

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-505852
(P2015-505852A)

(43) 公表日 平成27年2月26日(2015.2.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/26 (2015.01)	A 6 1 K 35/26 Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	4 C 0 8 1
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	4 C 0 8 7
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/22	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-546634 (P2014-546634)
 (86) (22) 出願日 平成24年12月12日 (2012.12.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月30日 (2014.7.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2012/053114
 (87) 国際公開番号 W02013/088148
 (87) 国際公開日 平成25年6月20日 (2013.6.20)
 (31) 優先権主張番号 1121308.9
 (32) 優先日 平成23年12月12日 (2011.12.12)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 514100290
 セル・メディカ・リミテッド
 イギリス・ロンドン・NW1・O Q G・セント・パンクラス・ウェイ・8-14・カナル・サイド・スタジオズ・1
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

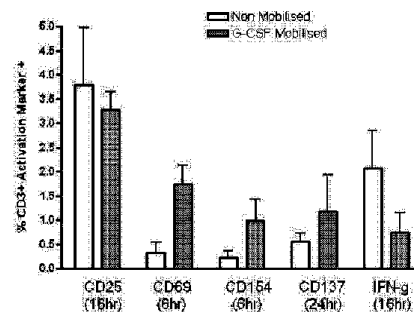
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動員ドナーからの治療用T細胞生成物を用いる処置方法

(57) 【要約】

本発明の開示は、処置を必要とする患者を、動員血液試料または動員アフェリシス試料から選択されるかおよび/または拡大される治療の有効量の治療用T細胞集団を投与することを包含する免疫再構築療法で処理する方法であって、選択が定常状態マーカーおよび/または活性化マーカーとその後の拡大に基づいており、あるいは拡大が抗原、例えばウイルス抗原の存在下である方法を提供する。該方法は、前記の治療用T細胞集団およびそれから獲得可能な生成物の生成方法にも及ぶ。

Figure 3 Optimal time of expression of activation markers in response to CMVpp65 stimulation in G-CSF mobilised (n=5) and non-mobilised (n=5) PBMC.



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

処置を必要とするヒト患者を、動員血液試料または動員アフェレシス試料から選択されるか、および/または拡大される治療的有効量の治療用 T 細胞集団を投与することにより免疫再構築療法で処置する方法であって、選択が、定常状態マーカーおよび/または活性化マーカーに、任意にその後の拡大に基づいており、あるいは拡大が抗原、例えばウイルス抗原の存在下である、方法。

【請求項 2】

前記患者が、造血幹細胞移植後である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 T 細胞集団が抗原特異的 T 細胞集団である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗原特異的 T 細胞集団が、ウイルス、例えば、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、BKウイルス、ヒトパピローマウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスおよびヒト T リンパ好性ウイルスからなる群から選択されるウイルス、例えばサイトメガロウイルスまたはアデノウイルスに特異的である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

ヒト療法、例えば免疫再構築療法に用いるための、動員血液試料または動員アフェレシスから選択されるか、および/または拡大される治療用 T 細胞集団、またはそれを含む薬学的組成物であって、選択が、定常状態マーカーおよび/または活性化マーカーに、任意にその後の拡大に基づいており、あるいは前記拡大が抗原、例えばウイルス抗原の存在下である、治療用 T 細胞集団またはそれを含む薬学的組成物。

【請求項 6】

前記療法が、造血幹細胞移植後患者のための免疫再構築療法である、請求項 5 に記載の治療用 T 細胞集団またはそれを含む薬学的組成物。

【請求項 7】

前記 T 細胞集団が抗原特異的 T 細胞集団である、請求項 5 または 6 に記載の治療用 T 細胞集団またはそれを含む薬学的組成物。

【請求項 8】

前記抗原特異的 T 細胞集団が、ウイルス、例えば、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトパピローマウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、BKウイルス、エプスタイン・バーウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスおよびヒト T リンパ好性ウイルスからなる群から選択されるウイルスからなる群から選択されるウイルス、例えばサイトメガロウイルスまたはアデノウイルスに特異的である、請求項 7 に記載の治療用 T 細胞集団またはそれを含む薬学的組成物。

【請求項 9】

前記集団が、例えば特定の H L A : ペプチド複合体、特にテトラ、ペンタおよび/またはヘキサ S t r e p t a m e r による T 細胞受容体の可逆的結紮により、定常状態マーカー、すなわち T 細胞受容体を基礎にして直接的に選択される、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の治療用 T 細胞集団または薬学的組成物。

【請求項 10】

前記活性化マーカーが抗原刺激の結果として上方調節される細胞表面マーカー、例えば C D 2 5、C D 6 9、C D 1 3 7 および C D 1 5 4 からなる群から選択されるものである、請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の治療用 T 細胞集団または薬学的組成物。

【請求項 11】

前記 T 細胞生成物が、特に抗原特異的方式で拡大される拡大 T 細胞生成物である、請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の治療用 T 細胞集団または薬学的組成物。

【請求項 12】

前記集団が、C D 2 5 マーカーを有する細胞に関して実質的に陰性である、請求項 5 ~

10

20

30

40

50

11のいずれか一項に記載の治療用T細胞集団または薬学的組成物。

【請求項13】

前記T細胞集団が同種異系である、請求項5～12のいずれか一項に記載の治療用T細胞集団または薬学的組成物。

【請求項14】

免疫再構築療法のための医薬品の製造のための、請求項5～13のいずれかで定義されるような治療用T細胞集団または薬学的組成物の使用。

【請求項15】

動員血液または動員アフレスシス試料からのウイルスに特異的である標的T細胞集団を選択し、および/または拡大する方法であって、選択が、T細胞の表面の定常状態マーカーまたは活性化マーカーをターゲティングすることを用い、そして拡大が、特に同種異系ドナーに由来する抗原特異的T細胞集団の拡大に適した条件を用いる、方法。

10

【請求項16】

前記標的抗原が、例えばDNAウイルスまたはRNAウイルスから選択されるウイルス抗原、例えばDNAウイルスである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記ウイルスが、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトパピローマウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、BKウイルス、エプスタイン・バーウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスおよびヒトTリンパ好性ウイルス、例えばサイトメガロウイルスまたはアデノウイルスからなる群から選択される、請求項16に記載の方法。

20

【請求項18】

前記定常状態マーカーが、T細胞受容体(TCR)であり、例えば前記T細胞集団が、直接選択の工程において特定のHLA：ペプチド複合体によるTCRの可逆的結紮により選択される、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記直接選択が、多量体HLA：ペプチド複合体、例えばテトラ-、ペンタ-、ヘキサ-およびStreptamerを用いる、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記HLAペプチドまたは多量体が、特定のHLA型、例えばA1、A2、B7、A24、B35、例えばA0201またはB0702を有する、請求項18または19に記載の方法。

30

【請求項21】

前記活性化マーカーが、抗原刺激の結果として上方調節される細胞表面マーカー、例えばCD25、CD69、CD137、CD154およびその組合せから選択されるものである、請求項15～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記T細胞集団が、このような活性化マーカーに対して向けられる単量体、二量体または多量体抗体または抗体断片による活性化マーカーの可逆的結紮により選択される、請求項21に記載の方法。

40

【請求項23】

前記定常状態マーカーが、標的ウイルスに関連した刺激に曝露後5～25時間、例えば6～24時間で発現される、請求項21または22に記載の方法。

【請求項24】

前記標的T細胞集団が、特に抗原の存在下で、T細胞拡大培地中で培養することにより拡大される、請求項15～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記標的細胞集団が、定常状態または活性化マーカーによる前もっての選択なしに、動員アフレスシスから選択的に拡大される、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 26】

前記拡大が迅速拡大工程、例えば15日以下、例えば14、13、12、11、10、9、8または7日、例えば約10日である、請求項24または25に記載の方法。

【請求項 27】

前記培地が、拡大期間に亘って、変化しないまま且つ補足されないままである、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

請求項15～27のいずれか一項に記載の方法から得られるかまたは獲得可能であるウィルス特異的拡大T細胞生成物またはそれを含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明の開示は、例えば免疫再構築のための、動員血液試料からのT細胞免疫療法製品を調製するための方法、上記方法から得られるT細胞集団およびそれを含む薬学的組成物に関する。本開示は、例えば、ウィルス感染、例えばCMVおよびアデノウィルス感染の処置または予防における療法、特に免疫再構築療法に用いるためのT細胞集団および上記薬学的処方物も提供する。

【背景技術】**【0002】**

免疫無防備状態患者は、日和見ウィルス感染に感受性である。これは骨髄移植患者において非常に大きな問題であるが、それは、彼らの免疫細胞が、時として、骨髄移植手順の一部として意図的に激減され、他の場合には、骨髄移植の一般的合併症である移植片対宿主病(GvHD)のためのステロイド処置のために非機能性にされる。潜在性ウィルス、例えばCMVおよびアデノウィルスは、再活性化されるようになり、身体は感染と闘うことができない。

【0003】

免疫再構築の実行が開発されてきたが、これは、適合HLAドナー(通常、骨髄または末梢幹細胞移植を提供する同一ドナー)からの免疫細胞の移植患者への移植片(養子免疫伝達)を包含する。ドナーの造血幹細胞の移植により患者自身の免疫系が完全に再構築され、次いで、多様な一連の血液細胞および免疫細胞に発達するまで、これらの細胞は、患者に移植して病原体に対する長期免疫を提供するか、あるいは感染と闘う場合に少なくともも暫時の手助けを提供する。

【0004】

骨髄移植後の患者における免疫再構築を達成するためのドナー免疫細胞の養子免疫伝達への臨床研究の時期は、このアプローチの利益ならびに当該アプローチを最適化して一貫した有効且つ安全な結果を保証するという難題を例証してきた。いくつかの場合、特定の病原体に対する免疫再構築を実行するために必要なドナー免疫細胞の数は、単なる機械的選択システムにより獲得できない。ドナー試料からの細胞の拡大の工程は、一般的に約21日を要し、関連細胞集団の考え得る最高数(収量)ならびに関連細胞集団の考え得る最高純度を得るために、例えばできるだけ所望細胞の100%に近い集団を獲得するために、特定の細胞を拡大することが主眼であった、ということ従来技術は示している。

【0005】

細胞の出発集団は、ドナー由来の血液試料または専用アフレスシス生成物から得られる。以下で考察される理由のため、ドナーがGCSF処置を受けたことがなく、したがって動員血液試料でない場合、現行作業は、アフレスシス生成物が専用アフレスシスで収穫されるというものである。

【0006】

組換えヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)による動員は、臓器提供前の循環におけるドナー幹細胞の数を増大するために用いられる。これは、骨髄移植とは対照的に、末梢血幹細胞移植を可能にする。末梢血幹細胞移植は、骨髄移植を上回る多数の利点を有

10

20

30

40

50

する。

【0007】

現行作業は、ドナーから患者への幹細胞移植後、動員の効果が落ち込んだ場合、患者の免疫応答を増大するために、治療用T細胞生成物を生成するために用いられ得るさらなる非動員血液試料またはアフェレシスを提供するよう、将来的時点でドナーを戻す必要があるということである。T細胞生成物は、試料からの細胞の小群から選択され得るし、および/または血液またはアフェレシス試料の分画から拡大され得る。

【0008】

二次手順のために戻さねばならないことは、ドナーに関して非常に不便であり、非遵守を生じ得るが、これは、患者の免疫応答を増大するために拡大T細胞生成物を生成するために、時として、血液試料または白血球アフェレシスが利用可能でない、ということの意味する。

10

【0009】

一般に、動員血液は拡大T細胞生成物を生成するために用いられないが、それは、動員血液は非動員血液と同一特性を有さず、特に、動員血液中のT細胞における活性低減が認められ得るということを経験的研究が確立しているためであって、例えばMielcar ek等は、Blood, March 1, 1997 vol. 89 no. 5 1629-1634で、顆粒球コロニー刺激因子-動員末梢血単核球由来のCD14⁺細胞による同種異系抗原誘導性T細胞増殖の抑圧を記載している。

【0010】

in vivoでのG-CSF刺激直後に、ヒトおよびネズミT細胞は、細胞傷害性活性低減を示す。増殖応答低減も、in vitro刺激時に観察される。

20

【0011】

Reyes等は、British Journal of Cancer (1999) 80 (1/2), 229-235において、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が、如何にして有糸分裂刺激T細胞増殖応答を一時的に抑圧するかを記載している。

【0012】

G-CSF動員は、単一細胞レベルとしての分泌の抑制を介してT細胞による1型サイトカイン産生を抑制し、ならびに末梢におけるサイトカイン分泌細胞の分画を低減し；養子免疫療法におけるこれらの細胞の使用に反対の結論を示す、ということを経験研究は示唆している(Pan et al 1999, Arpinati et al 2000 and Tayebi et al 2001)。

30

【0013】

動員血液からのある細胞のこの機能性低減は、多数の著者により確認された(例えば、Joshi et al - Decreased immune functions of blood cells following mobilization with granulocyte colony-stimulating factor: association with donor characteristics Blood, 15 September 2001 Vol 98, No 6, 1963-1970、およびNawa et al G-CSF reduces IFN- and IL-4 production by T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function, Bone Marrow Transplantation (2000) 25, 1035-1040参照)。

