L-システイン(NAC)を含む。いくつかの態様において、NACの濃度は、サプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、基礎培地中のNACの濃度が10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、50 mg/Lもしくは約50 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、100 mg/Lもしくは約100 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、

10

20

30

40

50

150 mg/Lもしくは約150 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、200 mg/Lもしくは約200 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、250 mg/Lもしくは約250 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、300 mg/Lもしくは約300 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、350 mg/Lもしくは約350 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、400 mg/Lもしくは約400 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、450 mg/Lもしくは約450 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、500 mg/Lもしくは約500 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、550 mg/Lもしくは約550 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、600 mg/Lもしくは約600 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、650 mg/Lもしくは約650 mg/L、10 mg/Lもしくは約10 mg/Lから、700 mg/Lもしくは約700 mg/Lである。

10

【0534】

いくつかの態様において、基礎培地中のNACの濃度は、0mMまたは約0mMから、1mMまたは約1mM、0mMまたは約0mMから、2mMまたは約2mM、0mMまたは約0mMから、3mMまたは約3mM、0mMまたは約0mMから、4mMまたは約4mM、0mMまたは約0mMから、5mMまたは約5mM、0mMまたは約0mMから、6mMまたは約6mM、0mMまたは約0mMから、7mMまたは約7mM、0mMまたは約0mMから、8mMまたは約8mM、0mMまたは約0mMから、9mMまたは約9mM、0mMまたは約0mMから、10mMまたは約10mM、0mMまたは約0mMから、12mMまたは約12mM、0mMまたは約0mMから、14mMまたは約14mM、0mMまたは約0mMから、16mMまたは約16mM、0mMまたは約0mMから、18mMまたは約18mM、0mMまたは約0mMから、20mMまたは約20mMである。

20

【0535】

いくつかの態様において、1つまたは複数の付加的な構成成分は、エタノールアミンを含む。いくつかの態様において、エタノールアミンの濃度は、サプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、基礎培地中のエタノールアミンの濃度が0mg/Lまたは約0mg/Lから、2mg/Lまたは約2mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、4mg/Lまたは約4mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、6mg/Lまたは約6mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、8mg/Lまたは約8mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、10mg/Lまたは約10mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、12mg/Lまたは約12mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、14mg/Lまたは約14mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、16mg/Lまたは約16mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、18mg/Lまたは約18mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、20mg/Lまたは約20mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、22mg/Lまたは約22mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、24mg/Lまたは約24mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、26mg/Lまたは約26mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、28mg/Lまたは約28mg/L、0mg/Lまたは約0mg/Lから、30mg/Lまたは約30mg/Lであるようなものである。

30

【0536】

いくつかの態様において、1つまたは複数の付加的な構成成分は、1つまたは複数のサプリメント、例えば第1のサプリメントおよび1つまたは複数のさらなるまたは付加的なサプリメントを基礎培地に添加することによって提供されることができる。

40

【0537】

いくつかの態様において、第1のサプリメントは、L-グルタミンを、1つまたは複数の所望の構成成分を含有する既存のサプリメントに添加するか、またはそれと混合することによって調製される。いくつかの態様において、L-グルタミンは血清代替サプリメント、例えば、免疫細胞血清代替物、例えば、ThermoFisher、#A2598101またはCTS(商標)免疫細胞血清代替物に添加されるか、またはそれと混合される。いくつかの態様において、L-グルタミンは、Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31に記述されている免疫細胞血清代替物を含むサプリメントに添加されるか、またはそれと混合される。

【0538】

50

いくつかの態様において、無血清培地配合物は、90%～98.75%(v/v)または約90%～約98.75%(v/v)の基礎培地および1.25%～10%(v/v)または約1.25%～約10%(v/v)の第1のサプリメントを含む。いくつかの態様において、無血清培地配合物は、90%～97.5%(v/v)または約90%～約97.5%(v/v)の基礎培地および1.25%～5%(v/v)または約1.25%～約5%(v/v)の第1のサプリメントを含む。いくつかの態様において、無血清培地配合物は、95%(v/v)または約95%(v/v)の基礎培地および2.5%±0.2%(v/v)または約2.5%±0.2%(v/v)、例えば2.5%(v/v)または約2.5%(v/v)の第1のサプリメントを含む。いくつかの態様において、1リットルの基礎培地に、25ミリリットルまたは約25ミリリットルの第1のサプリメントが補充される。

【0539】

いくつかの態様において、1つまたは複数の付加的な構成成分を提供するために、さらなるサプリメント、例えば第2のサプリメントが基礎培地と組み合わせられる。いくつかの態様において、第2のサプリメントは、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数の脂質剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つまたは複数の微量元素、および1つまたは複数のグルコシルコイドを含む、上記のいずれかのような1つまたは複数の付加的な構成成分を含む。第2のサプリメントの例示的な構成成分は、上に記述されている。いくつかの態様において、第2のサプリメントは、アルブミン、N-アセチルシステイン(NAC)およびエタノールアミンを含む。いくつかの態様において、第2のサプリメントは、アルブミン、N-アセチルシステイン(NAC)およびエタノールアミンを含み、ここでアルブミン、NACおよび/またはエタノールアミンの濃度は、第2のサプリメントが基礎培地(本明細書において記述されるものなど)と組み合わせられた後に、アルブミン、NACおよび/またはエタノールアミンの濃度が、本明細書において記述されるものと実質的に同じであるようなものである。いくつかの態様において、アルブミンはヒト由来のアルブミンである。いくつかの態様において、アルブミンは、ヒト血漿または血清からのヒト由来アルブミンである。いくつかの態様において、第2のサプリメントは液体であり、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)を含まないか、またはその有意な量を含まない。いくつかの態様において、第2のサプリメントは、OpTmizer(登録商標)サプリメント(Thermofisher、A1048503の一部)を含む。

【0540】

いくつかの態様において、第2のサプリメントは液体である。いくつかの態様において、第2のサプリメントは貯蔵のために凍結されないか、または凍結されることが推奨されない。いくつかの態様において、無血清培地配合物は、約1.25%～約5%(v/v)、例えば2.5%±0.2%または約2.5%±0.2%、例えば2.5%もしくは2.6%または約2.5%もしくは約2.6%の第2のサプリメントを含む。いくつかの態様において、1リットルの基礎培地に、約26ミリリットルの第2のサプリメントが補充される。いくつかの態様において、無血清培地配合物は、90%～97.5%(v/v)または約90%～約97.5%(v/v)の基礎培地および1.25%～5%(v/v)または約1.25%～約5%(v/v)の第2のサプリメントを含む。いくつかの態様において、無血清培地配合物は、95%または約95%(v/v)の基礎培地および2.5%±0.2%(v/v)または約2.5%±0.2%(v/v)、例えば2.5%(v/v)もしくは2.6%(v/v)または約2.5%(v/v)もしくは約2.6%(v/v)の第2のサプリメントを含む。いくつかの態様において、1リットルの基礎培地に、25ミリリットルもしくは26ミリリットルまたは約25ミリリットルもしくは26ミリリットルの第2のサプリメントが補充される。

【0541】

いくつかの態様において、第1のサプリメント(例えば血清代替サプリメント、例えばCTS(商標)免疫細胞血清代替物)とさらなるサプリメント(例えばOpTmizer(登録商標)細胞サプリメント)との両方が基礎培地に添加される。いくつかの態様において、無血清培地配合物は、約90%～97.5%(v/v)の基礎培地、約1.25%～5%(v/v)の第1のサプリメント、および約1.25%～5%(v/v)の第2のサプリメントを含む。いくつかの態様において、無血清培地配合物は、約95%(v/v)の基礎培地、約2.5%±0.2%(v/v)の第1のサプリメント、お

10

20

30

40

50

よび約2.5%±0.2%(v/v)の第2のサプリメントを含む。

【0542】

いくつかの態様において、1つまたは複数のサプリメントは、2または約2倍から、100倍または約100倍濃縮される。いくつかの態様において、サプリメントは、40倍または約40倍の配合物である。いくつかの態様において、1リットルの基礎培地に、第1のサプリメントと場合によっては1つまたは複数のさらなるサプリメントとを含む少なくとも1つのサプリメントが、20〜30ミリリットルまたは約20〜30ミリリットル、例えば25±2ミリリットル、補充される。

【0543】

C. 無血清培地

いくつかの態様において、無血清培地は、基礎培地および合成アミノ酸(例えば、L-グルタミンのジペプチド形態、例えば、L-アラニル-L-グルタミン)、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、基礎培地および合成アミノ酸(例えば、L-グルタミンのジペプチド形態、例えば、L-アラニル-L-グルタミン)、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、例えば操作されたT細胞を作製するための証明されたプロセスの間のT細胞の維持を支援するために、少なくとも1つのタンパク質または付加的な構成成分をさらに含む。

【0544】

いくつかの態様において、無血清培地は、細胞を含む細胞培養物中でグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)に変換することができる合成アミノ酸(例えば、L-グルタミンのジペプチド形態、例えば、L-アラニル-L-グルタミン)を含有する形態であり、ここで培地は無血清である。いくつかの態様において、合成アミノ酸は水溶液(例えば、無血清培地)に可溶性である。いくつかの態様において、水溶液中の合成アミノ酸の溶解度は、グルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)よりも高い。いくつかの態様において、無血清培地中のL-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、0.5mM〜5mMまたは約0.5mM〜約5mMである。いくつかの態様において、無血清培地中のL-グルタミンのジペプチド形態の(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、2mMまたは約2mMである。いくつかの態様において、L-グルタミンのジペプチド形態の(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、0.5mM〜1mM、0.5mM〜1.5mM、0.5mM〜2mM、0.5mM〜2.5mM、0.5mM〜3mM、0.5mM〜3.5mM、0.5mM〜4mM、0.5mM〜4.5mM、もしくは0.5mM〜5mM、または約0.5mM〜1mM、約0.5mM〜1.5mM、約0.5mM〜2mM、約0.5mM〜2.5mM、約0.5mM〜3mM、約0.5mM〜3.5mM、約0.5mM〜4mM、約0.5mM〜4.5mM、もしくは約0.5mM〜5mM(それぞれ両端の値を含む)である。いくつかの態様において、無血清培地中のL-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)の濃度は、少なくとも0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、もしくは5mM、または少なくとも約0.5mM、約1mM、約1.5mM、約2mM、約2.5mM、約3mM、約3.5mM、約4mM、約4.5mM、もしくは約5mMである。いくつかの態様において、無血清培地中のL-グルタミンのジペプチド形態、例えばL-アラニル-L-グルタミンの濃度は、2mMまたは約2mMであり、無血清培地中のL-グルタミンの遊離形態の濃度は、2mMまたは約2mMである。

【0545】

いくつかの態様において、無血清培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、約0.5mM〜約5mMである。いくつかの態様において、無血清培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、2mMまたは約2mMである。いくつかの態様において、無血清培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、0.5mM〜1mM、0.5mM〜1.5mM、0.5mM〜2mM、0.5mM〜2.5mM、0.5mM〜3mM、0.5mM〜3.5mM、0.5mM〜4mM、0.5mM〜4.5mM、もしくは0.5mM〜5mM、または約0.5mM〜1mM、約0.5mM〜1.5mM、約0.5mM〜2mM、約0.5mM〜2.5mM、約0.5mM〜3mM、約0.5mM〜3.5mM、約0.5mM〜4mM、約0.5mM〜4.5mM

10

20

30

40

50

、もしくは約0.5mM～5mM（それぞれ両端の値を含む）である。いくつかの態様において、培地中のグルタミンの遊離形態(すなわち、L-グルタミン)の濃度は、少なくとも0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、もしくは5mM、または少なくとも約0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、もしくは5mMである。

【0546】

いくつかの態様において、無血清培地は少なくとも1つのタンパク質を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は非哺乳動物起源のものではない。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は、ヒトのものであるか、またはヒトに由来する。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は組換えである。いくつかの態様において、1つまたは複数のさらなる構成成分は、少なくとも1つのタンパク質を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は非哺乳動物起源のものではない。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は、ヒトのものであるか、またはヒトに由来する。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は組換えである。いくつかの態様において、少なくとも1つのタンパク質は、アルブミン、トランスフェリン、インスリン、フィブロンекチン、アプロチニンまたはフェチュインを含む。いくつかの態様において、タンパク質は、アルブミン、インスリンまたはトランスフェリンの1つまたは複数、任意でヒトまたは組換えアルブミン、インスリンまたはトランスフェリンの1つまたは複数を含む。

【0547】

いくつかの態様において、無血清培地はアルブミンを含む。いくつかの態様において、アルブミンはヒトに由来する。いくつかの態様において、アルブミンはヒト血清またはヒト血漿に由来する。いくつかの態様において、アルブミンは組換えアルブミンである。いくつかの態様において、組換えアルブミンはヒトに由来する。いくつかの態様において、組換えアルブミンはヒトに由来しない。いくつかの態様において、サプリメントは天然アルブミンを含む。いくつかの態様において、天然アルブミンはヒトに由来する。いくつかの態様において、天然アルブミンはヒトに由来しない。いくつかの態様において、無血清培地中のアルブミンの濃度は、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、2 mg/mLもしくは約2 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、4 mg/mLもしくは約4 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、6 mg/mLもしくは約6 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、8 mg/mLもしくは約8 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、0 mg/mLもしくは約0 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、4 mg/mLもしくは約4 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、6 mg/mLもしくは約6 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、8 mg/mLもしくは約8 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、2 mg/mLもしくは約2 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、4 mg/mLもしくは約4 mg/mLから、6 mg/mLもしくは約6 mg/mL、4 mg/mLもしくは約4 mg/mLから、8 mg/mLもしくは約8 mg/mL、4 mg/mLもしくは約4 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、4 mg/mLもしくは約4 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、6 mg/mLもしくは約6 mg/mLから、8 mg/mLもしくは約8 mg/mL、6 mg/mLもしくは約6 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、6 mg/mLもしくは約6 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、8 mg/mLもしくは約8 mg/mLから、10 mg/mLもしくは約10 mg/mL、8 mg/mLもしくは約8 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、10 mg/mLもしくは約10 mg/mLから、12 mg/mLもしくは約12 mg/mL、または10 mg/mLもしくは約10 mg/mLから、15 mg/mLもしくは約15 mg/mL（それぞれ両端の値を含む）である。いくつかの態様において、培地中のアルブミンは5 mg/mLまたは約5 mg/mLである。

【0548】

いくつかの態様において、無血清培地は、トランスフェリンまたはトランスフェリン代替物(本明細書において記述されるものなど)を含む。いくつかの態様において、トランス

10

20

30

40

50

フェリンまたはトランスフェリン代替物は、ヒトに由来する。いくつかの態様において、トランスフェリンまたはトランスフェリン代替物は、ヒト血清または血漿に由来する。いくつかの態様において、無血清培地中のトランスフェリンの濃度は、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、50mg/Lもしくは約50mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、100mg/Lもしくは約100mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、150mg/Lもしくは約150mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、200mg/Lもしくは約200mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、250mg/Lもしくは約250mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、300mg/Lもしくは約300mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、350mg/Lもしくは約350mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、400mg/Lもしくは約400mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、450mg/Lもしくは約450mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、500mg/Lもしくは約500mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、550mg/Lもしくは約550mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、600mg/Lもしくは約600mg/L、10mg/Lもしくは約10mg/Lから、650mg/Lもしくは約650mg/L、または10mg/Lもしくは約10mg/Lから、750mg/Lもしくは約750mg/Lである。いくつかの態様において、無血清培地中のトランスフェリンの濃度は、100mg/Lもしくは約100mg/Lである。いくつかの態様において、無血清培地中のトランスフェリンの濃度は、50 mg/Lまたは約50 mg/Lから、150 mg/Lである。

【0549】

いくつかの態様において、サプリメントは、インスリンまたはインスリン代替物(本明細書において記述されるものなど)を含む。いくつかの態様において、インスリンはヒトに由来する。いくつかの態様において、インスリンは組換えインスリンである。いくつかの態様において、インスリンは組換えヒトインスリンである。いくつかの態様において、無血清培地中のインスリン(またはインスリン代替物)の濃度は、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、2.5 mg/Lもしくは約2.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、5 mg/Lもしくは約5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、7.5 mg/Lもしくは約7.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、10 mg/Lもしくは約10 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、12.5 mg/Lもしくは約12.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、15 mg/Lもしくは約15 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、17.5 mg/Lもしくは約17.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、20 mg/Lもしくは約20 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、22.5 mg/Lもしくは約22.5 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、25 mg/Lもしくは約25 mg/L、1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、27.5 mg/Lもしくは約27.5 mg/L、または1 mg/Lもしくは約1 mg/Lから、30 mg/Lもしくは約30 mg/Lである。いくつかの態様において、無血清培地中のインスリンまたはインスリン代替物の濃度は、10 mg/Lまたは約10 mg/Lである。いくつかの態様において、無血清培地中のインスリンまたはインスリン代替物の濃度は、7.5 mg/Lもしくは約7.5 mg/Lから、12.5 mg/Lもしくは約12.5 mg/Lである。

【0550】

いくつかの態様において、無血清培地はフェノールレッドを含まない。いくつかの態様において、無血清培地はフェノールレッドを含む。

【0551】

いくつかの態様において、無血清培地は、無機塩、糖、アミノ酸の栄養混合物を含み、ビタミン、有機酸、抗酸化剤、脂質、成長因子、N-アセチルシステイン、エタノールアミンおよび/または緩衝液を任意で含有してもよい。例としては、無機塩、糖、アミノ酸、ビタミン、有機酸、抗酸化剤、脂質、成長因子、N-アセチルシステイン、エタノールアミンおよび/または緩衝液を含む、上記の項におけるような、本明細書において記述されるものが挙げられる。

【0552】

いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数の抗酸化剤、1つまたは複数のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つまたは複数の脂質剤、1つまたは複数のインスリンまたはインスリン代替物、1つまたは複数のトランスフェリンまたはトランスフェリン

代替物、1つまたは複数の微量元素、1つまたは複数のグルココルチコイド、1つまたは複数の無機塩、1つまたは複数のエネルギー源、1つまたは複数の緩衝剤、1つまたは複数のピルビン酸塩、1つまたは複数のpH指示薬、1つまたは複数のアミノ酸、および1つまたは複数のビタミンの1つまたは複数から選択される1つまたは複数の成分を含む。いくつかの態様において、抗酸化剤は、N-アセチル-L-システイン、2-メルカプトエタノール、およびD,L-酢酸トコフェロール、またはそれらの誘導体もしくは混合物からなる群より選択される。いくつかの態様において、アルブミンはヒト血清アルブミンである。いくつかの態様において、脂質剤は、Human Ex-Cyte(登録商標)およびエタノールアミンである。いくつかの態様において、インスリンはヒト亜鉛インスリンである。いくつかの態様において、トランスフェリンはヒト鉄飽和トランスフェリンである。いくつかの態様において、グルココルチコイドはヒドロコルチゾンである。いくつかの態様において、無機塩成分は、1つまたは複数のカルシウム塩、1つまたは複数のカリウム塩、1つまたは複数のマグネシウム塩、1つまたは複数のナトリウム塩、1つまたは複数の炭酸塩、および1つまたは複数のリン酸塩からなる群より選択される1つまたは複数の無機塩を含む。いくつかの態様において、エネルギー源はD-グルコースである。いくつかの態様において、緩衝剤はHEPESである。いくつかの態様において、ピルビン酸塩はピルビン酸ナトリウムである。いくつかの態様において、pH指示薬はフェノールレッドである。いくつかの態様において、アミノ酸成分は、グリシン、L-アラニン、L-アスパラギン、L-システイン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リシン、L-ロイシン、L-グルタミン、L-アルギニンHCl、L-メチオニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、およびL-バリン、ならびにそれらの塩および誘導体からなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸を含む。いくつかの態様において、ビタミン成分は、ビオチン、D-パントテン酸カルシウム、塩化コリン、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサルHCl、リボフラビン、チアミンHCl、ならびにビタミンB12およびその誘導体からなる群より選択される1つまたは複数のビタミンを含む。いくつかの態様において、成分は、N-アセチル-L-システイン、2-メルカプトエタノール、ヒト血清アルブミン、D,L-酢酸トコフェロール、Human Ex-Cyte(登録商標)、エタノールアミン、ヒト亜鉛インスリン、鉄飽和トランスフェリン、 Se^{4+} 、ヒドロコルチゾン、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 CO_3^{2-} 、 PO_4^{3-} 、D-グルコース、HEPES、ピルビン酸ナトリウム、フェノールレッド、グリシン、L-アラニン、L-アスパラギン、L-システイン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リシン、L-ロイシン、L-グルタミン、L-アルギニンHCl、L-メチオニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、およびL-バリン、ビオチン、D-パントテン酸カルシウム、塩化コリン、葉酸、i-イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキサルHCl、リボフラビン、チアミンHCl、ならびにビタミンB12を含む。

【0553】

いくつかの態様において、基礎培地および少なくとも1つのサプリメントを含む無血清培地が提供される。基礎培地およびサプリメントの様々な例が、上記の項においてなど、本明細書において記述されている。

【0554】

いくつかの態様において、無血清培地配合物は、90%または約90%から、97.5%または約97.5% (v/v)の基礎培地、2.5%または約2.5%から、10%または約10% (v/v)のサプリメント、例えば第1のサプリメントおよび/または第2のサプリメントを含む。いくつかの態様において、無血清培地配合物は、90%または約90%から、97.5%または約97.5% (v/v)の基礎培地、1.25%または約1.25%から、5%または約5% (v/v)の第1のサプリメント、および1.25%または約1.25%から、5%または約5% (v/v)の第2のサプリメントを含む。

【0555】

いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数のサプリメントを補充された

基礎培地、例えばOpTmizer(商標)T細胞拡大増殖基礎培地(ThermoFisher)を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数のサプリメントは無血清である。いくつかの態様において、無血清培地は、OpTmizer(商標)T細胞拡大増殖サプリメント(ThermoFisher)のような、細胞(例えばT細胞)の維持のためのサプリメントを補充された基礎培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、L-グルタミンのようなアミノ酸の遊離形態をさらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数の組み換えヒトIL-2、組み換えヒトIL-7、および/または組み換えヒトIL-15のような組み換えサイトカインを含有しない。特定の態様において、無血清培地は、本明細書において記述されるプロセスの任意の1つまたは複数の工程、例えばI項に記述される1つまたは複数の工程に使用することができる。いくつかの態様において、そのような無血清培地は、細胞のインキュベーションおよび/または収集、回収もしくは配合の間に使用される。

10

【0556】

いくつかの態様において、無血清培地は、T細胞サプリメントおよびL-グルタミンの遊離形態を補充された基礎培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、OpTmizer(商標)T細胞拡大増殖サプリメントおよびL-グルタミンを補充されたOpTmizer(商標)T細胞拡大増殖基礎培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、約2.6%のOpTmizer(商標)T細胞拡大増殖サプリメント、および約1.0%のL-グルタミン(終濃度約2mM)を補充されたOpTmizer(商標)T細胞拡大増殖基礎培地を含む。いくつかの態様において、そのような無血清培地は、1つまたは複数の組み換えヒトIL-2、組み換えヒトIL-7、および/または組み換えヒトIL-15のような組み換えサイトカインを含有しない。特定の態様において、無血清培地は、本明細書において記述されるプロセスの任意の1つまたは複数の工程、例えばI項に記述される1つまたは複数の工程に使用することができる。いくつかの態様において、そのような無血清培地は、細胞のインキュベーションおよび/または収集、回収もしくは配合の間に使用される。

20

【0557】

いくつかの態様において、無血清培地は、細胞(例えば、T細胞)の維持のためのサプリメント、例えばOpTmizer(商標)T細胞拡大増殖サプリメント(ThermoFisher)を補充された基礎培地を含み、血清代替サプリメント、例えば、免疫細胞血清代替物、例えば、ThermoFisher、#A2596101、CTS(商標)免疫細胞血清代替物、またはSmith et al. Clin Transl Immunology, 2015 Jan; 4(1): e31に記載される免疫細胞血清代替物をさらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、L-グルタミンのようなアミノ酸の遊離形態をさらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、L-グルタミンのジペプチド形態(例えば、L-アラニル-L-グルタミン)、例えばGlutamax(商標)(ThermoFisher)中のジペプチドをさらに含む。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数のサイトカインを含む。ある種の態様において、1つまたは複数のサイトカインは、組み換えサイトカインである。ある種の態様において、1つまたは複数のサイトカインは、T細胞によって発現され、かつ/またはT細胞に内因性の受容体に結合する、および/または結合することができる。特定の態様において、1つまたは複数のサイトカインは、4-アルファヘリックス束ファミリーのサイトカインのメンバーである、またはそれを含む。いくつかの態様において、4-アルファヘリックス束ファミリーのサイトカインのメンバーは、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-4(IL-4)、インターロイキン-7(IL-7)、インターロイキン-9(IL-9)、インターロイキン12(IL-12)、インターロイキン15(IL-15)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むが、それ限定されるわけではない。いくつかの態様において、無血清培地は、1つまたは複数の組み換えヒトIL-2、組み換えヒトIL-7、および/または組み換えヒトIL-15をさらに含む。特定の態様において、無血清培地は、本明細書において記述されるプロセスの任意の1つまたは複数の工程、例えばI項に記述される1つまたは複数の工程に使用することができる。特定の態様において、無血清培地は、サンプル調製、選択、刺激および/または操作を含む任意の1つまたは複数の工程に使用することができる。

30

40

【0558】

50

いくつかの態様において、無血清培地は、T細胞サプリメント、免疫細胞血清代替物、L-グルタミンの遊離形態、L-グルタミンのジペプチド形態、組み換えIL-2、組み換えIL-7、および/または組み換えIL-15を補充された基礎培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、OpTmizer(商標)T細胞拡大増殖サプリメント、CTS(商標)免疫細胞血清代替物、L-グルタミン、L-アラニル-L-グルタミン、組み換えヒトIL-2、組み換えヒトIL-7、および組み換えヒトIL-15を補充されたOpTmizer(商標)T細胞拡大増殖基礎培地を含む。いくつかの態様において、無血清培地は、約2.6%のOpTmizer(商標)T細胞拡大増殖サプリメント、約2.5%のCTS(商標)免疫細胞血清代替物、約1.0%のL-グルタミン(終濃度約2mM)、約1.0%のL-アラニル-L-グルタミン(終濃度約2mM)、約100IU/mLの組み換えヒトIL-2、約600IU/mLの組み換えヒトIL-7、および約100IU/mLの組み換えヒトIL-15を補充されたOpTmizer(商標)T細胞拡大増殖基礎培地を含む。特定の態様において、無血清培地は、本明細書において記述されるプロセスの任意の1つまたは複数の工程、例えばI項に記述される1つまたは複数の工程に使用することができる。特定の態様において、無血清培地は、サンプル調製、選択、刺激および/または操作を含む任意の1つまたは複数の工程に使用することができる。

【0559】

いくつかの態様において、無血清培地は濃縮培地配合物である。いくつかの態様において、無血清培地は濃縮培地配合物ではない。いくつかの態様において、無血清培地は、2倍または約2倍から、100倍または約100倍濃縮される。いくつかの態様において、無血清培地は、10倍または約10倍の配合物である。いくつかの態様において、無血清培地は、2℃または約2℃～8℃で貯蔵することができる。

【0560】

IV. 組み換えタンパク質

いくつかの態様において、本明細書において提供される方法によって処理、加工、操作および/または作製される細胞は、例えばキメラ抗原受容体(CAR)、もしくはT細胞受容体(TCR)などの組換え受容体といった組換えタンパク質を含有もしくは発現するか、またはこれを含有もしくは発現するように操作される。一定の態様において、本明細書において提供される方法は、細胞、または細胞を含有および/もしくは細胞のために濃縮された集団もしくは組成物を作製するならびに/またはこれらを作製する能力を有する。これらの細胞は、組換えタンパク質を発現または含有するように操作されている。種々の態様において、1つまたは複数の組換えタンパク質を発現する、例えば免疫細胞、例えばT細胞といった、操作細胞、形質転換細胞、形質導入細胞、トランスフェクト細胞が提供される。特定態様において、1つまたは複数の組換えタンパク質のうち少なくとも1つは、例えば抗原受容体および1つまたは複数のその成分を含有する受容体といった組換え受容体である。

【0561】

A. 組換え受容体

いくつかの態様において、1つまたは複数の組換え受容体を発現する、例えば免疫細胞、例えばT細胞といった、操作された細胞が提供される。受容体は、抗原受容体および1つまたは複数のその成分を含有する受容体である。組換え受容体は、キメラ受容体、例えばリガンド結合ドメインまたはその結合フラグメントおよび細胞内シグナル伝達ドメインまたは細胞内シグナル伝達領域を含有する受容体、機能的非-TCR抗原受容体、キメラ抗原受容体(CAR)、例えば組換えTCRまたは遺伝子組換えされたTCRといったT細胞受容体(TCR)、キメラ自己抗体受容体(CAAR)および前述のもののうちのいずれかの成分を含みうる。例えばCARといった組換え受容体は、一般には1つまたは複数の細胞内シグナル伝達成分に結合された細胞外抗原(またはリガンド)結合ドメインを含み、いくつかの局面において、これはリンカーおよび/または膜貫通ドメイン(複数可)を介して連結される。いくつかの態様において、操作された細胞は、異なる成分、ドメインまたは領域を含有する2つまたは複数の受容体を発現する。いくつかの局面において、2つまたは複数の受容体により、空間的制御もしくは時間的制御、または特異性、活性、抗原(またはリガンド)結合、機能および/または組換え受容体の発現の制御が可能となる。

【0562】

1. キメラ抗原受容体 (CAR)

提供された方法のいくつかの態様において、キメラ受容体、例えばキメラ抗原受容体は、所望の抗原（例えば腫瘍抗原）に対する特異性を与えるリガンド結合ドメイン（例えば抗体または抗体フラグメント）を細胞内シグナル伝達ドメインと組み合わせる1つまたは複数のドメインを含有する。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次活性化シグナルを与える活性化細胞内ドメイン部分、例えばT細胞活性化ドメインである。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能を増進するために、共刺激シグナル伝達ドメインを含有し、または共刺激シグナル伝達ドメインを追加的に含有する。いくつかの態様において、キメラ受容体は、免疫細胞中へと遺伝子操作された場合に、T細胞の活性を調節することができ、また場合によっては、T細胞の分化またはホメオスタシスを調節することができ、それによって、例えば養子細胞療法で使用するための、インビボでの寿命、生存性および/または持続性が改良された、遺伝子操作された細胞をもたらす。

10

【0563】

CARを含む例示的な抗原受容体、およびこうした受容体を操作して細胞へと導入するための方法は、例えば国際特許出願公開第200014257号、同2013126726号、同2012/129514号、同2014031687号、同2013/166321号、同2013/071154号、同2013/123061号、米国特許出願公開第2002131960号、同2013287748号、同20130149337号、米国特許第6,451,995号、同7,446,190号、同8,252,592号、同8,339,645号、同8,398,282号、同7,446,179号、同6,410,319号、同7,070,995号、同7,265,209号、同7,354,762号、同7,446,191号、同8,324,353号、および同8,479,118号、ならびに欧州特許出願第2537416号記載のもの、ならびに/またはSadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3 (4) :388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8 (4) :e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24 (5) :633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18 (2) :160-75により記載のものが含まれる。いくつかの局面において、抗原受容体には、米国特許第7,446,190号記載のCAR、および国際特許出願公開第2014055668 A1号記載のものが含まれる。CARの例には、例えば、国際公開公報第2014031687号、米国特許第8,339,645号、同7,446,179号、同2013/0149337号、米国特許第7,446,190号、米国特許第8,389,282号、Kochenderfer et al., 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35 (9) :689-701; and Brentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5 (177) といった上述の出版物のいずれかに開示のCARが含まれる。また、国際公開公報第2014031687号、米国特許第8,339,645号、同7,446,179号、同2013/0149337号、米国特許第7,446,190号および米国特許第8,389,282号も参照されたい。

20

30

【0564】

CARといったキメラ受容体は、一般には抗体分子の一部であり、例えばscFv抗体フラグメントなど、抗体の一般的な可変重 (VH) 鎖領域および/または可変軽 (VL) 鎖領域といった、細胞外抗原結合ドメインを含む。

【0565】

いくつかの態様において、受容体によって標的とされる抗原はポリペプチドである。いくつかの態様において、それは糖分子または別の分子である。いくつかの態様において、抗原は、標準的な標的細胞もしくは組織、または非標準的な標的細胞もしくは組織と比較すると、例えば腫瘍細胞または病原性細胞などの疾患細胞または状態の細胞上にて選択的に発現されるか、または過剰発現される。別の態様において、抗原は、通常の細胞上および/または操作された細胞上に発現される。

