

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-513434

(P2023-513434A)

(43)公表日 令和5年3月31日(2023.3.31)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z 4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z Z N A
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全138頁) 最終頁に続く		

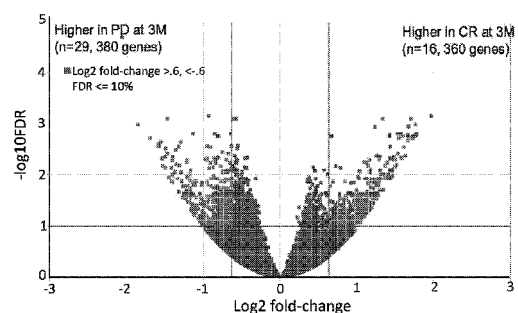
(21)出願番号	特願2022-545028(P2022-545028)	(71)出願人	516316897
(86)(22)出願日	令和3年1月22日(2021.1.22)		ジュノー セラピューティクス インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年9月16日(2022.9.16)		アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン
(86)国際出願番号	PCT/US2021/014775		州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0 0 スイート 1 2 0 0
(87)国際公開番号	WO2021/151008	(74)代理人	100102978
(87)国際公開日	令和3年7月29日(2021.7.29)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/965,774	(74)代理人	100102118
(32)優先日	令和2年1月24日(2020.1.24)		弁理士 春名 雅夫
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	63/037,542		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	令和2年6月10日(2020.6.10)	(74)代理人	100119507
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 刑部 俊
(31)優先権主張番号	63/068,975	(74)代理人	100142929
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 養子細胞療法における投与ならびに濾胞性リンパ腫および辺縁帯リンパ腫の処置のための方法

(57)【要約】

本明細書において、低悪性度非ホジキンリンパ腫（NHL）を有する対象を処置するためのある用量のT細胞を投与する方法、ならびに関連する方法、組成物、使用、および製造物品が提供される。細胞は、リンパ腫の抗原、例えばCD19を標的とするための組換え受容体、例えば、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する。一部の態様では、方法は、多くの治療歴を有するかまたは予後不良である対象、例えば、1つまたは複数の前治療による処置後に再発しているかあるいは1つまたは複数の前治療による処置に対して抵抗性である対象におけるものを含む、グレード1〜3Aの濾胞性リンパ腫（FL 1〜3A）または辺縁帯リンパ腫（MZL）を処置するためである。

FIG. 1A



【特許請求の範囲】

【請求項1】

再発性/抵抗性（r/r）濾胞性リンパ腫（FL）グレード1、2または3Aである疾患を有するかまたは有することが疑われる対象に、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞を投与する段階を含む、低悪性度濾胞性リンパ腫（FL）グレード1、2または3Aを処置する方法であって、

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み、

該対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該投与が、複数の別個の組成物を投与することを含み、該複数の別個の組成物が、CD8⁺CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前記方法。

【請求項2】

少なくとも1ラインの前治療が、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療の開始から24ヶ月以内に該疾患の進行を有していた（POD24）、請求項2記載の方法。

【請求項4】

対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ、

抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療を完了した後、診断から24ヶ月以内に該疾患の進行を有していた（POD24）、
請求項2または請求項3記載の方法。

【請求項5】

抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む少なくとも1ラインの前治療が、リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキシソルピシン、およびプレドニゾロン（R-CHOP）を含む化学免疫療法の組み合わせ療法である、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

対象が、最初のFL診断から6ヶ月以内に前記1ラインの前治療を受けた、請求項2～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ、

FLに起因する症状；末端器官機能の危機（threatened end-organ function）、リンパ腫に続発する血球減少、またはbulky病変；脾腫；および先行する6ヶ月以上にわたる疾患の着実な進行
の少なくとも1つを有する、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

少なくとも1ラインの前治療が2ラインの前治療である、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

2ラインの前治療のもう一方が、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン＋リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン＋オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSC T（任意で自己由来HSC Tまたは同種異系HSC T）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤（PI3Ki）による処置から選択され、任意で、PI3Kiが、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

対象が、1ラインの前治療の完了から12ヶ月以内に、処置に対して抵抗性であるかまたは再発しており、任意で、1ラインの前治療が、PI3Kiを含む併用療法または単独療法である、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 11】

対象がHSC T後に再発している、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

少なくとも1ラインの前治療が3ラインの前治療である、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

3ラインの前治療のうち残りの2ラインの前治療が各々独立して、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン＋リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン＋オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSC T（任意で自己由来HSC Tまたは同種異系HSC T）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤（PI3Ki）による処置から選択され、任意で、PI3Kiが、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである、請求項12記載の方法。

20

【請求項 14】

対象が、抗CD20抗体による処置に対して抵抗性である、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

対象が、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療に対して抵抗性である、請求項1～14のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 16】

対象が、抗CD20抗体による処置の完了から6ヶ月以内に再発している、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

対象が、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療の完了から6ヶ月以内に再発している、請求項1～16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

対象が、2ライン以上の治療後の抗CD20抗体維持療法の間または抗CD20抗体維持療法の完了後6ヶ月以内に再発している、請求項1～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

対象が、少なくとも1つのPET陽性病変および少なくとも1つの測定可能な結節性病変または節外性病変を有し、任意で、測定可能な結節性病変が、短軸に関係なく、長軸方向に1.5 cm超であり、測定可能な節外性病変が、長軸および短軸方向に1.0 cm超である、請求項1～18のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 20】

再発性/抵抗性（r/r）辺縁帯リンパ腫（MZL）を有するかまたは有することが疑われる対象に、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞を投与する段階を含み、該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含む、辺縁帯リンパ腫（MZL）を処置する方法であって、

該対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまた

50

は処置に対して抵抗性であり；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含む；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該投与が、複数の別個の組成物を投与することを含み、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前記方法。

【請求項21】

MZLが、節外性MZL（ENMZL、主に胃）、脾MZL（SMZL）、および節性MZL（NMZL）の中から選択されるサブタイプである、請求項20記載の方法。

【請求項22】

少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つが、MZLを処置するための組み合わせ全身療法であるか、または造血幹細胞移植（HSCT）である、請求項20または請求項21記載の方法。

【請求項23】

少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つが、MZLを処置するための組み合わせ全身療法であり、該組み合わせ全身療法が、リツキシマブ＋シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CHOP）、または抗CD20抗体およびアルキル化剤による療法から選択される、請求項20～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤である組み合わせ全身療法である、請求項20～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

対象が脾MZL（SMZL）を有し、かつ少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つが、脾臓摘出である、請求項20～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

対象が節外性MZL（ENMZL）を有し、かつ抗生物質が、少なくとも2ラインの前治療のうちの1つではない、請求項20～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

対象が、長軸方向に2.0 cm超の少なくとも1つの測定可能な結節性病変または少なくとも1つの測定可能な節外性病変を有するPET非集積疾患（PET non-avid disease）を有する、請求項20～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

対象が、FLグレード3B（FL3B）を有さない、請求項1～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

対象が、複合型DLBCLおよびFLのエビデンス、または形質転換FL（tFL）のエビデンスを有さない、請求項1～28のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】

対象が、世界保健機関（WHO）下位分類の十二指腸型FLを有さない、請求項1～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

対象が、少なくとも1ラインの前治療に対して再発しており、再発が、該少なくとも1ラインの前治療に対する完全奏効（CR）または部分奏功（PR）である初回奏効後である、請求項1～30のいずれか一項記載の方法。

【請求項32】

対象が、少なくとも1ラインの前治療に対して抵抗性であり、かつ抵抗性の処置が、該

10

20

30

40

50

少なくとも1ラインの前治療に対する安定 (SD) または進行 (PD) である最良効果である、請求項1~31のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

対象が、0または1のEastern Cooperative Oncology Group (ECOG) パフォーマンスステータスを有する、請求項1~32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

抗CD20抗体がモノクローナル抗CD20抗体である、請求項1~33のいずれか一項記載の方法。

【請求項35】

抗CD20抗体が、リツキシマブまたはオビヌツズマブである、請求項1~34のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項36】

抗CD20抗体がリツキシマブである、請求項1~35のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

アルキル化剤が、ベンダムスチンまたはクロラムブシルである、請求項1~36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

前記用量のCD4+およびCD8+T細胞の投与前に、対象にリンパ球枯渇療法を投与する段階をさらに含む、請求項1~37のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

リンパ球枯渇療法が、前記用量のCD4+およびCD8+T細胞の投与の開始前約7日以内に完了する、請求項38記載の方法。 20

【請求項40】

リンパ球枯渇療法の投与が、前記用量のCD4+およびCD8+T細胞の投与の開始前約2~7日以内に完了する、請求項38または請求項39記載の方法。

【請求項41】

リンパ球枯渇療法が、フルダラビンおよび/またはシクロホスファミドの投与を含む、請求項38~40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

リンパ球枯渇療法が、200~400 mg/m²または約200~400 mg/m²、任意で300 mg/m²または約300 mg/m² (両端の値を含む) のシクロホスファミド、および/あるいは20~40 mg/m²または約20~40 mg/m²、任意で30 mg/m²のフルダラビンの、2~4日間、任意で3日間にわたる毎日の投与を含む、請求項38~41のいずれか一項記載の方法。 30

【請求項43】

リンパ球枯渇療法が、300 mg/m²または約300 mg/m²のシクロホスファミドおよび30 mg/m²または約30 mg/m²のフルダラビンの、3日間にわたる同時の毎日の投与を含む、請求項38~42のいずれか一項記載の方法。

【請求項44】

CD19がヒトCD19である、請求項1~43のいずれか一項記載の方法。 40

【請求項45】

キメラ抗原受容体 (CAR) が、抗体FMC63の可変重鎖領域と可変軽鎖領域を含むscFv、15アミノ酸以下でありかつ免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンを含有するスペーサー、膜貫通ドメイン、および、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインと4-1BBのシグナル伝達ドメインである共刺激シグナル伝達領域とを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項1~44のいずれか一項記載の方法。

【請求項46】

免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンが、X₁がグリシン、システイン、またはアルギニンであり、かつX₂がシステインまたはスレオニンである、式X₁PPX₂P (SEQ ID NO: 58) 50

を含む、請求項45記載の方法。

【請求項47】

免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンが、IgG1ヒンジまたはその改変されたバージョンである、請求項45または請求項46記載の方法。

【請求項48】

免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンが、IgG4ヒンジまたはその改変されたバージョンである、請求項45または請求項46記載の方法。

【請求項49】

スペーサーが、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列、または、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションを含む、請求項45～48のいずれか一項記載の方法。

【請求項50】

スペーサーが、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列、または、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションからなる、請求項45～49のいずれか一項記載の方法。

【請求項51】

スペーサーが、12アミノ酸長または約12アミノ酸長である、請求項45～50のいずれか一項記載の方法。

【請求項52】

スペーサーが、SEQ ID NO: 1に示した配列を含む、請求項45～51のいずれか一項記載の方法。

【請求項53】

スペーサーが、SEQ ID NO: 1に示した配列からなる、請求項45～52のいずれか一項記載の方法。

【請求項54】

膜貫通ドメインが、CD28の膜貫通ドメインである、請求項45～53のいずれか一項記載の方法。

【請求項55】

膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 8に示したアミノ酸の配列、あるいは、SEQ ID NO: 8に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る、または少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、請求項45～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項56】

共刺激ドメインが、SEQ ID NO: 12に示した配列を含むか、または、SEQ ID NO: 12に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリエーションである、請求項45～55のいずれか一項記載の方法。

【請求項57】

CD3-ゼータ（CD3ζ）鎖のシグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 13、14、もしくは15に示した配列を含むか、または、SEQ ID NO: 13、14、もしくは15に示した配

10

20

30

40

50

列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリエーションである、請求項45～56のいずれか一項記載の方法。

【請求項58】

scFvが、SEQ ID NO: 35のCDRL1配列、SEQ ID NO: 55のCDRL2配列、およびSEQ ID NO: 56のCDRL3配列；ならびにSEQ ID NO: 38のCDRH1配列、SEQ ID NO: 39のCDRH2配列、およびSEQ ID NO: 54のCDRH3配列を含む、請求項45～57のいずれか一項記載の方法。

【請求項59】

scFvが、RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35) のCDRL1配列、SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) のCDRL2配列、およびGNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) のCDRL3配列；ならびにDYGVN (SEQ ID NO: 38) のCDRH1配列、VIWGSETTYYNNSALKS (SEQ ID NO: 39) のCDRH2配列、およびYAMDYWG (SEQ ID NO: 40) のCDRH3配列を含む、請求項45～57のいずれか一項記載の方法。

【請求項60】

scFvが、N末端からC末端までの順に、SEQ ID NO: 42に示した配列を含むV_L、およびSEQ ID NO: 41に示した配列を含むV_Hを含む、請求項45～59のいずれか一項記載の方法。

【請求項61】

scFvが、SEQ ID NO: 43に示した配列を含む、請求項45～60のいずれか一項記載の方法。

【請求項62】

CARが、N末端からC末端までの順に、SEQ ID NO: 43に示したscFvである細胞外抗原結合ドメイン、SEQ ID NO: 1に示したスペーサー、SEQ ID NO: 8に示した膜貫通ドメイン、SEQ ID NO: 12に示した4-1BB共刺激シグナル伝達ドメイン、およびSEQ ID NO: 13に示したCD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインを含有する、請求項1～61のいずれか一項記載の方法。

【請求項63】

前記用量のCD4+およびCD8+T細胞がそれぞれ、約 5×10^7 個のCAR+T細胞から約 1.1×10^8 個のCAR+T細胞（両端の値を含む）である、請求項1～62のいずれか一項記載の方法。

【請求項64】

前記用量のCD4+およびCD8+T細胞が、 5×10^7 個のCAR+T細胞である、請求項1～63のいずれか一項記載の方法。

【請求項65】

前記用量のCD4+およびCD8+T細胞が、 1×10^8 個のCAR+T細胞である、請求項1～63のいずれか一項記載の方法。

【請求項66】

第1の組成物および第2の組成物が、0～12時間の間隔で、0～6時間の間隔で、もしくは0～2時間の間隔で投与されるか、または第1の組成物の投与および第2の組成物の投与が、同日に、約0から約12時間の間隔で、約0から約6時間の間隔で、もしくは約0から2時間の間隔で行われ；かつ/あるいは

第1の組成物の投与の開始および第2の組成物の投与の開始が、約1分から約1時間の間隔でまたは約5分から約30分の間隔で行われる、請求項1～65のいずれか一項記載の方法。

【請求項67】

第1の組成物および第2の組成物が、2時間以下、1時間以下、30分以下、15分以下、10分以下、または5分以下の間隔で投与される、請求項1～66のいずれか一項記載の方法。

【請求項68】

10

20

30

40

50

第1の組成物および第2の組成物が、2時間未満の間隔で投与される、請求項1～67のいずれか一項記載の方法。

【請求項69】

CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物が、CD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物の前に投与される、請求項1～68のいずれか一項記載の方法。

【請求項70】

前記用量のCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞が、静脈内に投与される、請求項1～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項71】

T細胞が、対象由来の試料から取得された初代T細胞であり、任意で、試料が、全血試料、アフエーシス試料、または白血球アフエーシス試料である、請求項1～70のいずれか一項記載の方法。

【請求項72】

試料が、対象に対するリンパ球枯渇療法の投与の前に該対象から取得される、請求項71記載の方法。

【請求項73】

T細胞が、対象にとって自己由来である、請求項1～72のいずれか一項記載の方法。

【請求項74】

対象がヒトである、請求項1～73のいずれか一項記載の方法。

【請求項75】

前記方法により処置された複数の対象内での完全奏効率（CRR）が、50%超もしくは約50%超、60%超もしくは約60%超、70%超もしくは約70%超、または80%超もしくは約80%超である、請求項1～74のいずれか一項記載の方法。

【請求項76】

CRRが、最大24ヶ月の完全奏効（CR）である最良総合効果（BOR）を有する対象のパーセンテージである、請求項75記載の方法。

【請求項77】

対象がFLグレード1、2、または3Aを有し、かつCRRがPET-CTによって評価される、請求項75または請求項76記載の方法。

【請求項78】

対象がMZLを有し、かつCRRがCTによって評価される、請求項75または請求項76記載の方法。

【請求項79】

再発性/抵抗性（r/r）濾胞性リンパ腫（FL）グレード1、2または3Aである疾患を有するかまたは有することが疑われる対象を処置するためのある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；

該対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該用量が、複数の別個の組成物として投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、
前記使用。

【請求項80】

再発性/抵抗性（r/r）濾胞性リンパ腫（FL）グレード1、2または3Aである疾患を有

10

20

30

40

50

するかまたは有することが疑われる対象の処置のための医薬の製造におけるある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；

該対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該用量が、複数の別個の組成物として投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前記使用。

【請求項81】

再発性/抵抗性（r/r）辺縁帯リンパ腫（MZL）を有するかまたは有することが疑われる対象を処置するためのある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；

該対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該用量が、複数の別個の組成物の投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前期使用。

【請求項82】

再発性/抵抗性（r/r）辺縁帯リンパ腫（MZL）を有するかまたは有することが疑われる対象の処置のための医薬の製造におけるある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；

該対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該用量が、複数の別個の組成物の投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前記使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2020年1月24日に出願された「METHODS FOR DOSING AND TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA AND MARGINAL ZONE LYMPHOMA IN AD OPTIVE CELL THERAPY」と題する米国特許仮出願第62/965,774号、2020年6月

10

20

30

40

50

10日に出願された「METHODS FOR DOSING AND TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA AND MARGINAL ZONE LYMPHOMA IN ADOPTIVE CELL THERAPY」と題する米国特許仮出願第63/037,542号、および2020年8月21日に出願された「METHODS FOR DOSING AND TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA AND MARGINAL ZONE LYMPHOMA IN ADOPTIVE CELL THERAPY」と題する米国特許仮出願第63/068,975号に対する優先権を主張し、これらの内容は、全ての目的についてそれらの全体が参照により組み入れられる。

【0002】

参照による配列表の組み入れ

本願は電子形式での配列表と一緒に出願されている。配列表は、2021年1月13日に作成された、サイズが35,356バイトの735042023440SeqList.txtという名称のファイルとして提供される。配列表の電子形式での情報は、その全体が参照により組み入れられる。

10

【0003】

分野

本開示は、一部の局面では、高リスク対象を含む、低悪性度非ホジキンリンパ腫（NHL）を有する対象を処置するための細胞の用量の投与を伴う養子細胞療法、ならびに関連する方法、組成物、使用、および製造物品に関する。細胞は概して、リンパ腫の細胞上の抗原、例えばCD19を標的とするための、キメラ抗原受容体（CAR）などの組換え受容体を発現する。一部の態様では、低悪性度リンパ腫は、グレード1～3Aの濾胞性リンパ腫（FL 1～3A）、例えば、再発性または抵抗性のFLである。一部の態様では、疾患または状態は、辺縁帯リンパ腫（MZL）、例えば、再発性または抵抗性のMZLである。一部の態様では、対象は、FL 1～3AまたはMZLの対象の特定の群またはサブセットの対象、例えば、多くの治療歴を有する（heavily pretreated）または予後不良の対象である。

20

【背景技術】

【0004】

背景

低悪性度非ホジキンリンパ腫（NHL）サブタイプは、抗CD20標的化療法またはアルキル化剤などの化学免疫療法剤で通常処置される、増殖遅延型リンパ腫疾患である。濾胞性リンパ腫は、リンパ腫症例全体の10%から20%を占める、最も一般的なサブタイプである。辺縁帯リンパ腫は、B細胞NHL症例全体の約8%から12%を占める。多くの患者は、最終的に再発するか、または利用可能な治療に対して抵抗性になり、第二ライン、第三ライン、および特に第四ラインの処置が限定される。1種または複数種の前治療に失敗している、FL 1～3Aおよび MZLを有する患者に有効な療法が必要とされる。このようなニーズを満たす方法および使用が提供される。

30

【発明の概要】

【0005】

概要

本明細書において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞を対象に投与する段階を含む、濾胞性リンパ腫（FL）グレード1、2または3Aである疾患または状態を有するかまたは有することが疑われる対象を処置する方法であって、該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み、対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ該投与が複数の別個の組成物を投与することを含み、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR

40

50

発現T細胞を含む第2の組成物を含む、方法が提供される。

【0006】

本明細書において、再発性/抵抗性 (r/r) 濾胞性リンパ腫 (FL) グレード1、2または3Aである疾患を有するかまたは有することが疑われる対象を処置するためのある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) を含み；対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含有し；該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を有し；かつ該用量が、複数の別個の組成物として投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺CAR発現T細胞を含有する第1の組成物およびCD4⁺CAR発現T細胞を含有する第2の組成物を含む、使用もまた提供される。

10

【0007】

本明細書において、再発性/抵抗性 (r/r) 濾胞性リンパ腫 (FL) グレード1、2または3Aである疾患を有するかまたは有することが疑われる対象の処置のための医薬の製造におけるある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) を含み；対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含有し；該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を有し；かつ該用量が、複数の別個の組成物として投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺CAR発現T細胞を含有する第1の組成物およびCD4⁺CAR発現T細胞を含有する第2の組成物を含む、使用もまた提供される。

20

【0008】

一部の態様では、少なくとも1ラインの前治療は1ラインの前治療である。

【0009】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、1ラインの前治療を完了した後、診断から24ヶ月以内に疾患の進行を有した (POD24)。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、1ラインの前治療を完了した後、1ラインの前治療の開始から24ヶ月以内に疾患の進行を有した (POD24)。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、疾患を処置するための化学免疫療法の組み合わせ療法を完了した後、診断から24ヶ月以内に疾患の進行を有した (POD24)。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、疾患を処置するための化学免疫療法の組み合わせ療法を完了した後、処置の開始から24ヶ月以内に疾患の進行を有した (POD24)。任意のそのような態様の一部において、化学免疫療法の組み合わせ療法は、リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキシソルピシン、およびプレドニゾロン (R-CHOP) を含む。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、R-CHOPによる処置を完了した後、診断から24ヶ月以内に疾患の進行を有した (POD24)。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、R-CHOPによる処置の開始から24ヶ月以内に疾患の進行を有した (POD24)。

30

40

【0010】

任意のそのような態様の一部において、化学免疫療法の組み合わせ療法は、抗CD20モノクローナル抗体およびアルキル化剤を含む。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を完了した後、診断から24ヶ月以内に疾患の進行を有した (POD24)。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置の開始から24ヶ月以内に疾患の進行

50

を有した（POD24）。

【0011】

一部の態様では、対象は、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ、抗CD20抗体およびアルキル化剤である1ラインの前治療の開始から24ヶ月以内に疾患の進行を有した（POD24）。一部の態様では、対象は、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療を完了した後、診断から24ヶ月以内に疾患の進行を有した（POD24）。

【0012】

一部の態様では、対象は、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ以下の少なくとも1つを有する：FLに起因する症状；末端器官機能の危機（threatened end-organ function）、リンパ腫に続発する血球減少、またはbulky病変（bulky disease）；脾腫；および先行する6ヶ月以上にわたる疾患の着実な進行。一部の態様では、対象は、FLに起因する症状を有する。一部の態様では、対象は、末端器官機能の危機を有する。一部の態様では、対象は、FLに起因する症状を有する。一部の態様では、対象は、リンパ腫に続発する血球減少を有する。一部の態様では、対象は、bulky病変を有する。一部の態様では、bulky病変は、>7 cmの腫瘍1つ、または>3 cmの腫瘍3つ以上である。一部の態様では、対象は、脾腫を有する。一部の態様では、対象は、先行する6ヶ月以上にわたる疾患の着実な進行を有する。

【0013】

一部の態様では、少なくとも1ラインの前治療は2ラインの前治療である。一部の態様では、2ラインの前治療のもう一方は、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン+リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン+オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSCT（任意で自己由来HSCTまたは同種異系HSCT）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤（PI3Ki）による処置から選択される。一部の態様では、PI3Kiは、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである。

【0014】

一部の態様では、対象は、処置に対して抵抗性であるか、または1ラインの前治療の完了から12ヶ月以内に再発している。一部の態様では、1ラインの前治療は、PI3Kiを含む併用療法または単独療法である。一部の態様では、2ラインの前治療のもう一方は造血幹細胞移植（HSCT）であり、対象はHSCT後に再発している。

【0015】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20療法による処置に対して抵抗性であるか、あるいは抗CD20療法による処置の間または処置を完了した後最長6ヶ月で再発している（抗CD20抵抗性）。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20療法による処置に対して抵抗性である（抗CD20抵抗性）。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20療法による処置の間または処置を完了した後最長6ヶ月で再発している（抗CD20抵抗性）。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20抗体による処置に対して抵抗性であるか、あるいは抗CD20抗体による処置の間または処置を完了した後最長6ヶ月で再発している。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20抗体による処置に対して抵抗性である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20抗体による処置の間または処置を完了した後最長6ヶ月で再発している。

【0016】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20療法およびアルキル化剤による処置に対して抵抗性であるか、あるいは抗CD20療法およびアルキル化剤による処置の間または処置を完了した後最長6ヶ月で再発している。提供される態様のいずれかの

10

20

30

40

50

一部において、対象は、抗CD20療法 およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療に対して抵抗性である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20療法およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療の完了から6ヶ月以内に再発している。

【0017】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、2ライン以上の治療後の抗CD20抗体維持の間にまたは維持完了後6ヶ月以内に再発した。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、2ライン以上の治療後の抗CD20抗体維持療法の間に再発した。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、抗CD20抗体維持療法の完了後6ヶ月以内に再発した。一部の態様では、対象は、2ラインの前治療後、抗CD20抗体維持療法により処置され、対象は、抗CD20維持療法の間に再発した。一部の態様では、対象は、抗CD20抗体維持療法で処置され、対象は、抗CD20抗体維持療法の完了から6ヶ月以内に再発した。

10

【0018】

一部の態様では、抗CD20抗体はモノクローナル抗体である。任意のそのような態様の一部において、抗CD20モノクローナル抗体は、リツキシマブまたはオビヌツズマブである。任意のそのような態様の一部において、抗CD20モノクローナル抗体はリツキシマブである。任意のそのような態様の一部において、抗CD20抗体はオビヌツズマブである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤は、ベンダムスチンまたはクロラムブシルである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤はベンダムスチンである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤はクロラムブシルである。

20

【0019】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、造血幹細胞移植、任意で同種異系HSCTまたは自己由来HSCT後に再発した。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、造血幹細胞移植（HSCT）後に再発した。提供される態様のいずれかの一部において、造血幹細胞移植は同種異系HSCTである。提供される態様のいずれかの一部において、造血幹細胞移植は自己由来HSCTである。

【0020】

提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも1つの前治療は2ラインの前治療である。任意のそのような態様の一部において、2ラインの前治療のもう一方は、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン＋リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン＋オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ピンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSCT（任意で自己由来HSCTまたは同種異系HSCT）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤による処置から選択され、任意で、PI3K阻害剤は、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである。任意のそのような態様の一部において、2ラインの前治療のもう一方は、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン＋リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン＋オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ピンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSCT（任意で自己由来HSCTまたは同種異系HSCT）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤による処置から選択される。一部の態様では、PI3K阻害剤は、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである。一部の態様では、PI3K阻害剤はイデラリシブである。一部の態様では、PI3K阻害剤はコパンリシブである。一部の態様では、PI3K阻害剤はデュベリシブである。

30

40

【0021】

提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも1つの前治療は3ラインの前治療である。任意のそのような態様の一部において、3ラインの前治療のうちの残り2ラインの前治療は各々独立して、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン＋リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン＋オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ピンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSCT（任意で自己由来HSCTまたは同種異系HSCT）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；

50

またはPI3K阻害剤による処置から選択され、任意で、PI3K阻害剤は、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである。任意のそのような態様の一部において、3ラインの前治療のうちの残り2ラインの前治療は各々独立して、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン+リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン+オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSCT（任意で自己由来HSCTまたは同種異系HSCT）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤による処置から選択される。一部の態様では、PI3K阻害剤は、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである。一部の態様では、PI3K阻害剤はイデラリシブである。一部の態様では、PI3K阻害剤はコパンリシブである。一部の態様では、PI3K阻害剤はデュベリシブである。

10

【0022】

一部の態様では、対象は、抗CD20抗体による処置に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、抗CD20抗体による処置の完了から6ヶ月以内に再発した。一部の態様では、対象は、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療の完了から6ヶ月以内に再発した。一部の態様では、対象は、2ラインの前治療後に抗CD20抗体維持療法によって処置され、対象は、抗CD20維持療法の間にまたは抗CD20抗体維持療法の完了から6ヶ月以内に再発した。

【0023】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、1ラインの前治療の完了から12ヶ月以内に、任意で、PI3Kiによる併用療法または単独療法による処置後に、再発しているかまたは処置に対して抵抗性である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、併用療法の完了から12ヶ月以内に再発しているかまたは処置に対して抵抗性である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、PI3Kiによる単独療法の完了から12ヶ月以内に再発しているかまたは処置に対して抵抗性である。

20

【0024】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、1ラインの前治療の完了から12ヶ月以内に再発しているかまたは処置に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、第1のラインの治療の完了から12ヶ月以内に再発しているかまたは処置に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、第2のラインの治療の完了から12ヶ月以内に再発しているかまたは処置に対して抵抗性である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、1ラインの前治療の完了から12ヶ月以内に再発している。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、第1のラインの治療の完了から12ヶ月以内に再発している。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、第2のラインの治療の完了から12ヶ月以内に再発している。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、1ラインの前治療の完了から12ヶ月以内に処置に対して抵抗性である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、第1のラインの治療の完了から12ヶ月以内に処置に対して抵抗性である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、第2のラインの治療の完了から12ヶ月以内に処置に対して抵抗性である。一部の態様では、1ラインの前治療は、PI3Kiによる併用療法または単独療法による処置である。一部の態様では、1ラインの前治療はPI3Kiによる単独療法である。一部の態様では、1ラインの前治療は併用療法による処置である。

30

40

【0025】

一部の態様では、抗CD20抗体はモノクローナル抗体である。任意のそのような態様の一部において、抗CD20抗体はリツキシマブまたはオビヌツズマブである。任意のそのような態様の一部において、抗CD20抗体はリツキシマブである。任意のそのような態様の一部において、抗CD20抗体はオビヌツズマブである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤はベンダムスチンまたはクロラムブシルである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤はベンダムスチンである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤はクロラムブシルである。

50

【0026】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、少なくとも1ラインの前治療に対して再発しており、再発は、前記ラインの前治療に対する完全奏効（CR）または部分奏功（PR）である初回奏効の後である。提供される態様のいずれかの一部において、再発は、前記ラインの前治療に対する完全奏効（CR）である初回奏効の後である。提供される態様のいずれかの一部において、再発は、前記ラインの前治療に対する部分奏功（PR）である初回奏効の後である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、少なくとも1つまたは複数の前治療による処置に対して抵抗性であり、抵抗性の処置は、前記ラインの前治療後の安定（SD）または進行（PD）である最良効果である。一部の態様では、抵抗性の処置は、前記ラインの前治療後の安定（SD）である最良効果である。一部の態様では、抵抗性の処置は、前記ラインの前治療後の進行（PD）である最良効果である。

10

【0027】

一部の態様では、対象は、1ラインの前治療に対して再発している。一部の態様では、対象は、2ラインの前治療に対して再発している。一部の態様では、対象は、3ラインの前治療に対して再発している。一部の態様では、対象は、4ライン以上の前治療に対して再発している。一部の態様では、対象は、1ラインの前治療に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、2ラインの前治療に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、3ラインの前治療に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、4ライン以上の前治療に対して抵抗性である。

20

【0028】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、少なくとも1つのPET陽性病変および少なくとも1つの測定可能な結節性病変または節外性病変を有し、任意で、測定可能な結節性病変は、短軸に関係なく、長軸方向に1.5 cm超であり、測定可能な節外性病変は、長軸および短軸方向に1.0 cm超である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、少なくとも1つのPET陽性病変および少なくとも1つの測定可能な結節性病変または節外性病変を有する。提供される態様のいずれかの一部において、測定可能な結節性病変は、短軸に関係なく、長軸方向に1.5 cm超であり、測定可能な節外性病変は、長軸および短軸方向に1.0 cm超である。

【0029】

本明細書において、再発性/抵抗性（r/r）辺縁帯リンパ腫（MZL）を有するかまたは有することが疑われる対象にある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞を投与する段階を含む、辺縁帯リンパ腫（MZL）を処置する方法であって、該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み、対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり；該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ該投与が、複数の別個の組成物を投与することを含み、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、方法もまた提供される。

30

40

【0030】

本明細書において、再発性/抵抗性（r/r）辺縁帯リンパ腫（MZL）を有するかまたは有することが疑われる対象を処置するためのある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり；該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含有し；該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を有し；かつ該用量が、複数の別個の組成物の投与用に製剤化さ

50

れ、該複数の別個の組成物が、 $CD8^+$ CAR発現T細胞を含有する第1の組成物および $CD4^+$ CAR発現T細胞を含有する第2の組成物を含む、使用もまた提供される。

【0031】

本明細書において、再発性/抵抗性（r/r）辺縁帯リンパ腫（MZL）を有するかまたは有することが疑われる対象の処置のための医薬の製造におけるある用量の $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞の使用であって、該用量のT細胞が、 $CD19$ に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり；該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含有し；該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現する $CD4^+$ T細胞：CARを発現する $CD8^+$ T細胞の比を有し；かつ該用量が、複数の別個の組成物の投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、 $CD8^+$ CAR発現T細胞を含有する第1の組成物および $CD4^+$ CAR発現T細胞を含有する第2の組成物を含む、使用もまた提供される。

【0032】

提供される態様のいずれかの一部において、MZLは、節外性MZL（ENMZL、主に胃）、脾MZL（SMZL）、および節性MZL（NMZL）の中から選択されるサブタイプである。一部の態様では、MZLは節外性MZL（ENMZL、主に胃）である。一部の態様では、MZLは脾MZL（SMZL）である。一部の態様では、MZLは節性MZL（NMZL）である。

【0033】

提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つは、MZLを処置するための組み合わせ全身療法であるか、または造血幹細胞移植（HSCT）である。提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2つの前治療のうち少なくとも1つは、MZLを処置するための組み合わせ全身療法である。提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2つの前治療のうち少なくとも1つは、造血幹細胞移植（HSCT）である。

【0034】

提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つは、組み合わせ全身療法であり、組み合わせ全身療法は、リツキシマブ+シクロホスファミド、ドキシソルビン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CHOP）、または抗CD20抗体およびアルキル化剤による療法から選択される。提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つは、リツキシマブ+シクロホスファミド、ドキシソルビン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CHOP）である。提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つは、抗CD20抗体およびアルキル化である組み合わせ全身療法である。

【0035】

一部の態様では、抗CD20抗体はモノクローナル抗体である。任意のそのような態様の一部において、抗CD20抗体はリツキシマブまたはオビヌツズマブである。任意のそのような態様の一部において、抗CD20抗体はリツキシマブである。任意のそのような態様の一部において、抗CD20抗体はオビヌツズマブである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤はベンダムスチンまたはクロラムブシルである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤はベンダムスチンである。任意のそのような態様の一部において、アルキル化剤はクロラムブシルである。

【0036】

提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2つの前治療のうち少なくとも1つは、リツキシマブおよびベンダムスチンまたはリツキシマブおよびクロラムブシルである。提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つは、リツキシマブおよびベンダムスチンである。提供される態様のいずれかの一部において、少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つは、リツキシマブお

10

20

30

40

50

よびクロラムブシルである。

【0037】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は脾MZL (SMZL) を有し、少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つは、脾臓摘出である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は節外性MZL (ENMZL) を有し、抗生物質は、少なくとも2ラインの前治療の1つではない。

【0038】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、長軸方向に2.0 cm超の少なくとも1つの測定可能な結節性病変または少なくとも1つの測定可能な節外性病変を有する、PET非集積 (non-avid) 疾患を有する。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、長軸方向に2.0 cm超の少なくとも1つの測定可能な結節性病変を有するPET非集積疾患を有する。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、少なくとも1つの測定可能な節外性病変を有するPET非集積疾患を有する。

10

【0039】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、FLグレード3B (FL3B) を有さない。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、複合型DLBCLおよびFLのエビデンス、または形質転換FLのエビデンスを有さない。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、複合型DLBCLおよびFLのエビデンスを有さない。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、形質転換FLのエビデンスを有さない。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、世界保健機関 (WHO) 下位分類の十二指腸型FLを有さない。

20

【0040】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、少なくとも1ラインの前治療に対して再発しており、再発は、前記ラインの前治療に対する完全奏効 (CR) または部分奏功 (PR) である初回奏効の後である。提供される態様のいずれかの一部において、再発は、前記ラインの前治療に対する完全奏効 (CR) である初回奏効の後である。提供される態様のいずれかの一部において、再発は、前記ラインの前治療に対する部分奏功 (PR) である初回奏効の後である。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、少なくとも1つまたは複数の前治療による処置に対して抵抗性であり、抵抗性の処置は、前記ラインの前治療後の安定 (SD) または進行 (PD) である最良効果である。一部の態様では、抵抗性の処置は、前記ラインの前治療の後の安定 (SD) である最良効果である。一部の態様では、抵抗性の処置は、前記ラインの前治療後の進行 (PD) である最良効果である。

30

【0041】

一部の態様では、対象は、1ラインの前治療に対して再発している。一部の態様では、対象は、2ラインの前治療に対して再発している。一部の態様では、対象は、3ラインの前治療に対して再発している。一部の態様では、対象は、4ライン以上の前治療に対して再発している。一部の態様では、対象は、1ラインの前治療に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、2ラインの前治療に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、3ラインの前治療に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、4ライン以上の前治療に対して抵抗性である。

40

【0042】

提供される態様のいずれかの一部において、対象は、0または1のEastern Cooperative Oncology Group (ECOG) パフォーマンスステータスを有する。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、0のECOGパフォーマンスステータスを有する。提供される態様のいずれかの一部において、対象は、1のECOGパフォーマンスステータスを有する。

【0043】

提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の投与の前に、対象は、リンパ球枯渇療法を投与されている。いずれかの提供される態様の

50

部において、リンパ球枯渇療法は、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の投与の開始前約7日以内に完了する。いずれかの提供される態様の一部において、リンパ球枯渇療法は、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の投与の開始の約2～7日前に完了する。

【0044】

任意のそのような態様の一部において、リンパ球枯渇療法は、フルダラビンおよび/またはシクロホスファミドの投与を含む。任意のそのような態様の一部において、リンパ球枯渇療法は、フルダラビンの投与を含む。任意のそのような態様の一部において、リンパ球枯渇療法は、シクロホスファミドの投与を含む。任意のそのような態様の一部において、リンパ球枯渇療法は、フルダラビンおよびシクロホスファミドの投与を含む。任意のそのような態様の一部において、リンパ球枯渇療法は、200～400 mg/m²または約200～400 mg/m²、任意で300 mg/m²または約300 mg/m²（両端の値を含む）のシクロホスファミド、および/あるいは20～40 mg/m²または約20～40 mg/m²、任意で30 mg/m²のフルダラビンの、2～4日間、任意で3日間にわたる毎日の投与を含む。任意のそのような態様の一部において、リンパ球枯渇療法は、300 mg/m²または約300 mg/m²の（両端の値を含む）シクロホスファミドおよび/あるいは30 mg/m²または約30 mg/m²のフルダラビンの、3日間にわたる毎日の投与を含む。任意のそのような態様の一部において、リンパ球枯渇療法は、300 mg/m²または約300 mg/m²のシクロホスファミドおよび30 mg/m²または約30 mg/m²のフルダラビンの、3日間にわたる同時の毎日の投与を含む。

【0045】

提供される態様のいずれかの一部において、CD19はヒトCD19である。

【0046】

提供される態様のいずれかの一部において、キメラ抗原受容体（CAR）は、抗体FMC 63の可変重鎖領域と可変軽鎖領域を含むscFv、15アミノ酸以下でありかつ免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンを含有するスペーサー、膜貫通ドメイン、および、CD3-ゼータ（CD3ζ）鎖のシグナル伝達ドメインと4-1BBのシグナル伝達ドメインである共刺激シグナル伝達領域とを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0047】

任意のそのような態様の一部において、免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンは、X₁がグリシン、システイン、またはアルギニンであり、かつX₂がシステインまたはスレオニンである、式X₁PPX₂P（SEQ ID NO: 58）を含む。一部の態様では、X₁はグリシンである。一部の態様では、X₁はシステインである。一部の態様では、X₁はアルギニンである。一部の態様では、X₂はシステインである。一部の態様では、X₂はスレオニンである。任意のそのような態様の一部において、免疫グロブリンヒンジまたはその改変されたバージョンは、IgG1ヒンジまたはその改変されたバージョンである。任意のそのような態様の一部において、免疫グロブリンヒンジまたはその改変されたバージョンは、IgG1ヒンジの改変されたバージョンである。任意のそのような態様の一部において、免疫グロブリンヒンジまたはその改変されたバージョンは、IgG4ヒンジまたはその改変されたバージョンである。任意のそのような態様の一部において、免疫グロブリンヒンジまたはその改変されたバージョンは、IgG4ヒンジの改変されたバージョンである。

【0048】

任意のそのような態様の一部において、スペーサーは、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34に示した配列、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションを含むかまたはそれからなる。任意のそのような態様の一部において、スペーサーは、12アミノ酸長または約12アミノ酸

長である。任意のそのような態様の一部において、スパーサーは、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34に示した配列、またはSEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションを含む。任意のそのような態様の一部において、スパーサーは、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34に示した配列、またはSEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションからなる。任意のそのような態様の一部において、スパーサーは、SEQ ID NO: 1に示した配列を含む。任意のそのような態様の一部において、スパーサーは、12アミノ酸長または約12アミノ酸長である。任意のそのような態様の一部において、スパーサーは、SEQ ID NO: 1に示した配列からなる。

10

【0049】

任意のそのような態様の一部において、膜貫通ドメインは、CD28の膜貫通ドメインである。任意のそのような態様の一部において、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 8に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る、または少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。任意のそのような態様の一部において、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 8に示したアミノ酸の配列を含む。任意のそのような態様の一部において、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 8に示したアミノ酸の配列からなる。

20

【0050】

任意のそのような態様の一部において、共刺激ドメインは、SEQ ID NO: 12に示した配列を含むか、またはSEQ ID NO: 12に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリエーションである。任意のそのような態様の一部において、共刺激ドメインは、SEQ ID NO: 12に示した配列を含む。任意のそのような態様の一部において、共刺激ドメインは、SEQ ID NO: 12に示した配列からなる。任意のそのような態様の一部において、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 13、14、または15に示した配列を含むか、またはSEQ ID NO: 13、14、または15に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリエーションである。任意のそのような態様の一部において、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 13に示した配列を含む。任意のそのような態様の一部において、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 14に示した配列を含む。任意のそのような態様の一部において、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 15に示した配列を含む。任意のそのような態様の一部において、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 13に示した配列からなる。任意のそのような態様の一部において、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 14に示した配列からなる。任意のそのような態様の一部において、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 15に示した配列からなる。

30

40

【0051】

任意のそのような態様の一部において、scFvは、SEQ ID NO: 35のCDRL1配列、SEQ ID NO: 55のCDRL2配列、および/またはSEQ ID NO: 56のCDRL3配列、ならび

50

にSEQ ID NO: 38のCDRH1配列、SEQ ID NO: 39のCDRH2配列、および/またはSEQ ID NO: 54のCDRH3配列を含む。任意のそのような態様の一部において、scFvは、SEQ ID NO: 35のCDRL1配列、SEQ ID NO: 55のCDRL2配列、およびSEQ ID NO: 56のCDRL3配列、ならびにSEQ ID NO: 38のCDRH1配列、SEQ ID NO: 39のCDRH2配列、およびSEQ ID NO: 54のCDRH3配列を含む。任意のそのような態様の一部において、scFvは、RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35) のCDRL1配列、SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) のCDRL2配列、および/またはGNTLPYTTFG (SEQ ID NO: 37) のCDRL3配列、ならびにDYGVS (SEQ ID NO: 38) のCDRH1配列、VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) のCDRH2配列、および/またはYAMDYWG (SEQ ID NO: 40) のCDRH3配列を含む。任意のそのような態様の一部において、scFvは、順に、SEQ ID NO: 41に示した配列を含むV_H、およびSEQ ID NO: 42に示した配列を含むV_Lを含む。任意のそのような態様の一部において、scFvは、SEQ ID NO: 43に示した配列を含む。一部の態様では、scFvは、N末端からC末端までの順に、SEQ ID NO: 42に示した配列を含むV_L、およびSEQ ID NO: 41に示した配列を含むV_Hを含む。

10

20

【0052】

提供される態様のいずれかの一部において、CARは、N末端からC末端までの順に、SEQ ID NO: 43に示したscFvである細胞外抗原結合ドメイン、SEQ ID NO: 1に示したスパーサー、SEQ ID NO: 8に示した膜貫通ドメイン、SEQ ID NO: 12に示した4-1BB共刺激シグナル伝達ドメイン、およびSEQ ID NO: 13に示したCD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインを含有する。

【0053】

一部の態様では、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞はそれぞれ、約 5×10^7 個のCAR⁺T細胞から約 1.1×10^8 個のCAR⁺T細胞 (両端の値を含む) である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 5×10^7 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 6×10^7 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 7×10^7 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 8×10^7 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 9×10^7 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 1×10^8 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 1.1×10^8 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 1.2×10^8 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 1.3×10^8 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 1.4×10^8 個のCAR⁺T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞は、 1.5×10^8 個のCAR⁺T細胞である。

30

40

【0054】

提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、0~12時間の間隔で、0~6時間の間隔で、または0~2時間の間隔で投与されるか、または第1の組成物の投与および第2の組成物の投与は同日に行われ、約0から約12時間の間隔で、約0から約6時間の間隔で、または約0から2時間の間隔で行われ；かつ/あるいは第1の組成物の投与の開始および第2の組成物の投与の開始は、約1分から約1時間の間隔でまたは約5分から約30分の間隔で行われる。提供される態様のいずれかの一部において

50

、第1の組成物および第2の組成物は、0～12時間の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、0～6時間の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、0～2時間の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物の投与および第2の組成物の投与は、同日に行われる。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物の投与および第2の組成物の投与は、約0から約12時間の間隔で行われる。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物の投与および第2の組成物の投与は、約0から約6時間の間隔で行われる。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物の投与および第2の組成物の投与は、約0から2時間の間隔で行われる。一部の態様では、第1の組成物の投与の開始および第2の組成物の投与の開始は、約1分から約1時間の間隔で行われる。一部の態様では、第1の組成物の投与の開始および第2の組成物の投与の開始は、約5分から約30分の間隔で行われる。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、2時間以下、1時間以下、30分以下、15分以下、10分以下、または5分以下の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、2時間以下の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、2時間未満の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、1時間以下の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、30分以下の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、15分以下の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、10分以下の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物および第2の組成物は、5分以下の間隔で投与される。提供される態様のいずれかの一部において、第1の組成物は、第2の組成物の前に投与される。一部の態様では、第1の組成物はCD8⁺CAR発現T細胞を含み、かつ第2の組成物はCD4⁺T CAR発現細胞を含む。

10

20

30

40

50

【0055】

提供される態様のいずれかの一部において、ある用量のCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞は、静脈内に投与される。提供される態様のいずれかの一部において、T細胞は、対象由来の試料から取得された初代T細胞である。提供される態様のいずれかの一部において、T細胞は、対象にとって自己由来である。一部の態様では、細胞が得られるまたは単離される試料は、血液または血液由来試料である。一部の態様では、細胞が得られるまたは単離される試料は、アフエーシスまたは白血球アフエーシスによる生成物であるか、またはそれらに由来する。一部の態様では、試料は、対象に対するリンパ球枯渇療法の投与の前に、対象から取得される。一部の態様では、白血球アフエーシス試料は、対象に対するある用量のCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の投与のおよそ4または5週間前に、対象から取得される。任意のそのような態様の一部において、対象はヒトである。

【0056】

提供される態様のいずれかの一部において、本方法により処置された複数の対象間での完全奏効率（CRR）は、50%超もしくは約50%超、60%超もしくは約60%超、70%超もしくは約70%超、または80%超もしくは約80%超である。提供される態様のいずれかの一部において、本方法により処置された複数の対象間での完全奏効率（CRR）は、50%超または約50%超である。提供される態様のいずれかの一部において、本方法により処置された複数の対象間での完全奏効率（CRR）は、60%超または約60%超である。提供される態様のいずれかの一部において、本方法により処置された複数の対象間での完全奏効率（CRR）は、70%超または約70%超である。提供される態様のいずれかの一部において、本方法により処置された複数の対象間での完全奏効率（CRR）は、80%超または約80%超である。任意のそのような態様の一部において、CRRは、最大24ヶ月の完全奏効（CR）である最良総合効果（BOR）を有する対象のパーセンテージである。

【0057】

提供される態様のいずれかの一部において、対象はFLグレード1、2または3Aを有し、CRRはPET-CTによって評価される。提供される態様のいずれかの一部において、対象はFLグレード1を有し、CRRはPET-CTによって評価される。提供される態様のいずれかの一部において、対象はFLグレード2を有し、CRRはPET-CTによって評価される。提供される態様のいずれかの一部において、対象はFLグレード3Aを有し、CRRはPET-CTによって評価される。提供される態様のいずれかの一部において、対象はMZLを有し、CRRはCTによって評価される。提供される態様のいずれかの一部において、対象はMZLを有し、CRRはMRIによって評価される。提供される態様のいずれかの一部において、対象はMZLを有し、CRRはCTスキャンおよびMRIスキャンによって評価される。

【図面の簡単な説明】

10

【0058】

【図1A】初回コホート中の患者内での、処置後3ヶ月で完全奏効（CR）または進行（PD）を示す対象における処置前腫瘍生検での差次的遺伝子発現プロファイルを示す。

【図1B】濾胞性リンパ腫細胞株試料と比較してびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）細胞株試料でより高く発現した遺伝子を含む、初回コホート中の患者内での処置後3ヶ月でのPDに関連する種々の濃縮された遺伝子セットを示す（FL；FL_DLBCL_DN）。

【図2A】大規模コホート中の患者内での、処置後3ヶ月で完全奏効（CR）または進行（PD）を示す対象における処置前腫瘍生検での差次的遺伝子発現プロファイルを示す。

【図2B】濾胞性リンパ腫と比較してびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）でより高く発現した遺伝子を含む、大規模コホート中の患者内での処置後3ヶ月でのPDに関連する種々の濃縮された遺伝子セットを示す（FL；DLBCL_LIKE_vs_FLおよびSHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP）。

20

【図2C】濾胞性リンパ腫と比較してびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）でより高く発現した遺伝子を含む、マッチングした処置前試料および処置後11日目の試料内でのT細胞排除に関連する種々の濃縮された遺伝子セットを示す（FL；DLBCL_LIKE_vs_FLおよびSHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP）。

【図3】FL腫瘍生検とDLBCL腫瘍生検との間の差次的遺伝子発現を示す。

【図4】FL腫瘍とDLBCL腫瘍との間の例示的遺伝子EZH2（図4A）およびCD3ε（図4B）の差次的遺伝子発現を示す。

30

【図5A】図5Aおよび5B（初回コホート）ならびに図5C（大規模コホート）は、DLBCLで上昇していると認められる遺伝子（「DLBCL様遺伝子セット」と名付けられる；図5A）とFLで上昇していると認められる遺伝子（「FL様遺伝子セット」と名付けられる；図5Bおよび5C）との間の単一サンプル遺伝子セット濃縮分析（ssGSEA）スコア、およびCRを示し続けた対象またはPDを示し続けた対象を示し、DLBCLで認められるものと比較して、FLで認められるものにより類似している腫瘍遺伝子発現プロファイルを有する対象は、処置後3ヶ月でCRを示す可能性がより高かったことを例示する。