40

【0014】

G-CSFは、免疫寛容においてある役割を有するとも考えられた(例えば、Anke Franzke's review in Cytokine & Growth Factor Reviews 17 (2006) 235-244 entitled the role of G-CSF in adaptive immunity and Rutella et al granulocyte colony-sti

50

mulating factor: a novel mediator of T cell tolerance, The Journal of Immunology 2005 7085-7097参照)。移植細胞に対する免疫寛容は望ましいが、患者の免疫応答を増大するために治療用T細胞生成物を生成する場合、全身免疫寛容は望ましくない。実際、寛容は、T細胞アナジーまたは低応答性と何らかの関連を有し得る。

【0015】

他の研究は、G-CSFがT細胞集団を、細胞内ウイルス感染を制御するに際してあまり有効でないTh2群向きにし得ることを示唆している。

【0016】

したがって、当該分野における業務は、拡大T細胞生成物の調製のために動員血液を用いないことである。

【0017】

動員血液からのin vitro T細胞は、図6によれば、インターフェロン・ガンマ（抗原刺激性T細胞に関する活性化マーカー）をあまり分泌できないと思われるが、それにもかかわらず、当該細胞は、T細胞治療用生成物として用いるのに適している、と本発明人等は考える。インターフェロン・ガンマは免疫応答に関与する前炎症性サイトカインであり、このサイトカインの低レベルの分泌は一般的に動員血液からのT細胞の低活性を示している、と当業者は自然に考えるため、この観察は普通では信じがたい。しかしながら、動員血液から抗原特異的T細胞を選択し、拡大することができ、動員細胞環境から一旦得られると、これらの細胞は非動員血液からのT細胞に対して機能の点で劣らない。

【0018】

実際、G-CSF動員血液または動員アフエレシスから選択されおよび/または拡大される治療用T細胞生成物は、造血幹細胞移植後患者にin vivo投与した場合、安全且つ有効であるということ、意外にも本発明人等は確立した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

一実施形態では、それを必要とするヒト患者を、特に、患者が造血幹細胞移植後である場合、G-CSF動員血液試料または動員アフエレシスから選択されるか、および/または拡大される治療的有効量の治療用T細胞集団を投与することにより免疫再構築療法で処置する方法が提供される。

【0020】

本発明の開示は、G-CSF動員血液試料から選択され、および/または拡大される、あるいは処置に、特に造血幹細胞移植後患者の処置に用いるための治療用T細胞集団も提供する。

【0021】

一実施形態では、治療用T細胞集団は、抗原特異的T細胞集団である。

【0022】

一実施形態では、抗原特異的T細胞集団は、ウイルス、例えば、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトパピローマウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、BKウイルス、エプスタイン・バーウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスおよびヒトTリンパ好性ウイルスからなる群から選択されるウイルス、例えばサイトメガロウイルスまたはアデノウイルスに特異的である。

【0023】

一実施形態では、ウイルスはサイトメガロウイルスである。

【0024】

一実施形態では、治療用T細胞集団は、ウイルス感染、特に本明細書中に記載される特定のウイルス感染またはその組合せを処置するのに適している。

【0025】

一実施形態では、T細胞は、同種異系であり、すなわち、HLA適合ドナー、特に完全

10

20

30

40

50

適合ドナーに由来する。

【0026】

一実施形態では、T細胞集団は、定常マーカー、例えばT細胞受容体(TCR)に基づいて選択される。

【0027】

一実施形態では、T細胞集団は、マーカー、例えばCD25、CD69、CD137およびCD154から独立して選択されるマーカー、ならびにその組合せ、例えばCD69、CD137およびCD154およびその組合せを基礎にして選択される。

【0028】

選択後、細胞集団は、患者に利用可能な細胞の用量を増大するために拡大され得る。

10

【0029】

代替的には、細胞の出発集団は、抗原の存在下で拡大され得る。この工程は、天然選択要素を包含したが、この場合、当該工程は、抗原に特異的な細胞を特定の培養し、非標的細胞集団は低減されるかまたは排除される。

【0030】

一実施形態では、T細胞の集団は、有意量の細胞表面マーカーCD25を含まない。

【0031】

一実施形態では、治療用T細胞生成物は、G-CSF動員アフエレンシスから選択される。

【0032】

一実施形態では、治療用T細胞生成物は、G-CSF動員血液試料から拡大される。

20

【0033】

動員試料由来の細胞は、*in vitro*でのインターフェロン・ガンマ分泌のレベル低減を示し得る。それにもかかわらず、これらの細胞が機能しており、*in vitro*特性にもかかわらず治療用生成物に用いるのに適している、ということを示唆する証拠を、本発明人等は有する。これは、関連集団の選択に関して実際的困難を生じるが、それは、ガンマ捕捉のような方法に基づいた関連T細胞集団の選択が次善の選択であるためである。したがって、選択が用いられるべきである場合、定常状態T細胞マーカーおよび/または活性化マーカーが用いられなければならない。一実施形態では、これは、刺激ステップと、その後の細胞表面マーカー、例えばCD154に関する選択を用いるが、他の実施形態では、これは直接選択方法、例えばT細胞受容体-Streptamer選択に基づいた方法を用いる。

30

【0034】

したがって、実際、動員血液がT細胞生成物の調製のための適切な出発材料であり、そして動員血液試料からの出発T細胞集団からのウイルスに特異的である標的T細胞集団を選択し、および/または拡大する方法も提供されるが、この場合、選択は、T細胞の表面の定常状態マーカーをターゲティングする直接選択を用い、拡大は、標的ウイルス特異的T細胞集団の拡大に適した条件を用いる。

【0035】

T細胞生成物の調製のための動員血液試料の使用に関連した否定的開示を仮定すると、当該材料が、実際、首尾よく用いられ得る、ということは非常に意外である。付加的には、動員血液試料の使用は、拡大T細胞療法が、従来技術の方法によりドナーに生じた不便や欠点なしに、より多くの患者に利用可能であるため、本発明の開示による方法は、ドナー、患者および健康管理従業者に非常に大きな利点を提供する。

40

【0036】

二次試料の収集、運搬および貯蔵は有意量の付加的な人的および財政的供給源を要するため、本発明の方法に関連した有意の省資源化も存在する。

【0037】

さらに、動員血液からのT細胞を用いる免疫療法を提供し得ることは、治療用生成物が供与直後に調製され、それにより、非動員試料を得ることに伴う「時間差」を回避し、次

50

いで、それを加工処理して、治療用生成物を提供し得る、というさらなる利点を有し得る。

【0038】

最後に、ドナーは、付加的医学的介入を受けなければならないということはなく、したがって、付加的白血球アフェレシス手順に関連した危険におかれない。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】非対合G-CSF動員(n=6)および非動員(n=6)ドナーにおける機能プロフィール。16時間CMVpp65刺激後の培養の上清中のIL-2、TNF、IFN-、IL-10、IL-4およびIL-5の定量的査定。サイトカインの濃度は、陰性対照(非刺激)を差し引いたのちの正味値として表される。

10

【図2】非対合G-CSF動員(n=6)および非動員(n=6)ドナーにおけるIFN-g分泌抗原特異的T細胞の同定および単離。(2A)PBMCをCMVpp65で16時間刺激して、IFN-分泌細胞の頻度をCD3+T細胞の間で分析した。(2B)IFN-分泌細胞を磁気細胞選別を用いて単離して、純度および収率をCD3+集団内で確定した。

【図3】G-CSF動員(n=5)および非動員(n=5)PBMCにおけるCMVpp65刺激に応答する活性化マーカーの発現の最適時間。PBMCを24時間にわたって刺激して、1、4、6、16および24時間でのCD25、CD69、CD154およびCD137発現に関して、試料を分析した。IFN-分泌を、16時間で分析した。バーは、発現の最適時間での各活性化マーカーに関するCD3+集団における正味発現を表す。

20

【図4】4および6時間でのCD154表面発現のG-CSF動員および非動員ドナー間の直接比較。(4A)PBMCを、CD40-特異的抗体(1μg/ml)の存在下または非存在下で、CMVpp65PeptivatorまたはSEBで刺激した。細胞をCD3+CD4+T細胞上でゲート制御する。(4B、C)非動員(n=5)およびG-CSF動員(n=5)ドナーにおけるCD154発現の比較。データは、標準偏差(SD)を伴う平均として示される。

【図5】2つの非対合ドナーにおけるCD154発現によるCMV特異的T細胞の単離。(A)非動員およびG-CSF動員ドナーからのPBMCを、CD40特異的抗体の存在下で6時間、CMVpp65Peptivatorで刺激した。刺激前、刺激後、そしてMiniMACSでのCD154+T細胞の選別後に、CD3+リンパ球の中でCD154に関して、細胞を染色した。(B)G-CSF動員(n=4)および非動員(n=4)PBMCにおけるCMVpp65刺激後に、CD154+からの陽性分画を選別する。データは、SDを伴う平均として示される。

30

【図6】拡大CD154+T細胞の再刺激。(A)培養中で21日後、再刺激前のCD3およびCD4に関して染色された拡大CD154+T細胞。(B)CD40特異的抗体の存在下で6時間、CMVpp65を用いた場合と用いない場合で、拡大CD154+を、自系PBMCと共培養した。刺激後、CD154対CD69の発現を分析した。(C)G-CSF動員(n=3)および非動員(n=3)PBMCからのCD154+拡大細胞を、CD154、CD69に関して分析した。(D)G-CSF動員PBMCからの拡大CD154+を、プレフェルジンAおよびCD28特異的抗体の存在下で、前期と同様に刺激した。細胞を固定し、透過性にして、CD154対IL-、TNFおよびIFN-の発現に関して分析した。(E)G-CSF動員(n=3)および非動員(n=3)PBMCにおいて自系CMVpp65PBMCで再刺激後のIL-2、IFN-およびTNF発現の分析。データは、SDを伴う平均として示される。

40

【図7】G-CSF動員PBMCから単離されたCD154+CMV特異的T細胞は標的細胞を有効に死滅させる。蛍光染料カルセイン-AM細胞傷害性検定を用いて、50:1~0.5:1のE:T比で、CMVpp65を負荷した自系PHA芽球の特異的溶解を確定した。

50

【図 8】迅速拡大工程（G-r e x 4 0 培養装置ならびに I L - 4 および I L - 7 使用）を用いて、動員アフェレシス生成物の試料を 1 0 日間拡大させた。次いで、細胞を培地単独（非刺激）または C M V p p 6 5 ペプチドで再刺激した。フローサイトメトリーにより、I F N ガンマ産生の量を測定した。細胞を、肝臓リンパ球および C D 3 でゲート処理した。このプロットは、Q 1 において、動員血液からの拡大細胞の所望の集団がインターフェロン・ガンマを分泌し得ることを示す。このプロットで示されるプロファイルは、非動員血液から拡大された細胞に関して同一条件下で得られるプロファイルに匹敵する、と当業者は理解する。

【図 9】迅速拡大工程（G-r e x 4 0 培養装置ならびに I L - 4 および I L - 7 使用）を用いて、動員アフェレシス生成物の試料を 1 0 日間拡大させた。次いで、細胞を培地単独（非刺激）または A D V H e x o n V ペプチドで再刺激した。フローサイトメトリーにより、I F N ガンマ産生の量を測定した。細胞を、肝臓リンパ球および C D 3 でゲート処理した。このプロットは、Q 1 において、動員血液からの拡大細胞の所望の集団がインターフェロン・ガンマを分泌し得ることを示す。このプロットで示されるプロファイルは、非動員血液から拡大された細胞に関して同一条件下で得られるプロファイルに匹敵する、と当業者は理解する。

【図 1 0】動員アフェレシス生成物の試料を幹細胞収穫物から得て、加工処理のために C e l l M e d i c a に送った。細胞を特定の S t r e p t a m e r 選択試薬に曝露して、C l i n i M A C S を用いて選択した。次に、これを、患者への投与のために 3×10^4 T 細胞 / k g で用量投与した。C M V 特異的 T 細胞受容体（ストタンパク質陽性）を発現する細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより測定した。これは、非動員生成物と等価の用量および純度で、T 細胞が動員アフェレシス試料から首尾よく得られ、患者に安全に投与され得る、ということを示している。

【図 1 1】リンパ球および C D 3 でゲート制御された図 1 0 からの細胞を示す。

【図 1 2】抗原特異的 T 細胞が、動員される元の試料から得られる場合でさえ、機能性である、ということを示す。

【図 1 3】抗原特異的 T 細胞が、動員される元の試料から得られる場合でさえ、機能性である、ということを示す。

【図 1 4】難治性 C M V 感染患者を処置するために用いられるガンマ捕捉により選択される治療用 T 細胞の試料ならびにそれが得られる出発材料の分析を示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 0】