40

【0566】

いくつかの態様において、抗原は、 $\alpha v \beta 6$ インテグリン ($\alpha v \beta 6$ インテグリン)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H3、B7-H6、炭酸脱水素酵素9 (CA9、CAIXまたはG250としても知られる)、がん精巣抗原、がん/精巣抗原1B (CTAG、NY-ESO-1およびLAGE-2と

50

しても知られる)、がん胎児性抗原(CEA)、サイクリン、サイクリンA2、C-Cモチーフケモカインリガンド1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4(CSPG4)、上皮成長因子タンパク質(EGFR)、III型上皮成長因子受容体変異(EGFR vIII)、上皮糖タンパク質2(EPG-2)、上皮糖タンパク質40(EPG-40)、エフリンB2、エフリン受容体A2(EPha2)、エストロゲン受容体、Fc受容体様5(FCRL5、Fc受容体ホモログ5またはFCRH5としても知られる)、胎児型アセチルコリン受容体(胎児型AChR)、葉酸結合タンパク質(FBP)、葉酸受容体アルファ、ガングリオシドGD2、O-アセチル化GD2(OGD2)、ガングリオシドGD3、糖タンパク質100(gp100)、グリピカン-3(GPC3)、Gタンパク質共役受容体5D(GPRC5D)、Her2/neu(受容体チロシンキナーゼerb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二量体、ヒト高分子量メラノーマ関連抗原(HMW-MAA)、B型肝炎表面抗原、ヒト白血球抗原A1(HLA-A1)、ヒト白血球抗原A2(HLA-A2)、IL-22受容体アルファ(IL-22R α)、IL-13受容体アルファ2(IL-13R α 2)、キナーゼインサートドメイン受容体(kdr)、カップ軽鎖、L1細胞接着分子(L1-CAM)、L1-CAMのCE7エピトープ、ロイシンリッチリピート含有8ファミリーメンバーA(LRRC8A)、ルイスY、メラノーマ関連抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、メソテリン(MSLN)、c-Met、マウスサイトメガロウイルス(CMV)、ムチン1(MUC1)、MUC16、ナチュラルキラグループ2メンバーD(NKG2D)リガンド、メラニンA(MART-1)、神経系細胞接着分子(NCAM)、腫瘍胎児性抗原、メラノーマ優先発現抗原(PRAME)、プロゲステロン受容体、前立腺特異的抗原、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1)、サバイビン、栄養芽層糖タンパク質(TPBG、5T4としても知られる)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG72)、チロシナーゼ関連タンパク質1(TRP1、TYRP1またはgp75としても知られる)、チロシナーゼ関連タンパク質2(TRP2、ドパクロムトートメラゼ、ドパクロムデルタ-イソメラゼまたはDCTとしても知られる)、血管内皮成長因子受容体(VEGFR)、血管内皮成長因子受容体2(VEGFR2)、ウィルムス腫瘍1(WT-1)、病原体特異的抗原もしくは病原体発現抗原、またはユニバーサルタグに関連する抗原、および/またはバイオチニル化分子、および/またはHIV、HCV、HBVもしくは他の病原体によって発現される分子であるか、またはこれらを含む。受容体によって標的とされる抗原は、いくつかの態様において、多数の公知のB細胞マーカーのうちのいずれかなどの、B細胞悪性腫瘍に関連する抗原を含む。いくつかの態様において、抗原は、CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79bまたはCD30であるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、抗原は、病原体特異的抗原または病原体発現抗原であるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、抗原は、ウイルス抗原(例えばHIV、HCV、HBVなどに由来するウイルス抗原)、細菌抗原、および/または寄生虫抗原である。

【0567】

いくつかの態様において、抗体は、例えばscFvといった、例えば重鎖可変(V_H)領域および軽鎖可変(V_L)領域といった2つの抗体ドメインまたは領域ドメインを連結する1つまたは複数のリンカーを含む、抗原結合フラグメントである。リンカーは通常、例えばフレキシブルペプチドリンカーおよび/または可溶性ペプチドリンカーである。リンカーはグリシンおよびセリン、および/または場合によってはスレオニンが豊富なものである。いくつかの態様において、リンカーは、リジンおよび/またはグルタメートといった荷電性残基をさらに含み、これは可溶性を向上しうる。いくつかの態様において、リンカーは1つまたは複数のプロリンをさらに含む。いくつかの局面において、グリシンおよびセリン(および/またはスレオニン)が豊富なリンカーは、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%のこうしたアミノ酸(複数可)を含む。いくつかの態様において、これらは少なくとも50%、55%、60%、70%もしくは75%であるグリシン、セリン、および/もしくはスレオニン、または少なくとも約50%、55%、60%、70%もしくは75%であるグリシン、セリン、および/もしくはスレオ

10

20

30

40

50

ニンを含む。いくつかの態様において、リンカーは、実質的に全体的にグリシン、セリン、および/またはスレオニンから構成される。リンカーは一般には、約5～約50アミノ酸長の間であり、通常は例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30といった、10または約10から30または約30アミノ酸長であり、いくつかの例において10～25アミノ酸長である。例示的なリンカーは、配列GGGGS (4GS; SEQ ID NO:122) またはGGGS (3GS; SEQ ID NO:123) の繰り返しを様々な数で、例えばこうした配列の2、3、4から5回の繰り返しを有するリンカーを含む。例示的なリンカーは、SEQ ID NO: 79 (GGGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 62 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG)またはSEQ ID NO: 124 (SRGGGGSGGGSGGGGSLEMA)

10

に示される配列を有するか、またはこれからなるリンカーを含む。

【0568】

受容体によって標的とされる抗原は、いくつかの態様において、多数の公知のB細胞マーカーのうちのいずれかなどの、B細胞悪性腫瘍に関連する抗原を含む。いくつかの態様において、受容体によって標的とされる抗原は、CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Igκ、Igλ、CD79a、CD79b、またはCD30である。

【0569】

いくつかの態様において、抗原または抗原結合ドメインはCD19である。いくつかの態様において、scFvは、抗体またはCD19に特異的な抗体フラグメント由来のVHおよびVLを含有する。いくつかの態様において、抗体またはCD19を結合する抗体フラグメントは、例えばFMC63およびSJ25C1といったマウス由来抗体である。いくつかの態様において、抗体または抗体フラグメントは、例えば米国特許公報第2016/0152723号に記載されるようなヒト抗体である。

20

【0570】

本明細書における用語「抗体」は、最も広義に使用され、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、例えばインタクト抗体および機能的（抗原結合性）抗体フラグメント、例えばFab (Fragment antigen binding) フラグメント、F(ab')₂フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、組換えIgG (rIgG) フラグメント、抗原に特異的に結合する能力を有する重鎖可変 (V_H) 領域、一本鎖抗体フラグメント、例えば一本鎖可変フラグメント (scFv) および単ドメイン抗体 (例えばsdAb、sdFv、ナノボディ) フラグメントを包含する。この用語は、遺伝子操作型および/または他の修飾型の免疫グロブリン、例えばイントラボディ、ペプチボディ、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、およびヘテロコンジュゲート抗体、多重特異性、例えば二重特異性または三重特異性、抗体、ダイアボディ、トリアボディ (triabody)、およびテトラボディ、タンデムジ-scFv、タンデムトリ-scFvを包含する。別段の言明がある場合を除き、「抗体」という用語は、その機能的抗体フラグメントを包含すると理解されるべきであり、本明細書において「抗原結合フラグメント」とも呼ばれる。この用語は、インタクト抗体または全長抗体、例えばIgGおよびそのサブクラス、IgM、IgE、IgAならびにIgDなど、任意のクラスまたはサブクラスの抗体も包含する。

30

40

【0571】

「相補性決定領域」および「CDR」は、「超可変領域」または「HVR」と同義であって、これらが、抗原特異性および/または結合アフィニティーを付与する抗体可変領域内の非連続アミノ酸配列を指すことは、当技術分野において公知である。一般には、各重鎖可変領域に3つのCDR (CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3) と各軽鎖可変領域に3つのCDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3) がある。「フレームワーク領域」および「FR」が、重鎖および軽鎖の可変領域の非CDR部分を指すことは、当技術分野において公知である。一般には、各全長重鎖可変領域に4つのFR (FR-H1、FR-H2、FR-H3およびFR-H4) と各全長軽鎖可変領域に4つのFR (FR-L1、FR-L2、FR-L3およびFR-L4) がある。

50

【0572】

所与のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列境界は、Kabat et al. (1991), 'Sequences of Proteins of Immunological Interest', 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabat」ナンバリングスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (「Chothia」ナンバリングスキーム)、MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), 'Antibody-antigen interaction: Contact analysis and binding site topography' J. Mol. Biol. 262,732-745 (「Contact」ナンバリングスキーム)、Lefranc MP et al., 'IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains' Dev Comp Immunol, 2003 Jan; 27 (1): 55-77 (「IMGT」ナンバリングスキーム)、および Honegger A and Pluckthun A, 'Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool' J Mol Biol, 2001 Jun 8; 309 (3): 657-70 (「Aho」ナンバリングスキーム)、および Martin et al., 'Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm' PNAS, 1989, 86 (23): 9268-9272 (「AbM」ナンバリングスキーム)に記載されているものを含めて、多数の周知のスキームのいずれかを使って容易に決定することができる。

10

【0573】

所与のCDRまたはFRの境界は、同定のために使用されるスキームによって変化する。例えば、Kabatスキームは構造アラインメントに基づいているが、Chothiaスキームは構造的情報に基づいている。KabatスキームおよびChothiaスキームの両方に対するナンバリングは、例えば、挿入が「30a」といった挿入文字列により調整され、および欠失がいくつかの抗体に出現している状態で、最も一般的な抗体領域配列長に基づく。2つのスキームは、異なる位置に特定の挿入および欠失(「挿入欠失」)を配置し、これにより異なるナンバリングが生じる。Contactスキームは複合体結晶構造の解析に基づき、これはChothiaナンバリングスキームに関しても多くの点で類似している。AbMスキームは、Oxford MolecularによるAbM抗体モデリングソフトウェアに使用されたものに基づくKabat定義とChothia定義との折衷である。

20

【0574】

以下の表1には、Kabatスキーム、Chothiaスキーム、AbMスキームおよびContactスキームそれぞれによって同定されるCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3およびCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3の例示的な位置境界を列挙する。CDR-H1に関して、残基ナンバリングは、KabatナンバリングスキームおよびChothiaナンバリングスキームの両方を使用して列挙されている。FRはCDR間に位置し、例えば、FR-L1はCDR-L1の前に位置し、FR-L2はCDR-L1とCDR-L2の間に位置し、FR-L3はCDR-L2とCDR-L3の間に位置し、その他も同様である。示されたKabatナンバリングスキームがH35AおよびH35Bで挿入を配置することから、示されたKabatナンバリング慣習を使用してナンバリングされた場合、ChothiaのCDR-H1ループの終端は、ループ長に依存して、H32とH34の間で変化することに留意されたい。

30

【0575】

(表1) 種々のナンバリングスキームに従うCDR境界

40

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24-- L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50-- L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89-- L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat ナンバリング ¹)	H31-- H35B	H26-- H32..34	H26-- H35B	H30-- H35B
CDR-H1 (Chothia ナンバリング ²)	H31-- H35	H26--H32	H26-- H35	H30-- H35
CDR-H2	H50-- H65	H52--H56	H50-- H58	H47-- H58
CDR-H3	H95-- H102	H95--H102	H95-- H102	H93-- H101

1 - Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2 - Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948

【0576】

したがって、別段の指定がある場合を除き、所与の抗体またはその領域の、例えばその可変領域の、「CDR」もしくは「相補性決定領域」または指定された個々のCDR（例えばCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3）は、上述のスキームのいずれか、または別の公知のスキームによって定義される相補性決定領域（または特定の相補性決定領域）を包含すると理解されるべきである。例えば、所与のV_H領域またはV_L領域アミノ酸配列において、特定のCDR（例えばCDR-H3）が、対応するCDRのアミノ酸配列を含有すると言明された場合、そのようなCDRは、可変領域内に、上述のスキーム、または別の公知のスキームのいずれかによって定義される対応するCDR（例えばCDR-H3）の配列を有すると理解される。いくつかの態様において、特異CDR配列は指定される。提供された抗体は、上述の別のナンバリングスキームまたは当業者に公知の別のナンバリングスキームに従って記載されるCDRを含みうることが理解されているが、提供された抗体の例示的なCDR配列は、種々のナンバリングスキームを使用して記載される。

【0577】

同様に、別段の指定がある場合を除き、所与の抗体またはその領域、例えばその可変領域のFRまたは指定された個々のFR（例えばFR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4）は、公知のスキームのいずれかによって定義されるフレームワーク領域（または特定のフレームワーク領域）を包含すると理解されるべきである。いくつかの例では、Kabat、Chothia、AbMまたはContact法によって定義されるCDRなど、特定のCDR、FRまたは複数のFRもしくは複数のCDRを同定するためのスキーム、または他の公知のスキームが指定される。別の場合にはCDRまたはFRの特定のアミノ酸配列が与えられる。

【0578】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗原に対する抗体の結合に関与する抗体重鎖または抗体軽鎖のドメインを指す。未変性抗体の重鎖および軽鎖の可変領域（それぞれV_HおよびV_L）は一般に類似する構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域（FR）と3つのCDRとを含んでいる。（例えばKindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。）単一のV_HドメインまたはV_Lドメインでも、抗原結合特異性を付与するには十分でありうる。さらにまた、特定の抗原に結合する抗体は、その抗原に結合する抗体からのV_HドメインまたはV_Lドメインを使ってそれぞれ相補的なV_LドメインまたはV_Hドメインのライブラリーをスクリーニングすることによって、単離しうる。例えばPortolano *et al.*, J. Immunol. 150:8

80-887 (1993)、Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991) を参照されたい。
【0579】

提供されたCARに含まれる抗体は抗体フラグメントである。「抗体フラグメント」または「抗体結合フラグメント」とは、インタクト抗体以外の分子であって、インタクト抗体のうち、インタクト抗体が結合する抗原に結合する部分を含む分子を指す。抗体フラグメントの例として、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab₂')、ダイアボディ、線状抗体、重鎖可変(V_H)領域、例えばscFvといった一本鎖抗体分子、V_H領域のみを含むシングルドメイン抗体、および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられるが、それらに限定されない。いくつかの態様において、提供されたCARにおける抗原結合ドメインは、可変重鎖(V_H)領域および可変軽鎖(V_L)領域を含む抗体フラグメントであるか、これを含む。特定態様において、抗体は、重鎖可変(V_H)領域および/または軽鎖可変(V_L)領域を含む一本鎖抗体フラグメントであり、例えばscFvである。

10

【0580】

いくつかの態様において、scFvはFMC63由来である。FMC63は一般には、ヒト起源のCD19を発現するNalm-1細胞およびNalm-16細胞に対して産生されるマウスモノクローナルIgG1抗体を指す(Ling, N.R., et al. (1987) Leucocyte typing III.302)。いくつかの態様において、FMC63抗体は、それぞれSEQ ID NO:51およびSEQ ID NO:52に示されるCDRH1およびCDRH2、SEQ ID NO:53またはSEQ ID NO:54に示されるCDRH3、ならびにSEQ ID NO:55に示されるCDRL1ならびにSEQ ID NO:55またはSEQ ID NO:57に示されるCDRL2、ならびにSEQ ID NO:58またはSEQ ID NO:59に示されるCDRL3を含む。いくつかの態様において、FMC63抗体は、SEQ ID NO:60のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H)およびSEQ ID NO:61のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む。

20

【0581】

いくつかの態様において、scFvはSEQ ID NO:55のCDRL1配列、SEQ ID NO:56のCDRL2配列、およびSEQ ID NO:58のCDRL3配列を含有する可変軽鎖、ならびに/またはSEQ ID NO:51のCDRH1配列、SEQ ID NO:52のCDRH2配列、およびSEQ ID NO:53のCDRH3配列を含有する可変重鎖を含む。いくつかの態様において、scFvはSEQ ID NO:60に示される可変重鎖領域およびSEQ ID NO:61に示される可変軽鎖領域を含む。いくつかの態様において、可変重鎖および可変軽鎖はリンカーによって結合される。いくつかの態様において、リンカーはSEQ ID NO:62に示される。いくつかの態様において、scFvは、順にV_H、リンカーおよびV_Lを含む。いくつかの態様において、scFvは、順にV_L、リンカーおよびV_Hを含む。いくつかの態様において、scFvは、SEQ ID NO:63に示されるヌクレオチドの配列、またはSEQ ID NO:63に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を呈する配列によってコードされる。いくつかの態様において、scFvは、SEQ ID NO:64に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:64に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を呈する配列を含む。

30

【0582】

いくつかの態様において、scFvはSJ25C1由来である。SJ25C1は、ヒト起源のCD19を発現するNalm-1細胞およびNalm-16細胞に対して産生されるマウスモノクローナルIgG1抗体を指す(Ling, N.R., et al. (1987) Leucocyte typing III.302)。いくつかの態様において、SJ25C1抗体は、SEQ ID NO:65~67に示されるCDRH1、CDRH2、CDRH3をそれぞれ含み、SEQ ID NO:68~70に示されるCDRL1配列、CDRL2配列およびCDRL3配列をそれぞれ含む。いくつかの態様において、SJ25C1抗体は、SEQ ID NO:71のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H)およびSEQ ID NO:72のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む。

40

【0583】

いくつかの態様において、scFvはSEQ ID NO:73のCDRL1配列、SEQ ID NO:74のCD

50

RL2配列、およびSEQ ID NO:75のCDRL3配列を含有する可変軽鎖、ならびに/またはSEQ ID NO:76のCDRH1配列、SEQ ID NO:77のCDRH2配列、およびSEQ ID NO:78のCDRH3配列を含有する可変重鎖を含む。いくつかの態様において、scFvはSEQ ID NO:71に示される可変重鎖領域およびSEQ ID NO:72に示される可変軽鎖領域を含む。いくつかの態様において、可変重鎖および可変軽鎖はリンカーによって結合される。いくつかの態様において、リンカーはSEQ ID NO:79に示される。いくつかの態様において、scFvは、順にV_H、リンカーおよびV_Lを含む。いくつかの態様において、scFvは、順にV_L、リンカーおよびV_Hを含む。いくつかの態様において、scFvは、SEQ ID NO:80に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:80に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を呈する配列を含む。

10

【0584】

いくつかの態様において、抗体または抗原結合フラグメント（例えば、scFvまたはV_Hドメイン）は、BCMAといった抗原を特異的に認識する。いくつかの態様において、抗体または抗原結合フラグメントは、特異的にBCMAに結合する抗体または抗原結合フラグメント由来であるか、このバリエーションである。

【0585】

いくつかの態様において、CARはBCMAにとって特異的であり、例えばヒトBCMAといった抗BCMA CARである。マウス抗ヒトBCMA抗体およびヒト抗ヒト抗体を含む抗BCMA抗体を含有するキメラ抗原受容体、ならびにこうしたキメラ受容体を発現する細胞は、あらかじめ記載されている。Carpenter et al., Clin Cancer Res., 2013, 19 (8) :2048-2060、国際公開公報第2016/090320号、国際公開公報第2016090327号、国際公開公報第2010104949A2号および国際公開公報第2017173256号を参照されたい。いくつかの態様において、抗原または抗原結合ドメインはBCMAである。いくつかの態様において、scFvはBCMAに特異的な抗体または抗体フラグメント由来のV_HおよびV_Lを含有する。いくつかの態様において、BCMAに結合する抗体または抗体フラグメントは、国際特許出願公開番号第2016/090327号および同2016/090320号に示される抗体または抗体フラグメントからのV_HおよびV_Lであるか、これを含有する。

20

【0586】

いくつかの態様において、抗BCMA CARは、国際公開公報第2016/090320号または国際公開公報第2016090327号記載の抗体に由来する可変重（V_H）領域および/または可変軽（V_L）領域を含有する、scFvといった抗原結合ドメインを含有する。いくつかの態様において、scFvといった抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:116に示されるV_HおよびSEQ ID NO:117に示されるV_Lを含有する。いくつかの態様において、scFvといった抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:118に示されるV_HおよびSEQ ID NO:119に示されるV_Lを含有する。いくつかの態様において、scFvといった抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:120に示されるV_HおよびSEQ ID NO:121に示されるV_Lを含有する。いくつかの態様において、scFvといった抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:113に示されるV_HおよびSEQ ID NO:114に示されるV_Lを含有する。いくつかの態様において、scFvといった抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:125に示されるV_HおよびSEQ ID NO:126に示されるV_Lを含有する。いくつかの態様において、scFvといった抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:127に示されるV_HおよびSEQ ID NO:128に示されるV_Lを含有する。いくつかの態様において、scFvといった抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:129に示されるV_HおよびSEQ ID NO:130に示されるV_Lを含有する。いくつかの態様において、V_HまたはV_Lは、前述のV_HまたはV_L配列のいずれかに対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸の配列を有し、BCMAに対する結合を保持する。いくつかの態様において、V_H領域はV_L領域に対するアミノ末端である。いくつかの態様において、V_H領域はV_L領域に対するカルボキシ末端である。

30

40

【0587】

50

いくつかの態様において、抗原または抗原結合ドメインはGPCR5Dである。いくつかの態様において、scFvは、抗体またはGPCR5Dに特異的な抗体フラグメント由来のVHおよびVLを含有する。いくつかの態様において、GPCR5Dに結合する抗体または抗体フラグメントは、国際特許出願公開番号第2016/090329号および同2016/090312号に示される抗体または抗体フラグメントからのVHおよびVLであるか、またはこれを含有する。

【0588】

いくつかの局面では、CARは、ユニバーサルタグまたはユニバーサルエピトープと結合するまたはそれを認識する、例えば、特異的に認識する、リガンド(例えば、抗原)結合ドメインを含む。いくつかの局面では、結合ドメインは、疾患または障害に関連する抗原を認識する、異なる結合分子(例えば、抗体または抗原結合フラグメント)と連結することができる分子、タグ、ポリペプチドおよび/またはエピトープと結合することができる。例示的なタグまたはエピトープは、色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート)またはビオチンを含む。いくつかの局面では、疾患または障害に関連する抗原、例えば、腫瘍抗原を認識する、タグに連結された結合分子(例えば、抗体または抗原結合フラグメント)は、タグに特異的なCARを発現している操作された細胞と共に、操作された細胞の細胞傷害性または他のエフェクター機能をもたらす。いくつかの局面では、疾患または障害に関連する抗原に対するCARの特異性は、タグ付き結合分子(例えば、抗体)によって提供され、異なるタグ付き結合分子を使用して異なる抗原を標的づけることができる。ユニバーサルタグまたはユニバーサルエピトープに特異的な例示的なCARは、例えば、米国特許第9,233,125号、WO2016/030414、Urbanska et al., (2012) Cancer Res 72: 1844-1852、およびTamada et al., (2012). Clin Cancer Res 18:6436-6445に記載されているものを含む。

【0589】

いくつかの態様において、抗原は、病原体特異抗原または病原体発現抗原であるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、抗原は、ウイルス抗原(例えば、HIV、HCV、HBV、その他由来のウイルス抗原)、細菌抗原、および/または寄生虫抗原である。いくつかの態様において、CARは、主要組織適合性複合体(MHC)-ペプチド複合体として細胞表面に提示された細胞内抗原、例えば腫瘍関連抗原を特異的に認識するTCR様抗体、例えば抗体またはフラグメント(例えばscFv)を含む。いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体を認識する抗体またはその抗原結合部分は、細胞上に組み換え受容体、例えば抗原受容体の部分として発現することができる。抗原受容体の中に、機能的非T細胞受容体(TCR)抗原受容体、例えばキメラ抗原受容体(CAR)がある。いくつかの態様において、ペプチド-MHC複合体に対するTCR様特異性を示す抗体または抗原結合フラグメントを含むCARはまた、TCR様CARと呼ばれる場合がある。いくつかの態様において、CARはTCR様CARであり、抗原は、TCRのようにMHC分子に関連して細胞表面上で認識される、細胞内タンパク質のペプチド抗原などの、プロセッシングされたペプチド抗原である。いくつかの態様において、TCR様CARのMHC-ペプチド複合体に特異的な細胞外抗原結合ドメインは、いくつかの局面ではリンカーおよび/または膜貫通ドメインを介して、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達構成成分と連結される。いくつかの態様において、そのような分子は、典型的には、TCRなどの天然の抗原受容体を介したシグナル、および任意で、共刺激受容体と組み合わせたそのような受容体を介したシグナルをまねたり、そのようなシグナルに近づいたりすることができる。

【0590】

「主要組織適合性複合体」(MHC)への言及は、ポリペプチドのペプチド抗原(細胞内機構によってプロセッシングされたペプチド抗原を含む)と場合により複合体化し得る、多型ペプチド結合部位または結合溝を含むタンパク質、一般的には糖タンパク質を指す。いくつかの場合には、MHC分子は、TCRなどのT細胞上の抗原受容体またはTCR様抗体によって認識されるコンフォメーションで抗原を提示するために、例えばペプチドとの複合体、すなわちMHC-ペプチド複合体として、細胞表面にディスプレイまたは発現され得る。一般的に、MHCクラスI分子は、場合により3つのαドメインを含む膜貫通α鎖と、非共有

10

20

30

40

50

結合した β 2ミクログロブリンを有する、ヘテロ二量体である。一般的に、MHCクラスII分子は、2つの膜貫通糖タンパク質 α および β で構成され、両方とも通常は膜にまたがっている。MHC分子は、ペプチドを結合するための抗原結合部位（複数可）および適切な抗原受容体による認識に必要な配列を含む、MHCの有効な部分を含み得る。いくつかの態様では、MHCクラスI分子は、細胞質ゾルに由来するペプチドを細胞表面に送達する；この場合には、MHC-ペプチド複合体はT細胞、例えば一般には $CD8^+$ T細胞によって認識されるが、場合によっては $CD4^+$ T細胞によって認識される。いくつかの態様では、MHCクラスII分子は、小胞系（vesicular system）に由来するペプチドを細胞表面に送達する；この場合には、それらは通常 $CD4^+$ T細胞によって認識される。一般に、MHC分子は、マウスではH-2、ヒトではヒト白血球抗原（HLA）と総称される、連鎖している遺伝子座のグループによってコードされる。それゆえ、一般的に、ヒトMHCはヒト白血球抗原（HLA）と称されることもある。

10

【0591】

用語「MHC-ペプチド複合体」または「ペプチド-MHC複合体」またはその変形は、一般に、MHC分子の結合溝または裂け目に収まったペプチドの非共有結合的相互作用などによる、ペプチド抗原とMHC分子の複合体または会合を指す。いくつかの態様では、MHC-ペプチド複合体は、細胞の表面上に存在するか、または提示される。いくつかの態様では、MHC-ペプチド複合体は、抗原受容体、例えば、TCR、TCR様CAR、またはその抗原結合部分によって特異的に認識され得る。

【0592】

20

いくつかの態様では、ポリペプチドの、ペプチド抗原またはエピトープなどのペプチドは、例えば抗原受容体による認識のために、MHC分子と会合することができる。一般に、ペプチドは、ポリペプチドまたはタンパク質などのより長い生体分子に由来するか、またはその断片に基づく。いくつかの態様では、ペプチドは、典型的には約8～約24アミノ酸長である。いくつかの態様では、ペプチドは、MHCクラスII複合体での認識のために、9～22または約9～22アミノ酸の長さを有する。いくつかの態様では、ペプチドは、MHCクラスI複合体での認識のために、8～13または約8～13アミノ酸の長さを有する。いくつかの態様では、MHC-ペプチド複合体などの、MHC分子との関連でペプチドが認識されると、TCRまたはTCR様CARなどの抗原受容体は、T細胞応答、例えば、T細胞増殖、サイトカイン産生、細胞傷害性T細胞応答または他の応答を誘導するT細胞への活性化シグナルをもたらすか、または引き起こす。

30

【0593】

いくつかの態様では、TCR様抗体または抗原結合部分は、公知であるか、または公知の方法により作製することができる（例えば、米国特許出願公開番号US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/0099253 0; US20090226474; US20090304679; および出願公開番号WO 03/068201を参照されたい）。

【0594】

いくつかの態様では、MHC-ペプチド複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、特定のMHC-ペプチド複合体を含む有効量の免疫原で宿主を免疫することによって作製され得る。いくつかの場合では、MHC-ペプチド複合体のペプチドは、MHCに結合することができる抗原、例えば、腫瘍抗原、例えば、ユニバーサル腫瘍抗原、骨髄腫抗原、または以下に記載される他の抗原、のエピトープである。いくつかの態様では、次いで、免疫応答を誘発するために、有効量の免疫原が宿主に投与される；その場合、免疫原は、MHC分子の結合溝内のペプチドの三次元表現に対する免疫応答を引き出すのに十分な期間にわたってその三次元形態を保持する。その後、宿主から回収された血清をアッセイして、MHC分子の結合溝内のペプチドの三次元表現を認識する所望の抗体が産生されているかどうかを判定する。いくつかの態様では、産生された抗体をアッセイして、該抗体がMHC-ペプチド複合体をMHC分子単独、関心対象のペプチド単独、およびMHCと無関係のペプチドとの複合体から区別し得ることを確認することができる。その後、所望の抗体を

40

50

単離することができる。

【0595】

いくつかの態様では、MHC-ペプチド複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、ファージ抗体ライブラリーなどの、抗体ライブラリーディスプレイ法を使用することによって取得することができる。いくつかの態様では、変異型Fab、scFvまたは他の抗体形態のファージディスプレイライブラリーが作製され、例えば、該ライブラリーではそのメンバーがCDR（複数可）の1つまたは複数の残基で変異している。例えば、米国特許出願公開番号US20020150914; US2014/0294841; およびCohen CJ. et al. (2003) J Mol. Recog. 16:324-332を参照されたい。

【0596】

いくつかの態様において、抗原はCD20である。いくつかの態様において、scFvは、抗体またはCD20に特異的な抗体フラグメント由来のVHおよびVLを含有する。いくつかの態様において、CD20に結合する抗体または抗体フラグメントは、リツキシマブであるか、または例えばリツキシマブのscFvなどのリツキシマブを由来とするものである。

【0597】

いくつかの態様において、抗原はCD22である。いくつかの態様において、scFvは、抗体またはCD22に特異的な抗体フラグメント由来のVHおよびVLを含有する。いくつかの態様において、CD22に結合する抗体または抗体フラグメントは、m971であるか、または例えばm971のscFvなどのm971を由来とするものである。

【0598】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は抗体または抗体フラグメントを含有する細胞外部分を含む。いくつかの局面において、キメラ抗原受容体は、抗体またはフラグメントを含有する細胞外部分および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、抗体またはフラグメントはscFvを含む。

【0599】

いくつかの態様において、例えばCARなどの組換え受容体の抗体部分は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分、例えばヒンジ領域、例えばIgG4ヒンジ領域ならびに/またはCH1/CLおよび/もしくはFc領域をさらに含む。いくつかの態様において、定常領域または定常部分は、ヒトIgG、例えばIgG4またはIgG1のものである。いくつかの局面において、定常領域の部分は、例えばscFvなどの抗原認識成分と膜貫通ドメインの間でスペーサ領域として働く。スペーサは、スペーサの不在下と比較すると、抗原結合に続く、増加した細胞の応答性を提供する長さのものでありうる。例示的なスペーサは、Hudecek et al. (2013) Clin.Cancer Res.,19:3153、国際特許出願公開番号第2014031687号、米国特許第8,822,647号、または米国特許公開出願番号第2014/0271635号記載のものであるが、これらに限定されない。

【0600】

いくつかの態様において、定常領域または定常部分は、ヒトIgG、例えばIgG4またはIgG1のものである。いくつかの態様において、スペーサは配列ESKYGPCCPPCP (SEQ ID NO:81に示される)を有し、SEQ ID NO:82に示される配列によってコードされる。いくつかの態様において、スペーサはSEQ ID NO:83に示される配列を有する。いくつかの態様において、スペーサはSEQ ID NO:84に示される配列を有する。いくつかの態様において、定常領域または定常部分はIgDのものである。いくつかの態様において、スペーサはSEQ ID NO:85に示される配列を有する。いくつかの態様において、スペーサは、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:84またはSEQ ID NO:85のいずれかに対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸の配列を有する。いくつかの態様において、スペーサはSEQ ID NO:86~94に示される配列を有する。いくつかの態様において、スペーサは、SEQ ID NO:86~94のいずれかに対して、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸の配列を有す