【図5B】図5Aの説明を参照されたい。

【図5C】図5Aの説明を参照されたい。

【図5D】最も高いFL様遺伝子発現を有する15名の対象と残りの59名の対象との間で比較した、74名のDLBCL対象内での無増悪生存期間（PFS）を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0059】

詳細な説明

概してがんまたは腫瘍、例えば、白血病またはリンパ腫、特にB細胞悪性腫瘍または非ホジキンリンパ腫（NHL）であるかまたはそれを含む、疾患または状態を有する対象の処置のための、操作された細胞（例えば、T細胞）および/またはその組成物の方法および使用が提供される。提供される方法のいずれかの特定の態様において、T細胞は、CD19に対して作られているキメラ抗原受容体（CAR）によって操作される。一部の局面では、疾患または状態は、B細胞リンパ腫である。一部の局面では、疾患または状態は、濾胞

50

性リンパ腫（FL）、グレード1～3Aである。一部の局面では、疾患または状態は、辺縁帯リンパ腫（MZL）である。一部の局面では、方法および使用は、例えば、処置される特定の群の対象において、ある特定の代替の方法と比較して改善された奏効および/またはより持続的な奏効もしくは有効性および/または毒性もしくは他の副作用の低下したリスクをもたらすか、またはそれらを達成する。一部の態様では、方法は、指定された数または相対数の操作された細胞の投与、規定された比の特定のタイプの細胞の投与、特定の患者集団、例えば、特定のリスクプロファイル、ステージ分類、および/もしくは前治療歴、ならびに/またはそれらの組み合わせを有する患者集団の処置によって有利となる。

【0060】

一部の態様では、方法および使用は、養子細胞療法において遺伝子操作された（組換え）細胞表面受容体を発現する細胞を対象に投与することを含み、該受容体は概して、リンパ腫および/またはそれに由来する細胞タイプによって発現されるか、それらに関連するか、および/またはそれらに特異的である抗原を認識する、キメラ抗原受容体（CAR）などのキメラ受容体である。細胞は概して、投与用に製剤化された組成物で投与され；方法は概して、1回または複数回用量の細胞を対象に投与する段階を伴い、該用量は、組成物内に、特定数もしくは相対数の細胞もしくは操作された細胞、および/または規定された比もしくは組成の2種類以上のサブタイプ、例えばCD4 T細胞：CD8 T細胞を含んでもよい。

【0061】

一部の態様では、細胞、集団、および組成物は、例えば、養子T細胞療法などの養子細胞療法を介して、処置される特定の疾患または状態を有する対象に投与される。一部の態様では、方法は、低悪性度非ホジキンリンパ腫（NHL）などのリンパ腫またはB細胞悪性腫瘍を有する対象をある用量の抗原受容体発現細胞（例えば、CAR発現細胞）によって処置することを伴う。

【0062】

一部の態様では、提供される方法は、特定の群またはサブセットの対象、例えば、高リスク疾患を有するとして特定された対象を処置することを伴う。一部の局面では、方法は、予後不良の低悪性度NHL、例えば、再発しているかまたは標準的治療に対して抵抗性（R/R）でありかつ/または予後不良であるNHLを有する対象を処置する。一部の局面では、方法は、再発しているかまたは標準的治療に対して抵抗性（R/R）であるNHL、例えば、FL G1～3AまたはMZLを有する対象を処置する。一部の局面では、提供される方法、組成物、使用、および製造物品は、利用可能な療法に対して改善されかつ優れた奏効を達成する。一部の態様では、改善されたまたは優れた奏効は、現行の標準治療（SOC）と比較される。

【0063】

CD19は、初期発生から形質細胞への分化までB細胞上に存在する95 kDaの糖タンパク質である（Stamenkovic et al., J Exp Med. 1988; 168(3):1205-10）。それは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、B細胞活性化のシグナル伝達閾値を低下させることによってB細胞受容体の正の調節因子として機能する（Brentjens et al., Blood. 2011; 118(18):4817-28; LeBien et al, Blood. 2008;112(5):1570-80）。CD19は、B細胞NHLを含む大部分のB細胞悪性腫瘍によって発現されていることから、魅力的な治療標的である（Davila et al., Oncoimmunology. 2012; (9):1577-83）。重要なことには、CD19は、造血幹細胞上またはB細胞系列のものを除く任意の正常組織上に発現していない。加えて、CD19は循環中に流れておらず、オフターゲットの有害作用を制限する（Shank et al., Pharmacotherapy. 2017;37(3):334-45）。

【0064】

特定の態様では、本明細書において提供される方法は、CARがCD19指向性scFv抗原結合ドメイン（例えば、FMC63由来）を含有している、CD19指向性CAR T細胞療法の投与に基づく。CARは、CD3ゼータ由来のシグナル伝達ドメインを含有する細胞内シグ

10

20

30

40

50

ナル伝達ドメインをさらに含有し、かつ4-1BB共刺激ドメインも組み込まれ、これは、CD28含有構築物と比較してサイトカイン放出症候群（CRS）および神経毒性（NT；例えば、神経学的事象（NE））の発生率の低下と関連している（Lu et al. J Clin Oncol. 2018;36:3041）。一部の態様では、本明細書において提供される方法は、インビトロで別個に形質導入されかつ拡大増殖され、かつ同じ（約1：1）標的用量で投与される、CD8⁺およびCD4⁺T細胞サブセットを含む。一部の態様では、投与される総CD4⁺およびCD8⁺ CAR⁺T細胞用量、以前の研究で毒性の増加に関連した2つのパラメーターにおけるばらつきは、低い（Neelapu et al., N Engl Med. 2017. 377;2531-44; Turtle et al., Sci Transl Med. 2016;8:355ra116; Hay et al., Blood. 2017;130:2295-306）。

10

【0065】

一部の態様では、方法は、B細胞悪性腫瘍、例えば、NHL、例えば、FL G1～3A、またはMZLのある特定の予後またはリスクを有するとして選択されたまたは特定された対象への細胞の投与を含む。リンパ腫、例えばNHLは変わりやすい疾患である。NHLを有する一部の対象は処置なしに生存する場合もあれば、他の対象は、即時の介入を必要とする場合もある。一部の態様では、方法、使用、および製造物品は、例えば、特定の疾患型、診断基準、事前の処置、および/または事前の処置に対する奏効に基づいて、特定の群またはサブセットの対象を伴う、選択する、または特定する、対象の処置を伴うかまたは該処置のために用いられる。一部の態様では、方法は、1つもしくは複数の前治療による処置後の寛解後に再発しているか、もしくは該処置に対して抵抗性になっている対象；または再発しているかもしくは1つもしくは複数の前治療、例えば1ラインまたは複数ラインの標準的治療に対して抵抗性である（R/R）対象を処置することを伴う。一部の態様では、方法は、2つ以上の前治療による処置後の寛解後に再発しているか、または2つ以上の前治療に対して抵抗性になっている対象を処置することを伴う。一部の態様では、方法は、再発しているか、または2つ以上の前治療、例えば、2ライン以上の標準的治療に対して抵抗性（R/R）である対象を処置することを伴う。一部の態様では、方法は、3つ以上の前治療による処置後の寛解後に再発しているか、もしくは3つ以上の前治療に対して抵抗性になっている対象；または再発しているか、もしくは3つ以上の前治療、例えば、3ライン以上の標準的治療に対して抵抗性（R/R）である対象を処置することを伴う。

20

【0066】

一部の態様では、対象は、組換え受容体を発現する細胞の投与の前に、疾患または状態、例えば、NHL、例えば、FL G1～3AまたはMZLを標的とする療法または治療剤によって以前に処置されたことがある。一部の態様では、対象は、造血幹細胞移植（HSCT）、例えば、同種異系HSCTまたは自己由来HSCTによって以前に処置されたことがある。一部の態様では、対象は、標準的治療による処置後に予後不良であったか、かつ/または1ラインまたは複数ラインの前治療に失敗したことがある。一部の態様では、対象は、リンパ球枯渇療法および/または抗原受容体を発現する前記用量の細胞以外の、FL G1～3AまたはMZLなどの疾患または障害を処置するための少なくとも1、2、3、4つもしくはそれを上回る、または少なくとも約1、2、3、4つもしくはそれを上回る、または約1、2、3、4つもしくはそれを上回る他の療法で処置されているか、あるいはそれらを以前に受けたことがある。一部の態様では、対象は、CD20標的化物質（例えば、抗CD20抗体）およびアルキル化剤を含む療法で処置されているか、またはそれらを以前に受けたことがある。

30

40

【0067】

アキシカブタゲン シロルユーセル（axicabtagene ciloleucel）（axi-cel）およびチサゲンレクルユーセル（tisagenlecleucel）を含む、ある特定のCD19指向性CAR-T細胞療法は、B細胞リンパ腫の処置に利用可能である。1つの例示的な試験において、axi-cel処置対象は54%のCR率を達成し、持続的寛解では40%であった（追跡期間中央値、15.4ヶ月）（Neelapu et al., N Engl Med. 2017. 377;2531-44）。大部分の対象はCRS（93%）およびNE（64%）を発症し、それぞれ、2日および5日の発症ま

50

での時間の中央値およびグレード ≥ 3 のCRS (Lee評価基準 (Lee et al., Blood. 2014;124:188-95) を有し、NEはそれぞれ13%および28%で生じ、43%がトシリズマブを受けた (27%がコルチコステロイドを受けた)。別の例示的試験では、チサゲンレクルユーセルを受けた患者のおよそ1/3が1年での持続的寛解を維持した (Schuster et al., N Engl J Med. 2019. 380:45-56)。大部分の対象 (58%) はCRSを発症し、21%はNEを有した。グレード ≥ 3 のCRS (Penn評価基準、Porter et al., J Hematol Oncol. 2018;11:35) およびNEがそれぞれ、患者の22%および12%で報告された (Schuster et al., N Engl J Med. 2019. 380:45-56)。好適な奏効アウトカムが、これらの適応症の処置について観察されたが、毒性率が高いままである。さらに、FL G1~3AまたはMZLを有する患者を含むある特定のリンパ腫サブタイプを有する患者、特に、初回診断および/または処置の開始から24ヶ月以内に二重抵抗性状態または疾患進行を有する (POD24) など、ある特定の高リスク特性を有するそのような患者を処置するための承認済みCAR T細胞療法は現行存在しない。

10

【0068】

FLは、低悪性度非ホジキンリンパ腫 (NHL) の最も一般的なサブタイプであり、西洋諸国におけるリンパ腫症例全体の約10%~20%を占める (Union for International Cancer Control [UICC], 2014; Miranda-Filho et al., Cancer Causes Control. 2010; 30(5):489-99)。第二ライン (2L) の処置は最も一般的には、フロントラインで用いられるものと同じ処置、主に化学免疫療法レジメンを含む。FLにおける2L治療後、r/r FL患者の選択肢は限定される。National Comprehensive Cancer Network (NCCN, 2019) ガイドラインとEuropean Society for Medical Oncology (ESMO) (Dreyling, 2016) ガイドラインのどちらも、フロントライン状況において長期寛解が達成された場合、多くの場合、2L処置において同じレジメンが繰り返され、心毒性の懸念のために、フロントラインにおいてベンダムスチン+リツキシマブ (BR) を受ける患者で最も頻度が高く、リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキシソルピシン、およびプレドニゾン (R-CHOP) を受ける患者では頻度が低いことを示唆する。高度に選択された患者での第二ラインの処置には、自己由来または同種異系造血幹細胞移植 (HSCT) も含まれ得る (NCCN, 2019; Dreyling et al., 2016 Ann Oncol. 2016;27(83-v90))。現在、第四ライン以降のFL (4L+) における標準治療は存在しない。この状況において、いかなる作用物質も現行承認されていない。さらに、第四ラインまでに、患者は概して、利用可能な処置選択肢を使い果たしている。疾患の進行によって各処置と失敗との間隔がより短くなり、このことは、疾患の再発または進行時に3つの全身性の前治療を受けている患者が、満たされていないニーズが高い患者集団を含み得ることを示唆する。抵抗性の状況における利用可能な処置選択肢の欠如は、特に第三ライン以降 (3L+) において、重大な満たされていないニーズを提示する。FLの予後は過去20年にわたって実質的に改善しているが、FLは不治のままである (Kahl et al., Blood. 2016 Apr 28;127(17):2055-63)。

20

30

【0069】

辺縁帯リンパ腫 (MZL) は、B細胞NHL症例全体の8%~12%を占める、3番目に最も一般的なNHL組織像である (Swerdlow et al., 2016; Blood, 30:84-91; Al-Hamadani et al., Am J Hematol., 2015;90(9):790-5)。3つのサブタイプが記載される: 節外性MZL (ENMZL、主に胃)、脾MZL (SMZL)、および節性MZL (NMZL)。MZLを有する患者は多くの場合、その多様性を考慮して、軽視されるかまたは他の低悪性度NHLの試験から排除される。さらに、処置関連毒性は、高齢の患者 (年齢中央値67) で選択肢を制限する可能性があり、MZLの臨床経過もまた多様であり、他のサブタイプと比較して節性播種性MZLは予後の悪化と関連する (Denlinger et al., Cancer Manag Res. 2018;10:615-24)。イブルチニブはMZLの一般的な療法であり、第三ラインの療法 (3L) までに、MZLを有する多くの患者はイブルチニブで処置されている可能性が高く、よって、2ラインの前治療に失敗している患者は、高い満たされていないニーズがある集団と考えられる。他の処置選択肢には、2L+ MZLにおけるレナリドミ

40

50

ドおよびリツキシマブの組み合わせが含まれる。

【0070】

利用可能なエビデンスは、第二ライン（2L）、第三ライン（3L）、または第四ライン以降（4L+）の低悪性度 FL グレード 1～3A を有する対象のための利用可能な療法が満たせない、好適な利点/リスクプロファイルおよび持続的な奏効をもたらす追加的な治療選択肢について高い満たされていないニーズを示唆する。さらに、MZL を含む NHL のより希少なサブタイプでは、利用可能な処置選択肢は限定される。これらの知見は、特に、FL G1～3A または MZL の高リスク特性を有する対象内で、R/R NHL について重大な治療ギャップ、および既存の処置の改善のニーズを明らかにする。本明細書において、そのようなニーズを満たすことができる態様が提供される。

10

【0071】

特定の態様では、提供される方法は、利用可能な処置選択肢が限定されている、特定の NHL サブタイプまたは高リスク群、例えば、処置に対して二重抵抗性であるかまたは POD24 を有する患者を処置するために用いることができる。一部の場合では、他の CAR T 細胞療法を含む利用可能な療法が、毒性の高いリスクに関連している可能性がある。一部の局面では、CRS および神経毒性などのサイトカイン関連毒性が、CAR T 細胞療法により観察されている (Bonifant et al., Mol Ther Oncolytics. 2016;3:16011; Turtle et al., J Clin Invest. 2016;126(6):2123-38)。例えば、既存の CAR T 細胞療法は、サイトカイン放出症候群 (CRS) および神経学的事象 (NE) を含む重篤な CAR T 細胞関連毒性に関連し、このことは、投与を専門の治療センターに限定する場合があります (Yescarta Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) Gilead Pharma September 10, 2019; Kymriah Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) Novartis September 10, 2019)、治療が困難な患者での使用に影響を与える。好適な利点/リスクプロファイルを有する CAR T 細胞療法は、高リスク患者集団を含む対象サブグループの広範な包含を可能にし得る。

20

【0072】

本明細書における観察は、提供される方法に従う CD19 指向性 CAR T 細胞療法による高リスク疾患を有する対象の処置を裏付ける。例えば、FL グレード 1～3A または MZL を有する対象およびある特定の高リスク特性を有する、例えば、二重抵抗性状態または初回診断および/もしくは処置の開始から 24 ヶ月以内の疾患の進行 (POD24) を有する患者は、提供される方法にしたがって処置することができる。一部の態様では、提供される方法は、多くの治療歴を有している (例えば、1、2、3、4 つまたはそれを上回る、疾患を処置するための前治療による) 対象を処置するために用いることができる。

30

【0073】

したがって、一部の態様では、提供される方法、製造物品、および/または組成物は、処置のための、例えば養子細胞療法のための他の利用可能な方法、解決法またはアプローチを上回る利点をもたらすことができる。特に、提供される態様の中には、R/R FL G1～3A および R/R MZL を有する対象に処置をもたらすものがある。特定の態様では、R/R FL G1～3A を有する対象の中には、二重抵抗性状態または初回診断および/もしくは処置の開始から 24 ヶ月以内の疾患の進行 (POD24) を有する対象がある。

40

【0074】

本願において言及された、特許文書、科学文献、およびデータベースを含む刊行物は全て、それぞれ個々の刊行物が個々に参照により組み入れられるのと同じ程度に、全ての目的のためにその全体が参照により組み入れられる。本明細書において示された定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開された出願、および他の刊行物に示された定義と相違するか、または他の点で一致しない場合、参照により本明細書に組み入れられる定義よりも、本明細書において示された定義が優先される。

【0075】

本明細書において用いられるセクションの見出しは、系統立ててまとめることだけを目的とし、説明された対象を限定すると解釈してはならない。

50

【0076】

1. 低悪性度濾胞性リンパ腫（FL） グレード1～3Aおよび辺縁帯リンパ腫（MZL）におけるCD19標的化細胞療法の方法および使用

本明細書において、操作されたT細胞などの操作された細胞または操作された細胞を含有する組成物を投与することを伴う処置の方法が提供される。操作された細胞および/またはその組成物の投与を伴う、R/R FL G1～3AまたはR/R MZLを有する対象の処置のための方法を含む、操作された細胞（例えば、T細胞）および/またはその組成物の方法および使用もまた提供される。一部の局面では、R/R FL G1～3AまたはR/R MZLの処置のための操作されたT細胞などの操作された細胞または操作された細胞を含有する組成物の使用もまた提供される。一部の局面では、操作されたT細胞などの操作された細胞または操作された細胞を含有する組成物の使用は、本明細書に記載される方法のいずれかに従う。

10

【0077】

一部の態様では、方法および使用は、養子細胞療法において遺伝子操作された（組換え）細胞表面受容体を発現する細胞を対象に投与することを含み、該受容体は概して、リンパ腫および/またはそれに由来する細胞タイプによって発現されるか、それらに関連するか、および/またはそれらに特異的である抗原を認識する、キメラ抗原受容体（CAR）などのキメラ受容体である。細胞は概して、投与用に製剤化された組成物で投与される。特定の態様では、方法は、組成物内に、特定数もしくは相対数の細胞もしくは操作された細胞、例えば、規定された比もしくは組成の2種類以上のサブタイプ、例えばCD4 T細胞：CD8 T細胞を含む、1回または複数回用量の細胞を対象に投与することを伴う。一部の態様では、操作された細胞またはそれと同じものを含む組成物は、疾患または障害の処置をもたらすのに有効な量で投与される。使用には、そのような方法および処置における、ならびにそのような治療方法を行うための医薬の調製における、操作された細胞または組成物の使用が含まれる。一部の態様では、方法は、疾患または状態を有するかまたは有することが疑われる対象に、操作された細胞またはそれと同じものを含む組成物を投与することによって行われる。一部の態様では、方法はそれによって対象において疾患または状態または障害を処置する。

20

【0078】

養子細胞療法用の細胞の投与のための一般的な方法は公知であり、提供される方法および組成物に関連して使用され得る。例えば、養子T細胞療法の方法は、例えば、Gruenberg et al.に対する米国特許出願公開第2003/0170238号；Rosenbergに対する米国特許第4,690,915号；Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)に記載されている。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。

30

【0079】

一部の態様では、細胞、集団、および組成物は、例えば、養子T細胞療法などの養子細胞療法を介して、処置される低悪性度NHLを有する対象に投与される。一部の局面では、NHLは、Lugano分類（例えば、Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067；Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5を参照）に基づいて病期分類することができる。一部の局面では、病期は、ローマ数字IからIV（1～4）によって記載され、リンパ系以外の臓器（リンパ外臓器）に影響をおよぼす限局期（IまたはII）リンパ腫は、Eによって示される。I期は、1つのリンパ節もしくは隣接するリンパ節の集合における病変、またはリンパ節病変を伴わない単独のリンパ節外の病変（IE）を表す。2期は、横隔膜の同側にある2つ以上のリンパ節の集合における病変、またはリンパ節病変進展による、限局性かつ連続性のある節外臓器の病変を伴うI期もしくはII期（IIIE）を表す。III期は、横隔膜の両側にある複数のリンパ節の病変または脾臓病変を伴う横隔膜の上側の複数のリンパ節の病変を表す。IV期は、非連続性のリンパ外臓器の病変を加えた、病変を表す。加えて、「bulky病変」は、特にII期での、胸部の大きな腫瘍を説明する

40

50

ために用いられ得る。疾患の範囲は、集積リンパ腫では陽電子放射断層撮影（PET）-コンピュータ断層撮影（CT）、および非集積組織像ではCTによって判定される。いずれかの態様の一部では、ある用量の細胞の投与時または投与前に、提供される態様により処置される対象は、陽電子放射断層撮影（PET）陽性疾患を有する。

【0080】

一部の態様では、方法は、ある用量の抗原受容体発現細胞（例えば、CAR発現細胞）によってR/R FL G1~3AまたはR/R MZLを有する対象を処置することを伴う。特定の態様では、方法は、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞を対象に投与することを含み、各用量のT細胞は、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含む。

【0081】

一部の態様では、対象は18歳以上である。一部の態様では、対象が、CD19標的化療法を以前に受けたことがある場合、対象は、事前のCD19標的療法を完了してから、CD19陽性リンパ腫を有すると確認されなければならない。一部の態様では、対象は、スクリーニングの6ヶ月以内に組織学的に確認された疾患を有する。一部の態様では、対象は、適切な臓器機能および血管アクセスを有する。

【0082】

一部の態様では、対象は、0または1のEastern Cooperative Oncology Group（ECOG）パフォーマンスステータスを有する。一部の態様では、Eastern Cooperative Oncology Group（ECOG）パフォーマンスステータスの指標は、処置のための対象、例えば、前治療から成績不良を有していた対象を評価または選択するために用いることができる（例えば、Oken et al. (1982) Am J Clin Oncol. 5:649-655を参照）。ECOGスケールのパフォーマンスステータスは、患者の自分の身の回りのことをする能力、日常動作、および身体能力（例えば、歩行、作業など）の観点からの患者の機能性のレベルを説明する。一部の態様では、ECOGパフォーマンスステータス0は、対象が通常の活動を行うことができることを示す。一部の局面では、ECOGパフォーマンスステータス1を有する対象は、肉体的な活動では一部制限を示すが、該対象は十分に歩行可能である。一部の局面では、ECOGパフォーマンスステータス2を有する患者は、50%超歩行可能である。一部の局面では、ECOGパフォーマンスステータス2を有する対象は、自分の身の回りのことも可能である；例えば、Sorensen et al., (1993) Br J Cancer 67(4) 773-775を参照。ECOGパフォーマンスステータスを反映した基準を以下の表1に記載する：

【0083】

（表1）ECOGパフォーマンスステータス基準

グレード	ECOGパフォーマンスステータス
0	全く問題なく活動でき、発病前の全ての日常生活を制限なく行える
1	肉体的に激しい活動は制限されるが、歩行可能で、軽作業や座っての作業、例えば、軽い家事、事務作業は行うことができる
2	歩行可能で自分の身のまわりのことは全て可能だが、作業はできない；日中の約50%超はベッド外で過ごす
3	限られた自分の身のまわりのことしかできない；日中の50%超をベッドか椅子で過ごす。
4	まったく動けない；自分の身のまわりのことはまったくできない；完全にベッドか椅子で過ごす
5	死亡

【0084】

提供される方法は、再発しているかまたは前治療に対して抵抗性である（R/R）、対象の処置のためのものである。一部の局面では、対象は、前治療に対する完全奏効（CR）または部分奏功（PR）である初回奏効後に再発している。一部の態様では、対象は、少なくとも1つまたは複数の前治療による処置に対して抵抗性であり、抵抗性の処置は、前治療後の安定（SD）または進行（PD）である最良効果である。

【0085】

一部の態様では、対象は少なくとも18歳である。特定の態様では、提供される方法は、60歳超またはそれを上回る年齢の対象を含む、高齢である対象の集合において、好適なアウトカムまたは低い毒性率をもたらすことができる。

【0086】

一部の態様では、提供される方法は、一律の投与、例えば、CAR⁺細胞の総数、CAR⁺CD8⁺T細胞および/またはCAR⁺CD4⁺T細胞の総数を実行し、例えば、そのような細胞タイプの厳密なまたは一律の用量を、さまざまな体重の対象を含む、処置される対象の群の各々に投与する。したがって、提供される方法は、ある用量の細胞が一律用量の細胞または固定用量の細胞であり、細胞の用量が対象の体表面積もしくは体重に関係しないかまたはそれを基準にしない、方法を含む。一部の態様では、そのような方法は、CAR-T細胞の投与に関連する毒性アウトカムのリスクを増加させる可能性がある、対象に多すぎる細胞を投与する機会を最小化するかまたは低減させる。

10

【0087】

一部の態様では、ある用量のT細胞は、約 5×10^7 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞から約 1.1×10^8 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 6×10^7 個または約 6×10^7 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 7×10^7 個または約 7×10^7 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 0.75×10^8 個または約 0.75×10^8 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現CD8⁺T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 8×10^7 個または約 8×10^7 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 9×10^7 個または約 9×10^7 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 1×10^8 個または約 1×10^8 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 1.1×10^8 個または約 1.1×10^8 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個の組換え受容体（例えば、CAR）発現T細胞を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、CD4⁺およびCD8⁺T細胞を含む。一部の態様では、細胞の数は、生細胞であるそのような細胞の数である。

20

30

【0088】

養子細胞療法の状況では、ある特定の「用量」の投与は、所与の量もしくは数の細胞の単一組成物としての投与、および/または単一の中断なしの（uninterrupted）投与、例えば、単回注射または連続注入としての投与を包含し、かつ指定期間にわたる、例えば3日以下にわたる、複数の個別の組成物または注入で提供される、所与の量もしくは数の細胞の分割用量としてのまたは複数の組成物としての投与も包含する。したがって、一部の状況では、用量は、単一時点で与えられるかまたは開始される、指定された数の細胞の単回または連続投与である。しかしながら、一部の状況では、用量は、3日以下の期間にわたる複数回注射または複数回注入で、例えば、1日1回を3日間もしくは2日間または1日にわたる複数回注入によって投与される。

40

【0089】

したがって、一部の局面では、用量の細胞は単一の薬学的組成物で投与される。一部の態様では、用量の細胞は、用量の細胞を集合的に含有する、複数の組成物で投与される。

【0090】

一部の態様では、用語「分割用量」は、2日以上にわたって投与されるように分割される用量を指す。このタイプの投与は、本方法によって包含され、単一用量であるとみなされる。

【0091】

したがって、ある用量の細胞は、分割用量、例えば、時間をかけて投与される分割用量

50

として投与され得る。例えば、一部の態様では、用量は、2日にわたってまたは3日にわたって対象に投与され得る。分割投与のための例示的な方法は、1日目に用量の25%を投与し、2日目に用量の残りの75%を投与することを含む。他の態様では、用量の33%が1日目に投与されてもよく、残りの67%が2日目に投与される。一部の局面では、用量の10%が1日目に投与され、用量の30%が2日目に投与され、用量の60%が3日目に投与される。一部の態様では、分割用量は、3日を超えて広がらない。

【0092】

一部の態様では、用量の細胞は、それぞれが用量の一部の細胞を含有する複数の組成物または溶液、例えば、第1のおよび第2の組成物または溶液、任意でそれより多くの組成物または溶液の投与によって投与されてもよい。一部の局面では、それぞれが細胞の異なる集団および/またはサブタイプを含有する、複数の組成物が、任意である特定の期間内に、別々にまたは独立して投与される。例えば、細胞の集団またはサブタイプは、 $CD8^+$ T細胞および $CD4^+$ T細胞をそれぞれ、ならびに/または $CD8^+$ 濃縮集団および $CD4^+$ 濃縮集団をそれぞれ、例えば、それぞれが個別に組換え受容体を発現するように遺伝子操作された細胞を含む $CD4^+$ T細胞および/または $CD8^+$ T細胞を含み得る。一部の態様では、用量の投与は、ある用量の $CD8^+$ T細胞またはある用量の $CD4^+$ T細胞を含む第1の組成物の投与、ならびに、該用量の $CD4^+$ T細胞および $CD8^+$ T細胞のもう一方を含む第2の組成物の投与を含む。

【0093】

一部の態様では、組成物または用量の投与、例えば、複数の細胞組成物の投与は、細胞組成物の別々の投与を伴う。一部の局面では、別々の投与は、同時に、または任意の順序で連続的に行われる。特定の態様では、別々の投与は、ある用量の $CD8^+$ T細胞またはある用量の $CD4^+$ T細胞を含む第1の組成物、ならびに、該用量の $CD4^+$ T細胞および $CD8^+$ T細胞のもう一方を含む第2の組成物を任意の順序で投与することによって、連続的に行われる。一部の態様では、用量は第1の組成物および第2の組成物を含み、第1の組成物および第2の組成物は、相互に48時間以内に、例えば、相互に36時間以下または相互に24時間以下の範囲内で投与される。一部の態様では、第1の組成物および第2の組成物は、0~12時間の間隔で、0~6時間の間隔で、または0~2時間の間隔で投与される。一部の態様では、第1の組成物の投与の開始と第2の組成物の投与の開始とは、2時間以下、1時間以下、または30分以下の間隔で、15分以下、10分以下、または5分以下の間隔で行われる。一部の態様では、第1の組成物の投与の開始および/または完了と第2の組成物の投与の完了および/または開始とは、2時間以下、1時間以下、または30分以下の間隔で、15分以下、10分以下、または5分以下の間隔で行われる。一部の態様では、第1の組成物および第2の組成物は、2時間未満の間隔で投与される。

【0094】

一部の組成物では、第1の組成物、例えば、用量の第1の組成物は $CD4^+$ T細胞を含む。一部の組成物では、第1の組成物、例えば、用量の第1の組成物は $CD8^+$ T細胞を含む。一部の態様では、第1の組成物は、第2の組成物の前に投与される。特定の態様では、 $CD8^+$ T細胞は、 $CD4^+$ T細胞の前に投与される。

【0095】

一部の態様では、細胞の用量または組成は、規定された比または目標の比の組換え受容体（例えば、CAR）を発現する $CD4^+$ 細胞：組換え受容体（例えば、CAR）を発現する $CD8^+$ 細胞および/または $CD4^+$ 細胞： $CD8^+$ 細胞を含み、該比は任意でおよそ1:1であるか、またはおよそ1:3~およそ3:1、例えばおよそ1:1である。一部の局面では、目標の比または所望の比の異なる細胞集団（例えば、 $CD4^+ : CD8^+$ 比または $CAR^+CD4^+ : CAR^+CD8^+$ 比、例えば1:1）を有する組成物または用量の投与は、集団の一方を含有する細胞組成物の投与、次に集団のもう一方を含む別の細胞組成物の投与を伴い、ここで、該投与は、目標の比もしくは所望の比または概ね目標の比もしくは所望の比での投与である。一部の局面では、規定された比での細胞の用量または組成物の投与は、T細胞療法の拡大、持続および/または抗腫瘍活性の改善をもたらす。

【0096】

A. 低悪性度濾胞性リンパ腫（FL）グレード1～3A

一部の態様では、提供される方法は、濾胞性リンパ腫（FL）を有する特定の群またはサブセットの対象を処置することを伴う。一部の態様では、対象は、グレード1～3AであるFLを有し、再発性/抵抗性FL G1～3Aを有する対象を含む。一部の態様では、提供される方法は、低悪性度濾胞性リンパ腫（FL）である疾患を有する対象を伴う。一部の態様では、対象は、FLグレード1である疾患を有する。一部の態様では、対象は、FLグレード2である疾患を有する。一部の態様では、対象は、FLグレード3Aである疾患を有する。

【0097】

特定の局面では、本明細書において提供される方法は、ある用量の $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞を対象に投与することを伴い、各用量のT細胞は、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含む。そのようなCAR-T細胞およびそれらの製造のための方法は、セクションIIにおいて説明される。

【0098】

一部の態様では、提供される方法は、 2.5×10^7 個または約 2.5×10^7 個から 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個、例えば、約 5×10^7 個から 1×10^8 個または約 1×10^8 個の総組換え受容体発現T細胞（例えば、 CAR^+ T細胞）、例えば、本明細書に記載される規定された比で、例えば1:1またはは約1:1の比で投与される $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞を含むある用量のT細胞の投与を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.4×10^8 個または約 1.4×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.3×10^8 個または約 1.3×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.2×10^8 個または約 1.2×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.1×10^8 個または約 1.1×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.0×10^8 個または約 1.0×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 9×10^7 個または約 9×10^7 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 8×10^7 個または約 8×10^7 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 7×10^7 個または約 7×10^7 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 6×10^7 個または約 6×10^7 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、およそ1:1の、CARを発現する $CD4^+$ T細胞：CARを発現する $CD8^+$ T細胞の比を含む。特定の態様では、投与される用量は、厳密なもしくはは一律のもしくはは固定された数の CAR^+ T細胞、または厳密なもしくはは一律のもしくはは固定された数の特定の種類の CAR^+ T細胞、例えば、 $CD4^+CAR^+$ T細胞および/もしくは $CD8^+CAR^+$ T細胞、ならびに/またはそのような厳密なもしくはは一律のもしくはは固定された数と比較して指定された分散度、例えば+または-（プラスまたはマイナス、いくつかの場合では±と表示される）5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15%以下の範囲内にあるそのような細胞のいずれかの数である。一部の態様では、そのような一律のまたは固定された数の細胞は、 2.5×10^7 もしくはは約 2.5×10^7 個の総 CAR^+ T細胞または $CD8^+$ および/もしくは $CD4^+CAR^+$ T細胞、 5×10^7 もしくはは約 5×10^7 個の総 CAR^+ T細胞または $CD8^+$ および/も

10

20

30

40

50

しくは $CD4^+ CAR^+T$ 細胞、または 1×10^8 または約 1×10^8 個の総 $CD4^+ CAR^+T$ 細胞または $CD8^+$ および/もしくは $CD4^+ CAR^+T$ 細胞である。

【0099】

一部の態様では、ある用量の細胞は、 $CD4^+ CAR^+T$ 細胞からなるかまたは本質的にそれからなる。一部の態様では、ある用量の細胞は、 $CD3^+ CAR^+T$ 細胞からなるかまたは本質的にそれからなる。一部の態様では、ある用量の細胞は、 $CD4^+ CAR^+T$ 細胞および $CD8^+ CAR^+T$ 細胞からなるかまたは本質的にそれからなる。一部の態様では、ある用量の細胞は、 $CD3^-$ 細胞を含まないかまたは本質的にそれを含まない。一部の態様では、ある用量の細胞は、 $CD4^+$ 細胞を含まないかまたは本質的にそれを含まない。一部の態様では、ある用量の細胞は、 $CD8^+$ 細胞を含まないかまたは本質的にそれを含まない。一部の態様では、ある用量の細胞は、 $CD3^- CAR^+$ 細胞を含まないかまたは本質的にそれを含まない。

10

【0100】

一部の態様では、用量中の細胞の数は、 2.5×10^7 個の $CD4^+ CAR^+T$ 細胞、例えば、 1.25×10^7 個の $CD4^+ CAR^+T$ 細胞および 1.25×10^7 個の $CD8^+ CAR^+T$ 細胞を含むかまたはそれからなるかまたは本質的にそれからなる。一部の態様では、用量は、 5×10^7 個の $CD4^+ CAR^+T$ 細胞、例えば、 2.5×10^7 個の $CD4^+ CAR^+T$ 細胞および 2.5×10^7 個の $CD8^+ CAR^+T$ 細胞を含むかまたはそれからなるかまたは本質的にそれからなる。一部の態様では、用量は、 1×10^8 個の $CD4^+ CAR^+T$ 細胞、例えば、 0.5×10^8 個の $CD4^+ CAR^+T$ 細胞および 0.5×10^8 個の $CD8^+ CAR^+T$ 細胞を含むかまたはそれからなるかまたは本質的にそれからなる。一部の局面では、投与される細胞の数は、前述の態様におけるそのような数のある特定の分散度の範囲内、例えば、そのような細胞の数と比較して、プラスまたはマイナス（±）5、6、7、8、9、または10%の範囲内、例えばプラスまたはマイナス8%の範囲内にある。一部の局面では、用量は、そのような細胞（例えば、総 $CD4^+ CAR^+T$ 細胞または $CD8^+$ および/もしくは $CD4^+ CAR^+T$ 細胞）の数と、治療の奏効もしくはその持続期間（例えば、寛解、完全寛解、および/または特定の寛解持続期間を達成する尤度）および/または前述のいずれかの持続期間を示す1つまたは複数のアウトカムとの間に相関関係（任意で線形関係）が観察される範囲内である。

20

【0101】

一部の態様では、投与は、複数の別個の組成物を投与することを含み、該複数の別個の組成物は、前述の態様のいずれかにおける用量にしたがって、 $CD8^+ CAR$ 発現T細胞を含む第1の組成物および $CD4^+ CAR$ 発現T細胞を含む第2の組成物を含む。

30

【0102】

一部の態様では、対象が濾胞性リンパ腫（FL）グレード1～3Aを有する場合に、対象は処置のために選択される。一部の態様では、直交する2方向で少なくとも1つのPET陽性病変および少なくとも1つの測定可能な結節性または節外性病変を有するPET陽性疾患が存在する場合、対象が処置のために選択される。一部の態様では、結節性病変は、長軸方向に1.5 cm超である。一部の態様では、節外性病変は、長軸および短軸方向に >1.0 cmである。一部の態様では、FLは、マントル帯の減弱、極性化の消失、および/または可染体マクロファージの非存在を示す腫瘍性濾胞を呈するかまたはそれに関連する。一部の態様では、FLは、中心細胞と中心芽球の混合を伴う。一部の態様では、FLは中心細胞を伴わない。

40

【0103】

一部の態様では、FLは、リンパ節および/または脾臓、骨髓、末梢血、および他の節外性部位を伴う。一部の態様では、FLはリンパ節を伴う。一部の局面では、FLに関連する例示的な特徴には、Choi et al. (2018) Arch Pathol Lab Med 142:1330-1340; Luminari et al., (2012) Rev. Brad. Hematol. Hemoter., 34:54-59 and Salles (2007) ASH Education Book, 2007:216-25に記載されるものが含まれる。一部の局面では、FLの場合には、疾患負荷量の程度を評価するために用いられる例示的なパラメーターとしては、ヘモグロビンレベル（例えば、 <12 g/dLまたは <10 g/dL）、赤血球沈降速度（ESR）、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）レベル、および $\beta 2$ -ミクログロブリン（B2M）値、遺伝子発現、一塩基多型（SNP；例えば、IL-8、IL-2、IL-1

50

2B、およびIL1RNでの)、miRNA発現、およびタンパク質発現(例えば、CD68、STAT1、FOXP3、CD57)などのパラメーターが挙げられる。(Salles (2007) ASH Education Book, 2007:216-25)。FLの場合では、疾患の程度または負荷量は、Ann Arbor病期分類、腫瘍負荷量、bulky病変、疾患の結節性もしくは節外性部位の数、および/または骨髄病変によって評価され得る。

【0104】

一部の態様では、FLは、グレード1である。一部の態様では、グレード1のFLは、強拡大視野(HPF)当たり5個超の中心芽球を呈するかまたは伴う。一部の態様では、FLは、グレード2である。一部の態様では、グレード2のFLは、強拡大視野(HPF)当たり6個超および15個未満の中心芽球を呈するかまたは伴う。一部の態様では、FLは、グレード3Aである。一部の態様では、グレード3AのFLは、強拡大視野(HPF)当たり15個超の中心芽球を呈するかまたは伴う。一部の態様では、FLは、濾胞内にCD10、BCL6、およびBCL2の同時発現を伴う。一部の態様では、FLは、t(14;18)/IGH-BCL2および/またはBCL6再構成を伴うかまたはそれによって特徴づけられる。一部の態様では、FLは、t(14;18)(q32;q21)転座を伴う。一部の局面では、t(14;18)(q32;q21)転座は、免疫グロブリン(Ig)重鎖遺伝子座(IGH)エンハンサーの制御下でのBCL2発現に置かれる。一部の局面では、t(14;18)は、グレード1および2のFLのおよそ90%、およびグレード3の60~70%で検出される。

【0105】

FLを有する患者の臨床経過の不均一性のために、FLを治療する課題の1つは、代替の処置選択肢を必要とする高リスク患者の特定である。高リスクの疾患に関連する複数の患者因子が、同定されている。R-CHOPなどの化学免疫療法レジメンによる新たに診断された患者の初回処置後、患者のおよそ25%が24ヶ月以内に進行する(Casulo et al. Blood, 2015;125(1):40-7)。24ヶ月以内に疾患の進行を有する患者(POD24)は、50%の5年全生存率(OS)を有するのに対して、非POD24患者は、90%の5年OSを有する。POD24は重要な予後生存因子である(Casulo, Br J Haematol, 2019;186(4):513-23)。満たされていないニーズを有するさらなる2L集団には、FL処置の主力、すなわち、抗CD20抗体および/またはアルキル化剤の一部に対して抵抗性である患者が含まれる。特にリスクが高い患者には、抗CD20抗体およびアルキル化剤の両方に対して二重抵抗性である患者が含まれる。リツキシマブに基づく療法は標準治療であることから、抗CD20療法に対して抵抗性であるかまたは抗CD20療法後の初期に再発する患者は、転帰が不良である。無増悪期間および受けている前治療(例えば、併用療法、HSCT)もまた、FLでの処置失敗のリスクを定義する要素である。提供される方法は、高リスク患者である対象の処置を含む。提供される方法の一部の態様では、2Lおよびその後の治療のラインにおける高リスクの低悪性度FLグレード1~3A患者群には、POD24、リツキシマブ抵抗性、および二重抵抗性集団が含まれる。

【0106】

一部の態様では、対象は、1つまたは複数の他の前治療、例えば、少なくとも2つの前治療、少なくとも3つの前治療、または少なくとも4つの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、1つまたは複数の他の前治療、例えば、1つの前治療、2つの前治療、3つの前治療、または4つの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性である。再発性/抵抗性(r/r)または進行性の疾患の処置に対する考慮および指標には、他の要因の中で、FLに起因する症状(B症状に限定されない);末端器官機能の危機;リンパ腫に続発する血球減少;bulky病変(>7 cmの腫瘍1つ、または>3 cmの腫瘍3つ以上);脾腫;および少なくとも6ヶ月にわたる安定した進行(National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (NCCN, 2019)を含む改変Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires (GELF)基準が含まれる。

【0107】

一部の態様では、対象は、造血幹細胞移植後に再発している。一部の態様では、移植は

10

20

30

40

50

、同種異系HSC Tまたは自己由来HSC Tである。

【0108】

一部の態様では、対象は、疾患を処置するための化学免疫療法の組み合わせ療法である少なくとも1ラインの前治療による処置に対して抵抗性であるか、あるいは少なくとも1ラインの前治療の間にまたはその完了後最長6ヶ月で再発している。一部の態様では、化学免疫療法の組み合わせ療法は独立して、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン＋リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン＋オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤による処置から選択され、例えば、PI3K阻害剤は、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである。一部の態様では、前記ラインの前治療は、抗CD20モノクローナル抗体およびアルキル化剤を含む化学免疫療法の組み合わせ療法である。

10

【0109】

一部の態様では、対象は、疾患を処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり、少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つは、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む。一部の態様では、対象は、疾患を処置するための1ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり、1ラインの前治療は、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む。一部の態様では、対象は、疾患を処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり、少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つは、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む。一部の態様では、対象は、疾患を処置するための少なくとも3ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり、少なくとも3ラインの前治療のうち少なくとも1つは、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む。一部の態様では、対象は、疾患を処置するための3ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり、3ラインの前治療のうち少なくとも1つは、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む。

20

【0110】

一部の態様では、対象は、抗CD20療法およびアルキル化剤による処置に対して抵抗性であるか、あるいはそれらによる処置の間にまたは処置を完了した後最長6ヶ月で再発した。一部の態様では、対象は、抗CD20療法およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療による処置に対して抵抗性であるか、あるいは前治療の間にまたはそれを完了した後最長6ヶ月で再発した。一部の態様では、対象は、抗CD20療法およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療による処置に対して抵抗性であるか、あるいは前治療の間にまたはそれを完了した後最長6ヶ月でそれに再発した。一部の態様では、対象は、抗CD20療法による処置に対して抵抗性であるか、あるいはそれによる処置の間にまたは処置を完了した後最長6ヶ月で再発している。一部の態様では、対象は、治療のラインの完了後に抗CD20抗体維持療法を投与される。一部の態様では、対象は、2ライン以上の治療後の抗CD20抗体維持の間にまたは維持完了後6ヶ月以内に再発している。一部の態様では、対象は、先行治療のライン後の抗CD20抗体維持の間にまたは維持完了後6ヶ月以内に再発している。

30

40

【0111】

前述の態様における例示的な抗CD20抗体としては、これらに限定されないが、リツキシマブ、オフアツムマブ、オクレリズマブ（GA101またはR05072759としても公知）、ベルツズマブ、オビヌツズマブ、TRU-015（Trubion Pharmaceuticals）、オカラツズマブ（AME-133vまたはオカラツズマブとしても公知）、およびPro131921（Genentech）を挙げることができる。一部の態様では、抗CD20抗体はモノクローナル抗体である。一部の態様では、抗CD20抗体は、リツキシマブを含む。一部の態様では、

50

抗CD20抗体は、オビヌツズマブを含む。前述の態様における例示的なアルキル化剤としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、ダカルバジン、メルファラン、イホスファミド、テモゾロミド、およびベンダムスチンが挙げられる。一部の態様では、アルキル化剤は、ベンダムスチンである。

【0112】

一部の態様では、対象は、診断から24ヶ月以内および化学免疫療法レジメンなどの1ラインの前治療を完了した後に疾患の進行を有した。R-CHOPなどの化学免疫療法レジメンによる新たに診断された患者の初回処置後、患者のおよそ25%が24ヶ月以内に進行する(Casulo, 2015)。24ヶ月以内に疾患の進行を有する患者(POD24)は、50%の5年全生存率(OS)を有するのに対して、非POD24患者は、90%の5年OSを有する。POD24は重要な予後生存因子である(Casulo, Br J Haematol. 2019;186(4):513-23)。一部の態様では、対象は、疾患を処置するための化学免疫療法の組み合わせ療法を完了した後、初回処置の24ヶ月以内に疾患の進行を有した(POD24)。一部の態様では、対象は、疾患を処置するための化学免疫療法の組み合わせ療法を完了した後、診断から24ヶ月以内に疾患の進行を有した(POD24)。

10

【0113】

一部の態様では、FL対象のコホートは、本明細書において提供される方法のいずれかによって処置される。一部の態様では、FLコホートは、再発しているか、あるいはFLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療に対して抵抗性である対象を含み、1ラインの前治療は、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む。一部の態様では、FLコホートは、(i) FLの診断から24ヶ月以内の進行(POD24)、1ラインの前治療の開始から24ヶ月以内の進行(POD24)、または両方を有し、かつ(ii)対象の最初のFL診断から6ヶ月以内に1ラインの前治療を受けた対象を含む。一部の態様では、FLコホートは、以下：(i) 起因する症状；(ii) 末端器官機能の危機、リンパ腫に続発する血球減少、またはbulky病変；(iii) 脾腫；および(iv) 少なくとも6ヶ月にわたる疾患の着実な進行の1つまたは複数を有する対象を含む。したがって、一部の態様では、FLコホートは、再発しているか、あるいはFLグレード1、2または3Aを処置するための、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む1ラインの前治療に対して抵抗性であり；かつ(i) FLの診断から24ヶ月以内の進行(POD24)、1ラインの前治療の開始から24ヶ月以内の進行(POD24)、または両方を有し、かつ対象の最初のFL診断から6ヶ月以内に1ラインの前治療を受けた；あるいは(ii) FLに起因する症状；末端器官機能の危機、リンパ腫に続発する血球減少、またはbulky病変；脾腫；および少なくとも6ヶ月にわたる疾患の着実な進行の1つまたは複数を有する、対象を含む。一部の態様では、FLに起因する症状は、B症状に限定されない。一部の態様では、bulky病変とは、>7 cmの腫瘍1つ、または>3 cmの腫瘍3つ以上である。

20

30

【0114】

一部の態様では、FL対象のコホートは、本明細書において提供される方法のいずれかにより処置される。一部の態様では、FLコホートは、再発しているか、あるいはFLグレード1、2または3Aを処置するための2ラインの前治療に対して抵抗性である対象を含み、2ラインの前治療の1つは、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む。一部の態様では、FLコホートは、(i) 1ラインの前治療(例えば、第1のラインの前治療または第2のラインの前治療)の完了から12ヶ月以内に再発性または抵抗性の疾患を有し、かつ組み合わせ前治療を受けたことがある；(ii) HSCT後に再発している、かつ/あるいは(iii) 二重抵抗性の定義を満たしている、対象を含む。したがって、一部の態様では、FLコホートは、(i) 再発しているか、あるいはFLグレード1、2または3Aを処置するための2ラインの前治療に対して抵抗性であり、2ラインの前治療の1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む；ならびに(ii) 1ラインの前治療(例えば、第1のラインの前治療または第2のラインの前治療)の完了から12ヶ月以内に再発性または抵抗性の疾患を有し、かつ組み合わせ前治療を受けたことがある；HSCT後に再発している、かつ/または二重抵抗性の定義を満たしている、対象を含む。一部の態様では、PI

40

50

3 Kiによる単独療法が1ラインの前治療である。一部の態様では、対象が、(i) 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む全身性の治療ラインに抵抗性である；(ii) 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む全身性の1ラインの前治療の完了後6ヶ月以内に再発している；かつ/あるいは(iii) 2ラインの前治療後に提供される抗CD20抗体維持療法の間にまたは2ラインの前治療後に提供される抗CD20抗体維持療法の完了から6ヶ月以内に再発している場合に、対象は二重抵抗性である。

【0115】

一部の態様では、FL対象のコホートは、本明細書において提供される方法のいずれかにより処置される。一部の態様では、FLコホートは、再発しているか、あるいはFLグレード1、2または3Aを処置するための3ライン以上（例えば、3ライン）の前治療に対して抵抗性である対象を含み、3ライン以上の前治療のうち1つは、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含む。一部の態様では、HSCTは、3ライン以上の前治療の1つである。一部の態様では、FLコホートは、二重抵抗性である対象を含む。一部の態様では、対象が、(i) 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む全身性の治療ラインに抵抗性である；(ii) 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む全身性の1ラインの前治療完了後6ヶ月以内に再発している；かつ/あるいは(iii) 2ラインの前治療後に提供される抗CD20抗体維持療法の間にまたは2ラインの前治療後に提供される抗CD20抗体維持療法の完了から6ヶ月以内に再発している場合に、対象は二重抵抗性である。

10

【0116】

一部の態様では、対象は、FLグレード3B (FL3B) を有さない。一部の態様では、対象は、複合型DLBCLおよびFLのエビデンス、または形質転換FLのエビデンスを有さない。一部の態様では、対象は、世界保健機関 (WHO) 下位分類の十二指腸型FLを有さない。

20

【0117】

B. 辺縁帯リンパ腫 (MZL)

一部の態様では、提供される方法は、辺縁帯リンパ腫 (MZL) を有する特定の群またはサブセットの対象を処置することを伴う。一部の態様では、対象は再発性/抵抗性MZLを有する。