詳細な説明

動員血液は、本明細書中で用いる場合、G - C S F のような作用物質での処置により動員されたドナーからの血液試料を指す。動員の工程は、末梢血中の幹細胞の数を増大する。

【0 0 4 1】

アフェレシスは、本明細書中で用いる場合、血液から 1 つ以上の特定の構成成分を分離して取り出して、残りをドナーの循環中に戻す機器をドナーの血液が通過する工程の生成物である。

【0 0 4 2】

アフェレシスは、肝細胞移植に用いられる白血球アフェレシスを生じるために用いられる。

【0 0 4 3】

幹細胞移植のための調製において、白血球アフェレシス生成物は、C D 3 4 + 幹細胞に関する選択を受け得る。副生成物は、C D 3 4 分画として既知のこの工程から得られる。有益であるのは、本発明の工程がこの副生成物を用いて、治療用 T 細胞集団を選択し、または拡大し得ることである。一実施形態では、アフェレシスは C D 3 4 分画である。

【0 0 4 4】

アフェレシスは、それが潜在的に、出発材料中の多数の細胞、例えば 100 億 ~ 100

10

20

30

40

50

0億個の細胞、例えば200億、300億、400億、500億、600億、700億、800億または900億個の細胞に近づく方法を提供する、という点でも有益である。細胞のこの数は、選択のみにより、すなわちその後の拡大のための要件なしに、T細胞の適切な治療用量を生じるのに十分である。

【0045】

対照的に、血液試料は、2000万個の領域の細胞を含有するに過ぎない。したがって、出発材料が血液試料または相対的に少数の細胞を含有する血液である場合には、拡大ステップは、一般的に、患者に必要な治療用量の細胞を生じることを必要とする。

【0046】

動員アフェレシスは、本明細書中で用いる場合、G-CSFのような作用物質での処置により動員されたドナーからの試料を指す。動員の工程は、末梢血中の幹細胞の数を増大する。

10

【0047】

本発明の工程の種々の変形が存在するが、これらを以下に要約する：

1. 治療用量を提供するためのTCRマーカのような定常状態マーカに基づいた直接選択（出発材料アフェレシス）、
2. 治療用量を提供するための本明細書中に記載されるような活性化マーカに基づいた選択（出発材料アフェレシス）、
3. 治療用量を提供するための定常状態マーカに基づいた直接選択とその後の拡大（出発材料血液またはアフェレシス）、
4. 治療用量を提供するための活性化マーカに基づいた選択とその後の拡大、
5. 治療用量の抗原特異的T細胞集団を生成するための抗原の存在下での拡大（出発材料血液またはアフェレシス）。

20

【0048】

免疫再構築は、本明細書中で用いる場合、免疫応答を生じるためのメカニズムを宿主に提供すること、あるいは健常個体と同様に宿主の免疫応答を増大することを指すよう意図される（そうでなければ、宿主の応答は、損傷のために最小限であるかまたは存在しない）。

【0049】

一実施形態では、造血幹細胞移植は、別記しない限り、関連または非関連ドナーからの、または臍帯血からの幹細胞供与を伴う手順を含めた同種異系造血幹細胞移植（アロHSC T）、例えば末梢幹細胞移植である。

30

【0050】

処置に有効とは、本明細書中で用いる場合、患者への投与に関して安全であり、非動員血液由来の従来技術のT細胞療法と少なくとも後半に匹敵する療法を指す。

【0051】

本発明の開示の状況における療法は、予防的療法を包含し、これは、免疫再構築の状況では標準業務である。

【0052】

「細胞」は、当該技術分野で一般に用いられる用語であり、胸腺細胞、未熟Tリンパ球、成熟Tリンパ球、残りのTリンパ球または活性化Tリンパ球を含めたすべてのCD3+細胞を包含するよう意図される。T細胞は、Tヘルパー（Th）細胞、例えばTヘルパー1（Th1）またはTヘルパー2（Th2）細胞であり得るが、しかしT細胞集団の他の群が、集中的研究に基づいて発見されつつある。T細胞は、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4+CD8+T細胞、CD4-CD8-T細胞またはT細胞の任意の他の部分集合であり得る。

40

【0053】

細胞生成物は、本明細書中で用いる場合、療法、例えば免疫再構築療法に用いるのに適したT細胞の集団を指す。

【0054】

50

標的T細胞集団を拡大することは、本明細書中で用いる場合、例えば、適切な培地中で細胞の出発集団を培養することにより、細胞分裂の結果として細胞の一集団中の標的細胞の数を増大することを指すよう意図される。

【0055】

細胞拡大は、生育可能なCD3+細胞（すなわち、細胞の標的集団）を計数することにより評価され得る。

【0056】

生育可能細胞は、トリパンブルー（および光学顕微鏡）または7-アミノアクチノマイシンD、670nmで発光する生体染料（またはViaProbe：7AADの市販の簡易溶液）およびフローサイトメトリーでの細胞染色により、ならびに当該技術分野で既知の技法を用いることにより、試験され得る。染色が細胞中に浸透する場合、細胞は生育可能でないともみなされる。染料を取り込まない細胞は、生育可能であるとみなされる。例示的一方法は、約100 μ Lの細胞懸濁液当たり約5 μ Lの7AADおよび約5 μ Lのアネキシン-V（リン脂質結合タンパク質：これは、アポトーシス中に曝露される外部リン脂質ホスファチジルセリンと結合する）を用い得る。この混合物は、光の非存在下で、周囲温度で約15分間、インキュベートされ得る。次いでフローサイトメトリーを用いて、分析が実施され得る。例えば、MG Wing, AMP Montgomery, S. Songsivilai and JV Watson. An Improved Method for the Detection of Cell Surface Antigens in Samples of Low Viability using Flow Cytometry. J Immunol Methods 126: 21-27 1990参照。

10

20

【0057】

代替的染色はTO-PRO-3であって、これは、Alexa Fluor 647またはCy5染色と同様の遠赤外蛍光を有するカルボシアニン単量体核酸染色である。それは、核対比染色および死細胞指標として有用であり、核酸検出のための最高感受性プローブの1つである。

【0058】

一実施形態では、T細胞集団は、T細胞受容体（TCR）のような定常状態マーカーに基づいた直接選択により動員血液から選択される。この工程は、T細胞受容体と結紮する、特に多量体の形態の、例えば四、五および/または六量体のHLA：ペプチド複合体を用いる。これらのペプチドは、例えば、蛍光標識または磁気ビーズで標識され、これにより、次にこれらは同定され、選択され得る。一実施形態では、磁気標識が用いられる。

30

【0059】

したがって、直接選択は、一般的に、動員アフェレシス生成物の分画からのリンパ球の臨床等級濃化を包含する。これは、専用装置、例えばSepax装置（Biosafeから）を用い得る。その結果生じるリンパ球は、次に、磁気ビーズと結合される多量体化MHC/ペプチド複合体である選択試薬とともにインキュベートされる。MHC/ペプチド複合体は、患者およびドナーに適合される場合、抗原特異的T細胞受容体に特異的である。インキュベーション後、細胞は洗浄され、結合細胞は、Miltenyi ClinimaCSのような装置、または磁気ビーズを用いて細胞選択を可能にする任意の他の技法で選択されるが、この場合、陽性細胞は磁気カラム上にまたは袋中に保持され、陰性細胞は洗い落とされる。次いで磁気が除去され、抗原特異的細胞が溶離される。

40

【0060】

一実施形態では、多量体はStreptamerである。StreptamerによるTCRの結紮は可逆的であり、細胞の所望の集団の選択後には、特定試薬による処置は細胞からの複合体の除去である。

【0061】

用いられるHLA複合体は、HLA型と適合される必要があり、したがって、それらは、ペプチドまたは多量体が特定のHLA型、例えばA1、A2、B7、A24、B35、

50

例えば A 0 2 0 1 および B 0 7 0 2 を有するよう、T 細胞のウィルス特異的集団を結紮し得る。

【 0 0 6 2 】

選択は、さらにまたあるいは代替的には、活性化マーカーを基礎にし得る。これらは、抗原刺激の結果として上方調節されるマーカーである。多量のこれらが存在し、当業者に既知であって、例としては、C D 2 5、C D 6 9、C D 1 3 7、C D 1 5 4 のようなマーカーおよびその組合せが挙げられる。

【 0 0 6 3 】

これらのマーカーは、単量体、二量体、多量体抗体またはその結合断片との結紮により選択され得る。これらの抗体または断片は、例えば蛍光標識または磁気ビーズで標識され、その後、これにより、それらが同定され、選択される。一実施形態では、磁気標識が用いられる。

10

【 0 0 6 4 】

一実施形態では、用いられる抗体または断片は、例えば f a b - s t r e p t a m e r (I B A G m B H G e r m a n y から入手可能) である。

【 0 0 6 5 】

これらの f a b - s t r e p t a m e r の結合は、所望の細胞集団の選択後、適切な試薬での処置がそれらを細胞から放出する、という点で可逆的である。

【 0 0 6 6 】

結紮は、本明細書中で用いる場合、結合を指す。

20

【 0 0 6 7 】

一実施形態では、T 細胞集団は、動員血液から選択され、次いで拡大される。

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、拡大工程の小面である細胞の標的集団に関して拡大は選択的に濃化するため、選択は拡大前には必要でない。

【 0 0 6 9 】

ウィルスに特異的な T 細胞集団は、本明細書中で用いる場合、細胞の関連集団が、特異的である少なくとも 1 つのウィルス抗原をおもに認識し、そして例えば標的ウィルスの認識後、免疫応答を生じる、という事実を指すよう意図される。この状況での特異性は、標的ウィルスだけが認識される、ということ必ずしも意味しないが、いくつかの場合、標的ウィルスだけが認識され、しかし少なくとも標的ウィルスは、非標的ウィルスと比較してより大きい親和性、結合活性または応答の大きさで認識される。

30

【 0 0 7 0 】

ウィルス抗原は、本明細書中で用いる場合、特定の免疫学的応答により検出され得るウィルスゲノム (しばしば、外被タンパク質) により特定される抗原を指す。一実施形態では、ウィルス抗原は表面抗原である。

【 0 0 7 1 】

一実施形態では、ウィルスは D N A ウィルス、例えば二本鎖 D N A ウィルスである。

【 0 0 7 2 】

一実施形態では、ウィルスは R N A ウィルスである。

40

【 0 0 7 3 】

典型的には、P B M C は、当業者に既知のフィコール密度勾配分離により血液またはアフレスシス生成物から得られる。

【 0 0 7 4 】

患者からの試料採取のステップは、血液試料採取の通例の技法であり得る。この工程は、患者にとってほとんど危険でなく、医者より実施される必要はないが、しかし適切に訓練されたサポートスタッフにより実施され得る。一実施形態では、患者から得られる試料は、約 5 0 0 m l、4 0 0 m l、3 0 0 m l、2 0 0 m l、1 0 0 m l、5 0 m l、4 0 m l、3 0 m l、2 0 m l、1 0 m l、5 m l またはそれ以下の血液である。

【 0 0 7 5 】

50

一実施形態では、出発材料は、患者のためのCD34+用量が達成されていることが一旦保証されたら採取される動員アフェレシス生成物の分画である。例えば、 4×10^6 CD34+細胞/患者の体重1kg。

【0076】

一実施形態では、幹細胞移植の副生成物である細胞が用いられる。移植のための幹細胞は、しばしば、CD34を基礎にして選択される。CD34に関して陰性である集団は、しばしば、選択後に廃棄される。しかしながら、この除外集団は、例えば本明細書中に記載される方法、例えばT細胞拡大を用いて、治療用T細胞生成物を生成するのに適している。

【0077】

当業者に既知であるように、T細胞の拡大は、一般的に、適切なT細胞拡大培地中で実施される。T細胞拡大培地は、一般的に、拡大ステップに用いられる血清、培地および任意のサイトカインを含む。

【0078】

一実施形態では、培地は、Advanced RPMI培地またはRPMI培地1640 (Life Technologiesから入手可能)である。

【0079】

一実施形態では、細胞拡大培地は、10%ヒトAB血清、200mM L-グルタミンおよびRPMI-1640を含む。

【0080】

一実施形態では、培地は、45%上級RPMI、45%EHA A、10%FCsおよび200mM L-グルタミンを含む。

【0081】

一実施形態では、細胞拡大培地は、10%ヒトAB血清、200mM L-グルタミン、45%アール・ハムのアミノ酸 (EHA Aまたはクリック培地) および45%上級RPMIまたはRPMI-1640を含む。

【0082】

一実施形態では、用いられるサイトカインは、以下で考察される。

【0083】

一実施形態では、用いられるT細胞拡大培地は、特に迅速拡大工程が用いられる場合、拡大工程中に負荷されないし、補足されない。迅速拡大は、本明細書中で用いる場合、18日未満以内、例えば7~10日に治療生成物が得られる工程を指す。