10

20

30

40

50

る。

【0601】

いくつかの態様において、抗原受容体は、細胞外ドメインに直接的または間接的に連結された細胞内ドメインを含む。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインはITAMを含む。例えばいくつかの局面において、抗原認識ドメイン（例えば細胞外ドメイン）は、一般には1つまたは複数の細胞内シグナル伝達成分に、例えばCARの場合にはTCR複合体などの抗原受容体複合体を介する活性化および/または別の細胞表面受容体を介するシグナルを模倣するシグナル伝達成分などに、連結されている。いくつかの態様において、キメラ受容体は、細胞外ドメイン（例えばscFv）と細胞内シグナル伝達ドメインとの間に連結または融合された膜貫通ドメインを含む。したがって、いくつかの態様において、抗原結合成分（例えば、抗体）は、1つまたは複数の膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。

10

【0602】

一態様において、例えばCARなど、受容体内のドメインのうち1つと自然に会合する膜貫通ドメインが使用される。いくつかの例では膜貫通ドメインは、こうしたドメインの、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへの結合を避けるために、アミノ酸置換によって選択または修飾され、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。

【0603】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかを由来とする。源が天然のものである場合、ドメインはいくつかの局面において、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質を由来とする。膜貫通領域は、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖、またはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154由来のものを含む（すなわち、それらの少なくとも膜貫通領域を含む）。代替的には、いくつかの態様において膜貫通ドメインは合成のものである。いくつかの局面において、合成膜貫通ドメインは、主にロイシンおよびバリンといった疎水性残基を含む。いくつかの局面において、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットは、合成膜貫通ドメインの各終端に見られる。いくつかの態様において、結合はリンカー、スペーサおよび/または膜貫通ドメイン（複数可）によるものである。いくつかの局面において、膜貫通ドメインはCD28の膜貫通部分を含有する。

20

30

【0604】

いくつかの態様において、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとは、直接的または間接的に連結することができる。いくつかの態様において、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとは、本明細書において記載のいずれかなどのスペーサによって連結されている。いくつかの態様において、受容体は、CD28細胞外部分など、膜貫通ドメインが由来する分子の細胞外部分を含有する。

【0605】

細胞内シグナル伝達ドメインは、天然抗原受容体を介したシグナル、共刺激受容体と一体化された受容体などを介したシグナル、および/または共刺激受容体のみを介したシグナルを模倣またはこれに近似するものである。いくつかの態様において、例えば、2~10アミノ酸の間の長さであるリンカーといった、例えばグリシン-セリンダブルレットといったグリシンおよびセリンを含有するものなどの短オリゴリンカーまたはポリペプチドリンカーは、CARの膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインとの間に存在し、この間に結合を形成する。

40

【0606】

T細胞活性化は、いくつかの局面において、TCRによる抗原依存的一次活性化を開始するもの（一次細胞質シグナル伝達配列）と、抗原非依存的に作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを与えるもの（二次細胞質シグナル伝達配列）という、2種類の細胞質シ

50

グナル伝達配列によって媒介されると記載される。いくつかの局面において、CARはこうしたシグナル伝達成分のうち1つまたはその両方を含む。

【0607】

例えばCARといった受容体は、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達成分または複数の細胞内シグナル伝達成分を一般には含む。いくつかの局面において、CARは、TCR複合体の一次活性化を調節する、一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激性に作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン活性化モチーフ、すなわちITAMとして公知であるシグナル伝達モチーフを含有しうる。一次細胞質シグナル伝達配列を含有するITAMの例には、CD3ゼータ鎖、FcRガンマ、CD3ガンマ、CD3デルタおよびCD3イプシロン由来のものを含む。いくつかの態様において、CARにおける細胞質シグナル伝達分子は、CD3ゼータ由来の細胞質シグナル伝達ドメイン、その部分、または配列を含有する。

10

【0608】

いくつかの態様において、受容体は、例えばCD3ゼータ鎖といった、T細胞活性化および細胞傷害性を媒介するTCR CD3鎖などの、TCR複合体の細胞内成分を含む。したがって、いくつかの局面において、抗原結合部分は、1つまたは複数の細胞シグナル伝達モジュールに連結される。いくつかの態様において、細胞シグナル伝達モジュールは、CD3膜貫通ドメイン、CD3細胞内シグナル伝達ドメイン、および/または別のCD3膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様において、例えばCARといった受容体は、Fc受容体 γ 、CD8、CD4、CD25またはCD16といった1つまたは複数の追加分子の一部をさらに含む。例えば、いくつかの局面において、CARまたは別のキメラ受容体は、CD3-ゼータ (CD3- ζ) またはFc受容体 γ とCD8、CD4、CD25またはCD16の間にキメラ分子を含む。

20

【0609】

いくつかの態様において、CARまたは別のキメラ受容体のライゲーシオン時に、受容体の細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、標準的なエフェクター機能または例えばCARを発現するように操作されたT細胞などの免疫細胞の応答のうち少なくとも1つを活性化する。例えば、状況によっては、CARは細胞溶解活性またはT-ヘルパー活性など、サイトカインまたは別の因子の分泌といったT細胞の機能を含む。いくつかの態様において、抗原受容体成分または共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインの切断型部分は、例えばこれがエフェクター機能シグナルを伝達する場合に、インタクト免疫刺激鎖の代わりに使用される。いくつかの態様において、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体 (TCR) の細胞質配列を含み、いくつかの局面においては、自然な状況においてこうした受容体と協力し、抗原受容体の連結に続いてシグナル形質導入を開始する共受容体の細胞質配列も含む。

30

【0610】

天然TCRの文脈では、完全活性化は、一般には、TCRを介したシグナル伝達だけではなく、共刺激シグナルも必要とする。したがって、いくつかの態様において、完全活性化を推進するために、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生成するための成分もCAR中に含まれる。別の態様においては、CARは共刺激シグナルを生成するための成分を含まない。いくつかの局面において、追加のCARは同じ細胞中に発現され、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生成するための成分を提供する。

40

【0611】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、T細胞の共刺激分子の細胞内ドメインを含有する。いくつかの態様において、CARは、例えばCD28、4-1BB、OX40、DAP10およびICOSといった共刺激受容体のシグナル伝達ドメインおよび/または膜貫通部分を含む。いくつかの局面において、同じCARが、活性化成分および共刺激成分の両方を含む。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体は、T細胞共刺激分子に由来する細胞内ドメインまたはその機能的バリエーションを、例えば膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間に含有する。いくつかの局面において、T細胞共刺激分子は、CD28または41BBである。

【0612】

50

いくつかの態様において、活性化ドメインは、1つのCAR内に含まれ、他方で、共刺激成分は、別の抗原を認識する別のCARによって提供される。いくつかの態様において、CARは、活性化CARまたは刺激CAR、共刺激CARを含み、両方とも同じ細胞上で発現される（国際公開公報第2014/055668号を参照されたい）。いくつかの局面において、細胞は1つまたは複数の刺激CARまたは活性化CARおよび/または共刺激CARを含む。いくつかの態様において、細胞は、阻害CAR（iCAR、Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5 (215) (December, 2013) を参照されたい）、例えば疾患もしくは状態に関連しかつ/または疾患もしくは状態に特異的な抗原以外の抗原を認識するCARであって、それにより、疾患を標的とするCARを介して送達される活性化シグナルは、阻害CARがそのリガンドに結合することによって減少または阻害されて、例えばオフターゲット効果を低減するものを、さらに含む。

10

【0613】

いくつかの態様において、2つの受容体は、細胞に対して活性化シグナルおよび阻害シグナルをそれぞれ誘発し、その結果、受容体のうち1つによるその抗原に対するライゲーションが細胞を活性化するかまたは応答を誘発するが、もう一方の阻害受容体によるその抗原に対するライゲーションは、その応答を抑制または低下させるシグナルを誘発する。例は、活性化CARと阻害CAR（iCAR）の組み合わせである。こうした戦略は、例えば、活性化CARが、疾患または状態において発現されるが通常の細胞上でも発現される抗原に結合し、阻害受容体が、通常の細胞上で発現されるが疾患または状態の細胞では発現されない別の抗原に結合するといった状況において、オフターゲット効果の可能性を低減させるために使用されうる。

20

【0614】

いくつかの局面において、キメラ受容体は阻害CAR（例えば、iCAR）であるか、またはこれを含み、例えば、細胞におけるITAM促進応答および/または共刺激促進応答といった免疫応答を低下または抑制させる細胞内成分を含む。例示的なこうした細胞内シグナル伝達成分は、PD-1、CTLA4、LAG3、BTLA、OX2R、TIM-3、TIGIT、LAIR-1、PGE2受容体、A2ARを含むEP2/4アデノシン受容体を含む、免疫チェックポイント分子に見られるものである。いくつかの局面においては、操作された細胞は、こうした阻害分子のシグナル伝達ドメインまたはこうした阻害分子に由来するシグナル伝達ドメインを含む阻害CARを含み、この結果、これは例えば、活性化CARおよび/または共刺激CARによって誘発された細胞の応答を低下させるように働く。

30

【0615】

一定の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3（例えばCD3ゼータ）細胞内ドメインに連結されたCD28膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ細胞内ドメインに連結された、キメラCD28およびCD137（4-1BB、TNFRSF9）共刺激ドメインを含む。

【0616】

いくつかの態様において、CARは、細胞質部分に、1つまたは複数の、例えば、2つ以上の共刺激ドメインおよび活性化ドメイン、例えば一次活性化ドメインを包含する。例示的なCARは、CD3ゼータ、CD28および4-1BBの細胞内成分を含む。

40

【0617】

いくつかの態様において、抗原受容体はマーカーをさらに含み、かつ/またはCARもしくは他の抗原受容体を発現する細胞は、受容体を発現させるための細胞の形質導入または操作を確認するために使用しうる細胞表面マーカーなどの代理マーカーをさらに含む。いくつかの局面において、マーカーは、CD34、NGFRまたは上皮成長因子受容体の全部または一部（例えば切断型）、例えばそのような細胞表面受容体の切断型（例えばtEGFR）を含む。いくつかの態様において、マーカーをコードする核酸は、リンカー配列、例えば切断可能なリンカー配列、例えばT2Aをコードするポリヌクレオチドに、機能的に連結される。例えば、マーカーおよび任意でリンカー配列は、公開された国際特許出願第2014031687号に開示のいずれかでありうる。例えばマーカーは、任意で、T2A切断可能リンカー配

50

列などのリンカー配列に連結される切断型EGFR (tEGFR) であることができる。

【0618】

切断型EGFR (例えばtEGFR) の例示的なポリペプチドは、SEQ ID NO:43もしくはSEQ ID NO:44に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:43もしくは16に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸配列を含む。例示的なT2Aリンカー配列は、SEQ ID NO:47もしくはSEQ ID NO:48に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:47もしくは48に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸配列を含む。

10

【0619】

いくつかの態様において、マーカーは、T細胞上に自然には見いだされないまたはT細胞の表面上に自然には見いだされない分子、例えば細胞表面タンパク質、またはその一部分である。いくつかの態様において、分子は非自己分子、例えば非自己タンパク質、すなわち細胞が養子移入されることになる宿主の免疫系によって「自己」と認識されないものである。

【0620】

いくつかの態様において、マーカーは、治療機能を果たさず、かつ/または遺伝子操作のためのマーカーとして、例えば成功裏に操作された細胞を選択するために使用される以外の効果をもたらさない。別の態様において、マーカーは、治療分子であるか、または他の形で何らかの望ましい効果を発揮する分子、例えばインビボで遭遇する細胞に対するリガンド、例えば養子移入されてリガンドと遭遇したときに細胞の応答を増強および/または減衰するための共刺激分子または免疫チェックポイント分子であってもよい。

20

【0621】

場合によっては、CARは第1世代のCAR、第2世代のCAR、および/または第3世代のCARである。いくつかの局面において、第1世代のCARは、抗原結合時にCD3-鎖誘発シグナルを単に提供するものであり、第2世代のCARは、こうしたシグナルおよび共刺激シグナルを提供し、これは例えば、CD28またはCD137などの共刺激受容体からの細胞内シグナル伝達ドメインを含むものであり、いくつかの局面において、第3世代のCARは、異なる共刺激受容体の複数の共刺激ドメインを含むものである。

30

【0622】

例えばいくつかの態様において、CARは、記載される、CD28の膜貫通部分またはその機能的バリエーションであるか、またはこれを含む膜貫通ドメイン、およびCD28のシグナル伝達部分を含む細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能的バリエーションおよびCD3ゼータのシグナル伝達部分またはその機能的なバリエーションのいずれかを含む抗原に特異的な、例えば抗体フラグメントなど、scFvといった抗体を含む。いくつかの態様において、CARは、記載される、4-1BBの膜貫通部分またはその機能的バリエーションであるか、またはこれを含む膜貫通ドメイン、およびCD28のシグナル伝達部分を含む細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能的バリエーションおよびCD3ゼータのシグナル伝達部分またはその機能的なバリエーションのいずれかを含む抗原に特異的な、例えば抗体フラグメントなど、scFvといった抗体を含む。いくつかのこうした態様において、受容体は、ヒトIg分子、例えばIgG4ヒンジなどの例えばIgヒンジ、ヒンジのみのスペーサなど、Ig分子の一部を含むスペーサをさらに含む。

40

【0623】

いくつかの態様において、例えばCARなどの組換え受容体の膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:95に示されるアミノ酸の配列またはSEQ ID NO:95に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸の配列を含む膜貫通ドメインなどの、ヒトCD28の膜貫通ドメイン (例えば、アクセッション番号P01747.1) またはそのバリエーションであるか、またはこれを含み、いくつかの態様において、組換え受容体の膜

50

貫通ドメイン含有部分は、SEQ ID NO:96に示されるアミノ酸の配列またはこれに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える、または少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸の配列を含む。

【0624】

いくつかの態様において、例えばCARなどの組換え受容体の細胞内シグナル伝達成分（複数可）は、例えば未変性CD28タンパク質の位置186～187にてLL→GG置換を有するドメインといった、ヒトCD28またはその機能的バリエーションまたはその部分の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインを含有する。例えば、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:97もしくはSEQ ID NO:98に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:97もしくは98に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様において、細胞内ドメインは、4-1BBの細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、アクセッション番号 Q07011.1）またはその機能的バリエーションもしくは部分、例えば、SEQ ID NO:99に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:99に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸の配列を含む。

【0625】

いくつかの態様において、例えばCARなどの組換え受容体の細胞内シグナル伝達ドメインは、例えば、ヒトCD3ζ（アクセッション番号P20963.2）のアイソフォーム3の112 AA細胞質ドメインまたは米国特許第7,446,190号または米国特許第8,911,993号記載のCD3ゼータドメインといった、ヒトCD3ゼータ刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的バリエーションを含む。例えば、いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:97もしくはSEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101もしくはSEQ ID NO:102に示されるようなアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:100、SEQ ID NO:101もしくはSEQ ID NO:102に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸配列を含みうる。

【0626】

いくつかの局面において、スペーサは、例えばIgG4またはIgG1のヒンジのみ、例えばSEQ ID NO:81に示されるヒンジのみのスペーサなど、IgGのヒンジ領域のみを含有する。別の態様において、スペーサは、例えばIgG4誘発ヒンジであり、任意でCH2および/またはCH3ドメインに連結するIgヒンジであるか、またはこれを含有する。いくつかの態様において、スペーサは、例えばIgG4ヒンジであり、SEQ ID NO:84に示されるようなCH2およびCH3ドメインに連結するIgヒンジである。いくつかの態様において、スペーサは、例えばIgG4ヒンジであり、SEQ ID NO:83に示されるようなCH3ドメインのみに連結するIgヒンジである。いくつかの態様において、スペーサはグリシン-セリンリッチ配列または公知のフレキシブルリンカーなどの別のフレキシブルリンカーであるか、またはこれを含む。

【0627】

例えばいくつかの態様において、CARは、抗体、例えばscFvを含む抗体フラグメントと、スペーサ、例えば免疫グロブリン分子の一部、例えばヒンジ領域および/または1つもしくは複数の重鎖分子の定常領域を含有するスペーサ、例えばIg-ヒンジ含有スペーサと、CD28由来の膜貫通ドメインの全部または一部を含有する膜貫通ドメインと、CD28由来の細胞内シグナル伝達ドメインと、CD3ζシグナル伝達ドメインとを含む。いくつかの態様において、CARは、抗体またはフラグメント、例えばscFvと、スペーサ、例えばIg-ヒンジ含有スペーサのいずれかと、CD28由来の膜貫通ドメインと、4-1BB由来の細胞内シグナル伝達ドメインと、CD3ゼータ由来のシグナル伝達ドメインとを含む。

【0628】

10

20

30

40

50

例示的な代理マーカーは、切断型の細胞表面ポリペプチド、例えば、非機能性であって、シグナルを伝達しないもしくは伝達する能力を有さないか、または完全長型の細胞表面ポリペプチドによって通常伝達されるシグナルを伝達しないもしくは伝達することができず、かつ/またはインターナライズしないもしくはインターナライズする能力を有さない切断型を含むことができる。例示的な切断型細胞表面ポリペプチドとして、切断型の成長因子受容体または他の受容体、例えば切断型ヒト上皮成長因子受容体2 (tHER2)、切断型上皮成長因子受容体 (tEGFR、例示的tEGFR配列をSEQ ID NO:43もしくはSEQ ID NO:44に示される) もしくは前立腺特異的膜抗原 (PSMA) またはそれらの改変型が挙げられる。tEGFRは、抗体セツキシマブ (Erbixux (登録商標)) または他の治療用抗EGFR抗体もしくは結合性分子によって認識されるエピトープを含有することができ、そのエピトープは、tEGFR構築物を使って操作された細胞およびコードされた外因性タンパク質を同定もしくは選択するために、かつ/またはコードされた外因性タンパク質を発現する細胞を排除もしくは分離するために、使用することができる。米国特許第8,802,374およびLiu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34 (4) :430-434を参照されたい。いくつかの局面において、マーカー、例えば代理マーカーは、CD34の全部もしくは一部 (例えば切断型)、NGFRの全部もしくは一部 (例えば切断型)、CD19もしくは切断型CD19、例えば切断型非ヒトCD19、または上皮成長因子受容体の全部もしくは一部 (例えば切断型) (例えばtEGFR) を含む。いくつかの態様において、マーカーは、蛍光タンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP)、高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、例えばsuper-fold GFP (sfGFP)、赤色蛍光タンパク質 (RFP)、例えばtdTomato、mCherry、mStrawberry、AsRed2、DsRedもしくはDsRed2、シアン蛍光タンパク質 (CFP)、青緑色蛍光タンパク質 (BFP)、高感度青色蛍光タンパク質 (EBFP) および黄色蛍光タンパク質 (YFP)、ならびにそれらのバリエーション、例えば蛍光タンパク質の、種バリエーション、単量体バリエーション、ならびにコドン最適化および/もしくは高感度バリエーションであるか、またはそれらを含む。いくつかの態様において、マーカーは、酵素、例えばルシフェラーゼ、大腸菌 (E. coli) 由来のlacZ遺伝子、アルカリホスファターゼ、分泌型胎盤アルカリホスファターゼ (SEAP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) であるか、またはそれらを含む。例示的な発光レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ (luc)、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -グルクロニダーゼ (GUS) またはそれらのバリエーションが挙げられる。

【0629】

いくつかの態様において、マーカーは耐性マーカーまたは選択マーカーである。いくつかの態様において、耐性マーカーまたは選択マーカーは、外因性作用物質または薬物に対する耐性を与えるポリペプチドであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、耐性マーカーまたは選択マーカーは抗生物質耐性遺伝子である。いくつかの態様において、耐性マーカーまたは選択マーカーは、哺乳動物細胞に抗生物質耐性を与える抗生物質耐性遺伝子である。いくつかの態様において、耐性マーカーまたは選択マーカーは、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジェネティシン耐性遺伝子もしくはゼオシン耐性遺伝子またはそれらの改変型であるか、またはそれらを含む。

【0630】

いくつかの態様において、マーカーをコードする核酸は、リンカー配列、例えば切断可能なリンカー配列、例えばT2Aをコードするポリヌクレオチドに、機能的に連結される。例えば、マーカーおよび任意でリンカー配列は、PCT公開番号第2014031687号に開示のいずれかでありうる。

【0631】

いくつかの態様において、そのようなCAR構築物をコードする核酸分子は、T2Aリボソームスキップエレメントをコードする配列および/またはtEGFR配列を、例えばCARをコードする配列の下流に、さらに含む。いくつかの態様において、配列は、SEQ ID NO:47もしくはSEQ ID NO:48に示されるT2AリボソームスキップエレメントまたはSEQ ID NO

10

20

30

40

50

:47もしくはSEQ ID NO:48に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸配列をコードする。

【0632】

いくつかの態様において、抗原受容体（例えばCAR）を発現するT細胞は、非免疫原性選択エピトープとして切断型EGFR（EGFRt）を（例えば2つのタンパク質を同じ構築物から発現させるためにT2Aリボソームスイッチによって分離されたCARとEGFRtとをコードする構築物の導入によって）発現するように生成させることもでき、その場合は、それを、そのような細胞を検出するためのマーカーとして使用することができる（例えば米国特許第8,802,374号を参照されたい）。いくつかの態様において、配列は、SEQ ID NO:43もしくはSEQ ID NO:44に示されるtEGFR配列、またはSEQ ID NO:43もしくはSEQ ID NO:44に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを超える配列同一性を呈するアミノ酸配列をコードする。場合によっては、T2Aなどのペプチドは、リボソームに2AエレメントのC末端でのペプチド結合の合成をスキップ（リボソームスキッピング）させることができ、2A配列の末端と下流にある次のペプチドとの間の分離をもたらす（例えばde Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13（2004）およびde Felipe et al. Traffic 5: 616-626（2004）を参照されたい）。多くの2Aエレメントが公知である。本明細書において開示される方法および核酸において使用することができる2A配列の例は、非限定的に、米国特許公報第20070116690号記載の、口蹄疫ウイルス（F2A、例えばSEQ ID NO: 45）、ウマ鼻炎Aウイルス（E2A、例えばSEQ ID NO:46）、トセア・アシグナ（Thosea asigna）ウイルス（T2A、例えばSEQ ID NO:47または48）、およびブタテッシュウウイルス-1（P2A、例えばSEQ ID NO:49または50）からの2A配列である。

【0633】

対象に投与された細胞によって発現される、CARなどの組換え受容体は、一般には、治療される疾患もしくは状態または治療されるその細胞において、発現され、それらと関連し、かつ/またはそれらに特異的な分子を、認識するか、または同分子と特異的に結合する。分子、例えば抗原に特異的に結合すると、受容体は一般に、ITAM伝達シグナルなどの免疫刺激シグナルを細胞内に送達し、それによって、疾患または状態を標的とする免疫応答を増進する。例えば、いくつかの態様において、細胞は、疾患もしくは状態の細胞もしくは組織または疾患もしくは状態と関連する細胞もしくは組織によって発現される抗原に特異的に結合するCARを発現する。

【0634】

2. キメラ自己抗体受容体(CAAR)

いくつかの態様において、組み換え受容体はキメラ自己抗体受容体(CAAR)である。いくつかの態様において、CAARは自己抗体と結合する、例えば特異的に結合するか、またはそれを認識する。いくつかの態様において、CAARを発現するように操作されたT細胞などの、CAARを発現する細胞は、正常な抗体発現細胞に結合するのではなく、自己抗体発現細胞に結合して、それを死滅させるために使用することができる。いくつかの態様において、CAAR発現細胞は、自己免疫疾患などの、自己抗原の発現に関連する自己免疫疾患を処置するために使用できる。いくつかの態様において、CAAR発現細胞は、最終的に自己抗体を産生して細胞表面に自己抗体を提示するB細胞を標的づけ、これらのB細胞を治療的介入のための疾患特異的標的としてマークすることができる。いくつかの態様において、CAAR発現細胞は、抗原特異的キメラ自己抗体受容体を使用して疾患原因のB細胞を標的づけることにより、自己免疫疾患における病原性B細胞を効率的に標的づけ、死滅させるために使用できる。いくつかの態様において、組み換え受容体は、米国特許出願公開第2017/0051035号に記載されるいずれかのような、CAARである。

【0635】

いくつかの態様において、CAARは、自己抗体結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および1つまたは複数の細胞内シグナル伝達領域またはドメイン(互換的に細胞質シグナル伝達ドメ

インまたは領域とも呼ばれる)を含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達領域は細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン、T細胞で一次活性化シグナルを刺激および/もしくは誘導することができるシグナル伝達ドメイン、T細胞受容体(TCR)構成成分のシグナル伝達ドメイン(例えば、CD3-ゼータ(CD3 ζ)鎖の細胞内シグナル伝達ドメインもしくは領域またはその機能的変異体もしくはシグナル伝達部分)、および/または免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を含むシグナル伝達ドメインであるか、またはそれを含む。

【0636】

いくつかの態様において、自己抗体結合ドメインは、自己抗原またはその断片を含む。自己抗原の選択は、標的とされる自己抗体のタイプに依存することができる。例えば、自己抗原は、それが特定の疾患状態、例えば、自己抗体媒介自己免疫疾患などの自己免疫疾患と関連する標的細胞上、例えば、B細胞上の自己抗体を認識するので、選択され得る。いくつかの態様において、自己免疫疾患には尋常性天疱瘡(pemphigus vulgaris: PV)が含まれる。例示的な自己抗原には、デスモグレイン1(Dsg1)およびDsg3が含まれる。

【0637】

3. T細胞受容体 (TCR)

いくつかの態様では、腫瘍、ウイルスまたは自己免疫タンパク質の抗原などの、標的ポリペプチドのペプチドエпитープまたはT細胞エпитープを認識するT細胞受容体 (TCR) またはその抗原結合部分を発現する、操作された細胞、例えばT細胞が提供される。

【0638】

いくつかの態様では、「T細胞受容体」または「TCR」は、可変 α 鎖および β 鎖(それぞれ、TCR α およびTCR β としても知られる)もしくは可変 γ 鎖および δ 鎖(それぞれ、TCR α およびTCR β としても知られる)、またはその抗原結合部分を含み、かつMHC分子に結合されたペプチドに特異的に結合することができる分子である。いくつかの態様では、TCRは $\alpha\beta$ 型である。典型的には、 $\alpha\beta$ 型および $\gamma\delta$ 型で存在するTCRは一般に構造的に類似しているが、それらを発現するT細胞は異なる解剖学的位置または機能をもつ可能性がある。TCRは細胞の表面上に、または可溶性の形態で存在し得る。一般に、TCRはT細胞(またはTリンパ球)の表面に見られ、そこでは一般的に主要組織適合性複合体(MHC)分子に結合した抗原の認識に関与している。

【0639】

特に明記しない限り、用語「TCR」は、完全なTCRだけでなく、その抗原結合部分または抗原結合断片を包含すると理解されるべきである。いくつかの態様では、TCRは、 $\alpha\beta$ 型または $\gamma\delta$ 型のTCRを含めて、インタクトまたは完全長のTCRである。いくつかの態様では、TCRは完全長のTCRに満たない抗原結合部分であるが、それは、MHC-ペプチド複合体に結合するなど、MHC分子に結合した特定のペプチドに結合する。いくつかの場合には、TCRの抗原結合部分または断片は、完全長またはインタクトのTCRの構造ドメインの一部のみを含んでいてよいが、完全なTCRが結合するMHC-ペプチド複合体などのペプチドエпитープに結合することができる。いくつかの場合には、抗原結合部分は、特定のMHC-ペプチド複合体に結合するための結合部位を形成するのに十分なTCRの可変ドメイン、例えば、TCRの可変 α 鎖および可変 β 鎖を含む。一般的に、TCRの可変鎖は、ペプチド、MHCおよび/またはMHC-ペプチド複合体の認識に関与する相補性決定領域を含む。

【0640】

いくつかの態様では、TCRの可変ドメインは超可変ループまたは相補性決定領域(CDR)を含み、これらは一般に、抗原認識ならびに結合能および結合特異性に対する主要な寄与因子である。いくつかの態様では、TCRの1つのCDRまたはその組み合わせは、所与のTCR分子の抗原結合部位の全てまたは実質的に全てを形成する。TCR鎖の可変領域内の様々なCDRは一般に、フレームワーク領域(FR)によって分離されており、このFRは通常、CDRと比較して、TCR分子間でより少ない可変性(変動性)を示す(例えば、Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988を参照されたい; また、Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003も参

10

20

30

40

50

照されたい)。いくつかの態様では、CDR3は、抗原結合または特異性に関与する主要なCDRであるか、または抗原認識にとって、および/またはペプチド-MHC複合体のプロセッシングされたペプチド部分との相互作用によって、所与のTCR可変領域の3つのCDRの中で最も重要である。ある状況下では、 α 鎖のCDR1は、特定の抗原ペプチドのN末端部分と相互作用することができる。ある状況下では、 β 鎖のCDR1は、該ペプチドのC末端部分と相互作用することができる。ある状況下では、CDR2は、MHC-ペプチド複合体のMHC部分との相互作用またはMHC部分の認識に最も強く寄与するか、またはそれに関与する主要なCDRである。いくつかの態様では、 β 鎖の可変領域は、さらなる超可変領域(CDR4またはHVR4)を含むことができ、これは一般に、スーパー抗原の結合に関与し、抗原認識には関与しない(Kotb (1995) *Clinical Microbiology Reviews*, 8:411-426)。

10

【0641】

いくつかの態様では、TCRはまた、定常ドメイン、膜貫通ドメイン、および/または短い細胞質テイルを含むことができる(例えば、Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997を参照されたい)。いくつかの局面では、TCRの各鎖は、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、およびC末端の短い細胞質テイルを保有することができる。いくつかの態様では、TCRは、シグナル伝達を媒介するのに関与するCD3複合体の不変タンパク質と会合する。

【0642】

いくつかの態様では、TCR鎖は1つまたは複数の定常ドメインを含む。例えば、所与のTCR鎖(例えば、 α 鎖または β 鎖)の細胞外部分は、2つの免疫グロブリン様ドメイン、例えば、可変ドメイン(例えば、 $V\alpha$ または $V\beta$; 典型的にはKabatナンバリング(Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)に基づいてアミノ酸1-116)、および細胞膜に隣接する定常ドメイン(例えば、 α 鎖定常ドメインつまり $C\alpha$ 、典型的にはKabatナンバリングに基づいて117-259位、または β 鎖定常ドメインつまり $C\beta$ 、典型的にはKabatナンバリングに基づいて117-295位)を含むことができる。例えば、場合により、2本の鎖によって形成されるTCRの細胞外部分は、2つの膜近位定常ドメインと、2つの膜遠位可変ドメインを含み、その可変ドメインにはそれぞれCDRが含まれる。TCRの定常ドメインは短い接続配列を含んでもよく、その場合には、システイン残基がジスルフィド結合を形成し、それによってTCRの2本の鎖を連結する。いくつかの態様では、TCRは、 α 鎖と β 鎖のそれぞれに追加のシステイン残基をもつことができ、その結果、TCRは定常ドメインに2つのジスルフィド結合を含むようになる。

20

30

【0643】

いくつかの態様では、TCR鎖は膜貫通ドメインを含む。いくつかの態様では、膜貫通ドメインは正に帯電している。いくつかの場合には、TCR鎖は細胞質テイルを含む。場合によっては、この構造は、TCRを、CD3およびそのサブユニットなどの他の分子と会合させることができる。例えば、膜貫通領域と共に定常ドメインを含むTCRは、該タンパク質を細胞膜に固定して、CD3シグナル伝達装置または複合体の不変サブユニットと会合し得る。CD3シグナル伝達サブユニット(例えば、 $CD3\gamma$ 、 $CD3\delta$ 、 $CD3\epsilon$ 、および $CD3\zeta$ 鎖)の細胞内テイルは、TCR複合体のシグナル伝達能力に関与する1つまたは複数の免疫受容活性化チロシンモチーフつまりITAMを含む。

40

【0644】

いくつかの態様において、TCRは、2つの鎖 α および β (もしくは任意で γ および δ)のヘテロ二量体の場合があるか、または一本鎖TCR構築物の場合がある。いくつかの態様において、TCRは、1つまたは複数のジスルフィド結合などにより連結された、2つの別々の鎖(α および β 鎖または γ および δ 鎖)を含むヘテロ二量体である。

【0645】

いくつかの態様において、TCRは、実質的に完全長コード配列が容易に入手可能な $V\alpha$

50

、 β 鎖の配列などの公知のTCR配列から作製することができる。細胞起源からV鎖配列を含む完全長TCR配列を得るための方法は、周知である。いくつかの態様において、TCRをコードする核酸は、様々な起源から、例えば、1つもしくは複数の所与の細胞内の、もしくは該細胞から単離された、TCRをコードする核酸のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、または公的に入手可能なTCR DNA配列の合成により、得ることができる。