【0118】

MZLは、粘膜関連リンパ組織 (MALT)、脾臓、またはリンパ節の辺縁帯への移動前に二次リンパ濾胞において成熟するB細胞の形質転換から生じる不均一なB細胞悪性腫瘍である。一部の態様では、MZLは、超変異IgV遺伝子によって特徴づけられる辺縁帯リンパ球を呈するかまたはそれを伴う。一部の態様では、辺縁帯リンパ球は、pan-B+；CD5-/+；CD10-；CD23-；CD11c+/-；cyIg+ (細胞の40%)、sIgM+bright；sIgD-免疫表現型を呈するかまたはそれらを伴う。

30

【0119】

3種類のサブタイプを説明する：節外性MZL (ENMZL、主に胃)、脾MZL (SMZL)、および節性MZL (NMZL)。一部の局面では、対象は、節外性MZLを有する。一部の局面では、節外性MZLは、胃腸管、甲状腺、乳房、肺、脾臓、および//または他のMALT部位のMALTにおいて検出され得る。一部の態様では、節外性MZLは胃で検出され得る。一部の局面では、節外性MZLは、転座t(11:18) (q21;q21)/API2/MLT融合を呈するかまたはそれを伴う。一部の局面では、節外性MZLは、転座t(14:18) (q32;q21)/IgH/MLT1融合を呈するかまたはそれを伴う。一部の局面では、節外性MZLは、t(3:14)/IgH/FOXP1融合を呈するかまたはそれを伴う。一部の態様では、対象は脾MZLを有し、疾患は最初は、脾臓、骨髄、および/または血液においてのみ検出される。一部の態様では、脾MZLは、脾腫関連循環絨毛リンパ球を呈するかまたはそれを伴う。一部の局面では、脾MZLは、7q欠失を呈するかまたはそれを伴う。一部の局面では、欠失は、7q32.1から7q32-3の間の領域に及ぶ。一部の局面では、脾MZLは、7q転座を呈するかまたはそれを伴う。一部の局面では、転座は、7q22-q32領域を中心とする。一部の局面では、脾MZLは、トリソミー3を呈するかまたはそれを伴う。一部の局面で

40

50

は、脾MZLは、トリソミー12を呈するかまたはそれを伴う。一部の態様では、対象は節性MZLを有し、該リンパ腫は初めは、リンパ節、骨髄、および/または血液に限定される (Swerdlow et al., (2016) Blood, 30:84-91)。

【0120】

特定の局面では、本明細書において提供される方法は、ある用量の $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞を対象に投与することを含み、各用量のT細胞は、 $CD19$ に特異的に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) を含む。そのようなCAR-T細胞、およびそれらの製造のための方法は、セクションIIに記載される。

【0121】

一部の態様では、提供される方法は、 2.5×10^7 個または約 2.5×10^7 個から 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個、例えば、約 5×10^7 個から 1×10^8 個または約 1×10^8 個の総組換え受容体発現T細胞 (例えば、 CAR^+ T細胞)、例えば、本明細書において記載された規定された比、例えば、1:1または約1:1の比で投与される $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞を含むある用量のT細胞の投与を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞 (両端の値を含む) の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.1×10^8 個または約 1.1×10^8 個のCAR発現T細胞 (両端の値を含む) の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.0×10^8 個または約 1.0×10^8 個のCAR発現T細胞 (両端の値を含む) の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 9×10^7 個または約 9×10^7 個のCAR発現T細胞 (両端の値を含む) の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 8×10^7 個または約 8×10^7 個のCAR発現T細胞 (両端の値を含む) の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 7×10^7 個または約 7×10^7 個のCAR発現T細胞 (両端の値を含む) の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 6×10^7 個または約 6×10^7 個のCAR発現T細胞 (両端の値を含む) の用量を含む。一部の態様では、ある用量のT細胞は、およそ1:1の、CARを発現する $CD4^+$ T細胞:CARを発現する $CD8^+$ T細胞の比を含む。特定の態様では、投与される用量は、厳密なもしくは一律のもしくは固定された数の CAR^+ T細胞、または厳密なもしくは一律のもしくは固定された数の $CD4^+CAR^+$ T細胞および/もしくは $CD8^+CAR^+$ T細胞などの特定の種類の CAR^+ T細胞、ならびに/またはそのような厳密なもしくは一律のもしくは固定された数と比較して指定された分散度、例えば+または- (プラスまたはマイナス、いくつかの場合では±と表示される) 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15%以下の範囲内にあるそのような細胞のいずれかの数である。一部の態様では、そのような一律のまたは固定された数の細胞は、 2.5×10^7 個もしくは約 2.5×10^7 個の総 CAR^+ T細胞または $CD8^+$ および/もしくは $CD4^+CAR^+$ T細胞、 5×10^7 個の総 CAR^+ T細胞または $CD8^+$ および/もしくは $CD4^+CAR^+$ T細胞、または 1×10^8 個の総 CAR^+ T細胞または $CD8^+$ および/もしくは $CD4^+CAR^+$ T細胞である。一部の態様では、用量中の細胞の数は、 2.5×10^7 個の CAR^+ T細胞、例えば、 1.25×10^7 個の $CD4^+CAR^+$ T細胞および 1.25×10^7 個の $CD8^+CAR^+$ T細胞を含むかまたはそれからなるかまたは本質的にそれからなる。一部の態様では、用量は、 5×10^7 個の CAR^+ T細胞、例えば、 2.5×10^7 個の $CD4^+CAR^+$ T細胞および 2.5×10^7 個の $CD8^+CAR^+$ T細胞を含むかまたはそれからなるかまたは本質的にそれからなる。一部の態様では、用量は、 1×10^8 個の CAR^+ T細胞、例えば、 0.5×10^8 個の $CD4^+CAR^+$ T細胞および 0.5×10^8 個の $CD8^+CAR^+$ T細胞を含むかまたはそれからなるかまたは本質的にそれからなる。一部の局面では、投与される細胞の数は、前述の態様におけるそのような数のある特定の分散度の範囲内、例えば、そのような細胞の数と比較して、プラスまたはマイナス (±) 5、6、7、8、9、または10%の範囲内、例えばプラスまたはマイナス8%の範囲内にある。一部の局面では、用量は、そのような細胞 (例えば、総 CAR^+ T細胞または $CD8^+$

10

20

30

40

50

および/もしくは $CD4^+$ CAR⁺T細胞)の数と、治療の奏効もしくはその持続期間(例えば、寛解、完全寛解、および/または特定の寛解持続期間を達成する尤度)および/または前述のいずれかの持続期間を示す1つまたは複数のアウトカムとの間に相関関係(任意で線形関係)が観察される範囲内である。

【0122】

一部の態様では、投与は、複数の別個の組成物を投与することを含み、該複数の別個の組成物は、前述の態様のいずれかにおける用量にしたがって、 $CD8^+$ CAR発現T細胞を含む第1の組成物および $CD4^+$ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む。

【0123】

一部の態様では、対象がMZLを有する場合に、対象が処置のために選択される。一部の態様では、組織学的に確認された疾患がある場合、対象が処置のために選択される。一部の態様では、CTで確認された疾患がある場合、対象が処置のために選択される。一部の態様では、PETで確認された疾患がある場合、対象が処置のために選択される。一部の態様では、PET非集積疾患がある場合、対象が処置のために選択される。一部の態様では、対象が、長軸方向に2.0 cm超の少なくとも1つの測定可能な結節性病変を有する場合、対象が処置のために選択される。一部の態様では、患者は少なくとも1つの測定可能な結節性病変を有する。一部の態様では、患者は少なくとも1つの測定可能な節外性病変を有する。

【0124】

一部の態様では、対象は、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、MZLを処置するための2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性である。1ラインの前治療には、MZLを処置するために用いられる任意の治療が含まれ得る。一部の態様では、1ラインまたは複数ラインの前治療は、CD20標的化療法(例えば、リツキシマブまたはオビヌツズマブなどの抗CD20抗体)、イブルチニブ、または造血幹細胞移植(HSCT)による処置から選択される。一部の態様では、HSCTは同種異系である。一部の態様では、HSCTは自己由来である。

【0125】

特定の態様では、対象は、CD20標的化療法(例えば、抗CD20抗体)を含む組み合わせ化学免疫療法である1ラインの前治療を受けたことがある。一部の態様では、組み合わせは、組み合わせ全身療法である。処置される対象の中には、再発しているかまたはMZLを処置するための組み合わせ全身療法による処置に対して抵抗性である対象がある。一部の態様では、組み合わせ全身療法には、抗CD20抗体およびアルキル化剤が含まれる。一部の態様では、抗CD20抗体はモノクローナル抗体である。一部の態様では、抗CD20抗体はリツキシマブである。一部の態様では、抗CD20抗体はオビヌツズマブである。例示的なアルキル化剤としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、クロラムブシル、ダカルバジン、メルファラン、イホスファミド、テモゾロミド、およびベンダムスチンが含まれる。一部の態様では、アルキル化剤はベンダムスチンである。一部の態様では、アルキル化剤はクロラムブシルである。一部の態様では、対象は、リツキシマブおよびベンダムスチンによって以前に処置されたことがある。一部の態様では、対象は、リツキシマブおよびクロラムブシルによって以前に処置されたことがある。一部の態様では、対象は、オビヌツズマブおよびベンダムスチンによって以前に処置されたことがある。一部の態様では、対象は、オビヌツズマブおよびクロラムブシルによって以前に処置されたことがある。

【0126】

一部の態様では、1ラインの前治療は、リツキシマブ+シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン(R-CHOP)である。一部の態様では、対象は、再発しているか、またはリツキシマブ+シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン(R-CHOP)による処置に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、再発しているか、またはレナリドミドおよびリツキシマブによ

10

20

30

40

50

る処置に対して抵抗性である。

【0127】

一部の態様では、1ラインの前治療は造血幹細胞移植（HSCT）である。一部の態様では、対象は、再発しているか、または造血幹細胞移植（HSCT）に対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、同種異系HSCTを以前に受けたことがあり、かつ再発しているか、または同種異系HSCTに対して抵抗性である。一部の態様では、対象は、自己由来HSCTを以前に受けたことがあり、かつ再発しているか、または自己由来HSCTに対して抵抗性である。

【0128】

一部の態様では、MZL対象のコホートは、本明細書において提供される方法のいずれかにより処置される。一部の態様では、MZLコホートは、再発しているか、またはMZLを処置するための2ラインの前治療に対して抵抗性である対象を含み、少なくとも1ラインの前治療は、組み合わせ全身療法、抗CD20抗体およびアルキル化剤による療法、またはHSCTであった。一部の態様では、対象は、HSCT後に再発される。一部の態様では、MZLは脾MZLであり、かつ2ラインの前治療の1つは脾臓摘出である。一部の態様では、MZLは節外性MZLであり、かつ抗生物質は、2ラインの前治療の1つではない。

【0129】

一部の態様では、対象は脾MZLを有し、かつ少なくとも2つの前治療のうち少なくとも1つは脾臓摘出である。一部の態様では、対象は脾MZLを有し、かつ2つの前治療のうち少なくとも1つは脾臓摘出である。一部の態様では、対象は節外性MZL（ENMZL）を有し、かつ抗生物質は、少なくとも2ラインの前治療の1つではない。一部の態様では、対象は節外性MZL（ENMZL）を有し、かつ抗生物質は、2ラインの前治療のうち1つではない。

【0130】

C. 奏効、有効性、および生存

一部の態様では、提供される方法に従う投与は、対象が別の療法に対して抵抗性になっているにもかかわらず、対象を有効に処置する。一部の態様では、本方法により処置された対象の少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、または少なくとも80%は、完全寛解（CR）を達成する。一部の態様では、本方法により処置された対象の少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも80%、または少なくとも90%は、客観的奏効（OR）を達成する。一部の態様では、本方法により処置された対象の少なくとも50%もしくは少なくとも約50%、対象の少なくとも60%もしくは少なくとも約60%、対象の少なくとも70%もしくは少なくとも約70%、対象の少なくとも80%もしくは少なくとも約80%、または対象の少なくとも90%もしくは少なくとも約90%は、CRを達成し、かつ/または客観的奏効（OR）を達成する。一部の態様では、有効な処置について評価される基準としては、全奏効率（ORR；一部の場合では客観的奏効率としても知られる）、完全奏効（CR；一部の場合では完全寛解としても知られる）、奏効期間（DOR）、無増悪生存期間（PFS）、および/または全生存期間（OS）が含まれる。

【0131】

一部の態様では、本明細書において提供される方法により処置された対象の少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、または少なくとも70%は、完全寛解（CR；一部の場合では完全奏効としても知られる）を達成し、3ヶ月、6ヶ月、もしくは12ヶ月超、もしくは約3ヶ月、6ヶ月、もしくは12ヶ月超、または13ヶ月超もしくはおよそ14ヶ月超にわたる無増悪生存期間（PFS）および/または全生存期間（OS）を呈する。一部の態様では、平均して、本方法により処置された対象は、6ヶ月超、12ヶ月超、もしくは18ヶ月超、または約6ヶ月超、12ヶ月超、もしくは18ヶ月超の中央値PFSまたはOSを呈する。一部の態様では、対象は、少なくとも6、12、18ヶ月以上、または少なくとも約6、12、18ヶ月以上、またはそれより長期にわたる療法後にPFSまたはOSを呈する。

。

10

20

30

40

50

【0132】

一部の態様では、提供される方法により処置された対象は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%のCRRを呈する。一部の態様では、完全奏効率（CRR）は、最長12ヶ月、最長18ヶ月、最長24ヶ月、最長36ヶ月、またはそれより長い期間、最良総合効果（BOR）を有する対象のパーセンテージとして算出する。

【0133】

一部の局面では、対象、例えば、NHLを有する対象における奏効率は、Lugano判定基準に基づく。（Cheson et al., Blood. 2016;128(21):2489-96）。一部の局面では、奏功の評価は、臨床的方法、血液学的方法、および/または分子的方法のいずれかを利用する。一部の局面では、Lugano判定基準を用いて評価される奏効は、必要に応じて、陽電子放射断層撮影（PET）-コンピュータ断層撮影（CT）および/またはCTの使用を伴う。PET-CT評価は、FDG集積リンパ腫向けにフルオロデオキシグルコース（FDG）の使用をさらに含み得る。一部の局面では、PET-CTが、FDG集積組織像における奏効を評価するために用いられる場合、5ポイントスケールが用いられ得る。一部の点では、5ポイントスケールは、以下の基準を含む：1、バックグラウンドを上回る取り込みがない；2、取り込み $\leq$ 縦隔；3、取り込み $>$ 縦隔だが $\leq$ 肝臓；4、取り込みは若干 $>$ 肝臓；5、取り込みは肝臓より著しく高い、かつ/または新たな病変がある；X、リンパ腫と関係している可能性が低い新たな取り込み部位がある。

【0134】

一部の局面では、Lugano判定基準を用いて記載される完全奏効は、さまざまな測定可能な部位での代謝的完全奏効および放射線学的完全奏効を伴う。一部の局面では、これらの部位には、リンパ節部位およびリンパ節外部位が含まれ、CRは、PET-CTが用いられる場合には5ポイントスケールで、腫瘍の有無を問わず、1、2または3点のスコアとして記載される。一部の局面では、高い生理的取り込みを有するまたは脾臓または骨髄内活性化（例えば、化学療法または骨髄コロニー刺激因子による）有する節外性部位では、取り込みが、正常な縦隔および/または肝臓より強くなることがある。この状況では、たとえ組織が高い生理的取り込みを有したとしても、最初の病変の部位での取り込みが周囲の正常組織より高くない場合には、代謝的完全奏効が推測され得る。

【0135】

一部の局面では、奏功は、CTを用いてリンパ節で評価され、CRは、リンパ節外部位の病変なしとして記載され、標的リンパ節/結節の腫瘍は、病変の最長径（LDi）が ≤ 1.5 cmまで縮小しなければならない。評価のさらなる部位には骨髄が含まれ、PET-CTに基づく評価は、骨髄にFDG集積病変のエビデンスはないことを示すはずであり、CTに基づく評価は、正常な形態を示すはずである。さらなる部位には臓器腫大の評価が含まれてもよく、正常まで縮小しなければならない。一部の局面では、非測定病変および新病変が評価され、CRの場合には、該当なしでなければならない（Chessen et al., Blood. 2016 Nov 24;128(21):2489-96）。

【0136】

一部の局面では、Lugano判定基準を用いて説明される部分奏功（PR；一部の 경우에는部分寛解としても知られる）は、さまざまな測定可能な部位での代謝的部分奏功および/または放射線学的部分奏功を伴う。一部の局面では、これらの部位には、リンパ節部位およびリンパ節外部位が含まれ、PRは、PET-CTが用いられる場合、ベースラインと比較して減弱した取り込みおよび任意のサイズの残存腫瘍を有する4または5点のスコアとして記載される。中間では、そのような知見は、疾患の応答を示し得る。処置の最後では、そのような知見は疾患の残存を示し得る。

【0137】

一部の局面では、奏功は、CTを用いてリンパ節において評価され、PRは、最大6個の標的の測定可能なリンパ節部位および節外性部位のSPDの $\geq 50\%$ の減少として記載される。病変がCTでの測定に小さすぎる場合は、5 mm $\times$ 5 mmをデフォルト値として割り

当て；病変が目で見えない場合、値は0 mm×0 mmであり；>5 mm×5 mmだが正常より小さいリンパ節では、実測値を用いて計算する。評価のさらなる部位には骨髓が挙げられ、PET-CTに基づく評価は、正常骨髓の取り込みより高いが、ベースラインと比較すると減弱している残存取り込み（化学療法に由来する反応性変化に相当するびまん性取り込みは許容）を示さなければならない。一部の局面では、結節性奏効の状況において骨髓での持続的な限局性変化が存在する場合、MRIもしくは生検または一定間隔をおいたスキャンによる再評価を考慮しなければならない。一部の局面では、さらなる部位には、臓器腫大の評価が含まれてもよく、脾臓の長さは、正常を超えて>50%縮小していなければならない。一部の局面では、非測定病変および新病変が評価され、PRの場合には、該当なし/正常、退縮、ただし増加なしでなければならない。反応なし/安定（SD）または進行（PD）もまた、PET-CTおよび/またはCTに基づく評価を用いて測定することができる。（Chessen et al., Blood. [0144] 2016 Nov 24; 128(21): 2489-96）。

10

【0138】

一部の点では、無増悪生存期間（PFS）は、その疾患が悪化せずに疾患を有する対象が生存する、がんなどの疾患の治療中および治療後の期間の長さとして説明される。一部の局面では、客観的奏効（OR）は、測定可能な奏効として説明される。一部の局面では、客観的奏効率（ORR；一部の 경우에는 全奏効率としても知られる）は、CRまたはPRを達成した患者の割合として説明される。一部の局面では、全生存期間（OS）は、がんなどの疾患の診断日または治療の開始のいずれかから、疾患と診断された対象が生存している時点までの期間として説明される。一部の局面では、イベントフリー生存（EFS）は、その治療により予防または遅延が想定されていた特定の合併症や事象が対象に現れなかったままである、がんの治療が終了した後の期間として説明される。これらのイベントには、がんの再発、または骨に転移したがんによる骨痛などの特定の症状の発現、または死亡が含まれ得る。

20

【0139】

一部の態様では、奏効期間（DOR）の測定には、腫瘍奏効の記録から疾患進行までの期間が含まれる。一部の態様では、奏功を評価するためのパラメーターには、持続的な奏効、例えば、治療の開始からの期間後に持続する奏効を含み得る。一部の態様では、持続的な奏効は、治療の開始後およそ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、または24ヶ月での奏効率によって示される。一部の態様では、奏功は、3ヶ月超または6ヶ月超にわたって持続する。

30

【0140】

一部の態様では、方法は、疾患または状態の負荷、例えば、腫瘍細胞の数、腫瘍のサイズ、患者の生存期間またはイベントフリー生存期間の持続時間などを、代替の投与レジメン、例えば、1種もしくは複数種の代替治療剤を対象が受けているレジメン、ならびに/または提供される方法による、および/もしくは提供される製造品もしくは組成物によるある用量の細胞および/もしくはリンパ球枯渇剤を対象が受けていないレジメンを用いる同等の方法により観察されるであろう低減と比較してより大きな程度までかつ/またはより長い期間まで低減する。一部の局面では、対象の生存率、特定の期間内の生存率、生存の程度、イベントフリー生存もしくは無症状生存または無再発生存の存在または持続期間が評価される。一部の態様では、疾患または状態の任意の症状が評価される。一部の態様では、疾患または状態の負荷の尺度が指定される。

40

【0141】

一部の態様では、対象のイベントフリー生存率または全生存率は、他の方法、例えば、1種もしくは複数種の代替治療剤を対象が受けている方法、ならびに/または提供される方法による、および/または提供される製造物品もしくは組成物によるある用量の細胞および/もしくはリンパ球枯渇剤を対象が受けていない方法と比較して、本方法によって改善される。例えば、一部の態様では、投与後6ヶ月での本方法によって処置された対象のイベントフリー生存率または確率は、約40%超、約50%超、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超、または約95%超である。一部の局面では、全生存率は、約40%超

50

、約50%超、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超、または約95%超である。一部の態様では、本方法により処置された対象は、少なくとも6ヶ月、または少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10年までのイベントフリー生存、無再発生存、または生存を呈する。一部の態様では、無増悪期間は改善され、例えば、6ヶ月、または少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10年より多い、あるいは約6ヶ月、または少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10年より多い無増悪期間である。

【0142】

一部の態様では、方法による処置後、再発の確率は、他の方法、例えば、1種もしくは複数種の代替治療剤を対象が受けている方法、ならびに/または提供される方法による、および/または提供される製造物品もしくは組成物によるある用量の細胞および/もしくはリンパ球枯渇剤を対象が受けていない方法と比較して、低下する。例えば、一部の態様では、最初の投与後6ヶ月での再発の確率は、約80%未満、約70%未満、約60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、または約10%未満である。

【0143】

いくつかの場合において、投与された細胞、例えば養子移入された細胞の薬物動態が、投与された細胞の利用能、例えば生物学的利用能を評価するために決定される。養子移入された細胞の薬物動態を決定するための方法は、操作された細胞を投与されている対象から末梢血を採取する段階、および末梢血中の操作された細胞の数または比率を決定する段階を含み得る。細胞を選択および/または単離するためのアプローチは、キメラ抗原受容体(CAR)に特異的な抗体(例えば、Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 2013 Mar; 5(177): 177ra38); タンパク質L(Zheng et al., *J. Transl. Med.* 2012 Feb; 10:29); CAR中の特定部位に直接導入されるStrep-Tag配列などのエピトープタグ(それによって、Strep-Tagに対する結合試薬を用いてCARを直接的に評価する)(Liu et al. (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; 国際特許出願公開WO2015095895)、およびCARポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体(国際特許出願公開WO2014190273を参照)の使用を含んでよい。いくつかの場合において、外因性マーカー遺伝子が、細胞の検出または選択を可能にするため、および、一部の 경우에는、細胞自殺も促進するために、操作された細胞による療法と関連して利用されてよい。いくつかの場合において、切断型上皮増殖因子受容体(EGFRt)を、形質導入された細胞において、関心対象の導入遺伝子(CARまたはTCR)と同時発現させることができる(例えば米国特許第8,802,374号を参照)。EGFRt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、これらは、EGFRt構築物および別の組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体(CAR)により操作されている細胞を同定もしくは選択する、および/または該受容体を発現する細胞を除去もしくは分離するために用いることができる。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。

【0144】

一部の態様では、患者から取得した生物試料、例えば血液中のCAR⁺T細胞の数は、例えば、細胞の薬物動態を測定するために、細胞療法の投与後のある期間に決定することができる。一部の態様では、対象の血液中または本方法によってそのように処置された対象の大半において検出可能なCAR⁺T細胞、任意でCAR⁺CD8⁺T細胞および/またはCAR⁺CD4⁺T細胞の数は、1細胞/ μ Lより多い、5細胞/ μ Lより多い、または10細胞/ μ Lより多い。一部の態様では、患者から取得した生物試料、例えば血液中のCAR⁺T細胞の数は、CAR導入遺伝子のためのPCRを介して決定することができる。

【0145】

D. 毒性

一部の態様では、提供される方法のいずれかにより処置された対象は、投与された細胞に関連する可能性がある毒性の1つまたは複数の徴候または症状について評価される。養子T細胞療法の投与、例えば、キメラ抗原受容体を発現するT細胞による処置は、サイト

カイン放出症候群および神経毒性などの毒性作用または毒性アウトカムを誘発するおそれがある。一部の例では、このような作用またはアウトカムは、高レベルの循環中サイトカインと同時に起こり、これらは、観察される毒性の基礎をなす可能性がある。

【0146】

一部の局面では、毒性アウトカムは、サイトカイン放出症候群（CRS）もしくは重度のCRS（sCRS）であるか、またはサイトカイン放出症候群もしくは重度のCRSに関連するか、またはサイトカイン放出症候群もしくは重度のCRSを示す。CRS、例えばsCRSは、一部の 경우에는、養子T細胞療法および他の生物産物の対象への投与後に生じ得る。Davila et al., Sci Transl Med 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al., Sci. Transl. Med. 5, 177ra38 (2013)を参照。

10

【0147】

典型的には、CRSは、例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、単球、および/またはマクロファージによって媒介される、悪化した全身免疫応答によって引き起こされる。このような細胞は、多量の炎症メディエーター、例えば、サイトカインおよびケモカインを放出することがある。サイトカインは、微小血管漏出、心不全、もしくは死亡の原因となり得る、急性炎症反応を誘発するおよび/または内臓器損傷を誘導することがある。重度の、生命を脅かすCRSは、肺浸潤および肺損傷、腎不全、または播種性血管内凝固につながる可能性がある。他の重度の、生命を脅かす毒性には、心毒性、呼吸窮迫、神経毒性、および/または肝不全が含まれ得る。一部の局面では、発熱、特に高熱（ $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ または $\geq 101.3^{\circ}\text{F}$ ）が、CRSまたはそのリスクに関連する。一部の 경우에는、CRSの特徴および症状は、感染によく似ている。一部の態様では、CRS症状を呈している患者では感染も考慮され、培養によるモニタリングおよび経験的な抗生物質治療が投与され得る。CRSに関連する他の症状には、心機能不全、成人型呼吸窮迫症候群、腎および/または肝不全、凝血障害、播種性血管内凝固、および毛細管漏出症候群が含まれ得る。

20

【0148】

CRSは、抗炎症性療法、例えば、抗IL-6療法、例えば、抗IL-6抗体、例えば、トシリズマブ、または抗生物質、または記載されるような他の作用物質を用いて処置され得る。CRSのアウトカム、徴候、および症状は公知であり、本明細書に記載のものを含む。一部の態様では、特定の投与が、ある特定のCRS関連アウトカム、徴候、もしくは症状をもたらすまたはもたらさない場合、特定のアウトカム、徴候、および症状、ならびに/またはその数量もしくは程度が指定されることがある。

30

【0149】

CAR発現細胞の投与の状況では、CRSは典型的には、CARを発現する細胞の注入後2週間以内に生じる。Abramson et al., J Clin Onc. 2018;36(15_suppl):7505を参照。一部の 경우에는、CRSは、CAR T細胞の注入後3日未満または21日超に生じる。CRSの発生率およびタイミングは、注入時のベースラインサイトカインレベルまたは腫瘍負荷量と関係する可能性がある。一般的に、CRSは、インターフェロン(IFN)- γ 、腫瘍壊死因子(TNF)- α 、および/またはインターロイキン(IL)-2の血清レベルの上昇を伴う。CRSにおいて迅速に誘導される可能性がある他のサイトカインは、IL-1 β 、IL-6、IL-8、およびIL-10である。

40

【0150】

CRSに関連する例示的なアウトカムには、発熱、硬直、悪寒、低血圧、呼吸困難、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、脳症、ALT/ASTの上昇、腎不全、心臓障害、低酸素、神経障害、および死亡が含まれる。神経学的合併症には、せん妄、発作様活動、錯乱、喚語困難(word-finding difficulty)、失語症、および/または昏迷状態が含まれる。他のCRS関連アウトカムには、疲労、悪心、頭痛、発作、頻拍、筋肉痛、発疹、急性血管漏出症候群、肝機能低下、および腎不全が含まれる。一部の局面では、CRSは、1種または複数の因子、例えば、血清フェリチン、d-ダイマー、アミノトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、およびトリグリセリドの増加に関連するか、または低フィブリノゲン血症もしくは肝脾腫に関連する。CRSに関連する他の例示的な徴候または症状には、血行

50

動態不安定、発熱性好中球減少、血清中C反応性タンパク質(CRP)の増加、凝固パラメーター(例えば、国際標準比(INR)、プロトロンビン時間(PTI)、および/もしくはフィブリノーゲン)の変化、心臓機能および他の器官機能の変化、ならびに/または絶対好中球数(ANC)が含まれる。

【0151】

一部の態様では、CRSに関連するアウトカムには、持続的な発熱、例えば、2日以上、例えば、3日以上、例えば、4日以上にわたる、または少なくとも3日間連続した、指定された体温、例えば、38℃超または約38℃超の発熱;38℃超または約38℃超の発熱;サイトカインの上昇、例えば、少なくとも2種のサイトカイン(例えば、インターフェロン γ (IFN γ)、GM-CSF、IL-6、IL-10、Flt-3L、フラクタルカイン、およびIL-5、ならびに/もしくは腫瘍壊死因子 α (TNF α)からなる群のうちの少なくとも2種)の処置前レベルと比較した最大倍率変化、例えば、少なくとも75もしくは少なくとも約75の最大倍率変化、またはこのようなサイトカインの少なくとも1種の最大倍率変化、例えば、少なくとも250もしくは少なくとも約250の最大倍率変化;ならびに/または毒性の少なくとも1つの臨床徴候、例えば、低血圧(例えば、少なくとも1種の静脈内血管作動性昇圧薬(intravenous vasoactive pressor)によって測定される);低酸素(例えば、90%未満または約90%未満の血漿酸素(PO₂)レベル);ならびに/あるいは1つまたは複数の神経障害(精神状態変化、鈍麻、および発作を含む)の1つまたは複数が含まれる。一部の態様では、神経毒性(NT)はCRSと同時に観察され得る。

【0152】

例示的なCRS関連アウトカムには、サイトカインおよびケモカインならびにCRSに関連する他の因子を含む、1種または複数種の因子の増加したまたは高い血清レベルが含まれる。例示的なアウトカムにはさらに、このような因子の1つまたは複数の合成または分泌の増加が含まれる。このような合成または分泌は、T細胞またはT細胞と相互作用する細胞、例えば、自然免疫細胞もしくはB細胞によるものでもよい。

【0153】

どの患者がsCRSを発症するリスクを有する可能性が高いかを予測するために、CRSの発症と相関すると思われるCRS判断基準が開発されている(Davilla et al. Science translational medicine. 2014;6(224):224ra25;Abramson et al., J Clin Onc. 2018;36(15_suppl):7505を参照)。因子には、発熱、低酸素、低血圧、神経変化、炎症性サイトカイン、例えば、処置によって誘導される上昇が処置前の腫瘍負荷量およびsCRS症状の両方と良好に相関することができる7種類一組のサイトカイン(IFN γ 、IL-5、IL-6、IL-10、Flt-3L、フラクタルカイン、およびGM-CSF)の血清レベルの上昇が含まれる。一部の態様では、CRSグレードを反映する判断基準は、以下の表2に詳述した判断基準である。

【0154】

(表2) サイトカイン放出症候群のグレード分類基準

10

20

30

40

50

	症状/徴候	サイトカイン 放出症候群 (CRS) グレード1 (軽度)	CRSグレード2 (中程度)	CRSグレード3 (重度)	CRSグレード4 (生命を脅かす)
			CRSグレードは、最も重篤な症状によって定義される (発熱を除く)		
バイタル サイン	体温 ≥ 38.5 °C/101.3 °F	あり	任意	任意	任意
	収縮期血圧 (SBP) ≤ 90 mmHg	N/A	静脈内 (IV) 輸液 または低用量の 1 種の昇圧剤に 応答する	高用量または 複数種の 昇圧剤を 必要とする	生命を脅かす
	>90%の酸素飽和度 (SaO ₂)に到達するための 酸素要求量	N/A	<40%の吸入 酸素濃度 (FiO ₂)	FiO ₂ ≥ 40%	人工呼吸器の サポートを 必要とする
臓器毒性		N/A	グレード2	グレード3または 高トランスアミナーゼ 血症グレード4	グレード4 (高トランスアミナーゼ 血症を除く)

10

【0155】

一部の態様では、高用量昇圧剤療法には、以下の表3に記載されるものが含まれる。

20

【0156】

(表3) 高用量昇圧剤 (≥3時間で必要とされる全用量)

昇圧剤	用量
ノルエピネフリン単独療法	≥ 20 µg/min
ドーパミン単独療法	≥ 10 µg/kg/min
フェニレフリン単独療法	≥ 200 µg/min
エピネフリン単独療法	≥ 10 µg/min
バソプレシンの場合	バソプレシン + ≥ 10 µg/分 ^a のノルエピネフリン等価物 (NE)
(バソプレシンではない) 昇圧剤の組み合わせの場合	≥ 20 µg/分 ^a のノルエピネフリン等価物

30

^a VASST試験昇圧剤等価式: ノルエピネフリン等価量 = [ノルエピネフリン (µg/分)] + [ドーパミン (µg/kg/分) ÷ 2] + [エピネフリン (µg/分)] + [フェニレフリン (µg/分) ÷ 10]

【0157】

一部の態様では、毒性アウトカムは重度のCRSである。一部の態様では、毒性アウトカムは、重度のCRSの非存在である (例えば、中等度または軽度のCRS)。

【0158】

一部の態様では、発熱および/またはC反応性タンパク質 (CRP) のレベルが測定される。一部の態様では、CRS関連血清因子またはCRS関連アウトカムには、Flt-3L、フラクタルカイン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン-1β (IL-1β)、IL-2、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、インターフェロンγ (IFN-γ)、マクロファージ炎症性タンパク質 (MIP) -1、MIP-1、sIL-2Rα、または腫瘍壊死因子α (TNFα) を含む、炎症性サイトカインおよび/またはケモカインのレベルおよび/または濃度の増加が含まれる。一部の態様では、前記因子またはアウトカムにはC反応性タンパク質 (CRP) が含まれる。一部の態様では、高レベルのCRPを有すると測定された対象はCRSを有さない。一部の態様では、CRSの測定は、CRPおよびCRSを示す別の因子の測定を含む。

40

【0159】

一部の態様では、重度のCRSまたはグレード3以上のCRS、例えばグレード4以上に関連するアウトカムには、以下のうちの1つまたは複数が含まれる: 持続的な発熱、例えば

50

、2日以上、例えば3日以上、例えば4日以上にわたる、または少なくとも3日連続の、指定された体温、例えば38℃超または約38℃超の発熱；38℃超または約38℃超の発熱；サイトカインの上昇、例えば、少なくとも2種のサイトカイン(例えば、インターフェロン γ (IFN γ)、GM-CSF、IL-6、IL-10、Flt-3L、フラクタルカイン、およびIL-5、ならびに/もしくは腫瘍壊死因子 α (TNF α)からなる群のうち少なくとも2種)の処置前レベルと比較した、最大倍率変化、例えば、少なくとも75もしくは少なくとも約75の最大倍率変化、またはそのようなサイトカインのうちの少なくとも1種の最大倍率変化、例えば、少なくとも250もしくは少なくとも約250の最大倍率変化；ならびに/または毒性の少なくとも1つの臨床徴候、例えば、低血圧(例えば、少なくとも1種の静脈内血管作動性昇圧薬によって測定される)；低酸素(例えば、90%未満または約90%未満の血漿酸素(PO_2)レベル)；ならびに/あるいは1種または複数種の神経障害(精神状態の変化、鈍麻、および発作を含む)。一部の態様では、重度のCRSには、集中治療室(ICU)での管理または看護を必要とするCRSが含まれる。

10

【0160】

一部の態様では、CRS、例えば重度のCRSは、(1)持続的な発熱(少なくとも3日間にわたり少なくとも38℃の発熱)および(2)少なくとも20 mg/dLまたは少なくとも約20 mg/dLのCRPの血清レベルの組合せを包含する。一部の態様では、CRSは、2種以上の昇圧剤の使用を必要とする低血圧または機械的換気を必要とする呼吸不全を包含する。一部の態様では、昇圧剤の投与量は、2回目または後続の投与において増加される。

【0161】

20

一部の態様では、重度のCRSまたはグレード3のCRSは、アラニンアミノトランスフェラーゼの増加、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの増加、悪寒、発熱性好中球減少、頭痛、左室機能不全、脳障害、水頭症、および/または振戦を包含する。一部の態様では、重度のCRSは、シクロホスファミドなどの追加のT細胞枯渇療法によって処置される(Brudno et al., Blood. 2016;127(26):3321-30)。

【0162】

様々なアウトカムを測定または検出する方法が指定され得る。

【0163】

一部の局面では、毒性アウトカムは神経毒性であるかまたは神経毒性に関連する。一部の態様では、神経毒性の臨床リスクに関連する症状には、錯乱、せん妄、失語症、表出性失語、鈍麻、ミオクロヌス、嗜眠、精神状態変化、痙攣、発作様活動、発作(任意で、脳波(EEG)によって確認される)、 β アミロイド($A\beta$)のレベルの上昇、グルタミン酸のレベルの上昇、および酸素ラジカルのレベルの上昇が含まれる。一部の態様では、神経毒性は、(例えば、グレード1~5スケールを用いて)重症度に基づいてグレード分類される(例えば、National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 5.00 (NCI CTCAE version 5.0を参照))。

30

【0164】

一部の例では、神経症状はsCRSの最初期の症状でもよい。一部の態様では、神経症状は、細胞療法注入の5~7日後に始まることが認められる。一部の態様では、神経変化の持続期間は、3~23日に及んでもよい。一部の態様では、sCRSの他の症状が消散した後に神経変化の回復が生じる。一部の態様では、神経変化の消散の時間または程度は、抗IL-6および/またはステロイドによる処置によって早まらない。

40

【0165】

一部の態様では、重度の神経毒性には、グレードが3以上の神経毒性、例えば、表4に示した神経毒性が含まれる。

【0166】

(表4) 神経毒性の例示的なグレード分類基準

50

グレード	症状の説明
1 無症候または軽度	一過性または軽度の不快感；活動の制限なし； 医療介入/治療の必要なし
2 中程度	身の回り以外の日常生活動作(ADL)、例えば、食事の準備、 日用品や衣服の買い物、電話の使用、金銭の管理 を制限する症状の存在
3 重度	身の回りのADL、例えば、入浴、着衣・脱衣、食事の摂取、トイレの使用、 薬の内服を制限する症状の存在
4 生命を脅かす	緊急介入を要する、生命を脅かす症状
5 致死	死亡

10

【0167】

一部の態様では、毒性を処置するための1種または複数種の介入または作用物質、例えば毒性を標的とする療法は、例えば、前述の態様のいずれかによって測定された、持続性の発熱を示すと対象が判定または確認(例えば、初めて判定または確認)される時点でまたはその直後に、投与される。一部の態様では、1種または複数種の毒性標的療法は、そのような確認または判定から一定期間内に、例えば、その30分、1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、または8時間以内に投与される。

20

【0168】

一部の態様では、提供される方法にしたがっておよび/または提供される製造物品もしくは組成物により処置された対象において観察された結果として生じる奏効は、処置された対象の大部分において任意の毒性のリスクが低いことまたは重篤な毒性のリスクが低いことに関連するかまたはそれをもたらす。一部の態様では、提供される方法にしたがっておよび/または提供される製造物品もしくは組成物によって処置された対象の30%、35%、40%、50%、55%、60%、70%、80%、もしくは90%超またはそれ以上、あるいは約30%、35%、40%、50%、55%、60%、70%、80%、もしくは90%超またはそれ以上は、いずれかのグレードのCRSまたはいずれかのグレードの神経毒性(NT)を示さない。一部の態様では、提供される方法にしたがっておよび/または提供される製造物品もしくは組成物によって処置された対象の50%、60%、70%、80%、90%、もしくは95%超またはそれ以上、あるいは約50%、60%、70%、80%、90%、もしくは95%超またはそれ以上は、重度のCRSまたはグレード3以上のCRSを示さない。一部の態様では、提供される方法にしたがっておよび/または提供される製造物品もしくは組成物によって処置された対象の50%、60%、70%、80%、90%、もしくは95%超またはそれ以上は、重度の神経毒性またはグレード3以上の神経毒性、例えば、グレード4または5の神経毒性を示さない。

30

【0169】

一部の態様では、方法にしたがっておよび/または提供される製造物品もしくは組成物によって処置された対象の少なくとも45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%または少なくとも約45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%は、早期発症のCRSまたは神経毒性を示さない、および/または投与の開始後1日、2日、3日または4日より早くCRSの発症を示さない。一部の態様では、方法にしたがっておよび/または提供される製造物品もしくは組成物によって処置された対象の少なくとも45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%または少なくとも約45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%は、投与の開始後3日、4日、5日、6日または7日より早く神経毒性の発症を示さない。一部の局面では、方法にしたがっておよび/また

40

50

は提供される製造物品もしくは組成物によって処置された対象間での神経毒性の発症の中央値は、本方法により処置された対象におけるCRSのピークの中央値もしくはその後、またはCRS消失までの時間の中央値もしくはその後である。一部の場合では、本方法により処置された対象間での神経毒性の発症の中央値は、8、9、10、もしくは11日超または約8、9、10、もしくは11日超である。

【0170】

II. 細胞療法および操作された細胞

一部の態様では、提供される併用療法の方法にしたがって使用するための細胞療法（例えば、T細胞療法）は、高リスク特性を示すそのような疾患または状態を含む、r/r/FLグレード1~3Aまたはr/r/MZLなどの疾患または状態に関連する抗原を認識するかつ/またはそれに特異的に結合するように設計された組換え受容体（例えば、CAR）を発現する操作された細胞を投与することを含む。特定の態様では、組換え受容体（例えば、CAR）によって結合または認識される抗原は、CD19である。一部の態様では、抗原への結合は、そのような抗原に対する応答、例えば免疫応答をもたらす。一部の態様では、細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）などの組換え受容体を含有するか、またはそれを含有するように操作される。CARなどの組換え受容体は一般に、一部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成分に連結されている、抗原に特異的な細胞外抗原（またはリガンド）結合ドメインを含む。一部の局面では、操作された細胞は、対象への投与、例えば、養子細胞療法に適した薬学的組成物および製剤として提供される。対象、例えば、患者に細胞および組成物を投与するための治療方法もまた、提供される。

【0171】

一部の態様では、細胞は、遺伝子操作を介して導入された1つまたは複数の核酸を含み、それにより、そのような核酸の組換え産物または遺伝子操作された産物を発現する。一部の態様では、遺伝子移入は、まず細胞を刺激し、例えば、サイトカインまたは活性化マーカーの発現によって測定される、増殖、生存、および/または活性化など応答のを誘導する刺激と細胞とを組み合わせ、その後、活性化された細胞の形質導入、および臨床応用に十分な数まで培養で拡大増殖を行うことによって達成される。

【0172】

A. キメラ抗原受容体

提供される方法および使用の一部の態様では、T細胞などの操作された細胞は、所望の抗原（例えば、腫瘍抗原）に対する特異性をもたらすリガンド結合ドメイン（例えば、抗体または抗体断片）と細胞内シグナル伝達ドメインとを組み合わせる1つまたは複数のドメインを含むキメラ受容体、例えば、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する。一部の態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次活性化シグナルをもたらす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。一部の態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能を促進するための共刺激シグナル伝達ドメインを含有するかまたは追加的に含有する。分子、例えば抗原に特異的に結合すると、受容体は概して、ITAM形質導入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促進する。一部の態様では、キメラ受容体は、免疫細胞内に遺伝子操作されると、T細胞の活性を調節することができ、いくつかの場合では、T細胞の分化または恒常性を調節することができ、それにより、例えば養子細胞療法の方法での使用のために、インビボでの改善された長寿命、生存、および/または持続性を有する遺伝子操作された細胞がもたらされ得る。

【0173】

CARを含む例示的な抗原受容体、ならびにそのような受容体を操作する方法およびそのような受容体を細胞内に導入するための方法としては、例えば、国際特許出願公開公報第W0200014257号、同第W02013126726号、同第W02012/129514号、同第W02014031687号、同第W02013/166321号、同第W02013/071154、同第W02013/123061号 米国特許出願公開第US2002131960号、同第US2013287748号、

10

20

30

40

50

同US第20130149337号、米国特許第6,451,995号、同第7,446,190号、同第8,252,592号、同第8,339,645号、同第8,398,282号、同第7,446,179号、同第6,410,319号、同第7,070,995号、同第7,265,209号、同第7,354,762号、同第7,446,191号、同第8,324,353号および同第8,479,118号ならびに欧州特許第EP2537416号に記載のもの、および/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に記載のものが挙げられる。一部の局面では、抗原受容体としては、米国特許第7,446,190号に記載のCARおよび国際特許出願公開公報第WO 2014055668 A1号に記載のものが挙げられる。CARの例としては、前述の刊行物のいずれか、例えばWO2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、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; およびBrentjens et al., *Sci Transl Med.* 2013 5 (177) に開示されたCARが挙げられる。また、WO2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、米国特許第7,446,190号、および米国特許第8,389,282号も参照。

【0174】

一部の態様では、T細胞などの操作された細胞は、特定の抗原（またはマーカーもしくはリガンド）、例えば、特定の細胞タイプの表面上に発現している抗原に対して特異性を有する組換え受容体、例えば、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する。一部の態様では、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。一部の態様では、それは糖質または他の分子である。一部の態様では、抗原は、正常なまたは標的とされない細胞または組織と比較して、疾患または状態の細胞、例えば腫瘍細胞または病原体細胞上に選択的に発現または過剰発現する。他の態様では、抗原は、正常細胞上に発現するおよび/または操作された細胞上に発現する。

【0175】

受容体によって標的とされる抗原としては、一部の態様では、B細胞悪性腫瘍に関連する抗原、例えば、いくつかの公知のB細胞マーカーのいずれかが挙げられる。一部の態様では、受容体によって標的とされる抗原は、CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Igカップ、Igラムダ、CD79a、CD79b、またはCD30である。特定の局面では、抗原はCD19である。一部の態様では、そのような抗原のいずれかは、ヒトB細胞上に発現している抗原である。

【0176】

CARなどのキメラ受容体には概して、抗体分子の1つまたは複数の抗原結合部分である細胞外抗原結合ドメインが含まれる。一部の態様では、抗原結合ドメインは、抗体分子の部分、概して、抗体の可変重（ V_H ）鎖領域および/または可変軽（ V_L ）鎖領域、例えば、scFv抗体断片である。一部の態様では、抗原結合ドメインは単ドメイン抗体（sdAb）、例えば、sdFv、ナノボディ、 V_{HH} 、および V_{NAR} である。一部の態様では、抗原結合断片は、フレキシブルリンカーによって連結された抗体可変領域を含む。

【0177】

一部の態様では、抗体または抗原結合断片（例えば、scFvまたは V_H ドメイン）は、CD19などの抗原を特異的に認識する。一部の態様では、抗体または抗原結合断片は、CD19に特異的に結合する抗体または抗原結合断片に由来するか、またはそのバリエーションである。一部の態様では、抗原はCD19である。一部の態様では、scFvは、CD19に特異的な抗体または抗体断片に由来する V_H および V_L を含有する。一部の態様では、CD19に結合する抗体または抗体断片は、FMC63およびSJ25C1などのマウス由来抗体である。一部の態様では、抗体または抗体断片は、例えば、米国特許公開第US 2016/0152723号に記載されるような、ヒト抗体である。

【0178】

一部の態様では、抗原結合ドメインは、FMC63に由来するV_Hおよび/またはV_Lを含み、一部の局面では、scFvであり得る。FMC63は一般に、ヒト起源のCD19を発現するNalm-1および-16細胞に対して作製された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)。一部の態様では、FMC63抗体は、それぞれSEQ ID NO: 38および39に示したCDR-H1およびCDR-H2、およびSEQ ID NO: 40または54に示したCDR-H3、ならびにSEQ ID NO: 35に示したCDR-L1、およびSEQ ID NO: 36または55に示したCDR-L2、およびSEQ ID NO: 37または56に示したCDR-L3配列を含む。一部の態様では、FMC63抗体は、SEQ ID NO: 41のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H)およびSEQ ID NO: 42のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む。

10

【0179】

一部の態様では、scFvは、SEQ ID NO: 35のCDR-L1配列、SEQ ID NO: 36のCDR-L2配列、およびSEQ ID NO: 37のCDR-L3配列を含有する可変軽鎖、ならびに/もしくはSEQ ID NO: 38のCDR-H1配列、SEQ ID NO: 39のCDR-H2配列、およびSEQ ID NO: 40のCDR-H3配列を含有する可変重鎖、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションを含む。一部の態様では、scFvは、SEQ ID NO: 41に示したFMC63の可変重鎖領域およびSEQ ID NO: 42に示したFMC63の可変軽鎖領域、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションを含む。一部の態様では、可変重鎖および可変軽鎖は、リンカーによって接続される。一部の態様では、リンカーはSEQ ID NO: 59に示される。一部の態様では、scFvは、順に、V_H、リンカー、およびV_Lを含む。一部の態様では、scFvは、順に、V_L、リンカー、およびV_Hを含む。一部の態様では、scFvは、SEQ ID NO: 57に示したヌクレオチドの配列、またはSEQ ID NO: 57に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示す配列によってコードされる。一部の態様では、scFvは、SEQ ID NO: 43に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 43に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示す配列を含む。

20

30

【0180】

一部の態様では、抗原結合ドメインは、SJ25C1に由来するV_Hおよび/またはV_Lを含み、一部の局面では、scFvであり得る。SJ25C1は、ヒト起源のCD19を発現するNalm-1および-16細胞に対して作製されたマウスモノクローナルIgG1抗体である(Ling, N. R., et al. (1987). Leucocyte typing III. 302)。一部の態様では、SJ25C1抗体は、それぞれSEQ ID NO: 47~49に示したCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3、ならびにそれぞれSEQ ID NO: 44~46に示したCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3配列を含む。一部の態様では、SJ25C1抗体は、SEQ ID NO: 50のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H)およびSEQ ID NO: 51のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む。一部の態様では、svFvは、SEQ ID NO: 44のCDR-L1配列、SEQ ID NO: 45のCDR-L2配列、およびSEQ ID NO: 46のCDR-L3配列を含有する可変軽鎖、ならびに/もしくはSEQ ID NO: 47のCDR-H1配列、SEQ ID NO: 48のCDR-H2配列、およびSEQ ID NO: 49のCDR-H3配列を含有する可変重鎖、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションを含む。一部の態様では、scFvは、SEQ ID NO: 50に示したSJ25C1の可変重鎖領域およびSEQ ID NO: 51に示したSJ25C1の可変軽鎖領域、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもの

40

50

のいずれかのバリエーションを含む。一部の態様では、可変重鎖および可変軽鎖は、リンカーによって接続される。一部の態様では、リンカーは、SEQ ID NO: 52に示される。一部の態様では、scFvは、順に、V_H、リンカー、およびV_Lを含む。一部の態様では、scFvは、順に、V_L、リンカー、およびV_Hを含む。一部の態様では、scFvは、SEQ ID NO: 53に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 53に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を示す配列を含む。