【0084】

したがって、一実施形態では、本発明の開示に従って、抗原特異的T細胞 (例えば同種異系抗原特異的T細胞) の迅速拡大のための*in vitro*拡大工程であって、標的抗原 (単数または複数) に関連したペプチドまたはペプチド混合物の存在下で、サイトカインが外因性IL-2以外である点で特性化される外因性サイトカインの存在下で、気体透過性容器中で、PBMC (例えば、同種異系PBMC) の集団を培養するステップを包含する工程が提供される。

【0085】

一実施形態では、本発明の開示に従って、抗原特異的T細胞、例えば同種異系抗原特異的T細胞の迅速拡大のための*in vitro*拡大工程であって、抗原、例えば標的抗原 (単数または複数) に関連したペプチドまたはペプチド混合物の存在下で、T細胞の所望の集団を提供するための拡大が14日以下、例えば9、10、11または12日、例えば10日である点で特性化される外因性サイトカインの存在下で、気体透過性容器中で、PBMC (例えば、同種異系PBMC) の集団を培養するステップを包含する工程が提供される。

【0086】

本発明の開示の工程で用いられ得るサイトカインとしては、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12およびIL-15が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0087】

大量の、今までのところ非限定的な、文献が、IL-2は、T細胞クローン拡大および縮小を制御し、そしてリンパ球分化を促進する。IL-2およびIL-15は、記憶細胞分裂も支持し得るし、CTLの拡大のために、抗原駆動性刺激と組み合わせて用いられてきた。

【0088】

IL-7は、末梢T細胞恒常性を調節し、*in vivo*でのCD41およびCD81記憶Tリンパ球の両方の生成および長期生存に寄与する。

【0089】

一実施形態では、本発明の開示に従って拡大工程で用いられるサイトカインは、独立して、IL-4、IL-7およびIL-15、特にIL-4およびIL-7から選択される。

10

【0090】

一実施形態では、用いられるサイトカインは、IL-4および/またはIL-7である。理論に縛られずに考えると、これらのサイトカインは、ウィルス抗原特異的T細胞の頻度、レパトリーおよび拡大を具体化するに際して果たす役割を有する。

【0091】

一実施形態では、本発明の開示による方法は、抗原特異的T細胞のレパトリーを有するT細胞集団を提供する。

【0092】

T細胞のレパトリーは、各ペプチドが2つのプールで独自に表示されるよう、プールにアリコート化されたペプチドライブラリーでの刺激後のELISPOT分析により(Kern, F., N. Faulhaber, C. Frommel, E. Khatamzas, S. Prosch, C. Schonemann, I. Kretzschmar, R. Volkmer-Engert, H. D. Volk, and P. Reinke. 2000. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. Eur J Immunol. 30:1676-1682およびStraathof, K. C., A. M. Leen, E. L. Buzza, G. Taylor, M. H. Huls, H. E. Heslop, C. M. Rooney, and C. M. Bollard. 2005. Characterization of latent membrane protein 2 specificity in CTL lines from patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma and lymphoma. J. Immunol. 175:4137-4147)、あるいは丸底96ウェルプレート中で、1ug/mlの濃度で細胞を再刺激するために上記のようなペプチドを用いて、200,000個の最終T細胞生成物をプレート化することによる細胞内サイトカイン染色により、確定され得る。これは、5ug/mlのプレフェルジンAの存在下で一晩実施されるが、これにより、サイトカインの分泌が防止され、したがって、フローサイトメトリーを用いた計数のための細胞内部のIFN γ の増加を保証するために用いられる。

20

30

40

【0093】

IL-4は、一般的に、250ng/培養1ml、またはそれ未満、例えば200ng/ml以下の最終濃度で用いられる。

【0094】

IL-7は、一般的に、50ng/培養1ml、またはそれ未満、例えば20ng/ml以下、特に10ng/mlの最終濃度で用いられる。

【0095】

IL-15が用いられる場合、適切な最終濃度は、50ng/培養1ml、またはそれ未満、例えば20ng/ml以下、特に10ng/mlである。

50

【0096】

一実施形態では、約20ml / G R e x - 10 (例えば、 20×10^6 P B M C) において、I L - 4 (1666単位 / m L) および I L - 7 (10ng / m L) を含有するさらに10mlの培地が付加される。

【0097】

I L - 12は、T h 1フォーカシングにおいて一役を有し、外因性I L - 12は、平衡化T h 1 / T h 2が望ましい場合、省かれ得る。一実施形態では、本発明の開示の工程は、外因性I L - 12を用いない。しかしながら、本発明のT細胞生成物の状況では、C D 4 + 集団におけるT h 1応答は望ましいと考えられる。

【0098】

一実施形態では、I L - 4が用いられる場合、本発明の開示の拡大工程で用いられる。10日目または11日目に、拡大細胞の数は、I L - 4をI L - 2の代わりとして、類似のプロトコルを用いて拡大される細胞より、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100または200%高いことがある。

【0099】

外因性I L - 2が迅速拡大系で用いられる場合、T細胞のより高い増殖が生成される。このより高い迅速拡大が起こる場合には、望ましいT細胞および残りの細胞の平衡は、拡大が非常に迅速に起こるので、多数の残りの細胞は死んでいるわけではなく、したがって全細胞集団中に依然として存在する、という点で次善のものである。したがって、迅速拡大の固有の不適合因子と、非標的細胞の死を可能にする期間、細胞を培養するという選択肢とを、本発明人等は調停して、I L - 2を省くことが所望の細胞対残りの細胞の比率を改善する、ということを見出した。さらに、7~14日、例えば10日の期間において、所望の細胞対残りの細胞の比率は、培養生成物が治療に用いるのに適するようになる交差点である。この交差点は、 5×10^5 C D 3 + T細胞 / 患者の体重1kg以下の安全閾値内にある十分最小量の治療用T細胞の用量が用量投与処方物内で達成される場合、と定義される。

【0100】

一実施形態では、同種異系としてのT細胞集団、いわゆるT細胞集団は、患者でないドナーから得られる。

【0101】

一般的に、ドナーは完全にH L A適合性である。

【0102】

ヒト白血球抗原(H L A)系は、ヒトにおける主要組織適合抗原複合体(M H C)の名称である。超遺伝子座は、ヒトにおける免疫系機能に関連した多数の遺伝子を含む。この群の遺伝子は、第六染色体上に存在し、細胞表面抗原提示タンパク質および多数の他の遺伝子をコードする。H L A遺伝子は、ほとんどの脊椎動物において見出されるM H C遺伝子のヒトバージョンである(したがって、最も研究されたM H C遺伝子である)。ある遺伝子によりコードされるタンパク質は、臓器移植における因子としての歴史的発見の結果として、抗原としても既知である。主要H L A抗原は、免疫機能のための必須要素である。異なるクラスは、異なる機能を有する：

【0103】

M H CクラスI (A、BおよびC)に対応するH L Aは、細胞内部からのペプチドを提示する(存在する場合、ウィルスペプチドを含む)。これらのペプチドは、プロテアソーム中で分解される消化タンパク質から生成される。概して、当該ペプチドは、約9アミノ酸長の小型ポリマーである。外来抗原は、細胞を破壊するキラーT細胞(C D 8陽性細胞または細胞傷害性T細胞ともよばれる)を引き寄せる。

【0104】

M H CクラスII (D P、D M、D O A、D O B、D QおよびD R)に対応するH L Aは、細胞の外側からの抗原をTリンパ球に提示する。これらの特定の抗原は、T-ヘルパー細胞の増殖を刺激し、これが次に、抗体産生B細胞を刺激して、特定の抗原に対する抗

10

20

30

40

50

体を産生する。自己抗原は、サブレッサーT細胞により抑圧される。

【0105】

一実施形態では、細胞の選択は、抗原、特に関連抗原のペプチドによる細胞の刺激後の、インターフェロン-ガンマ分泌または細胞表面活性化マーカーに基づいている。

【0106】

一実施形態では、ドナーから得られる動員血液試料は、加工処理前に凍結保存され得る。

【0107】

一実施形態では、拡大後、任意に、1つ以上の構成成分、例えば安定化剤および/または凍結保存剤、例えばヒト血清アルブミン、グリセロール、DMSO等が、処方物に付加される。

10

【0108】

本発明は、本発明による同種異系抗原特異的T細胞集団を含む組成物にも及ぶ。これらの組成物は、希釈剤、担体、安定化剤、界面活性剤、pH調節剤、または主要工程ステップ後に細胞集団に付加される任意のその他の製薬上許容可能な賦形剤を含み得る。賦形剤は、一般的に、処方物を安定化し、半減期を延長し、組成物を患者の*in vivo*系とより適合性にさせる等の機能を有する。

【0109】

一実施形態では、タンパク質安定化剤、例えばアルブミン、特にヒト血清アルブミン(安定化剤として作用し得る)は、製造後に細胞培養に付加される。処方物中に用いられるアルブミンの量は、10~50%w/w、例えば約12.5%w/wであり得る。

20

【0110】

一実施形態では、処方物は、凍結保存剤、例えばグリセロールまたはDMSOも含有する。DMSOの量は、一般的に12%以下、例えば約10%w/wである。

【0111】

一実施形態では、本発明の工程は、製薬上許容可能な賦形剤、特に本明細書中に記載されるような賦形剤、例えば希釈剤、安定化剤および/または防腐剤を付加することにより、薬学的処方物を調製するというさらなるステップを包含する。

【0112】

賦形剤は、本明細書中で用いる場合、生物学的または生理学的機能を有さないT細胞集団に付加されるすべての成分を包含する一般用語である。

30

【0113】

一実施形態では、薬学的組成物は、注入による投与のために適合される。

【0114】

一実施形態では、抗原特異的T細胞集団が生成される標的ウイルスはCMVであり、例えば標的ウイルスに対して用いられる抗原は、pp65である。ヒトサイトメガロウイルス(菌株AD169)に関する配列は、番号P06725でUniProtデータベース中に存在する。組換えタンパク質は、Miltenyi Biotechから購入可能である。この会社は、Peptivator(登録商標)CMVpp65も提供しているが、これは、主に15-merペプチド(11-アミノ酸(aa)オーバーラップを含む)からなり、ヒトサイトメガロウイルスのpp65タンパク質の完全配列を包含するペプチドプールである。

40

【0115】

本発明の態様において、開示は、本発明の方法から得られるかまたは得られる可能性があるT細胞生成物に及ぶ。

【0116】

一態様では、本開示は、ウイルス特異的拡大T細胞生成物に及ぶ。

【0117】

一実施形態では、本開示は、骨髄移植片または末梢幹細胞移植片を受容後、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週間、またはそれ以上後に、本発明の開示によ

50

るT細胞生成物、またはそれを含む組成物で患者を処置するかまたは予防することを包含する。

【0118】

本明細書中で言及される引用文および文書はすべて、参照により具体的に援用される。文献および特許文書への参照はすべて、参照により援用される。

【0119】

全体として含むことは、本発明の状況においては、全体の一部として含むことを意味する。

【0120】

上記は、ある種の完全体を含む実施形態である。上記の本発明の実施形態は、技術的に適切である場合、組み合わせられ得る。本発明の開示は、本明細書中に記載されるような上記の完全体からなる対応する実施形態にも及ぶ。

実施例

実施例 1

血液ドナーおよび細胞調製

【0121】

3～5時間白血球アフェレシス後に、G-CSF動員および非動員健常ドナーの両方からの血液試料を得た。ヘルシンキ宣言に従ってインフォームド・コンセントを得て、試験は、Royal Free NHS Trust Research and Development review boardにより承認された。末梢血単核球(PBMC)を、フィコール(Axis Shield Diagnostics)密度勾配分離を用いて生成し、そして1%抗生物質(Gibco)および10%熱不活性化ヒトAB血清(Biosera)を 1×10^7 /mlの濃度で補足したRPMI 1640培地(Gibco)中で培養した。過剰量のPBMCを、ヒト血清アルブミン(HSA)4.5%(Bio Products Laboratory)(フィーダー細胞の将来的供給源として20%DMSO(Wak Chemie)を含有)とともに1:1で凍結保存した。CMVpp65 Peptivator(Miltenyi Biotec)を有する6ウェル培養プレート(Nunc)中で、 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ で、24時間までの間、PBMCを刺激した。CD154実験に関しては、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD40抗体(BioLegend)の存在下で、培養を刺激した。

フローサイトメトリー解析

【0122】

フローサイトメトリー実験は4～6カラーパネルで構成されたが、この場合、FACSscanフローサイトメーター(Cytek UK)でのFSCおよびSSCシグナルを用いて、生存可能リンパ球のゲート制御後に、最小で50,000のCD3+を獲得し、そしてFlowJoバージョン7.6(TreeStar)を用いてデータを解析した。サイトカインおよび活性化マーカーのアイソタイプ対照染色に関しては、PE結合型マウスIgG1抗体(BD Bioscience)を用いた。細胞を暗所で15分間染色し、2mlのHBSS中で5分間洗浄して、 $200 \mu\text{l}$ のFACS Flow(BD Bioscience)中に再懸濁した後、獲得した。CMVpp65刺激および非刺激PBMCからの上清のサイトカイン解析をFACS Ariaフローサイトメーター(BD Biosciences)で実施して、最小で20,000事象を収集した。