【0646】

いくつかの態様において、TCRは、生物学的供給源から、例えば細胞から、例えばT細胞(例えば細胞傷害性T細胞)、T細胞ハイブリドーマ、または他の公表されている供給源から得られる。いくつかの態様において、T細胞はインビボで単離された細胞から得ることができる。いくつかの態様において、TCRは、胸腺で選択されたTCRである。いくつかの態様において、TCRはネオエピトープ拘束性TCRである。いくつかの態様において、T細胞は、培養したT細胞ハイブリドーマまたはクローンであることができる。いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合部分もしくはその抗原結合フラグメントは、TCRの配列の知識から合成的に作製することができる。

【0647】

いくつかの態様において、TCRは、標的ポリペプチド抗原またはその標的T細胞エピトープに対する候補TCRのライブラリーのスクリーニングから同定または選択されたTCRから作製される。TCRライブラリーは、PBMC、脾臓または他のリンパ器官に存在する細胞を含む、対象から単離されたT細胞からのV α およびV β のレパートリーの増幅によって作製することができる。場合によっては、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)からT細胞を増幅することができる。いくつかの態様において、TCRライブラリーは、CD4+またはCD8+ T細胞から作製することができる。いくつかの態様において、TCRは、正常または健常な対象のT細胞源、すなわち正常TCRライブラリーから増幅することができる。いくつかの態様において、TCRは、罹患した対象のT細胞源、すなわち罹患TCRライブラリーから増幅することができる。いくつかの態様において、縮重プライマーは、ヒトから得られたT細胞などのサンプルにおけるRT-PCRなどによって、V α およびV β の遺伝子レパートリーを増幅するために使用される。いくつかの態様において、scTvライブラリーは、ナイーブV α およびV β ライブラリーから組み立てることができ、その際、増幅産物がリンカーによって分離されるようにクローン化されるか、または組み立てられる。対象および細胞の供給源に応じて、該ライブラリーはHLAアレル特異的であることができる。あるいは、いくつかの態様において、TCRライブラリーは、親または足場TCR分子の変異誘発または多様化によって作製することができる。いくつかの局面では、TCRは、例えば α 鎖または β 鎖の、変異誘発などによる定方向進化に供される。いくつかの局面では、TCRのCDR内の特定の残基が変更される。いくつかの態様において、選択されたTCRは、親和性成熟によって改変することができる。いくつかの態様において、ペプチドに対するCTL活性を評価するためのスクリーニングなどによって、抗原特異的T細胞が選択される場合がある。いくつかの局面では、TCR、例えば抗原特異的T細胞上に存在するTCRは、結合活性などによって、例えば、抗原に対する特定の親和性または結合力によって、選択される場合がある。

【0648】

いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合部分は、改変または操作されたものである。いくつかの態様において、変更された特性を有するTCR、例えば、特定のMHC-ペプチド複合体に対する親和性がより高いTCRを作製するために、定方向進化法が用いられる。いくつかの態様において、定方向進化は、以下を含むがそれに限定されるわけではないディスプレイ法によって達成される: 酵母ディスプレイ(Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92)、ファージディスプレイ(Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54)、またはT細胞ディスプレイ(Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84)。いくつかの態様において、ディスプレイアプローチは、公知の親または基準TCRを操作または改変することを含む。例えば、いくつかの場合には、野生型TCRが、CDRの1個または複数の残基を変異させた変異誘発TCRを産生するためのテンプレートとして使用することがで

き、所望の標的抗原に対するより高い親和性などの、望ましい変更特性を備える変異体が選択される。

【0649】

いくつかの態様において、関心対象のTCRの産生または作製に使用するための標的ポリペプチドのペプチドは、公知であるか、または容易に同定することができる。いくつかの態様において、TCRまたは抗原結合部分の作製に使用するために適したペプチドは、関心対象の標的ポリペプチド、例えば、下記の標的ポリペプチドにおけるHLA拘束性モチーフの存在に基づき決定することができる。いくつかの態様において、ペプチドは、利用可能なコンピュータ予測モデルを用いて同定される。いくつかの態様において、MHCクラスI結合部位を予測するために、そのようなモデルは、ProPred1(Singh and Raghava (2001) Bioinformatics 17(12):1236-1237、およびSYFPEITHIを含むが、それに限定されるわけではない(Schuler et al. (2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409(1): 75-93 2007を参照されたい)。いくつかの態様において、MHC拘束性エピトープは、HLA-A0201であり、これは、白人全体の約39~46%に発現され、したがって、TCRまたは他のMHC-ペプチド結合分子の調製に使用するために選ばれてふさわしいMHC抗原を意味する。

10

【0650】

コンピュータ予測モデルを用いた、HLA-A0201結合モチーフまたはプロテアソームおよび免疫プロテアソーム向けの切断部位は、公知である。MHCクラスI結合部位を予測するため、こうしたモデルはProPred1 (Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17 (12) :1236-1237 2001により詳細に記載される) およびSYFPEITHI (Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409 (1) :75-93 2007を参照されたい) を含むが、これに限定されない。

20

【0651】

いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合部分は、組換え生産天然タンパク質であるか、結合特性など、1つまたは複数の性質が変性されたその変異形態であってよい。いくつかの態様において、TCRは、ヒト、マウス、ラットまたは別の哺乳動物など、種々の動物種のうち1つを由来としてよい。TCRは、細胞結合型または可溶型であってよい。いくつかの態様において、提供された方法の目的のために、TCRは細胞の表面上に発現された細胞結合型である。

30

【0652】

いくつかの態様において、TCRは全長鎖TCRである。いくつかの態様において、TCRは抗原結合部分である。いくつかの態様において、TCRは二量体TCR (dTTCR) である。いくつかの態様において、TCRは一本鎖TCR (sc-TCR) である。いくつかの態様において、dTTCRまたはscTCRは、国際公開公報第03/020763号、同第04/033685号、同第2011/044186号記載の構造を有する。

【0653】

いくつかの態様において、TCRは膜貫通配列に対応する配列を含有する。いくつかの態様において、TCRは細胞質配列に対応する配列を含有する。いくつかの態様において、TCRは、CD3を用いたTCR複合体を形成する能力を有する。いくつかの態様において、dTTCRまたはscTCRを含むTCRのいずれかは、T細胞の表面上で活性TCRを得るシグナル伝達ドメインに連結されうる。いくつかの態様において、TCRは細胞の表面上に発現される。

40

【0654】

いくつかの態様において、dTTCRは、TCR α 鎖可変領域配列がTCR α 鎖定常領域細胞外配列に対応する配列のN末端に融合される第1ポリペプチド、TCR β 鎖可変領域配列がTCR β 鎖定常領域細胞外配列に対応する配列のN末端に融合される第2ポリペプチドを含有し、第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドは、ジスルフィド結合によって連結される。いくつかの態様において、このジスルフィド結合は、未変性二量体 $\alpha\beta$ TCRに存在する未変性鎖間ジスルフィド結合に対応することができる。いくつかの態様において、鎖間ジスルフ

50

イド結合は未変性TCR内には存在しない。例えば、いくつかの態様において、1つまたは複数のシステインはdTCRポリペプチド対の定常領域細胞外配列へと導入されうる。場合によっては、未変性ジスルフィド結合および非未変性ジスルフィド結合が望ましいことがある。いくつかの態様において、TCRは膜に固定する膜貫通配列を含有する。

【0655】

いくつかの態様において、dTCRは可変 α ドメインを含有するTCR α 鎖、定常 α ドメインおよび定常 α ドメインのC末端に付着された第1二量体化モチーフ、および可変 β ドメインを含むTCR β 鎖、定常 β ドメインおよび定常 β ドメインのC末端に付着された第1二量体化モチーフを含有し、第1二量体化モチーフおよび第2二量体化モチーフは容易に相互作用し、第1二量体化モチーフにおけるアミノ酸と、第2二量体化モチーフにおけるアミノ酸との間で、TCR α 鎖およびTCR β 鎖が共に結合する共有結合を形成する。

10

【0656】

いくつかの態様において、TCRはscTCRである。通常、scTCRは公知の方法を用いて生成されうる。例えば、Soo Hoo, W.F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wulfiging, C. and Pluckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); 国際公開されたPCT番号WO96/13593号、同WO96/18105号、同WO99/60120号、同WO99/18129号、同WO03/020763号、同2011/044186号およびSchlueter, C.J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)を参照されたい。いくつかの態様において、scTCRは、TCR鎖の会合を増進するため、導入された非未変性ジスルフィド鎖間結合を含有する（例えば、国際公開されたPCT番号WO03/020763号を参照されたい）。いくつかの態様において、scTCRは、そのC末端に融合された異種ロイシンジッパーが鎖の会合を増進する、非ジスルフィド結合で連結された切断型TCRである（例えば、国際公開されたPCT番号WO99/60120号を参照されたい）。いくつかの態様において、scTCRは、ペプチドリンカーを介してTCR β 可変ドメインに共有結合されたTCR α 可変ドメインを含有する（例えば、国際公開されたPCT番号WO99/18129号を参照されたい）。

20

【0657】

いくつかの態様において、scTCRは、TCR α 鎖可変領域に対応するアミノ酸配列によって構成される第1セグメント、TCR β 鎖定常ドメイン細胞外配列に対応するアミノ酸配列のN末端に融合されたTCR β 鎖可変領域配列に対応するアミノ酸配列によって構成される第2セグメント、および第1セグメントのC末端を第2セグメントのN末端に連結するリンカー配列を含む。

30

【0658】

いくつかの態様において、scTCRは、 α 鎖細胞外定常ドメイン配列のN末端に融合された α 鎖可変領域配列によって構成される第1セグメント、ならびに β 鎖細胞外定常配列および膜貫通配列のN末端に融合された β 鎖可変領域配列によって構成される第2セグメント、ならびに任意で、第1セグメントのC末端を第2セグメントのN末端に連結するリンカー配列を含む。

【0659】

いくつかの態様において、scTCRは、 β 鎖細胞外定常ドメイン配列のN末端に融合されたTCR β 鎖可変領域配列によって構成される第1セグメント、ならびに α 鎖細胞外定常配列および膜貫通配列のN末端に融合された α 鎖可変領域配列によって構成される第2セグメント、ならびに任意で、第1セグメントのC末端を第2セグメントのN末端に連結するリンカー配列を含む。

40

【0660】

いくつかの態様において、第1および第2TCRセグメントを連結するscTCRのリンカーは、TCR結合特異性を保持しながら、単一のポリペプチド鎖を形成することができる任意のリンカーであることができる。いくつかの態様において、リンカー配列は、例えば、式-P-AA-P-を有する場合があります。ここで、Pはプロリンであり、AAは、アミノ酸がグリシンとセリンであるアミノ酸配列を表す。いくつかの態様において、第1および第2セグメントは、その可変領域配列がそのような結合のために配向されるように対合される。それゆえ、

50

いくつかの場合には、リンカーは、第1セグメントのC末端と第2セグメントのN末端との間、またはその逆の間の距離にまたがるのに十分な長さがあるが、標的リガンドへのscTCRの結合をブロックまたは低減させるほど長すぎない。いくつかの態様において、リンカーは、10～45アミノ酸または約10～約45アミノ酸、例えば10～30アミノ酸または26～41アミノ酸残基、例えば29、30、31または32アミノ酸を含むことができる。いくつかの態様において、リンカーは、式-PGGG-(SGGGG)₅-P-(SEQ ID NO:38)を有し、ここで、Pはプロリン、Gはグリシン、Sはセリンである。いくつかの態様において、リンカーは、配列
GSADDAKKDAAKKDGKS (SEQ ID NO:39)

を有する。

【0661】

いくつかの態様において、scTCRは、α鎖の定常ドメインの免疫グロブリン領域の残基を、β鎖の定常ドメインの免疫グロブリン領域の残基に連結する、共有ジスルフィド結合を含む。いくつかの態様において、ネイティブなTCR中の鎖間ジスルフィド結合は存在しない。例えば、いくつかの態様において、1つまたは複数のシステインは、scTCRポリペプチドの第1および第2セグメントの定常領域細胞外配列に組み込むことができる。場合によっては、ネイティブなジスルフィド結合および非ネイティブなジスルフィド結合の両方が望ましい場合がある。

【0662】

導入された鎖間ジスルフィド結合を含有するdTCRまたはscTCRのいくつかの態様において、未変性ジスルフィド結合は存在しない。いくつかの態様において、未変性鎖間ジスルフィド結合を形成する1つまたは複数の未変性システインは、例えばセリンまたはアラニンなど、別の残基に置換される。いくつかの態様において、導入されたジスルフィド結合は、第1セグメントおよび第2セグメント上の非システイン残基をシステインに変異させることで形成されうる。例示的なTCRの非未変性ジスルフィド結合は、公開された国際PCT番号WO2006/000830号に記載される。

【0663】

いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合フラグメントは、 10^{-5} または約 10^{-5} から 10^{-12} Mまたは約 10^{-12} Mであり、その中の個々の値および範囲である標的抗原に対する平衡結合定数を有するアフィニティーを呈する。いくつかの態様において、標的抗原はMHCペプチド複合体またはリガンドである。

【0664】

いくつかの態様において、核酸または例えばα鎖およびβ鎖といったTCRをコードする核酸は、PCR、クローニングまたは別の好適な手段によって増幅され、好適な1つまたは複数の発現ベクターへとクローン化されうる。発現ベクターは任意の好適な組換え発現ベクターであることができ、任意の好適な宿主を形質転換またはトランスフェクトするために使用されうる。好適なベクターは、例えばプラスミドおよびウイルスなど、増殖および拡大培養のため、または発現のため、またはその両方のために設計されたものを含む。

【0665】

いくつかの態様において、ベクターは、pUC系列 (Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列 (Stratagene, LaJolla, Calif.)、pET系列 (Novagen, Madison, Wis.)、pGEX系列 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) またはpEX系列 (Clontech, Palo Alto, Calif.) のベクターでありうる。場合によっては、λG10、λGT11、λZap II (Stratagene)、λEMBL4およびλNM1149などのバクテリオファージベクターも使用することができる。いくつかの態様において、植物発現ベクターが使用されることができ、pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121およびpBIN19 (Clontech) を含む。いくつかの態様において、動物発現ベクターは、pEUK-Cl、pMAMおよびpMAMneo (Clontech) を含む。いくつかの態様において、例えばレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターが使用される。

【0666】

いくつかの態様において、組換え発現ベクターは標準的な組換えDNA技法を用いて調製されうる。いくつかの態様において、ベクターは、必要に応じて、またそのベクターがDNAベースであるかRNAベースであるかを考慮して、そのベクターを導入する宿主（例：細菌、真菌、植物または動物）のタイプに特異的な制御配列、例えば転写および翻訳開始ならびに終止コドンを含む。いくつかの態様において、ベクターはTCRをコードするヌクレオチド配列または抗原結合部分（または別のMHCペプチド結合分子）に任意で連結される未変性プロモータを含む。いくつかの態様において、プロモータは、例えばサイトメガロウイルス（CMV）プロモータ、SV40プロモータ、RSVプロモータ、およびマウス幹細胞ウイルスの長い末端反復に見られるプロモータなど、非ウイルスプロモータまたはウイルスプロモータでありうる。別の公知のプロモータもまた企図される。

10

【0667】

いくつかの態様において、TCRをコードするベクターを生成するために、 α 鎖および β 鎖は、関心対象のTCRを発現するT細胞クローンから単離された総cDNAからPCR増幅され、発現ベクターへとクローン化される。いくつかの態様において、 α 鎖および β 鎖は同じベクターへとクローン化される。いくつかの態様において、 α 鎖および β 鎖は異なるベクターへとクローン化される。いくつかの態様において、生成された α 鎖および β 鎖は、例えばレンチウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターへと導入される。

【0668】

B. 遺伝子操作のための核酸、ベクターおよび方法

いくつかの態様において、細胞、例えば、T細胞は、組み換え受容体を発現するように遺伝子操作される。いくつかの態様において、操作は、組み換え受容体またはその部分もしくは構成成分をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを導入することによって行われる。組み換え受容体をコードするポリヌクレオチド、ならびにそのような核酸および/またはポリヌクレオチドを含むベクターまたは構築物もまた提供される。

20

【0669】

いくつかの態様において、組み換え受容体をコードするポリヌクレオチドは、組み換え受容体の発現を制御するように機能的に連結された少なくとも1つのプロモータを含む。いくつかの例では、該ポリヌクレオチドは、組み換え受容体の発現を制御するように機能的に連結された2つ、3つ、またはそれ以上のプロモータを含む。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、必要に応じて、および該ポリヌクレオチドがDNAベースかRNAベースかを考慮して、ポリヌクレオチドが導入されることになる宿主（例えば、細菌、真菌、植物または動物）のタイプに特異的な調節配列、例えば転写および翻訳の開始および終止コドンを含むことができる。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、プロモータ、エンハンサー、イントロン、ポリアデニル化シグナル、Kozakコンセンサス配列、配列内リボソーム進入部位(IRES)、2A配列、およびスプライスアクセプターまたはドナーなどの調節/制御エレメントを含むことができる。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、組み換え受容体および/または1つもしくは複数の付加的なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能的に連結される非ネイティブなプロモータを含むことができる。いくつかの態様において、プロモータは、RNA pol I、pol IIまたはpol IIIプロモータの中より選択される。いくつかの態様において、プロモータは、RNAポリメラーゼII（例えば、CMV、SV40初期領域またはアデノウイルス主後期プロモータ）によって認識される。別の態様において、プロモータは、RNAポリメラーゼIII（例えば、U6またはH1プロモータ）によって認識される。いくつかの態様において、プロモータは、非ウイルスプロモータまたはウイルスプロモータ、例えばサイトメガロウイルス(CMV)プロモータ、SV40プロモータ、RSVプロモータ、およびマウス幹細胞ウイルスの長末端反復に見られるプロモータであることができる。その他の公知のプロモータも考えられる。

30

40

【0670】

いくつかの態様において、プロモータは、構成的プロモータであるか、またはそれを含む。例示的な構成的プロモータは、例えば、シミアンウイルス40初期プロモータ(SV40)

50

、サイトメガロウイルス前初期プロモータ(CMV)、ヒトユビキチンCプロモータ(UBC)、ヒト伸長因子1 α プロモータ(EF1 α)、マウスホスホグリセリン酸キナーゼ1プロモータ(PGK)、およびCMV初期エンハンサー結合型ニワトリ β -アクチンプロモータ(CAGG)を含む。いくつかの態様において、構成的プロモータは、合成または改変されたプロモータである。いくつかの態様において、プロモータは、MNDプロモータ、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサーを有する改変されたMoMuLV LTRのU3領域を含む合成プロモータであるか、またはそれを含む(Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755を参照されたい)。いくつかの態様において、プロモータは、組織特異的プロモータである。別の態様において、プロモータはウイルスプロモータである。別の態様において、プロモータは非ウイルスプロモータである。いくつかの態様において、例示的なプロモータは、ヒト伸長因子1アルファ(EF1 α)プロモータもしくはその改変された形態またはMNDプロモータを含むことができるが、それに限定されるわけではない。

【0671】

別の態様において、プロモータは、調節されたプロモータ(例えば、誘導性プロモータ)である。いくつかの態様において、プロモータは、誘導性プロモータまたは抑制性(repressible)プロモータである。いくつかの態様において、プロモータは、Lacオペレーター配列、テトラサイクリンオペレーター配列、ガラクトースオペレーター配列もしくはドキシサイクリンオペレーター配列を含むか、またはその類似体であるか、またはLacリプレッサーもしくはテトラサイクリンリプレッサー、もしくはその類似体によって結合もしくは認識されることができる。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、調節エレメント、例えばプロモータを含まない。

【0672】

いくつかの場合には、組み換え受容体をコードする核酸配列は、シグナルペプチドをコードするシグナル配列を含む。ある局面では、シグナル配列は、ネイティブなポリペプチドに由来するシグナルペプチドをコードし得る。他の局面では、シグナル配列は、異種または非ネイティブなシグナルペプチドを、例えば、SEQ ID NO:41に示されるヌクレオチド配列によってコードされる、SEQ ID NO:40に示されるGMCSFRアルファ鎖の例示的なシグナルペプチドをコードし得る。場合によっては、組み換え受容体、例えばキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列は、シグナルペプチドをコードするシグナル配列を含む。それに限定されるわけではない例示的なシグナルペプチドとして、例えば、SEQ ID NO:40に示されるヌクレオチド配列によってコードされる、SEQ ID NO:40に示されるGMCSFRアルファ鎖シグナルペプチド、またはSEQ ID NO:42に示されるCD8アルファシグナルペプチドが挙げられる。

【0673】

いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、1つまたは複数の付加的なポリペプチド、例えば、1つもしくは複数のマーカーおよび/または1つもしくは複数のエフェクター分子をコードする核酸配列を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数のマーカーは、形質導入マーカー、代理マーカーおよび/または耐性マーカーもしくは選択マーカーを含む。例えば、1つまたは複数の付加的なポリペプチドをコードする、導入された付加的な核酸配列の中には、移植された細胞の生存率および/または機能を促進することなどによって治療の有効性を改善することができる核酸配列; 例えば、インビボでの生存率または局在を評価するための、細胞の選択および/または評価のための遺伝的マーカーを提供する核酸配列; 例えば、Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); および Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)に記載されているような、インビボで細胞を陰性選択に感受性にすることによって安全性を改善する核酸配列が含まれる; 優性陽性選択マーカーと陰性選択マーカーとの融合に由来する二機能性選択融合遺伝子の使用について記載しているWO1992008796およびWO1994028143、ならびに米国特許第6,040,177号も参照されたい。

【0674】

いくつかの態様において、マーカーは形質導入マーカーまたは代理マーカーである。形

10

20

30

40

50

質導入マーカーまたは代理マーカーは、ポリヌクレオチド、例えば組み換え受容体をコードするポリヌクレオチドが導入された細胞を検出するために使用することができる。いくつかの態様において、形質導入マーカーは、細胞の改変を示すかまたは確認することができる。いくつかの態様において、代理マーカーは、細胞表面上に組み換え受容体、例えばCAR、と共発現するようにされたタンパク質である。特定の態様において、そのような代理マーカーは、活性をほとんどまたはまったく持たないように修飾された表面タンパク質である。ある特定の態様において、代理マーカーは、組み換え受容体をコードする同じポリヌクレオチド上にコードされる。いくつかの態様において、組み換え受容体をコードする核酸配列は、任意で、内部リボソーム進入部位(IRES)によって、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチド、例えば2A配列、をコードする核酸によって分離された、マーカーをコードする核酸配列に機能的に連結される。外来性マーカー遺伝子を、いくつかの場合には操作された細胞に関連して利用して、細胞の検出または選択を可能にし、場合によっては細胞除去および/または細胞自殺も促進する場合がある。

【0675】

例示的な代理マーカーは、細胞表面ポリペプチドのトランケート形態を含むことができ、例えば、該トランケート形態は、非機能的であり、シグナルもしくは細胞表面ポリペプチドの完全長形態によって通常は伝達されるシグナルを伝達しないか、伝達できず、かつ/または内部移行しないか、内部移行できない。例示的なトランケート型細胞表面ポリペプチドには、成長因子または他の受容体のトランケート形態、例えば、トランケート型ヒト上皮成長因子受容体2(tHER2)、トランケート型上皮成長因子受容体(tEGFR、SEQ ID NO: 43もしくは44に示される例示的なtEGFR配列)、または前立腺特異的膜抗原(PSMA)もしくはその改変形態、例えばトランケート型PSMA(tPSMA)が含まれる。いくつかの局面では、tEGFRは、抗体セツキシマブ(Erbitux(登録商標))または他の治療用抗EGFR抗体もしくは結合分子によって認識されるエピトープを含む場合があり、これらの抗体または分子を、tEGFR構築物およびコードされる外因性タンパク質で操作された細胞を同定もしくは選択するために、かつ/またはコードされる外因性タンパク質を発現する細胞を排除もしくは分離するために使用することができる。米国特許第8,802,374号およびLiu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434を参照されたい。いくつかの局面では、マーカー、例えば、代理マーカーには、全部または一部(例えば、トランケート形態)のCD34、NGFR、CD19もしくはトランケート型CD19、例えばトランケート型非ヒトCD19が含まれる。トランケート型EGFR(例えばtEGFR)についての例示的なポリペプチドは、SEQ ID NO: 43もしくは44に示されるアミノ酸配列またはSEQ ID NO: 43もしくは44に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0676】

いくつかの態様において、マーカーは、検出可能なタンパク質、例えば蛍光タンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)、強化緑色蛍光タンパク質(EGFP)、例えばスーパーフォールドGFP(sfGFP)、赤色蛍光タンパク質(RFP)、例えばtdTomato、mCherry、mStrawberry、AsRed2、DsRedまたはDsRed2、シアン色蛍光タンパク質(CFP)、青緑色蛍光タンパク質(BFP)、強化青色蛍光タンパク質(EBFP)、および黄色蛍光タンパク質(YFP)、ならびにそれらの変異体、例えば、蛍光タンパク質の種変異体、単量体変異体、コドン最適化、安定化および/または強化変異体などであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、マーカーは、酵素、例えばルシフェラーゼ、大腸菌(E. coli)由来のlacZ遺伝子、アルカリホスファターゼ、分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)であるか、またはそれを含む。例示的な発光レポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ(luc)、β-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、β-グルクロニダーゼ(GUS)またはそれらの変異体が含まれる。いくつかの局面では、酵素の発現は、酵素の発現および機能的活性の際に

検出することができる基質の添加によって検出することができる。

【0677】

いくつかの態様において、マーカーは耐性マーカーまたは選択マーカーである。いくつかの態様において、耐性マーカーまたは選択マーカーは、外因性の薬剤または薬物に対する耐性を付与するポリペプチドであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、耐性マーカーまたは選択マーカーは抗生物質耐性遺伝子である。いくつかの態様において、耐性マーカーまたは選択マーカーは、哺乳動物細胞に抗生物質耐性を付与する抗生物質耐性遺伝子である。いくつかの態様において、耐性マーカーまたは選択マーカーは、ピューロマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、プラスチジン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジェネティシン耐性遺伝子、もしくはゼオシン耐性遺伝子、またはその改変形態であるか、またはそれを含む。

10

【0678】

本明細書に記載の組み換え受容体および/または付加的なポリペプチドはいずれも、組み換え受容体をコードする1つまたは複数の核酸配列を任意の組み合わせ、配向または配置で含む1つまたは複数のポリヌクレオチドによってコードされることができる。例えば、1、2、3またはそれ以上のポリヌクレオチドが、1、2、3またはそれ以上の異なるポリペプチド、例えば組み換え受容体もしくはその部分もしくは構成成分、および/または1つもしくは複数の付加的なポリペプチド、例えばマーカーおよび/もしくはエフェクター分子をコードすることができる。いくつかの態様において、1つのポリヌクレオチドは、組み換え受容体、例えばCAR、またはその部分もしくは構成成分をコードする核酸配列、および1つまたは複数の付加的なポリペプチドをコードする核酸配列を含む別のベクターまたは構築物を含む。いくつかの態様において、組み換え受容体をコードする核酸配列および1つまたは複数の付加的なポリペプチドをコードする核酸配列は、2つの異なるプロモータに機能的に連結される。いくつかの態様において、組み換え受容体をコードする核酸は、1つまたは複数の付加的なポリペプチドをコードする核酸の上流に存在する。いくつかの態様において、組み換え受容体をコードする核酸は、1つまたは複数の付加的なポリペプチドをコードする核酸の下流に存在する。

20

【0679】

特定の場合において、1つのポリヌクレオチドは、2つ以上の異なるポリペプチド鎖、例えば、組み換え受容体および1つまたは複数の付加的なポリペプチド、例えば、マーカーおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸配列を含む。いくつかの態様において、2つ以上の異なるポリペプチド鎖を、例えば、組み換え受容体および1つまたは複数の付加的なポリペプチドを、コードする核酸配列は、2つの別々のポリヌクレオチドに存在する。例えば、2つの別々のポリヌクレオチドが提供され、各々を、細胞における発現のために細胞内に個別に移入または導入することができる。いくつかの態様において、マーカーをコードする核酸配列および組み換え受容体をコードする核酸配列は、細胞のゲノム内の異なる位置に存在するか、またはその位置に挿入される。いくつかの態様において、マーカーをコードする核酸配列および組み換え受容体をコードする核酸配列は、2つの異なるプロモータに機能的に連結される。

30

40

【0680】

ポリヌクレオチドが第1および第2核酸配列を含む態様などのいくつかの態様において、異なるポリペプチド鎖の各々をコードするコード配列は、同じまたは異なることができるプロモータに機能的に連結することができる。いくつかの態様において、核酸分子は、2つ以上の異なるポリペプチド鎖の発現を駆動するプロモータを含むことができる。いくつかの態様において、そのような核酸分子はマルチシストロニック(バイシストロニックまたはトリシストロニック; 例えば、米国特許第6,060,273号を参照)であることができる。いくつかの態様において、組み換え受容体をコードする核酸配列および1つまたは複数の付加的なポリペプチドをコードする核酸配列は、同じプロモータに機能的に連結され、任意

50

で、内部リボソーム進入部位(IRES)によって、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチド、例えば2Aエレメントをコードする核酸によって分離される。例えば、例示的なマーカー、および任意でリボソームスキッピング配列は、PCT公報番号WO2014031687に開示されるいずれかであることができる。

【0681】

いくつかの態様において、転写ユニットは、IRESを含むバイシストロニックなユニットとして操作することができ、IRESは、単一のプロモータからのメッセージによる遺伝子産物(例えば、組み換え受容体および付加的なポリペプチドをコードする)の共発現を可能にする。あるいは場合によっては、単一のオープンリーディングフレーム(ORF)に、自己切断ペプチド(例えば、2A配列)またはプロテアーゼ認識部位(例えば、フューリン)をコードする配列によって互いに分離された2個または3個の遺伝子(例えば、マーカーをコードする、および組み換え受容体をコードする)を含むRNAの発現を、単一のプロモータが指令する場合がある。したがって、該ORFは、翻訳中(2Aの場合)または翻訳後に、個々のタンパク質にプロセッシングされる、単一のポリペプチドをコードする。場合によっては、T2Aなどのペプチドは、2AエレメントのC末端でのペプチド結合の合成をリボソームにスキップさせることができ(リボソームスキッピング)、これは2A配列の該末端と下流の次のペプチドの間の分離につながる(例えば、de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004)およびde Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)を参照されたい)。様々な2Aエレメントが知られている。本明細書に開示される方法およびシステムで使用する2A配列の例は、非限定的に、米国特許出願公開第20070116690号に記載されるような、口蹄疫ウイルス(F2A、例えばSEQ ID NO: 45)、ウマ鼻炎ウイルスA(E2A、例えばSEQ ID NO: 46)、ゾセア アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(T2A、例えばSEQ ID NO: 47または48)、およびブタテッシュウウイルス-1(P2A、例えばSEQ ID NO: 49または50)由来の2A配列である。

【0682】

いくつかの態様において、組み換え受容体をコードするポリヌクレオチドおよび/または付加的なポリペプチドは、ベクター中に含まれるか、または1つもしくは複数のベクター中にクローニングすることができる。いくつかの態様において、1つまたは複数のベクターを使用して、宿主細胞、例えば、操作のための細胞を形質転換またはトランスフェクトすることができる。例示的なベクターは、導入、増殖および拡大増殖のためもしくは発現のため、または両方のために設計されたベクター、例えばプラスミドおよびウイルスベクターを含む。いくつかの局面では、ベクターは発現ベクター、例えば、組み換え発現ベクターである。いくつかの態様において、標準的な組み換えDNA技法を用いて組み換え発現ベクターを調製することができる。

【0683】

いくつかの態様において、ベクターは、pUCシリーズ(Fermentas Life Sciences)、p Bluescriptシリーズ(Stratagene, LaJolla, Calif.)、pETシリーズ(Novagen, Madison, Wis.)、pGEXシリーズ(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)、またはpEXシリーズ(Clontech, Palo Alto, Calif.)のベクターであることができる。場合によっては、バクテリオファージベクター、例えばλG10、λGT11、λZapII(Stratagene)、λEMBL4、およびλNM1149もまた、使用することができる。いくつかの態様において、植物発現ベクターを使用することができ、それらは、pBI01、pBI01.2、pBI01.3、pBI121およびpBIN19(Clontech)を含む。いくつかの態様において、動物発現ベクターは、pEUK-Cl、pMAMおよびpMAMneo(Clontech)を含む。

【0684】

いくつかの態様において、ベクターは、ウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクターである。いくつかの態様において、組み換え受容体および/または付加的なポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、レトロウイルスもしくはレンチウイルスベクターを介して、またはトランスポゾンを経由して細胞内に導入される(例えば、Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.