【0181】

用語「抗体」は本明細書において、最も広い意味で用いられ、インタクトな抗体および機能的（抗原結合）抗体断片を含む、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含み、該断片は、断片抗原結合性（Fab）断片、F（ab'）₂断片、Fab'断片、Fv断片、組換えIgG（rIgG）断片、抗原に特異的に結合できる可変重鎖（V_H）領域、単鎖可変断片（scFv）を含む単鎖抗体断片、および単一ドメイン抗体（例えば、sdAb、sdFv、ナノボディ、V_HHまたはV_{NAR}）または断片を含む。この用語は、遺伝子操作されたおよび/または他の方法で改変された形態の免疫グロブリン、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、例えば二重特異性抗体、ダイアボディ、トリアボディ、およびテトラボディ、タンデムdi-scFv、タンデムtri-scFvを包含する。他に明記されない限り、用語「抗体」は、その機能的抗体断片を包含すると理解されるべきである。この用語はまた、IgGおよびそのサブクラス、IgM、IgE、IgA、およびIgDを含む、任意のクラスまたはサブクラスの抗体を含む、インタクトなまたは全長の抗体も包含する。一部の局面では、CARは、例えば、異なる特異性を有する2種の抗原結合ドメインを含有する、二重特異性CARである。

【0182】

一部の態様では、抗原結合タンパク質、抗体、およびその抗原結合断片は、全長抗体の抗原を特異的に認識する。一部の態様では、抗体の重鎖および軽鎖は、全長であり得るか、または抗原結合部分（Fab、F（ab'）₂、Fv、または単鎖Fv断片（scFv））であり得る。他の態様では、抗体重鎖定常領域は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgEから選択される、具体的には、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から選択される、より具体的には、IgG1（例えば、ヒトIgG1）から選択される。別の態様では、抗体軽鎖定常領域は、例えば、カッパまたはラムダ、特にカッパから選択される。

【0183】

用語「相補性決定領域」および「CDR」は、「超可変領域」または「HVR」と同義であり、いくつかの場合には、抗原特異性および/または結合親和性を与える、抗体可変領域内のアミノ酸の非連続的配列を指すことが公知である。一般に、各重鎖可変領域には3つのCDR（CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3）があり、各軽鎖領域には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」は、いくつかの場合には、重鎖および軽鎖の可変領域の非CDR部分を指すことが公知である。一般に、各完全長重鎖可変領域には4つのFR（FR-H1、FR-H2、FR-H3、およびFR-H4）があり、各完全長軽鎖可変領域には4つのFR（FR-L1、FR-L2、FR-L3、およびFR-L4）がある。

【0184】

所与のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列境界は、いくつかの周知の方式のいずれかを用いて容易に特定することができる。これらの方式には、Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabat」番号付与方式); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (「Chothia」番号付与方式); MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745." (「Contact」番号付与方式); Lefranc MP et al., "IMGT unig 50

ue 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」番号付与方式); 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(「Ah o」番号付与方式);およびMartin et al., “Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm,” PNAS, 1989, 86(23):9268-9272(「AbM」番号付与方式)によって説明されているものが含まれる。

【0185】

所与のCDRまたはFRの境界は、特定のために使用される方式に応じて変動し得る。例えば、Kabat方式は、構造アライメントに基づいているのに対し、Chothia方式は、構造情報に基づいている。Kabat方式とChothia方式のどちらの番号付与も、最も一般的な抗体領域配列長に基づいており、挿入には挿入文字、例えば「30a」によって対応し、一部の抗体には欠失が現れる。これら2つの方式は、ある種の挿入および欠失(「インデル」)を異なる位置に配置するため、異なる番号が付与される。Contact方式は、複合体結晶構造の解析に基づいており、Chothia番号付与方式と多くの点で類似している。AbM方式は、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されているものに基づく、Kabat定義とChothia定義の折衷案である。

【0186】

下記の表5は、Kabat、Chothia、AbM、およびContact方式によってそれぞれ特定された、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一覧にしている。CDR-H1について、残基の番号付与は、Kabat番号付与方式およびChothia番号付与方式の両方を用いて記載されている。FRはCDRの間に位置しており、例えば、FR-L1はCDR-L1の前方に位置し、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、以下同様である。示されているKabatの番号付与方式ではH35AおよびH35Bに挿入を配置するため、Chothia CDR-H1ループの末端は、示されているKabatの番号付与方式の慣例を用いて番号付与すると、ループの長さに応じてH32とH34の間で変動することに留意されたい。

【0187】

(表5) 様々な番号付与方式に基づく、CDRの境界

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 番号付与 ¹)	H31--H35B	H26--H32.34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia 番号付与 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

【0188】

したがって、別段の指定が無い限り、所与の抗体またはその領域、例えばその可変領域の「CDR」もしくは「相補性決定領域」、または個々の指定されたCDR(例えば、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)は、前述の方式のいずれかまたは他の公知の方式によって定

められた、ある(または具体的な)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、特定のCDR(例えばCDR-H3)が、所与のV_H領域またはV_L領域のアミノ酸配列中に対応するCDRのアミノ酸配列を含むと記載されている場合、そのようなCDRは、前述の方式のいずれかまたは他の公知の方式によって定めた場合に、対応するCDR(例えばCDR-H3)の配列を可変領域内に有していると理解される。いくつかの態様において、具体的なCDR配列が指定される。提供される抗体の例示的なCDR配列は、様々な番号付与方式を用いて説明されるが、提供される抗体は、他の前述の番号付与方式のいずれかまたは当業者に公知の他の番号付与方式に従って説明されるようなCDRを含むことができると理解される。

【0189】

10

同様に、別段の指定が無い限り、所与の抗体またはその領域、例えばその可変領域のFRまたは個々の指定されたFR(例えば、FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4)は、公知の方式のいずれかによって定められる、ある(または具体的な)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。場合によっては、個々のCDR、FR、または複数のFRもしくはCDRを特定するための方式は指定される。例えば、CDRは、Kabat、Chothia、AbM、もしくはContactの方法、または他の公知の方式によって定められる。他の場合において、CDRまたはFRの特定のアミノ酸配列が与えられる。

【0190】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の抗原への結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。ネイティブな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、各ドメインが4つの保存されたフレームワーク領域(FR)および3つのCDRを含む、類似の構造を有する(例えば、Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照)。単一V_HまたはV_Lドメインが、抗原結合特異性を付与するのに十分である場合がある。さらに、特定の抗原に結合する抗体が、それぞれ相補的V_L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ために、抗原に結合する抗体に由来するV_HまたはV_Lドメインを用いて単離される場合がある。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)を参照。

20

【0191】

提供される抗体の中には、抗体断片がある。「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体の例としては、これらに限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂ダイアボディ；直線状抗体；可変重鎖(V_H)領域、単鎖抗体分子、例えばscFv、およびシングルドメインV_H単一抗体；ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。特定の態様では、抗体は、可変重鎖領域および/または可変軽鎖領域を含む単鎖抗体断片、例えばscFvである。

30

【0192】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体を抗原に結合させるのに関与している抗体重鎖または抗体軽鎖のドメインを意味する。一般に、天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン(それぞれV_HおよびV_L)は、類似した構造を有しており、各ドメインは、4つの保存されているフレームワーク領域(FR)および3つのCDRを含む。(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ドメインが、抗原結合特異性を与えるのに十分である場合がある。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、その抗原に結合する抗体に由来するV_HドメインまたはV_Lドメインを用いて、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それぞれスクリーニングして、単離することもできる。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)を参照されたい。

40

【0193】

シングルドメイン抗体(sdAb)は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部また

50

は軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む抗体断片である。ある特定の態様において、シングルドメイン抗体はヒトシングルドメイン抗体である。いくつかの態様において、CARは、抗原、例えば、がんマーカー、または標的化しようとする細胞もしくは疾患、例えば、腫瘍細胞もしくはがん細胞の細胞表面抗原、例えば、本明細書に記載の、または公知の任意の標的抗原に特異的に結合する抗体重鎖ドメインを含む。例示的なシングルドメイン抗体は、sdFv、ナノボディ、V_{HH}、またはV_{NAR}を含む。

【0194】

抗体断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解消化ならびに組換え宿主細胞による生成を含むが、これに限定されない様々な技法によって作ることができる。いくつかの態様において、抗体は、組換えにより生成された断片、例えば、天然では生じない配置を含む断片、例えば、2つもしくはそれ以上の抗体領域もしくは鎖が合成リンカー、例えば、ペプチドリンカーでつながっている断片、および/または天然のインタクトな抗体の酵素消化では生成されないことがある断片である。いくつかの態様において、抗体断片はscFvである。

【0195】

「ヒト化」抗体とは、すべての、または実質的にすべてのCDRアミノ酸残基が非ヒトCDRに由来し、すべての、または実質的にすべてのFRアミノ酸残基がヒトFRに由来する抗体である。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。「ヒト化型」の非ヒト抗体とは、典型的には、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持しながらヒトに対する免疫原性を小さくするためにヒト化されている、非ヒト抗体のバリエーションを指す。いくつかの態様において、ヒト化抗体にある、いくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を回復または改善するために、非ヒト抗体（例えば、CDR残基が得られた抗体）に由来する対応する残基で置換される。

【0196】

一部の局面では、組換え受容体、例えば、キメラ抗原受容体は、1つまたは複数のリガンド（例えば、抗原）結合ドメイン、例えば、抗体またはその断片を含有する細胞外部分、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（細胞質シグナル伝達ドメインまたは領域とも互換的に呼ばれる）を含む。一部の局面では、組換え受容体、例えば、CARは、スペーサーおよび/または膜貫通ドメインまたは部分をさらに含む。一部の局面では、スペーサーおよび/または膜貫通ドメインは、リガンド（例えば、抗原）結合ドメインを含有する細胞外部分と細胞内シグナル伝達領域またはドメインとを連結できる。

【0197】

一部の態様では、CARなどの組換え受容体は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部、またはそのバリエーションもしくは改変されたバージョン、例えばヒンジ領域、例えばIgG4ヒンジ領域、ならびに/またはC_H1/C_Lおよび/もしくはFc領域であり得るかまたはそれらを含み得る、スペーサーをさらに含む。一部の態様では、組換え受容体は、スペーサーおよび/またはヒンジ領域をさらに含む。一部の態様では、定常領域または部分は、ヒトIgG、例えば、IgG4またはIgG1の定常領域または部分である。一部の局面では、定常領域の部分は、抗原認識成分、例えば、scFvと膜貫通ドメインとの間にあるスペーサー領域として機能する。スペーサーは、スペーサーが存在しない場合と比較して、抗原結合後の細胞の応答性の増加をもたらす長さのものであり得る。一部の例では、スペーサーは、12アミノ酸長または約12アミノ酸長であるか、あるいは12アミノ酸長以下である。例示的なスペーサーとしては、少なくとも約10~229アミノ酸、約10~200アミノ酸、約10~175アミノ酸、約10~150アミノ酸、約10~125アミノ酸、約10~100アミノ酸、約10~75アミノ酸、約10~50アミノ酸、約10~40アミノ酸、約10~30アミノ酸、約10~20アミノ酸、または約10~15アミノ酸を有するもの、および記載した範囲のいずれかの端点間にある任意の整数を含むものが挙げられる。一部の態様では、スペーサー領域は、約12アミノ酸以下、約119アミノ酸以下、または約229アミノ酸以下を有する。例示的なスペーサーとしては、IgG4ヒンジ単独、CH2およびCH3ドメインに連

結されたIgG4ヒンジ、またはCH3ドメインに連結されたIgG4ヒンジが挙げられる。例示的なスペーサーには、これらに限定されないが、Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153、Hudecek et al. (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135、または国際特許出願公開番号 WO2014031687が含まれる。

【0198】

一部の態様では、スペーサーは、IgGのヒンジ領域のみ、例えば、IgG4またはIgG1のヒンジのみ、例えば、SEQ ID NO: 1に示されかつSEQ ID NO: 2に示した配列によってコードされるヒンジのみのスペーサーを含有する。一部の態様では、スペーサーは、CH2および/またはCH3ドメインに連結されたIgヒンジ、例えば、IgG4ヒンジである。一部の態様では、スペーサーは、SEQ ID NO: 3に示されるような、CH2およびCH3ドメインに連結されたIgヒンジ、例えば、IgG4ヒンジである。一部の態様では、スペーサーは、SEQ ID NO: 4に示されるような、CH3ドメインのみに連結されたIgヒンジ、例えば、IgG4ヒンジである。一部の態様では、スペーサーは、グリシン-セリンリッチ配列または他のフレキシブルリンカー、例えば、公知のフレキシブルリンカーであるか、またはそれを含む。一部の態様では、定常領域または部分はIgDの定常領域または部分である。一部の態様では、スペーサーは、SEQ ID NO: 5に示した配列を有する。一部の態様では、スペーサーは、SEQ ID NO: 1、3、4および5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%もしくはそれを上回る、または少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を有する。

【0199】

一部の局面では、スペーサーは、(a) 免疫グロブリンヒンジもしくはその改変されたバージョンの全てもしくは一部を含むかもしくはそれからなるか、または約15アミノ酸以下を含み、かつCD28細胞外領域およびCD8細胞外領域を含まない、(b) 免疫グロブリンヒンジ、任意でIgG4ヒンジ、もしくはその改変されたバージョンの全てもしくは一部を含むかもしくはそれからなり、かつ/または約15アミノ酸以下を含み、かつCD28細胞外領域およびCD8細胞外領域を含まない、あるいは(c) 12アミノ酸長もしくは約12アミノ酸長であり、かつ/または、免疫グロブリンヒンジ、任意でIgG4、もしくはその改変されたバージョンの全てもしくは一部を含むかもしくはそれからなる；あるいは(d) SEQ ID NO: 1、3~5、27~34もしくは58に示したアミノ酸の配列、またはそれらに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションからなるかまたはそれを含む、あるいは(e) X₁がグリシン、システイン、またはアルギニンであり、かつX₂がシステインまたはスレオニンである、式X₁PPX₂Pを含むかまたはそれからなる、ポリペプチドスペーサーである。

【0200】

一部の態様では、抗原受容体は、細胞外ドメインに直接的にまたは間接的に連結された細胞内ドメインを含む。一部の態様では、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。一部の態様では、細胞内シグナル伝達ドメインはITAMを含む。例えば、一部の局面では、抗原認識ドメイン（例えば、細胞外ドメイン）は一般に、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達成分、例えば、抗原受容体複合体、例えばCARの場合にはTCR複合体による活性化、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に連結される。一部の態様では、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で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、一部の態様では、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。

【0201】

一態様では、受容体、例えば、CARにおいてドメインの1つと天然で結合している膜貫

通ドメインが用いられる。一部の例では、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小にするために、このようなドメインと、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとの結合を避けるように選択されるか、またはそのようにアミノ酸置換によって改変される。

【0202】

膜貫通ドメインは、一部の態様では、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来する。供給源が天然である場合、ドメインは、一部の局面では、任意の膜結合型タンパク質または膜貫通タンパク質に由来する。膜貫通領域は、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖、もしくはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 (4-1BB)、またはCD154に由来するものを含む（すなわち、少なくとも、それらの膜貫通領域を含む）。あるいは、膜貫通ドメインは、一部の態様では、合成である。一部の局面では、合成膜貫通ドメインは主に、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含む。一部の局面では、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が、合成膜貫通ドメインの各末端に認められる。一部の態様では、連結は、リンカー、スパーサー、および/または膜貫通ドメインによるものである。一部の局面では、膜貫通ドメインは、CD28の膜貫通部分またはそのバリエーションを含む。細胞外ドメインおよび膜貫通は、直接的にまたは間接的に連結することができる。一部の態様では、細胞外ドメインおよび膜貫通は、スパーサー、例えば、本明細書において記載されるいずれかによって連結される。

10

20

【0203】

一部の態様では、受容体、例えば、CARの膜貫通ドメインは、ヒトCD28の膜貫通ドメインまたはそのバリエーション、例えば、ヒトCD28（アクセッション番号:P10747.1）の27アミノ酸の膜貫通ドメインであるか、またはSEQ ID NO: 8に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回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%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む膜貫通ドメインである。一部の態様では、組換え受容体の膜貫通ドメイン含有部分は、SEQ ID NO: 9に示したアミノ酸の配列、またはそ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%もしくはそれを上回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%もしくはそれを上回る配列同一性を有するアミノ酸の配列を含む。

30

【0204】

一部の態様では、組換え受容体、例えば、CAR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該成分、例えば、細胞内シグナル伝達領域またはドメインを含む。T細胞活性化は、一部の局面では、2つのクラスの細胞質シグナル伝達配列：TCRを通じて抗原依存性一次活性化を開始する細胞質シグナル伝達配列（一次細胞質シグナル伝達配列）、および抗原非依存的に作用し二次シグナルまたは共刺激シグナルをもたらす細胞質シグナル伝達配列（二次細胞質シグナル伝達配列）によって媒介されると説明される。一部の局面では、CARは、このようなシグナル伝達成分の一方または両方を含む。細胞内シグナル伝達領域の中には、天然抗原受容体によるシグナル、共刺激受容体との組み合わせでのそのような受容体によるシグナル、および/または共刺激受容体単独によるシグナルを模倣するか、またはそれに似せるものがある。一部の態様では、短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、例えば、2〜10アミノ酸長のリンカー、例えば、グリシンおよびセリン、例えば、グリシン-セリンダブルット（doublet）を含有するリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間に存在し、その間に連結を形成する。

40

【0205】

50

一部の態様では、CARがライゲーシオンすると、CARの細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達領域は、免疫細胞、例えば、CARを発現するように操作されたT細胞の正常なエフェクター機能および応答の少なくとも1つを活性化する。例えば、一部の状況では、CARは、T細胞の機能、例えば、細胞溶解活性またはTヘルパー活性、例えば、サイトカインまたは他の因子の分泌を誘導する。一部の態様では、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領域の切断された部分は、例えば、それがエフェクター機能シグナルを伝達する場合に、インタクトな免疫賦活性鎖の代わりに用いられる。一部の態様では、細胞内シグナル伝達領域、例えば、1つまたは複数の細胞内ドメインを含む細胞内シグナル伝達領域は、T細胞受容体（TCR）の細胞質配列を含み、一部の局面では、天然の状況では、そのような受容体と協調して、抗原受容体結合後にシグナル伝達を開始するように機能する補助受容体の細胞質配列、および/またはそのような分子の任意の誘導体もしくはバリエーション、および/または同じ機能を有する任意の合成配列も含む。一部の態様では、細胞内シグナル伝達領域、例えば、1つまたは複数の細胞内ドメインを含む細胞内シグナル伝達領域は、提供する共刺激シグナルに関与する領域またはドメインの細胞質配列を含む。

10

【0206】

一部の局面では、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。刺激するように機能する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体活性化チロシンモチーフまたはITAMとして公知であるシグナル伝達モチーフを含有してもよい。一次細胞質シグナル伝達配列を含有するITAMの例としては、CD3ゼータ鎖、FcR γ 、CD3ガンマ、CD3デルタ、およびCD3イプシロンに由来するものが挙げられる。一部の態様では、CARにある細胞質シグナル伝達分子は、CD3ゼータに由来する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。

20

【0207】

一部の態様では、受容体は、TCR複合体の細胞内成分、例えば、T細胞活性化および細胞傷害性を媒介するTCR CD3鎖、例えば、CD3ゼータ鎖を含む。したがって、一部の局面では、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。一部の態様では、細胞シグナル伝達モジュールには、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/または他のCD膜貫通ドメインが含まれる。一部の態様では、受容体、例えば、CARは、1つまたは複数の追加分子、例えば、Fc受容体 γ 、CD8アルファ、CD8ベータ、CD4、CD25、またはCD16の部分を含み。例えば、一部の局面では、CARまたは他のキメラ受容体には、CD3-ゼータ（CD3- ζ ）またはFc受容体 γ とCD8アルファ、CD8ベータ、CD4、CD25、またはCD16との間のキメラ分子が含まれる。

30

【0208】

一部の態様では、細胞内（または細胞質）シグナル伝達領域は、ヒトCD3鎖、任意で、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、例えば、ヒトCD3ゼータのアイソフォーム3の112 AA細胞質ドメイン（アクセッション番号：P20963.2）、または米国特許第7,446,190号もしくは米国特許第8,911,993号に記載のCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む。一部の態様では、細胞内シグナル伝達領域は、SEQ ID NO: 13、14もしくは15に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 13、14もしくは15に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回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%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

40

【0209】

天然TCRの状況では、完全活性化には、一般に、TCRによるシグナル伝達だけでなく共刺激シグナルも必要とされる。したがって、一部の態様では、完全活性化を促進するためには、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生じさせるための成分もまた、CARに含

50

まれる。他の態様では、CARは、共刺激シグナルを生じさせるための成分を含まない。一部の局面では、追加的なCARが同じ細胞に発現され、二次シグナルまたは共刺激シグナルを生じさせるための成分を提供する。

【0210】

一部の態様では、キメラ抗原受容体は、T細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含有する。一部の態様では、CARは、共刺激受容体、例えば、CD28、4-1BB、OX40（CD134）、CD27、DAP10、DAP12、ICOS、および/または他の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。一部の態様では、CARは、CD28または4-1BB、例えば、ヒトCD28またはヒト4-1BBの共刺激領域またはドメインを含む。

【0211】

一部の態様では、細胞内シグナル伝達領域またはドメインは、ヒトCD28の細胞内共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もしくは部分、例えば、その41アミノ酸ドメインおよび/または天然CD28タンパク質の186位～187位にLLからGGへの置換を有するそのようなドメインを含む。一部の態様では、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 10もしくは11に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 10もしくは11に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回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%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含むことができる。一部の態様では、細胞内領域は、4-1BBの細胞内共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もしくは部分、例えば、ヒト4-1BB（アクセッション番号Q07011.1）の42アミノ酸の細胞質ドメイン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: 12に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 12に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回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%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

【0212】

一部の局面では、同じCARが、一次（または活性化）細胞質シグナル伝達領域と共刺激シグナル伝達成分との両方を含む。

【0213】

一部の態様では、活性化ドメインが、ある1つのCAR内に含まれるのに対して、共刺激成分が、別の抗原を認識する別のCARによって提供される。一部の態様では、CARは、活性化または刺激CAR、共刺激CARを含み、両方が同じ細胞上に発現される（WO2014/055668を参照）。一部の局面では、細胞は、1つまたは複数の刺激もしくは活性化CARおよび/または共刺激CARを含む。一部の態様では、細胞は、阻害性CAR（iCAR、Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013)を参照）、例えば、疾患または状態に関連するおよび/または疾患または状態に特異的な抗原以外の抗原を認識するCARをさらに含み、それによって、疾患標的指向性CARを通じて送達される活性化シグナルが、阻害性CARとそのリガンドとの結合によって減弱または阻害され、オフターゲット作用を低減させる。

【0214】

一部の態様では、2種の受容体は、それぞれ、活性化シグナルおよび阻害性シグナルを細胞に誘導し、受容体の一方のその抗原への結合は、細胞を活性化するかまたは応答を誘導するが、第2の阻害性受容体のその抗原への結合は、その応答を抑制するかまたは弱めるシグナルを誘導する。例は、活性化CARと阻害性CAR（iCAR）の組み合わせである。そのような戦略は、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正常な細胞上にも発現される抗原に結合し、かつ阻害性受容体が、正常な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状況において、オフターゲット作用の尤度を低減させるために、用いられ得る。

10

20

30

40

50

【0215】

一部の局面では、キメラ受容体は、阻害性 CAR（例えば、iCAR）であるかまたはそれを含み、かつ免疫応答、例えば、細胞におけるITAM促進性および/または共刺激促進性の応答を減弱または抑制する細胞内成分を含む。そのような細胞内シグナル伝達成分の例は、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上に認められるものである。一部の局面では、操作された細胞は、そのような阻害性分子のシグナル伝達ドメインまたはそれに由来するシグナル伝達ドメインを含む阻害性CARを含み、その結果、細胞の応答、例えば、活性化CARおよび/または共刺激CARによって誘導された細胞の応答を減弱するように機能する。

10

【0216】

一部の場合では、CARは、第一世代CAR、第二世代CAR、および/または第三世代CARと呼ばれる。一部の局面では、第一世代CARは、抗原が結合した時に、CD3鎖によって誘導されるシグナルのみをもたらすCARであり；一部の局面では、第二世代CARは、そのようなシグナルと共刺激シグナルをもたらすCAR、例えば、CD28またはCD137などの共刺激受容体に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含むCARであり；一部の局面では、第三世代CARは、一部の局面では、異なる共刺激受容体の複数の共刺激ドメインを含むCARである。

【0217】

一部の態様では、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。

20

【0218】

一部の態様では、抗原受容体はマーカーをさらに含み、かつ/またはCARまた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ような細胞の形質導入または操作を確認するために用いられ得るサロゲートマーカー、例えば、細胞表面マーカーをさらに含む。一部の局面では、マーカーは、CD34、NGFR、または上皮増殖因子受容体の全てまたは一部（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バージョン（例えば、tEGFR）を含む。一部の態様では、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、公開特許出願第W02014031687号に開示されるいずれかであり得る。例えば、マーカーは、任意でリンカー配列、例えばT2A切断可能リンカー配列に連結される、切断型EGFR（tEGFR）であり得る。

30

【0219】

切断型EGFR（例えば、tEGFR）の例示的なポリペプチドは、SEQ ID NO: 7もしくは16に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 7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%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。例示的なT2Aリンカー配列は、SEQ ID NO: 6もしくは17に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 6もしくは17に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

40

【0220】

一部の態様では、マーカーは、T細胞上に天然で認められないか、もしくはT細胞の表面に天然で認められない分子、例えば、細胞表面タンパク質、またはその部分である。一部の態様では、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宿主の免疫系によって「自己」として認識されないものである。

【0221】

一部の態様では、マーカーは、治療機能を果たさない、および/または遺伝子操作する

50

ための、例えば、成功裏に操作された細胞を選択するためのマーカーとして用いられる以外の作用を生じない。他の態様では、マーカーは、治療用分子または何らかの望ましい作用を他の方法で発揮する分子、例えば、細胞がインビボで遭遇するリガンド、例えば、養子移入時に細胞の応答を増強するおよび/または弱めるならびにリガンドに遭遇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。

【0222】

一部の態様では、キメラ抗原受容体は、本明細書において記載される抗体または断片を含有する細胞外部分を含む。一部の局面では、キメラ抗原受容体は、本明細書において記載される抗体または断片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。一部の態様では、抗体または断片は、scFvまたはシングルドメインV_H抗体を含み、細胞内ドメインはITAMを含有する。一部の局面では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ（CD3ζ）鎖のゼータ鎖のシグナル伝達ドメインを含む。一部の態様では、CD3-ゼータ鎖はヒトCD3-ゼータ鎖である。一部の態様では、細胞内シグナル伝達領域は、CD3ゼータ細胞内ドメインと連結した、CD28およびCD137（4-1BB、TNFRSF9）共刺激ドメインをさらに含む。一部の態様では、CD28はヒトCD28である。一部の態様では、4-1BBはヒト4-1BBである。一部の態様では、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領域との間に配置された膜貫通ドメインを含む。一部の局面では、膜貫通ドメインは、CD28の膜貫通部分を含有する。細胞外ドメインおよび膜貫通は、直接的にまたは間接的に連結することができる。一部の態様では、細胞外ドメインおよび膜貫通は、スペーサー、例えば、本明細書において記載されるいずれかによって連結される。

【0223】

一部の態様では、CARは、抗体、例えば、抗体断片と、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それを含有する膜貫通ドメインと、CD28のシグナル伝達部分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バリエーションを含有する細胞内シグナル伝達ドメインとを含有する。例えば、一部の態様では、CARは、例えばCD19に特異的な、抗体、例えば、scFvを含む抗体断片、例えば、上記に記載されるいずれかと、スペーサー、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/または重鎖分子の1つもしくは複数の定常領域を含有するスペーサー、例えば、Ig-ヒンジ含有スペーサーと、CD28由来膜貫通ドメインの全部または部分を含む膜貫通ドメインと、CD28由来細胞内シグナル伝達ドメインと、CD3ゼータシグナル伝達ドメインとを含む。

【0224】

一部の態様では、CARは、抗体、例えば、抗体断片と、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それを含有する膜貫通ドメインと、4-1BBのシグナル伝達部分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バリエーションを含有する細胞内シグナル伝達ドメインとを含有する。そのような態様の一部では、受容体は、ヒトIg分子などのIg分子の一部、例えば、Igヒンジ、例えば、IgG4ヒンジを含有するスペーサー、例えば、ヒンジのみのスペーサーをさらに含む。一部の態様では、CARは、例えば、CD19に特異的な、抗体または断片、例えばscFv、例えば、上記に記載されるいずれかと、スペーサー、例えば、Ig-ヒンジ含有スペーサーのいずれかと、CD28由来膜貫通ドメインと、4-1BB由来細胞内シグナル伝達ドメインと、CD3ゼータ由来シグナル伝達ドメインとを含む。

【0225】

提供される方法のいずれかの特定の態様では、CARは、N末端からC末端までの順に、SEQ ID NO: 43に示したscFvである細胞外抗原結合ドメイン、SEQ ID NO: 1に示したスペーサー、SEQ ID NO: 8に示した膜貫通ドメイン、SEQ ID NO: 12に示した4-1BB共刺激シグナル伝達ドメイン、およびSEQ ID NO: 13に示したCD3-ゼータ（CD3ζ）鎖のシグナル伝達ドメインを含有する。

【0226】

10

20

30

40

50

B. 遺伝子操作のための核酸、ベクターおよび方法

一部の態様では、細胞、例えば、T細胞は、組換え受容体を発現するように遺伝子操作される。一部の態様では、操作は、組換え受容体をコードするポリヌクレオチドを導入することによって行われる。組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/もしくはポリヌクレオチド含有するベクターまたは構築物もまた提供される。

【0227】

一部の場合では、組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有する。一部の局面では、シグナル配列は、天然のポリペプチドに由来するシグナルペプチドをコードしてもよい。他の局面では、シグナル配列は、異種のまたは非天然のシグナルペプチド、例えば、SEQ ID NO: 25に示されかつSEQ ID NO: 24に示したヌクレオチド配列によってコードされるGMCSFR α 鎖の例示的なシグナルペプチドをコードしてもよい。一部の場合では、組換え受容体、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有する。シグナルペプチドの非限定的な例示的な例としては、例えば、SEQ ID NO: 25に示されかつSEQ ID NO: 24に示したヌクレオチド配列によってコードされるGMCSFR α 鎖シグナルペプチド、またはSEQ ID NO: 26に示したCD8アルファシグナルペプチドが挙げられる。

【0228】

一部の態様では、組換え受容体をコードするポリヌクレオチドは、組換え受容体の発現を制御するように機能的に連結される少なくとも1つのプロモーターを含有する。一部の例では、ポリヌクレオチドは、組換え受容体の発現を制御するように機能的に連結される2つ、3つ、またはそれを上回るプロモーターを含有する。

【0229】

核酸分子が2つ以上の異なるポリペプチド鎖、例えば、組換え受容体およびマーカーをコードするある特定の場、ポリペプチド鎖の各々は、別個の核酸分子によってコードされ得る。例えば、2つの別個の核酸が提供され、各々は、細胞での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。一部の態様では、組換え受容体をコードする核酸およびマーカーをコードする核酸は、同じプロモーターに機能的に連結され、かつ、任意で、配列内リボソーム進入部位 (IRES)、または任意でT2A、P2A、E2A、もしくはF2Aである自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングをもたらすペプチドをコードする核酸によって分けられる。一部の態様では、マーカーをコードする核酸および組換え受容体をコードする核酸は、2つの異なるプロモーターに機能的に連結される。一部の態様では、マーカーをコードする核酸および組換え受容体をコードする核酸は、細胞のゲノム内の異なる位置に存在するかまたは挿入される。一部の態様では、組換え受容体をコードするポリヌクレオチドは、例えば、レトロウイルスによる形質導入、トランスフェクションまたは形質転換によって、培養細胞を含有する組成物内に導入される。

【0230】

一部の態様では、ポリヌクレオチドが第1および第2の核酸配列を含有するものなど、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、プロモーターに機能的に連結することができる。プロモーターは、同じまたは異なるものであり得る。一部の態様では、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ーを含有することができる。一部の態様では、そのような核酸分子は、マルチシストロニック (multicistronic) (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) であり得る。一部の態様では、転写単位は、IRES (配列内リボソーム進入部位) を含有するバイシストロニックな単位として操作することができ、単一プロモーターからのメッセージによって遺伝子産物 (例えば、マーカーをコードする遺伝子産物および組換え受容体をコードする遺伝子産物) の同時発現を可能にする。あるいは、一部の場合では、単一プロモーターは、1つのオープンリーディングフレーム (ORF) 中に、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、フリン)

10

20

30

40

50

をコードする配列によって相互に分けられる2つまたは3つの遺伝子（例えば、マーカーをコードする遺伝子および組換え受容体をコードする遺伝子）を含有する、RNAの発現を方向付け得る。したがって、ORFは、翻訳時（2Aの場合）または翻訳後のいずれかに、個々のタンパク質へとプロセシングされる、1つのポリペプチドをコードする。一部の 경우에는、T2Aなどのペプチドは、2AエレメントのC末端におけるペプチド結合の合成をリボソームに読み飛ばさせて（リボソームスキッピング）、2A配列の末端と次の下流ペプチドの間で分離させることができる（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）。さまざまな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システムにおいて使用できる2A配列の例には、限定されないが、米国特許出願公開第20070116690号に記載されている口蹄疫ウイルス由来の2A配列(F2A、例えば、SEQ ID NO: 21)、ウマ鼻炎Aウイルス由来の2A配列(E2A、例えば、SEQ ID NO: 20)、トシア・アシナ(Thosea asigna)ウイルス由来の2A配列(T2A、例えば、SEQ ID NO: 6または17)、およびブタテッシュウウイルス-1(teschovirus-1)由来の2A配列(P2A、例えば、SEQ ID NO: 18または19)である。

10

20

30

40

50

【0231】

本明細書において記載される組換え受容体のいずれかは、任意の組み合わせまたは配置で、組換え受容体をコードする1つまたは複数の核酸配列を含有するポリヌクレオチドによってコードされ得る。例えば、1つ、2つ、または3つ以上のポリヌクレオチドが、1つ、2つ、または3つ以上の異なるポリペプチド、例えば、組換え受容体をコードし得る。一部の態様では、1つのベクターまたは構築物は、マーカーをコードする核酸配列を含有し、別のベクターまたは構築物は、組換え受容体、例えば、CARをコードする核酸配列を含有する。一部の態様では、マーカーをコードする核酸および組換え受容体をコードする核酸は、2つの異なるプロモーターに機能的に連結される。一部の態様では、組換え受容体をコードする核酸は、マーカーをコードする核酸の下流に存在する。

【0232】

一部の態様では、ベクター骨格は、1つまたは複数のマーカーをコードする核酸配列を含有する。一部の態様では、1つまたは複数のマーカーは、形質導入マーカー、サロゲートマーカー、および/または選択マーカーである。

【0233】

一部の態様では、マーカーは形質導入マーカーまたはサロゲートマーカーである。形質導入マーカーまたはサロゲートマーカーは、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導入されている細胞を検出するために用いることができる。一部の態様では、形質導入マーカーは、細胞の改変を示すまたは確認することができる。一部の態様では、サロゲートマーカーは、組換え受容体、例えばCARと共に細胞表面上に共発現するように作製されるタンパク質である。特定の態様では、そのようなサロゲートマーカーは、活性をほとんどまたは全く有さないように改変されている表面タンパク質である。ある特定の態様では、サロゲートマーカーは、組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。一部の態様では、組換え受容体をコードする核酸配列は、任意で配列内リボソーム進入部位(IRES)によって分けられる、マーカーをコードする核酸配列、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もたらすペプチド、例えば、T2A、P2A、E2A、もしくはF2Aなどの2A配列をコードする核酸に機能的に連結される。外因性マーカー遺伝子が、一部の場において、細胞の検出または選択を可能にし、一部の場では、細胞自殺も促進するように操作された細胞に関連して利用され得る。

【0234】

例示的なサロゲートマーカーとしては、細胞表面ポリペプチドの切断型、例えば、非機能性であり、かつシグナルもしくは細胞表面ポリペプチドの全長型により通常伝達されるシグナルを伝達しないかまたは伝達できない、かつ/または内部移行しないかまたは内部移行できない、切断型が挙げることができる。例示的な切断型細胞表面ポリペプチドとし

ては、成長因子または他の受容体の切断型、例えば、切断型ヒト上皮成長因子受容体2 (tHER2)、切断型上皮増殖因子受容体 (tEGFR、SEQ ID NO:7または16に示される例示的なtEGFR配列)、もしくは前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、またはその改変型が挙げられる。tEGFRは、tEGFR構築物により操作されている細胞およびコードされる外因性タンパク質を特定もしくは選択する、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除去もしくは分離するために用いることができる、抗体セツキシマブ (Erb itux(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み得る。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。一部の局面では、マーカー、例えばサロゲートマーカーには、CD34、NGFR、CD19、もしくは切断型CD19、例えば、切断型非ヒトCD19、または上皮増殖因子受容体 (例えば、tEGFR) の全部または一部 (例えば、切断型) が含まれる。

10

【0235】

一部の態様では、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)、強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、例えばスーパーフォールド (super-fold) 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)、ならびにこれらの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、およびコドン最適化および/または強化バリエーションを含むそれらのバリエーションであるか、またはそれらを含む。一部の態様では、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 (secreted embryonic alkaline phosphatase) (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)、またはそのバリエーションが挙げられる。

20

【0236】

一部の態様では、マーカーは選択マーカーである。一部の態様では、選択マーカーは、外因性の作用物質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。一部の態様では、選択マーカーは抗生物質耐性遺伝子である。一部の態様では、選択マーカーは、哺乳類細胞に対して抗生物質耐性を付与する抗生物質耐性遺伝子である。一部の態様では、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、またはその改変型であるかまたはそれを含む。

30

【0237】

一部の態様では、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宿主の免疫系によって「自己」として認識されないものである。

【0238】

一部の態様では、マーカーは、治療機能を果たさない、および/または遺伝子操作するための、例えば、成功裏に操作された細胞を選択するためのマーカーとして用いられる以外の作用を生じない。他の態様では、マーカーは、治療用分子または何らかの望ましい作用を他の方法で発揮する分子、例えば、細胞がインビボで遭遇するリガンド、例えば、養子移入時に細胞の応答を増強するおよび/または弱めるならびにリガンドに遭遇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。

40

【0239】

一部の態様では、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公開第WO2014031687号に開示されるいずれかであり得る。例えば、マーカーは、任意でリンカー配列、例えばT2A切断可能リ

50

ンカー配列に連結される、切断型EGFR (tEGFR) であり得る。切断型EGFR (例えば、tEGFR) の例示的なポリペプチドは、SEQ ID NO: 7もしくは16に示したアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 7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%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

【0240】

一部の態様では、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)、強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP)、例えばスーパーフォールド (super-fold) 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、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、およびコドン最適化および/または強化バリエーションを含むそれらのバリエーションであるか、またはそれらを含む。一部の態様では、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 (secreted embryonic alkaline phosphatase) (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)、またはそのバリエーションが挙げられる。

【0241】

一部の態様では、マーカーは選択マーカーである。一部の態様では、選択マーカーは、外因性の作用物質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らを含む。一部の態様では、選択マーカーは、抗生物質耐性遺伝子である。一部の態様では、選択マーカーは、哺乳類細胞に対して抗生物質耐性を付与する抗生物質耐性遺伝子である。一部の態様では、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、またはその改変型であるかまたはそれらを含む。

【0242】

一部の態様では、組換え核酸は、例えば、サルウイルス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などの組換え感染性ウイルス粒子を用いて、細胞に移入される。一部の態様では、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用いて、T細胞内に移入される (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)。

【0243】

一部の態様では、ウイルスベクターはアデノ随伴ウイルス (AAV) である。

【0244】

一部の態様では、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)、または脾フォーカス形成ウイルス (SFFV) に由来するレトロウイルスベクターは、長い末端反復配列 (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。一部の態様では、レトロウイルスには、任意の鳥類または哺乳類の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、典型的にはアンホトロピックであり、それらはヒトを含むいくつかの種の宿主細胞に感染できることを意味する。一態様では、発現させようとする遺伝子は、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。いくつか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、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. Devel. 3:102-109を参照）。

【0245】

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に記載される。

10

【0246】

一部の態様では、組換え核酸は、エレクトロポレーションを介してT細胞に移入される（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）。一部の態様では、組換え核酸は、転位を介してT細胞に移入される（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）。免疫細胞に遺伝物質を導入して発現させる他の方法としては、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）、プロトプラスト融合、カチオン性リポソームを介したトランスフェクション；タングステン粒子促進微粒子銃（Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)）；およびリン酸ストロンチウムDNA共沈（Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)）が挙げられる。

20

【0247】

組換え産物をコードする核酸の移入のための他のアプローチおよびベクターは、例えば、国際特許出願公開第WO2014055668号、および米国特許第7,446,190号に記載されているものである。

【0248】

一部の態様では、細胞、例えばT細胞は、拡大増殖時または拡大増殖後のいずれかに、例えば、T細胞受容体（TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）で、トランスフェクトされてよい。所望の受容体の遺伝子の導入のためのこのトランスフェクションは、例えば、任意の適切なレトロウイルスベクターによって行うことができる。遺伝子改変された細胞集団は、次いで、最初の刺激（例えば、抗CD3/抗CD28刺激）から解放され、続いて、第二のタイプの刺激で、例えば、新規に導入された受容体を介して、刺激され得る。この第二のタイプの刺激には、ペプチド/MHC分子の形態での抗原性刺激、遺伝子導入された受容体の同族（架橋結合する）リガンド（例えば、CARの天然のリガンド）、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）新たな受容体のフレームワーク内に直接的に結合する任意のリガンド（例えば抗体）が含まれ得る。例えば、Cheadle 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 T therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)を参照。

30

40

【0249】

一部のケースでは、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用いられ得る。一部のそのような例では、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その後に、一部のケースでは、培養の少なくとも一部と同時にまたはその最中に、操作されてもよい。

【0250】

追加的な核酸、例えば、導入のための遺伝子の中には、例えば、移入された細胞の生存力および/または機能を促進することによって、療法の有効性を改善するもの；例えば、

50

インビボでの生存または局在化を評価するための、細胞の選択および/または評価用の遺伝子マーカーを提供するための遺伝子; 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) によって記載されるように、例えば、細胞をインビボでネガティブ選択を受けやすくすることによって、安全性を高める遺伝子がある。ドミナントポジティブな選択可能マーカーをネガティブ選択可能マーカーと融合することにより得られる二機能性の選択可能融合遺伝子の使用を記載する Lupton らによる公報 PCT/US91/08442 および PCT/US94/05601 も参照。例えば、Riddell らの米国特許第 6,040,177 号のカラム 14~17 を参照。

【0251】

遺伝子操作のための細胞および細胞の調製

一部の態様では、核酸は異種である、すなわち、細胞または細胞から得られた試料に通常は存在せず、例えば、別の生物または細胞から得られたものであり、例えば、操作されている細胞および/またはそのような細胞が得られた生物に普通は見出されない。一部の態様では、核酸は天然に存在せず、例えば、複数の異なる細胞タイプに由来する様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含む核酸を含む、自然界で見出されない核酸である。

【0252】

細胞は一般に、哺乳類細胞などの真核細胞であり、典型的には、ヒト細胞である。一部の態様では、細胞は、血液、骨髄、リンパ、またはリンパ系器官に由来し、免疫系の細胞、例えば、自然免疫もしくは適応免疫の細胞、例えば、リンパ球、典型的には T 細胞および/または NK 細胞を含む骨髄系細胞またはリンパ系細胞である。他の例示的な細胞としては、幹細胞、例えば、人工多能性幹細胞 (iPSC) を含む複能性幹細胞または多能性幹細胞が挙げられる。細胞は典型的には、初代細胞、例えば、対象から直接単離されたおよび/または対象から単離され凍結された細胞である。一部の態様では、細胞には、T 細胞または他の細胞タイプの 1 つまたは複数のサブセット、例えば、全 T 細胞集団、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、およびその部分母集団、例えば、機能、活性化状態、成熟度、分化能、拡大増殖、再循環、局在化、および/もしくは持続能、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定の器官もしくは区画での存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、ならびに/または分化の程度によって規定されるものが含まれる。処置しようとする対象に関して、細胞は同種異系および/または自己由来であり得る。前記方法の中には既製の方法が含まれる。一部の局面では、例えば、既製の技術の場合、細胞は、多能性および/または複能性であり、例えば、人工多能性幹細胞 (iPSC) などの幹細胞である。一部の態様では、方法は、対象から細胞を単離する段階、それらを調製、処理、培養、および/または操作する段階、ならびに凍結保存前または凍結保存後にそれらを同じ対象に再導入する段階を含む。

【0253】

T 細胞ならびに/または CD4⁺および/もしくは CD8⁺T 細胞のサブタイプおよび部分母集団の中には、ナイーブ T (T_N) 細胞、エフェクター T 細胞 (T_{EFF})、メモリー T 細胞、およびそれらのサブタイプ、例えば、幹細胞メモリー T (T_{SCM})、セントラルメモリー T (T_{CM})、エフェクターメモリー T (T_{EM})、または終末分化したエフェクターメモリー T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、未熟 T 細胞、成熟 T 細胞、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、粘膜関連インバリアント (mucosa-associated invariant) T (MAIT) 細胞、天然および適応性制御性 T (T_{reg}) 細胞、ヘルパー T 細胞、例えば、TH1 細胞、TH2 細胞、TH3 細胞、TH17 細胞、TH9 細胞、TH22 細胞、濾胞ヘルパー T 細胞、α/β T 細胞、ならびに δ/γ T 細胞がある。

【0254】

一部の態様では、細胞はナチュラルキラー (NK) 細胞である。一部の態様では、細胞は、単球または顆粒球、例えば、骨髄系細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、および/または好塩基球である。

【0255】

一部の態様では、細胞は、遺伝子操作を介して導入された1つまたは複数の核酸を含み、それによって、そのような核酸の組換え産物または遺伝子操作された産物を発現する。一部の態様では、核酸は異種である、すなわち、細胞または細胞から得られた試料に通常は存在せず、例えば、別の生物または細胞から得られたものであり、例えば、操作されている細胞および/またはそのような細胞が得られた生物に普通は見出されない。一部の態様では、核酸は天然に存在せず、例えば、複数の異なる細胞タイプに由来する様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含む核酸を含む、自然界で見出されない核酸である。

【0256】

一部の態様では、操作された細胞の調製は、1つまたは複数の培養段階および/または調製段階を含む。トランスジェニック受容体、例えば、CARをコードする核酸の導入のための細胞は、生物学的試料などの試料、例えば、対象から得られた試料または対象に由来する試料から単離されてもよい。一部の態様では、細胞が単離される対象は、疾患もしくは状態を有するか、または細胞療法を必要とするか、または細胞療法が投与される対象である。対象は、一部の態様では、特定の治療介入、例えば、養子細胞療法を必要とし、このために細胞が単離、処理、および/または操作されているヒトである。

【0257】

したがって、細胞は、一部の態様では、初代細胞、例えば、初代ヒト細胞である。試料には、対象から直接採取した組織、液体、および他の試料、ならびに1つまたは複数の処理段階、例えば、分離、遠心分離、遺伝子操作（例えば、ウイルスベクターによる形質導入）、洗浄、および/またはインキュベーションに起因する試料が含まれる。生物学的試料は、生物学的供給源から直接得られた試料でもよく、または処理された試料でもよい。生物学的試料には、これに限定されないが、体液、例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および臓器試料が、これらから得られた処理済み試料を含めて含まれる。

【0258】

一部の局面では、細胞が得られるまたは単離される試料は、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による生成物であるかもしくはこれから得られる。例示的な試料としては、全血、末梢血単核球（PBMC）、白血球、骨髄、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、消化管に関連するリンパ系組織、粘膜に関連するリンパ系組織、脾臓、他のリンパ系組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸部、精巣、卵巣、扁桃腺、もしくは他の器官、および/またはこれらに由来する細胞が挙げられる。試料には、細胞療法、例えば、養子細胞療法の状況では、自己由来供給源および同種異系供給源に由来する試料が含まれる。

【0259】

一部の態様では、細胞は、細胞株、例えば、T細胞株に由来する。細胞は、一部の態様では、異種供給源から、例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類、およびブタから得られる。

【0260】

一部の態様では、細胞の単離には、1つまたは複数の調製段階および/または親和性に基づかない細胞分離段階が含まれる。一部の例では、例えば、望ましくない成分を除去するために、望ましい成分を濃縮するために、特定の試薬に対して感受性のある細胞を溶解または除去するために、細胞は、洗浄される、遠心分離される、および/または1種または複数種の試薬の存在下でインキュベートされる。一部の例では、細胞は、密度、粘着性、サイズ、特定の成分に対する感受性および/または耐性などの1つまたは複数の特性に基づいて分離される。

【0261】

一部の例では、対象の循環血液に由来する細胞は、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、一部の局面では、T細胞、単球、顆粒球、

10

20

30

40

50

B細胞、他の有核白血球を含むリンパ球、赤血球、および/または血小板を含有し、一部の局面では、赤血球および血小板以外の細胞を含有する。

【0262】

一部の態様では、例えば、血漿画分を除去するために、およびその後の処理段階のために細胞を適切な緩衝液または培地中に置くために、対象から収集した血液細胞は洗浄される。一部の態様では、細胞はリン酸緩衝食塩水（PBS）で洗浄される。一部の態様では、洗浄溶液は、カルシウムおよび/もしくはマグネシウムならびに/または多くのもしくは全ての二価カチオンを欠いている。一部の局面では、洗浄段階は、半自動「フロースルー」遠心機（例えば、Cobe 2991 cell processor, Baxter）によって製造業者の説明書にしたがって達成される。一部の局面では、洗浄段階は、タンジェンシャルフロー濾過（TFF）によって製造業者の説明書にしたがって達成される。一部の態様では、細胞は、洗浄後に、様々な生体適合性緩衝液、例えば、 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ を含まないPBSなどで再懸濁される。ある特定の態様では、血液細胞試料の成分は除去され、細胞は培養培地に直接再懸濁される。

10

【0263】

一部の態様では、方法には、密度に基づく細胞分離方法、例えば、赤血球を溶解することによる末梢血からの白血球の調製およびPercoll勾配またはFicoll勾配による遠心分離が含まれる。

【0264】

一部の態様では、単離方法には、細胞における、1種または複数種の特定の分子、例えば、表面マーカー、例えば、表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸の発現または存在に基づく様々な細胞タイプの分離が含まれる。一部の態様では、そのようなマーカーに基づいて分離するための任意の公知の方法が用いられ得る。一部の態様では、分離は親和性または免疫親和性に基づく分離である。例えば、単離は、一部の局面では、例えば、このようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーとインキュベートし、その後一般的に、洗浄段階を行い、抗体または結合パートナーに結合している細胞を、抗体または結合パートナーに結合していない細胞から分離することによって、1種または複数種のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞の発現または発現レベルに基づいて細胞および細胞集団を分離することを含む。

20

【0265】

そのような分離段階は、さらなる使用のために試薬に結合している細胞が保持される正の選択、および/または抗体または結合パートナーに結合していない細胞が保持される負の選択に基づくことができる。一部の例では、両方の画分がさらなる使用のために保持される。一部の局面では、不均質な集団の中にある細胞タイプを特異的に特定する抗体が利用できない場合、望ましい集団以外の細胞によって発現されるマーカーに基づいて分離が最も良く行われるように、負の選択が特に有用な場合がある。

30

【0266】

分離は、特定のマーカーを発現する特定の細胞集団または細胞の100%濃縮または除去をもたらす必要はない。例えば、特定のタイプの細胞、例えば、マーカーを発現する細胞の正の選択または濃縮は、そのような細胞の数またはパーセンテージを増加させることを指すが、このマーカーを発現しない細胞が完全に無くなる必要はない。同様に、特定のタイプの細胞、例えば、マーカーを発現する細胞の負の選択、除去、または枯渇は、そのような細胞の数またはパーセンテージを減少させることを指すが、このような細胞が全て完全に取り除かれる必要はない。