血球計数ビーズアレイ(CBA)によるサイトカイン解析

【0123】

動員および非動員ドナーの両方からの16～24時間でのCMVpp65刺激および非刺激対照培養から上清を収集し、 -80°C で保存した。血球計数ビーズアレイキット(BD Biosciences)による解析を用いて、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IFN- γ およびTNFのレベルを定量した。FCAP Arrayソフトウェアバージョン1.0.1(Soft Flow Hungary Ltd.)を用いて、得られたデータの解析を実施した。

10

20

30

40

50

経時的検定

【0124】

動員および非動員ドナーから単離されたPBM Cを、96ウェルプレート中で、 $1 \times 10^7 / \text{ml}$ の濃度で、24時間、CMV pp65 Peptivatorまたは $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ SEB (Sigma)で刺激するか、あるいは何もせずにそのままにしておいた。1、4、6、16および24時間で試料を採取して、APC - 結合型抗CD3、FITC - 結合型抗CD4、PerCP - 結合型抗CD8、およびいずれかのPE - 結合型抗CD154、抗CD25およびCD69または抗CD137 (すべて、BD Bioscience)で染色した。

抗原特異的T細胞の単離

10

【0125】

CMV pp65刺激後の抗原特異的T細胞の単離のために、16時間後にPE結合型抗CD25で、または6時間後にPE結合型抗CD154で(ともに、BD Bioscience)、細胞を染色した。 $100 \mu\text{l}$ のCliniMACS緩衝液中の抗体/ 10^7 細胞 $10 \mu\text{l}$ を用いて、20分間、標識化を実施した。 $80 \mu\text{l}$ のCliniMACS緩衝液中でPE結合型マイクロビーズ($20 \mu\text{l} / 10^7$ 細胞)とともに20分間インキュベーション後、MiniMACS上でMSカラムを用いて(すべて、Miltenyi Biotec)、細胞懸濁液を濃化した。インキュベーションステップはすべて、暗所で4~8で実施した。抗原特異的T細胞を、さらにまた、メーカーの推奨(Miltenyi Biotec)に従って、IFN - 分泌検定を用いて単離した。単離は、CD154およびCD25分離のものと同であった。

20

【0126】

これを、定常状態特異性マーカー、例えば特異的T細胞受容体においても実施し、それにより、Stage/IBA生成物 - streptamersを、選択試薬として、選択のためにCliniMACSを用いて臨床規模で用いた。

抗原特異的T細胞株の拡大

【0127】

6時間インキュベーション後、10%ヒトAB血清、1%抗生物質を含有し、 $10 \text{ ng} / \text{ml}$ のIL-7およびIL-15 (Cell Genix)を補足されたRPMI 1640培地を有する24ウェルプレート中で、フィーダー細胞として作用するよう、50:1 - 照射(30 Gy)自系PBM Cの存在下で、 0.25×10^6 単離CD154+細胞に育て上げた。培地を、2~3日毎に補充して、必要な場合には、細胞を分割した。細胞を、最大で23日まで拡大させた後、収穫した。

30

【0128】

拡大前に細胞を選択しなかった場合、G-rex10拡大系(Wilson Wolf)で、20ml中に、 2×10^6 PBM C/mlで細胞を植え付けた。細胞を、特定のペプチド、IL-4およびIL-7とともにRPMI 10%ヒト血清中に植え付けて、10日間、そのまま何もせずに培養した。

拡大抗原特異的T細胞株の再刺激

【0129】

CMV pp65 Peptivator、CMV IE-1 (JPT)負荷自系PBM Cまたは対照として手を付けていない自系PBM C(すべて、 $1 \mu\text{M}$ CFSE (Sigma)で標識)を2.5:1の比率で用いて、48ウェルプレート中で $1 \times 10^7 / \text{ml}$ の濃度で、5~6時間の期間、拡大細胞を再刺激した。細胞内サイトカインおよびCD154の分析のために、抗CD28抗体(BD Bioscience)の存在下で細胞をインキュベートし、2時間後に、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ のプレフェルジンA (Sigma)を付加した。細胞を固定し、メーカーの使用説明書に従ってイントラステイン(Dako Cytomation)を用いて透過性にして、APC結合型抗CD154、PerCP結合型抗CD4、いずれかのPE - 結合型抗IL-2および抗TNFまたは抗IFN- (すべて、BD Bioscience)で染色した。表面染色のために、細胞を抗CD40抗

40

50

体の存在下でインキュベートし、次いで、FITC結合型抗CD4、PE結合型抗CD154、PerCP結合型抗CD8、APC結合型抗CD3およびAPCCy7結合型CD69(すべて、BD Biosciences)で、10分間染色した。

細胞傷害性検定

【0130】

自系PBMCを3 μ g/mlのPHA(Sigma)で24時間、次に、20U/mlのIL-2(Miltenyi Biotec)で、1 \times 10⁶/mlの濃度で、RPMI 1640(10%AB血清を有する)中で、刺激した。次に、PHA芽球に、CMVpp65 Peptivatorを負荷して、標的細胞として用いた。負荷標的細胞を、カルセイン-AM(Molecular Probes)で、10 μ Mの濃度で標識して、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。完全培地中で4回洗浄後、細胞を7 \times 10⁴/mlに調整して、U底96ウェルプレート(Corning)中で、三重反復実験で、20:1~0.5:1の範囲のE:Tで、エフェクター細胞に付加した。三つ組ウェルも設定して、自発的放出(標的細胞のみ)、最大放出(標的細胞+2%トリトンX-100)および培地単独を測定した。37 $^{\circ}$ C/5%CO₂で4時間のインキュベーション後、100 μ lの上清を収穫して、新しいプレートに移した。BMG FLUOstar Galaxyマイクロプレート蛍光分光計(MTX Lab Systems Inc.)(励起フィルター:485 \pm 9nm:帯域通過フィルター:530 \pm 9nm)を用いて、試料を測定した。データを、随意蛍光単位(AFU)として表して、溶解パーセントを、式[(試験放出-自発的放出)/最大放出-自発的放出] \times 100]を用いて算定した。

統計学的分析

【0131】

AGraphPad Prism4.0を用いて、分析を実行した。ノンパラメトリック・マン・ホイットニー検定を用いて、G-CSF動員および非動員PBMC間の統計学的有意、ならびにCD154発現に及ぼすCD40遮断の影響を分析するためのペアドt検定を確定した。統計学的有意は、Pが0.05未満である場合に、達成された。

結果

CMVpp65刺激G-CSF動員PBMCのサイトカインプロファイル

【0132】

初期実験は、G-CSF動員PBMCからのCMVpp65刺激PBMCのサイトカインプロファイルを検査して、非動員PBMCとの等価が存在するか否かを確定することを目指した。CMV+健常個体からのPBMCを、16時間培養においてCMVpp65重複ペプチドで刺激した。16時間後、上清のアリコートをし、刺激および手つかずのままの培養から採取し、-80 $^{\circ}$ Cで凍結させた。フローサイトメトリーベースの検定、サイトカインビーズアレイ(CBA)を用いて、培養期間中のサイトカイン放出に関して上清を検定した。IL-2、TNF、IFN- γ 、IL-10、IL-4およびIL-5分泌を、分析した(図1)。G-CSF動員および非動員PBMC間で、TH₁サイトカインIL-2、TNFおよびIFN- γ に関して有意差は観察されなかったが、しかし、G-CSF動員PBMCからのIL-10分泌において有意の減少(P=0.01)が検出され、この傾向は、低レベルのIL-4およびIL-5分泌においても明らかであった。

【0133】

次に、非動員PBMCからのCMV特異的T細胞の製造のために依然この系を用いたように、IFN- γ 分泌に基づいてG-CSF動員PBMCからCMV特異的T細胞が単離され得るか否かを評価し、それらの臨床的効力を実証した。CMVpp65刺激に应答してIFN- γ を分泌する細胞を、IFN- γ 特異的抗体を用いて捕捉し、磁気ビーズを用いて選択した。磁氣的濃化の前および後にIFN- γ を測定して、動員および非動員PBMC間の純度および収率を査定した。有意ではないが、IFN- γ 分泌はCMVpp65刺激後に減少し(図2A)、そして純度および収率(図2B)も、G-CSF動員PBMCにおいて負の影響を及ぼされる、ということを示した。CD4+対CD8+IFN- γ 分泌細胞の比は、G-CSF動員PBMCにおいては変わらないように見えた。要するに、

G - C S F 動員 P B M C からの P B M C は、非動員 P B M C と同様のレベルで I F N - およびその他のエフェクターサイトカインを分泌し得るが、しかし、C M V p p 6 5 刺激後の細胞当たりの単離および検出は、減損されると思われる。これらの結果は、従来の発表済みデータと一致しており、このことは、G - C S F 動員が、単一細胞レベルで I F N - 産生に関する能力を減損する、ということを示唆している。

C M V p p 6 5 刺激後の活性化マーカー発現の解析

【 0 1 3 4 】

次に、G - C S F 動員 P B M C における C M V p p 6 5 特異的 T 細胞に関する活性化誘導性 C D 2 5、C D 6 9、C D 1 5 4 および C D 1 3 7 発現の動力学を調べて、非動員 P B M C と比較した場合の刺激の最適持続時間を確定した。24時間の期間に亘って、C M V p p 6 5 ペプチドで P B M C を刺激して、1、4、6、16 および 24 時間で培養から P B M C 集団を取り出して、次に、フローサイトメトリーにより活性化マーカーの表面発現に関して解析した(図3)。C D 2 5 の抗原誘発性発現は16時間で最適で、G - C S F 動員および非動員 P B M C において同一強度を有した。C D 6 9 および C D 1 5 4 は6時間で最適で、両方の発現は、G - C S F 動員 P B M C で高くなった。C D 1 3 7 発現は、24時間でピーク強度に達し、これも G - C S F 動員 P B M C で増大された。従来の結果と一致して、C M V p p 6 5 刺激後16時間で G - C S F 動員 P B M C からの I F N - 分泌のレベルの低減が観察された。

G - C S F 動員 P B M C における C D 1 5 4 の抗原特異的発現の査定

【 0 1 3 5 】

従来公表済みのデータは、C D 1 5 4 が C M V 特異的 T 細胞の検出および単離のための適切なマーカーであることを実証している。したがって、G - C S F 動員 P B M C における C D 1 5 4 発現が非動員 P B M C と一致するか否かを、C D 4 0 特異的抗体を用いて調べて、C D 4 0 との結紮を防止することにより、細胞表面に C D 1 5 4 を保存した。P B M C を、C D 4 0 特異的抗体の存在下または非存在下で、S E B または C M V p p 6 5 ペプチドで4~6時間刺激して、次に、C D 4 + T 細胞集団の中で C D 1 5 4 発現に関して解析した(図4A)。

【 0 1 3 6 】

残りの C D + T 細胞における低バックグラウンド C D 1 5 4 発現は、G - C S F 動員 P B M C (0 . 3 0 %) と非動員 P B M C (0 . 2 2 %) との間で比較可能であった。6時間の最適時点での C D 4 0 特異的抗体の存在下での C D 1 5 4 発現は、G - C S F 動員 P B M C (1 . 8 6 %) と非動員 P B M C (1 . 2 2 %) との間に統計学的有意差はないことを示したが、しかし実際、G - C S F 動員ドナー設定において増大され(図4B~C)、いかなる非特異的活性化誘導性 C D 1 5 4 発現も伴わなかった。

C D 1 5 4 発現による G - C S F 動員および非動員 P B M C からの抗原特異的 T 細胞の単離

【 0 1 3 7 】

次に、G - C S F 動員および非動員 P B M C からの C D 4 0 特異的抗体の存在下での、C M V p p 6 5 刺激 P B M C の単一濃化ステップ(図5A~B)を、4例の C M V + 健全非対合ドナーにおける磁気細胞分離を用いて、実施した。G - C S F 動員(48.94%) および非動員(58.08%) P B M C 間で、C D 1 5 4 + C M V 特異的 T 細胞の純度における有意差は観察されなかった(図5C)。その後、C D 1 5 4 陽性分画を、短期培養で拡大させて、単離細胞の *i n v i t r o* 増殖および C M V 特異性を確定した。

G - C S F 動員 P B M C からの *i n v i t r o* 拡大抗原特異的 T 細胞の再刺激

【 0 1 3 8 】

C D 1 5 4 + C M V 特異的 T 細胞を、自系照射フィーダー細胞の存在下で、I L - 7 および I L - 1 5 を含有する完全培地中で21日間に亘って培養した。C D 1 5 4 + 応答体集団は、G - C S F 動員 P B M C (n = 3) において74.6倍(48~84の範囲)の平均増幅因子を示したが、これに比して、非増幅 P B M C (n = 3) では103.6(18~168の範囲)であった。拡大細胞は、すべての培養において主に C D 3 + C D 4 +