10

20

30

40

50

13:1050-1063; Frecha et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:1748-1757; および Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:674-683を参照されたい。

【0685】

いくつかの態様において、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、例えばシミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)由来のベクターなどの組み換え感染性ウイルス粒子を用いて、細胞内に導入される。いくつかの態様において、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、組み換えレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクター、例えばガンマ-レトロウイルスベクターなどを用いて、T細胞内に導入される(例えば、Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557を参照されたい。

【0686】

いくつかの態様において、ベクターはレトロウイルスベクターである。いくつかの局面では、レトロウイルスベクター、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス(MPSV)、マウス胚性幹細胞ウイルス(MESV)、マウス幹細胞ウイルス(MSCV)、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)、またはアデノ随伴ウイルス(AAV)由来のレトロウイルスベクターは、は長末端反復配列(LTR)を有する。大部分のレトロウイルスベクターは、マウスレトロウイルスに由来する。いくつかの態様において、レトロウイルスには、任意の鳥類細胞または哺乳動物細胞供給源に由来するものが含まれる。レトロウイルスは典型的に広宿主性であり、広宿主性とは、それらが、ヒトを含むいくつかの種の宿主細胞に感染する能力を有することを意味する。1つの態様において、発現されるべき遺伝子でレトロウイルスのgag、pol、および/またはenv配列を置き換える。実例となるレトロウイルス系がいくつか記載されている(例えば、米国特許第5,219,740号; 同第6,207,453号; 同第5,219,740号; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; および Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109。

【0687】

レンチウイルス形質導入の方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35 (9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood*. 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506:97-114; および Cavalieri et al. (2003) *Blood*. 102(2): 497-505に記載されている。いくつかの態様において、組み換え受容体をコードするポリヌクレオチドおよび/または1つもしくは複数の付加的なポリペプチドは、培養細胞を含有する組成物中に、例えばレトロウイルス形質導入、トランスフェクション、または形質転換により、導入される。

【0688】

いくつかの態様において、1つまたは複数のポリヌクレオチドは、エレクトロポレーションを用いてT細胞内に導入される(例えば、Chicaybam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 および Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437を参照されたい)。いくつかの態様において、組み換え核酸は転位を介してT細胞内に導入される(例えば、Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; および Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126を参照されたい)。遺伝物質、例えば、ポリヌクレオチドおよび/またはベクターを免疫細胞内に導入して発現させる他の方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション(例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載されている)、プロトプラスト融合、カチオン性リポソーム媒介トランスフェクション; タングステン粒子促進微小粒子衝撃法(tungsten particle-facilitated microparticle bombardment)(Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); およ

10

20

30

40

50

びリン酸ストロンチウムDNA共沈(Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))および例えば、国際特許出願公開番号WO2014055668、および米国特許第7,446,190号に記載される他のアプローチが含まれる。

【0689】

いくつかの態様において、組み換え受容体および/または付加的なポリペプチドをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドまたはベクターは、拡大増殖の最中または後のいずれかに細胞内に、例えばT細胞内に導入され得る。ポリヌクレオチドまたはベクターのこの導入は、例えば任意の適切なレトロウイルスベクターを用いて行うことができる。次に、結果として生じた遺伝子操作細胞を、最初の刺激(例えば抗CD3/抗CD28刺激)から開放し、次いで、(例えば、新規に導入された受容体を介して)第2のタイプの刺激の存在下で刺激することができる。この第2のタイプの刺激には、ペプチド/MHC分子、遺伝的に導入された受容体(例えばCARの天然抗原および/もしくはリガンド)の同族(架橋)リガンド、または(例えば、受容体内の定常領域を認識することによって)新規受容体のフレームワーク内に直接結合する任意のリガンド(抗体など)の形態の抗原刺激が含まれ得る。例えば、Ch eadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66またはBarrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)を参照されたい。

10

【0690】

場合によっては、細胞、例えばT細胞が活性化されることを必要としないベクターが、使用され得る。いくつかのそのような場合には、細胞は、活性化の前に選択および/または形質導入され得る。したがって、細胞は、細胞の培養の前または後に、場合によっては培養と同時にまたは少なくともその一部分の最中に操作され得る。

20

【0691】

V. 組成物、製剤および投与方法

例えばCARまたはTCRなどの任意で遺伝子操作された(例えば、操作された抗原受容体)刺激細胞および選択細胞を含有する組成物、ならびに、薬学的組成物および製剤を含む、該細胞を含有する組成物も、提供される。抗原が発現される疾患、状態および障害の処置における、または検出方法、診断的方法および予後判定方法などにおける、該組成物を使用する方法およびその使用も、提供される。

30

【0692】

A. 組成物/製剤

「薬学的製剤」という用語は、その中に含有される活性成分の生物学的活性を有効にさせるような形態にあり、かつ製剤が投与された対象にとって許容されないほど有毒であるさらなる構成成分を含有しない調製物をいう。

【0693】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒性である、活性成分以外の、薬学的製剤中の成分をいう。薬学的に許容される担体は、緩衝液、賦形剤、安定剤、または保存料を含むが、これらに限定されることはない。

【0694】

40

いくつかの局面において、担体の選択は、一部には特定の細胞によって、および/または投与方法によって決定される。したがって、種々の適当な製剤が存在する。例えば、薬学的組成物は保存料を含みうる。適当な保存料としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、および塩化ベンザルコニウムが挙げられうる。いくつかの局面において、2つまたはそれ以上の保存料の混合物が用いられる。保存料またはその混合物は、典型的には全組成物の約0.0001重量%から約2重量%の量で存在する。担体は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)によって記述されている。薬学的に許容される担体は一般に、用いられる投与量および濃度でレシピエントに無毒性であり、以下のものが含まれるが、これらに限定されることはない: リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝剤; アスコルビン酸およびメ

50

チオニンを含む抗酸化剤; 保存料(塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトリウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール、メチルもしくはブロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノールおよびm-クレゾールなど); 低分子量(約10残基未満)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリンなどのタンパク質; ポリビニルピロリドンなどの親水性重合体; グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリジンなどのアミノ酸; 単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む他の炭水化物; EDTAなどのキレート剤; スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなどの糖類; ナトリウムなどの塩形成対イオン; 金属錯体(例えばZn-タンパク質錯体); ならびに/またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン界面活性剤。

10

【0695】

いくつかの局面において緩衝剤が組成物に含まれる。適当な緩衝剤としては、例えばクエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに他のさまざまな酸および塩が挙げられる。いくつかの局面において、2つまたはそれ以上の緩衝剤の混合物が用いられる。緩衝剤またはその混合物は、典型的には全組成物の約0.001重量%~約4重量%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製するための方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)においてより詳細に記述されている。

【0696】

製剤または組成物はまた、各活性が互いに悪影響を及ぼさない、好ましくは細胞を補完する活性を有するものである、細胞で処置される特定の適応症、疾患、または状態に有用な2つ以上の活性成分を含有しうる。そのような活性成分は、意図された目的に有効な量で組み合わせて適当に存在する。したがって、いくつかの態様において、薬学的組成物は、化学療法剤、例えばアスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、ビンクリスチンなどのような、他の薬学的に活性な作用物質または薬物をさらに含む。いくつかの態様において、細胞または抗体は、塩、例えば薬学的に許容される塩の形態で投与される。適当な薬学的に許容される酸付加塩は、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸および硫酸のような鉱酸、ならびに酒石酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、安息香酸、グリコール酸、グルコン酸、コハク酸およびアリールスルホン酸、例えばp-トルエンスルホン酸のような有機酸に由来するものを含む。

20

30

【0697】

活性成分はマイクロカプセル中、コロイド性薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)中、またはマクロエマルジョン中に封入されてよい。一定の態様において、薬学的組成物は、例えばシクロデキストリン封入複合体などの封入複合体として、またはリポソームとして製剤化される。リポソームは、宿主細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)を特定の組織へと標的指向させるように働きうる。多くの方法はリポソームを調製するのに利用可能であり、例えばSzoka et al., Ann.Rev.Biophys.Bioeng., 9:467 (1980) ならびに米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同4,837,028号および同5,019,369号記載のものである。

40

【0698】

いくつかの局面において、薬学的組成物は、この組成物が送達された後に、治療されるべき部位の感受性を高め、そのために十分な時間を備えるよう、持続放出型送達システム、遅効型放出送達システム、および徐放性送達システムを使用することができる。多くのタイプの放出送達システムが利用可能であり、公知である。こうしたシステムは、組成物の連続投与を避け、それによって対象および医師に対する利便性を増加させる。

【0699】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、治療有効量または予防有効量など、疾患ま

50

たは状態を治療または予防するのに十分な量の細胞を含有する。いくつかの態様において、治療効力または予防効力は、治療対象の定期評価によってモニターされる。数日またはそれ以上にわたる連続投与の場合、状態に応じて、治療は、疾患症状の所望の抑制が起こるまで繰り返される。ただし他の投薬レジメンも有用でありうる場合があり、これが決定されうる。所望の投与量は、組成物の単回急速投与によって、組成物の複数回急速投与によって、または組成物の継続点滴投与によって送達されうる。

【0700】

細胞は、標準的な投与技法、製剤、および/またはデバイスを使用して投与されてよい。製剤、ならびに組成物の貯蔵および投与のための、例えば注射器およびバイアル瓶といったデバイスが提供される。細胞の投与は、自己または異種でありうる。例えば、免疫応答性細胞または前駆細胞は、ある対象から取得されることができ、同じ対象または異なる対象、適合する対象に投与されうる。免疫応答性細胞またはその後代（例えば、インビボ、エクスビボまたはインビトロ由来）を由来とする末梢血は、カテーテル投与を含む局所注射、全身注射、局所注射、静脈内注射または非経口投与を介して投与される。治療組成物（例えば、遺伝子操作された免疫応答性細胞を含有する薬学的組成物）を投与する場合、単位用量の注射可能な形態（溶液、懸濁液、エマルション）で一般には製剤化される。

【0701】

製剤は、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、肺投与、経皮投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、頬側投与、皮下投与または坐薬投与のものを含む。いくつかの態様において、細胞集団は非経口的に投与される。本明細書において使用される場合、用語「非経口」は静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、腔内投与および腹腔内投与を含む。いくつかの態様において、細胞集団は、静脈内注射、腹腔内注射または皮下注射による末梢全身性送達を用いて対象に投与される。

【0702】

いくつかの態様において、組成物は、例えば等張水溶液、懸濁液、エマルション、分散液または粘稠性組成物などの滅菌液調製物として提供され、いくつかの局面において、これらは選択されたpHへと緩衝されうる。液体製剤は、ゲル、他の粘稠性組成物および固体組成物よりも調製するには通常は容易である。追加で、液体組成物は投与、特に注射による投与に若干、さらに利便性がある。一方で、粘稠性組成物は、特定の組織に関して、より長い接触期間を提供する適切な粘稠範囲内で製剤化されうる。液体組成物または粘稠性組成物は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール）およびこれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒でありうる担体を含みうる。

【0703】

滅菌注射液は、好適な担体、希釈液、または例えば滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどといった賦形剤と混合などを行うことで、溶媒中に細胞を組み込むことで調製されうる。組成物はまた、凍結乾燥されうる。組成物は、投与の経路および所望の製剤に応じ、例えば湿潤剤、分散剤または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH緩衝剤、ゲル増強添加剤または粘稠増強添加剤、保存剤、香料、着色料などといった補助物質を含有しうる。いくつかの局面において、好適な調製物を調製するために標準的なテキストが調べられてよい。

【0704】

組成物の安定性および無菌性を増強する種々の添加剤は、抗菌保存剤、抗酸化剤、キレート剤および緩衝剤を含むが、これが加えられうる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌および抗真菌作用物質、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって確実なものとなりうる。注射可能な薬学的形態の持続的吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によって生じさせることができる。

【0705】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の好適な例としては、抗体を含有する固

10

20

30

40

50

形疎水性ポリマーの半透過性マトリックスであって、マトリックスがフィルムまたはマイクロカプセルなどの造形品の形態にあるものが挙げられる。

【0706】

インビボ投与に使用される製剤は一般に無菌状態にある。無菌性は例えば無菌ろ過膜によるろ過などによって容易に達成することができる。

【0707】

B. 投与の方法

細胞、集団および組成物を投与する方法、ならびにがんを含む疾患、状態および障害を治療または予防するためのこうした細胞、集団および組成物の使用が提供される。細胞、集団および組成物を使用する方法およびその使用、ならびにがんを含む疾患、状態および障害を治療または予防するためのこうした細胞、集団および組成物の使用が提供される。特定態様において、細胞、集団および組成物は、提供された方法のいずれかに従って作製および操作されたものである。いくつかの態様において、細胞、集団および組成物は、例えば、養子T細胞療法といった養子細胞療法を介して、治療されるべき特定の疾患または状態を有する対象または患者へと投与される。いくつかの態様において、例えばインキュベーションおよび/または別の加工工程後の、操作された組成物および作製が完了した組成物といった、提供された方法によって調製された細胞および組成物は、例えば疾患または状態のリスクを有するか、またはそのリスク状態の対象といった対象に投与される。いくつかの局面において、方法により、そうして、操作されたT細胞によって認識される抗原を発現しているがんの腫瘍負荷を軽減させることなどにより、疾患または状態の1つまたは複数の症状が治療、例えば緩和される。

【0708】

こうした方法および使用は、例えば、細胞ならびにインキュベーションおよび/または別の加工工程後の操作された組成物および作製が完了した組成物といった、提供された方法により調製された組成物を、例えばがんなどの疾患、状態または障害を有する対象への、疾患または障害の治療をもたらすための投与に関連する治療方法および使用を含む。使用には、こうした方法および治療における組成物の使用、およびこうした治療方法を実施するための薬物の調製時におけるこうした組成物の使用を含む。いくつかの態様において、それによる方法および使用により、対象中の例えば腫瘍またはがんといった疾患または状態または障害が治療される。

【0709】

養子細胞療法のための、細胞の投与のための方法は公知であり、提供された方法および組成物に関連して使用されてよい。例えば、養子T細胞療法は、例えばGruenberg et al. による米国特許出願公開第2003/0170238号、Rosenbergによる米国特許第4,690,915号、Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol.8 (10):577-85に記載される。例えば、Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol.31 (10):928-933;Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1):84-9;Davila et al. (2013) PLoS ONE 8 (4):e61338を参照されたい。

【0710】

本明細書において使用される場合、「対象」は、例えばヒトまたは別の動物といった哺乳動物であり、通常はヒトである。いくつかの態様において、例えば患者など、細胞、細胞集団または組成物を投与される対象は哺乳動物であり、通常は例えばヒトなどの霊長類である。いくつかの態様において、霊長類はサルまたは類人猿である。対象はオスまたはメスでありうる。または対象は、乳児、若年期の対象、青年期の対象、成年の対象または高齢期の対象を含む、任意の好適な年齢でありうる。いくつかの態様において、対象は例えばげっ歯類などの非霊長類の哺乳動物である。

【0711】

本明細書において使用される場合、「治療」（および例えば「治療する」または「治療している」など、この文法的な語尾変化）は、疾患もしくは状態もしくは障害、または症状、副作用もしくはアウトカム、またはこれに関連する表現型の完了、または部分的な回

復、またはその低減を指す。処置の望ましい効果としては、疾患の発生または再発を予防すること、症状の緩和、疾患の何らかの直接的または間接的な病理学的帰結の縮減、転移の防止、疾患進行速度を減じること、疾患状態の改善または一時的軽減、および寛解または予後の改善が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。この用語は、疾患の完全な治癒または全ての症状またはアウトカムに関する任意の症状または1つもしくは複数の効果の完全な消失を意味するわけではない。

【0712】

本明細書において使用される場合、「疾患の発症を遅延させる」は、疾患（例えばがん）の発症を延期する、邪魔する、遅延する、遅らせる、安定化させる、抑制するおよび/または伸ばすことを意味する。この遅延は、疾患の病歴および/または治療されている個体によって変化する、時間の長さを変化させるものでありうる。当業者には明白であるように、十分な遅延または著しい遅延は、個体が疾患を発症しないといった点で、実質的には予防を包含しうる。例えば、転移の発生など、後期がんを遅延させる場合がある。

10

【0713】

本明細書において使用される場合、「予防する」は、疾患の素因となりうるが、疾患であるとまだ診断されていない対象における疾患の発生または再発に関して予防を提供することを含む。いくつかの態様において、提供された細胞および組成物は、疾患の発達を遅延させ、または疾患の進行を遅くするために使用される。

【0714】

本明細書において使用される場合、機能または活性を「抑制」することは、関心対象の状態またはパラメータを除き、他の同じ状態と比較した場合、または代替的には別の状態と比較した場合、機能または活性を低減することである。例えば、腫瘍増殖を抑制する細胞は、細胞の不在下での腫瘍の増殖速度と比較すると、腫瘍の増殖速度を低減する。

20

【0715】

作用物質、例えば投与といった文脈における薬学的製剤、細胞または組成物の「有効量」とは、必要な投薬量/投与量および必要な期間で、例えば、治療結果または予防結果といった所望の結果を達成するのに有効な量を指す。

【0716】

例えば、薬学的製剤または細胞といった作用物質の「治療有効量」は、必要な投薬量/投与量および必要な期間で、例えば、疾患、状態または障害の治療、および/または治療の薬物動態効果もしくは薬力学的効果によって、所望の治療結果を達成するのに有効な量を指す。本明細書における治療有効量は、対象の疾患状態、年齢、性別および体重などの因子、ならびに投与される細胞の集団に従って変動しうる。いくつかの態様において、提供された方法は、例えば治療有効量など、細胞および/または治療有効量での組成物を投与することに関連する。

30

【0717】

「予防有効量」とは、所望の予防結果を達成するのに、必要な投薬量および期間において、有効な量を指す。通常、予防用量は罹患前の対象または疾患の初期段階にある対象に使用されるので、必ずというわけではないが典型的には、予防有効量は治療有効量よりも少ない。

40

【0718】

治療される疾患または状態は、抗原の発現が疾患、状態または障害の原因に関連および/または関与している任意のものでありうる。これは例えば、こうした疾患、状態または障害を引き起こし、これらを悪化させ、それ以外の場合にはこれらに関与する。例示的な疾患および状態には、悪性腫瘍または細胞の形質転換（例えばがん）、自己免疫疾患または炎症性疾患、または例えば、細菌性病原体、ウイルス性病原体もしくは別の病原体によって引き起こされる感染性疾患が含まれうる。治療されうる種々の疾患および状態に関連する抗原を含む例示的な抗原は、上に記載されている。特定態様において、キメラ抗原受容体または遺伝子導入TCRは、疾患または状態に関連する抗原に特異的に結合する。

【0719】

50

したがって、提供された方法および使用は、養子細胞療法のための方法および使用を含む。いくつかの態様において、方法は、細胞または細胞を含有する組成物の、例えば疾患、状態もしくは障害を有するか、疾患、状態もしくは障害のリスクにあるか、または疾患、状態もしくは障害を有すると疑われる、対象、組織または細胞への投与を含む。いくつかの態様において、細胞、集団および組成物は、例えば、養子T細胞治療といった養子細胞療法を介して、治療されるべき特定の疾患または状態を有する対象へと投与される。いくつかの態様において、細胞または組成物は、例えば疾患または状態を有する対象またはそのリスクがある対象などへと投与され、疾患または状態の1つまたは複数の症状を回復させる。

【0720】

いくつかの態様において、例えば養子T細胞療法などの細胞療法は、自家遺伝子の導入によって実施される。これは、細胞が、例えば第1対象といった、細胞治療を受ける予定の対象から、またはこうした対象に由来する試料から、単離および/または他の場合では調製される。したがって、いくつかの局面において、細胞は例えば患者といった治療の必要がある対象に由来し、単離および加工の後、細胞は同じ対象に投与される。

【0721】

いくつかの態様において、例えば養子T細胞療法などの細胞療法は、同種遺伝子の導入によって実施される。これは、細胞が、例えば第1対象といった、細胞療法を受ける予定であるか、または最終的にこれを受ける対象以外の対象から単離および/または他の場合では調製される。こうした態様において、次に細胞は、例えば第2対象など、同種の異なる対象に投与される。いくつかの態様において、第1対象および第2対象は遺伝子的に同一である。いくつかの態様において、第1対象および第2対象は遺伝子的に類似している。いくつかの態様において、第2対象は、第1対象と同じHLAクラスまたはスーパータイプを発現する。細胞は任意の好適な手段によって投与することができる。用量および投与は、投与が短期または慢性であるかどうかにより一部依拠しうる。種々の投与スケジュールには、様々な時点での単回もしくは複数回投与、急速投与、およびパルス注入が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0722】

一定の態様において、細胞、または細胞のサブタイプの個々の集団は、対象に、約100万個～約1000億個の範囲で、および/または体重1キログラムあたりその細胞量で、例えば、100万個～約500億個の細胞（例えば、約500万個の細胞、約2500万個の細胞、約5億個の細胞、約10億個の細胞、約50億個の細胞、約200億個の細胞、約300億個の細胞、約400億個の細胞、または前述の値のうち任意の2つによって定義される範囲）など、約1000万個～約1000億個の細胞（例えば、約2000万個の細胞、約3000万個の細胞、約4000万個の細胞、約6000万個の細胞、約7000万個の細胞、約8000万個の細胞、約9000万個の細胞、約100億個の細胞、約250億個の細胞、約500億個の細胞、約750億個の細胞、約900億個の細胞、または前述の値のうち任意の2つによって定義される範囲）などで投与され、場合によっては、約1億個の細胞～約500億個の細胞（例えば、約1.2億個の細胞、約2.5億個の細胞、約3.5億個の細胞、約4.5億個の細胞、約6.5億個の細胞、約8億個の細胞、約9億個の細胞、約30億個の細胞、約300億個の細胞、約450億個の細胞）またはこれらの範囲の間にあるおよび/または体重1キログラムあたり任意の値で投与される。さらに、投与量は、疾患もしくは障害および/または患者および/または他の治療の特性に応じて変化してよい。いくつかの態様において、細胞は、例えば抗体または操作された細胞または受容体または細胞傷害性薬物もしくは治療薬などの薬剤など、別の治療的処置と同時に、または別の治療的処置と任意の順番で順次といったように、併用治療の一部として投与される。いくつかの態様において、細胞は、同時にまたは任意の順番で順次にのいずれかで、1つまたは複数の追加の治療薬と共に投与されるか、あるいは別の治療的処置につながられる。いくつかの状況においては、細胞は、細胞集団が1つまたは複数の追加の治療薬の効果を増強するように、あるいはその逆であるように、十分近い時間内で別の療法と共に投与される。いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数の追

10

20

30

40

50

加の治療薬に先立って投与される。いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数の追加の治療薬の後に投与される。いくつかの態様において、1つまたは複数の追加薬は、例えば持続性を増強させるIL-2などのサイトカインを含む。いくつかの態様において、方法は化学療法薬の投与を含む。

【0723】

細胞の投与後、いくつかの態様における操作された細胞集団の生物学的活性は、例えば多数の公知の方法のいずれかによって測定される。評価するパラメータには、インビボでの、例えばイメージングによる、またはエクスピボでの、例えばELISAもしくはフローサイトメトリによる、操作されたもしくは天然のT細胞または他の免疫細胞の抗原への特異的結合が含まれる。一定の態様において、操作された細胞が標的細胞を破壊する能力は、例えばKochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32 (7) :689-702 (2009)、および Herman et al. J. Immunological Methods, 285 (1) :25-40 (2004) 記載の細胞傷害性アッセイなど、当技術分野において公知である任意の好適な方法を用いて測定することができる。一定の態様において、細胞の生物学的活性は、1つまたは複数のサイトカイン、例えばCD107a、IFN γ 、IL-2およびTNFなどの発現および/または分泌をアッセイすることによって測定される。いくつかの局面において、生物学的活性は、腫瘍負荷または腫瘍量の低減などの臨床アウトカムを測定することによって測定される。

【0724】

一定の態様において、操作された細胞は多くの手法でさらに修飾され、結果それらの治療効力または予防効力が増加される。例えば、集団によって発現された操作CARまたは操作TCRは、リンカーを介して直接的にまたは間接的にいずれかで標的部分にコンジュゲートされうる。例えばCARまたはTCRといった化合物を標的部分にコンジュゲートさせるという実践は、当技術分野において公知である。例えば、Wadwa et al., J. Drug Targeting 3:111 (1995) および米国特許第5,087,616号を参照されたい。

【0725】

VI. 装置および製造物品

いくつかの態様において、装置または製造物品もまた提供される。提供された方法のうちいずれかを実施するため、アフィニティークロマトグラフィーのマトリックスである固定相を含む装置が本明細書において提供される。いくつかの態様において、固定相は、クロマトグラフィーカラム内に含まれる。配置には、第1固定相に流体的に接続された第2固定相がさらに含まれてよい。第2固定相はゲルろ過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであってよく、ゲルろ過クロマトグラフィーマトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは選択試薬を含み、それによって固定相上の多量体化試薬を固定化するのに好適である。このタイプの配置は、標的細胞（例えば、T細胞、CD4、CD3、CD8T細胞）の連続的な選択を増進させることができ、このカラムのうち1つは本明細書において記載のオンカラム刺激にも好適である。

【0726】

いくつかの態様において、装置はクロマトグラフィー（例えば、カラムクロマトグラフィー）用のアフィニティークロマトグラフィーマトリックスである固定相を含む配置を含む。いくつかの態様において、固定相は、例えば本明細書において記載されるように、固定相上に固定化された選択試薬を有する。いくつかの態様において、配置には、本明細書に記載の選択およびオンカラム刺激のために並行して、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、カラムクロマトグラフィー）用の前述の2つの固定相が含まれる。いくつかの態様において、配置には、本明細書に記載の連続的な選択およびオンカラム刺激のため、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、カラムクロマトグラフィー）用の前述の2つの固定相が含まれる。いくつかの態様において、配置は並行かつ連続的な選択、オンカラム刺激またはポリッシングを実施するように配置されうる2つ超のカラムを含む。例えば、並行する2つのカラムは、連続して選択するため、該カラムの出力がカラムへと与えられるように配置されてよい。

【0727】

いくつかの態様において、装置は、固定相の配置（例えば、上記のもの）および固定相から収集された選択細胞および刺激細胞を洗浄および形質導入するためのデバイス（例えば、遠心分離チャンバ）を含有する。

【0728】

いくつかの態様において、本発明は、例えば、細胞の組成物の刺激または拡大培養といった、精製（例えば、選択およびオンカラム刺激）および培養用装置にさらに関し、装置はバイオリアクタおよび上で定義されたようなクロマトグラフィー用の第1固定相または第2固定相の少なくとも1つの配置を含む。いくつかの態様において、クロマトグラフィー用の第1固定相およびバイオリアクタの配置が提供される。バイオリアクタは、細胞の拡大培養に好適であり、固定相は細胞分離およびオンカラム刺激に好適である。例えば、固定相からの選択細胞および刺激細胞は、洗浄、形質導入され、拡大培養のためにバイオリアクタ内に配置されてよい。態様において、固定相はゲルろ過マトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスであり、ゲルろ過クロマトグラフィーマトリックスおよび/またはアフィニティークロマトグラフィーマトリックスは選択試薬を含み、選択試薬は選択物質内に含まれる結合パートナーC1に特異的に結合する結合部位Z1を含み、および/または選択試薬は第2選択物質内に含まれる結合パートナーC2に特異的に結合する結合部位Z2を含む。それによって固定相は、第1選択物質および/または第2作用物質、第1結合パートナーC1および/または第2結合パートナーC2上に固定化するのに好適である。加えて、バイオリアクタおよび固定相は流体的に接続される。いくつかの態様において、固定相は洗浄工程および形質導入工程用のデバイスを介してバイオリアクタに接続されてよい。この配置は、連続的な拡大培養にて使用されうる。さらに、Quantum（登録商標）細胞拡大培養システムといった公知の細胞拡大培養システムまたはXuri Cell Expansion System W25に組み込まれうる。いくつかの態様において、バイオリアクタは、細胞の健康状態および表現型をモニターするため、例えばOvizio iLine F（Ovizio Imaging Systems NV/SA, Brussels, Belgium）などのデバイスに接続されるがこれに限定されない（セクションI-E-3aを参照されたい）。

【0729】

いくつかの態様において、配置はポリッシング用固定相をさらに含む（例えば、セクションI-Iを参照されたい）。いくつかの態様において、固定相は、クロマトグラフィー（例えば、カラムクロマトグラフィー）用のアフィニティークロマトグラフィーマトリックスである。いくつかの態様において、ポリッシング用の固定相は、細胞選択を増進させるために、その上に固定化される、本明細書において記載のものといった選択試薬を有する。いくつかの態様において、配置には、例えば本明細書において記載されるように、治療組成物の洗浄、製剤化および好適な容器への充填のためのおよびデバイス（例えば、遠心分離チャンバ）がさらに含まれる。

【0730】

いくつかの態様において、配置の構成要素は配管によって接続される。いくつかの態様において、配置の構成要素は溶接によって接続される。いくつかの態様において、配置の構成要素間の接続（例えば、配管および/または溶接）は滅菌状態である。

【0731】

いくつかの態様において、配置は装置内に組み入れられる。装置は、連続して流体接続されているバイオリアクタおよび固定相の複数の配置をさらに備えてよい。

装置は、クロマトグラフィー（例えば、選択およびオンカラム刺激）用の固定相に流体接続されている試料入口を備えてよい。装置は、精製（例えば、選択）標的細胞および刺激された標的細胞用の試料出口もまた備えてよく、試料出口は、バイオリアクタおよびクロマトグラフィー用固定相の少なくとも1つの配置の最後の固定相に流体接続される。いくつかの態様において、装置は出口をさらに備え、これにより、操作されたT細胞（例えば、治療用細胞組成物）は好適な容器へと充填されうる。最終的に、装置は機能的に閉鎖システムとして設計されてよい。

【0732】

VII. 定義

特に定義されない限り、本明細書で用いられる専門用語、表記、ならびに他の技術用語および科学用語または用語法は全て、特許請求される主題が関係する技術分野の当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有することが意図される。場合によっては、一般に理解されている意味を有する用語を、明確にするためにおよび／またはすぐに参照できるように本明細書において定義するが、本明細書にそのような定義を含めることは、当技術分野において一般に理解されているものとの実質的な相違を表すと必ずしも解釈されるべきではない。

【0733】

本明細書で用いられる場合、単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」、および「その」は、特に文脈によって明白に指示されていない限り、その対象物の複数形も含む。例えば、「1つの (a)」または「1つの (an)」は、「少なくとも1つの」または「1つまたは複数の」を意味する。本明細書に記載される局面および変形は、局面および変形「からなる」ならびに／または局面および変形「から本質的になる」を含むと理解される。

【0734】

本開示を通して、特許請求される主題の様々な局面は、範囲形式で提示される。範囲形式での記載は、単に便宜上および簡潔化のためであり、特許請求される主題の範囲に対する確固たる限定として解釈されるべきでないことが、理解されるべきである。したがって、範囲の記載は、可能な部分範囲およびその範囲内の個々の数値を全て具体的に開示していると見なされるべきである。例えば、ある値域が提供される場合、その範囲の上限値と下限値の間の各介在値、およびその規定範囲内の任意の他の規定値または介在値が、特許請求される主題内に包含されることが理解される。これらのより小さな範囲の上限値および下限値は、独立的にそのより小さな範囲内に含まれてよく、これらもまた、規定範囲における任意の具体的に除外される限界値に従って、特許請求される主題内に包含される。規定範囲が限界値の一方または両方を含む場合、それら含まれた限界値の一方または両方を除外する範囲もまた、特許請求される主題内に含まれる。このことは、範囲の幅とは無関係に適用される。

【0735】

本明細書で用いられる「約」という用語は、明白な各値に関する通常の誤差範囲を指す。本明細書において「約」のついた値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータそのものに向けられた態様を含む（および記載する）。例えば、「約X」に言及する記載は「X」の記載を含む。

【0736】

本明細書で使用する場合、ヌクレオチドまたはアミノ酸の位置が、配列表に示されるような開示された配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸の位置に「対応する」という記載は、GAPアルゴリズムなどの標準的なアラインメントアルゴリズムを用いて同一性を最大化するように開示された配列とアラインメントさせたときに同定される、ヌクレオチドまたはアミノ酸の位置を指す。配列同士をアラインメントさせることにより、例えば保存された同一のアミノ酸残基をガイドとして用いて、対応する残基を同定することができる。一般的に、対応する位置を同定するために、アミノ酸の配列は、最上位のマッチが得られるようにアラインメントされる（例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M.編, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W.編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G.編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; およびSequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J.編, M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073を参照されたい）。

【0737】

本明細書で用いられる「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を増

10

20

30

40

50

殖させることができる核酸分子を指す。本用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、およびそれが導入された宿主細胞のゲノム中に組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが機能的に連結されている核酸の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。ベクターには、ウイルスベクター、例えばガンマレトロウイルスベクターといったレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターなどが含まれる。