40

【0267】

一部の例では、複数回の分離段階が行われ、この場合、ある段階に由来する正に選択された画分または負に選択された画分は、別の分離段階、例えば、その後の正の選択または負の選択に供される。一部の例では、1回の分離段階で、例えば、それぞれが負の選択のために標的とされるマーカーに特異的な複数の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、複数のマーカーを同時に発現する細胞を枯渇させることがで

50

きる。同様に、様々な細胞タイプ上に発現している複数の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞タイプを同時に正に選択することができる。

【0268】

例えば、一部の局面では、T細胞の特定の部分母集団、例えば、1つまたは複数の表面マーカーが陽性であるか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、正の選択技法または負の選択技法によって単離される。

【0269】

例えば、 $CD3^+$ 、 $CD28^+$ T細胞は、抗CD3/抗CD28結合磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander）を用いて正に選択することができる。

【0270】

一部の態様では、単離は、正の選択による特定の細胞集団の濃縮、または負の選択による特定の細胞集団の枯渇によって行われる。一部の態様では、正のまたは負の選択は、それぞれ、正にまたは負に選択される細胞上に発現している（マーカー⁺）かまたは相対的に高いレベルで発現している（マーカー^{high}）1つまたは複数の表面マーカーに特異的に結合する1つまたは複数の抗体または他の結合物質と共に細胞をインキュベートすることによって達成される。

【0271】

一部の態様では、T細胞は、B細胞、単球、または他の白血球などの非T細胞上に発現しているマーカー、例えば、 $CD14$ の負の選択によってPBMC試料から分離される。一部の局面では、 $CD4^+$ または $CD8^+$ 選択段階が、 $CD4^+$ ヘルパーおよび $CD8^+$ 細胞傷害性T細胞を分離するために用いられる。そのような $CD4^+$ および $CD8^+$ 集団は、1つまたは複数のナイーブ、メモリー、および/またはエフェクターT細胞部分母集団上に発現しているかまたは相対的に高い程度に発現しているマーカーの正のまたは負の選択によって部分母集団にさらに選別することができる。

【0272】

一部の態様では、 $CD8^+$ 細胞は、例えば、それぞれの部分母集団に関連する表面抗原に基づく正のまたは負の選択によって、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、および/またはセントラルメモリー幹細胞についてさらに濃縮させるかまたはそれをさらに枯渇させる。一部の態様では、セントラルメモリーT（ T_{CM} ）細胞についての濃縮は、有効性を増大させるために、例えば、長期生存、拡大増殖、および/または投与後の生着を改善するために行われ、一部の局面では、そのような部分母集団において特に強固である。Terakura et al. (2012) Blood, 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701を参照。一部の態様では、 T_{CM} を濃縮した $CD8^+$ T細胞と $CD4^+$ T細胞とを組み合わせると、有効性がさらに増強する。

【0273】

態様では、メモリーT細胞は、 $CD8^+$ 末梢血リンパ球の $CD62L^+$ サブセットと $CD62L^-$ サブセットの両方に存在する。PBMCは、例えば、抗CD8抗体および抗CD62L抗体を用いて、 $CD62L^-CD8^+$ 画分および/または $CD62L^+CD8^+$ 画分について濃縮させるかまたは枯渇させることができる。

【0274】

一部の態様では、セントラルメモリーT（ T_{CM} ）細胞の濃縮は、 $CD45RO$ 、 $CD62L$ 、 $CCR7$ 、 $CD28$ 、 $CD3$ 、および/または $CD127$ の正のまたは高い表面発現に基づき；一部の局面では、それは、 $CD45RA$ および/またはグランザイムBを発現するかまたは高く発現する細胞に対する負の選択に基づく。一部の局面では、 T_{CM} 細胞について濃縮した $CD8^+$ 集団の単離は、 $CD4$ 、 $CD14$ 、 $CD45RA$ を発現する細胞の枯渇と、 $CD62L$ を発現する細胞に対する正の選択または濃縮によって行われる。一局面では、セントラルメモリーT（ T_{CM} ）細胞の濃縮は、 $CD4$ 発現に基づいて選択された細胞の負の画分から開始して行

10

20

30

40

50

われ、この画分は、CD14およびCD45RAの発現に基づく負の選択と、CD62Lに基づく正の選択に供される。そのような選択は一部の局面では、同時に行われ、他の局面では、どちらかの順序で連続して行われる。一部の局面では、CD8⁺細胞集団または部分母集団の調製において用いられた同じCD4発現に基づく選択段階が、CD4⁺細胞集団または部分母集団を作製するのにも用いられ、CD4に基づく分離から正の画分および負の画分が両方とも保持され、この方法の後の段階において、任意で、1つまたは複数のさらなる正の選択段階または負の選択段階の後に用いられる。

【0275】

特定の例では、PBMCの試料または他の白血球試料はCD4⁺細胞の選択に供され、ここでは、負の画分および正の画分が両方とも保持される。負の画分は、次いで、CD14およびCD45RAまたはCD19の発現に基づく負の選択、およびセントラルメモリーT細胞に特徴的なマーカー、例えば、CD62LまたはCCR7に基づく正の選択に供され、ここでは、正の選択および負の選択はいずれかの順序でも行われる。

【0276】

CD4⁺Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することによってナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、およびエフェクター細胞に選別される。CD4⁺リンパ球は標準的な方法によって得ることができる。一部の態様では、ナイーブCD4⁺Tリンパ球は、CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T細胞である。一部の態様では、セントラルメモリーCD4⁺細胞はCD62L⁺およびCD45RO⁺である。一部の態様では、エフェクターCD4⁺細胞はCD62L⁻およびCD45RO⁻である。

【0277】

一例では、負の選択によってCD4⁺細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。一部の態様では、抗体または結合パートナーが、磁気ビーズまたは常磁性ビーズなどの固体支持体またはマトリックスに結合され、正の選択および/または負の選択での細胞の分離を可能にする。例えば、一部の態様では、細胞および細胞集団は、免疫磁気（または親和性磁気（affinity magnetic））分離技法を用いて分離または単離される（Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher（著作権）Humana Press Inc., Totowa, NJにおいて概説される）。

【0278】

一部の局面では、分離しようとする細胞の試料または組成物は、小さな、磁化可能な、または磁気に反応する物質、例えば、磁気に反応する粒子または微粒子、例えば、常磁性ビーズ（例えば、Dynalbeads（登録商標）またはMACS（登録商標）ビーズ）と共にインキュベートされる。磁気に反応する物質、例えば、粒子は一般に、分離することが望ましい、例えば、負に選択するまたは正に選択することが望ましい、細胞、複数の細胞、または細胞の集団上に存在する分子、例えば、表面マーカーに特異的に結合する結合パートナー、例えば、抗体に直接的または間接的に付着させる。

【0279】

一部の態様では、磁性粒子または磁気ビーズは、抗体または他の結合パートナーなどの特異的結合メンバーに結合されている磁気に反応する物質を含む。磁気分離方法において用いられる多くの周知の磁気に反応する物質がある。適切な磁性粒子には、参照により本明細書に組み入れられる、Molday, 米国特許第4,452,773号、および欧州特許明細書EP452342Bに記載のものが含まれる。コロイドサイズの粒子、例えば、Owen 米国特許第4,795,698号およびLiberti et al., 米国特許第5,200,084号に記載のものが他の例である。

【0280】

インキュベーションは一般に、磁性粒子または磁気ビーズに付着している、抗体もしくは結合パートナー、またはこのような抗体もしくは結合パートナーに特異的に結合する分

10

20

30

40

50

子、例えば、二次抗体もしくは他の試薬が、細胞表面分子が試料中の細胞上に存在している場合に細胞表面分子に特異的に結合する、条件下で行われる。

【0281】

一部の局面では、試料は磁場の中に置かれ、磁気に反応する粒子または磁化可能な粒子が付着しているそのような細胞は、磁石に引き付けられ、非標識細胞から分離される。正の選択では、磁石に引き付けられた細胞が保持され；負の選択では、引き付けられなかった細胞（非標識細胞）が保持される。一部の局面では、正の選択と負の選択との組み合わせが、同じ選択段階の間に行われ、ここでは、正の画分および負の画分が保持され、さらに処理されるかまたはさらなる分離段階に供される。

【0282】

ある特定の態様では、磁気に反応する粒子は、一次抗体または他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素、もしくはストレプトアビジンでコーティングされる。ある特定の態様では、磁性粒子は、1つまたは複数のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを介して細胞に付着される。ある特定の態様では、細胞はビーズではなく、一次抗体または結合パートナーで標識され、次いで、細胞タイプ特異的な二次抗体または他の結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン）でコーティングされた磁性粒子が添加される。ある特定の態様では、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性粒子が、ビオチン化した一次抗体または二次抗体と一緒に用いられる。

【0283】

一部の態様では、磁気に反応する粒子は、その後にインキュベート、培養、および/または操作される細胞に付着させたままであり；一部の局面では、該粒子は、患者に投与するための細胞に付着させたままである。一部の態様では、磁化可能な粒子または磁気に反応する粒子は細胞から取り除かれる。磁化可能な粒子を細胞から取り除くための方法は公知であり、例えば、競合する非標識競合抗体、および切断可能なリンカーにコンジュゲートさせた磁化可能な粒子または抗体の使用を含む。一部の態様では、磁化可能な粒子は生分解性である。

【0284】

一部の態様では、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別（MACS（登録商標））（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）を介する。磁気活性化細胞選別（MACS（登録商標））システムは、磁化粒子が付着している細胞を高純度で選択することができる。ある特定の態様では、MACS（登録商標）は、非標的種および標的種が、外部磁場の印加後に連続して溶出されるモードで動作する。すなわち、磁化粒子に付着した細胞は、付着していない種が溶出される間、適切な位置に保持される。次いで、この第1の溶出段階が完了した後に、磁場に閉じ込められ、溶出しないようにされていた種は、このような種が溶出および回収できるように何らかのやり方で開放される。ある特定の態様では、非標的細胞は標識され、細胞の不均質な集団から枯渇される。

【0285】

ある特定の態様では、単離または分離は、前記方法の単離段階、細胞調製段階、分離段階、処理段階、インキュベーション段階、培養段階、および/または製剤化段階の1つまたは複数を行うシステム、装置、または器具を用いて行われる。一部の局面では、システムは、例えば、誤り、使用者の操作、および/または汚染を最小限にするために、これらの各段階を閉鎖環境または無菌環境において行うように用いられる。一例では、システムは、国際特許出願公開番号 WO2009/072003またはUS20110003380 A1に記載されるシステムである。

【0286】

一部の態様では、システムまたは器具は、統合型もしくは自立型システムにおいて、および/または自動的もしくはプログラム可能なやり方で、単離段階、処理段階、操作段階、および製剤化段階の1つまたは複数、例えば、全てを行う。一部の局面では、システムまたは器具には、使用者が、処理段階、単離段階、操作段階、および製剤化段階の様々な局面をプログラムする、制御する、そのアウトカムを評価する、および/または調整する

10

20

30

40

50

のを可能にする、システムまたは器具と通信するコンピュータおよび/またはコンピュータプログラムが含まれる。

【0287】

一部の局面では、分離段階および/または他の段階は、例えば、閉鎖型の無菌システムにおいて臨床規模レベルで細胞を自動分離するために、CliniMACS（登録商標）システム（Miltenyi Biotec）を用いて行われる。構成要素には、内蔵型マイクロコンピュータ、磁気分離ユニット、蠕動ポンプ、および様々なピンチ弁が含まれ得る。内蔵型コンピュータは、一部の局面では、機器の全構成要素を制御し、反復手順を標準化された順序で行うようにシステムに指示する。磁気分離ユニットは、一部の局面では、可動性の永久磁石および選択カラム用のホルダーを含む。蠕動ポンプは、チューブセット全体にわたる流速を制御し、ピンチ弁と一緒に、システムによる緩衝液の流れの制御と、細胞の連続的な懸濁とを確かなものにする。

10

【0288】

CliniMACS（登録商標）システムは、一部の局面では、滅菌した非発熱性の溶液で供給される、抗体に結合した磁化可能な粒子を用いる。一部の態様では、磁性粒子による細胞の標識後、細胞は、余分な粒子を除去するために洗浄される。次いで、細胞調製バッグがチューブセットに接続され、次にチューブセットは緩衝液含有バッグおよび細胞収集バッグに接続される。チューブセットは、プレカラムおよび分離カラムを含む、予め組み立てられた滅菌チューブからなり、使い捨て専用である。分離プログラムの開始後、システムは、分離カラムの上に細胞試料を自動的にアプライする。標識された細胞はカラム内に保持されるのに対して、標識されなかった細胞は一連の洗浄段階によって除去される。一部の態様では、本明細書に記載される方法で使用するための細胞集団は標識されず、カラム内に保持されない。一部の態様では、本明細書に記載される方法で使用するための細胞集団は標識され、カラム内に保持される。一部の態様では、本明細書に記載される方法で使用するための細胞集団は、磁場の除去後にカラムから溶出され、細胞収集バッグ内に収集される。

20

【0289】

ある特定の態様では、分離段階および/または他の段階は、CliniMACS Prodigy（登録商標）システム（Miltenyi Biotec）を用いて行われる。CliniMACS Prodigy（登録商標）システムは、一部の局面では、遠心分離による細胞の自動洗浄および分画を可能にする細胞処理ユニット（cell processing unit）を備えている。CliniMACS Prodigy（登録商標）システムはまた、供給源の細胞産物の巨視的な層を識別することによって最適な細胞分画エンドポイントを決定する内蔵カメラおよび画像認識ソフトウェアも備えている場合がある。例えば、末梢血は、赤血球、白血球、および血漿の層に自動的に分離される。CliniMACS Prodigy（登録商標）システムはまた、細胞培養プロトコール、例えば、細胞分化および拡大増殖、抗原添加、ならびに長期細胞培養を達成する統合型細胞培養チャンバーも含み得る。インพุットポートは、培地の無菌的除去および補充を可能にすることができ、細胞は、統合型顕微鏡を用いてモニタリングすることができる。例えば、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82, および Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701を参照。

30

【0290】

一部の態様では、本明細書に記載される細胞集団は、複数の細胞表面マーカーについて染色された細胞が流体の流れ（fluidic stream）で運ばれる、フローサイトメトリーを介して収集および濃縮（または枯渇）される。一部の態様では、本明細書に記載される細胞集団は、分取スケール（preparative scale）（蛍光活性化細胞選別、FACS）選別を介して収集および濃縮（または枯渇）される。ある特定の態様では、本明細書に記載される細胞集団は、FACSに基づく検出系との組み合わせで微小電気機械システム（MEMS）チップを用いることによって収集および濃縮（または枯渇）される（例えば、WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; および Godin et al.

40

50

(2008) J Biophoton. 1(5):355-376を参照)。どちらの場合でも、細胞は、複数のマーカーで標識することができ、それによって、明確に定義されたT細胞サブセットを高純度で単離することが可能になる。

【0291】

一部の態様では、抗体または結合パートナーは、1つまたは複数の検出可能なマーカーで標識され、正の選択および/または負の選択での分離を容易にする。例えば、分離は、蛍光標識された抗体への結合に基づいてもよい。一部の例では、1つまたは複数の細胞表面マーカーに特異的な抗体または他の結合パートナーの結合に基づく細胞の分離は、流体流で、流体の流れの中で、例えば、分取スケール（FACS）および/または微小電気機械システム（MEMS）チップを含む、蛍光活性化細胞選別（FACS）によって、例えば、フローサイトメトリー検出系との組み合わせで行われる。そのような方法は、複数のマーカーに基づく正の選択および負の選択を同時に可能にする。

10

【0292】

一部の態様では、調製方法は、単離、インキュベーション、および/または操作の前または後のいずれかに、細胞を凍結、例えば、凍結保存するための段階を含む。一部の態様では、凍結段階およびその後の解凍段階は、細胞集団中の顆粒球、およびある程度までの単球を取り除く。一部の態様では、細胞は、例えば、血漿および血小板を取り除く洗浄段階の後に、凍結溶液に懸濁される。任意の様々な公知の凍結溶液およびパラメータが、一部の局面において用いられ得る。一例は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミン（HSA）を含有するPBS、または他の適切な細胞凍結培地を使用することを伴う。次いで、これは、DMSOおよびHSAの最終濃度がそれぞれ10%および4%になるように、培地で1:1に希釈される。次いで、細胞は概して、1分につき1℃の速度で-80℃まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相の中で保管される。

20

【0293】

一部の態様では、細胞は、遺伝子操作の前にまたは遺伝子操作とともに、インキュベートおよび/または培養される。インキュベーション段階は、培養（culture）、培養（cultivation）、刺激、活性化、および/または増殖を含むことができる。インキュベーションおよび/または操作は、培養容器、例えば、培養または細胞培養のためのユニット、チャンバー、ウェル、カラム、チューブ、チュービングセット、バルブ、バイアル、培養皿、バッグ、または他の容器中で実施されてよい。一部の態様では、組成物または細胞は、刺激条件または刺激物質の存在下でインキュベートされる。そのような条件には、集団における細胞の増殖、拡大増殖、活性化、および/もしくは生存を誘導する、抗原曝露を模倣する、ならびに/または遺伝子操作のために、例えば、組換え抗原受容体の導入のために細胞を予備刺激するように設計されたものが含まれる。

30

【0294】

条件には、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、可溶性組換え受容体、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うちの1つまたは複数が含まれ得る。

40

【0295】

一部の態様では、刺激条件または刺激物質には、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化または刺激することができる1つまたは複数の作用物質、例えばリガンドが含まれる。一部の局面では、作用物質は、T細胞においてTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードを作動させるかまたは開始する。このような作用物質には、抗体、例えばTCRに特異的なもの、例えば抗CD3が含まれ得る。一部の態様では、刺激条件には、共刺激受容体を刺激することができる1つまたは複数の作用物質、例えばリガンド、例えば抗CD28が含まれる。一部の態様では、このような作用物質および/またはリガンドは、ビーズなどの固体支持体および/または1つもしくは複数のサイトカインに結合していてもよい。任意で、拡大増殖方法は、抗CD3抗体および/または抗CD28抗体を培養培地に（例

50

えば、少なくとも約0.5 ng/mlの濃度で)添加する段階をさらに含んでもよい。一部の態様では、刺激物質には、IL-2、IL-15、および/またはIL-7が含まれる。一部の局面では、IL-2の濃度は、少なくとも約10単位/mLである。

【0296】

一部の局面では、インキュベーションは、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に記載されているもののような技術に従って行われる。

【0297】

一部の態様では、T細胞は、(例えば、結果として生じる細胞の集団が、拡大増殖させようとする初期集団中の各Tリンパ球に対して少なくとも約5、10、20、もしくは40またはそれ以上のPBMCフィーダー細胞を含むように)非分裂末梢血単核球(PBMC)などのフィーダー細胞を培養開始組成物に添加し;かつ(例えば、T細胞の数を増大させるのに十分な時間にわたって)培養物をインキュベートすることによって、拡大増殖される。一部の局面では、非分裂フィーダー細胞は、ガンマ線照射PBMCフィーダー細胞を含むことができる。一部の態様では、PBMCは、細胞分裂を妨げるために、約3000~3600ラドの範囲のガンマ線を照射される。一部の局面では、フィーダー細胞は、T細胞の集団の添加の前に、培養培地に添加される。

【0298】

一部の態様では、刺激条件には、ヒトTリンパ球の成長に適している温度、例えば、少なくとも約25℃、一般に少なくとも約30℃、および一般に37℃または約37℃が含まれる。任意で、インキュベーションは、非分裂EBV形質転換リンパ芽球様細胞(LCL)をフィーダー細胞として添加することをさらに含んでもよい。LCLは、約6000~10,000ラドの範囲のガンマ線で照射することができる。LCLフィーダー細胞は、一部の局面では、任意の適切な量で、例えば、LCLフィーダー細胞と初期Tリンパ球の比が少なくとも約10:1である量で、提供される。

【0299】

態様では、抗原特異的T細胞、例えば、抗原特異的なCD4⁺T細胞および/またはCD8⁺T細胞は、ナイーブTリンパ球または抗原特異的Tリンパ球を抗原で刺激することによって得られる。例えば、抗原特異的なT細胞株またはクローンは、感染した対象からT細胞を単離し、同じ抗原を用いてインビトロで細胞を刺激することにより、サイトメガロウイルス抗原に対して作製することができる。

【0300】

C. 細胞を操作する方法

特定の態様において、操作された細胞は、1種もしくは複数種のインプット組成物および/または単一の生物試料から、濃縮T細胞のアウトプット組成物を生成するプロセスによって作製される。一定の態様において、アウトプット組成物は、組換え受容体、例えば、抗CD19 CARなどのCARを発現する細胞を含む。特定の態様において、アウトプット組成物の細胞は、自己細胞療法などの、治療薬として対象に投与するのに適している。いくつかの態様において、アウトプット組成物は、濃縮CD4⁺T細胞または濃縮CD8⁺T細胞の組成物である。

【0301】

いくつかの態様において、操作された細胞を生成または作製するためのプロセスは、以下の段階のうちのいくつかまたはすべてを含む工程による:生物試料を採取もしくは入手する段階;該生物試料からインプット細胞を単離、選択、もしくは濃縮する段階;該インプット細胞を凍結保存し保管する段階;該インプット細胞を刺激条件下で解凍および/もしくはインキュベーションする段階;組換えポリヌクレオチド、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を発現するかもしくは含むように、該刺激された細胞を操作する段階;該操作された細胞を、例えば、量、密度、もしくは拡大増殖の閾値まで培養する段階;該培養された細胞をアウトプット組成物として製剤化する段階;ならびに/

10

20

30

40

50

または該細胞を輸注のために遊離させ、かつ/もしくは対象に投与するのに適する時まで、該製剤化アウトプット細胞を凍結保存させ保管する段階。一定の態様において、このプロセスは、濃縮T細胞の2種またはそれ以上のインプット組成物、例えば、別個のCD4+組成物および別個のCD8+組成物を用いて実施され、これらの組成物は、同じ出発生物試料または初期生物試料から別々に処理および操作され、所定の比、例えばCD4+T細胞とCD8+T細胞の比1:1で再注入して対象に戻される。いくつかの態様において、濃縮T細胞は、操作されたT細胞、例えば、組換え受容体を発現するように形質導入されたT細胞であるか、またはそれを含む。

【0302】

特定の態様において、組換え受容体(例えば抗CD19 CAR)を発現する操作された細胞のアウトプット組成物は、細胞の初期および/またはインプット組成物から作製される。いくつかの態様において、インプット組成物は、濃縮T細胞、濃縮CD4+T細胞、および/または濃縮CD8+T細胞の組成物(以下、それぞれ濃縮T細胞組成物、濃縮CD4+T細胞組成物、および濃縮CD8+T細胞組成物とも呼ばれる)である。いくつかの態様において、CD4+T細胞が濃縮された組成物は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または99.9%のCD4+T細胞を含む。特定の態様において、濃縮CD4+T細胞の組成物は、100%のCD4+T細胞を含み、約100%のCD4+T細胞を含む。一定の態様において、濃縮T細胞組成物は、20%未満、10%未満、5%未満、1%未満、0.1%未満、もしくは0.01%未満のCD8+T細胞を含むかもしくは含有し、かつ/またはCD8+T細胞を含有せず、かつ/またはCD8+T細胞を含まないもしくは実質的に含まない。いくつかの態様において、細胞の集団は、本質的にCD4+T細胞からなる。いくつかの態様において、CD8+T細胞が濃縮された組成物は、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、もしくは99.9%のCD8+T細胞を含有するか、または約100%のCD8+のCD8+T細胞を含有もしくは含有する。一定の態様において、濃縮CD8+T細胞の組成物は、20%未満、10%未満、5%未満、1%未満、0.1%未満、もしくは0.01%未満のCD4+T細胞を含むかもしくは含有し、かつ/またはCD4+T細胞を含有せず、かつ/またはCD4+T細胞を含まないもしくは実質的に含まない。いくつかの態様において、細胞の集団は、本質的にCD8+T細胞からなる。

【0303】

一定の態様において、操作された細胞を作製するためのプロセスは、次のうちの1つまたは複数をさらに含むことができる:細胞、例えばインプット組成物の細胞を活性化および/もしくは刺激する段階;例えば、形質導入もしくはトランスフェクションによって組換えタンパク質をコードするポリヌクレオチドを導入するために、該活性化および/もしくは刺激された細胞の遺伝子を操作する段階;ならびに/または例えば増殖および/もしくは拡大増殖を促進する条件下で、該操作された細胞を培養する段階。特定の態様において、提供される方法は、細胞をインキュベーション、活性化、刺激、操作、形質導入、トランスフェクション、および/または培養した後に得られたアウトプット組成物を回収、採取、および/または製剤化する段階とともに使用されてよい。

【0304】

いくつかの態様において、提供される方法および使用に沿って使用される操作された細胞、例えば、前述の抗CD19 CARを発現するものは、細胞を選択、単離、活性化、刺激、拡大増殖、培養、および/または製剤化するためのプロセスによって作製または生成される。いくつかの態様において、このような方法には、前述のいずれかが含まれる。

【0305】

いくつかの態様において、提供される方法および使用に沿って使用される操作された細胞、例えば、前述の抗CD19 CARを発現するものは、例えば、WO 2019/089855およびWO 2015/164675に記載されている例示的なプロセスによって作製または生成される。

【0306】

任意の態様のうちのいくつかにおいて、操作された細胞、例えば前述の抗CD19 CAR

を発現するもの、またはそのような細胞を含む組成物、例えば、同じ抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)をそれぞれ発現する操作されたCD4+T細胞および操作されたCD8+T細胞を含む組成物を生成、作製、または製造するための例示的なプロセスは、プロセスの段階に濃縮CD4+細胞集団および濃縮CD8+細胞集団を別々に供する段階を含む。操作された細胞を生成または製造するための例示的なプロセスのいくつかの局面において、CD4+細胞およびCD8+細胞は、例えば白血球搬出によって得られるヒト末梢血単核細胞(PBMC)より別々に選択されて、別々の濃縮CD4+細胞組成物および濃縮CD8+細胞組成物を生成する。いくつかの局面において、このような細胞は、凍結保存することができる。いくつかの局面において、CD4+組成物およびCD8+組成物は、後で解凍し、刺激、形質導入、および拡大増殖のための段階に別々に供することができる。

10

【0307】

操作された細胞を生成または製造するための例示的なプロセスのいくつかの局面において、解凍されたCD4+細胞およびCD8+細胞は、例えば、抗CD3抗体および抗CD28抗体に結合させた、ポリスチレンでコーティングされた常磁性ビーズの存在下で(例えば、ビーズと細胞の比が1:1で)、別々に刺激される。いくつかの局面において、刺激は、ヒト組換えIL-2、ヒト組換えIL-15、およびN-アセチルシステイン(NAC)を含む培地において行われる。いくつかの局面において、CD4+細胞用の細胞培地は、ヒト組換えIL-7も含むことができる。

【0308】

操作された細胞を生成または製造するための例示的なプロセスのいくつかの局面において、ビーズの導入後、同じCAR、例えば同じ抗CD19 CARをコードするレンチウイルスベクターを用いて、CD4+細胞およびCD8+細胞に別々に形質導入する。いくつかの局面において、CARは、マウス抗体に由来する抗CD19 scFv、免疫グロブリンスペーサー、CD28に由来する膜貫通ドメイン、4-1BBに由来する共刺激領域、およびCD3-ζ細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができる。いくつかの局面において、ベクターは、T2A配列によってCAR構築物に結合されている、CAR発現に関するサロゲートマーカーとして役立つ短縮型受容体をコードすることができる。例示的なプロセスのいくつかの局面において、これらの細胞は、10 μg/ml硫酸プロタミンの存在下で形質導入される。

20

【0309】

操作された細胞を生成または製造するための例示的なプロセスのいくつかの局面において、形質導入後、磁場に曝露することにより、細胞組成物からビーズを取り出す。いくつかの局面において、CD4+細胞組成物およびCD8+細胞組成物は、連続的に混ぜ、バイオリアクター(例えばXuri(商標) W25バイオリアクター)によって酸素を送りながら、別々に培養して拡大増殖させる。いくつかの場合において、ポロキサマーが培地に添加される。いくつかの局面において、CD4+細胞組成物およびCD8+細胞組成物のどちらも、IL-2およびIL-15の存在下で培養される。いくつかの局面において、CD4+細胞培地はまた、IL-7も含む。いくつかの場合において、CD4+細胞およびCD8+細胞は、回収前に、4倍に拡大増殖するまでそれぞれ培養される。いくつかの局面において、閾値に到達後1日目に、各組成物に由来する細胞を別々に回収、製剤化、および凍結保存することができる。いくつかの局面において、操作された細胞、例えば前述の抗CD19 CARを発現するもの、またはそのような細胞を含む組成物、例えば、同じ抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)をそれぞれ発現する操作されたCD4+T細胞および操作されたCD8+T細胞を含む組成物を生成、作製、または製造するための例示的なプロセスは、下記の表6に説明することを含む。

30

40

【0310】

(表6) CD4+ CAR-T細胞およびCD8+ CAR-T細胞を作製するための例示的なプロセス

段階	CD4+ 細胞	CD8+ 細胞
刺激 (1～2日目)	- 抗 CD3/CD28 抗体 結合ビーズ - ビーズ対細胞比 1:1 - 培地: IL-2, IL-7, IL-15, および NAC	- 抗 CD3/CD28 抗体 結合ビーズ - ビーズ対細胞比 1:1 - 培地: IL-2, IL-15, および NAC
形質導入 (2～5日目)	形質導入アジュバント (例えば、10μg/ml 硫酸プロタミン)	形質導入アジュバント (例えば、10μg/ml 硫酸プロタミン)
ビーズ取り出し (5日目*)	磁気ビーズの取り出し	磁気ビーズの取り出し
拡大増殖 (5日目*～回収時)	- 揺動バイオリアクター および/または 連続混合 - 培地: IL-2, IL-7, IL15, および ポロキサマー	- 揺動バイオリアクター および/または 連続混合 - 培地: IL-2, IL15, および ポロキサマー

* 概数

【0311】

他の局面において、操作された細胞またはそのような細胞を含む組成物を生成、作製、または製造するための別の例示的なプロセスには、上記の例示的なプロセスとは次の点で異なるプロセスが含まれる: 刺激時に NAC は培地に添加されないこと; CD4+細胞培地が IL-2 を含まないこと; 細胞が、ビーズと細胞の比が 3:1 で刺激されること; 細胞が、より高濃度の硫酸プロタミンを用いて形質導入されること; ビーズの取り出しが 7 日目頃に行われること; ならびに拡大増殖が、静的環境で、すなわち、連続的混合も灌流 (例えば半連続灌流および/もしくは段階的灌流) もせず、かつポロキサマーなしで行われること。

【0312】

いくつかの態様において、少なくとも 1 種の別個の濃縮 CD4+T 細胞組成物および少なくとも 1 種の別個の濃縮 CD8+T 細胞組成物は、単一の生物試料、例えば、患者または健康個体などの同一ドナーに由来する PBMC または他の白血球の試料から、単離、選択、濃縮、または入手される。いくつかの態様において、別個の濃縮 CD4+T 細胞組成物および別個の濃縮 CD8+T 細胞組成物は、同じ生物試料、例えば、1 名の対象から入手、採取、および/または収集された単一の生物試料に由来し、例えば、最初に単離され、選択され、かつ/または濃縮された。いくつかの態様において、生物試料は、CD4+T 細胞の選択に最初に供され、その際、陰性画分と陽性画分の両方が確保され、陰性画分は CD8+T 細胞の選択にさらに供される。他の態様において、生物試料は、CD8+T 細胞の選択に最初に供され、その際、陰性画分と陽性画分の両方が確保され、陰性画分は CD4+T 細胞の選択にさらに供される。いくつかの態様において、選択の方法は、国際 PCT 公開公報第 2015/164675 号に記載されているように実施する。いくつかの態様において、選択の方法は、国際 PCT 公開公報第 2019/089855 号に記載されているように実施する。いくつかの局面において、少なくとも 1 種の濃縮 CD8+T 細胞組成物と少なくとも 1 種の濃縮 CD4+T 細胞組成物が、同じ生物試料、例えば、同じドナー患者または健康個体に由来する別個の組成物となるように、生物試料をまず CD8+T 細胞について陽性選択して、少なくとも 1 種の濃縮 CD8+T 細胞組成物を生成し、次に陰性画分を CD4+T 細胞について陽性選択して、少なくとも 1 種の濃縮 CD4+T 細胞組成物を生成する。いくつかの局面において、例えば、少なくとも 1 種は濃縮 CD4+T 細胞組成物であり、少なくとも 1 種は同じドナーに由来する別の濃縮 CD8+T 細胞組成物である、2 種またはそれ以上の別個の濃縮 T 細胞組成物は、別々に凍結、例えば、凍結保存媒体中で凍結保護または凍結保存される。

【0313】

いくつかの局面において、例えば、少なくとも 1 種は濃縮 CD4+T 細胞組成物であり、

少なくとも1種は同じ生物試料に由来する別の濃縮CD8+T細胞組成物である、2種またはそれ以上の別個の濃縮T細胞組成物は、刺激性試薬と接触させることによって(例えば、T細胞活性化のためのCD3/CD28とコンジュゲートされた磁性ビーズとともにインキュベーションすることによって)、活性化および/または刺激される。いくつかの局面において、活性化/刺激された各細胞組成物は、例えば、組換えタンパク質(例えばCAR)をコードするウイルスベクターを用いて操作、形質導入、および/またはトランスフェクトされて、各細胞組成物のCD4+T細胞およびCD8+T細胞において同じ組換えタンパク質を発現するようになる。いくつかの局面において、方法は、刺激性試薬、例えば磁性ビーズを細胞組成物から取り出す段階を含む。いくつかの局面において、操作されたCD4+T細胞を含む細胞組成物および操作されたCD8+T細胞を含む細胞組成物は、例えば、その中のCD4+T細胞集団およびCD8+T細胞集団を別々に拡大増殖させるために、別々に培養される。一定の態様において、培養に由来する細胞組成物は、例えば、細胞組成物を製剤緩衝液中で洗浄することにより、回収および/もしくは採取ならびに/または製剤化される。一定の態様において、CD4+T細胞を含む製剤化細胞組成物およびCD8+T細胞を含む製剤化細胞組成物は、凍結、例えば、凍結保存媒体中で凍結保護または凍結保存される。いくつかの局面において、各製剤中の操作されたCD4+T細胞およびCD8+T細胞は、同じドナーまたは生物試料に由来し、同じ組換えタンパク質(例えば抗CD19 CARなどのCAR)を発現する。いくつかの局面において、別個の操作されたCD4+製剤および別個の操作されたCD8+製剤は、所定の比、例えば1:1で、それを必要とする対象、例えば同じドナーに投与される。

10

20

【0314】

1. 遺伝子操作のための細胞および細胞の調製

いくつかの態様において、提供される方法、使用、製造品、または組成物とともに使用される細胞、例えばT細胞は、組換え受容体、例えば本明細書に記載のCARまたはTCRを発現するように遺伝子操作された細胞である。いくつかの態様において、操作された細胞は、細胞療法、例えば養子細胞療法において使用される。いくつかの態様において、操作された細胞は免疫細胞である。いくつかの態様において、操作された細胞は、T細胞、例えば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、操作された細胞は、T細胞、例えばCD4+細胞およびCD8+T細胞である。

【0315】

一部の態様では、前記核酸、例えば組換え受容体をコードする核酸は異種である、すなわち、細胞または細胞から得られた試料、例えば、別の生物または細胞から得られた試料に通常は存在せず、例えば、操作されている細胞および/またはこのような細胞が得られた生物に普通は見出されない。一部の態様では、前記核酸は天然に存在せず、例えば、複数の異なる細胞タイプに由来する様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含む核酸を含む、自然界で見出されない核酸である。

30

【0316】

細胞は一般的に、真核細胞、典型的には、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である。一部の態様において、前記細胞は血液、骨髄、リンパ、またはリンパ系臓器に由来し、免疫系の細胞、例えば、自然免疫もしくは適応免疫の細胞、例えば、リンパ球、典型的にはT細胞および/またはNK細胞を含む骨髄系細胞またはリンパ系細胞である。他の例示的な細胞には、幹細胞、例えば、人工多能性幹細胞(iPSC)を含む多分化能性幹細胞および多能性幹細胞が含まれる。前記細胞は、典型的には、初代細胞、例えば、対象から直接単離された、および/または対象から単離され、凍結された細胞である。一部の態様において、前記細胞には、T細胞または他の細胞タイプの1つまたは複数のサブセット、例えば、全T細胞集団、CD4+細胞、CD8+細胞、およびその部分母集団、例えば、機能、活性化状態、成熟度、分化能、拡大増殖、再循環、局在化、および/もしくは持続の能力、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定の臓器もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、ならびに/または分化の程度によって規定されるT細胞または他の細胞タイプの1つまたは複数のサブセットが含まれる。処置しようとする対

40

50

象に関して、前記細胞は同種異系および/または自己由来でもよい。一部の局面では、細胞は自己由来である。一部の局面では、細胞は同種異系である。方法の中には既製の方法が含まれる。一部の局面では、例えば、既製の技術の場合、細胞は、多能性および/または複能性であり、例えば、人工多能性幹細胞 (iPSC) などの幹細胞である。一部の態様では、方法は、対象から細胞を単離する段階、細胞を調製、処理、培養、および/または操作する段階、ならびに凍結保存前または凍結保存後に細胞を同じ対象に再導入する段階を含む。

【0317】

T細胞ならびに/またはCD4⁺および/もしくはCD8⁺T細胞のサブタイプおよび部分母集団の中には、ナイーブT (T_N) 細胞、エフェクターT細胞 (T_{EFF})、メモリーT細胞、およびそれらのサブタイプ、例えば、幹細胞メモリーT (T_{SCM})、セントラルメモリーT (T_{CM})、エフェクターメモリーT (T_{EM})、または終末分化したエフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、未熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT (MAIT) 細胞、天然および適応性制御性T (Treg) 細胞、ヘルパーT細胞、例えば、TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞ヘルパーT細胞、α/βT細胞、ならびにδ/γT細胞がある。

【0318】

一部の態様では、細胞はナチュラルキラー (NK) 細胞である。一部の態様では、細胞は、単球または顆粒球、例えば、骨髄系細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、および/または好塩基球である。

【0319】

一部の態様では、細胞は、遺伝子操作を介して導入された1つまたは複数の核酸を含み、それによって、そのような核酸の組換え産物または遺伝子操作された産物を発現する。一部の態様では、核酸は異種である、すなわち、細胞または細胞から得られた試料に通常は存在せず、例えば、別の生物または細胞から得られたものであり、例えば、操作されている細胞および/またはそのような細胞が得られた生物に普通は見出されない。一部の態様では、核酸は天然に存在せず、例えば、複数の異なる細胞タイプに由来する様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含む核酸を含む、自然界で見出されない核酸である。

【0320】

一部の態様では、操作された細胞の調製は、1つまたは複数の培養段階および/または調製段階を含む。トランスジェニック受容体、例えば、CARをコードする核酸の導入のための細胞は、生物学的試料などの試料、例えば、対象から得られた試料または対象に由来する試料から単離されてもよい。一部の態様では、細胞が単離される対象は、疾患もしくは状態を有するか、または細胞療法を必要とするか、または細胞療法が投与される対象である。対象は、一部の態様では、特定の治療介入、例えば、養子細胞療法を必要とし、このために細胞が単離、処理、および/または操作されているヒトである。

【0321】

したがって、細胞は、一部の態様では、初代細胞、例えば、初代ヒト細胞である。試料には、対象から直接採取した組織、液体、および他の試料、ならびに1つまたは複数の処理段階、例えば、分離、遠心分離、遺伝子操作 (例えば、ウイルスベクターによる形質導入)、洗浄、および/またはインキュベーションに起因する試料が含まれる。生物学的試料は、生物学的供給源から直接得られた試料でもよく、または処理された試料でもよい。生物学的試料には、これに限定されないが、体液、例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および臓器試料が、これらから得られた処理済み試料を含めて含まれる。

【0322】

一部の局面では、細胞が得られるまたは単離される試料は、血液もしくは血液由来試料であるか、またはアフェレーシスもしくは白血球アフェレーシスによる生成物であるかもしくはこれから得られる。例示的な試料としては、全血、末梢血単核球 (PBMC)、白血

10

20

30

40

50

球、骨髓、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、消化管に関連するリンパ系組織、粘膜に関連するリンパ系組織、脾臓、他のリンパ系組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸部、精巣、卵巣、扁桃腺、もしくは他の器官、および/またはこれらに由来する細胞が挙げられる。試料には、細胞療法、例えば、養子細胞療法の状況では、自己由来供給源および同種異系供給源に由来する試料が含まれる。

【0323】

一部の態様では、細胞は、細胞株、例えば、T細胞株に由来する。細胞は、一部の態様では、異種供給源から、例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類、およびブタから得られる。

【0324】

一部の態様では、細胞の単離には、1つまたは複数の調製段階および/または親和性に基づかない細胞分離段階が含まれる。一部の例では、例えば、望ましくない成分を除去するために、望ましい成分を濃縮するために、特定の試薬に対して感受性のある細胞を溶解または除去するために、細胞は、洗浄される、遠心分離される、および/または1種または複数種の試薬の存在下でインキュベートされる。一部の例では、細胞は、密度、粘着性、サイズ、特定の成分に対する感受性および/または耐性などの1つまたは複数の特性に基づいて分離される。

【0325】

一部の例では、対象の循環血液に由来する細胞は、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、一部の局面では、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含むリンパ球、赤血球、および/または血小板を含有し、一部の局面では、赤血球および血小板以外の細胞を含有する。

【0326】

一部の態様では、例えば、血漿画分を除去するために、およびその後の処理段階のために細胞を適切な緩衝液または培地中に置くために、対象から収集した血液細胞は洗浄される。一部の態様では、細胞はリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄される。一部の態様では、洗浄溶液は、カルシウムおよび/もしくはマグネシウムならびに/または多くのもしくは全ての二価カチオンを欠いている。一部の局面では、洗浄段階は、半自動「フロースルー」遠心機(例えば、Cobe 2991 cell processor, Baxter)によって製造業者の説明書にしたがって達成される。一部の局面では、洗浄段階は、タンジェンシャルフロー濾過(TFF)によって製造業者の説明書にしたがって達成される。一部の態様では、細胞は、洗浄後に、様々な生体適合性緩衝液、例えば、 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ を含まないPBSで再懸濁される。ある特定の態様では、血液細胞試料の成分は除去され、細胞は培養培地に直接再懸濁される。

【0327】

一部の態様では、方法には、密度に基づく細胞分離方法、例えば、赤血球を溶解することによる末梢血からの白血球の調製およびPercoll(登録商標)またはFicoll(登録商標)勾配による遠心分離が含まれる。

【0328】

いくつかの態様において、選択段階の少なくとも一部は、選択試薬とともに細胞をインキュベーションすることを含む。例えば、選択方法の一環としての、1種または複数種の選択試薬とのインキュベーションは、1種または複数種の特殊な分子、例えば表面マーカー、例えば表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸の細胞中または細胞表面での発現または存在に基づいて1種または複数種の異なる細胞型を選択するための1種または複数種の選択試薬を用いて、実施されてよい。いくつかの態様において、そのようなマーカーに基づく分離のために1種または複数種の選択試薬を用いる任意の公知の方法が使用されてよい。いくつかの態様において、1種または複数種の選択試薬は、親和性またはイムノアフィニティーに基づく分離である分離をもたらす。例えば、いくつかの局面における選択は、1種または複数種のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞発現または発

10

20

30

40

50

現レベルに基づいて細胞および細胞集団を分離するための1種または複数種の試薬とともにインキュベーションすることを含み、これは、例えば、そのようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合相手とともにインキュベーションすることにより、通常はその後に、洗浄段階と、該抗体または該結合相手に結合していない細胞からの該抗体または該結合相手に結合している細胞の分離が続く。

【0329】

このようなプロセスのいくつかの局面において、ある体積量の細胞が、ある量の親和性に基づく所望の選択試薬と混合される。イムノアフィニティーに基づく選択は、分離される細胞と、細胞上のマーカーに特異的に結合する分子、例えば、粒子などの固形表面上の抗体または他の結合相手との好ましいエネルギー相互作用をもたらす任意の方式または方法を用いて実施することができる。いくつかの態様において、方法は、細胞のマーカーに特異的な選択試薬(例えば抗体)でコーティングされている粒子、例えば磁性ビーズなどのビーズを用いて実施される。これらの粒子(例えばビーズ)は、エネルギー的に好ましい相互作用を促進するのに役立つ一定の細胞密度対粒子(例えばビーズ)比率で、振盪または混合しつつ、チューブまたはバッグなどの容器中で細胞とインキュベーションまたは混合することができる。他の場合では、方法は、選択の全部または一部分が、例えば遠心回転の状態にある遠心チャンバーの内部キャビティにおいて行われる細胞選択を含む。いくつかの態様において、イムノアフィニティーに基づく選択試薬などの選択試薬との細胞のインキュベーションは、遠心チャンバー中で実施される。一定の態様において、単離または分離は、国際特許出願公開番号WO2009/072003またはUS20110003380A1に記載されている系、器具、または装置を用いて行われる。一例を挙げれば、系は、国際公開公報第2016/073602号に記載されている系である。

【0330】

いくつかの態様において、遠心チャンバーのキャビティでそのような選択段階またはその一部分(例えば、抗体でコーティングされた粒子、例えば磁性ビーズとのインキュベーション)を行うことにより、使用者は、いくつかのパラメーター、例えば、様々な溶液の体積、加工処理中の溶液の添加およびそのタイミングを制御することができる。このことにより、他の利用可能な方法と比べて利点をもたらすことができる。例えば、インキュベーション時にキャビティ中の液体体積を減らせることにより、選択において使用される粒子(例えばビーズ試薬)の濃度、およびしたがって溶液の化学的能力を、キャビティ中の細胞総数に影響を与えることなく、増大させることができる。この結果として、加工処理される細胞と選択のために使用される粒子とのペア相互作用を強めることができる。いくつかの態様において、例えば、本明細書において説明する系、回路、および制御に関連する場合に、チャンバー中でインキュベーション段階を行うことにより、使用者はインキュベーション中に所望の回数の溶液攪拌を実行することが可能になり、これによっても相互作用を向上させることができる。

【0331】

いくつかの態様において、選択段階の少なくとも一部は、遠心チャンバー中で実施され、選択試薬とともに細胞をインキュベーションすることを含む。このようなプロセスのいくつかの局面において、ある体積量の細胞が、ある量の親和性に基づく所望の選択試薬と混合され、その際、該選択試薬の量は、製造業者の取扱い説明書に従って同じ数の細胞および/または同じ体積の細胞を選択するためにチューブまたは容器中で同様の選択を実施する際に通常使用されるよりはるかに少ない量である。いくつかの態様において、製造業者の取扱い説明書に従って同じ数の細胞および/または同じ体積の細胞を得るためにチューブまたは容器を用いるインキュベーションにおいて細胞を選択するために使用される同じ選択試薬の量の5%以下、10%以下、15%以下、20%以下、25%以下、50%以下、60%以下、70%以下、または80%以下である、1種または複数種の選択試薬の量が、使用される。

【0332】

いくつかの態様において、選択、例えば、イムノアフィニティーに基づく細胞選択のた

めに、細胞は、選択試薬とともに選択緩衝液も含む混合物中で、チャンバーのキャビティにおいてインキュベーションされる。該選択試薬は、例えば、濃縮および/または枯渇することが望まれる細胞上の表面マーカーには特異的に結合するが、その混合物中の他の細胞上のものには結合しない分子、例として抗体である。抗体は、ポリマーまたは表面などの足場、例えば、磁性ビーズなどのビーズに結合されていてもよく、例えば、CD4およびCD8に特異的なモノクローナル抗体に結合された磁性ビーズである。いくつかの態様において、前述したように、選択試薬は、振盪または回転しながらチューブ中で選択が実施される場合に同じ数の細胞または同じ体積の細胞の選択についてほぼ同じまたは同様の効率を実現するために典型的に使用されるかまたは必要であると思われる選択試薬の量と比較して、実質的に少ない(例えば、その量の5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、または80%以下である)量で、チャンバーのキャビティ中の細胞に添加される。いくつかの態様において、インキュベーションは、例えば10mL~200mL、例えば、少なくとも10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL、もしくは200mL、または少なくとも約10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL、もしくは200mLである、試薬のインキュベーションに伴う目標体積を実現するために、細胞および選択試薬に選択緩衝液を添加して、実施される。いくつかの態様において、選択緩衝液および選択試薬は、細胞に添加する前に予備混合される。いくつかの態様において、選択緩衝液および選択試薬は、細胞に別々に添加される。いくつかの態様において、選択インキュベーションは、定期的に穏やかに混合する条件下で実施され、この条件は、エネルギー的に好ましい相互作用を促進するのに役立ち、それによって、選択試薬の総使用量を少なくし、同時に高い選択効率を実現することを可能にし得る。

10

20

【0333】

いくつかの態様において、選択試薬とのインキュベーションの合計期間は、5分~6時間または約5分~6時間、例えば、30分~3時間または約30分~3時間、例えば、少なくとも30分、60分、120分、もしくは180分、または少なくとも約30分、60分、120分、もしくは180分である。

【0334】

いくつかの態様において、インキュベーションは、通常、混合条件下で行われ、例えば、通常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ために使用される速度よりも低い速度で、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)で、例えば、チャンバーまたは他の容器の試料または壁に対して80g~100gまたは約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)のRCFでの回転の存在下で行われる。いくつかの態様において、回転は、このような低速度での回転とそれに続く静止期間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10秒間の回転および/または静止、例えば、約1または2秒の回転とそれに続く約5、6、7、または8秒間の静止という時間間隔の繰り返しを用いて行われる。

30

40

【0335】

いくつかの態様において、このようなプロセスは、チャンバーが内蔵されている完全閉鎖系内で行われる。いくつかの態様において、このプロセス(およびいくつかの局面において、1つまたは複数の付加的な段階、例えば、アフエーシス試料など細胞を含む試料を洗浄する事前洗浄段階も)は、自動化された様式で行われる。この様式では、自動化プログラムを用いて単一の閉鎖系において洗浄および結合段階を完了するように、細胞、試薬、および他の構成成分が適切な時点にチャンバーに引き入れられ、押し出され、遠心分離が実施される。

【0336】

50

いくつかの態様において、細胞ならびに1種および/または複数種の選択試薬のインキュベーションおよび/または混合後、インキュベーションした細胞を分離に供して、特定の1種または複数種の試薬の存在または不在に基づいて細胞を選択する。いくつかの態様において、分離は、細胞と選択試薬とのインキュベーションが実施されたのと同じ閉鎖系で実施される。いくつかの態様において、選択試薬とのインキュベーション後、選択試薬が結合した細胞を含むインキュベーションされた細胞を、イムノアフィニティーに基づく細胞分離のための系に移す。いくつかの態様において、イムノアフィニティーに基づく分離のための系は、磁気分離カラムであるか、またはそれを含む。

【0337】

いくつかの態様において、単離方法には、細胞における、1種類または複数種の特定の分子、例えば、表面マーカー、例えば、表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸の発現または存在に基づく様々な細胞タイプの分離が含まれる。一部の態様において、このようなマーカーに基づいて分離するための任意の公知の方法を使用することができる。一部の態様において、分離は親和性または免疫親和性に基づく分離である。例えば、単離は、一部の局面では、例えば、このようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーとインキュベートし、その後、一般的に洗浄段階を行い、抗体または結合パートナーに結合している細胞を、抗体または結合パートナーに結合していない細胞から分離することによって、1種類または複数種のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞発現または発現レベルに基づいて細胞および細胞集団を分離することを含む。