であった(図6A)。全培養が、自系CMVpp65負荷PBMCでの再試験時に、CD154+およびCD69+発現の上方調節により確定されたCMVpp65に関する高い特異性を示した。自系PBMCを用いた対照再試験実験では、low to undetectable levels of 観察されたCD154発現のレベルは低いかまたは非検出であった(図6B)。G-CSF動員PBMCから拡大された細胞における再試験時のCD154+CD69+発現の上方調節において増大が観察されたが(平均93.13%)、これに比して、フローサイトメトリー解析後の非動員PBMCは平均で63.0%であった(図6C)。いくつかの実験において、拡大細胞をCMVIE-1ペプチドで再試験したが、CD154活性化は観察されず、これが、特異性を確認した(データは示されていない)。

10

【0139】

拡大細胞の機能性を解析するために、細胞内サイトカイン染色(ICS)により、IL-2、TNFおよびIFN- γ の産生に関して試験した(図6D)。拡大細胞は、3つのサイトカインすべてを合成し、分泌することができたが、しかし主にIFN- γ であった。拡大細胞を刺激しないかまたはCMVIE-1ペプチドとともにインキュベートした実験では、最小サイトカイン分泌が観察された。G-CSF動員PBMCと非動員PBMCとの間に、IL-2、TNFまたはIFN- γ 分泌における有意差は検出されなかった(図6E)。CD154検定は、G-CSF動員PBMCからの拡大可能および機能的CMV特異的T細胞の両方の特異的単離を可能にし、これは非動員PBMCにおける公表済みデータと等価である、ということが実証された。

20

拡大細胞の細胞傷害活性

【0140】

最後に、G-CSF動員PBMCから単離された拡大CD154+CMV特異的T細胞が、標的細胞を溶解し得るか否かを調べた。CMVpp65ペプチドを負荷され、カルセイン-A M染料で標識された自系PHA芽球を、標的として用いた。標的は、すべてのE:T比率で、拡大細胞により有効に死滅させられた(図7)。

実施例2 CD34選択の陰性分画から得られた細胞の解析

【0141】

出発材料は、動員HPC-A(本明細書中ではアフェレシス試料としても言及される)からのCD34選択からの陰性分画であった。

30

【0142】

細胞は、密度勾配遠心分離を受けた後、ADVペプチド、IL-4およびIL-7とともに10日間培養された。10日目に、細胞を収穫し、洗浄し、計数して、用量投与し、凍結保存した。ガンマ産生に関する有効性試験、ならびに純度および生存率に関する表現型分類も実施した。

【0143】

1×10^4 および 1×10^5 個のT細胞/kgの用量を凍結した(12kg)。

【0144】

ADVペプチドでの再刺激(放出判定基準状態1%)およびすべての他の放出判定基準(T細胞純度、生存率、微生物学、マイコプラズマ、内毒素)後のT細胞産生IFN- γ の7.56%が基準を満たした。この解析に関する散布図を、図11に示す。

40

【0145】

対合試料は解析されなかったが、しかし9つの産生実験を各出発材料で実施した。動員および非動員生成物の両方に関する再刺激時のIFN- γ 産生を、以下の表に示す。

【0146】

【表 1】

動員生成物		非動員生成物	
	1.32		2.22
	2.45		1.85
	5.26		0.24
	1.95		13.86
	6.53		21.19
	1.31		1.95
	7.56		2.71
	3.62		4.89
	1.54		17.38
平均	3.5	平均	7.3
S D	2.4	S D	7.9

10

実施例 3

【0147】

図 1 2 および 1 3 のデータは、抗原特異的 T 細胞が、動員される元の試料から得られる場合でも機能的である、ということを示す。動員アフレスシ由来 P B M C を、細胞に取り込まれる C F S E - a 染料で染色し、細胞が分裂すると、細胞の明るさは低減され、これは、フローサイトメトリーにより検出され得る。細胞を、刺激なし (n i l) または抗原特異的ペプチドを用いて、3 7 ° C で 5 日間培養した後、s t r e p t a m e r、C D 3、C D 8 に関して染色し、フローサイトメーターで調べた。これは、十分な刺激が存在するほど長い間動員されているにも関わらず細胞は増殖し得るし、刺激が存在しなければ増殖しない、すなわち機能を示す、ということを示している。

20

実施例 4 患者の処置

【0148】

凍結動員アフレスシ試料からのガンマ捕捉により細胞を選択し、C M V 網膜炎に伴う難治性 C M V を有する 7 2 K g 患者の処置 (少なくとも 2 か月) のために用いた。約 2 2 , 0 0 0 C M V 特異的 T 細胞の用量を、注入により投与した。処置後、C M V および網膜炎は消散し、患者は退院した。したがって、動員にもかかわらず、投与された細胞は機能的であった。図 1 4 は、いくつかのガンマが前選択集団において産生され、それが、陰性分画では軽減され、陽性分画は、患者に実際に投与された生成物であった、ということを示している。

30

【 図 1 4 】

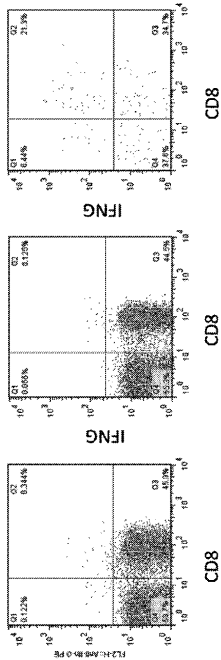
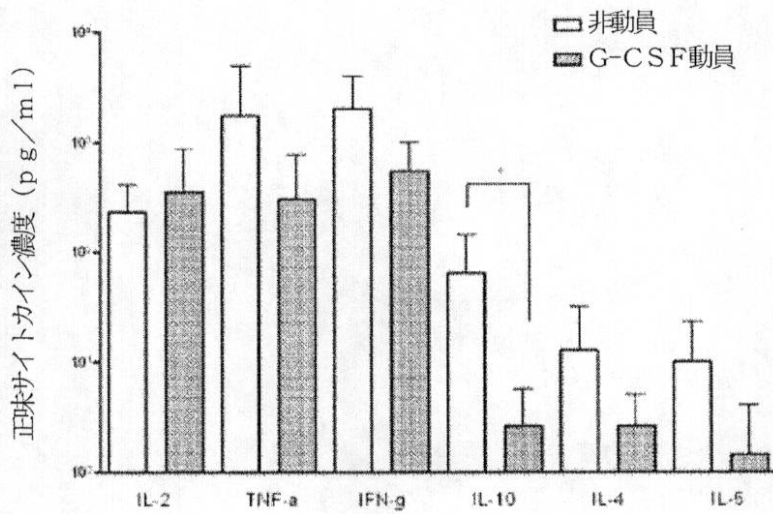


Figure 14

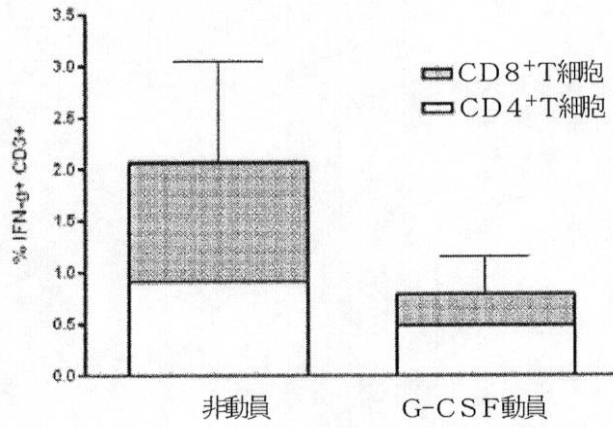
【 図 1 】

非対合G-CSF動員 (n=6) および非動員 (n=6) ドナーにおける機能プロフィール

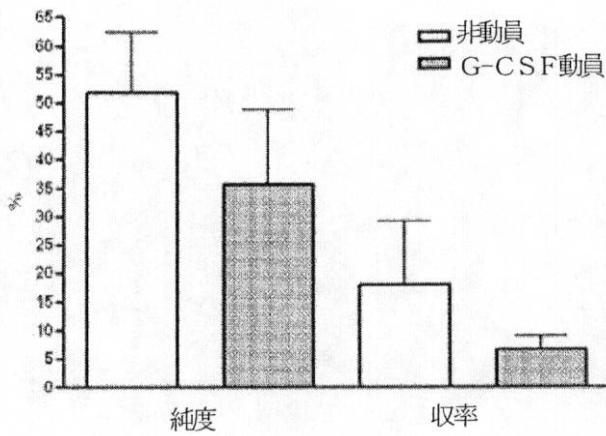


【 図 2 A 】

非対合G-CSF動員 (n=6) および非動員 (n=6) ドナーにおけるIFN-g分泌抗原特異的T細胞の同定および単離

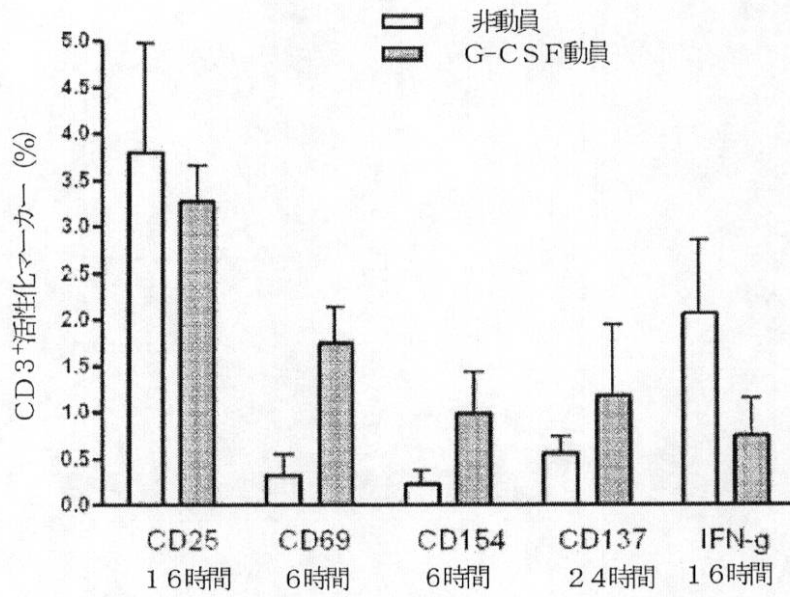


【 図 2 B 】



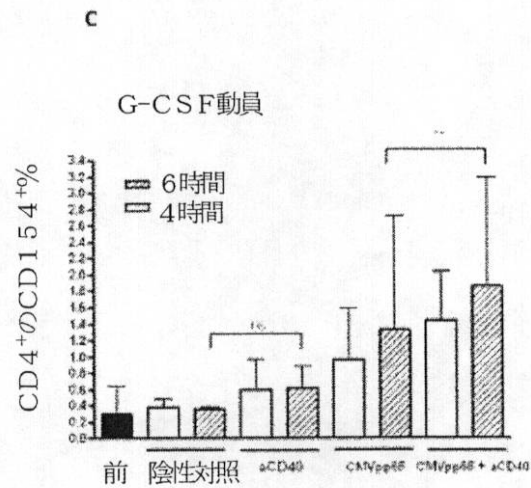
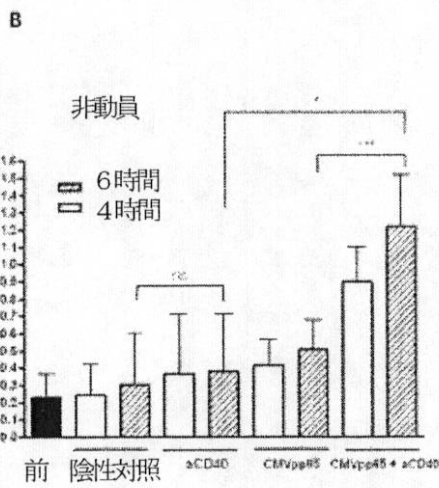
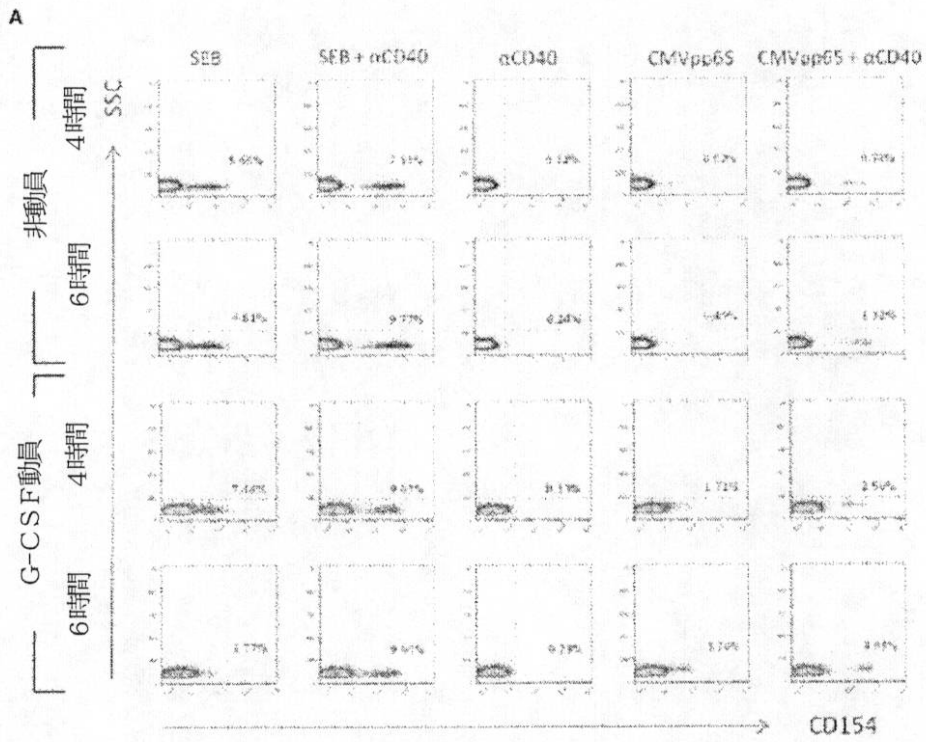
【 図 3 】