【0738】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫も含む。宿主細胞には「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これには初代形質転換細胞、および継代数に関係なくそれらに由来する子孫が含まれる。子孫は、核酸の内容が親細胞と完全に一致していなくてもよく、変異を含有してもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書に含まれる。

10

【0739】

本明細書で用いられる場合、細胞または細胞の集団が特定マーカーに関して「陽性」であるという記述は、特定マーカー、典型的には表面マーカーが、細胞上または細胞中に検出可能な程度に存在することを指す。表面マーカーに言及する場合、本用語は、フローサイトメトリによって、例えばマーカーに特異的に結合する抗体で染色し該抗体を検出することによって、検出される表面発現の存在を指し、この場合、染色は、アイソタイプ一致対照を他の点では同一の条件下で用いて同じ手順を行って検出される染色を実質的に上回るレベルで、および／またはそのマーカーに関して陽性であることが公知である細胞のレベルと実質的に類似するレベルで、および／またはそのマーカーに関して陰性であることが公知である細胞のレベルよりも実質的に高いレベルで、フローサイトメトリによって検出可能である。

20

【0740】

本明細書で用いられる場合、細胞または細胞の集団が特定マーカーに関して「陰性」であるという記述は、特定マーカー、典型的には表面マーカーが、細胞上または細胞中に実質的に検出可能な程度に存在しないことを指す。表面マーカーに言及する場合、本用語は、フローサイトメトリによって、例えばマーカーに特異的に結合する抗体で染色し該抗体を検出することによって、検出される表面発現の非存在を指し、この場合、染色は、アイソタイプ一致対照を他の点では同一の条件下で用いて同じ手順を行って検出される染色を実質的に上回るレベルで、および／またはそのマーカーに関して陽性であることが公知である細胞のレベルよりも実質的に低いレベルで、および／またはそのマーカーに関して陰性であることが公知である細胞のレベルと比較して実質的に類似するレベルで、フローサイトメトリによって検出されない。

30

【0741】

本明細書で使用する場合、アミノ酸配列（参照ポリペプチド配列）に関して使用するときの「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」および「同一性パーセント」とは、配列をアラインメントさせて、必要に応じて、最大の配列同一性パーセントを達成するためにギャップを導入した後、保存的置換を配列同一性の一部とみなさずに、参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列（例えば、対象の抗体または断片）のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、様々な公知の方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegaalign（DNASTAR社）ソフトウェアなどの公開されているコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされるアルゴリズムを含めて、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。

40

【0742】

アミノ酸の置換は、ポリペプチド中のあるアミノ酸を別のアミノ酸で置き換えることを

50

含む。置換は、保存的アミノ酸置換であっても、非保存的アミノ酸置換であってもよい。アミノ酸の置換は、対象となる結合分子（例えば抗体）に導入されるか、または所望の活性（例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低下、またはADCCもしくはCDCの改善）についてスクリーニングされる産物に導入することができる。

【0743】

アミノ酸は一般に、次の共通の側鎖特性に従ってグループに分けることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖の向きに影響を与える残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

10

【0744】

いくつかの態様では、保存的置換には、これらのクラスのうちのあるクラスのメンバーを同じクラスの別のメンバーと交換することが含まれる。いくつかの態様では、非保存的アミノ酸置換には、これらのクラスのうちのあるクラスのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することが含まれる。

【0745】

本明細書で使用する場合、組成物は、細胞を含めて、2つ以上の産物、物質、または化合物の任意の混合物を指す。それは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。

20

【0746】

本明細書で使用する場合、「対象」は、哺乳動物、例えばヒトまたは他の動物であり、典型的にはヒトである。

【0747】

VIII. 例示的な態様

提供される態様としては以下がある。

1. 以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法：

(a) 固定相上に固定化された複数のT細胞を1つまたは複数の刺激物質と共にインキュベートして、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する工程であって、該固定相が、該1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞によって発現された該選択マーカーへの該選択物質の特異的結合が、該1つまたは複数のT細胞を固定相上に固定化する、工程、および

30

(b) インキュベーションの開始から24時間以内に、複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく該1つまたは複数のT細胞を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

2. 固定相が、1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つを含む、態様1の方法。

3. 少なくとも1つの刺激物質が第1刺激物質であり、固定相が、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数をさらに含む、態様2の方法。

40

4. 刺激物質が第1刺激物質であり、インキュベートすることに先立って、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数を含む刺激試薬が固定相に加えられる、態様2の方法。

5. インキュベートすることに先立って、1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つを含む刺激試薬を固定相に加える、態様1の方法。

6. 少なくとも1つの刺激物質が第1刺激物質であり、1つまたは複数の刺激物質が、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する1つまたは複数の第2刺激物質をさらに含む、態様5の方法。

50

7. 1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つ、任意で第1刺激物質が、刺激シグナルを送達する能力を有し、該刺激シグナルが、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介した刺激シグナルである、態様1～6のいずれかの方法。

8. 第2刺激物質が、1つまたは複数のT細胞上の共刺激分子に特異的に結合する能力を有する、態様3、4、6および7のいずれかの方法。

9. 以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

(a) 複数のT細胞を含む試料を固定相に加える工程であって、該固定相が、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面上の選択マーカーに結合する選択物質を含み、それによって、複数のT細胞のうちの該1つまたは複数のT細胞が固定相上に固定化される、工程、

(b) 該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含む刺激試薬を該固定相に加え、それによって、該刺激試薬と該1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程、および

(c) インキュベーション開始から24時間以内に、複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

10. 以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

(1) (a) 複数のT細胞を含む試料と (b) 該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の表面上に発現した選択マーカーに特異的に結合する能力を有する選択物質を含む固定相とを混合する工程であって、選択マーカーに対する該選択物質の特異的結合が、該固定相への該複数のT細胞の固定化をもたらす、工程、

(2) T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質を含む刺激試薬を該固定相に加え、それによって、該刺激試薬と該1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程、および

(3) インキュベーション開始から24時間以内に、複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

11. 以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

オリゴマー刺激試薬を、複数の固定化T細胞を含む固定相に加え、それによって、該刺激試薬と該複数の固定化T細胞のうちの1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、

該固定相が、1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに特異的に結合する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞によって発現された選択マーカーへの該選択物質の特異的結合が、該1つまたは複数のT細胞を該固定相に固定化し、

該オリゴマー刺激試薬が、(i) 複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子と (ii) 1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する1つまたは複数の刺激物質とを含み、該オリゴマー刺激試薬のサイズが、i) 50nm超の半径、ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量および/または (iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、

工程。

12. インキュベーション開始から24時間以内に、複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含有する組成物を生成する工程をさらに含む、態様11の方法。

13. 複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞を固定相から収集することが、インキュベーション開始から約23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3または2時間以内に行われる、態様1～10または12のいずれかの方

10

20

30

40

50

法。

14. 複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から約2~24、3~24、4~24、5~24、6~24、7~24、8~24、9~24、10~24、11~24、12~24、13~24、14~24、15~24、16~24、17~24、18~24、19~24、20~24、21~24、22~24、23~24、2~23、2~22、2~21、2~20、2~19、2~18、2~17、2~16、2~15、2~14、2~13、2~12、2~11、2~10、2~9、2~8、2~7、2~6、2~5、2~4または2~3時間以内に行われる、態様1~10、12または13のいずれかの方法。

15. 複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から約12、10、8、6、4または2時間以内に行われる、態様1~10または12~14のいずれかの方法。

10

16. 複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から5時間以内に行われる、態様1~10または12~15のいずれかの方法。

17. 複数のT細胞のうちの1つまたは複数を固定相から収集することが、インキュベーション開始から4時間以内に行われる、態様1~10または12~16のいずれかの方法。

18. 刺激試薬とのインキュベーションの開始が、複数のT細胞を含む試料を固定相に加えた後または固定相と混合した後、10分以内もしくは約10分以内、20分以内もしくは約20分以内、30分以内もしくは約30分以内、45分以内もしくは約45分以内、60分以内もしくは約60分以内、90分以内もしくは約90分以内または120分以内もしくは約120分以内に行われる、態様9、10および13~17のいずれかの方法。

20

19. 1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つが、刺激シグナルを送達する能力を有し、該刺激シグナルが、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介した刺激シグナルである、態様9~18のいずれかの方法。

20. 少なくとも1つの刺激物質が第1刺激物質であり、刺激試薬が、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの1つまたは複数をさらに含む、態様19の方法。

21. 第2刺激物質が、1つまたは複数のT細胞上の共刺激分子に特異的に結合する能力を有する、態様3、4、6、7および20のいずれかの方法。

22. 共刺激分子がCD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40またはHVEMの中から選択される、態様21の方法。

30

23. 第2刺激物質がCD28に特異的に結合する能力を有する、態様21または態様22の方法。

24. 第1刺激物質がCD3に特異的に結合し、第2刺激物質がCD28に特異的に結合する、態様3、4、6、7および20~23のいずれかの方法。

25. 刺激物質が、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、もしくはそれを含み;ならびに/または

40

刺激物質が抗体フラグメントを含み;

刺激物質がFabフラグメントであるか、もしくはそれを含み;

刺激物質が、(Fab)₂ フラグメントおよび二価一本鎖Fv (scFv) フラグメントからなる二価抗体フラグメントの群から選択され;

刺激物質が、Fabフラグメント、FvフラグメントおよびscFvからなる群より選択される一価抗体フラグメントであり;ならびに/または

刺激物質が、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ (glubody)、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質、結晶スキャフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーからなる群より選択される、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子である、

50

態様1～24のいずれかの方法。

26. 第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、もしくはそれを含み;ならびに/または

第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、抗体フラグメントを含み;

第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、Fabフラグメントであるか、もしくはそれを含み;

第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、(Fab)₂'フラグメントおよび二価一本鎖Fv(scFv)フラグメントからなる二価抗体フラグメントの群から選択され;

第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、Fabフラグメント、FvフラグメントおよびscFvからなる群より選択される一価抗体フラグメントであり;ならびに/または

第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質、結晶スキャフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーからなる群より選択される、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子である、

態様3、4、6、7または20～24のいずれかの方法。

27. 第1刺激試薬が抗CD3 Fabであり、第2刺激物質が抗CD28 Fabである、態様3、4、6、7、20～24および26のいずれかの方法。

28. 以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

T細胞において刺激シグナルを送達する能力を有するオリゴマー刺激試薬を、複数の固定化T細胞を含む固定相に加え、それによって、該刺激試薬と1つまたは複数のT細胞とのインキュベーションを開始する工程であって、

該固定相が、1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットの表面上の選択マーカーに特異的に結合する能力を有する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞またはそのサブセットによって発現された選択マーカーに対する該選択物質の特異的結合が、該固定相への該少なくとも複数のT細胞の固定化をもたらし、該選択物質が、CD3、CD4およびCD8からなる群より選択される選択マーカーに特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり;

該オリゴマー刺激試薬が、(i) 複数のストレプトアビジンムテイン分子、(ii) CD3に特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり、1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送達する能力を有する第1刺激物質、および(iii) CD28に特異的に結合する能力を有するFabフラグメントであり、刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質を含み、該オリゴマー刺激試薬のサイズが、i) 50nm超の半径、ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量、および/または(iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む

工程、ならびに

インキュベーション開始から24時間以内に、複数のT細胞を固定相から溶出させるために競合剤も遊離結合剤も添加することなく該複数のT細胞のうちの1つまたは複数の重力流によって該固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

29. 刺激物質が、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

10

20

30

40

50

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、態様25の方法。

30. 第1刺激物質および第2刺激物質が、独立して、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:

8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

20

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、態様26の方法。

30

31. 選択物質が、抗体フラグメント、一価抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体;受容体リガンド;およびその結合性フラグメントからなる群より選択される物質であるか、もしくはそれを含み;ならびに/または

選択物質が抗体フラグメントを含み;

選択物質がFabフラグメントであるか、もしくはそれを含み;

選択物質が、(Fab)₂ フラグメントおよび二価一本鎖Fv (scFv) フラグメントからなる二価抗体フラグメントの群から選択され;

選択物質が、Fabフラグメント、FvフラグメントおよびscFvからなる群より選択される一価抗体フラグメントであり;ならびに/または

40

選択物質が、アプタマー、リポカリンファミリーのポリペプチドに基づくムテイン、グルボディ、アンキリンスキャフォールドに基づくタンパク質、結晶スキャフォールドに基づくタンパク質、アドネクチンおよびアビマーからなる群より選択される、抗体様結合特性を持つタンパク質性結合分子である、
態様1~30のいずれかの方法。

32. 選択物質が、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

50

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

10

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、態様31の方法。

33. 選択マーカーがT細胞補助受容体であり;

選択マーカーがT細胞抗原受容体複合体のメンバーであるか、もしくはそれを含み、

選択マーカーがCD3鎖であるか、もしくはそれを含み、

選択マーカーがCD3ゼータ鎖であるか、もしくはそれを含み、

選択マーカーがCD8であるか、もしくはそれを含み;

選択マーカーがCD4であるか、もしくはそれを含み、

選択マーカーがCD45RAであるか、もしくはそれを含み;

選択マーカーがCD27であるか、もしくはそれを含み、

選択マーカーがCD28であるか、もしくはそれを含み、および/または

選択マーカーがCCR7であるか、もしくはそれを含む、

態様1〜32のいずれかの方法。

34. 選択物質と選択マーカーの間の特異的結合が、T細胞へのシグナルを誘導しないか、または、T細胞への刺激シグナル、活性化シグナルおよび増殖シグナルをいずれも誘導しない、態様1〜33のいずれかの方法。

35. 選択物質が抗CD3 Fab、抗CD8 Fabまたは抗CD4 Fabである、態様1〜34のいずれかの方法。

36. 刺激試薬が可溶性である、態様2および態様5〜35のいずれかの方法。

37. 刺激試薬が、固形支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁気粒子および/もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合も会合もしておらず;ならびに/または

該試薬が、フレキシブルであり、金属コアも磁気コアも含有せず、完全にもしくは主として有機多量体で構成され、形状は球状ではなく、実質的に球状でも均一でもなく、かつ/もしくは剛直ではない、

態様2および態様5〜36のいずれかの方法。

38. 刺激試薬が、ストレプトアビジン;アビジン;ビオチン、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なそのフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンのムテイン;ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンのムテイン;少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬であって、該少なくとも2つのキレート基が、遷移金属イオンに結合する能力を有する、試薬;オリゴヒスチジンアフィニティータグに結合する能力を有する物質;グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合する能力を有する物質;カルモジュリンまたはその類似体;カルモジュリン結合ペプチド (CBP) に結合する能力を有する物質;FLAG-ペプチドに結合する能力を有する物質;HAタグに結合する能力を有する物質;マルトース結合タンパク質 (MBP) に結合する能力を有する物質;HSVエピトープに結合する能力を有する物質;mycエピトープに結合する能力を有する物質;またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する物質であるか、またはそれを含む、態様2および態様5〜10、および態様12〜37のいずれかの方法。

20

30

40

50

39. 刺激試薬が、ビオチンもしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含み、

刺激試薬が、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含み、および/あるいは

刺激試薬が、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含み、

態様2、5～10および態様12～38のいずれかの方法。

40. 刺激試薬が、複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子を含むオリゴマー刺激試薬であり、該オリゴマー粒子試薬のサイズが、i) 50nm超の半径、ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量および/または (iii) オリゴマー粒子試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、態様2、5～10および態様12～39のいずれかの方法。

41. オリゴマー刺激試薬が可溶性である、態様11または態様40の方法。

42. オリゴマー刺激試薬が、固形支持体、固定相、ビーズ、微粒子、磁気粒子および/もしくはマトリックスではなく、かつそれらに結合も会合もしておらず、ならびに/または該試薬が、フレキシブルであり、金属コアも磁気コアも含有せず、完全にもしくは主として有機多量体、iで構成され、かつ/もしくは剛直ではない、

態様11、態様40または態様41のいずれかの方法。

43. ストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するか、または可逆的に結合する能力を有する、態様11または態様40～42のいずれかの方法。

44. ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むか、または

ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、

態様38～43のいずれかの方法。

45. ストレプトアビジン結合ペプチドが、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:

8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys

((SEQ ID NO: 17), SAWSHQPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-

Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID

NO: 18)および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択される、態様38、39、43または44のいずれかの方法。

46. オリゴマー粒子試薬が、
60nm超、70nm超、80nm超または90nm超の半径
を含む、態様11または40～45のいずれかの方法。

47. オリゴマー粒子試薬が
両端の値を含む50nm～150nm、75nm～125nm、80nm～115nmもしくは90nm～110nmの半径、または

90nm±15nmもしくは95nm±20～25nmの半径
を含む、態様11または態様40～46のいずれかの方法。

48. 前記半径が流体力学的半径である、態様11または40～47のいずれかの方法。

49. オリゴマー粒子試薬が、

少なくとも $5 \times 10^7 \text{ g/mol}$ もしくは少なくとも $1 \times 10^8 \text{ g/mol}$ 、および/または $5 \times 10^7 \text{ g/mol} \sim 5 \times 10^8 \text{ g/mol}$ 、 $1 \times 10^8 \text{ g/mol} \sim 5 \times 10^8 \text{ g/mol}$ 、もしくは $1 \times 10^8 \text{ g/mol} \sim 2 \times 10^8 \text{ g/mol}$

の分子量を含む、態様11または40～48のいずれかの方法。

50. オリゴマー粒子試薬が、

少なくとも500個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、少なくとも1,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、少なくとも1,500個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、または少なくとも2,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、および/または

1,000～20,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、1,000～10,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体、または2,000～5,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体

を含む、態様11または態様40～49のいずれかの方法。

51. 選択物質が固定相に直接的または間接的に結合される、態様1～50のいずれかの方法。

52. 選択物質が、該選択物質が可逆的に結合する選択試薬を介して間接的に固定相に結合される、態様1～51のいずれかの方法。

53. 選択試薬が、ストレプトアビジン;アビジン;ビオチン、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なそのフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンのムテイン;ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンのムテイン;少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬であって、該少なくとも2つのキレート基が、遷移金属イオンに結合する能力を有する、試薬;オリゴヒスチジンアフィニティータグに結合する能力を有する物質;グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合する能力を有する物質;カルモジュリンまたはその類似体;カルモジュリン結合ペプチド(CBP)に結合する能力を有する物質;FLAG-ペプチドに結合する能力を有する物質;HAタグに結合する能力を有する物質;マルトース結合タンパク質(MBP)に結合する能力を有する物質;HSVエピトープに結合する能力を有する物質;mycエピトープに結合する能力を有する物質;またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する物質であるか、またはそれを含む、態様51または態様52の方法。

54. 選択試薬が、ビオチンもしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含み、

刺激試薬が、ビオチン類似体もしくは生物学的に活性なフラグメントに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含み、および/あるいは

刺激試薬が、ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するストレプトアビジンムテインもしくはアビジンムテインであるか、またはそれを含む、態様51～53のいずれかの方法。

55. ストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合するか、または可逆的に結合する能力を有する、態様53または態様54の方法。

56. ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含むか、または

ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、

態様53～55のいずれかの方法。

57. ストレプトアビジン結合ペプチドが、

Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8),
SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18)
および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択される、態様53～54のいずれかの方法。

10

58. 重力流によって収集することが、固定相からT細胞を溶出させるための競合剤も遊離結合剤も含まない培地を固定相に加えることを含む、態様1～10または態様12～57のいずれかの方法。

59. 前記収集後に、刺激されたT細胞を含む組成物をさらにインキュベートする工程を含む、態様1～10または態様12～58のいずれかの方法。

60. さらにインキュベーションが、 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ もしくは約 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ で実行され;および/またはさらにインキュベーションが、T細胞においてシグナルを送達する能力を有するさらなる作用物質の存在下で実行される、態様59の方法。

61. さらに作用物質が、固定相を洗浄するために使用される培地に含まれる、態様60の方法。

20

62. さらに作用物質が、T細胞、CD4+T細胞および/またはCD8+T細胞の増殖を増強または誘導する能力を有する、態様60または態様61の方法。

63. さらに作用物質が、IL-2、IL-15およびIL-7の中から選択されるサイトカインである、態様60～62のいずれかの方法。

64. さらにインキュベーションが、72時間、48時間以下、24時間以下、または12時間以下の時間にわたって実行される、態様59～63のいずれかの方法。

65. 組成物の刺激されたT細胞に、組換えタンパク質をコードする組換え核酸分子を導入し、それによって、形質導入T細胞を含む組成物を作製する工程をさらに含む、態様1～64のいずれかの方法。

30

66. 組換えタンパク質が抗原受容体である、態様65の方法。

67. 組換えタンパク質がキメラ抗原受容体である、態様65の方法。

68. キメラ抗原受容体 (CAR) が、標的抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む、態様67の方法。

69. 細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ゼータ (CD3 ζ) 鎖の細胞内ドメインを含む、態様68の方法。

70. 細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとを連結する膜貫通ドメインをさらに含む、態様68または態様69の方法。

71. 膜貫通ドメインがCD28の膜貫通部分を含む、態様70の方法。

72. 細胞内シグナル伝達ドメインがT細胞共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む、態様68～71のいずれかの方法。

40

73. T細胞共刺激分子が、CD28および41BBからなる群より選択される、態様72の方法。

74. 前記核酸が、組換え抗原受容体をコードする核酸に機能的に連結されたプロモータをさらに含む、態様65～73のいずれかの方法。

75. 組換え核酸の導入が、ウイルス粒子を使った形質導入によって達成される、態様65～74いずれかの方法。

76. ウイルス粒子がレトロウイルスベクター粒子である、態様75の方法。

77. ウイルス粒子がレンチウイルスベクター粒子である、態様75の方法。

78. 形質導入細胞を含む組成物を、ウイルス組込みのための条件下で培養し、それによ

50

って、培養T細胞を含む組成物を作製する工程を、さらに含む、態様65~77のいずれかの方法。

79. 形質導入細胞を含む組成物を、T細胞を拡大培養するための条件下で培養する工程をさらに含む、態様75~78のいずれかの方法。

80. 培養する工程が14日以下、12日以下、10日以下、8日以下または6日以下の時間にわたって実行される、態様79の方法。

81. 刺激されたT細胞を含む組成物に競合剤または遊離結合剤を加え、それによって、可逆的結合を破壊する工程を、さらに含む、態様59~64のいずれかの方法。

82. 形質導入T細胞を含む組成物に競合剤または遊離結合剤を加え、それによって、可逆的結合を破壊する工程を、さらに含む、態様65~77のいずれかの方法。

83. 培養T細胞を含む組成物に競合剤または遊離結合剤を加え、それによって、可逆的結合を破壊する工程を、さらに含む、態様78~80のいずれかの方法。

84. 競合剤もしくは遊離結合剤が、T細胞にとって有害ではなく、および/または、該物質の添加が、競合剤も遊離結合剤も使用しない同等もしくは同じ条件下でのT細胞のインキュベーションとの比較で、生残するT細胞のパーセンテージを90%未満、80%未満、70%未満、60%未満もしくは50%未満に低減させることはない、態様81~83のいずれかの方法。

85. 前記破壊が、T細胞における刺激シグナルを終結または軽減させる、態様81~84のいずれかの方法。

86. 競合試薬および遊離結合剤が、独立して、ストレプトアビジン結合分子;ビオチン;D-ビオチン;ビオチン類似体;ストレプトアビジン、または野生型ストレプトアビジンの位置44~47に対応する配列位置にアミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を有するストレプトアビジン類似体に特異的に結合するビオチン類似体からなる群からの分子;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:7のいずれか1つに示される配列を含むか、またはこれからなるペプチドを含み、または競合試薬および遊離結合剤が、独立して、任意でEDTAまたはEGTAである、金属キレート剤を含む、

態様81~85のいずれかの方法。

87. T細胞が、抗原特異的T細胞もしくはその集団、Tヘルパー細胞もしくはその集団、細胞傷害性T細胞もしくはその集団、メモリーT細胞もしくはその集団、または制御性T細胞もしくはその集団を含む、態様1~77のいずれかの方法。

88. T細胞がCD3+T細胞を含むか、CD4+および/またはCD8+T細胞を含む、態様1~87のいずれかの方法。

89. 固定相がクロマトグラフィーマトリックスであるか、またはそれを含む、態様1~88のいずれかの方法。

90. (a) T細胞表面上の第1分子および第2分子にそれぞれ特異的に結合することによってT細胞を刺激する能力を有する、第1刺激物質および第2刺激物質と、

(b) T細胞上の選択マーカーに特異的に結合することによって固定相上にT細胞を固定化する能力を有する選択物質を含む、固定相とを含む、T細胞のオンカラム刺激のための製造物品。

91. 固定相が第1刺激物質および第2刺激物質をさらに含む、態様90の製造物品。

92. 第1刺激物質、第2刺激物質および選択物質が、選択試薬を介して間接的に固定相に結合される、態様90または態様91の製造物品。

93. 刺激試薬をさらに含み、第1刺激物質および第2刺激物質が、可逆的に結合されているかまたは可逆的に結合される能力を有する、態様90の製造物品。

94. 選択物質が選択試薬を介して間接的に固定相に結合される、態様90の方法。

95. 固定相が、クロマトグラフィーマトリックスであるかそれを含み、前記製造物品が、該クロマトグラフィーマトリックスの全部または一部を含有する容器をさらに含む、態様90~94のいずれかの製造物品。

96. 態様90~95のいずれかの製造物品を含む、装置。

97. 装置の1つまたは複数の構成要素に流体的に接続された流体入口および/あるいは装置の1つまたは複数の構成要素に流体的に接続された流体出口をさらに含む、態様96の装置。

98. 閉鎖システム内または無菌システム内にある、態様96または態様97のいずれかの装置。

99. 自動で実行されてもよい態様1～89のいずれかの方法において使用するための、態様96～98のいずれかの装置または態様90～95のいずれかの物品。

【実施例】

【0748】

IX. 実施例

以下の実施例は例示のために含まれるに過ぎず、本発明の範囲を限定しようとするものではない。

【0749】

実施例1：ストレプトアビジンムテインを含む抗CD3/抗CD28 Fab結合オリゴマー試薬を調製する方法

STREP-TACTIN（登録商標）M2と呼ばれる例示的なストレプトアビジンムテイン（SEQ ID NO: 6に記載されるアミノ酸のムテイン配列を含むストレプトアビジンホモ四量体、例えば、米国特許第6,103,493号ならびにVoss and Skerra (1997) Protein Eng., 1: 975-982およびArgarana et al.(1986) Nucleic Acids Research, 1871-1882を参照）を重合させることによってオリゴマー試薬を調製した。オリゴマー化のためのストレプトアビジンムテインを調製するために、1つまたは複数の反応性チオール基を含有するストレプトアビジンムテインをマレイミド活性化ストレプトアビジンムテインとともにインキュベートした。チオール化ストレプトアビジンムテインを調製するために、ストレプトアビジンムテイン約100mgを、100mMのホウ酸塩緩衝液中、総量2.6mLで、2-イミノチオラン塩酸塩とともに、1：100のモル比で、約8.5のpHおよび24℃で1時間のインキュベーションによってチオール化した。活性化反応のために、ストレプトアビジンムテイン約400mgを、リン酸ナトリウム緩衝液中、約10.4mLの総量で、スクシンイミジル-6-[（β-マレイミドプロピオンアミド）ヘキサノエート（SMPH）とともに、1：2のモル比で、約7.2のpHおよび24℃で1時間インキュベートした。チオール化および活性化反応は、ほぼ同じタイミングで開始するように調整し、反応の期間を制御した。

【0750】

反応の後、PD-10脱塩カラム（GE Healthcare）を用いて試料のゲル濾過を個々に実施することにより、2-イミノチオラン塩酸塩およびSMPHを試料から除去した。試料2.5mL量ごとに、1mLのPD-10カラムを平衡させ、チオール化ストレプトアビジンまたはマレイミドムテインストレプトアビジンを装填し、カップリング緩衝液（100mM NaH₂PO₄、150mM NaCl、5mM EDTA、pH7.2）3.5mLを加えることによって溶出を実施した。マレイミドムテインストレプトアビジンのゲル濾過を、>10mL量を占める4つのカラムで実施し、溶出物をプールした。活性化およびチオール化反応のタイミングならびに活性化およびチオール化反応の終了とオリゴマー化反応の開始との間のタイミングを注意深く制御した。概して、ゲル濾過の開始、すなわち、活性化およびチオール化反応の終了からオリゴマー化反応が開始されるまで10分以下しか経過させなかった。

【0751】

次いで、オリゴマー化のために、マレイミドストレプトアビジンムテイン試料とチオール化ストレプトアビジンムテイン試料とを約17.5mLの総量へと合わせ、7.2のpH、24℃、約600rpmでの攪拌条件下、1時間インキュベートした。2-イミノチオラン塩酸塩の場合の四倍のストレプトアビジンムテインをSMPHとともにインキュベートしたため、オリゴマー反応中のチオール化ストレプトアビジンムテインとマレイミドストレプトアビジンムテインとのモル比は1：4であった。反応の後、オリゴマー化されたストレプトアビジンムテイン試薬の残るSH基を、N-エチルマレイミド（NEM）とともに24℃で攪拌しながら（約600rpm）15分間インキュベートし、次いで4℃でさらに16～20時間インキュベ

10

20

30

40

50

トすることによって飽和させた。

【0752】

NEMとのインキュベーションの後、オリゴマー化ストレプトアビジンムテインを含有する試料を遠心分離し、上清を0.45 μmメンブレン (Millex-HP 0.45 μm, Merck Millopre) に通して濾過した。次いで、濾過した溶液をカラム (Sephacryl S-300 HR HiPrep 26/60, GE Healthcare) に装填して、AKTA Explorerクロマトグラフィーシステム (GE Healthcare) を用いるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に付した。1500mAU以上のmAU (milli absorbance unit) の分画をプールした。

【0753】

オリゴマーストレプトアビジンムテインを含有するプールされた試料を、pH6.35の100mMヒドロキシルアミンにより、室温で15分間処理した。処理後にヒドロキシルアミンを除去するために、試料をPD10カラムに装填し (1カラムあたり2.5mL)、100mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、1mM EDTAを含有するpH7.2の緩衝液3.5mLで溶出させた。PD10溶出物をプールし、0.45 μmフィルター、次いで0.22 μmフィルターによって除菌濾過した後、試料を凍結し、-80℃で貯蔵した。凍結の前に、オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬の最終濃度を計測し、オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬のサイズを動的光散乱法 (DLS) によって測定した。

【0754】

オリゴマー化プロセスの一貫性を評価するために、上記方法を使用して、5つの異なるストレプトアビジンムテイン (SAM) のロットから10のオリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬を調製した。各オリゴマーの平均サイズ、収率 (280nmでの吸光度を計測することによって測定、ベースライン補正なし) および活性 (ビオチン結合) を評価した。結果を表E1に示す。結果は、得られたオリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬がこれらのパラメータにおいて一貫しており、平均半径が97nm±10nmであり、ビオチン結合が40nmol/mg±3nmol/mgであったことを示す。

【0755】

(表 E 1) 異なるバッチからのオリゴマー化STREP-TACTINの比較

	SAM ロット	半径 (nm)	収率 (%)	ビオチン 結合 (nmol/mg)
バッチ1	1	92	74	41
バッチ2	2	100	68	40
バッチ3	2	106	82	37
バッチ4	2	94	73	39
バッチ5	3	87	79	41
バッチ6	3	90	81	39
バッチ7	4	97	84	43
バッチ8	4	97	76	43
バッチ9	5	102	85	42
バッチ 10	5	87	63	42

【0756】

上記のように生成された3つのオリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬の平均分子量 (MW) を、HPLCシステム (AGILENT 1100およびWyatt ECLIPSE DUALTEC) をUV検出 (MALLS DAWN HELEOS (Wyatt) と結合したAgilent UV検出器) とともに用いて実行した非対称流れ流動場分離 (AF4) 法によって計測した。AF4による計測は、ストレプトアビジンムテイン四量体の平均分子量を52,500g/mol (52.5kDa) と仮定して