【0338】

このような分離段階は、さらに使用するために、試薬に結合した細胞が保持される正の選択に基づいてもよく、および/または抗体または結合パートナーに結合していない細胞が保持される負の選択に基づいてもよい。一部の例では、さらに使用するために両画分とも保持される。一部の局面において、不均質な集団の中にある細胞タイプを特異的に特定する抗体が利用できない場合、望ましい集団以外の細胞によって発現されるマーカーに基づいて分離が最も良く行われるように、負の選択が特に有用な場合がある。

【0339】

分離によって、特定のマーカーを発現する特定の細胞集団または細胞が100%濃縮または取り出される必要はない。例えば、特定のタイプの細胞、例えば、マーカーを発現する細胞の正の選択または濃縮とは、このような細胞の数またはパーセントが増加することを指すが、このマーカーを発現しない細胞が完全に無くなる必要はない。同様に、特定のタイプの細胞、例えば、マーカーを発現する細胞の負の選択、除去、または枯渇とは、このような細胞の数またはパーセントが減少することを指すが、このような細胞が全て完全に取り除かれる必要はない。

【0340】

一部の例では、複数回の分離段階が行われ、この場合、ある段階に由来する正に選択された画分または負に選択された画分は別の分離段階、例えば、後の正の選択または負の選択に供される。一部の例では、1回の分離段階で、例えば、それぞれが負の選択のために標的とされるマーカーに特異的な複数種の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、同時に、複数種のマーカーを発現する細胞を枯渇することができる。同様に、様々な細胞タイプの表面に発現している複数種の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞タイプを同時に正に選択することができる。

【0341】

例えば、一部の局面において、特定のT細胞部分母集団、例えば、1種類もしくは複数種の表面マーカーが陽性の細胞または高レベルの1種類もしくは複数種の表面マーカーを発現する細胞、例えば、CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺、および/またはCD45RO⁺T細胞が正の選択法または負の選択法によって単離される。

【0342】

例えば、 $CD3^+$ 、 $CD28^+$ T細胞は、抗CD3/抗CD28結合磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander）を用いて正に選択することができる。

【0343】

一部の態様において、単離は、特定の細胞集団を正の選択によって濃縮することによって、または特定の細胞集団を負の選択によって枯渇させることによって行われる。一部の態様において、正の選択または負の選択は、それぞれ、正に選択された細胞または負に選択された細胞の表面に発現している1種類もしくは複数種の表面マーカー（マーカー⁺）または比較的高いレベルで発現している1種類もしくは複数種の表面マーカー（マーカー^{high}）に特異的に結合する1種類または複数種の抗体または他の結合剤と細胞をインキュベートすることによって成し遂げられる。

10

【0344】

特定の態様において、生物試料、例えばPBMCまたは他の白血球の試料は、 $CD4^+$ T細胞の選択に供され、その際、陰性画分と陽性画分の両方が確保される。一定の態様において、 $CD8^+$ T細胞は、陰性画分より選択される。いくつかの態様において、生物試料は、 $CD8^+$ T細胞の選択に供され、その際、陰性画分と陽性画分の両方が確保される。一定の態様において、 $CD4^+$ T細胞は、陰性画分より選択される。

【0345】

一部の態様において、T細胞は、非T細胞、例えば、B細胞、単球、または他の白血球の表面に発現しているマーカー、例えば、 $CD14$ の負の選択によってPBMC試料から分離される。一部の局面において、 $CD4^+$ ヘルパーおよび $CD8^+$ 細胞傷害性T細胞を分離するために、 $CD4^+$ 選択段階または $CD8^+$ 選択段階が用いられる。このような $CD4^+$ 集団および $CD8^+$ 集団は、1つまたは複数のナイーブ、メモリー、および/またはエフェクターT細胞部分母集団の表面で発現しているか、または比較的多量に発現しているマーカーを対象にした正の選択または負の選択によって部分母集団にさらに選別することができる。

20

【0346】

一部の態様において、さらに、 $CD8^+$ 細胞は、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、および/またはセントラルメモリー幹細胞について、例えば、それぞれの部分母集団に関連する表面抗原に基づいた正の選択または負の選択によって濃縮または枯渇される。一部の態様において、有効性を高めるために、例えば、長期生存、拡大増殖、および/または投与後の生着を改善するために、セントラルメモリーT（ T_{CM} ）細胞の濃縮が行われる。一部の局面において、この有効性は、このような部分母集団において特に口バストである。Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35 (9):689-701を参照されたい。一部の態様において、 T_{CM} が濃縮された $CD8^+$ T細胞および $CD4^+$ T細胞を組み合わせると有効性がさらに高まる。

30

【0347】

一部の態様では、メモリーT細胞は、 $CD8^+$ 末梢血リンパ球の $CD62L^+$ サブセットと $CD62L^-$ サブセットの両方に存在する。PBMCは、例えば、抗CD8抗体および抗CD62L抗体を用いて、 $CD62L^-CD8^+$ 画分および/または $CD62L^+CD8^+$ 画分について濃縮させかつまたは枯渇させることができる。

40

【0348】

一部の態様では、セントラルメモリーT（ T_{CM} ）細胞の濃縮は、 $CD45RO$ 、 $CD62L$ 、 $CCR7$ 、 $CD28$ 、 $CD3$ 、および/または $CD127$ の正のまたは高い表面発現に基づき；一部の局面では、それは、 $CD45RA$ および/またはグランザイムBを発現するかまたは高く発現する細胞に対する負の選択に基づく。一部の局面では、 T_{CM} 細胞について濃縮した $CD8^+$ 集団の単離は、 $CD4$ 、 $CD14$ 、 $CD45RA$ を発現する細胞の枯渇と、 $CD62L$ を発現する細胞に対する正の選択または濃縮によって行われる。一局面では、セントラルメモリーT（ T_{CM} ）細胞の濃縮は、 $CD4$ 発現に基づいて選択された細胞の負の画分から開始して行われ、この画分は、 $CD14$ および $CD45RA$ の発現に基づく負の選択と、 $CD62L$ に基づく正の選択に供される。そのような選択は一部の局面では、同時に行われ、他の局面では、

50

どちらかの順序で連続して行われる。一部の局面では、 $CD8^+$ 細胞集団または部分母集団の調製において用いられた同じ $CD4$ 発現に基づく選択段階が、 $CD4^+$ 細胞集団または部分母集団を作製するのにも用いられ、 $CD4$ に基づく分離から正の画分および負の画分が両方とも保持され、この方法の後の段階において、任意で、1つまたは複数のさらなる正の選択段階または負の選択段階の後に用いられる。

【0349】

特定の例では、PBMCの試料または他の白血球試料は $CD4^+$ 細胞の選択に供され、ここで、負の画分および正の画分が両方とも保持される。負の画分は、次いで、 $CD14$ および $CD45RA$ または $CD19$ の発現に基づく負の選択、およびセントラルメモリーT細胞に特徴的なマーカー、例えば、 $CD62L$ または $CCR7$ に基づく正の選択に供され、ここで、正の選択および負の選択はいずれかの順序でも行われる。

10

【0350】

$CD4^+$ Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することによってナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、およびエフェクター細胞に選別される。 $CD4^+$ リンパ球は標準的な方法によって得ることができる。一部の態様では、ナイーブ $CD4^+$ Tリンパ球は、 $CD45RO^-$ 、 $CD45RA^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD4^+$ T細胞である。一部の態様では、セントラルメモリー $CD4^+$ 細胞は $CD62L^+$ および $CD45RO^+$ である。一部の態様では、エフェクター $CD4^+$ 細胞は $CD62L^-$ および $CD45RO^-$ である。

【0351】

一例では、負の選択によって $CD4^+$ 細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは典型的には、 $CD14$ 、 $CD20$ 、 $CD11b$ 、 $CD16$ 、HLA-DR、および $CD8$ に対する抗体を含む。一部の態様では、抗体または結合パートナーが、磁気ビーズまたは常磁性ビーズなどの固体支持体またはマトリックスに結合され、正の選択および/または負の選択での細胞の分離を可能にする。例えば、一部の態様では、細胞および細胞集団は、免疫磁気（または親和性磁気（affinity magnetic））分離技法を用いて分離または単離される（Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher（著作権）Humana Press Inc., Totowa, NJにおいて概説される）。

20

【0352】

一部の局面では、分離しようとする細胞の試料または組成物は、小さな、磁化可能な、または磁気に反応する物質、例えば、磁気に反応する粒子または微粒子、例えば、常磁性ビーズ（例えば、Dynalbeads（登録商標）またはMACS（登録商標）ビーズ）と共にインキュベートされる。磁気に反応する物質、例えば、粒子は一般に、分離することが望ましい、例えば、負に選択するまたは正に選択することが望ましい、細胞、複数の細胞、または細胞の集団上に存在する分子、例えば、表面マーカーに特異的に結合する結合パートナー、例えば、抗体に直接的または間接的に付着させる。

30

【0353】

一部の態様では、磁性粒子または磁気ビーズは、抗体または他の結合パートナーなどの特異的結合メンバーに結合されている磁気に反応する物質を含む。磁気分離方法において用いられる多くの周知の磁気に反応する物質がある。適切な磁性粒子には、参照により本明細書に組み入れられる、Molday, 米国特許第4,452,773号、および欧州特許明細書EP452342Bに記載のものが含まれる。コロイドサイズの粒子、例えば、Owen 米国特許第4,795,698号およびLiberti et al., 米国特許第5,200,084号に記載のものが他の例である。

40

【0354】

インキュベーションは一般に、磁性粒子または磁気ビーズに付着している、抗体もしくは結合パートナー、またはこのような抗体もしくは結合パートナーに特異的に結合する分子、例えば、二次抗体もしくは他の試薬が、細胞表面分子が試料中の細胞上に存在している場合に細胞表面分子に特異的に結合する、条件下で行われる。

50

【0355】

一部の局面では、試料は磁場の中に置かれ、磁気に応答する粒子または磁化可能な粒子が付着しているそのような細胞は、磁石に引き付けられ、非標識細胞から分離される。正の選択では、磁石に引き付けられた細胞が保持され；負の選択では、引き付けられなかった細胞（非標識細胞）が保持される。一部の局面では、正の選択と負の選択との組み合わせが、同じ選択段階の間に行われ、ここでは、正の画分および負の画分が保持され、さらに処理されるかまたはさらなる分離段階に供される。

【0356】

ある特定の態様では、磁気に応答する粒子は、一次抗体または他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素、もしくはストレプトアビジンでコーティングされる。ある特定の態様では、磁性粒子は、1つまたは複数のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを介して細胞に付着される。ある特定の態様では、細胞はビーズではなく、一次抗体または結合パートナーで標識され、次いで、細胞タイプ特異的な二次抗体または他の結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン）でコーティングされた磁性粒子が添加される。ある特定の態様では、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性粒子が、ビオチン化した一次抗体または二次抗体と一緒に用いられる。

【0357】

一部の態様では、磁気に応答する粒子は、その後にインキュベート、培養、および/または操作される細胞に付着させたままであり；一部の局面では、該粒子は、患者に投与するための細胞に付着させたままである。一部の態様では、磁化可能な粒子または磁気に応答する粒子は細胞から取り除かれる。磁化可能な粒子を細胞から取り除くための方法は公知であり、例えば、競合する非標識競合抗体、および切断可能なリンカーにコンジュゲートさせた磁化可能な粒子または抗体の使用を含む。一部の態様では、磁化可能な粒子は生分解性である。

【0358】

一部の態様において、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別（MACS（登録商標））（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）を介した選択である。磁気活性化細胞選別（MACS（登録商標））システムは、磁化粒子が取り付けられている細胞を高純度で選択することができる。ある特定の態様において、MACS（登録商標）は、外部磁場が印加された後に、非標的種および標的種が連続して溶出されるモードで動作する。すなわち、取り付けられなかった種が溶出される間に、磁化粒子に取り付けられた細胞は所定の位置に保たれる。次いで、この第1の溶出段階が完了した後に、磁場に閉じ込められ、溶出しないようにされていた種は、このような種が溶出および回収が可能なように何らかのやり方で遊離される。ある特定の態様において、非標的細胞は標識され、不均質な集団細胞から枯渇される。

【0359】

ある特定の態様において、単離または分離は、前記方法の単離段階、細胞調製段階、分離段階、処理段階、インキュベーション段階、培養段階、および/または製剤化段階の1つまたは複数を行うシステム、装置、または器具を用いて行われる。一部の局面において、前記システムは、例えば、誤り、使用者の操作、および/または汚染を最小限にするために、これらの各段階を閉じた、または無菌の環境において行うのに用いられる。一例では、システムは、国際特許出願公開番号 WO2009/072003またはUS20110003380 A1に記載のシステムである。

【0360】

一部の態様において、システムまたは器具は、統合システム型もしくは自立型システムにおいて、および/または自動的に、もしくはプログラム可能なやり方で、単離段階、処理段階、操作段階、および製剤化段階の1つまたは複数、例えば、全てを行う。一部の局面において、システムまたは器具は、使用者が、処理段階、単離段階、操作段階、および製剤化段階の様々な局面をプログラムする、制御する、そのアウトカムを評価する、および/または調整するのを可能にする、システムまたは器具と通信するコンピュータおよび

/またはコンピュータプログラムを備える。

【0361】

一部の局面では、分離段階および/または他の段階は、例えば、閉鎖型の無菌システムにおいて臨床規模レベルで細胞を自動分離するために、CliniMACS（登録商標）システム（Miltenyi Biotec）を用いて行われる。構成要素には、内蔵型マイクロコンピュータ、磁気分離ユニット、蠕動ポンプ、および様々なピンチ弁が含まれ得る。内蔵型コンピュータは、一部の局面では、機器の全構成要素を制御し、反復手順を標準化された順序で行うようにシステムに指示する。磁気分離ユニットは、一部の局面では、可動性の永久磁石および選択カラム用のホルダを含む。蠕動ポンプは、チューブセット全体にわたる流速を制御し、ピンチ弁と一緒に、システムによる緩衝液の流れの制御と、細胞の連続的な懸濁とを確かなものにする。

10

【0362】

CliniMACS（登録商標）システムは、一部の局面では、滅菌した非発熱性の溶液に溶解して供給される、抗体に結合した磁化可能な粒子を使用する。一部の態様において、細胞は磁性粒子で標識された後に、余分な粒子を除去するために洗浄される。次いで、細胞調製バッグがチューブセットに接続され、そして次にチューブセットは緩衝液含有バックおよび細胞収集バッグに接続される。チューブセットは、プレカラムおよび分離カラムを含む予め組み立てられた滅菌チューブからなり、使い捨て専用である。分離プログラムが開始した後に、システムは分離カラムに細胞試料を自動的にアプライする。標識された細胞はカラム内に保持されるのに対して、標識されなかった細胞は一連の洗浄段階によって除去される。一部の態様において、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団は標識されず、カラム内に保持されない。一部の態様において、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団は標識され、カラム内に保持される。一部の態様において、磁場が取り除かれた後に、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団はカラムから溶出され、細胞収集バッグ内に収集される。

20

【0363】

ある特定の態様において、分離段階および/または他の段階はCliniMACS Prodigy（登録商標）システム（Miltenyi Biotec）を用いて行われる。CliniMACS Prodigy（登録商標）システムには、一部の局面では、細胞を自動洗浄し、遠心分離によって分画する細胞処理ユニット（cell processing unit）が付いている。CliniMACS Prodigy（登録商標）システムはまた、内蔵カメラと、供給源の細胞産物の巨視的な層を識別することによって最適な細胞分画エンドポイントを決定する画像認識ソフトウェアも備えている場合がある。例えば、末梢血は赤血球、白血球、および血漿の層に自動的に分離される。CliniMACS Prodigy（登録商標）システムはまた、細胞培養プロトコール、例えば、細胞分化および拡大増殖、抗原添加、ならびに長期細胞培養を行う内蔵型細胞発育チャンバーも備えている場合がある。インプットポートを用いると、培地を無菌的に取り出し、補充することができる。細胞は、内蔵型顕微鏡を用いてモニタリングすることができる。例えば、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 651-660, Tera kura et al. (2012) Blood. 1:72-82、およびWang et al. (2012) J Immunot her. 35 (9):689-701を参照されたい。

30

40

【0364】

一部の態様において、本明細書に記載の細胞集団はフローサイトメトリーを介して収集および濃縮（または枯渇）される。フローサイトメトリーでは、複数種の細胞表面マーカーについて染色された細胞は流体の流れに入って運ばれる。一部の態様において、本明細書に記載の細胞集団は、分取スケール（preparative scale）（FACS）選別を介して収集および濃縮（または枯渇）される。ある特定の態様において、本明細書に記載の細胞集団は、FACSに基づく検出系と組み合わせて微小電気機械システム（MEMS）チップを用いることによって収集および濃縮（または枯渇）される（例えば、WO2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573;および Godin et al. (2008) J Biophoton. 1 (5):355-376を参照されたい）。どちらの場合でも、細胞は複

50

数種のマーカーで標識することができ、それによって、詳細に明らかにされたT細胞サブセットを高純度で単離することが可能になる。

【0365】

一部の態様において、正の選択および/または負の選択のために分離を容易にするために、抗体または結合パートナーは1種類または複数種の検出可能なマーカーで標識される。例えば、分離は蛍光標識抗体との結合に基づいてもよい。一部の例では、1種類または複数種の細胞表面マーカーに特異的な抗体または他の結合パートナーの結合に基づく細胞の分離は、流体の流れの中で、例えば、分取スケール（FACS）および/または微小電気機械システム（MEMS）チップを備える蛍光標識細胞分取（FACS）によって、例えば、フローサイトメトリー検出系と組み合わせて行われる。このような方法を用いると、複数種のマーカーに基づいて正の選択および負の選択を同時に行うことができる。

10

【0366】

一部の態様において、調製方法は、単離、インキュベーション、および/または操作の前または後に細胞を凍結、例えば、凍結保存するための段階を含む。一部の態様において、凍結段階およびその後の解凍段階によって、細胞集団の中にある顆粒球が取り除かれ、単球がある程度まで取り除かれる。一部の態様において、例えば、血漿および血小板を取り除く洗浄段階の後に、前記細胞は凍結溶液に懸濁される。様々な任意の公知の凍結溶液およびパラメータを一部の局面で使用することができる。一例は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミン（HSA）を含有するPBS、または他の適切な細胞凍結培地を使用することを伴う。次いで、DMSOおよびHSAの最終濃度がそれぞれ10%および4%になるように、これを培地で1:1に希釈する。一部の態様において、細胞組成物は、5%、6%、7%、7.5%、8%、9%、もしくは10%ジメチルスルホキシド、または約5%、6%、7%、7.5%、8%、9%、もしくは10%ジメチルスルホキシド、あるいは前述のいずれかによって規定された範囲、例えば7.5%もしくは約7.5%のDMSOを含む製剤中で、保管される。一部の局面において、組成物は、0.5%、1%、2%、もしくは2.5%または約0.5%、1%、2%、もしくは2.5%（v/v）の25%ヒトアルブミン、あるいは、前述のいずれかによって規定された範囲、例えば1%（v/v）25%ヒトアルブミンを含む製剤中で保管される。次いで、細胞は一般的に1分につき1℃の速度で-80℃まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相の中で保管される。

20

【0367】

いくつかの態様において、単離および/または選択によって、濃縮T細胞、例えばCD3+T細胞、CD4+T細胞、および/またはCD8+T細胞の、1種または複数種のインプット組成物がもたらされる。いくつかの態様において、2種またはそれ以上の別個のインプット組成物は、単一の生物試料から単離、選択、濃縮、または取得される。いくつかの態様において、別個のインプット組成物は、同じ対象から採取、収集、および/または取得された別個の生物試料から単離、選択、濃縮、および/または取得される。

30

【0368】

一定の態様において、1種または複数種のインプット組成物は、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98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.9%、または100%もしくは約100%のCD3+T細胞を含む濃縮T細胞の組成物であるか、あるいはそれを含む。特定の態様において、濃縮T細胞のインプット組成物は、本質的にCD3+T細胞からなる。

40

【0369】

一定の態様において、1種または複数種のインプット組成物は、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98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.9%、または100%もしくは約100%のCD4+T細胞を含む濃縮CD4+T細胞の組成物であるか、あるいはそれを含む。一定の態様において、CD4+T細胞のインプット組成物は、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15

50

%未満、10%未満、5%未満、1%未満、0.1%未満、もしくは0.01%未満のCD8+T細胞を含み、かつ/またはCD8+T細胞を含有せず、かつ/またはCD8+T細胞を含まないもしくは実質的に含まない。いくつかの態様において、濃縮T細胞の組成物は、本質的にCD4+T細胞からなる。

【0370】

一定の態様において、1種または複数種の組成物は、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98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.9%、または100%もしくは約100%のCD8+T細胞であるかまたはそれを含むCD8+T細胞の組成物であるか、あるいはそれを含む。一定の態様において、CD8+T細胞の組成物は、40%未満、35%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、もしくは0.01%未満のCD4+T細胞を含有し、かつ/またはCD4+T細胞を含有せず、かつ/またはCD4+T細胞を含まないもしくは実質的に含まない。いくつかの態様において、濃縮T細胞の組成物は、本質的にCD8+T細胞からなる。

10

【0371】

2. 活性化および刺激

いくつかの態様において、細胞は、遺伝子操作の前にまたは遺伝子操作とともに、インキュベーションおよび/または培養される。インキュベーション段階は、培養、カルチベーション、刺激、活性化、および/または増殖を含むことができる。インキュベーションおよび/または操作は、培養容器、例えば、培養または細胞培養のための装置、チャンバー、ウェル、カラム、チューブ、チュービングセット、バルブ、バイアル、培養皿、バッグ、または他の容器中で実施されてよい。いくつかの態様において、組成物または細胞は、刺激条件または刺激物質の存在下でインキュベーションされる。このような条件には、集団における細胞の増殖、拡大増殖、活性化、および/もしくは生存を誘導する、抗原曝露を模倣する、ならびに/または遺伝子操作、例えば組換え抗原受容体の導入のために細胞を予備刺激するように設計されたものが含まれる。

20

【0372】

これらの条件には、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、結合相手、融合タンパク質、可溶性組換え受容体、ならびに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つまたは複数が含まれ得る。

30

【0373】

いくつかの態様において、刺激条件または刺激物質には、TCR複合体の細胞内シグナル伝達領域を刺激または活性化することができる1種または複数種の作用物質、例えばリガンドが含まれる。いくつかの局面において、作用物質は、T細胞においてTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードを作動させるかまたは開始する。このような作用物質には、抗体、例えばTCRに特異的なもの、例えば抗CD3が含まれ得る。いくつかの態様において、刺激条件には、共刺激受容体を刺激することができる1種または複数種の作用物質、例えばリガンド、例えば抗CD28が含まれる。いくつかの態様において、このような作用物質および/またはリガンドは、ビーズなどの固体支持体および/または1つもしくは複数のサイトカインに結合していてもよい。任意で、拡大増殖方法は、抗CD3抗体および/または抗CD28抗体を培地に(例えば、少なくとも約0.5 ng/mlの濃度で)添加する段階をさらに含んでもよい。いくつかの態様において、刺激物質には、IL-2、IL-15、および/またはIL-7が含まれる。いくつかの局面において、IL-2の濃度は、少なくとも約10単位/mLである。

40

【0374】

いくつかの局面において、インキュベーションは、Riddellらの米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660、Terakura et

50

al. (2012) Blood.1:72-82、および/またはWang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701に記載されているもののような技術に従って行われる。

【0375】

いくつかの態様において、(例えば、結果として生じる細胞集団が、拡大増殖させようとする初期集団中の各Tリンパ球に対して少なくとも約5、10、20、もしくは40個またはそれ以上のPBMCフィーダー細胞を含むように)非分裂末梢血単核細胞(PBMC)などのフィーダー細胞を培養開始組成物に添加し;かつ(例えば、T細胞の数を増大させるのに十分な時間)培養物をインキュベーションすることによって、T細胞を拡大増殖させる。いくつかの局面において、非分裂フィーダー細胞は、ガンマ線照射PBMCフィーダー細胞を含むことができる。いくつかの態様において、PBMCは、細胞分裂を防ぐために、約3000~3600ラドの範囲のガンマ線を照射される。いくつかの局面において、フィーダー細胞は、T細胞集団の添加の前に、培地に添加される。

10

【0376】

いくつかの態様において、刺激条件には、ヒトTリンパ球の増殖に適している温度、例えば、少なくとも約25℃、通常は少なくとも約30℃、および通常は37℃または約37℃が含まれる。任意で、インキュベーションは、非分裂EBV形質転換リンパ芽球様細胞(LCL)をフィーダー細胞として添加することをさらに含んでもよい。LCLは、約6000~10,000ラドの範囲のガンマ線で照射することができる。いくつかの局面におけるLCLフィーダー細胞は、任意の適切な量で、例えばLCLフィーダー細胞と初期Tリンパ球の比が少なくとも約10:1である量で、提供される。

20

【0377】

態様において、抗原特異的T細胞、例えば抗原特異的なCD4⁺T細胞および/またはCD8⁺T細胞は、ナイーブTリンパ球または抗原特異的Tリンパ球を抗原で刺激することによって得られる。例えば、抗原特異的なT細胞株またはクローンは、サイトメガロウイルス抗原に対して、感染した対象からT細胞を単離し、同じ抗原を用いて細胞をインビトロで刺激することにより、作製することができる。

【0378】

いくつかの態様において、1種または複数種の刺激条件または刺激物質の存在下でのインキュベーションの少なくとも一部は、例えば、国際公開公報第2016/073602号に記載されているような遠心回転下で、遠心チャンバーの内部キャビティ内で行われる。いくつかの態様において、遠心チャンバー内で行われるインキュベーションの少なくとも一部は、刺激および/または活性化を誘導するための1種または複数種の試薬と混合することを含む。いくつかの態様において、細胞、例えば選択された細胞は、遠心チャンバー内で刺激条件または刺激物質と混合される。このようなプロセスのいくつかの局面において、ある体積量の細胞が、細胞培養プレートまたは他の系において同様の刺激を与える場合に通常使用されるよりもはるかに少ない量の、1種または複数種の刺激条件または刺激物質と混合される。

30

【0379】

いくつかの態様において、刺激物質は、遠心チャンバー内で混合せずに、例えば、定期的に振盪または回転しながらチューブまたはバッグ中で選択が実施される場合に、同じ数の細胞または同じ体積の細胞の選択についてほぼ同じまたは同様の効率を実現するために典型的に使用されるかまたは必要であると思われる刺激物質の量と比較して、実質的に少ない(例えば、その量の5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、または80%以下である)量で、チャンバーのキャビティ中の細胞に添加される。いくつかの態様において、インキュベーションは、例えば10mL~200mL、例えば、少なくとも10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL、もしくは200mL、または少なくとも約10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL、150mL、もしくは200mL、または約10mL、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70

40

50

mL、80 mL、90 mL、100 mL、150 mL、もしくは200 mLである、試薬のインキュベーションに伴う目標体積を実現するために、細胞および刺激物質にインキュベーション緩衝液を添加して、実施される。いくつかの態様において、インキュベーション緩衝液および刺激物質は、細胞に添加する前に予備混合される。いくつかの態様において、インキュベーション緩衝液および刺激物質は、細胞に別々に添加される。いくつかの態様において、刺激インキュベーションは、定期的に穏やかに混合する条件下で実施され、この条件は、エネルギー的に好ましい相互作用を促進するのに役立ち、それによって、刺激物質の総使用量を少なくし、同時に細胞の刺激および活性化を実現することを可能にし得る。

【0380】

いくつかの態様において、インキュベーションは、通常、混合条件下で行われ、例えば、通常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ために使用される速度よりも低い速度で、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)で、例えば、チャンバーまたは他の容器の試料または壁に対して80g~100gまたは約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)のRCFでの回転の存在下で行われる。いくつかの態様において、回転は、このような低速度での回転とそれに続く静止期間、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10秒間の回転および/または静止、例えば、約1または2秒の回転とそれに続く約5、6、7、または8秒間の静止という時間間隔の繰り返しを用いて行われる。

【0381】

いくつかの態様において、例えば刺激物質とのインキュベーションの合計持続時間は、1時間~96時間、1時間~72時間、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~96時間、約1時間~72時間、約1時間~48時間、約4時間~36時間、約8時間~30時間、もしくは約12時間~24時間、例えば、少なくとも6時間、12時間、18時間、24時間、36時間、もしくは72時間、または少なくとも約6時間、12時間、18時間、24時間、36時間、もしくは72時間である。いくつかの態様において、さらなるインキュベーションが、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、約4時間~36時間、約8時間~30時間、もしくは約12時間~24時間(両端の値を含む)、行われる。

【0382】

特定の態様において、刺激条件には、1種もしくは複数種のサイトカインとともに、かつ/または1種もしくは複数種のサイトカインの存在下で、濃縮T細胞の組成物をインキュベーション、培養、および/またはカルチベーションすることが含まれる。特定の態様において、1種または複数種のサイトカインは、組換えサイトカインである。いくつかの態様において、1種または複数種のサイトカインは、ヒト組換えサイトカインである。一定の態様において、1種または複数種のサイトカインは、T細胞によって発現され、かつ/またはT細胞に内在する受容体に、結合し、かつ/または結合することができる。特定の態様において、1種または複数種のサイトカインは、サイトカインの4 α -ヘリックスバンドルファミリーのメンバーであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、サイトカインの4 α -ヘリックスバンドルファミリーのメンバーには、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)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0383】

いくつかの態様において、刺激は、例えば形質導入より前に、細胞の活性化および/または増殖をもたらす。

【0384】

3. 遺伝子操作のためのベクターおよび方法

いくつかの態様において、提供される方法、使用、製造品、または組成物とともに使用される操作された細胞、例えばT細胞は、組換え受容体、例えば本明細書に記載のCARを発現するように遺伝子操作された細胞である。いくつかの態様において、これらの細胞は、組換え受容体および/または他の分子をコードする核酸配列の導入、送達、または移入によって操作される。

【0385】

いくつかの態様において、操作された細胞を作製するための方法は、組換え受容体(例えば抗CD19 CAR)をコードするポリヌクレオチドを細胞、例えば刺激または活性化された細胞に導入することを含む。特定の態様において、組換えタンパク質は、説明したいずれかのような組換え受容体である。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分子の細胞への導入は、いくつかの公知のベクターのいずれかを用いて行われてよい。このようなベクターには、レンチウイルス系およびガンマレトロウイルス系、およびトランスポゾンベースの系、例えばPiggyBacまたはSleeping Beautyベースの遺伝子移入系を含む、ウイルス系および非ウイルス系が含まれる。例示的な方法には、ウイルス、例えばレトロウイルスまたはレンチウイルス、形質導入、トランスポゾン、およびエレクトロポレーションを介するものを含む、受容体をコードする核酸を移入するための方法が含まれる。いくつかの態様において、操作により、1種または複数種の操作された濃縮T細胞組成物が作製される。

【0386】

一定の態様において、1種または複数種の、刺激されたT細胞の組成物は、2種の別個の刺激された濃縮T細胞組成物であるか、またはそれらを含む。特定の態様において、濃縮T細胞の2種の別個の組成物、例えば、同じ生物試料から選択、単離、および/または濃縮された濃縮T細胞の2種の別個の組成物は、別々に操作される。一定の態様において、2種の別個の組成物には、濃縮CD4+T細胞の組成物が含まれる。特定の態様において、2種の別個の組成物には、濃縮CD8+T細胞の組成物が含まれる。いくつかの態様において、濃縮CD4+T細胞および濃縮CD8+T細胞の2種の別個の組成物は、別々に遺伝子操作される。

【0387】

いくつかの態様において、遺伝子移入は、例えば細胞を刺激物質と混合することによって、まず細胞を刺激し、続いて、活性化された細胞に形質導入し、臨床応用に十分な数まで培養によって拡大増殖させることにより、遂行される。ここで、刺激物質は、例えば、サイトカインまたは活性化マーカーの発現に基づいて測定される、応答、例えば、増殖、生存、およびまたは活性化を誘導するものである。一定の態様において、遺伝子移入は、例えば説明した方法のいずれかによって、刺激条件下で細胞をまずインキュベーションすることにより、遂行される。

【0388】

いくつかの態様において、遺伝子操作のための方法は、組成物の1つまたは複数の細胞を、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。いくつかの態様において、接触は、スピノキュレーション(例えば遠心接種)など、遠心を用いて実施することができる。このような方法には、国際公開公報第2016/073602号に記載されているもののいずれかが含まれる。例示的な遠心チャンバーには、Biosafe SAによって製造および販売されるものが含まれ、これにはSepax(登録商標)およびSepax(登録商標)2システムとともに使用するのためのものが含まれ、A-200/FおよびA-200遠心チャンバーおよびそのようなシステムで使用するための様々なキットが含まれる。例示的なチャンバー、システム、ならびに加工処理用の機器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、および米国特許出願公開US 2008/0171951、ならびに公開された国際特許出願、公開番号WO 00/38762に記載されており、各文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み入

10

20

30

40

50

れられる。このようなシステムで使用するための例示的なキットには、BioSafe SAからCS-430.1、CS-490.1、CS-600.1またはCS-900.2の製品名で販売されている単回使用キットが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0389】

いくつかの態様において、接触は、スピノキュレーション(例えば遠心接種)など、遠心を用いて実施することができる。いくつかの態様において、細胞を含む組成物、ベクター、例えば、ウイルス粒子、および試薬を、通常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ために使用される速度よりも低い速度で、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)で、回転させることができる。いくつかの態様において、この回転は、例えばチャンバーまたはキャビティの内壁または外壁に対して測定した場合に、ある力で、例えば、100g~3200gまたは約100g~3200g(例えば、100g、200g、300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g、もしくは3200g、または約100g、200g、300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g、もしくは3200g、または少なくとも100g、200g、300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g、もしくは3200g、または少なくとも約100g、200g、300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g、もしくは3200g)の相対遠心力で、行われる。通常、用語「相対遠心力」またはRCFは、回転軸と比較して空間内の特定の点における、地球の重力と比べた、ある物体または物質(例えば、細胞、試料、もしくはペレット、および/または回転されているチャンバーもしくは他の容器内の一箇所)に加えられる有効力であると理解されている。その値は、重力、回転速度、および回転半径(回転軸からの距離、およびRCFが測定されている物体、物質、または粒子)を考慮に入れて、周知の式を用いて求めることができる。

【0390】

いくつかの態様において、システムは、他の機器とともに含まれ、かつ/または他の機器と関係するように配置される。該他の機器には、該システムにおいて実施される形質導入段階および1つまたは複数の他の様々な加工処理段階、例えば、本明細書においてまたは国際公開公報第2016/073602号において説明される遠心チャンバーシステムを用いてまたはそれに関連して行うことができる1つまたは複数の加工処理段階の局面を作動、自動化、制御、および/またはモニターするための機器が含まれる。いくつかの態様において、この機器はキャビネット内に含まれる。いくつかの態様において、機器はキャビネットを含み、キャビネットは、制御回路網、遠心分離機、カバー、モーター、ポンプ、センサー、ディスプレイ、およびユーザーインターフェースを収容する筐体を含む。例示的な装置は、米国特許第6,123,655号、米国特許第6,733,433号、およびUS 2008/0171951に記載されている。

【0391】

いくつかの態様において、システムは、一連の容器、例えば、バッグ、チュービング、活栓、クランプ、コネクタ、および遠心チャンバーを含む。いくつかの態様において、バッグなどの容器は、同じ容器または別々の容器、例えば同じバッグまたは別々のバッグの中に、形質導入しようとする細胞およびウイルスベクター粒子を含む、1つまたは複数の容器、例えばバッグを含む。いくつかの態様において、システムは、チャンバーに引き込まれる希釈剤および/もしくは洗浄溶液などの媒体、ならびに/または方法の実施中に構成要素および/もしくは組成物を希釈、再懸濁、および/もしくは洗浄するための他の構成要素を含む、1つまたは複数の容器、例えばバッグをさらに含む。これらの容器は、システム内の1つまたは複数の位置、例えばインプットライン、希釈剤ライン、洗浄ライン、廃棄物ライン、および/またはアウトプットラインに対応する位置で連結することができる。

【0392】

いくつかの態様において、チャンバーは、例えばその回転軸を中心にしてチャンバーの回転をもたらすことができる遠心分離機と結合されている。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、間、および/もしくは後に、ならびに/または他の加工処理段階のうちの1つもしくは複数において、行われてよい。したがって、いくつかの態様において、様々な加工処理段階のうちの1つまたは複数は、例えば特定の力での回転下で行われる。チャンバーは、遠心分離時にチャンバーが垂直に位置し、かつ側壁と軸が垂直またはおおむね垂直であり、端壁が水平またはおおむね水平であるように、典型的には垂直またはおおむね垂直な回転が可能である。

【0393】

いくつかの態様において、遺伝子操作の少なくとも一部、例えば形質導入の間に、かつ/または遺伝子操作の後に、細胞は、遺伝子操作された細胞の培養のため、例えば細胞のカルチベーションまたは拡大増殖のためのバイオリアクターバッグアセンブリに移される。

10

【0394】

いくつかの態様において、組換え核酸は、例えば、サルウイルス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などの組換え感染性ウイルス粒子を用いて、細胞中に移入される。いくつかの態様において、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用いてT細胞中に移入される(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)。

20

【0395】

いくつかの態様において、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)、または脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)に由来するレトロウイルスベクターは、長い末端反復配列(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。いくつかの態様において、レトロウイルスには、任意の鳥類または哺乳類の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、典型的にはアンホトロピックであり、これは、ヒトを含むいくつかの種の宿主細胞に感染できることを意味する。1つの態様において、発現させようとする遺伝子で、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。いくつかの例示的なレトロウイルス系が説明されている(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. U S A* 90:8033-8037; および Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109を参照されたい)。

30

【0396】

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; Verhoeven 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。

40

【0397】

いくつかの態様において、ウイルスベクター粒子は、レトロウイルスゲノムに基づくベクターに由来する、例えばレンチウイルスゲノムに基づくベクターに由来する、ゲノムを含む。提供されるウイルスベクターのいくつかの局面において、組換え受容体、例えばCARなどの抗原受容体をコードする異種核酸は、ベクターゲノムの5'LTR配列と3'LTR配列の間に含まれ、かつ/または位置する。

【0398】

50

いくつかの態様において、ウイルスベクターゲノムは、HIV-1ゲノムまたはSIVゲノムなどのレンチウイルスゲノムである。例えば、レンチウイルスベクターは、病原性遺伝子を複数回弱毒化することによって作製されており、例えば、遺伝子env、vif、vpr、およびnefを欠失させて、治療目的のためにベクターの安全性を高めることができる。レンチウイルスベクターは公知である。Naldini et al., (1996 and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998、米国特許第6,013,516号;および同第5,994,136号を参照されたい。いくつかの態様において、これらのウイルスベクターは、プラスミドベースまたはウイルスベースであり、外来核酸の組入れのため、選択のため、および宿主細胞への核酸の移入のために必須な配列を有するように構成されている。公知のレンチウイルスは、American Type Culture Collection(「ATCC」; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209)などの寄託機関またはコレクションから容易に入手できるか、または一般に利用可能な技術を用いて公知の供給源から単離することができる。

10

【0399】

レンチウイルスベクターの非限定的な例には、ヒト免疫不全ウイルス1(HIV-1)、HIV-2、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒトTリンパ球向性ウイルス1(HTLV-1)、HTLV-2、またはウマ伝染性貧血ウイルス(E1AV)などのレンチウイルスに由来するものが含まれる。例えば、レンチウイルスベクターは、HIV病原性遺伝子を複数回弱毒化することによって作製されており、例えば、遺伝子env、vif、vpr、vpu、およびnefを欠失させて、治療目的のためにベクターの安全性を高める。レンチウイルスベクターは当技術分野において公知であり、Naldini et al., (1996 and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998、米国特許第6,013,516号;および同第5,994,136号を参照されたい。いくつかの態様において、これらのウイルスベクターは、プラスミドベースまたはウイルスベースであり、外来核酸の組入れのため、選択のため、および宿主細胞への核酸の移入のために必須な配列を有するように構成されている。公知のレンチウイルスは、American Type Culture Collection(「ATCC」; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209)などの寄託機関またはコレクションから容易に入手できるか、または一般に利用可能な技術を用いて公知の供給源から単離することができる。

20

【0400】

いくつかの態様において、ウイルスゲノムベクターは、レンチウイルスなどのレトロウイルスの5'LTRおよび3'LTRの配列を含むことができる。いくつかの局面において、ウイルスゲノム構築物は、レンチウイルスの5'LTRおよび3'LTR由来の配列を含んでよく、特に、レンチウイルスの5'LTR由来のR配列およびU5配列ならびにレンチウイルス由来の不活性3'LTRまたは自己不活性化3'LTRを含むことができる。LTR配列は、任意の種に起源を持つ任意のレンチウイルス由来のLTR配列であることができる。例えば、それらは、HIV、SIV、FIV、またはBIVに由来するLTR配列であってよい。典型的には、LTR配列はHIV LTR配列である。

30

【0401】

いくつかの態様において、HIVウイルスベクターなどのウイルスベクターの核酸は、付加的な転写単位を欠く。ベクターゲノムは、不活性3'LTRまたは自己不活性化3'LTRを含むことができる(Zufferey et al. J Virol 72:9873, 1998; Miyoshi et al., J Virol 72:8150, 1998)。例えば、ウイルスベクターRNAを産生するのに使用される核酸の3'LTRのU3領域における欠失を利用して、自己不活性化(SIN)ベクターを作製することができる。次いで、この欠失を、逆転写の進行中にプロウイルスDNAの5'LTRに移入することができる。通常、自己不活性化ベクターは、3'の長い末端反復配列(LTR)に由来するエンハンサー配列およびプロモーター配列の欠失を有し、この欠失はベクターの組込み時に5'LTRにコピーされる。いくつかの態様において、TATAボックスの除去を含む十分な配列の排除によって、LTRの転写活性を無効にすることができる。これにより、形質導入された細胞における完全長ベクターRNAの産生を防止することができる。いくつかの局面において、3'LTRのU3エレメントは、そのエンハンサー配列、TATAボック

40

50

ス、Sp1、およびNF-κB部位の欠失を含む。自己不活性化3'LTRの結果として、侵入および逆転写の後に生成されるプロウイルスは、不活性5'LTRを含む。これにより、ベクターゲノムの起動リスク、および近傍の細胞プロモーターへのLTRの影響を低減することによって安全性を高めることができる。自己不活性化3'LTRは、当技術分野において公知である任意の方法によって構築することができる。いくつかの態様において、これは、ベクター力価にもベクターのインビトロ特性およびインビボ特性にも影響を及ぼさない。

【0402】

任意で、レンチウイルス5'LTR由来のU3配列は、ウイルス構築物中のプロモーター配列、例えば異種プロモーター配列で置き換えることができる。これにより、パッケージング細胞株から回収されるウイルスの力価を高めることができる。エンハンサー配列もまた、含めることができる。パッケージング細胞株におけるウイルスRNAゲノムの発現を増加させる任意のエンハンサー/プロモーター組合せが、使用されてよい。一例では、CMVエンハンサー/プロモーター配列が使用される(米国特許第5,385,839号および米国特許第5,168,062号)。

【0403】

一定の態様において、レンチウイルスベクターゲノムなどのレトロウイルスベクターゲノムを組み込み欠陥になるように構築することによって、挿入変異のリスクを最小限に抑えることができる。非組み込みベクターゲノムを作製するために、様々なアプローチを遂行することができる。いくつかの態様において、不活性インテグラーゼを有するタンパク質をpol遺伝子がコードするように、pol遺伝子のインテグラーゼ酵素構成要素に変異を人工的に作り出すことができる。いくつかの態様において、例えば、一方もしくは両方の付着部位を変異もしくは欠失させることにより、または欠失もしくは改変によって3'LTR近位ポリプリン領域(PPT)を非機能性にするることにより、ベクターゲノム自体を改変して、組み込みを防ぐことができる。いくつかの態様において、非遺伝学的アプローチが利用可能であり、これらには、インテグラーゼの1つまたは複数の機能を阻害する薬理学的物質が含まれる。これらのアプローチは相互排他的ではなく、すなわちそれらの複数を同時に使用することができる。例えば、インテグラーゼと付着部位の両方が非機能性であることができるか、またはインテグラーゼおよびPPT部位が非機能性であることができるか、または付着部位およびPPT部位が非機能性であることができるか、またはそれらのすべてが非機能性であることができる。このような方法およびウイルスベクターゲノムは公知であり、利用可能である(Philpott and Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Engelman et al. J Virol 69:2729, 1995; Brown et al J Virol 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams et al., J Virol 77:11150, 2003; Powell and Levin J Virol 70:5288, 1996を参照されたい)。

【0404】

いくつかの態様において、ベクターは、原核生物宿主細胞などの宿主細胞における増殖のための配列を含む。いくつかの態様において、ウイルスベクターの核酸は、細菌細胞などの原核細胞における増殖のための1つまたは複数の複製起点を含む。いくつかの態様において、原核生物の複製起点を含むベクターはまた、その発現によって薬剤耐性などの検出可能または選択可能なマーカーが与えられる遺伝子を含んでもよい。

【0405】

典型的には、ウイルスベクターゲノムは、パッケージング細胞株またはプロデューサー細胞株にトランスフェクトすることができるプラスミド形態で構築される。様々な公知の方法のいずれかを用いて、ゲノムがウイルスベクターゲノムのRNAコピーを含むレトロウイルス粒子を作製することができる。いくつかの態様において、少なくとも2つの構成材料が、ウイルスに基づく遺伝子送達系の作製に関与している。1つ目は、構造タンパク質およびウイルスベクター粒子を生成するために必要な酵素を包含するパッケージングプラスミドであり、2つ目は、ウイルスベクター自体、すなわち移入される遺伝物質である。バイオセーフティ保護を、これらの構成材料の一方または両方の設計に導入することが

できる。

【0406】

いくつかの態様において、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すべてのレトロウイルスタンパク質、例えばHIV-1タンパク質を含むことができる(Naldini et al., 1998)。他の態様において、ウイルスベクターは、ビルレンスに関連するもの、例えばvpr、vif、vpu、およびnef、ならびに/またはHIVの主要なトランス活性化因子であるTatなどの付加的なウイルス遺伝子を欠いていてもよい。いくつかの態様において、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、これによって、組換えにより野生型ウイルスが再構成する可能性が低くなるかまたは無くなる。

10

【0407】

いくつかの態様において、ウイルスベクターゲノムは、該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をウイルス粒子中にパッケージングするために必要なすべての構成要素を含むパッケージング細胞株中に導入される。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、ウイルス構成要素をコードする1つまたは複数の遺伝子を含んでもよい。しかし、いくつかの局面において、標的細胞における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中で別途提供される。

【0408】

いくつかの態様において、パッケージング細胞株は、粒子を生成するために必要な構成要素を含む1つまたは複数のプラスミドベクターでトランスフェクトされる。いくつかの態様において、パッケージング細胞株は、LTR、シス作用性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むプラスミド、ならびにGag、pol、および/またはrevなどのウイルスの酵素成分および/または構成成分をコードする1つまたは複数のヘルパープラスミドでトランスフェクトされる。いくつかの態様において、レトロウイルスベクター粒子を生成する様々な遺伝子成分を別々にするために、複数のベクターを利用する。いくつかのそのような態様において、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、さもなければ複製能を有するウイルスをもたらし得る組換え事象の可能性が低くなる。いくつかの態様において、レトロウイルス構成要素のすべて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。

20

30

【0409】

いくつかの態様において、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、いくつかの態様において、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、幅広い細胞宿主範囲が提供されて、形質導入できる細胞型の範囲が広がる。いくつかの態様において、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などのゼノトロピック、ポリトロピック、またはアンホトロピックな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でトランスフェクトされる。

40

【0410】

いくつかの態様において、パッケージング細胞株は、ウイルスの調節タンパク質および構造タンパク質を含む、ウイルスゲノムRNAをレンチウイルスベクター粒子中にパッケージングするためにトランスで必要とされる構成要素を提供する。いくつかの態様において、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、かつ機能性レンチウイルスベクター粒子を産生することができる、任意の細胞株であってよい。いくつかの局面において、適切なパッケージング細胞株には、293(ATCC CCL X)、293T、HeLA(ATCC CCL 2)、D17(ATCC CCL 183)、MDCK(ATCC CCL 34)、BHK(ATCC CCL -10)、およびCf2Th(ATCC CRL 1430)細胞が含まれる。

50

【0411】

いくつかの態様において、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、いくつかの局面において、gag、pol、rev、および/または他の構造遺伝子を含むLTRおよびパッケージング構成要素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。いくつかの態様において、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/またはエンベローブ糖タンパク質をコードする核酸を含むウイルスペクターゲノムとともに、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で一過性にトランスフェクトされ得る。

【0412】

いくつかの態様において、ウイルスペクターならびに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によってパッケージング細胞株中に導入される。パッケージング細胞株は、ウイルスペクターゲノムを含むウイルスペ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。非限定的な例には、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、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が含まれる。

【0413】

組換えプラスミドならびにレトロウイルスのLTRおよびパッケージング配列が(例えばリン酸カルシウム沈殿などによって)特殊な細胞株中に導入された場合、パッケージング配列は、組換えプラスミドのRNA転写物がウイルス粒子中にパッケージングされることを可能にすることができ、該ウイルス粒子はその後、培地に分泌され得る。いくつかの態様において、次に、組換えレトロウイルスを含む培地を採取し、任意で濃縮し、遺伝子移入に使用する。例えば、いくつかの局面において、パッケージングプラスミドおよび移入ベクターをパッケージング細胞株に同時トランスフェクションした後、ウイルスペクター粒子を培地から回収し、当業者によって使用される標準的な方法によって力価測定する。

【0414】

いくつかの態様において、レンチウイルスペクターなどのレトロウイルスペクターは、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において作製することができる。いくつかの態様において、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、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でトランスフェクトされ、かつ/またはそれを含む。いくつかの態様において、パッケージング細胞株は、任意でおよび/またはさらに、revタンパク質をコードするポリヌクレオチドでトランスフェクトされ、かつ/またはそれを含む。いくつかの態様において、パッケージング細胞株は、任意でおよび/またはさらに、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でトランスフェクトされ、かつ/またはそれを含む。いくつかのこのような態様において、細胞、例えばHEK 293T細胞のトランスフェクション後約2日目に、細胞上清は組換えレンチウイルスペクターを含み、これを回収し、力価測定することができる。

【0415】

回収および/または作製されたレトロウイルスペクター粒子は、説明される方法を用いて標的細胞に形質導入するために使用することができる。標的細胞に入ると、ウイルスRNAは逆転写され、核内に運ばれ、宿主ゲノムに安定に組み込まれる。ウイルスRNAの組み込み後1日目または2日目に、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。

【0416】

いくつかの態様において、提供される方法は、複数の細胞を含む細胞組成物をウイルス粒子と接触させる、例えばインキュベーションすることによって細胞に形質導入する方法を含む。いくつかの態様において、トランスフェクトまたは形質導入される細胞は、対象から得られた初代細胞、例えば対象から濃縮および/もしくは選択された細胞であるか、またはそれを含む。