G-CSF動員 (n=5) および非動員 (n=5) PBMCにおけるCMV pp65刺激に
応答する活性化マーカーの発現の最適時間



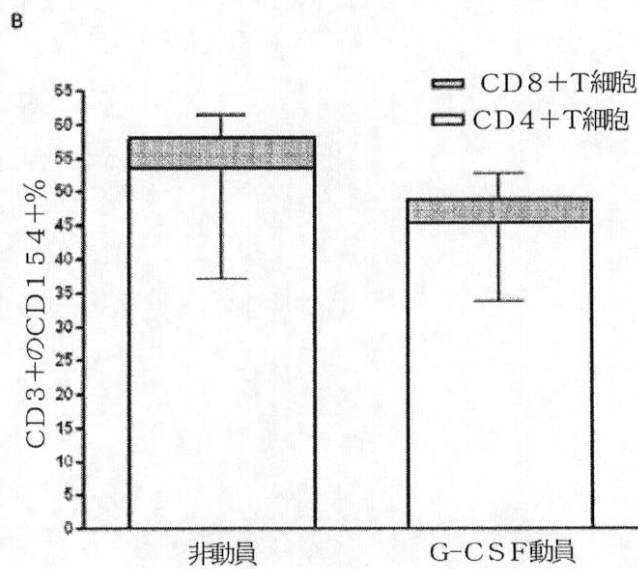
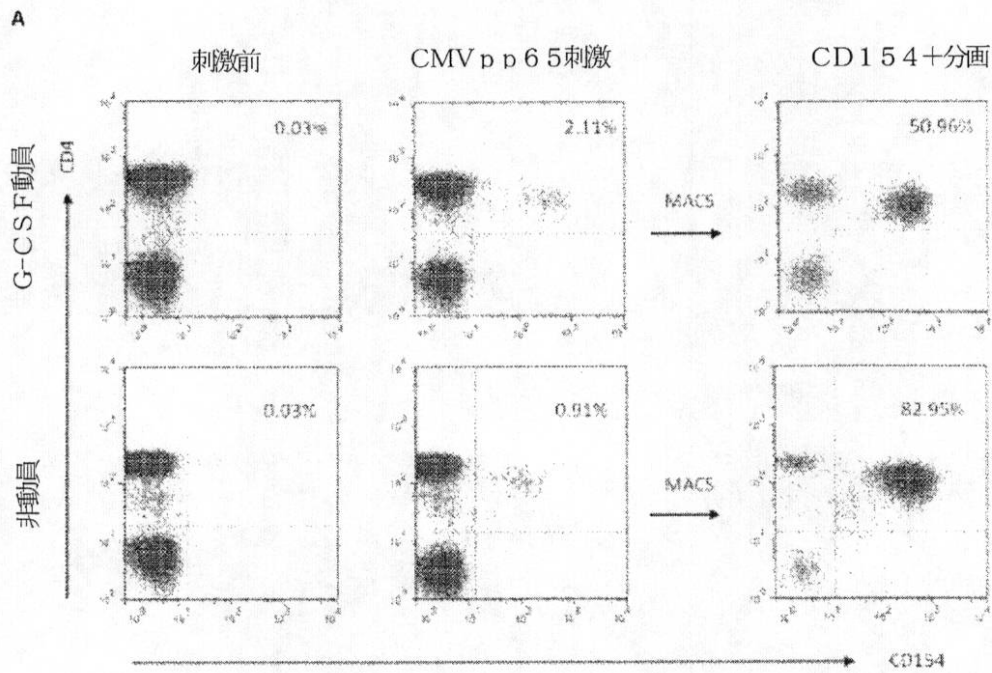
【 図 4 】