、各オリゴマー試薬中のストレプトアビジン四量体の平均数の計算を可能にした（表E2）。

【0757】

（表E2）オリゴマーストレプトアビジン試薬のサイズおよび分子量

半径 (nm)	MW (g/mol)	四量体の数
102	1.65×10^8	3150
82	1.08×10^8	2050
92	1.26×10^8	2280

10

【0758】

刺激物質（抗CD3および抗CD28 Fab断片）を、上記のように生成されたオリゴマーストレプトアビジン試薬への可逆性結合によって多量体化した。抗CD3および抗CD28 Fab断片を、各Fab断片に融着したストレプトアビジンペプチド結合パートナーを介してストレプトアビジンオリゴマーに可逆的に結合させた。抗CD3 Fab断片は、ハイブリドーマ細胞株OKT3（ATCC（登録商標）CRL-8001（商標）；また、米国特許第4,361,549号を参照）から産生されたCD3結合モノクローナル抗体に由来し、Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996)に記載されている抗CD3抗体OKT3の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含有するものであった。これらの配列はSEQ ID NO: 31および32にそれぞれ記載されている。抗CD28 Fab断片は、抗体CD28.3（合成一本鎖Fv構築物としてGenBankアクセッション番号AF451974.1の下で寄託；また、Vanhove et al., BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570を参照）に由来し、SEQ ID NO: 33および34にそれぞれ記載されている抗CD28抗体CD28.3の重および軽鎖可変ドメインを含有するものであった。Fab断片を、それらの重鎖のカルボキシ末端において、アミノ酸の配列
SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

20

を有する2つのストレプトアビジン結合分子の連続配置を含有するストレプトアビジンペプチド結合配列に個々に融着した。ペプチド標識されたFab断片を組換え的に製造した（国際特許出願公開番号WO2013/011011およびWO2013/124474を参照）。

30

【0759】

可逆性結合を実施するために、ペプチド標識された抗CD3および抗CD28 Fab断片を、オリゴマーストレプトアビジン試薬とほぼ室温で混合し、それにより、試薬上の結合部位に可逆的に結合することができる結合パートナーであるFab断片上のTwin-Strep-tag間の相互作用を介して試薬に可逆的に結合させた。場合によっては、ペプチド標識されたFab断片を、オリゴマーストレプトアビジン試薬上への固定の前に事前に混合した。それは、いくつかの例において、様々なFab分子のより均一な分散を生じさせることができる。オリゴマーストレプトアビジン試薬へのペプチド標識された抗CD3および抗CD28の結合は、D-ビオチンの添加によって切断または解消することができる。D-ビオチンは、ストレプトアビジン上の結合パートナーへの結合を求めて作用物質上のStrep-tagと競合し、それにより、結合を切断する。

40

【0760】

実施例2：ストレプトアビジンオリゴマーに可逆的に結合したオリゴマー化抗CD3および抗CD28 Fab断片の活性評価

実施例1に記載したプロセスによって表E1に記載されたバッチそれぞれからの様々なオリゴマーストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3および抗CD28 Fab断片を、T細胞を刺激する能力に関して評価した。これらのオリゴマーストレプトアビジン試薬は約95nmの平均半径を有していた。可溶性ホルマザン色素複合体への安定なテトラゾリウ

50

ム塩WST-1の切断の比色モニタリングにより、細胞増殖の指標としての細胞の代謝活性を評価した。

【0761】

3名の異なるドナーからのT細胞を、オリゴマーストレプトアビジン試薬に可逆的に結合した抗CD3/抗CD28多量体化Fab断片とともにインキュベートした。また、細胞を、同じく抗CD3/抗CD28 Fab断片に可逆的に結合した、101（内部基準）または36nmの平均半径を有する対照オリゴマー試薬とともにインキュベートした。

【0762】

インキュベーションの後、WST-1試薬を細胞に適用し、450nmでの吸光度を読み出しとして計測することによって代謝活性のレベルを評価した。結果を、アッセイ対象の培養物中の細胞の数に対して正規化し、細胞数あたりのWST-1の比として表した。

【0763】

図2Bに示すように、試験された試薬それぞれで刺激されたT細胞の平均WST-1活性は匹敵しうる程度であった。そのうえ、刺激の程度は、試験したすべての試薬に関して同様であり、同様なサイズの内部基準試薬に匹敵しうるものであった（概して±2標準偏差内で異なる）。図2Aは、試薬ごとに別々のデータ点として記されるWST-1活性を示す。図2Aおよび図2Bは、より小さな36nmのオリゴマーストレプトアビジン試薬バックボーン上に多量体化された抗CD3/抗CD28 Fabを使用したとき、WST-1活性によって観測されるT細胞の刺激が低めであったことを示す。

【0764】

実施例3:カラムクロマトグラフィーによるT細胞の選択および刺激

抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激物質の存在下でのオンカラム刺激を伴うカラムに基づくアフィニティークロマトグラフィーによってT細胞を濃縮するために、研究を実施した。

【0765】

本研究では、Sephadex G50（Sigma）が固定相として使用され、臭化シアン（CNBr）活性樹脂を用いてSTREP-TACTIN（登録商標）M2（SEQ ID NO:6）と共有結合された。Sephadex G50の50%懸濁液は、1mLのビーズ懸濁液につき約70 μgの共有結合された7 Strep-tactin（登録商標）を含有した。固定相上へSTREP-TACTIN（登録商標）を固定化した後、固定化されたStrep-tactin（登録商標）試薬へのFabフラグメントの結合を可能とするため、Strep-tactin（登録商標）を含む2mLのSephadex G50懸濁液を、4℃にて20分間、T細胞表面選択マーカーに特異的な10 μgの選択物質を用いてインキュベートした。次いで懸濁液を、底部に90マイクロメートルのフリットを有するプラスチック製ミニカラム内に充填した。カラムは、0.5%のウシ血清アルブミンを含有するPBS（リン酸緩衝食塩水）（PBSA緩衝液）で平衡化され、1mLのベッドボリュームを得た。

【0766】

これらの研究では、実験は、選択物質として抗CD3結合Fabフラグメント、抗CD4結合Fabフラグメントまたは抗CD8結合Fabフラグメントのいずれかを選択物質として使用して実施された。CD3結合Fabフラグメントは、ハイブリドーマ細胞株であるOKT3（ATCC（登録商標）CRL-8001（商標）、米国特許第4,361,549号も参照されたい）により生産されたCD3結合モノクローナル抗体に由来し、Arakawa et al J.Biochem.120,657-662（1996）記載の抗CD3抗体であるOKT3の重鎖可変ドメイン（SEQ ID NO:31）および軽鎖可変ドメイン（SEQ ID NO:32）を含有した。CD4結合Fabフラグメントは、m13B8.2（例えば、米国特許第7,482,000号）から取得され、抗CD4抗体であるm13B8.2の重鎖可変ドメイン（SEQ ID NO:29）および軽鎖可変ドメイン（SEQ ID NO:30）を含有した。CD8結合Fabフラグメントは、OKT8（例えば、ATCC CRL-8014）から取得され、抗CD8抗体であるOKT8の重鎖可変ドメイン（SEQ ID NO:9）および軽鎖可変ドメイン（SEQ ID NO:10）を含有した。それぞれのFabフラグメントの重鎖は、2つのストレプトアビジン結合モジュールの連続配列を含有するTwin Strep-Tag（登録商標）（SEQ ID NO:16）とカルボキシ末端で融合された。

【0767】

10

20

30

40

50

ヒトドナーからのアフエーシス試料をアフィニティーカラム上へと充填し、2回の洗浄工程を実施した。試料の充填時間から30分超の時間が経過した後、実施例1に記載されるように生成されたオリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬（抗CD3/抗CD28オリゴマー試薬）に可逆的に結合された40 μ gの多量体化された抗CD3抗CD28Fabフラグメントを、グルタミンならびに組換えIL-2、IL-15およびIL-7を含有する3mLの無血清基礎培地中でカラム上へと充填し、37°Cでインキュベートした。約24時間後、細胞は、カラムを通して、結合を破壊するさらなる競合物質を加えることなく、グルタミンならびに組換えIL-2、IL-15およびIL-7を含有する80mLの無血清基礎培地を通すことにより、単一の工程でカラムから収集された。対照として、アフエーシス試料を、抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬の存在下でのインキュベーションなしに、抗CD3アフィニティーカラム上へと充填した。対照条件のため、24時間後にD-ビオチンを加えて抗CD3FabのTwin Strep-Tag（登録商標）とSTREP-TACTIN（登録商標）との間の結合を破壊し、放出された細胞を重力流により収集した。

【0768】

抗CD3/抗CD28オリゴマー試薬を用いた刺激の開始後約24時間で、収集された細胞を選択マーカーの表面発現について解析した。図3に示されるように、CD3、CD4、およびCD8のダウンレギュレーションが、選択マーカーに特異的なそれぞれの選択物質を用いたオンカラム選択および刺激試薬を用いたインキュベーション後24時間で観察された。対照的に、細胞がオリゴマー刺激試薬を用いてインキュベートされなかった対照条件に関しては、選択マーカーの受容体ダウンレギュレーションは観察されなかった。これらの結果は、抗CD3/抗CD8刺激試薬を用いたT細胞の刺激が、受容体の表面発現のダウンレギュレーションをもたらし、それによって、競合試薬を加える必要なしにカラムから細胞を自発的に脱離可能としたという観察と一致している。

【0769】

上記のように、T細胞が抗CD3STREP-TACTIN（登録商標）アフィニティーカラム上で選択され、抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬を用いたオンカラム刺激へと供される、類似の研究を実施した。細胞は、オリゴマー刺激試薬の添加後の種々の時点で重力流により収集された。収集された細胞は、アルファ-ベータTCR鎖に対する抗体で直ちに染色され、CD3の表面発現を検出するためにフローサイトメトリによりモニターされた。図4は、抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬の存在下での刺激開始後の、CD3/TCR複合体のダウンレギュレーションおよび再発現の例示的な動態を説明する。示されるように、CD3/TCR複合体の表面発現の迅速なダウンレギュレーションが、刺激の最初の24時間中に観察され、わずか12時間後にCD3/TCR複合体の表面発現が最も減少していることが観察された。36時間より長い間にわたるオリゴマー刺激試薬の存在下でのインキュベーションは、表面CD3/TCR複合体の再発現をもたらし、刺激試薬を用いた刺激の開始後約72時間以内に最大のCD3/TCR複合体表面再発現が達成されていた。これらの結果により、実質的なオンカラム刺激媒介性の自発的T細胞脱離が、刺激試薬を用いたオンカラムインキュベーションの開始後、4～6時間以内に発生し得、12時間または約12時間で最大放出が起こり得ることが支持される。

【0770】

抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬を加えた後約24時間の時点で自発的に脱離した細胞を、最大9日間にわたり、グルタミンならびに組換えIL-2、IL-15およびIL-7を含有する無血清基礎培地中で、37°Cで培養した。インキュベーション中、オリゴマー刺激試薬は除去されなかったが、インキュベーション中に細胞は増殖し続けたため、それは希釈された。細胞は、後続のインキュベーション中の24時間時点と5日目時点で、サイズならびにCD3および活性化マーカーであるCD69およびCD25の発現についてモニターされた。図5Aに示されるように、最大5日間にわたるさらなるインキュベーションにより、24時間時点にて観察されたCD3の初期のダウンレギュレーション後、CD3の再発現がもたらされた。加えて、24時間時点と比較して5日目で、細胞サイズならびに活性化マーカーであるCD25およびCD69の表面発現の増加も観察された。最大9日間にわたる後続のインキュベ

ション後の細胞の数および増殖倍率に関する評価は、自発的に脱離した細胞が高い増殖能力を実証したことを示した（図5B）。これらの結果は、オンカラム選択および短期刺激を経たT細胞が、所望の刺激、活性化および/または増殖を達成するためにさらにインキュベートされうるといふ観察と一致する。

【0771】

これらの結果は、操作されたT細胞組成物を作製するための下流プロセス（例えば、形質導入）に先立ってまたはそれらに関連して標的細胞を単離および刺激する迅速な手段（例えば、24時間未満）としてのオンカラム選択および刺激の使用を支持する。

【0772】

実施例4:小分子mTORキナーゼ阻害剤の存在下で作製された操作T細胞におけるT細胞表現型および機能の評価

ヒトドナー対象からの白血球アフェレーシス試料から、免疫親和性に基づく濃縮によってCD4+T細胞およびCD8+T細胞を単離した。1日目に、単離されたCD4+T細胞およびCD8+T細胞は1:1で混和され、1μMの2-(3-ヒドロキシフェニル)-9-(2-イソプロピルフェニル)-8-オキソ-8,9-ジヒドロ-7H-プリン-6-カルボキシアミド（化合物63）を含むかまたは含まない、組換えIL-2（100 IU/mL）、組換えIL-7（600 IU/mL）、および組換えIL-15（100 IU/mL）を補足した無血清培地中で、実施例1に記載されるように生成された抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬で刺激された。化合物63を含めてまたはこれを含めずに培養されたT細胞は、37°Cで一晩（約24時間）インキュベートされ、次に、抗CD19CARをコードするレンチウイルスベクターを用いて、化合物63（1mM）を含むかまたはこれを含まない無血清培地中で形質導入された。CARは、CD19（FMC63に由来）に特異的なscFv抗原結合ドメイン、CD28膜貫通領域、4-1BB共刺激シグナル伝達領域、およびCD3-ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを含有した。形質導入後、細胞は、組換えサイトカインを含まない無血清培地（基本培地）中で、化合物63（1mM）を含めてまたはこれを含めずにインキュベートされ、抗CD3/抗CD28オリゴマー刺激試薬を用いた刺激の開始後最大96時間（プロセスの5日目まで）にわたってインキュベーター内で約37.0°Cにてインキュベートさせた。インキュベーションを開始後約24時間時点（プロセスの3日目）で、1mMのビオチンが加えられた。インキュベーション後、各ドナーからのCD4+T細胞およびCD8+T細胞は、採取され、製剤化されてクライオ凍結された。

【0773】

クライオ凍結された操作CD4+T細胞およびCD8+T細胞は解凍され、T細胞は、細胞内S6リン酸化反応、リボソーム性タンパク質およびmTOR阻害のマーカーについて評価され、CD4またはCD8の表面発現と、メモリーサブセットのマーカーとしてのCCR7およびCD45RAとについて、共染色された。メモリーサブセットによる生存CD8+T細胞におけるpS6発現が、図6Aに示されるようにCCR7およびCD45RAの発現によって示された。示されるように、化合物63を用いたインキュベーションは、刺激されたメモリーT細胞サブセットであるTemra、Tem、およびTcm細胞の平均蛍光強度を減少させ、mTORの阻害を示したが、その一方で、経時的な生存細胞のパーセンテージまたはその総数においては著しい効果を有さなかった。CD8+T細胞におけるPS6の平均蛍光強度（MFI）は、図6Bに示される。図6Cおよび図6Dに示されるように、化合物63の存在は、生成された組成物中の生存細胞パーセントおよび総生存細胞にそれぞれ影響を与えなかった。

【0774】

記載のプロセスによって生成された、解凍された細胞は、アポトーシスのマーカー（例えば、カスパーゼ陽性CAR-T細胞のパーセンテージ）、表現型プロファイル、ならびにPMA/イオノマイシンおよびゴルジ阻害剤を用いた刺激後に細胞内サイトカインを産生するための能力について、評価された。図7Aに示されるように、化合物63を用いてインキュベートされた試料からのT細胞は、化合物63を用いてインキュベートされなかったものよりも低い細胞内カスパーゼ発現を呈し、操作された細胞を生成するプロセス中における化合物63の存在は、T細胞組成物の全体的な細胞の健康状態を向上させることを示した。解凍された細胞はまた、フローサイトメトリによるCD27およびCCR7の表面発現のために染

10

20

30

40

50

色された。図7B（CD8+T細胞）および図7D（CD4+T細胞）に示されるように、化合物63を用いたインキュベーションは、CD27および/またはCCR7の発現により評価されたとおり、細胞の表現型サブセットプロファイルを実質的に変化させることはなかった。化合物63の存在下で作製されたCD4+T細胞およびCD8+T細胞の機能的活性は、細胞内サイトカインであるIL2、IFNgまたはTNFのレベルによって明白であるとおおり、化合物63の存在下で事前に作製された操作CD8+T細胞（図7C）およびCD4+T細胞（図7E）の両方において実質的に向上された。

細胞の機能的活性をさらに評価するため、生成されたT細胞組成物は、抗CD19CARに対する抗イディオタイプ（ID）抗体とコンジュゲートされたビーズを用いて12日間にわたって長期で刺激され、細胞の増殖および生存をモニターし（図7F、左パネル）、総拡大メトリックを曲線下面積により算出した（図7F、右パネル）。示されるように、化合物63の不在下での細胞の刺激により、CARの慢性刺激と一致する経時的な細胞増殖の減少および長期刺激後の持続性機能の喪失がもたらされた。これらの結果は、化合物63の存在下で事前に作製された操作細胞における長期的なCAR特異的刺激後にT細胞の機能の向上が観察されたことを示す。

【0775】

実施例5: 一体化された選択およびオンカラム刺激プロセスを用いて操作されたT細胞の表現型特性および機能的特性の評価

クロマトグラフィーカラムにおいて選択工程および刺激工程を一体化したプロセス（オンカラム選択および刺激）を、実質的に、実施例3に記載されるとおりに、ただし、より大きなスケールにて、実施した。オンカラム選択および刺激プロセスは、実質的に類似であるが刺激工程が選択工程とは別個に溶液中で実施される代替プロセスと比較された。

【0776】

A. オンカラム選択および刺激

0日目に、ヒトドナーからのアフエレーシス試料を、臭化シアン（CNBr）活性樹脂を用いてStrepTactin（登録商標）（SEQ ID NO:6）に共有結合されたSephadex G50（Sigma）固定相を含有するアフィニティークラム上へ充填した。20mLの固定相は最大20億±5億個の細胞を収容する能力を有した。選択物質である、実施例3記載の抗CD3結合Fabフラグメントが、StrepTactinに結合する能力を有する重鎖カルボキシ末端融合ストレプトアビジン結合ペプチド（Twin Strep-Tag（登録商標）；SEQ ID NO:16）を介して固定相上に固定化された。

【0777】

試料の充填時間から約60分後、実施例1に記載されるように生成されたオリゴマーstreptavidin試薬（抗CD3/抗CD28オリゴマー試薬）に可逆的に結合された多量体化抗CD3抗CD28Fabフラグメントが、組換えIL-2（例えば、100 IU/mL）、IL-15（例えば、100 IU/mL）およびIL-7（例えば、600 IU/mL）を含有する無血清培地中、 $0.2 \sim 0.3 \times (1 \sim 2 \mu\text{g}/\text{細胞}100\text{万個})$ の固定用量にてカラム上へと充填され、約4.5時間にわたりカラム内にて37°Cでインキュベートされた。インキュベーション中、抗CD3/抗CD28オリゴマー試薬を用いた刺激は、カラム上の選択物質からの固定化細胞の脱離または放出をもたらした。放出された細胞は、同無血清培地により重力流によってカラムから溶出された。培地はビオチンを含まず、固定相上のStrepTactin（登録商標）と、カラムの固定相上に細胞を固定化するのに使用された抗CD3抗体へと融合されたstreptavidin結合ペプチドとの間の結合を破壊する任意の競合物質も含まなかった。

【0778】

放出され収集された細胞は次いで、例示的な抗CD19CARをコードするレンチウイルスベクターを用い、同じ無血清培地中での1時間にわたるインキュベーションにより、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように形質導入された。例示的なCARは、マウス抗体FMC63由来の抗CD19scFv、免疫グロブリンスペーサ、CD28由来の膜貫通ドメイン、4-1BB由来の共刺激領域、およびCD3-ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含有した。形質導入のため、培養液量は 1×10^6 細胞/mLに調整された。

【0779】

形質導入された細胞は洗浄され、次いで37℃でさらにインキュベートされた。抗CD3/抗CD28オリゴマー試薬を用いたオンカラム刺激の開始後約48時間で、1.0mMのD-ビオチンを加えて細胞と混和し、可溶性オリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬から抗CD3Fabおよび抗CD28Fabを解離させた。

【0780】

ビオチンの添加後、細胞は追加で約24時間にわたって37℃でさらにインキュベートされた。細胞は次に2つのサブセットに分割された。第1サブセットにおいては、細胞は凍結保護物質を用いて直接製剤化された。第2サブセットにおいては、インキュベーション工程および形質導入工程中に使用されるIL-2、IL-7およびIL-15の濃度の2倍を含有する無血清培地中、 0.5×10^6 細胞/mLに、細胞の液量が調整された。この第2サブセットの細胞は、培地交換を伴う静置培養にて37℃でさらに5日間にわたり培養することにより、拡大培養のためにさらにインキュベートされ、その後、凍結保護物質を用いて製剤化された。

【0781】

B. 代替プロセス:選択と刺激の分離（溶液中）

代替プロセスは、一般には上に記載されるとおりに進行したが、選択および刺激のための工程はカラム中で一体化されなかった。同じヒトドナーからのアフエーシス試料が、CD3+T細胞の選択のために、上記の抗CD3選択試薬を含有するアフィニティーカラム上へと充填された。選択された細胞を溶出するために、1.0mMのD-ビオチンがカラムに加えられ、溶出された細胞が収集された。D-ビオチンは競合物質として作用し、抗CD3Fabへと融合されたストレプトアビジン結合ペプチドと固定相上のStrepTactin（登録商標）との結合を破壊し、カラムからの細胞および抗CD3 Fabを放出した。

【0782】

代替プロセスの0日目に、選択された細胞を洗浄し、 1×10^6 /mLへと希釈し、実施例1にて記載されるように生成された抗CD3/抗CD28 Fabコンジュゲートオリゴマーストレプトアビジンムテイン試薬を固定用量（0.3×、約2μg/細胞100万個）で用いたインキュベーションにより刺激した。刺激は、組換えIL-2（例えば、100 IU/mL）、組換えIL-7（例えば、600 IU/mL）、および組換えIL-15（例えば、100 IU/mL）を含有する無血清培地中で、約18～30時間（24±6時間）の間にわたって実施された。

【0783】

刺激後、細胞は、上記の同じ例示的な抗CD19CARをコードするレンチウイルスベクターを用いて、同じ無血清培地中で30分間にわたるスピノキュレーションによって形質導入された。

【0784】

スピノキュレーション後、細胞は洗浄され、次いで37℃でさらにインキュベートされた。抗CD3/抗CD28オリゴマー試薬を用いた刺激の開始後約48±6時間で、1.0mMのD-ビオチンを加えて細胞と混和し、オリゴマーストレプトアビジン試薬から抗CD3 Fabおよび抗CD28 Fabを解離させた。

【0785】

ビオチンの添加後、細胞は追加で約24時間にわたって37℃でさらにインキュベートされた。細胞は次に、上と同様に2つのサブセットに分割された。第1サブセットにおいては、細胞は凍結保護物質を用いて直接製剤化された。第2サブセットにおいては、細胞は、培地交換を伴う静置培養にて37℃でさらに5日間にわたり培養することにより、拡大培養のためにさらにインキュベートされ、その後、凍結保護物質を用いて製剤化された。

【0786】

C. 細胞回収および表現型の評価

オンカラム選択および刺激後にカラムから放出されたCD3+T細胞、CD4+T細胞およびCD8+T細胞の収率を、細胞を放出するためのビオチンの添加を含み、選択のみがカラム上で実施された代替プロセスにおいてカラムから放出された細胞に対して、比較した。図8Aに示されるように、CD3+T細胞収率、ならびにCD4+T細胞およびCD8+T細胞収率は

10

20

30

40

50

、双方のプロセスにおいて類似していた。オンカラム選択および刺激後にカラムから放出された細胞における刺激後の生存細胞の総細胞数およびパーセンテージを、代替プロセスにおける選択された細胞の個別刺激後の細胞と比較した。図8Bおよび8Cは、双方のプロセスについて刺激後の生存細胞の総細胞数およびそのパーセンテージをそれぞれ示す。この実験では、細胞回収は、オンカラム刺激を用いるプロセスに関して、より多かった。

【0787】

追加の5日間の培養を含むプロセスについて、各プロセスにより操作された細胞集団の質および表現型が、培養5日目（プロセスの開始から8日目）に評価された。図9Aおよび9Bは、各プロセスについて、回収された生存T細胞のパーセンテージおよび例示的なCAR（CAR+）を発現する生存細胞のパーセンテージをそれぞれ示す。5日間（プロセスの開始から8日目）にわたるさらなる培養後に双方のプロセスから生成された組成物からの試料は、CD4、CD8、CD27およびCCR7を含むマーカーの表面発現について、フローサイトメトリによって評価された。図9Cは、さらなる培養（5日目）後の培養最終日に細胞組成物中に存在する生存CD4+T細胞のパーセンテージに対する、選択工程（代替プロセス）または一体化された選択および刺激工程（オンカラム刺激）から得られたCD4+T細胞のパーセンテージの比較を提供する。

【0788】

図9Dは、オンカラム刺激プロセスにより生成された組成物中のCD27-CCR7-T細胞、CD27+CCR7-T細胞、CD27+CCR7+T細胞およびCD27-CCR7+T細胞のパーセンテージが、代替プロセスにより作製された細胞組成物中に存在するパーセンテージに類似していたことを示す。

【0789】

D. オンカラム刺激を用いて製造された操作T細胞の機能の評価

オンカラム刺激を含むプロセスを用いて製造された操作T細胞の機能的能力は、インビトロおよびインビボの両方で評価された。結果は、代替プロセスを用いて製造された操作T細胞に対して比較された。

【0790】

1. インビトロ機能解析

操作された抗CD19CAR T細胞を、CD19を発現するHEK細胞（HEK CD19）と、5:1のエフェクター:標的比で共培養することによって、細胞溶解活性を評価した。細胞溶解は、培養中の複数の時点にて行われたインピーダンス計測によって測定された。対照条件は、異なる標的（BCMA）に対する代替CARを発現するT細胞（HEK CD19+BCMA CAR）、標的細胞のみ（HEK CD19+のみ）、または抗CD19 CAR T細胞を用いてインキュベートされた非標的細胞（HEK CD19-&CD19 CAR）のインキュベーションを含んだ。図10に示されるように、細胞溶解活性は標的細胞に特異的であり、オンカラム刺激プロセスによって製造されたCAR T細胞は、代替プロセスにより操作された細胞と類似する強力な細胞溶解活性を呈した。これらのデータは、オンカラム刺激を用いて製造された操作T細胞が、代替プロセスを用いて製造された操作T細胞に匹敵する有効性を有することを実証する。

【0791】

ゴルジ阻害剤の存在下での標的細胞株（CD19+HEK細胞）を用いた抗原特異的刺激後のサイトカインの蓄積をモニターすることにより、操作されたT細胞のサイトカイン活性を評価した。サイトカイン産生は、表面CD4、CD8または抗CD19CARに対しても共染色された細胞内のIFN γ 、IL-2、およびTNF- α に対する細胞内サイトカインの染色後に、フローサイトメトリによって評価された。図11A~11Cは、IFN γ 、IL-2、およびTNF- α をそれぞれ発現するそれぞれの製造プロセスを由来とするCD4+T細胞およびCD8+T細胞サブセットのパーセンテージを示す。T細胞は2つの方法に従って製造したが、CAR発現を欠失しているT細胞は対照として使用された。これらのデータは、CAR T細胞抗原特異的なサイトカイン産生が製造プロセス間では作製された細胞において同等であることを実証する。

【0792】

10

20

30

40

50

2. インビボ機能解析

オンカラム刺激および代替操作プロセスから生成された抗CD19 CAR T細胞を含有するT細胞組成物の抗腫瘍活性を、インビボで比較した。

【0793】

免疫無防備状態のNSGマウスに、0日目時点で 5×10^5 個のB細胞リンパ腫細胞株（Raji）を注射した（静脈注射）。7日目に、マウスに、オンカラム刺激または代替プロセスのいずれかにより作製されたCAR+操作組成物からの 0.75×10^6 個のCAR+T細胞を注射した。3名の異なるドナーからの各プロセスについて3回の製造ランを完了させ、それぞれの作製された操作CAR+T治療用細胞組成物を検査した。図12A~12Cは、注射前のそれぞれの操作された治療用組成物のCD4:CD8比率、形質導入効率、および生存細胞のパーセンテージのそれぞれを示す。示されるように、ドナーによるある程度の変動が観察されたものの、双方のプロセスからの細胞は各ドナーについて同等の操作された細胞を産生した。

【0794】

腫瘍負荷は、CAR-T細胞の投与後最大41日間の異なる時点にて、生存中の発光イメージングによりインビボで測定された。腫瘍注射後6日間は、全ての治療群内の動物が類似の腫瘍負荷を示した（図13）。図14に示されるように、腫瘍負荷は全ての治療群にわたり、経時的に実質的に低減された。これらの結果は、製造プロセスにより作製されたCAR+操作治療T細胞間での匹敵する抗腫瘍効力を実証した。

【0795】

E. 結論

まとめると、これらのデータは、形質導入を含むプロセスの後続工程にて使用するための、選択されたT細胞が抗CD3/抗CD28オリゴマー試薬を用いた刺激の開始後4.5時間以内にカラムから収集されるプロセスを含む、操作T細胞（例えば、CAR+T細胞）を作製するためのプロセスにおいて、オンカラム選択および刺激が使用されうること示す。結果は、オンカラム選択および刺激プロセスが、代替プロセスと同等の表現型的特徴および機能的特徴を呈する操作（例えば、CAR+細胞）細胞組成物をもたらし、その上で、単一の工程において選択と刺激を一体化する能力により、より効率的かつより短時間にて実施されうることを実証する。

【0796】

開示した特定態様は、例えば本発明の様々な局面を例示するなどの目的で提供されているのであって、それらの特定態様に本発明の範囲が限定されることは意図されていない。記載の組成物および方法の様々な変更態様は、本明細書における記載および教示から明らかになるであろう。そのような変形は、本開示の真の範囲および趣旨から逸脱することなく実施することができ、本発明の範囲に包含されるものとする。

【0797】

配列

10

20

30

40

50

No.	配列	説明
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALT GTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAW KNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEAN AWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AAKKAGVNNGNPLDAV QQ	ストレプトアビジン 種: ストレプトマイセス・ アビジニ UniProt No. P22629
2	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPhelleV alThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrGluSerAlaValGlyA snAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrA spGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArg AsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAla ArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrp LysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAla Ser	最小 ストレプトアビジン 種: ストレプトマイセス・ アビジニ
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALT GTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVA WKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTE ANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AAKKAGVNNGNPLD AVQQ	ムテイン ストレプトアビジン Val44-Thr45- Ala46-Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニ
4	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPhelleV alThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValThrAlaArgGlyA snAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrA spGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArg AsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAla ArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrp LysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAla Ser	ムテイン ストレプトアビジン Val44-Thr45- Ala46-Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニ
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALT GTYIGARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAW KNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEAN AWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AAKKAGVNNGNPLDAV QQ	ムテイン ストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala- 46-Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニ

10

20

30

40

50

6	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrIleGlyAlaArgGlyAsnAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaSer	ムテイン ストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala- 46-Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニ
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	ストレプトアビジン 結合ペプチド, Strep-tag(登録商標)
8	WSHPQFEK	Strep-tag(登録商標) II
9	His-Pro-Xaa	ストレプトアビジン 結合ペプチド XaaはGln、Asp およびMetから 選択される
10	His-Pro-Gln-Phe	ストレプトアビジン 結合ペプチド
11	Xaa ₁ -Xaa ₂ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₃ -Xaa ₄	ストレプトアビジン 結合ペプチド Xaa ₁ はTrp、Lys またはArgであり、 Xaa ₂ は任意の アミノ酸であり、 Xaa ₃ はGlyまたは Gluであり、 Xaa ₄ はGly、Lys またはArgである
12	-Trp-Xaa ₁ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₂ -Xaa ₃ -	ストレプトアビジン 結合ペプチド Xaa ₁ は任意の アミノ酸であり、 Xaa ₂ はGlyまたは Gluであり、 Xaa ₃ はGly、Lys またはArgである
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	ストレプトアビジン 結合ペプチドの 配列モジュール

10

20

30

40

50

		Xaaは任意のアミノ酸であり、nは8または12のいずれかである	
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) ⁿ -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	ストレプトアビジン結合ペプチドの配列モジュール nは2または3である	10
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK	Twin-Strep-タグ	
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-タグ	
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK	Twin-Strep-タグ	
18	WSHPQFEKGGGSGGGWSHPQFEK	Twin-Strep-タグ	
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-タグ	
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA-タグ	
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-タグ	20
22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV-タグ	
23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	T7 エピトープ	
24	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV エピトープ	
25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Myc エピトープ	
26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5-タグ	
27	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	ムテイン ストレプトアビジン Val44-Thr45-Ala46-Arg47および Glu117, Gly120, Tyr121 (ムテイン m1-9) 種: ストレプトマイセス・アビジニ	30
28	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	ムテイン ストレプトアビジン Val44-Thr45-Ala46-Arg47および	40