10

20

30

40

50

【0417】

いくつかの態様において、組成物中の形質導入される細胞の濃度は、 1.0×10^5 細胞/mL $\sim 1.0 \times 10^8$ 細胞/mLまたは約 1.0×10^5 細胞/mL $\sim 1.0 \times 10^8$ 細胞/mL、例えば、少なくとも 1.0×10^5 細胞/mL、 5×10^5 細胞/mL、 1×10^6 細胞/mL、 5×10^6 細胞/mL、 1×10^7 細胞/mL、 5×10^7 細胞/mL、もしくは 1×10^8 細胞/mL、または少なくとも約 1.0×10^5 細胞/mL、 5×10^5 細胞/mL、 1×10^6 細胞/mL、 5×10^6 細胞/mL、 1×10^7 細胞/mL、 5×10^7 細胞/mL、もしくは 1×10^8 細胞/mL、または約 1.0×10^5 細胞/mL、 5×10^5 細胞/mL、 1×10^6 細胞/mL、 5×10^6 細胞/mL、 1×10^7 細胞/mL、 5×10^7 細胞/mL、もしくは 1×10^8 細胞/mLである。

【0418】

いくつかの態様において、ウイルス粒子は、特定の比率の、形質導入される細胞の総数当たりのウイルスベクター粒子のコピー数またはその感染単位(IU)(IU/細胞)で、提供される。例えば、いくつかの態様において、ウイルス粒子は、接触期間中、細胞1個当たりのウイルスベクター粒子が0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、もしくは60IU、または約0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、もしくは60IU、または少なくとも0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、もしくは60IU、または少なくとも約0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、もしくは60IUで、存在する。

【0419】

いくつかの態様において、ウイルスベクター粒子の力価は、 1×10^6 IU/mL $\sim 1 \times 10^8$ IU/mLまたは約 1×10^6 IU/mL $\sim 1 \times 10^8$ IU/mL、例えば 5×10^6 IU/mL $\sim 5 \times 10^7$ IU/mLまたは約 5×10^6 IU/mL $\sim 5 \times 10^7$ IU/mL、例えば、少なくとも 6×10^6 IU/mL、 7×10^6 IU/mL、 8×10^6 IU/mL、 9×10^6 IU/mL、 1×10^7 IU/mL、 2×10^7 IU/mL、 3×10^7 IU/mL、 4×10^7 IU/mL、または 5×10^7 IU/mLである。

【0420】

いくつかの態様において、形質導入は、100未満、例えば通常60、50、40、30、20、10、5またはそれ以下より低い感染多重度(MOI)で達成することができる。

【0421】

いくつかの態様において、方法は、細胞をウイルス粒子と接触させるかまたはウイルス粒子とともにインキュベーションすることを含む。いくつかの態様において、接触の長さは、30分 ~ 72 時間、例えば、30分 ~ 48 時間、30分 ~ 24 時間、または1時間 ~ 24 時間、例えば、少なくとも30分、1時間、2時間、6時間、12時間、24時間、36時間もしくはそれ以上、または少なくとも約30分、1時間、2時間、6時間、12時間、24時間、36時間もしくはそれ以上である。

【0422】

いくつかの態様において、接触は溶液中で実施される。いくつかの態様において、細胞およびウイルス粒子は、0.5mL ~ 500 mLまたは約0.5mL ~ 500 mL、例えば、0.5mL ~ 200 mL、0.5mL ~ 100 mL、0.5mL ~ 50 mL、0.5mL ~ 10 mL、0.5mL ~ 5 mL、5mL ~ 500 mL、5mL ~ 200 mL、5mL ~ 100 mL、5mL ~ 50 mL、5mL ~ 10 mL、10mL ~ 500 mL、10mL ~ 200 mL、10mL ~ 100 mL、10mL ~ 50 mL、50mL ~ 500 mL、50mL ~ 200 mL、50mL ~ 100 mL、100mL ~ 500 mL、100mL ~ 200 mL、もしくは200mL ~ 500 mL、または約0.5mL ~ 200 mL、約0.5mL ~ 100 mL、約0.5mL ~ 50 mL、約0.5mL ~ 10 mL、約0.5mL ~ 5 mL、約5mL ~ 500 mL、約5mL ~ 200 mL、約5mL ~ 100 mL、約5mL ~ 50 mL、約5mL ~ 10 mL、約10mL ~ 500 mL、約10mL ~ 200 mL、約10mL ~ 100 mL、約10mL ~ 50 mL、約50mL ~ 500 mL、約50mL ~ 200 mL、約50mL ~ 100 mL、約100mL ~ 500 mL、約100mL ~ 200 mL、もしくは約200mL ~ 500 mLの体積中で接触させられる。

【0423】

一定の態様において、インプット細胞は、ウイルスDNAによってコードされる組換え受容体に結合するまたはそれを認識する結合分子を含む粒子で処理されるか、該粒子と

10

20

30

40

50

もにインキュベーションされるか、または該粒子と接触させられる。

【0424】

いくつかの態様において、ウイルスベクター粒子との細胞のインキュベーションは、ウイルスベクター粒子で形質導入された細胞を含むアウトプット組成物をもたらすか、または生じる。

【0425】

いくつかの態様において、組換え核酸は、エレクトロポレーションによってT細胞に移入される(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、組換え核酸は、トランスポジションを介してT細胞に移入される(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)。免疫細胞に遺伝物質を導入し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を介したトランスフェクション、タングステン粒子促進微粒子銃(Johnston, Nature, 346:776-777(1990))、およびリン酸ストロンチウムDNA共沈(Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))が含まれる。

【0426】

組換え産物をコードする核酸を移入するための他のアプローチおよびベクターは、例えば、国際特許出願公開WO2014055668および米国特許第7,446,190号に記載されているものである。

【0427】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞は、拡大増殖中または拡大増殖後のいずれかに、例えばT細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)で、トランスフェクトされてよい。所望の受容体の遺伝子を導入するためのこのトランスフェクションは、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。次いで、遺伝子改変された細胞集団を、最初の刺激(例えば、抗CD3/抗CD28刺激)から解放し、続いて、第二のタイプの刺激で、例えば、新規に導入された受容体を介して、刺激することができる。この第二のタイプの刺激には、ペプチド/MHC分子の形態での抗原性刺激、遺伝子導入された受容体の同族(架橋結合する)リガンド(例えば、CARの天然のリガンド)、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)該新たな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(例えば抗体)が含まれ得る。例えば、Cheadle 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。

【0428】

いくつかの場合において、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。いくつかのこのような事例では、細胞は、活性化の前に選択され、かつ/または形質導入されてよい。したがって、細胞は、細胞培養の前または後に、いくつかの場合においては、培養の少なくとも一部と同時にまたはその最中に、操作されてよい。

【0429】

付加的な核酸、例えば、導入のための遺伝子としては、例えば、移入された細胞の生存力および/または機能を促進することによって、療法の有効性を高めるもの;例えば、インビボでの生存または局在化を評価するために、細胞の選択および/または評価のための遺伝子マーカーを提供するための遺伝子; 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

よって記載されているように、例えば、細胞をインビボでネガティブ選択を受けやすくすることによって、安全性を高めるための遺伝子が挙げられる。ドミナントポジティブな選択マーカーをネガティブ選択マーカーと融合することによって得られる二機能性の選択可能融合遺伝子の使用を記載しているLuptonらによる公報PCT/US91/08442およびPCT/US94/05601も参照されたい。例えば、Riddellらの米国特許第6,040,177号のカラム14-17を参照されたい。

【0430】

4. 操作された細胞の培養、拡大増殖、および製剤化

いくつかの態様において、例えば、提供される方法、使用、製造品、または組成物のいずれかに従って、例えば細胞療法のための操作された細胞を作製するための方法は、細胞を培養するため、例えば、増殖および/または拡大増殖を促進する条件下で細胞を培養するための1つまたは複数の段階を含む。いくつかの態様において、細胞は、遺伝子操作する、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段階の後に、増殖および/または拡大増殖を促進する条件下で培養される。特定の態様において、細胞は、刺激条件下で該細胞をインキュベーションし、かつ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で形質導入またはトランスフェクトした後に、培養される。したがって、いくつかの態様において、CARをコードする組換えポリヌクレオチドによる形質導入またはトランスフェクションによって操作されたCAR陽性T細胞の組成物は、増殖および/または拡大増殖を促進する条件下で培養される。

【0431】

一定の態様において、操作されたT細胞の1種または複数種の組成物は、濃縮T細胞の2種の別個の組成物、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を用いて操作された濃縮T細胞の2種の別個の組成物であるか、またはそれらを含む。特定の態様において、濃縮T細胞の2種の別個の組成物、例えば、同じ生物試料から選択、単離、および/または濃縮された濃縮T細胞の2種の別個の組成物は、遺伝子操作する、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段階の後などに、刺激条件下で別々に培養される。一定の態様において、2種の別個の組成物には、濃縮CD4+T細胞の組成物、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を用いて操作された濃縮CD4+T細胞の組成物が含まれる。特定の態様において、2種の別個の組成物には、濃縮CD8+T細胞の組成物、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を用いて操作された濃縮CD8+T細胞の組成物が含まれる。いくつかの態様において、濃縮CD4+T細胞および濃縮CD8+T細胞の2種の別個の組成物、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を用いてそれぞれが別々に操作された、濃縮CD4+T細胞の組成物および濃縮CD8+T細胞の組成物は、例えば、増殖および/または拡大増殖を促進する条件下で、別々に培養される。

【0432】

いくつかの態様において、培養は、増殖および/または拡大増殖を促進する条件下で行われる。いくつかの態様において、このような条件は、集団における細胞の増殖、拡大増殖、活性化、および/または生存を誘導するように設計されてよい。特定の態様において、刺激条件には、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、結合相手、融合タンパク質、可溶性組換え受容体、ならびに細胞の増殖、分割、および/または拡大増殖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つまたは複数が含まれ得る。

【0433】

特定の態様において、細胞は、1種または複数種のサイトカインの存在下で培養される。特定の態様において、1種または複数種のサイトカインは、組換えサイトカインである。いくつかの態様において、1種または複数種のサイトカインは、ヒト組換えサイトカインである。一定の態様において、1種または複数種のサイトカインは、T細胞によって発

現され、かつ/またはT細胞に内在する受容体に、結合し、かつ/または結合することができる。特定の態様において、1種または複数種のサイトカイン、例えば組換えサイトカインは、サイトカインの4 α -ヘリックスバンドルファミリーのメンバーであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、サイトカインの4 α -ヘリックスバンドルファミリーのメンバーには、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、1種または複数種の組換えサイトカインには、IL-2、IL-7、および/またはIL-15が含まれる。いくつかの態様において、細胞、例えば操作された細胞は、濃度1IU/mL~2,000IU/mL、10IU/mL~100IU/mL、50IU/mL~200IU/mL、100IU/mL~500IU/mL、100IU/mL~1,000IU/mL、500IU/mL~2,000IU/mL、または100IU/mL~1,500IU/mL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培養される。

10

【0434】

いくつかの態様において、培養は、ヒトTリンパ球などの一次免疫細胞の増殖に適した温度、例えば少なくとも約25℃、一般に少なくとも約30℃、および一般に37℃または約37℃を含むのが通常である条件下で培養される。いくつかの態様において、濃縮T細胞の組成物は、25~38℃、例えば30~37℃、例えば37℃ $\pm$ 2℃または約37℃ $\pm$ 2℃の温度でインキュベーションされる。いくつかの態様において、インキュベーションは、培養、例えばカルチベーションまたは拡大増殖によって所望または閾値の細胞密度、細胞数、または細胞用量がもたらされるまでの期間、行われる。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日間、6日間、7日間、8日間、9日間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日間、6日間、7日間、8日間、9日間もしくはそれ以上より長い、あるいは約24時間、48時間、72時間、96時間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間またはそれ以上の間である。

20

【0435】

特定の態様において、培養は閉鎖系で実施される。特定の態様において、培養は、無菌条件下の閉鎖系で実施される。特定の態様において、培養は、提供される系の1つまたは複数の段階と同じ閉鎖系で実施される。いくつかの態様において、濃縮T細胞の組成物は、閉鎖系から取り出され、培養のためにバイオリアクターに配置および/または連結される。培養用の適切なバイオリアクターの例には、GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius BioSTAT RM 20/50、Finesse SmartRocker Bioreactor Systems、およびPall XRS Bioreactor Systems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、バイオリアクターは、培養段階の少なくとも一部の間に細胞を灌流し、かつ/または混合するために使用される。

30

【0436】

いくつかの態様において、混合は、揺り動かすことおよび/もしくは動かすことであるか、またはそれを含む。いくつかの場合において、バイオリアクターは、動かすか、または揺り動かすことができ、これにより、いくつかの局面では、酸素移動容量を増やすことができる。バイオリアクターを動かすことには、水平軸に沿って回転させること、垂直軸に沿って回転させること、バイオリアクターの傾いたもしくは傾斜した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得るが、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は、揺り動かしながら行われる。揺動速度および揺動角度は、所望の攪拌を実現するように調整され得る。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°、または1°である。一定の態様において、揺動角度は6~16°である。他の態様において、揺動角度は7~16°である。他の態様において、揺動角度は8~12°である。いくつかの態様

40

50

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、4～12rpm、例えば4～6rpm(両端の値を含む)である。

【0437】

いくつかの態様において、バイオリアクターは、0.01L/分、0.05L/分、0.1L/分、0.2L/分、0.3L/分、0.4L/分、0.5L/分、1.0L/分、1.5L/分、もしくは2.0L/分、または約0.01L/分、0.05L/分、0.1L/分、0.2L/分、0.3L/分、0.4L/分、0.5L/分、1.0L/分、1.5L/分、もしくは2.0L/分、または少なくとも0.01L/分、0.05L/分、0.1L/分、0.2L/分、0.3L/分、0.4L/分、0.5L/分、1.0L/分、1.5L/分、もしくは2.0L/分、あるいは2.0L/分超の定常空気流で、37℃または37℃に近い温度および5%または5%に近いCO₂レベルを維持する。一定の態様において、培養の少なくとも一部は、例えば培養の開始に関するタイミングおよび/または培養細胞の密度に応じて、例えば、290ml/日、580ml/日、および/または1160ml/日の速度で灌流しながら実施される。いくつかの態様において、細胞培養による拡大増殖の少なくとも一部は、例えば5°～10°、例えば6°の角度にて、一定の揺動速度、例えば5～15RPM、例えば6RMPまたは10RPMの速度で揺動運動しながら実施される。

【0438】

いくつかの態様において、提供される方法、使用、または製造品に従って細胞療法薬および/または操作された細胞を製造、生成、または作製するための方法は、インキュベーション、操作、および培養、ならびに/または記載される1つもしくは複数の他の加工処理段階の前または後に、細胞の製剤化、例えば該加工処理段階によって生じる遺伝子操作された細胞の製剤化を含んでよい。いくつかの態様において、細胞の製剤化を含む加工処理段階のうちの1つもしくは複数のは、閉鎖系で行うことができる。いくつかの場合において、細胞は、細胞療法薬を製造、生成、または作製するための(例えば、遠心チャンバーおよび/または閉鎖系で行われる)1つまたは複数の段階で加工処理され、かつ/あるいは操作された細胞は、カルチベーションおよび拡大などの培養ならびに/または記載される1つもしくは複数の他の加工処理段階の前または後に、細胞の製剤化、例えば、形質導入処理段階によって生じる遺伝子操作された細胞の製剤化を含んでよい。いくつかの場合において、遺伝子操作された細胞は、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む、単位用量形態の組成物として製剤化される。

【0439】

いくつかの態様において、組換え抗原受容体、例えばCARまたはTCRによって操作された細胞を含む細胞の用量は、組成物または製剤、例えば薬学的組成物または薬学的製剤として提供される。このような組成物は、提供される方法に従って、例えば、疾患、病態、および障害の処置において、または検出、診断、および予後判定の方法ならびに使用および製造品において使用することができる。いくつかの場合において、細胞は、投与量投与のため、例えば、単一の単位投与量の投与または複数投与量の投与のための量で、製剤化され得る。

【0440】

いくつかの態様において、細胞は、バッグまたはバイアルなどの容器に入れられた製剤にすることができる。いくつかの態様において、バイアルは注入バイアルであってよい。いくつかの場合において、バイアルは、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むなど、操作された細胞の単一の単位用量を有する製剤にされる。

【0441】

いくつかの態様において、細胞は、薬学的に許容される緩衝液中で製剤化され、該緩衝液は、いくつかの局面において、薬学的に許容される担体または賦形剤を含み得る。いくつかの態様において、加工処理は、薬学的に許容されるかまたは対象への投与にとって望ましい媒体または製剤緩衝液に媒体を交換することを含む。いくつかの態様において、加工処理段階は、形質導入および/または拡大増殖された細胞を洗浄して、1種または複数

10

20

30

40

50

種の任意の薬学的に許容される担体または賦形剤を含み得る薬学的に許容される緩衝液において細胞を置き換えることを含むことができる。薬学的に許容される担体または賦形剤を含むこ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後述する任意のものであることができる。いくつかの態様における薬学的組成物は、治療的有効量または予防的有効量などの、疾患または病態を処置または予防するために有効な量の細胞を含む。

【0442】

いくつかの態様において、製剤緩衝液は、凍結保存剤を含む。いくつかの態様において、細胞は、1.0%~30%のDMSO溶液、例えば5%~20%のDMSO溶液または5%~10%のDMSO溶液を含む凍結保存溶液を用いて製剤化される。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)を含むPBS、もしくは他の適切な細胞凍結媒体であるか、またはそれを含む。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7.5%もしくは約7.5%のDMSOであるか、またはそれを含む。いくつかの態様において、加工処理段階は、形質導入および/または拡大増殖された細胞を洗浄して、凍結保存溶液において細胞を置き換えることを含むことができる。いくつかの態様において、細胞は、最終濃度が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、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、または1%~15%、6%~12%、5%~10%、もしくは6%~8%DMSOである媒体および/または溶液中で凍結、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、最終濃度が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%~0.5%、0.25%~4%、0.5%~2%、または1%~2%HSAである媒体および/または溶液中で凍結、例えば、凍結保護または凍結保存される。

【0443】

いくつかの態様において、製剤化は、培養または拡大増殖された細胞などの細胞の洗浄、希釈、または濃縮を含む1つまたは複数の加工処理段階を用いて行われる。いくつかの場合において、加工処理は、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む単位用量形態の組成物など、所望の濃度または数に細胞を希釈または濃縮することを含み得る。いくつかの態様において、加工処理段階は、体積を減らし、それによって所望に応じて細胞濃度を上昇させることを含み得る。いくつかの態様において、加工処理段階は、体積を増やし、それによって所望に応じて細胞濃度を低下させることを含み得る。いくつかの態様において、加工処理は、ある体積量の製剤緩衝液を形質導入および/または拡大増殖された細胞に添加することを含む。いくつかの態様において、製剤緩衝液の体積は、10mL~100mLまたは約10mL~100mL、例えば、少なくとも50mL、100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、もしくは1000mL、または少なくとも約50mL、100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、もしくは1000mL、または約50mL、100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、もしくは1000mL、または50mL、100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL、もしくは1000mLである。

【0444】

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このような加工処理段階は、閉鎖系で行われる。このような加工処理段階の例は、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ともに遠心チャンバーを用いて、例えば、Sepax(登録商標)またはSepax 2(登録商標)細胞処理システムを用いて使用するのためのものを含む、Biosafe SAによって製造および販売されている遠心チャンバーを用いて、実施され得

る。例示的なシステムおよびプロセスは、国際公開公報第2016/073602号に記載されている。いくつかの態様において、方法は、遠心チャンバーの内部キャビティからの製剤化された組成物の圧出を行うことを含み、該製剤化された組成物は、説明した上記の態様のいずれかにおいて、薬学的に許容される緩衝液などの製剤緩衝液中で製剤化された結果として得られる細胞組成物である。いくつかの態様において、製剤化された組成物の圧出は、閉鎖系の一部として遠心チャンバーと機能的に連結された容器、例えば、本明細書に記載の生物医用材料容器のバイアルに向けて行われる。いくつかの態様において、生物医用材料容器は、1つもしくは複数の加工処理段階を行う閉鎖系もしくは装置への組込みおよび/もしくは機能的な接続用に構成されており、かつ/または該閉鎖系もしくは装置に組み込まれるかもしくは機能的に接続されている。いくつかの態様において、生物医用材料容器は、アウトプットラインまたはアウトプット位置においてシステムに接続されている。いくつかの場合において、閉鎖系は、入口管の位置で生物医用材料容器のバイアルに接続されている。本明細書に記載の生物医用材料容器とともに使用するための例示的な閉鎖系には、Sepax(登録商標)システムおよびSepax(登録商標)2システムが含まれる。

10

20

30

40

50

【0445】

いくつかの態様において、遠心チャンバーまたは細胞処理システムに結合されたもののなどの閉鎖系は、製剤化された組成物の圧出のために1つまたは複数の容器を接続できるポートを有するチューブラインの各端部に結合された多方向チューブマニホールドを含む、マルチポートアウトプットキットを含む。いくつかの局面において、所望の数または複数のバイアルを、マルチポートアウトプットのポートのうちの1つまたは複数、通常2つまたはそれ以上、例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8またはそれ以上に無菌的に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、例えば生物医用材料容器をそれらのポートに、または全部よりは少ない数の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、系は、生物医用材料容器の複数のバイアル中へのアウトプット組成物の圧出を行うことができる。

【0446】

いくつかの局面において、細胞は、複数のアウトプット容器のうちの1つまたは複数、例えばバイアルに、投与量投与のため、例えば、単一の単位投与量の投与または複数投与量の投与のための量で、圧出され得る。例えば、いくつかの態様において、バイアルはそれぞれ、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んでよい。したがって、各バイアルは、いくつかの局面において、投与のための単一の単位用量を含み得るか、または複数のバイアルのうちの1つより多く、例えばバイアルのうちの2つまたはバイアルのうちの3つが合わさって投与用量を構成するように、所望の用量の分割量を含んでもよい。いくつかの態様において、4つのバイアルが合わさって、投与用量を構成する。

【0447】

したがって、容器、例えばバッグまたはバイアルは、通常、投与細胞、例えばその1つまたは複数の単位用量を含む。単位用量は、対象に投与される細胞の量もしくは数、または投与される細胞の数の2倍(もしくはそれより多く)であってよい。単位用量は、対象に投与される細胞についての最低用量または可能な限り低用量であってよい。いくつかの局面において、提供される製造品は、複数のアウトプット容器のうちの1つまたは複数を含む。

【0448】

いくつかの態様において、バッグまたはバイアルなどの容器のそれぞれは、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、同じまたはおおよそまた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、 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 個、もしくは 1×10^8 、または約 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、もしくは 1×10^8 個、または少なくとも 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、もしくは 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、各単位用量は、 $1 \times$

10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 個、もしくは 1×10^8 個、または約 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、もしくは 1×10^8 個、または少なくとも 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、もしくは 1×10^8 個、または少なくとも約 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、もしくは 1×10^8 個の、CD3+、例えばCD4+もしくはCD8+であるCAR+T細胞、または生存能力があるそのサブセットを含む。

【0449】

いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、10mLまたは約10mLから、100mLまたは約100mL、例えば、20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、もしくは100mL、または約20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、もしくは100mL、または少なくとも20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、もしくは100mL、または少なくとも約20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、もしくは100mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、1mLまたは約1mLから、10mLまたは約10mL、例えば、1mLまたは約1mLから、5mLまたは約5mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、4mLまたは約4mLから、5mLまたは約5mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、4.4mLであるか、または約4.4mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、4.5mLであるか、または約4.5mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、4.6mLであるか、または約4.6mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、4.7mLであるか、または約4.7mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、4.8mLであるか、または約4.8mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、4.9mLであるか、または約4.9mLである。いくつかの態様において、各容器、例えばバッグまたはバイアル中の製剤化された細胞組成物の体積は、5.0mLであるか、または約5.0mLである。

【0450】

いくつかの態様において、製剤化された細胞組成物の濃度は、 0.5×10^6 個/mL超もしくは約 0.5×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 1.0×10^6 個/mL超もしくは約 1.0×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 1.5×10^6 個/mL超もしくは約 1.5×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 2.0×10^6 個/mL超もしくは約 2.0×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 2.5×10^6 個/mL超もしくは約 2.5×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 2.6×10^6 個/mL超もしくは約 2.6×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 2.7×10^6 個/mL超もしくは約 2.7×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 2.8×10^6 個/mL超もしくは約 2.8×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 2.9×10^6 個/mL超もしくは約 2.9×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 3.0×10^6 個/mL超もしくは約 3.0×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 3.5×10^6 個/mL超もしくは約 3.5×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 4.0×10^6 個/mL超もしくは約 4.0×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR+)/CD3+細胞もしくはそのような生存細胞、 4.5×10^6 個/mL超もしくは約 4.5×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例

例えばCAR⁺)/CD3⁺細胞もしくはそのような生存細胞、または 5×10^6 個/mL超もしくは約 5×10^6 個/mL超の組換え受容体発現(例えばCAR⁺)/CD3⁺細胞もしくはそのような生存細胞、である。いくつかの態様において、CD3⁺細胞は、CD4⁺T細胞である。いくつかの態様において、CD3⁺細胞は、CD8⁺T細胞である。いくつかの態様において、CD3⁺T細胞は、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞である。

【0451】

いくつかの態様において、バッグまたはバイアルなどの容器中の細胞は、凍結保存することができる。いくつかの態様において、バイアルなどの容器は、後で使用するまで液体窒素中で保存することができる。

【0452】

いくつかの態様において、方法によって作製されるそのような細胞、またはそのような細胞を含む組成物は、例えば、本明細書において説明する方法、使用、および製造品に合せて、疾患または病態を処置するために対象に投与される。

【0453】

III. 組成物および製剤

いくつかの態様において、組換え抗原受容体、例えばCARまたはTCRによって操作された細胞を含む細胞の用量は、組成物または製剤、例えば薬学的組成物または薬学的製剤として提供される。例示的な組成物および製剤が上述され、前記細胞を操作する方法と関連して産生されたものである。このような組成物は、提供される方法もしくは使用に従って、かつ/または提供される製造品もしくは組成物とともに、疾患、病態、および障害の予防もしくは処置において、または検出、診断、および予後判定の方法において使用することができる。

【0454】

用語「薬学的製剤」は、「薬学的製剤」に含まれる活性成分の生物学的活性が有効になるような形をとり、製剤が投与される対象に対して容認できないほどの毒性がある、さらなる成分を含有しない調製物を指す。

【0455】

「薬学的に許容される担体」とは、対象に無毒な、活性成分以外の、薬学的製剤中にある成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これに限定されない。

【0456】

一部の局面では、担体の選択は、一つには、特定の細胞もしくは薬剤によって、および/または投与方法によって決定される。従って、様々な適切な製剤がある。例えば、薬学的組成物は防腐剤を含有してもよい。適切な防腐剤には、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含まれ得る。一部の局面では、2種類以上の防腐剤の混合物が用いられる。防腐剤またはその混合物は典型的には全組成物の重量に対して約0.0001%~約2%の量で存在する。担体は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されている。薬学的に許容される担体は、一般的に、使用される投与量および濃度でレシピエントに無毒であり、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸;アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化物質;防腐剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム;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、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール;アルキルパラベン、例えば、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン;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);低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン;アミノ酸、例えば、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;グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖、二糖、および他の糖質;キレート剤、例えば、EDTA;糖、例えば、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;塩を形成

10

20

30

40

50

する対イオン、例えば、ナトリウム;金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体);ならびに/または非イオン界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)を含むが、これに限定されない。

【0457】

一部の局面では、緩衝剤が前記組成物に含まれる。適切な緩衝剤には、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、ならびに様々な他の酸および塩が含まれる。一部の局面では、2種類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重量に対して約0.001%~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、さらに詳細に説明されている。

10

【0458】

前記製剤または組成物はまた、前記細胞または薬剤で予防または処置されている特定の適応症、疾患、または状態に有用な複数種の活性成分も含有してよく、この場合、それぞれの活性は互いに悪影響を及ぼさない。このような活性成分は、所期の目的に有効な量で組み合わせられて適切に存在する。従って、一部の態様では、薬学的組成物は、他の薬学的に活性な薬剤または薬物、例えば、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、メトトレキセート、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をさらに含む。一部の態様では、薬剤または細胞は、塩、例えば、薬学的に許容される塩の形で投与される。適切な薬学的に許容される酸添加塩には、鉱酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸、および硫酸に由来する塩、ならびに有機酸、例えば、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、およびアリアルスルホン酸、例えば、p-トルエンスルホン酸に由来する塩が含まれる。

20

【0459】

薬学的組成物は、一部の態様では、薬剤または細胞を、前記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、治療の有効量または予防の有効量で含む。治療有効性または予防有効性は、一部の態様では、処置される対象を定期的に評価することによってモニタリングされる。状態に応じて数日またはそれより長期間にわたって反復投与するために、疾患症状の望ましい抑止が起こるまで処置は繰り返される。しかしながら、他のレジメンが有用な場合があり、確かめることができる。望ましい投与量は組成物の単回ボーラス投与によって送達されてもよく、組成物の複数回ボーラス投与によって送達されてもよく、組成物の連続注入投与によって送達されてもよい。

30

【0460】

前記の薬剤または細胞は、任意の適切な手段によって、例えば、ボーラス注入によって、注射、例えば、静脈内注射または皮下注射、眼内注射、眼周囲注射、網膜下注射、硝子体内注射、経中隔注射、強膜下注射、脈絡膜内注射、前房内注射、結膜下(subconjunctival)注射、結膜下(subconjunctival)注射、テノン嚢下注射、眼球後注射、眼球周囲注射、または後強膜近傍送達によって投与することができる。一部の態様では、前記の薬剤または細胞は、非経口投与、肺内投与、および鼻腔内投与によって、所望であれば、局所処置の場合、病巣内投与によって投与される。非経口注入には、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または皮下投与が含まれる。一部の態様では、ある特定の用量が前記の細胞または薬剤の単回ボーラス投与によって投与される。一部の態様では、ある特定の用量が、前記細胞または薬剤の複数回ボーラス投与によって、例えば、3日以下の期間にわたって投与されるか、または前記細胞または薬剤の連続注入投与によって投与される。

40

【0461】

疾患の予防または処置のために、適切な投与量は、治療される疾患のタイプ、薬剤のタイプ、細胞または組換え受容体のタイプ、疾患の重症度および経過、薬剤または細胞が予

50

防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の療法、対象の病歴、ならびに薬剤または細胞に対応する応答、ならびに主治医の判断に左右されることがある。前記組成物は、一部の態様では、一度に、または一連の処置にわたって対象に適切に投与される。

【0462】

前記の細胞または薬剤は、標準的な投与技法、製剤、および/または装置を用いて投与され得る。前記組成物を保管および投与するための製剤および装置、例えば、注射器およびバイアルが提供される。細胞について、投与は自家投与でもよく、または異種投与でもよい。例えば、ある対象から免疫応答性細胞または前駆細胞を入手し、同じ対象または異なる適合性対象に投与することができる。末梢血に由来する免疫応答性細胞またはその子孫(例えば、インビボ、エクスビボ、またはインビトロで得られる)を、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することができる。治療用組成物(例えば、遺伝子組換えされた免疫応答性細胞、または神経毒性の症状を処置するか、もしくは回復させる薬剤を含有する薬学的組成物)が投与される時に、一般的に、注射用単位剤形(溶液、懸濁液、エマルジョン)の形で製剤化される。

10

【0463】

製剤には、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、頬投与、舌下投与、または坐剤投与のための製剤が含まれる。一部の態様では、前記の薬剤または細胞集団は非経口投与される。本明細書で使用する用語「非経口」は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、腔投与、および腹腔内投与を含む。一部の態様では、前記の薬剤または細胞集団は、静脈内注射、腹腔内注射、または皮下注射による末梢全身送達を用いて対象に投与される。

20

【0464】

組成物は、一部の態様では、滅菌した液体調製物、例えば、等張性水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液として提供されるか、または粘性のある組成物として提供され、これらは、一部の局面では、選択されたpHまで緩衝化されてもよい。液体調製物は、通常、ゲル、他の粘性のある組成物、および固体組成物より調製しやすい。さらに、液体組成物の方が、投与するのに、特に、注射によって投与するのに若干便利である。他方で、粘性のある組成物は、特定の組織との長い接触期間をもたらすように適切な粘性の範囲内で製剤化することができる。液体組成物または粘性のある組成物は、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)、およびその適切な混合物を含有する、溶媒または分散媒でもよい担体を含んでもよい。

30

【0465】

滅菌注射液は、前記の薬剤または細胞を溶媒の中に取り入れて、例えば、適切な担体、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混合して調製することができる。

【0466】

インビボ投与のために使用しようとする製剤は一般的に無菌である。無菌性は、容易に、例えば、滅菌濾過膜で濾過することによって成し遂げられ得る。

【0467】

一部の態様では、投与されるある用量の細胞は、凍結保存された組成物の状態である。一部の局面では、組成物は、凍結保存された組成物を解凍した後に投与される。一部の態様では、組成物は、解凍後30分、45分、60分、90分、120分、150分もしくは180分以内、または約30分、45分、60分、90分、120分、150分もしくは180分以内に投与される。一部の態様では、組成物は、解凍後120分以内または約120分以内に投与される。

40

【0468】

一部の態様では、ある用量の細胞はシリンジで投与される。一部の態様では、シリンジは、0.5、1、2、2.5、3、4、5、7.5、10、20もしくは25 mLもしくは約0.5、1、2、2.5、3、4、5、7.5、10、20もしくは25 mL、または前述のいずれかによって規

50

定される範囲の体積を有する。

【0469】

組換え受容体を発現する操作された細胞またはその組成物、および、任意で、提供される方法による使用のための説明書、例えば、投与のための説明書を含有する、製造物品およびキットも提供される。一部の態様では、説明書は、提供される方法のいずれかによる療法のための対象の選択または特定のための判断基準を特定する。

【0470】

いくつかの態様において、治療上有効な量の本明細書に記載される操作された細胞のいずれかを含む組成物、および疾患または病態を処置するために対象に投与するための説明書を備える、製造物品および/またはキットが提供される。いくつかの態様において、説明書は、本明細書において提供される方法の要素のいくつかまたは全部を指定し得る。いくつかの態様において、説明書は、細胞療法用の細胞を投与するための具体的な指示、例えば、用量、タイミング、投与する対象および投与のための病態の選択および/または特定を指定する。いくつかの態様において、製造物品および/またはキットは、治療（例えばリンパ球除去療法および/または併用療法）用の1つまたは複数の追加の作用物質、例えば本明細書に記載されるいずれかのものをさらに備え、治療用の該追加の作用物質を投与するための説明書を任意でさらに備える。いくつかの態様において、製造物品および/またはキットは、リンパ球除去療法用の作用物質をさらに備え、リンパ球除去療法を投与するための説明書を任意でさらに備える。いくつかの態様において、説明書は、投与用組成物に付随するラベル表示または添付文書として備え得る。

【0471】

IV. 定義

別段の定義のない限り、本明細書において用いられる全ての専門用語、表記、ならびに他の技術および科学用語または術語は、特許請求の範囲に記載の対象が属する技術分野における当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有することを意図する。一部の場
合では、通常理解される意味を有する用語が、本明細書において、明確化および/または即時参照のために定義され、本明細書でのそのような定義の包含は必ずしも、当技術分野において一般に理解されるものとの実質的な相違を意味すると解釈されるべきではない。

【0472】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために同義に用いられ、最小の長さに限定されない。提供される受容体を含むポリペプチドと、他のポリペプチド、例えば、リンカーまたはペプチドは、天然アミノ酸残基および/または非天然アミノ酸残基を含むアミノ酸残基を含んでもよい。これらの用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、およびリン酸化も含む。一部の局面では、ポリペプチドは、タンパク質が望ましい活性を維持する限り、自然または天然の配列に対して修飾を含有してもよい。これらの修飾は、部位特異的変異誘発を介した修飾のように意図的なものでもよく、タンパク質を産生する宿主の変異またはPCR増幅によるエラーを介した修飾のように偶発的なものでもよい。

【0473】

本明細書で使用する、「対象」とは、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。一部の態様では、前記の薬剤、細胞、細胞集団、または組成物が投与される対象、例えば、患者は哺乳動物、典型的には霊長類、例えば、ヒトである。一部の態様では、霊長類はサルまたは類人猿である。対象は男性または女性でもよく、乳児、年少者、青年、成人、および老人の対象を含む任意の適切な年齢でよい。一部の態様では、対象は非霊長類哺乳動物、例えば、げっ歯類である。

【0474】

本明細書で使用する「処置(treatment)」(およびその文法上の語尾変化、例えば、「処置する(treat)」または「処置する(treating)」)とは、疾患もしくは状態もしくは障害、あるいはこれらに関連する症状、副作用もしくはアウトカム、または表現型の完全または部分的な回復または低減を指す。処置の望ましい効果には、疾患の発生または再発の

阻止、症状の緩和、疾患のあらゆる直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の阻止、疾患進行速度の減少、疾患状態の回復または軽減、および寛解または予後の改善が含まれるが、これに限定されない。これらの用語は、疾患の完治、あるいはあらゆる症状、または全ての症状もしくはアウトカムに及ぼす影響の完全な除去を意味しない。

【0475】

本明細書で使用する「疾患の発症を遅らせる」とは、疾患(例えば、がん)の発症を延ばす、邪魔する、遅くする、減速する、安定化する、抑制する、および/または延期することを意味する。この遅れは、病歴および/または処置されている個体に応じて様々な長さの時間になることがある。一部の態様では、十分な、または大きな遅れは、実際には、個体が疾患を発症しない点では予防を含む。例えば、転移の発症などの末期がんを遅らせることができる。

10

【0476】

本明細書で使用する「予防する」は、疾患の素因がある可能性があるが、まだ疾患と診断されていない対象において、疾患の発生または再発に関する予防を提供することを含む。一部の態様では、提供される細胞および組成物は、疾患の発症を遅らせるのに、または疾患の進行を遅くするのに用いられる。

【0477】

本明細書で使用する、機能または活性を「抑制する」ということは、関心対象の条件もしくはパラメータ以外は同じ条件と比較した時に、または別の条件と比較した時に機能または活性を低減することである。例えば、腫瘍成長を抑制する細胞は、前記細胞の非存在下での腫瘍成長の速度と比較して腫瘍成長の速度を低減する。

20

【0478】

投与の文脈において、薬剤、例えば、薬学的製剤、細胞、または組成物の「有効量」とは、望ましい結果、例えば、治療結果または予防結果を成し遂げるのに、必要な投与量/量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。

【0479】

薬剤、例えば、薬学的製剤または細胞の「治療的有效量」とは、望ましい治療結果、例えば、疾患、状態、もしくは障害を処置するための望ましい治療結果、および/または処置の薬物動態学的効果もしくは薬力学的効果を成し遂げるのに、必要な投与量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。治療的有效量は、対象の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに投与される細胞集団などの要因に応じて変化する場合がある。一部の態様では、提供される方法は、有効量、例えば、治療的有效量の前記細胞および/または組成物を投与する段階を伴う。

30

【0480】

「予防的有效量」とは、望ましい予防結果を成し遂げるのに、必要な投与量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。典型的には、疾患の前に、または疾患の初期段階に対象において予防用量が用いられるので予防的有效量は治療的有效量より少ないが、必ず治療的有效量より少ないとは限らない。少ない腫瘍負荷量の状況では、予防的有效量は一部の局面では治療的有效量より多い。

【0481】

40

本明細書で使用する用語「約」は、この技術分野の当業者に容易に分かる、それぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」のついた値またはパラメータについての言及は、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(およびその態様について説明している)。

【0482】

本明細書で使用する単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に文脈によってはっきり示されていない限り複数の指示物を含む。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。

【0483】

50

本開示全体を通じて、クレームされた対象の様々な局面が範囲の形で示される。範囲の形での説明は単なる便宜および簡略のためであり、クレームされた対象の範囲に対する融通の利かない限定として解釈してはならないと理解されるはずである。従って、範囲の説明は、可能性のある全ての部分範囲ならびにその範囲内にある個々の数値を具体的に開示したとみなされるはずである。例えば、値の範囲が示された場合、その範囲の上限と下限との間の、間にあるそれぞれの値と、その述べられた範囲内にある他の任意の述べられた値または間にある値が、クレームされた対象に包含されると理解される。これらのさらに小さな範囲の上限および下限は、独立して、その小さな範囲に含まれてもよく、その述べられた範囲内にある、明確に除外されるあらゆる限界を条件としてクレームされた対象に包含される。述べられた範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界のいずれかまたは両方を除外する範囲もまた、クレームされた対象に含まれる。このことは範囲の幅に関係なく適用される。

10

【0484】

本明細書で使用する組成物とは、細胞を含む、2種類以上の産物、物質、または化合物の任意の混合物を指す。組成物は、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性、またはその任意の組み合わせでもよい。

【0485】

本明細書で使用する「濃縮する」とは、1つまたは複数の特定の細胞タイプまたは細胞集団について言及している時には、細胞タイプまたは集団の数またはパーセントを、例えば、組成物中にある、もしくは組成物の体積中にある細胞の総数と比較して、または他の細胞タイプと比べて増やすこと、例えば、前記集団もしくは細胞によって発現されたマーカーに基づく正の選択によって、または枯渇させようとする、前記細胞集団または細胞に存在しないマーカーに基づく負の選択によって増やすことを指す。この用語は、組成物から他の細胞、細胞タイプ、または集団を完全に除去することを必要とせず、このように濃縮された細胞が、濃縮された組成物中に100%もしくは100%近くで存在することを必要としない。

20

【0486】

本明細書で使用する、細胞または細胞集団が特定のマーカーについて「陽性」とであるという記載は、特定のマーカー、典型的には表面マーカーが細胞の表面に、または細胞の中に検出可能に存在することを指す。表面マーカーを指している場合、この用語は、フローサイトメトリーによって、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、この抗体を検出することによって検出される時に表面発現が存在することを指す。ここで、染色は、フローサイトメトリーによって、他の点では同一の条件下で、アイソタイプが一致する対照またはFMO(Fluorescence minus one)ゲーティング対照を用いた同じ手順を行って検出される染色をかなり上回るレベルで、および/またはマーカーが陽性であることが分かっている細胞のレベルと実質的に類似するレベルで、および/またはマーカーが陰性であることが分かっている細胞のレベルよりかなり高いレベルで検出することができる。

30

【0487】

本明細書で使用する、細胞または細胞集団が特定のマーカーについて「陰性」とであるという記載は、特定のマーカー、典型的には表面マーカーが細胞の表面に、または細胞の中に実質的に検出可能に存在することが無いことを指す。表面マーカーを指している場合、この用語は、フローサイトメトリーによって、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、この抗体を検出することによって検出される時に表面発現が存在しないことを指す。ここで、染色は、フローサイトメトリーによって、他の点では同一の条件下で、アイソタイプが一致する対照またはFMO(Fluorescence minus one)ゲーティング対照を用いた同じ手順を行って検出される染色をかなり上回るレベルで、および/またはマーカーが陽性であることが分かっている細胞のレベルよりかなり低いレベルで、および/またはマーカーが陰性であることが分かっている細胞のレベルと比較して実質的に類似するレベルで検出されない。

40

50

【0488】

本明細書で使用する用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を増やすことができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造であるベクター、ならびにベクターが導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、機能的に連結されている核酸の発現を起こすことができる。このようなベクターは本明細書において「発現ベクター」と呼ばれる。

【0489】

V. 例示的な態様

提供される態様には、以下がある。

1. 再発性/抵抗性 (r/r) 濾胞性リンパ腫 (FL) グレード1、2または3Aである疾患を有するかまたは有することが疑われる対象に、ある用量の $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞を投与する段階を含む、低悪性度濾胞性リンパ腫 (FL) グレード1、2または3Aを処置する方法であって、

10

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) を含み、

該対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現する $CD4^+$ T細胞：CARを発現する $CD8^+$ T細胞の比を含み；かつ

20

該投与が、複数の別個の組成物を投与することを含み、該複数の別個の組成物が、 $CD8^+$ CAR発現T細胞を含む第1の組成物および $CD4^+$ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前記方法。

2. 少なくとも1ラインの前治療が、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療である、態様1の方法。

3. 対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療の開始から24ヶ月以内に該疾患の進行を有していた (POD24)、態様2の方法。

30

4. 対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ、

抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療を完了した後、診断から24ヶ月以内に該疾患の進行を有していた (POD24)、態様2または態様3の方法。

5. 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む少なくとも1ラインの前治療が、リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、およびプレドニゾロン (R-CHOP) を含む化学免疫療法の組み合わせ療法である、態様1~4のいずれか一つの方法。

40

6. 対象が、最初のFL診断から6ヶ月以内に前記1ラインの前治療を受けた、態様2~5のいずれか一つの方法。

7. 対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、かつ、

FLに起因する症状；末端器官機能の危機 (threatened end-organ function)、リンパ腫に続発する血球減少、またはbulky病変；脾腫；および先行する6ヶ月以上にわたる疾患の着実な進行

の少なくとも1つを有する、態様1~6のいずれか一つの方法。

8. 少なくとも1ラインの前治療が2ラインの前治療である、態様1~7のいずれか一つの方法。

50

9. 2ラインの前治療のもう一方が、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン＋リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン＋オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSCT（任意で自己由来HSCTまたは同種異系HSCT）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤（PI3Ki）による処置から選択され、任意で、PI3Kiが、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである、態様8の方法。

10. 対象が、1ラインの前治療の完了から12ヶ月以内に、処置に対して抵抗性であるかまたは再発しており、任意で、1ラインの前治療が、PI3Kiを含む併用療法または単独療法である、態様1～9のいずれか一つの方法。

11. 対象がHSCT後に再発している、態様1～10のいずれか一つの方法。

12. 少なくとも1ラインの前治療が3ラインの前治療である、態様1～11のいずれか一つの方法。

13. 3ラインの前治療のうち残りの2ラインの前治療が各々独立して、リツキシマブ；オビヌツズマブ；ベンダムスチン＋リツキシマブ（BR）；ベンダムスチン＋オビヌツズマブ（BO）；R-CHOP；リツキシマブ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CVP）；HSCT（任意で自己由来HSCTまたは同種異系HSCT）；リツキシマブとの組み合わせでのレナリドミド；またはPI3K阻害剤（PI3Ki）による処置から選択され、任意で、PI3Kiが、イデラリシブ、コパンリシブ、またはデュベリシブである、態様12の方法。

14. 対象が、抗CD20抗体による処置に対して抵抗性である、態様1～13のいずれか一つの方法。

15. 対象が、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療に対して抵抗性である、態様1～14のいずれか一つの方法。

16. 対象が、抗CD20抗体による処置の完了から6ヶ月以内に再発している、態様1～15のいずれか一つの方法。

17. 対象が、抗CD20抗体およびアルキル化剤を含む1ラインの前治療の完了から6ヶ月以内に再発している、態様1～16のいずれか一つの方法。

18. 対象が、2ライン以上の治療後の抗CD20抗体維持療法の間にまたは抗CD20抗体維持療法の完了後6ヶ月以内に再発している、態様1～17のいずれか一つの方法。

19. 対象が、少なくとも1つのPET陽性病変および少なくとも1つの測定可能な結節性病変または節外性病変を有し、任意で、測定可能な結節性病変が、短軸に関係なく、長軸方向に1.5 cm超であり、測定可能な節外性病変が、長軸および短軸方向に1.0 cm超である、態様1～18のいずれか一つの方法。

20. 再発性/抵抗性（r/r）辺縁帯リンパ腫（MZL）を有するかまたは有することが疑われる対象に、ある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞を投与する段階を含み、該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含む、辺縁帯リンパ腫（MZL）を処置する方法であって、

該対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該投与が、複数の別個の組成物を投与することを含み、該複数の別個の組成物が、CD8⁺CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、前記方法。

21. MZLが、節外性MZL（ENMZL、主に胃）、脾MZL（SMZL）、および節性MZL（NMZL）の中から選択されるサブタイプである、態様20の方法。

22. 少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つが、MZLを処置するための組み

10

20

30

40

50

合わせ全身療法であるか、または造血幹細胞移植（HSCT）である、態様20または態様21の方法。

23. 少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つが、MZLを処置するための組み合わせ全身療法であり、該組み合わせ全身療法が、リツキシマブ+シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾン（R-CHOP）、または抗CD20抗体およびアルキル化剤による療法から選択される、態様20～22のいずれか一つの方法。

24. 少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤である組み合わせ全身療法である、態様20～23のいずれか一つの方法。

25. 対象が脾MZL（SMZL）を有し、かつ少なくとも2ラインの前治療のうち少なくとも1つが、脾臓摘出である、態様20～24のいずれか一つの方法。

26. 対象が節外性MZL（ENMZL）を有し、かつ抗生物質が、少なくとも2ラインの前治療のうちの1つではない、態様20～24のいずれか一つの方法。

27. 対象が、長軸方向に2.0 cm超の少なくとも1つの測定可能な結節性病変または少なくとも1つの測定可能な節外性病変を有するPET非集積疾患（PET non-avid disease）を有する、態様20～26のいずれか一つの方法。

28. 対象が、FLグレード3B（FL3B）を有さない、態様1～27のいずれか一つの方法。

29. 対象が、複合型DLBCLおよびFLのエビデンス、または形質転換FL（tFL）のエビデンスを有さない、態様1～28のいずれか一つの方法。

30. 対象が、世界保健機関（WHO）下位分類の十二指腸型FLを有さない、態様1～29のいずれか一つの方法。

31. 対象が、少なくとも1ラインの前治療に対して再発しており、再発が、該少なくとも1ラインの前治療に対する完全奏効（CR）または部分奏功（PR）である初回奏効後である、態様1～30のいずれか一つの方法。

32. 対象が、少なくとも1ラインの前治療に対して抵抗性であり、かつ抵抗性の処置が、該少なくとも1ラインの前治療に対する安定（SD）または進行（PD）である最良効果である、態様1～31のいずれか一つの方法。

33. 対象が、0または1のEastern Cooperative Oncology Group（ECOG）パフォーマンスステータスを有する、態様1～32のいずれか一つの方法。

34. 抗CD20抗体がモノクローナル抗CD20抗体である、態様1～33のいずれか一つの方法。

35. 抗CD20抗体が、リツキシマブまたはオビヌツズマブである、態様1～34のいずれか一つの方法。

36. 抗CD20抗体がリツキシマブである、態様1～35のいずれか一つの方法。

37. アルキル化剤が、ベンダムスチンまたはクロラムブシルである、態様1～36のいずれか一つの方法。

38. 前記用量のCD4+およびCD8+T細胞の投与前に、対象にリンパ球枯渇療法を投与する段階をさらに含む、態様1～37のいずれか一つの方法。

39. リンパ球枯渇療法が、前記用量のCD4+およびCD8+T細胞の投与の開始前約7日以内に完了する、態様38の方法。

40. リンパ球枯渇療法の投与が、前記用量のCD4+およびCD8+T細胞の投与の開始前約2～7日以内に完了する、態様38または態様39の方法。

41. リンパ球枯渇療法が、フルダラビンおよび/またはシクロホスファミドの投与を含む、態様38～40のいずれか一つの方法。

42. リンパ球枯渇療法が、200～400 mg/m²または約200～400 mg/m²、任意で300 mg/m²または約300 mg/m²（両端の値を含む）のシクロホスファミド、および/あるいは20～40 mg/m²または約20～40 mg/m²、任意で30 mg/m²のフルダラビンの、2～4日間、任意で3日間にわたる毎日の投与を含む、態様38～41のいずれか一つの方法。

43. リンパ球枯渇療法が、300 mg/m²または約300 mg/m²のシクロホスファミドおよび30 mg/m²または約30 mg/m²のフルダラビンの、3日間にわたる同時の毎日の投