		Glu117, Gly120, Tyy121 (ムテイン m1-9) 種: ストレプトマイセス・アビジニ
29	AMQVQLKQSG PGLVQPSQSL SITCTVSGFS LTTFGVHWVR QSPGKGLEWL GVIWASGITD YNVPFMSRLS ITKDNSKSQV FFKLNSLQPD DTAIYYCAKN DPGTGFAYWG QGTLVTVSAG STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCGSAWSHPQ FEKGGGSGGG SGGSAWSHPQ FEK	Fabフラグメントの 可変重鎖 m13B8.2
30	AMDIQMTQSP ASLSASVGET VTFTCRASEM IYSYLAWYQQ KQGKSPQLLV HDAKTLAEGV PSRFGGGSG TQFSLKINTL QPEDFGTYYC QAHYGNPPTF GGGTKLEIKR GIAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECGS	Fabフラグメントの 可変軽鎖 m13B8.2
31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	抗CD3抗体である OKT3の可変重鎖
32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	抗CD3抗体である OKT3の可変軽鎖
33	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	抗CD28抗体である CD28. 3の可変重鎖

10

20

30

40

34	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	抗CD28抗体である CD28.3の可変軽鎖
35	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	MAT タグ
36	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala1 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr65 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	huOKT8の可変重鎖
37	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	huOKT8の可変軽鎖
38	-PGGG-(SGGGG) ₅ -P-	リンカー Pはプロリンであり、 Gはグリシンであり、 Sはセリンである
39	GSADDAKKDAAKKDGS	リンカー
40	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR アルファ鎖 (アミノ酸)
41	atgcttctctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattctctgatccc a	GMCSFR アルファ鎖 (核酸)
42	MALPVTALLLPLALLHA	CD8 アルファ シグナルペプチド
43	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINAT NIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLA VVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLF GTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPR	切断型 表皮成長因子 受容体 (tEGFR)

10

20

30

40

50

	DCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPEC LPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGE NNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTP KIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	
44	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAF RGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH AFENLEIIRGR TKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKA TGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN LLEGEPREFVENSECIQCHPEC LPQAMNITCTGRGPDNCIQ CAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHL CHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMVGALLLLLVV ALGIGLFM	切断型 表皮成長因子 受容体 (tEGFR)
45	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
46	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
47	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
48	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
49	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
50	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
51	DYGVS	CDR H1
52	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
53	YAMDYWG	CDR H3
54	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
55	RASQDISKYL N	CDR L1
56	SRLHSGV	CDR L2
57	HTSRLHS	CDR L2
58	GNTLPYTFG	CDR L3
59	QQGNTLPYT	CDR L3
60	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP RKGLEWLGVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S	VH

10

20

30

40

50

61	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	VL
62	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	リンカー
63	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgccagcctggcgaccgggtgacc atcagctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacctaactggatcagcagaagccc gacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggctgcacagcggcgtgcccagc cggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacctctccaacctggaacagg aagatatgccacactacttttgcagcagggaacacactgccctacacctttggcgcgga acaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgagg gcagcaccagggcgagggtgaagctgcaggaaagcgccctggcctggtggccccagc cagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccactacggcgtgagc tggatccggcagccccccaggaaggcctggaatggctggcgctgatctggggcagcga gaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgacctatcaaggacaacagcaa gagccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactactgc gccaagcactactactacggcgagctacgcatggactactggggccagggcaccagc gtgacctgagcagc	scFVをコードする 配列
64	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPD GTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTK GEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLEWLGVWIGSETTYYNALKSRLTIHKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVS S	scFv
65	SYWMN	CDR H1
66	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
67	KTISSVVDYFDY	CDR H3
68	QQYNRYPYT	CDR L3
69	SYWMN	CDR H1
70	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
71	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTTVT VSS	VH
72	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQK PGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSK DLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL

10

20

30

40

50

73	KASQNVGTNVA	CDR L1
74	SATYRNS	CDR L2
75	QQYNRYPYT	CDR L3
76	SYWMN	CDR H1
77	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
78	KTISSVVDYFDY	CDR H3
79	GGGGSGGGSGGGGS	リンカー
80	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTA YMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTTVT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVT CKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDR FTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGG TKLEIKR	scFv
81	ESKYGPPCPPCP	スパーサ (IgG4ヒンジ) (aa) ホモ・サピエンス (Homo sapiens)
82	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	スパーサ (IgG4ヒンジ) (nt) ホモ・サピエンス
83	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	ヒンジ-CH3 スパーサ ホモ・サピエンス
84	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	ヒンジ-CH2-CH3 スパーサ ホモ・サピエンス
85	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRG GEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQ DLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEE GLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPP QRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSG	IgD-ヒンジ-Fc ホモ・サピエンス

10

20

30

40

50

	FSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWS VLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLNASRSLEVSIVTD H	
86	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	例示的なIgGヒンジ
87	X1PPX2P X1 はグリシン、システインまたはアルギニンである X2 はシステインまたはトレオニンである	例示的なIgGヒンジ
88	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	例示的なIgGヒンジ
89	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	例示的なIgGヒンジ
90	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPC PRCPEPKSCDTPPPCPRCP	例示的なIgGヒンジ
91	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	例示的なIgGヒンジ
92	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	例示的なIgGヒンジ
93	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	例示的なIgGヒンジ
94	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	例示的なIgGヒンジ
95	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (アクセッション番号 P10747のアミノ酸 153～179) ホモ・サピエンス
96	IEVMYPPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (アクセッション番号 P10747のアミノ酸 114～179) ホモ・サピエンス
97	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	CD28 (P10747のアミノ酸 180～220) ホモ・サピエンス
98	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	CD28 (LL → GG) ホモ・サピエンス

10

20

30

40

99	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE L	4-1BB (Q07011.1のアミノ酸 214～255) ホモ・サピエンス
100	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ゼータ ホモ・サピエンス
101	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ゼータ ホモ・サピエンス
102	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ゼータ ホモ・サピエンス
103	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValT hrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrGluSerAlaValGlyAsn AlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAsp GlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAs nAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArg IleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLys SerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaSer	最小 ストレプトアビジン 種: ストレプトマイセス・ アビジニ
104	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValT hrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValThrAlaArgGlyAsn AlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAsp GlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAs nAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArg IleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLys SerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaSer	ムテイン ストレプトアビジン Val44-Thr45- Ala46-Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニ
105	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValT hrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrIleGlyAlaArgGlyAsnA laGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspG lySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsn AlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgI leAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysS erThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaSer	ムテイン ストレプトアビジン Ile44-Gly45-Ala- 46-Arg47 種: ストレプトマイセス・ アビジニ
106	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSF	ヒト IgG2 Fc (Uniprot P01859)

10

20

30

40

	FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
107	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ヒトIgG4 Fc (Uniprot P01861)
108	GVQVETISPGDGRFTFPRGQTCVVHYTGMLDGGKMDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE	FKBP
109	GVQVETISPGDGRFTFPRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSRDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLE	FKBP12v36
110	MGSNKSCKPDASQRRR	修飾された アシル化モチーフ
111	Met-Gly-Cys-Xaa-Cys	デュアルアシル化 モチーフ
112	Cys-Ala-Ala-Xaa	アシル化領域
113	EVQLVQSGAEMKKPGASLKLSCASGYTFIDYYVYWMRQAPGQGLESMDGWNPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAMYYCARSQRDGYMDYWGQGTLVTVSS	可変重 (V _H) 抗BCMA
114	QSALTQPASVSASPGQSIASCTGTSSDVGWYQQHPGKAPKLMIYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYICSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG	可変軽 (V _L) 抗BCMA
115	ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ヒンジ-CH ₂ -CH ₃ スパーサ ホモ・サビエンス
116	QIQLVQSGPELKPKGETVKISCKASGYTFDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSTVTVSS	可変重 (V _H) 抗BCMA
117	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRITPRTFGGGTKLEIK	可変軽 (V _L) 抗BCMA

10

20

30

40

118	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFTNFGMNWVKQ APGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSATT AYLQINNLTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFAYWGQGT LTVSA	可変重 (V _H) 抗 BCMA
119	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSITCRASQDVNTAVSWYQQK PGQSPKLLIFSASYRYTGVPDRFTGSGSGADFTLTISVQAE DLAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLDIK	可変軽 (V _L) 抗 BCMA
120	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGIIYPGDSSTRYSPSFQGHVTISADKSISTAYL QWSSLKASDTAMYYCARYSGSFDNWGQGTLLTVSS	可変重 (V _H) 抗 BCMA
121	SYELTQPPSASGTPGQRVTMSCSGTSSNIGSHSVNWWYQQLP GTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSED EADYYCAAWDGSNLGLVFGGGTKLTVLG	可変軽 (V _L) 抗 BCMA
122	GGGS	リンカー
123	GGGS	リンカー
124	SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA	リンカー
125	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTMTEDTSTDYAY MELSSLRSEDYAVYYCARSGYSKIVSYMDYWGQGTLLTV VSS	可変重 (V _H) 抗 BCMA
126	LPVLTQPPSTSGTPGQRVTVSCSGSSSNIGSNVFWYQQLP GTAPKLVIYRNNQRPSGVPDRFSVSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVLG	可変軽 (V _L) 抗 BCMA
127	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGRIIPILGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDYAVYYCARSGYGSYRWEDSWGQGTLLTVSS	可変重 (V _H) 抗 BCMA

10

20

30

40

50

128	QAVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNYVFWYQQLP GTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCAAWDDSLASASYVFGTGTKVTVLG	可変軽 (V _L) 抗 BCMA
129	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVR QAPGQRLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQDRITVTRDTSSN TGYMELTRLRSDDTAVYYCARSPYSGVLDKKGQGTLLTV SS	可変重 (V _H) 抗 BCMA
130	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGFDVHWYQQL PGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAE DEADYYCQSYDSSLSGYVFGTGTKVTVLG	可変軽 (V _L) 抗 BCMA
131	KYGPPCPPCP	ヒンジ

10

20

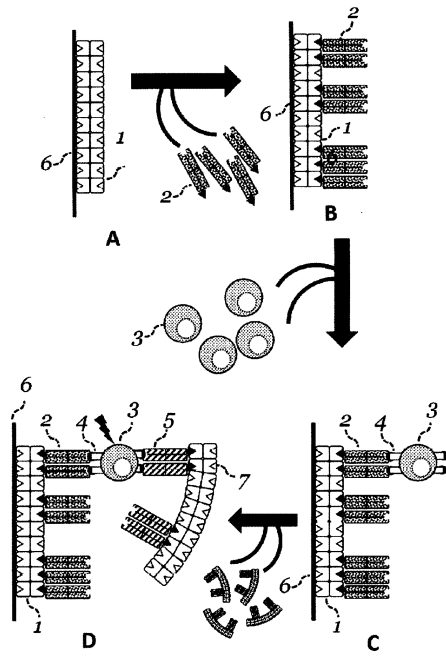
30

40

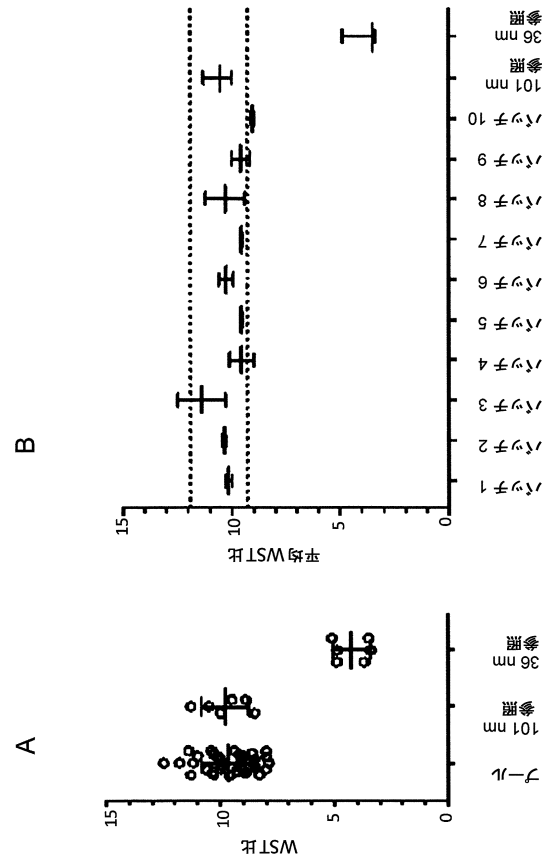
50

【図面】

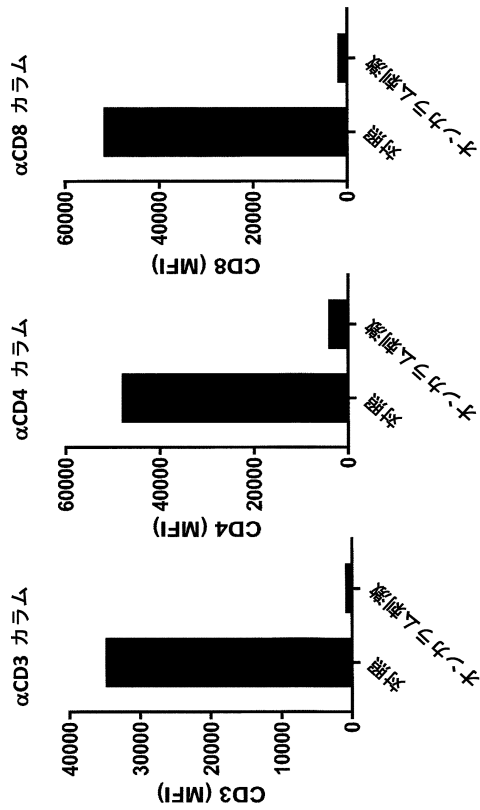
【図 1】



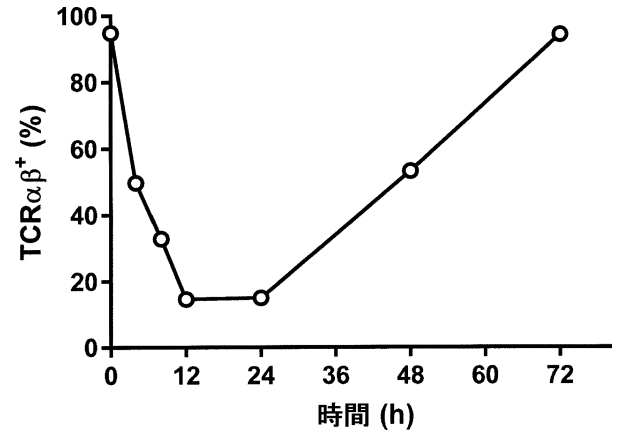
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

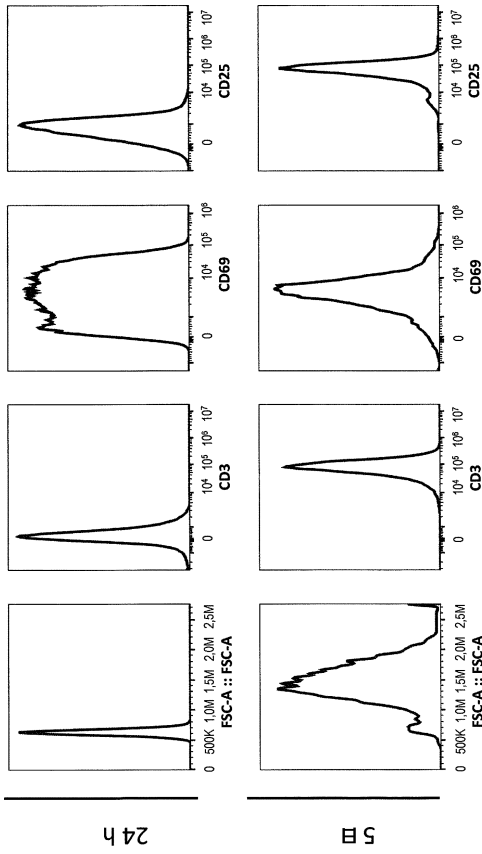
20

30

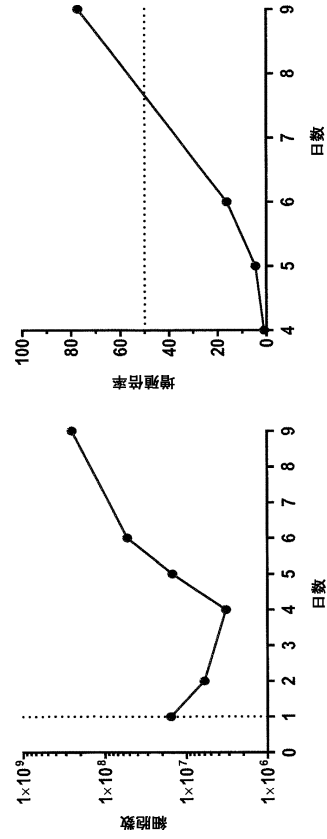
40

50

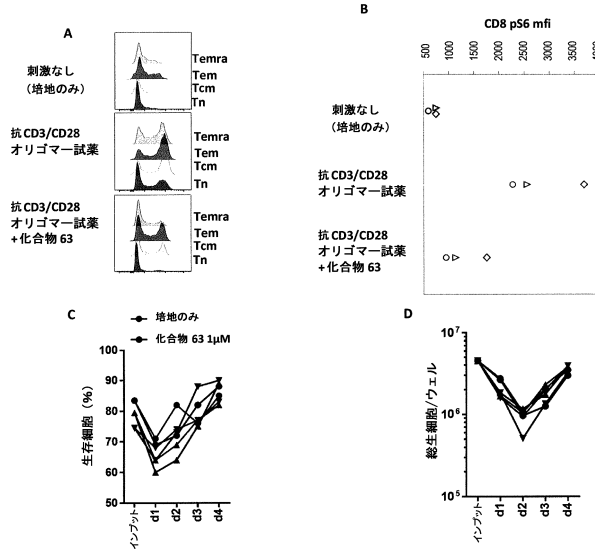
【図 5 A】



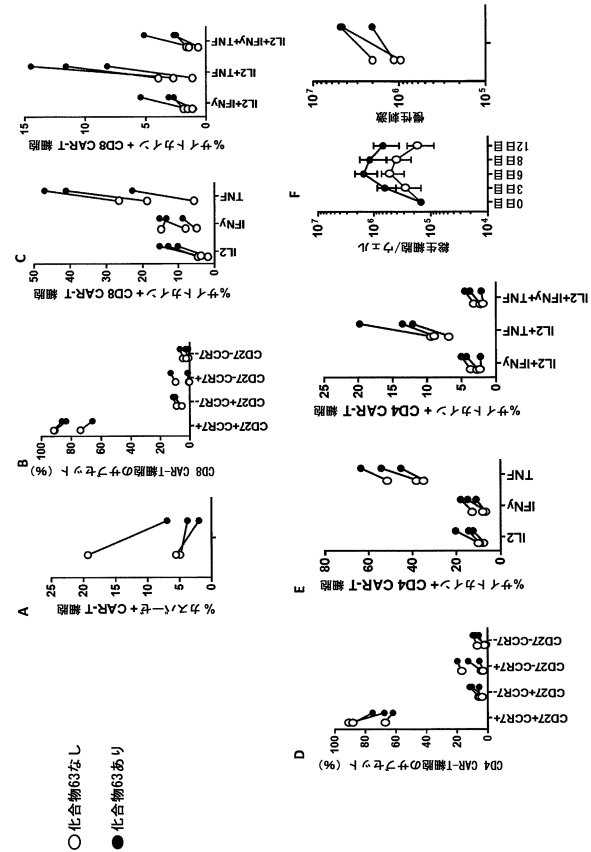
【図 5 B】



【図 6】



【図 7】



10

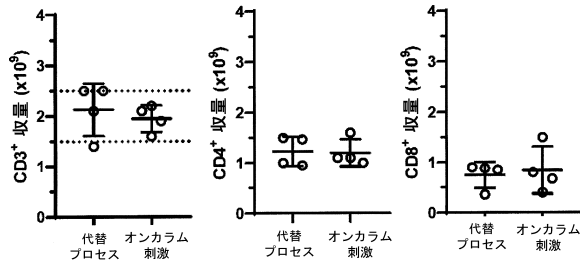
20

30

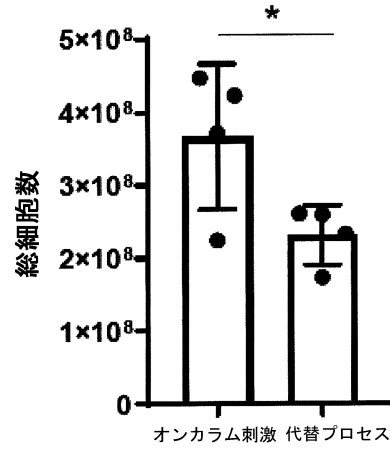
40

50

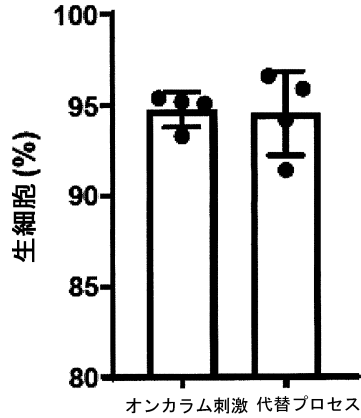
【図 8 A】



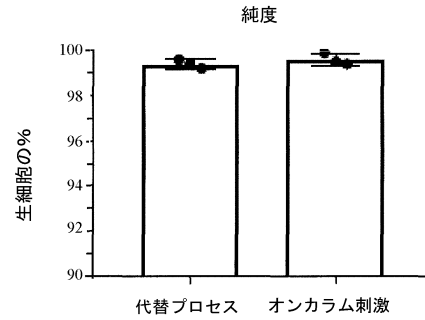
【図 8 B】



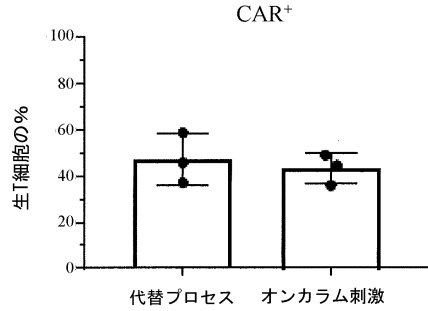
【図 8 C】



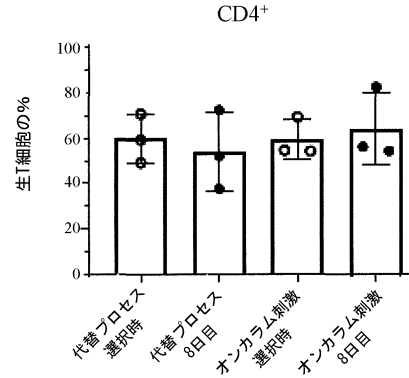
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 9 C】



10

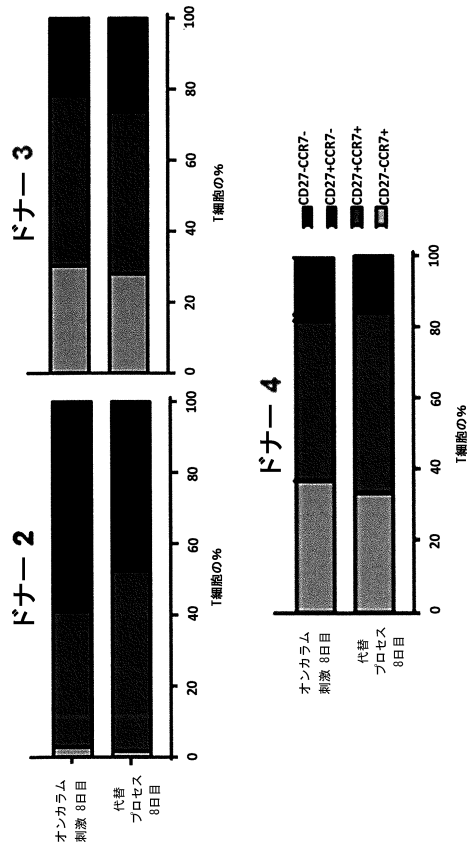
20

30

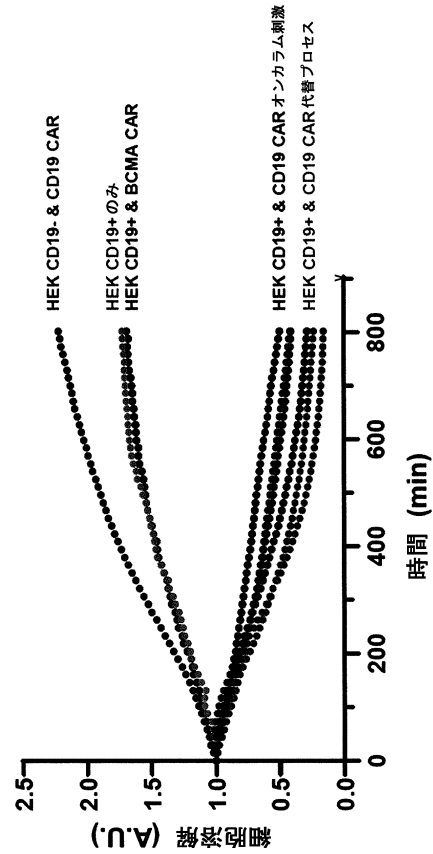
40

50

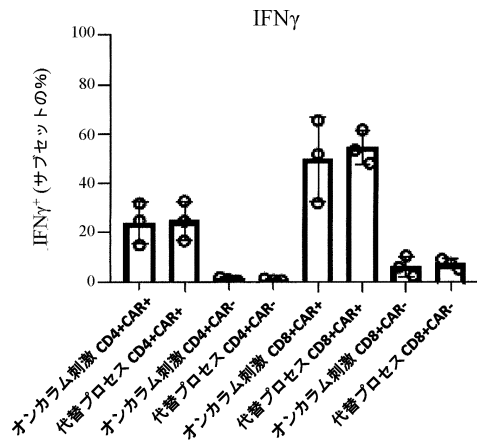
【図 9 D】



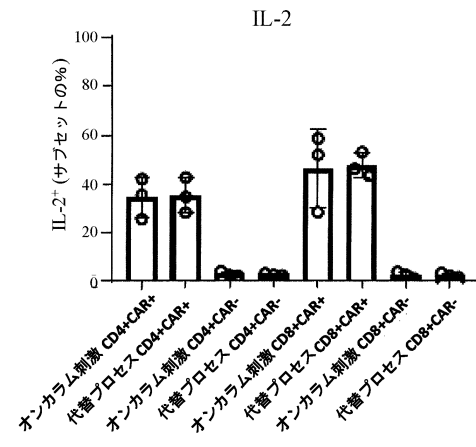
【図 10】



【図 11 A】



【図 11 B】



10

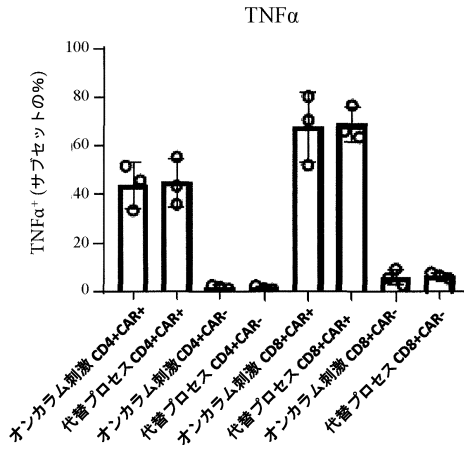
20

30

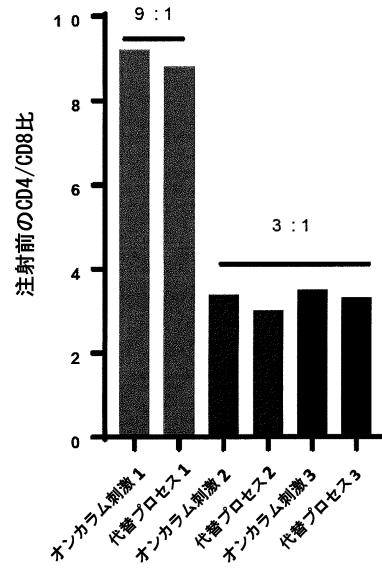
40

50

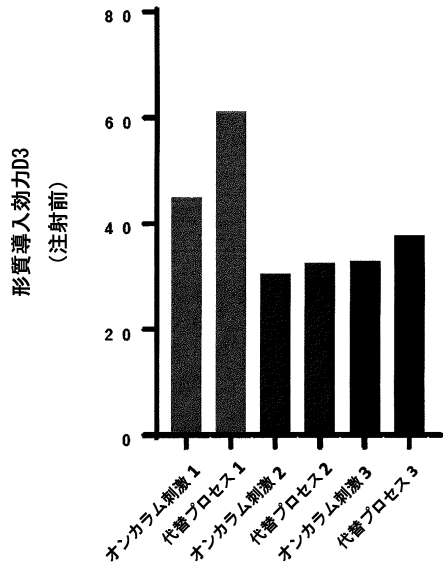
【図 1 1 C】



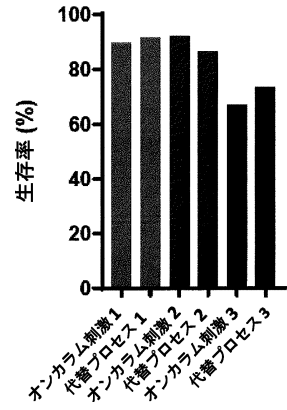
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



10

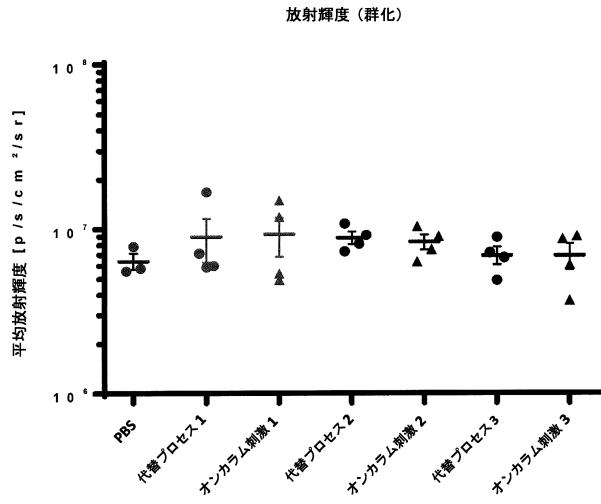
20

30

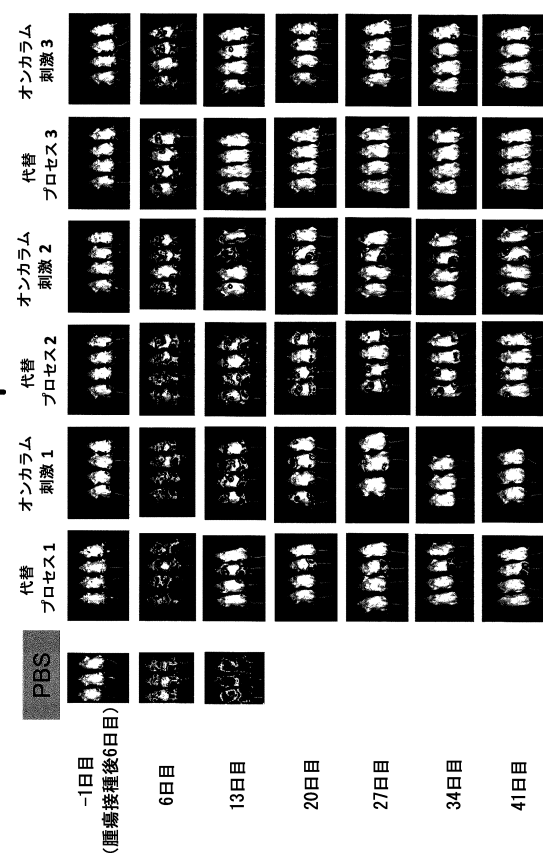
40

50

【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

0007582940000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	11/06	(2006.01)	C 1 2 N	11/06	
C 1 2 N	11/08	(2020.01)	C 1 2 N	11/08	
C 1 2 N	11/10	(2006.01)	C 1 2 N	11/10	
C 1 2 N	11/12	(2006.01)	C 1 2 N	11/12	
C 1 2 N	11/14	(2006.01)	C 1 2 N	11/14	
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 N	15/867	(2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	15/86	(2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/861,314

(32)優先日 令和1年6月13日(2019.6.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ゲルメロート ローター
ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 5 ミュンヘン グリルパーザーシュトラッセ 1 0

(72)発明者 シュテムベルガー クリスティアン
ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 5 ミュンヘン グリルパーザーシュトラッセ 1 0

(72)発明者 ボルトラック マテウシュ パヴェル
ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 5 ミュンヘン グリルパーザーシュトラッセ 1 0

(72)発明者 シュミット トーマス
ドイツ連邦共和国 8 1 6 7 5 ミュンヘン グリルパーザーシュトラッセ 1 0

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 0 6 8 4 2 5 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8