10

20

30

40

50

与を含む、態様38～42のいずれか一つの方法。

44. CD19がヒトCD19である、態様1～43のいずれか一つの方法。

45. キメラ抗原受容体 (CAR) が、抗体FMC63の可変重鎖領域と可変軽鎖領域を含む scFv、15アミノ酸以下でありかつ免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンを含有するスペーサー、膜貫通ドメイン、および、CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインと4-1BBのシグナル伝達ドメインである共刺激シグナル伝達領域とを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、態様1～44のいずれか一つの方法。

46. 免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンが、 X_1 がグリシン、システイン、またはアルギニンであり、かつ X_2 がシステインまたはスレオニンである、式 X_1PPX_2P (SEQ ID NO: 58)

を含む、態様45の方法。

47. 免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンが、IgG1ヒンジまたはその改変されたバージョンである、態様45または態様46の方法。

48. 免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変されたバージョンが、IgG4ヒンジまたはその改変されたバージョンである、態様45または態様46の方法。

49. スペーサーが、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列、または、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションを含む、態様45～48のいずれか一つの方法。

50. スペーサーが、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列、または、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、もしくはSEQ ID NO: 34に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有する前述のもののいずれかのバリエーションからなる、態様45～49のいずれか一つの方法。

51. スペーサーが、12アミノ酸長または約12アミノ酸長である、態様45～50のいずれか一つの方法。

52. スペーサーが、SEQ ID NO: 1に示した配列を含む、態様45～51のいずれか一つの方法。

53. スペーサーが、SEQ ID NO: 1に示した配列からなる、態様45～52のいずれか一つの方法。

54. 膜貫通ドメインが、CD28の膜貫通ドメインである、態様45～53のいずれか一つの方法。

55. 膜貫通ドメインが、SEQ ID NO: 8に示したアミノ酸の配列、あるいは、SEQ ID NO: 8に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る、または少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、態様45～54のいずれか一つの方法。

56. 共刺激ドメインが、SEQ ID NO: 12に示した配列を含むか、または、SEQ ID NO: 12に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリエーションである、態様45～55のいずれか一つの方法。

57. CD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO: 13、14、もしくは15に示した配列を含むか、または、SEQ ID NO: 13、14、もしくは15に示した配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、9

10

20

30

40

50

3%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を有するそのバリエーションである、態様45～56のいずれか一つの方法。

58. scFvが、SEQ ID NO: 35のCDRL1配列、SEQ ID NO: 55のCDRL2配列、およびSEQ ID NO: 56のCDRL3配列；ならびにSEQ ID NO: 38のCDRH1配列、SEQ ID NO: 39のCDRH2配列、およびSEQ ID NO: 54のCDRH3配列を含む、態様45～57のいずれか一つの方法。

59. scFvが、RASQDISKYLN (SEQ ID NO: 35) のCDRL1配列、SRLHSGV (SEQ ID NO: 36) のCDRL2配列、およびGNTLPYTFG (SEQ ID NO: 37) のCDRL3配列；ならびにDYGVVS (SEQ ID NO: 38) のCDRH1配列、VIWGSETTYNSALKS (SEQ ID NO: 39) のCDRH2配列、およびYAMDYWG (SEQ ID NO: 40) のCDRH3配列を含む、態様45～57のいずれか一つの方法。

10

60. scFvが、N末端からC末端までの順に、SEQ ID NO: 42に示した配列を含むV_L、およびSEQ ID NO: 41に示した配列を含むV_Hを含む、態様45～59のいずれか一つの方法。

61. scFvが、SEQ ID NO: 43に示した配列を含む、態様45～60のいずれか一つの方法。

62. CARが、N末端からC末端までの順に、SEQ ID NO: 43に示したscFvである細胞外抗原結合ドメイン、SEQ ID NO: 1に示したスペーサー、SEQ ID NO: 8に示した膜貫通ドメイン、SEQ ID NO: 12に示した4-1BB共刺激シグナル伝達ドメイン、およびSEQ ID NO: 13に示したCD3-ゼータ (CD3ζ) 鎖のシグナル伝達ドメインを含有する、態様1～61のいずれか一つの方法。

20

63. 前記用量のCD4+およびCD8+T細胞がそれぞれ、約 5×10^7 個のCAR+T細胞から約 1.1×10^8 個のCAR+T細胞（両端の値を含む）である、態様1～62のいずれか一つの方法。

64. 前記用量のCD4+およびCD8+T細胞が、 5×10^7 個のCAR+T細胞である、態様1～63のいずれか一つの方法。

65. 前記用量のCD4+およびCD8+T細胞が、 1×10^8 個のCAR+T細胞である、態様1～63のいずれか一つの方法。

66. 第1の組成物および第2の組成物が、0～12時間の間隔で、0～6時間の間隔で、もしくは0～2時間の間隔で投与されるか、または第1の組成物の投与および第2の組成物の投与が、同日に、約0から約12時間の間隔で、約0から約6時間の間隔で、もしくは約0から2時間の間隔で行われ；かつ/あるいは

30

第1の組成物の投与の開始および第2の組成物の投与の開始が、約1分から約1時間の間隔でまたは約5分から約30分の間隔で行われる、態様1～65のいずれか一つの方法。

67. 第1の組成物および第2の組成物が、2時間以下、1時間以下、30分以下、15分以下、10分以下、または5分以下の間隔で投与される、態様1～66のいずれか一つの方法。

68. 第1の組成物および第2の組成物が、2時間未満の間隔で投与される、態様1～67のいずれか一つの方法。

69. CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物が、CD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物の前に投与される、態様1～68のいずれか一つの方法。

40

70. 前記用量のCD4+T細胞およびCD8+T細胞が、静脈内に投与される、態様1～69のいずれか一つの方法。

71. T細胞が、対象由来の試料から取得された初代T細胞であり、任意で、試料が、全血試料、アフエーシス試料、または白血球アフエーシス試料である、態様1～70のいずれか一つの方法。

72. 試料が、対象に対するリンパ球枯渇療法の投与の前に該対象から取得される、態様71の方法。

73. T細胞が、対象にとって自己由来である、態様1～72のいずれか一つの方法。

74. 対象がヒトである、態様1～73のいずれか一つの方法。

50

75. 前記方法により処置された複数の対象内での完全奏効率（CRR）が、50%超もしくは約50%超、60%超もしくは約60%超、70%超もしくは約70%超、または80%超もしくは約80%超である、態様1～74のいずれか一つの方法。

76. CRRが、最大24ヶ月の完全奏効（CR）である最良総合効果（BOR）を有する対象のパーセンテージである、態様75の方法。

77. 対象がFLグレード1、2、または3Aを有し、かつCRRがPET-CTによって評価される、態様75または態様76の方法。

78. 対象がMZLを有し、かつCRRがCTによって評価される、態様75または態様76の方法。

79. 再発性/抵抗性（r/r）濾胞性リンパ腫（FL）グレード1、2または3Aである疾患を有するかまたは有することが疑われる対象を処置するためのある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；

該対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該用量が、複数の別個の組成物として投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前記使用。

80. 再発性/抵抗性（r/r）濾胞性リンパ腫（FL）グレード1、2または3Aである疾患を有するかまたは有することが疑われる対象の処置のための医薬の製造におけるある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；

該対象が、FLグレード1、2または3Aを処置するための少なくとも1ラインの前治療後に再発しているかあるいは処置に対して抵抗性であり、該少なくとも1ラインの前治療のうち少なくとも1つが、抗CD20抗体およびアルキル化剤による処置を含み；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該用量が、複数の別個の組成物として投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前記使用。

81. 再発性/抵抗性（r/r）辺縁帯リンパ腫（MZL）を有するかまたは有することが疑われる対象を処置するためのある用量のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の使用であって、

該用量のT細胞が、CD19に特異的に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含み；

該対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞（両端の値を含む）を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現するCD4⁺T細胞：CARを発現するCD8⁺T細胞の比を含み；かつ

該用量が、複数の別個の組成物の投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、CD8⁺ CAR発現T細胞を含む第1の組成物およびCD4⁺ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を

10

20

30

40

50

含む、
前期使用。

82. 再発性/抵抗性 (r/r) 辺縁帯リンパ腫 (MZL) を有するかまたは有することが疑われる対象の処置のための医薬の製造におけるある用量の $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞の使用であって、

該用量のT細胞が、 $CD19$ に特異的に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) を含み；

該対象が、MZLを処置するための少なくとも2ラインの前治療後に再発しているかまたは処置に対して抵抗性であり；

該用量のT細胞が、 5×10^7 個または約 5×10^7 個のCAR発現T細胞から、 1.5×10^8 個または約 1.5×10^8 個のCAR発現T細胞 (両端の値を含む) を含み；

該用量のT細胞が、およそ1:1の、CARを発現する $CD4^+$ T細胞：CARを発現する $CD8^+$ T細胞の比を含み；かつ

該用量が、複数の別個の組成物の投与用に製剤化され、該複数の別個の組成物が、 $CD8^+$ CAR発現T細胞を含む第1の組成物および $CD4^+$ CAR発現T細胞を含む第2の組成物を含む、

前記使用。

【実施例】

【0490】

VI. 実施例

以下の実施例は、例証の目的だけで含まれ、本発明の範囲を限定するようには意図されない。

【0491】

実施例1 処置前生検遺伝子発現プロファイルおよび臨床奏効の分析

$CD19$ に特異的なキメラ抗原受容体 (CAR) を発現する自己由来T細胞を含有する治療用CAR⁺T細胞組成物を、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) を有する対象に投与した。

【0492】

投与される治療用T細胞組成物は、処置される個々の対象由来の白血球アフェレーシス試料からの $CD4^+$ および $CD8^+$ 細胞の免疫親和性ベース (例えば、免疫磁気選択) 濃縮を含むプロセスによって作製されていた。単離された $CD4^+$ および $CD8^+$ T細胞を抗 $CD3$ / 抗 $CD28$ 磁気ビーズにより別々に活性化し、独立して、抗 $CD19$ CARをコードするウイルスベクター (例えば、レンチウイルスベクター) で形質導入し、続いて、操作された細胞集団を低容量で別々に拡大増殖し、凍結保存した。CARは、マウス抗体 (FMC63に由来する可変領域、 V_L -リンカー- V_H の向き) に由来する抗 $CD19$ scFv、免疫グロブリン由来のスペーサー、 $CD28$ に由来する膜貫通ドメイン、4-1BBに由来する共刺激領域、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。ウイルスベクターは、T2Aリボソームスキップ配列によりCAR配列から隔てられた、CAR発現のサロゲートマーカーとして機能する、切断型受容体をコードする配列をさらに含有した。

【0493】

凍結保存した細胞組成物を静脈内投与の前に解凍した。およそ1:1の目標比で投与される製剤化 $CD4^+$ CAR⁺細胞集団および製剤化 $CD8^+$ CAR⁺集団を投与することによって、治療用T細胞用量を規定された細胞組成物として投与した。

【0494】

投与の3ヶ月後を含む、CAR T細胞組成物の投与後に、対象を臨床奏効についてモニタリングし、対象が進行 (PD) または完全奏効 (CR) を有したかどうかを評価することによって、CAR T細胞組成物に対する奏効を判定した。処置された患者のうち、53%が、CAR T細胞組成物による処置後に持続的なCRを達成し、高リスク、進行性の再発性/抵抗性大細胞型B細胞リンパ腫を有する患者内で重篤なサイトカイン放出症候群 (CRS) および神経学的事象の発生率は低かった。患者の一部は、CAR T細胞処置の1年後にCRを達成しなかった。

10

20

30

40

50

【0495】

50名の処置対象の初回コホートからの腫瘍生検を、リンパ球枯渇化学療法の投与前およびCAR T細胞投与後およそ11日目に収集し、遺伝子発現についてRNA配列決定（RNA-seq）によって分析した。具体的には、相補的DNA（cDNA）試料を腫瘍生検から単離したRNAから調製し、RNA-seqによって分析した。試料を、処置後CRまたはPDのいずれかを示す患者の群に分け、安定（SD）または部分奏功（PR）を示した対象から試料は分析に含めなかった。処置前腫瘍生検からRNA-seqを用いて決定した遺伝子発現レベルを、自己由来治療用CAR T細胞組成物の投与後の奏効と事後的に相関させた。

【0496】

図1Aは、処置後3ヶ月にCRまたはPDを示した対象における処置前腫瘍生検での差次的遺伝子発現プロファイルを示す。0.6超または-0.6未満のLog₂倍率変化カットオフおよび10%以下の偽陽性率（FDR）の設定によって、処置後3ヶ月でCRを示した対象（n=16）からの処置前生検で高く発現した360の遺伝子、および処置後3ヶ月でPDを有する対象（n=29）からの処置前生検で高く発現した380の遺伝子が明らかになった。差次的に発現した遺伝子のうち、T細胞に関連する遺伝子の発現は、処置後3ヶ月でCRを示した対象からの処置前生検で高かった。EZH2、zesteホモログ2のヒストンリジンメチルトランスフェラーゼエンハンサーをコードする遺伝子、およびEZH2の標的である遺伝子の発現は、処置後3ヶ月でPDを示した対象での処置前生検で高かった。

【0497】

図1Bで示されるように、FLと比較してDLBCLにおいて高いレベルで発現した遺伝子として特定される遺伝子セット（「FL_DLBCCL_DN」遺伝子セットと命名される；下記の実施例2に記載される75の利用可能なDLBCL細胞株試料および75の利用可能なFL細胞株試料での差次的遺伝子発現の分析から）もまた、処置の3ヶ月後にPDを示した対象からの生検に関連する遺伝子について高度に濃縮されることが認められた。

【0498】

同じ試験から追加の24名の患者を有する大規模コホート（74名の総対象；「大規模コホート」）の分析において、同様の結果が観察された。上記と同様に、この対象のセットでは、上記に記載されるRNA-seq分析のために、腫瘍生検試料を、74名の対象について処置前および56名の対象について処置のおよそ11日後に採取し、マッチングした生検を、これらの対象のうち28名について処置前および処置のおよそ11日後に採取した。大規模コホートのうち、処置前生検を有する患者の46%は処置後3ヶ月でCRを示し、11日目の生検を有する患者の56%は処置後3ヶ月でCRを示した。RNA-seq試料を取得しなかった対象の集団と比較して、RNA-seq試験集団の奏効アウトカムに偏りがあるかどうかを決定するために、CR、PD、部分奏功（PR）、および無増悪生存期間（PFS）アウトカムを2つの集団間で比較した。有意差は観察されなかった。

【0499】

差次的遺伝子発現分析を大規模コホートの処置前腫瘍生検に対しても実施し、処置後3ヶ月でCRを示した対象でより高い発現した遺伝子および処置後3ヶ月でPDを示した対象でより高く発現した遺伝子を特定した。この対象の群では、0.6超または-0.6未満のLog₂倍率変化カットオフおよび10%以下のFDR率の設定によって、処置後3ヶ月でCRを示す対象（n=22）からの処置前生検でより高く発現した230の遺伝子および処置後3ヶ月でPDを示した対象（n=40）からの処置前生検でより高く発現した271の遺伝子が明らかになった（図2A）。

【0500】

大規模コホートのさらなる分析では、図2Bに示すように、処置前腫瘍生検の遺伝子発現分析によって、FLと比較してDLBCLでより高く発現した遺伝子を含む遺伝子セット（DLBCL_LIKE_vs_FL）およびDLBCLをFLから区別する最も上方制御された遺伝子（SHIP1_DLBCCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP）が処置後3ヶ月でPDを示した患者で濃縮されたことが明らかになった。それに対して、DLBCLと比較してFLでより高く発現した遺伝子を含む遺伝子セット（FL_LIKE_vs_DLBCCL）およびDLBCLをFLからを

区別する最も下方制御された遺伝子 (SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN) は、処置後3ヶ月でCRを示した患者で濃縮された。

【0501】

これらの結果は、CAR-T細胞の投与後の対象における3ヶ月でのPDに関連する遺伝子のうち、FLと比較してDLBCLにおいて高いレベルで発現している遺伝子、およびEZH2標的遺伝子は、処置前生検試料で濃縮されていたことを支持する。

【0502】

上記に記載される28のマッチングした前処置試料および処置後11日目の試料では、処置後11日目での免疫浸潤を、CAR転写物を含む、複数のT細胞遺伝子の平均を用いて推定した。この浸潤レベルの中央値を用いて、対象を2つの群、高浸潤を伴う群 (n=14) および低浸潤を伴う群 (n=14) に分割した。差次的遺伝子発現分析を、それらの11日目のマッチング日の「高」または「低」浸潤レベルによりグループ分けした28の前処置試料に対して行い、抗CD19 CAR T細胞の投与後にT細胞浸潤に関連する処置前生検における遺伝子発現を特定した。図2Cに示されるように、「高」浸潤群の対象は、DLBCLと比較してFLでより高く発現した遺伝子を含む遺伝子セット (FL_LIKE_vs_DLBCL) およびDLBCLをFLから区別する最も下方制御された遺伝子 (SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN) の濃縮を示した。「低」浸潤群の対象の中には、FLと比較してDLBCLでより高く発現した遺伝子を含む遺伝子セット (DLBCL_LIKE_vs_FL) およびDLBCLをFLから区別する最も上方制御された遺伝子 (SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP) の濃縮が観察された。

【0503】

これらのデータは、FL様遺伝子発現がT細胞浸潤、ならびに処置に対する改善された奏効に関連することを示す。

【0504】

実施例2 びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) vs. 濾胞性リンパ腫 (FL) の遺伝子発現分析

内部データセットを用いて、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) と濾胞性リンパ腫 (FL) との間の生物学的相違点を調査するための試験を行った。

【0505】

実施例1において上記に記載されるように、遺伝子発現についてのRNA-seqを、約75の濾胞性リンパ腫 (FL) の利用可能な腫瘍細胞試料および約75のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) の利用可能な腫瘍細胞試料 (ホルマリン固定化したパラフィン包埋腫瘍生検) から単離したRNAから調製した相補的DNA (cDNA) 試料に対して行った。分析した腫瘍細胞試料は、野生型または変異型EZH2のいずれかを保有し、DLBCLの胚中心B細胞様 (GCB) および活性化B細胞 (ABC) サブタイプの両方を含んだ。図3に示されるように、差次的遺伝子発現が、DLBCL (「DLBCL様」) およびFL (「FL様」) 腫瘍細胞試料で上昇した異なる遺伝子セットを伴うDLBCLおよびFL腫瘍細胞試料において観察された。FL腫瘍細胞試料とDLBCL腫瘍細胞試料との間で差次的発現を示した遺伝子の中には、EZH2 (図4A; zesteホモログ2、ヒストンリジンメチルトランスフェラーゼのエンハンサーをコードする) およびCD3E (図4B; T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖、CD3-TCR複合体のイプシロンポリペプチドをコードする) があつた。示すように、FL腫瘍細胞試料は、DLBCL腫瘍細胞試料と比較して、低い発現レベルのEZH2および高い発現レベルのCD3Eを示した。

【0506】

記載されるように抗CD19治療用T細胞組成物をその後投与された、実施例1に記載の対象の初回コホートからの、処置前腫瘍生検に対するRNA-seqによる遺伝子発現プロファイルを、FLと比較してDLBCLで上昇していると認められる (「DLBCL様」または「DLBCL_LIKE_vs_FL」遺伝子セットと命名) か、またはDLBCLと比較してFLで上昇していると認められる (「FL様」または「FL_LIKE_vs_DLBCL」遺伝子セットと命名)、図3に記載される試験からの遺伝子の発現について分析した。単一サンプル遺伝子セッ

ト濃縮分析 (ssGSEA) を行い、試料の各ペアリングおよび各々の遺伝子セットについて別個の濃縮スコアを算出した。図5Aに示されるように、実施例1に記載される試験においてCRを示し続けた対象は、PDを示し続けた対象と比較して、DLBCL様遺伝子セット (DLBCL_LIKE_vs_FL) について低いssGSEAスコアを有した。反対に、図5Bに示されるように、実施例1に記載される試験においてCRを示し続けた対象は、PDを示し続けた対象と比較して、FL様遺伝子セット (FL_LIKE_vs_DLBCL) について高いssGSEAスコアを有した。

【0507】

同様の分析において、実施例1において記載される大規模コホートにおける対象間で、同様の結果が観察された。処置後3ヶ月でCRを示した対象は、FL様遺伝子セットについて有意に高い濃縮スコアを有した (図5C; $n=62$)。加えて、8名の患者は、「FL様」遺伝子発現スコアを明確に有し; 最も高い「FL様」遺伝子発現を伴うこれらの対象は、非「FL様」対象 (CR=22%) と比較して、処置後3ヶ月で高い率のCR (CR=100%) を示した。高いFL様スコアを伴う複数名のDLBCL対象は、形質転換した濾胞性リンパ腫 (tFL) 組織像を有したが、低FL様スコアを伴う他のtFL対象でも存在した。同様に、一部の非tFL対象は高いFL様スコアを有した。大規模コホートにおける対象内で、無増悪生存期間 (PFS) 曲線を、最も高いFL様スコアを有する15名の対象および残りの59名の対象について比較し、高いFL様遺伝子発現を有する対象は有意に高いPFSを示した (図5D)。

【0508】

これらのデータは、DLBCLおよびFLを有する対象の遺伝子発現プロファイルが異なっていることを実証する。具体的には、DLBCL腫瘍生検とFL腫瘍生検との間の遺伝子発現の相違は、免疫もしくは間質含量の量または腫瘍細胞の状態に関連する。これらのデータは、DLBCLを有する対象またはDLBCL対象で上昇することが認められた遺伝子の高い発現を有する対象と比較して、FLを有する対象またはFL対象で上昇することが認められた遺伝子の高い発現を有する対象は、腫瘍環境内でのT細胞浸潤に耐性が低い可能性があるという観察と一致する。さらに、FL腫瘍により類似しているように見えるDLBCL腫瘍を有する対象は、CAR T細胞処置後にPFSアウトカムが改善している可能性がある。

【0509】

実施例3 濾胞性リンパ腫 (FL) または辺縁帯リンパ腫 (MZL) を有する対象に対する抗CD19 CAR発現細胞の投与

規定された組成 (およそ1:1の比) のCD4⁺ CAR発現T細胞組成物およびCD8⁺ CAR発現T細胞組成物を含有する抗CD19 CAR発現治療用T細胞組成物を、低悪性度濾胞性リンパ腫 (FL) グレード1~3Aおよび辺縁帯リンパ腫 (MZL) を含む、再発性/抵抗性 (R/R) 低悪性度B細胞非ホジキンリンパ腫 (NHL) を有する対象に投与した。

【0510】

対象を以下のように4つのコホートに分けた: コホート 1、第四ライン以降 (4L+) のr/r/ FL、二重抵抗性対象を含む; コホート 2、第三ライン (3L) のr/r FL、二重抵抗性対象を含む; コホート 3、第二ライン (2L) のr/r FL、診断および/または処置の開始から24ヶ月以内に疾患の進行を有する対象 (POD24) を含む; およびコホート 4、第三ライン以降 (3L+) のMZL。したがって、二重抵抗性対象および診断から24ヶ月以内に疾患の進行を有する対象 (POD24) を含む、高リスク特性を有する対象の群が登録される。二重抵抗性対象は、以下の判断基準の少なくとも1つを満たした対象であった: (i) 抗CD20抗体およびアルキル化剤 (例えば、ベンダムスチン) を含んだ前処置による処置に対して抵抗性である、(ii) 抗CD20モノクローナル抗体およびアルキル化剤 (例えば、ベンダムスチン) を含んだ前治療の処置を完了した後、6ヶ月以内 (すなわち、6ヶ月の間にまたは最長6ヶ月で) 再発している、または (iii) 2ライン以上の治療後の抗CD20維持の間にまたは維持完了後6ヶ月以内に再発している。POD24対象は、化学免疫療法法の組み合わせ療法、例えば、抗CD20抗体およびアルキル化剤 (例えば、ベンダムスチン) による処置後、診断または処置の開始から24ヶ月以内に進行していた対象で

10

20

30

40

50

あった。他の高リスク特性は、事前の組み合わせ療法の完了から12ヶ月以内の再発、および造血幹細胞移植後の失敗を含んだ。グレード3B FL (FL3B) を有する対象は、登録から排除された。加えて、複合型DLBCLおよびFL、または形質転換FLのエビデンスを有する対象もまた、登録から排除された。全ての対象は、0または1のEastern Cooperative Oncology Groupパフォーマンス (ECOG) ステータスを有した。例示的なコホートを表E1に示す。

【0511】

(表E1) 例示的なコホート

コホート	説明
コホート1 (4L+ r/r FL)	対象は、少なくとも3ラインの全身性の前治療を受けており、これらのラインのうち少なくとも1つが、抗CD20抗体 (例えば、リツキシマブ、オビヌツズマブ) およびアルキル化剤を含んだ組み合わせであった。事前のHSCTは1ラインの前治療として認められる。 これらの要件に加えて、4L+二重抵抗性の対象の群は、以下の判定基準の1つも満たさなければならない: (i) 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含んだ1ラインの全身性の治療に対して抵抗性である、 (ii) 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含んだ1ラインの全身性の前治療の完了後6ヶ月以内に再発している、かつ/あるいは (iii) 2ライン以上の治療後の抗CD20抗体維持の間または維持完了後6ヶ月以内に再発している。
コホート2 (3L r/r FL)	対象は、2ラインの全身性の前治療を受けており、これらのラインのうち少なくとも1つは、抗CD20抗体 (例えば、リツキシマブ、オビヌツズマブ) およびアルキル化剤を含んだ組み合わせであった。 この要件に加えて、対象は、以下の高リスク判定基準の1つを満たさなければならない: (i) 1ラインの前治療の完了から12ヶ月以内に再発性または抵抗性の疾患を有し、かつ組み合わせ前治療を受けている。PI3Kiによる単独療法は許容されるラインの治療である、 (ii) HSCT後に再発している、かつ/あるいは (iii) 二重抵抗性の定義を満たしている。 3L二重抵抗性対象は、以下の判定基準の1つを満たさなければならない: (i) 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含んだ1ラインの全身性の治療に対して抵抗性である、 (ii) 抗CD20抗体およびアルキル化剤を含んだ1ラインの全身性の前治療の完了後6ヶ月以内に再発している、かつ/あるいは (iii) 2ライン以上の治療後の抗CD20抗体維持の間または維持完了後6ヶ月以内に再発している。
コホート3 (2L r/r FL)	対象は、抗CD20抗体 (例えば、リツキシマブ、オビヌツズマブ) およびアルキル化剤を含んだ、1ラインの全身性の前治療の組み合わせを受けている。 診断および/または処置開始から24ヶ月以内に進行を有し、かつ最初のFL診断の6ヶ月以内に処置を受けているとして定義される、POD24対象の群は、このコホートに登録される。 このPOD24定義を満たさない2L対象は、その代わりに、以下の改変GELF*基準の1つを満たさなければならない: (i) FLに起因する症状を有する (B症状に限定されない)、 (ii) 末端器官機能の危機、またはリンパ腫に続発する血球減少、または bulky病変 (> 7 cmの単一の腫瘍または> 3 cmの3個以上の腫瘍)、 (iii) 脾腫、および/あるいは (iv) 少なくとも6ヶ月にわたる着実な進行を有する。
コホート4 (3L+ MZL)	対象は、少なくとも1ラインの治療が組み合わせ全身療法、抗CD20抗体 (例えば、リツキシマブ、オビヌツズマブ) およびアルキル化剤による療法であった、少なくとも2つの全身性の前治療を受けているか、またはHSCT後に再発している。脾MZL (SMZL) に対する脾臓摘出は、1ラインの治療とみなされる。節外性MZL (ENMZL) に対する抗生物質は、1ラインの前治療とみなされない。

* National Comprehensive Cancer Network.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCNガイドライン): B細胞リンパ腫; V4. 2019

【0512】

投与される抗CD19 CAR発現治療用T細胞組成物を、処置される個々の対象由来の白血球アフェレーシス試料からのCD4⁺およびCD8⁺細胞の免疫親和性ベース（例えば、免疫磁気選択）濃縮を含むプロセスによって作製した。単離されたCD4⁺およびCD8⁺T細胞を別々に活性化し、独立して、抗CD19 CARをコードするウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）で形質導入し、続いて、操作された細胞集団を低容量で別々に拡大増殖し、凍結保存した。CARは、マウス抗体（FMC63に由来する可変領域、V_L-リンカー-V_Hの向き）に由来する抗CD19 scFv、免疫グロブリン由来のスペーサー、CD28に由来する膜貫通ドメイン、4-1BBに由来する共刺激領域、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。ウイルスベクターは、T2Aリボソームスキップ配列によりCAR配列から隔てられた、CAR発現のサロゲートマーカーとして機能する、切断型受容体をコードする配列をさらに含有した。

10

【0513】

凍結保存したCD4⁺およびCD8⁺細胞組成物を静脈内投与の前に解凍した。およそ1:1の目標比で投与される製剤化CD4⁺ CAR⁺細胞集団および製剤化CD8⁺ CAR⁺集団を投与することによって、治療用T細胞用量を規定された細胞組成物として投与した。

【0514】

CAR⁺T細胞の注入前に、対象は、フルダラビン（flu、30 mg/m²/日）およびシクロホスファミド（Cy、300 mg/m²/日）によるリンパ球枯渇化学療法を3日にわたって受けた。一部の場合では、リンパ球枯渇化学療法の投与前に、PET陽性疾患をFL対象で再確認し、CT陽性疾患をMZL対象で再確認した。

20

【0515】

対象は、リンパ枯渇の2〜7日後にCAR発現T細胞を受けた。対象に、 1×10^8 （ 100×10^6 ）個のCAR発現T細胞の単回用量（各単回用量は、それぞれ1:1の比でのCD4⁺ CAR発現T細胞およびCD8⁺ CAR発現T細胞での別個の注入を介する）を投与した。

【0516】

処置に対する奏効を、処置前のベースラインの時点および処置後のさまざまな時点での陽電子放射断層撮影（PET）スキャンおよび/またはコンピュータ断層撮影（CT）スキャンおよび/または磁気共鳴画像撮影（MRI）スキャンによるX線撮影による腫瘍評価に基づいて評価した（例えば、Lugano分類に基づく、例えば、Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067を参照）。FL対象は、PETスキャンを用いて主に評価されたのに対して、MZL対象は、CT/MRIスキャンを用いて主に評価された。評価される奏効アウトカムには、完全奏効率（CRR）および全奏効率（ORR）も含まれた。一部の場合では、奏効期間（DOR）、無増悪生存期間（PFS）、および全生存期間（OS）も評価した。

30

【0517】

安全性評価もまたモニタリングされ、これらには、有害事象（AE）/重篤な有害事象（SAE）の収集、併用医薬および手法の評価、臨床検査値の評価、身体検査、ならびにバイタルサインの評価が含まれた。National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events（NCI CTCAEバージョン5.0）にしたがって、AEおよび臨床検査の異常（タイプ、頻度および重症度）を収集し、グレード分類し、報告した。2017年11月27日に発表されたU.S. Department of Health and Human Servicesを参照。特に注目すべき有害事象（AESI）には、これらに限定されないが、サイトカイン放出症候群（CRS）、神経毒性（NT）、注入反応、マクロファージ活性化症候群（MAS）、腫瘍崩壊症候群（TLS）、低ガンマグロブリン血症、遷延性血球減少症、感染、二次原発悪性腫瘍（SPM）、および自己免疫事象が含まれた。サイトカイン放出症候群（CRS）および神経毒性（NT）は、American Society for Transplantation and Cellular Therapy（ASTCT）Consensus Grading Systemにしたがってグレード分類された（Lee et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2019 Apr; 25(4):625-38）。CRSおよび神経毒性の徴候および症状もモニタリングした。

40

50

【0518】

評価される他のエンドポイントには、最大濃度 (C_{max})、最大濃度に到達するまでの時間 (T_{max})、曲線下面積 (AUC)、およびCAR発現T細胞の持続性（例えば、PCRによって評価される）を含む、薬物動態 (PK)；末梢B細胞形成不全の測定を含む、薬力学；EORTC QLQ-C30および/またはFACT-LymSによって評価されるような、健康関連の生活の質 (HRQoL) が含まれた。

【0519】

一部の場合では、奏功、安全性、および他のエンドポイントを処置後少なくとも約24ヶ月または最大で約24ヶ月にわたって評価した。

【0520】

本発明は、例えば、本発明の様々な局面を例示するために提供される、特定の開示される態様に範囲を限定されることを意図しない。記載される組成物および方法に対する様々な改変は、本明細書の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精神から逸脱することなく実施することができ、本開示の範囲に属することを意図し得る。

【0521】

配列

10

20

30

40

50

#	配列	アノテーション
1	ESKYGPPCPPCP	スパーサー (IgG4ヒンジ) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	スパーサー (IgG4ヒンジ) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLK	ヒンジ-CH3 スパーサー
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVQLHQLDNLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	ヒンジ-CH2-CH3 スパーサー
5	RWPESPKAQASSVPTAQPPAQEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEK EEQEERETKTPECP SHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVP TGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVT CTLNHP SLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSG FSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSP QPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVDH	IgD-ヒンジ-Fc
6	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKN CTSIGDLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWP ENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCS PEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPE CLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYA DAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVA LGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (アクセッション番号 P10747の アミノ酸153～179)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (アクセッション番号 P10747の アミノ酸114～179)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747の アミノ酸180～220)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL から GG)
12	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1の アミノ酸214～255)

10

20

30

40

50

#	配列	アノテーション
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	CD3 ゼータ
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	CD3 ゼータ
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR	CD3 ゼータ
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTH TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGT SGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGR ECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCA HYIDGPHCVKTCIPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGL EGCPTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG- (SGGG) ₅ -P- 配列中、Pはプロリンであり、 Gはグリシンであり、かつSはセリンである	リンカー
23	GSADDAKKDAAKKDGS	リンカー
24	atgcttctctcgttgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagc attcctcctgatecca	GMCSFR α鎖シグナル配列
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR α鎖シグナル配列
26	MALPVTALLLPLALLHA	CD8α シグナルペプチド
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	ヒンジ
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	ヒンジ
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKS CDTPPPCPRCP	ヒンジ
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	ヒンジ
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	ヒンジ
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	ヒンジ
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	ヒンジ
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	ヒンジ
35	RASQDISKYLN	CDR L1

10

20

30

40

#	配列	アノテーション
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGV	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	VH
42	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG GTKLEIT	VL
43	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYH TSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGG GTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQ IYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKT ISSVDFYFDYWGQGTSTVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYS ATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGG GTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGSGGGGS	リンカー
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQ IYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKT ISSVDFYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIELTQSPKFMST SVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFT GSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcga ccgggtgaccatcagctgccgggcccagccaggacatcagcaagtacctga actggtatcagcagaagcccagcggcaccgtcaagctgctgatctaccac accagccggctgcacagcggcgtgccagccggttagcggcagcggctc cggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatcg ccacctacttttgccagcagggcaacacactgcctacacctttggcggc ggaacaaagctggaaatcaccggcagcacctccggcagcggcaagcctgg	scFvを コードする配列

10

20

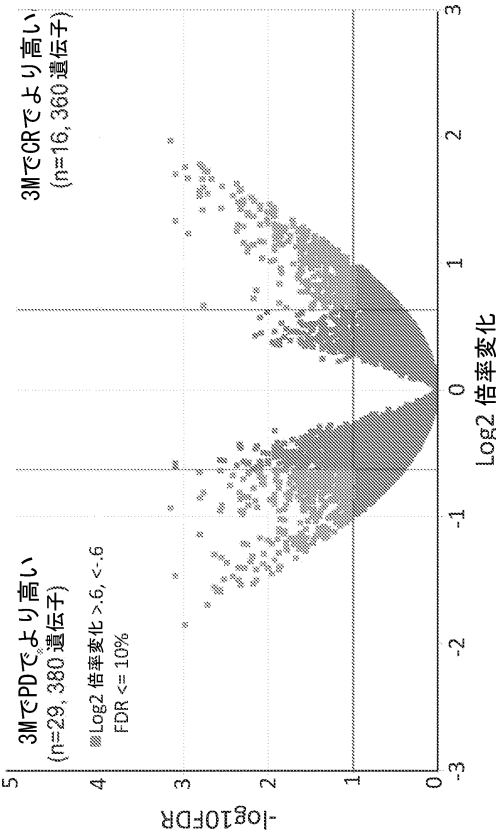
30

40

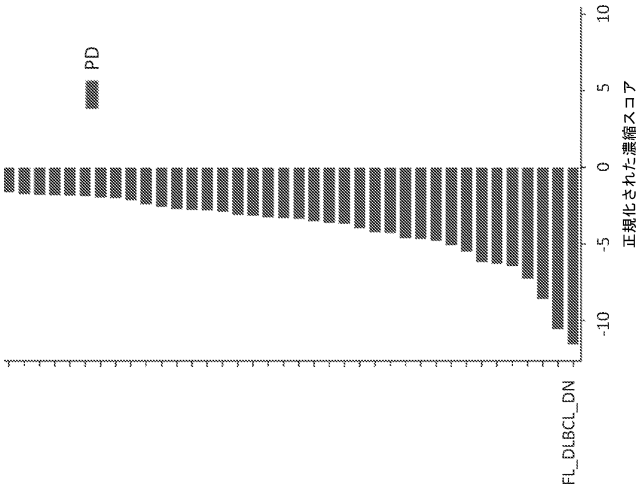
#	配列	アノテーション
	cagcggcgaggggcagcaccaagggcgaggtgaagctgcaggaaagcggcc ctggcctggtggccccccagccagagcctgagcgtgacctgcaccgtgagc ggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctggatccggcagccccccag gaagggcctggaatggctgggcgtgatctggggcagcgcgagaccacctact acaacagcgcacctgaagagccggctgaccatcatcaaggacaacagcaag agccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccat ctactactgcgccaagcactactactacggcggcagctacgccatggact actggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc	
58	X ₁ PPX ₂ P X ₁ はグリシン、システインまたはアルギニンである X ₂ はシステインまたはスレオニンである	ヒンジ
59	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	リンカー

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



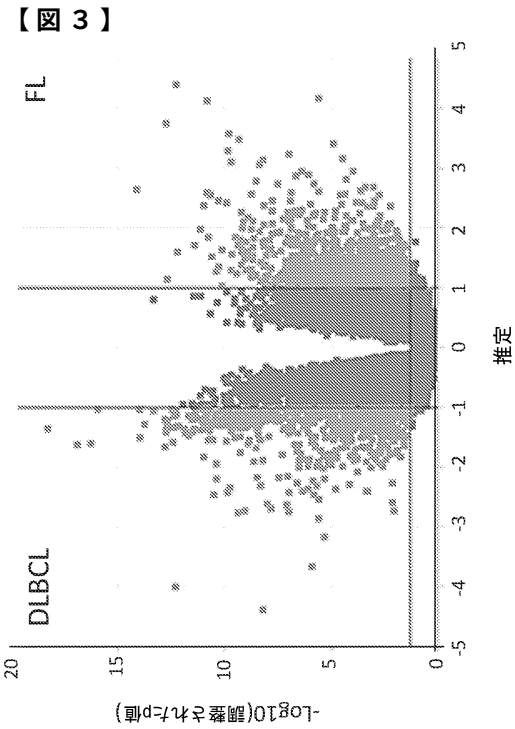
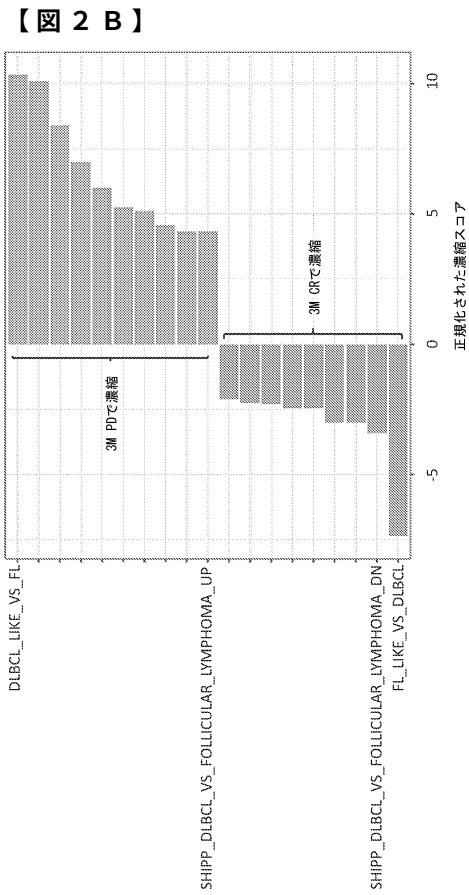
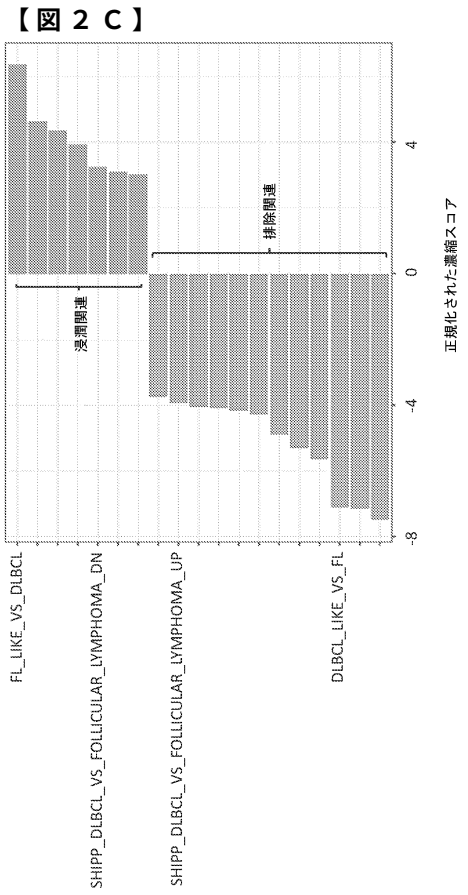
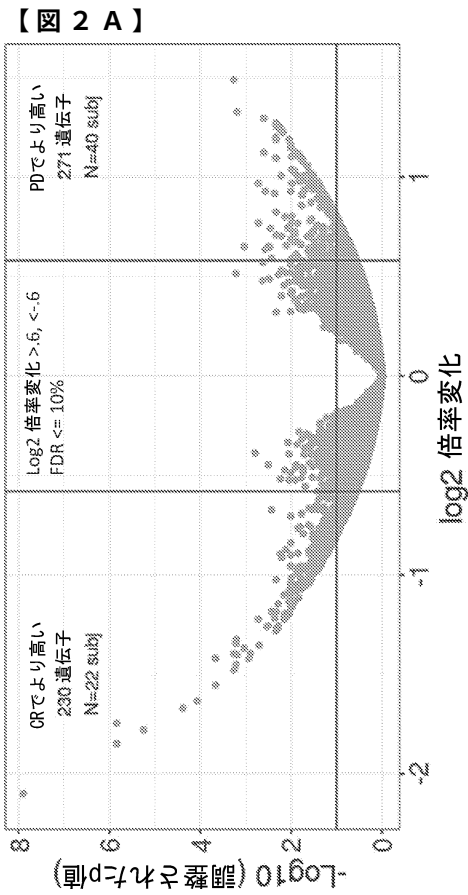
10

20

30

40

50



10

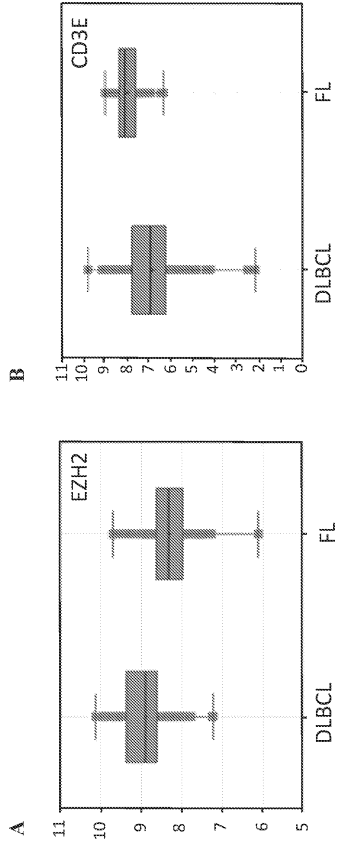
20

30

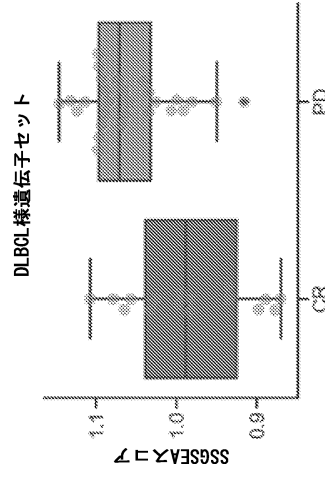
40

50

【図 4】



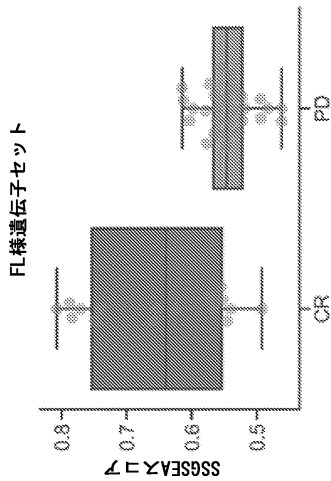
【図 5 A】



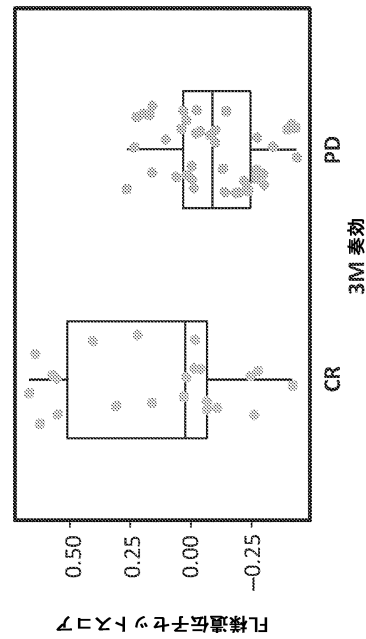
10

20

【図 5 B】



【図 5 C】

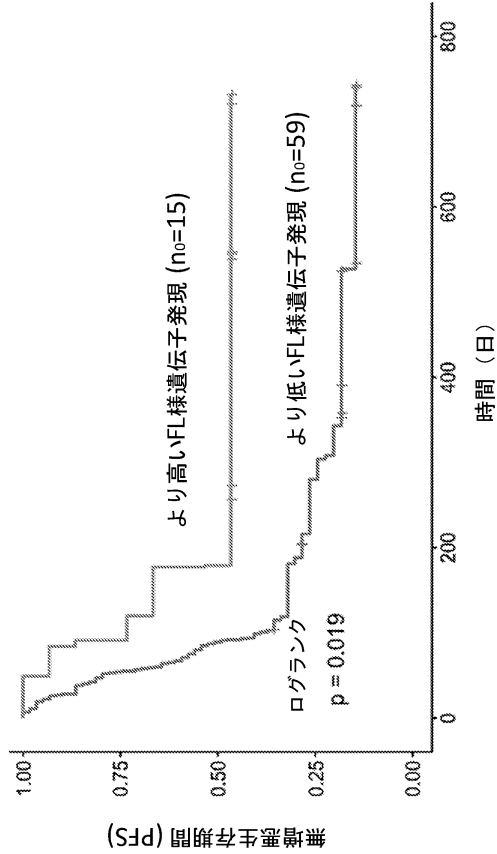


30

40

50

【図 5 D】



【配列表】

202351343400001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/014775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 A61P35/00 C07K14/725 C07K16/28 C12N5/0783 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K C12N A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Cameron J Turtle ET AL: "JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib", 10 September 2017 (2017-09-10), pages 3010-3020, XP55601636, Retrieved from the Internet: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5590803/pdf/JCO.2017.72.8519.pdf [retrieved on 2019-07-02] methods, appendix, clinical trial design ----- -/--	1-82
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
5 May 2021		18/05/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fellows, Edward

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/014775

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/214207 A2 (JUNO THERAPEUTICS INC [US]; FRED HUTCHINSON CANCER RES CENTER [US]) 14 December 2017 (2017-12-14) example all -----	3,4,6,7, 10-13, 19-23, 25-30, 32,33, 37, 45-62, 64-69, 75-78
X	WO 2019/213184 A1 (JUNO THERAPEUTICS INC [US]) 7 November 2019 (2019-11-07) example all -----	3,4,6,7, 10-13, 19-23, 25-30, 32,33, 37, 45-62, 64-69, 75-78
X	WO 2016/191755 A1 (BOT ADRIAN [US]; WIEZOREK JEFFREY S [US] ET AL.) 1 December 2016 (2016-12-01) paragraph [0207]; example all -----	3,4,6,7, 10-13, 19-23, 25-30, 32,33, 37, 45-62, 64-69, 75-78
X	WO 2016/191756 A1 (BOT ADRIAN [US]; WIEZOREK JEFFREY S [US] ET AL.) 1 December 2016 (2016-12-01) paragraph [0215]; example all -----	3,4,6,7, 10-13, 19-23, 25-30, 32,33, 37, 45-62, 64-69, 75-78

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/014775

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/014775

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017214207 A2	14-12-2017	AU 2017277396 A1 BR 112018074406 A2 CA 3024725 A1 CN 109562151 A EP 3463437 A2 JP 2019517589 A KR 20190026740 A US 2020016199 A1 WO 2017214207 A2	29-11-2018 06-03-2019 14-12-2017 02-04-2019 10-04-2019 24-06-2019 13-03-2019 16-01-2020 14-12-2017
WO 2019213184 A1	07-11-2019	AU 2019261986 A1 BR 112020022185 A2 CA 3098497 A1 CN 112584902 A EP 3787751 A1 SG 11202010642T A US 2021121466 A1 WO 2019213184 A1	26-11-2020 02-02-2021 07-11-2019 30-03-2021 10-03-2021 27-11-2020 29-04-2021 07-11-2019
WO 2016191755 A1	01-12-2016	AU 2016268863 A1 BR 112017025120 A2 CA 2986793 A1 CL 2017003005 A1 CN 107921064 A DO P2017000272 A EA 201792642 A1 EP 3302507 A1 HK 1246150 A1 HK 1251960 A1 JP 2018516919 A KR 20180011251 A PH 12017502153 A1 SG 10201913620Q A SG 10201913623P A US 2018344767 A1 WO 2016191755 A1	07-12-2017 07-08-2018 01-12-2016 11-05-2018 17-04-2018 15-02-2018 31-10-2018 11-04-2018 07-09-2018 03-05-2019 28-06-2018 31-01-2018 28-05-2018 30-03-2020 30-03-2020 06-12-2018 01-12-2016
WO 2016191756 A1	01-12-2016	AU 2016268864 A1 BR 112017025166 A2 CA 2986798 A1 CL 2017003006 A1 CN 107921066 A DO P2017000271 A EA 201792649 A1 EP 3302508 A1 HK 1246151 A1 HK 1248141 A1 JP 2018516915 A KR 20180011250 A PH 12017502154 A1 SG 10201913604T A SG 10201913613S A TW 201717962 A US 2016346326 A1 US 2017368101 A1 US 2018369283 A1 WO 2016191756 A1	07-12-2017 31-07-2018 01-12-2016 11-05-2018 17-04-2018 15-02-2018 29-06-2018 11-04-2018 07-09-2018 12-10-2018 28-06-2018 31-01-2018 28-05-2018 27-02-2020 30-03-2020 01-06-2017 01-12-2016 28-12-2017 27-12-2018 01-12-2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	

(32)優先日 令和2年8月21日(2020.8.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433
弁理士 梅村 幸輔

(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 100214396
弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ファラジ タリア
アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0 0 ス
イト 1 2 0 0

F ターム (参考) 4C085 AA02 BB01 BB11 BB18 CC03 DD62 EE01 GG02
4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 MA66 NA14 ZB27

【要約の続き】