4および6時間でのCD154表面発現のG-CSF動員および非動員ドナー間の直接比較



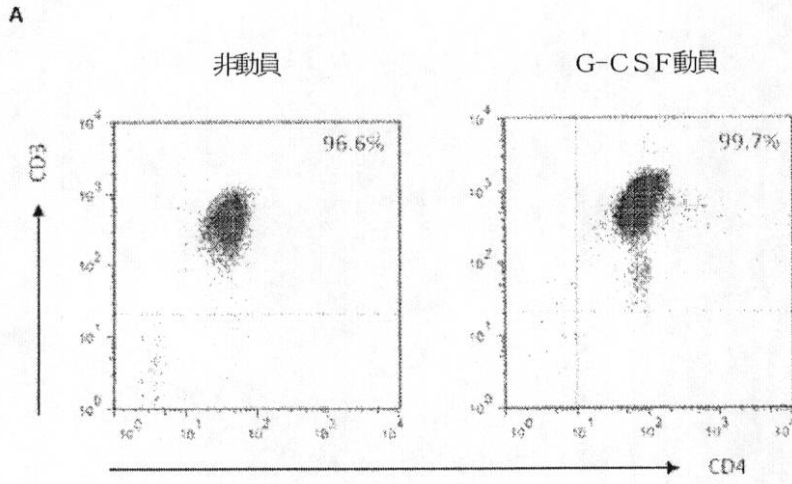
【 図 5 】

2つの非対合ドナーにおけるCD154発現によるCMV特異的T細胞の単離

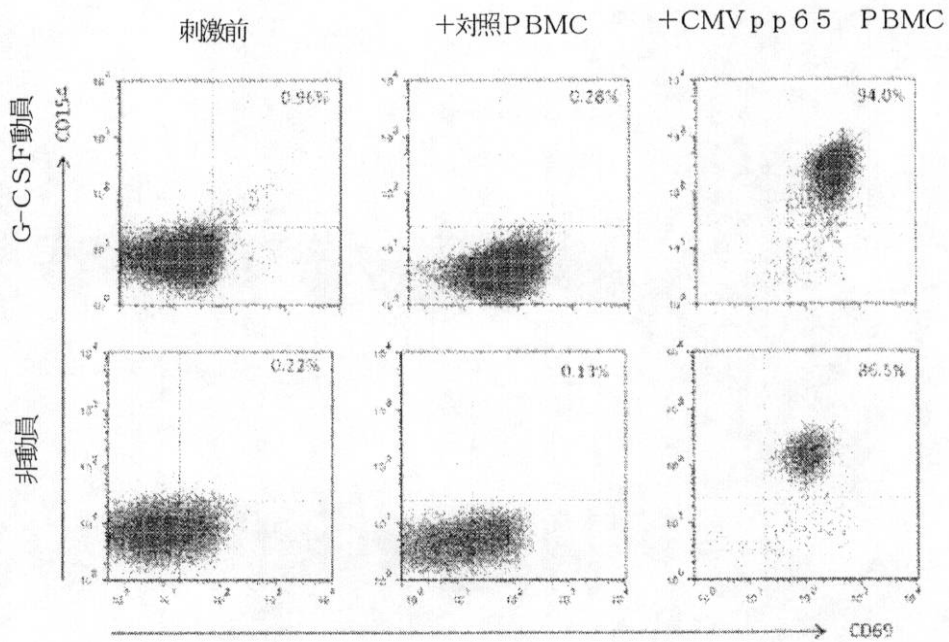


【 図 6 A 】

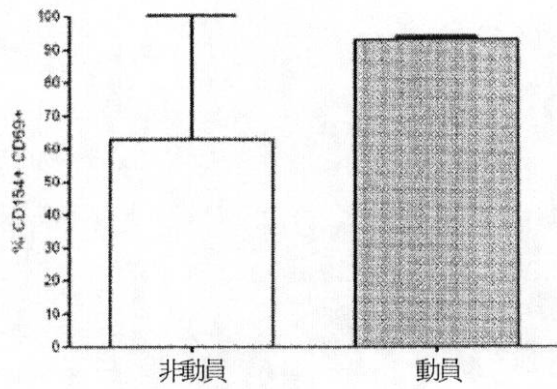
拡大CD154+T細胞の再刺激



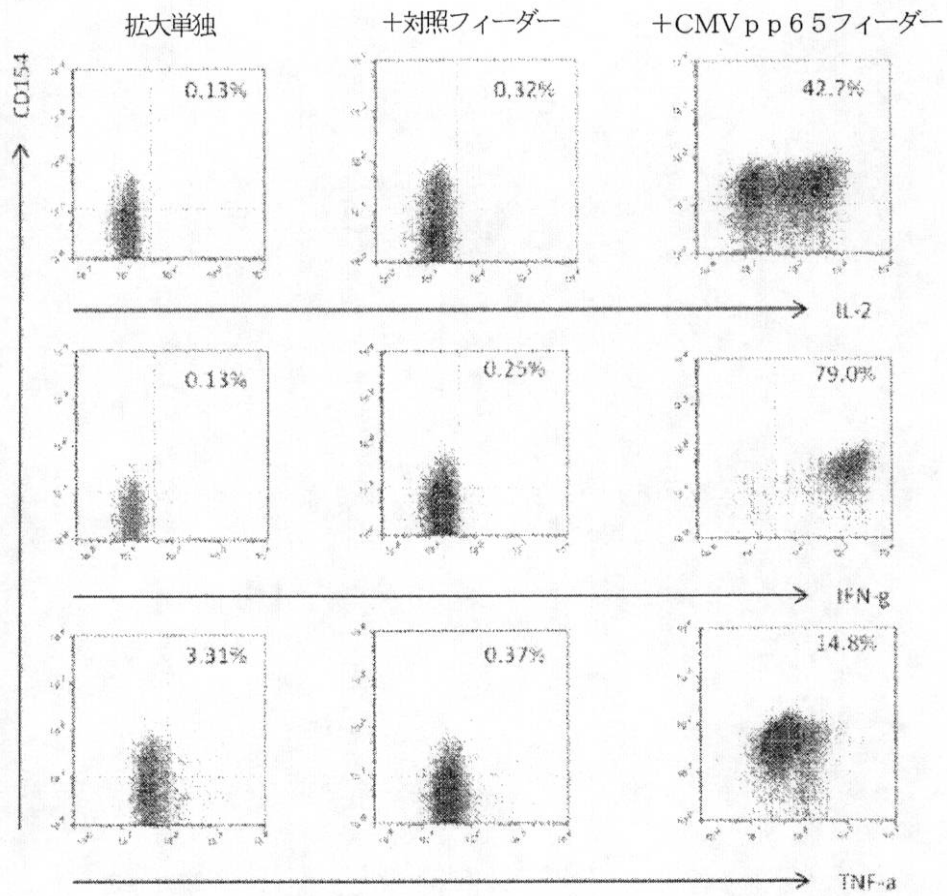
【 図 6 B 】



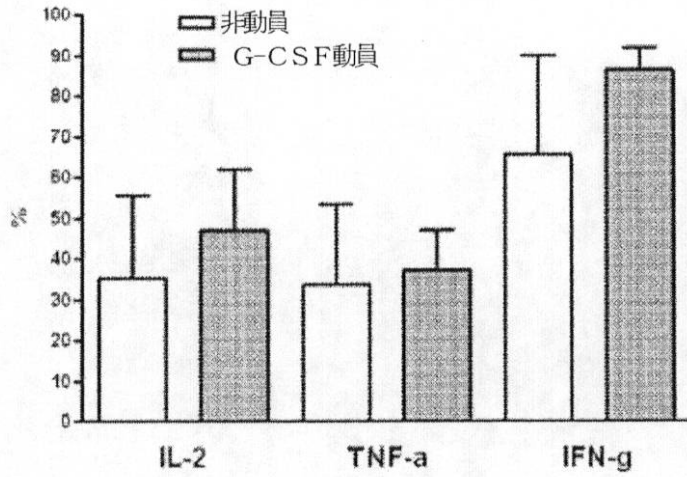
【 図 6 C 】



【 図 6 D 】

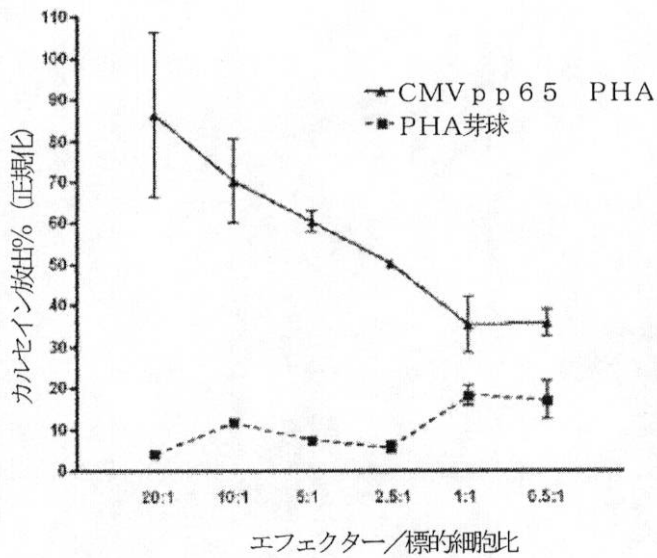


【 図 6 E 】



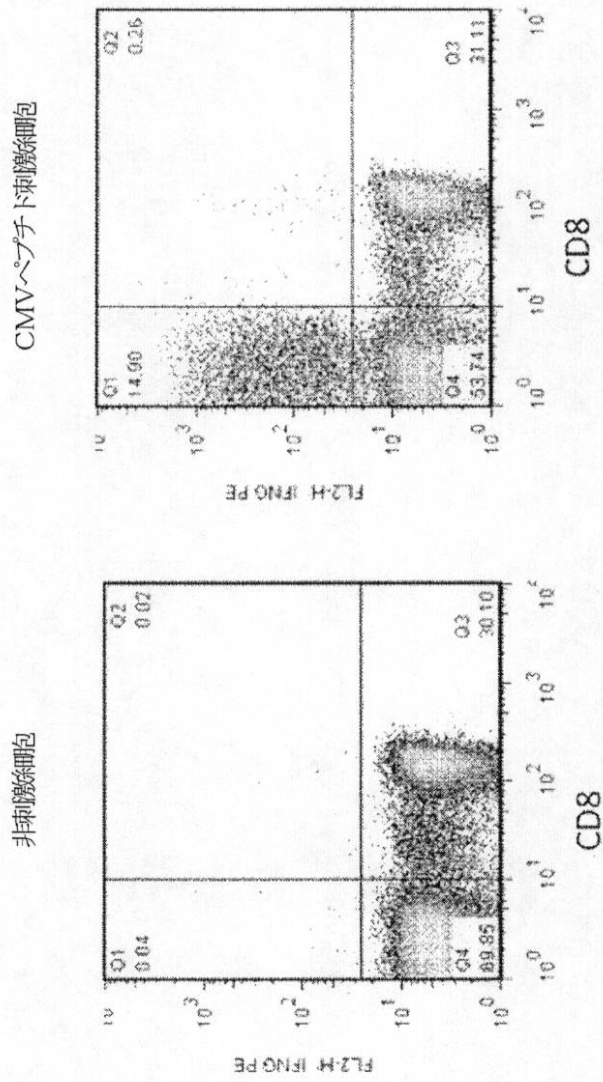
【 図 7 】

G-CSF動員PBMCから単離されたCD154+CMV特異的T細胞は標的細胞を有効に死滅させる



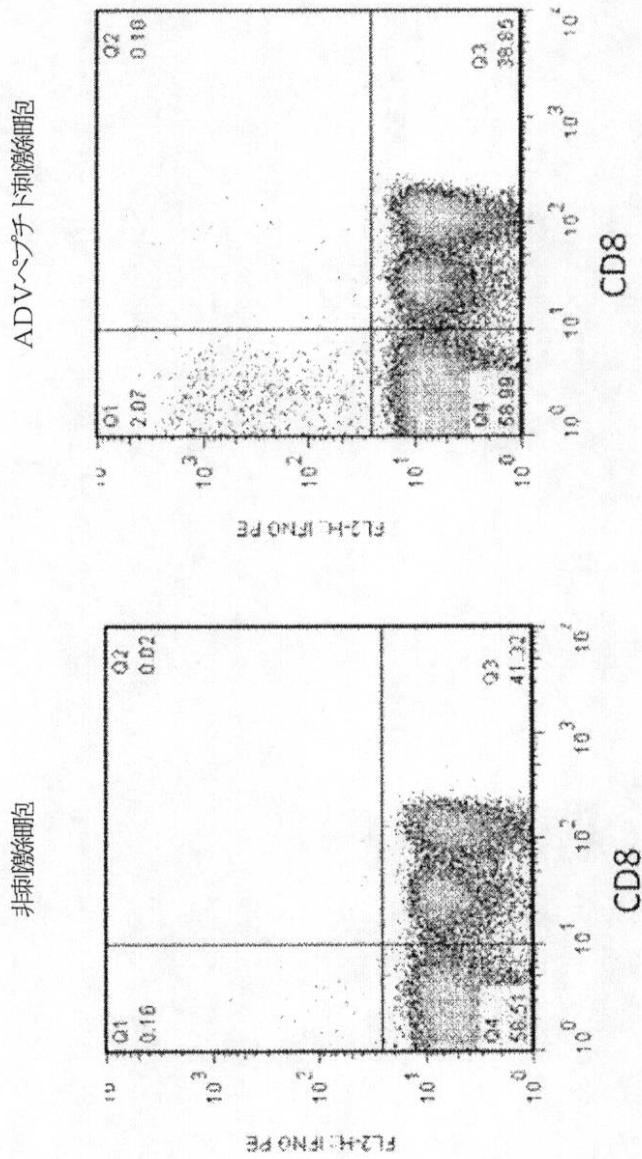
【 図 8 】

10日拡大およびCMV p p 6 5ペプチドで再刺激後のフローサイトメリーにより測定されたIFN γ 産生



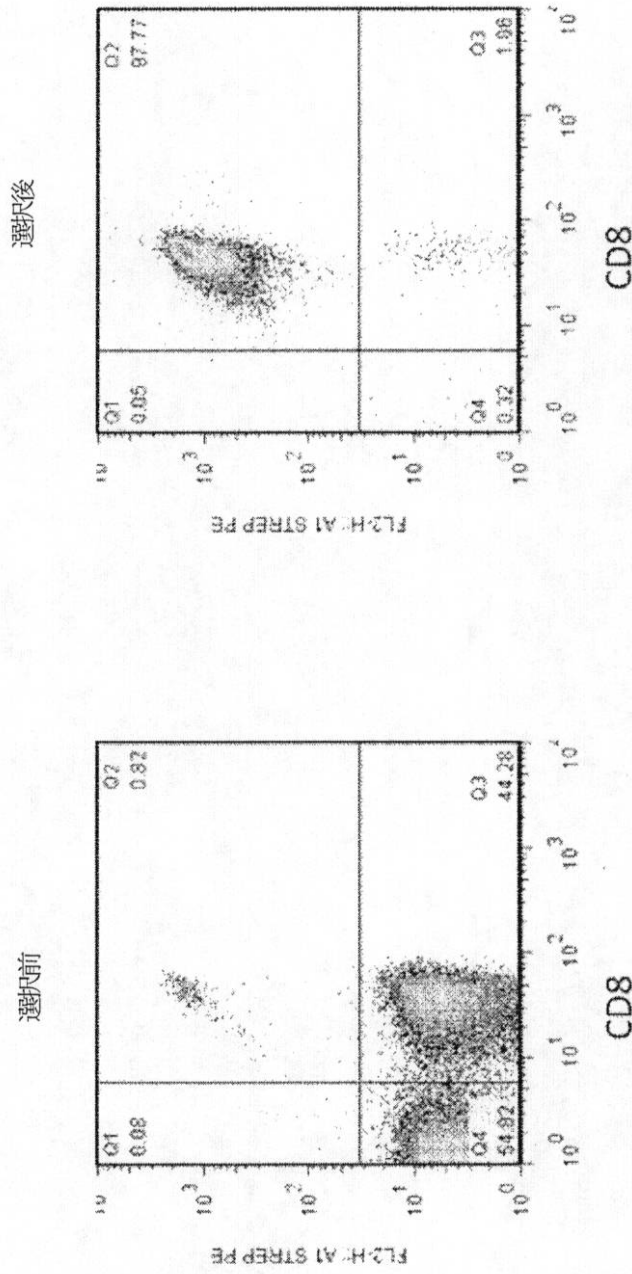
【 図 9 】

10日拡大およびAdヘキソンVペプチドで再刺激後のフローサイトメトリーにより測定されたIFN γ 産生



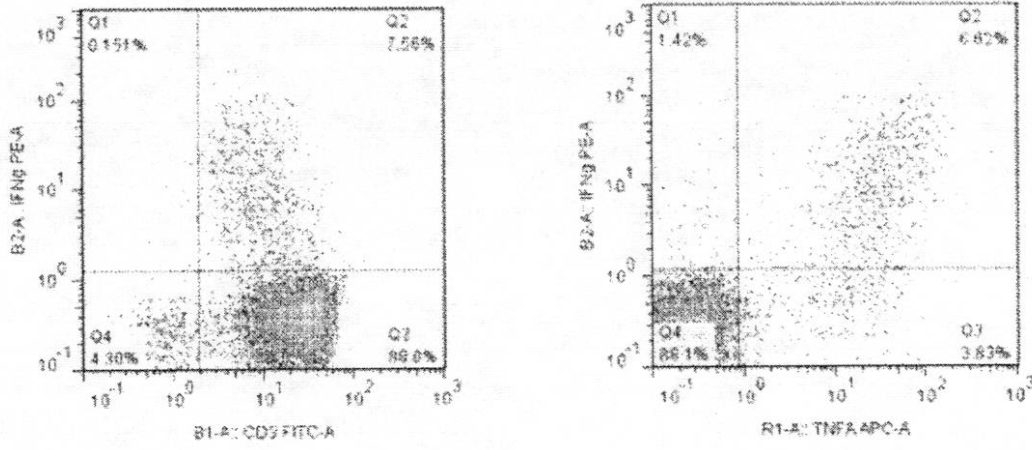
【 図 1 0 】

フローサイトメトリーにより測定されたCMV特異的T細胞受容体を発現する細胞の%

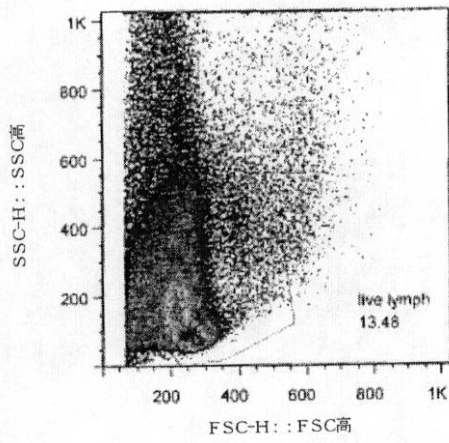


【 図 1 1 】

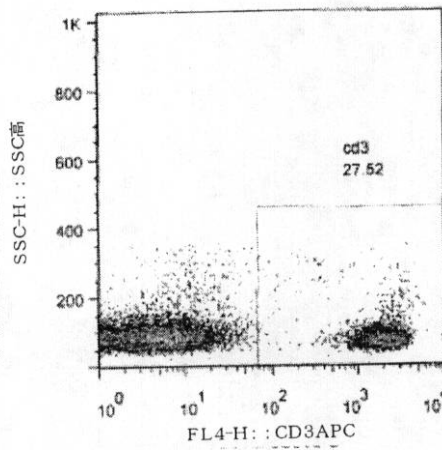
リンパ球ゲート (左) またはCD3ゲート (右) でゲート制御された細胞



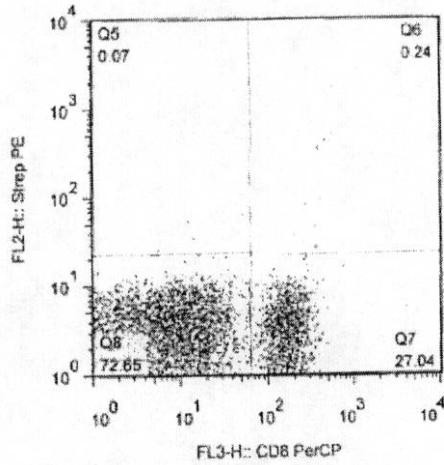
【 図 1 2 】



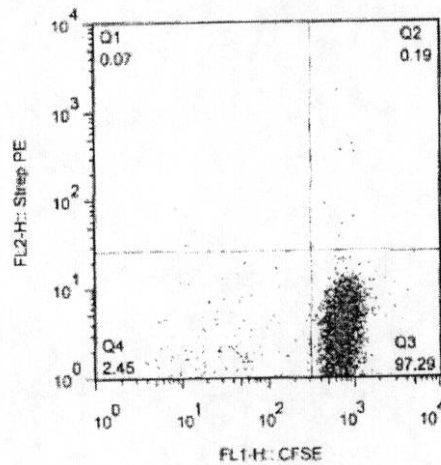
ACE 11_07 PBMC NIL.001
アンゲート
156225



ACE 11_07 PBMC NIL.001
生リン球
21065

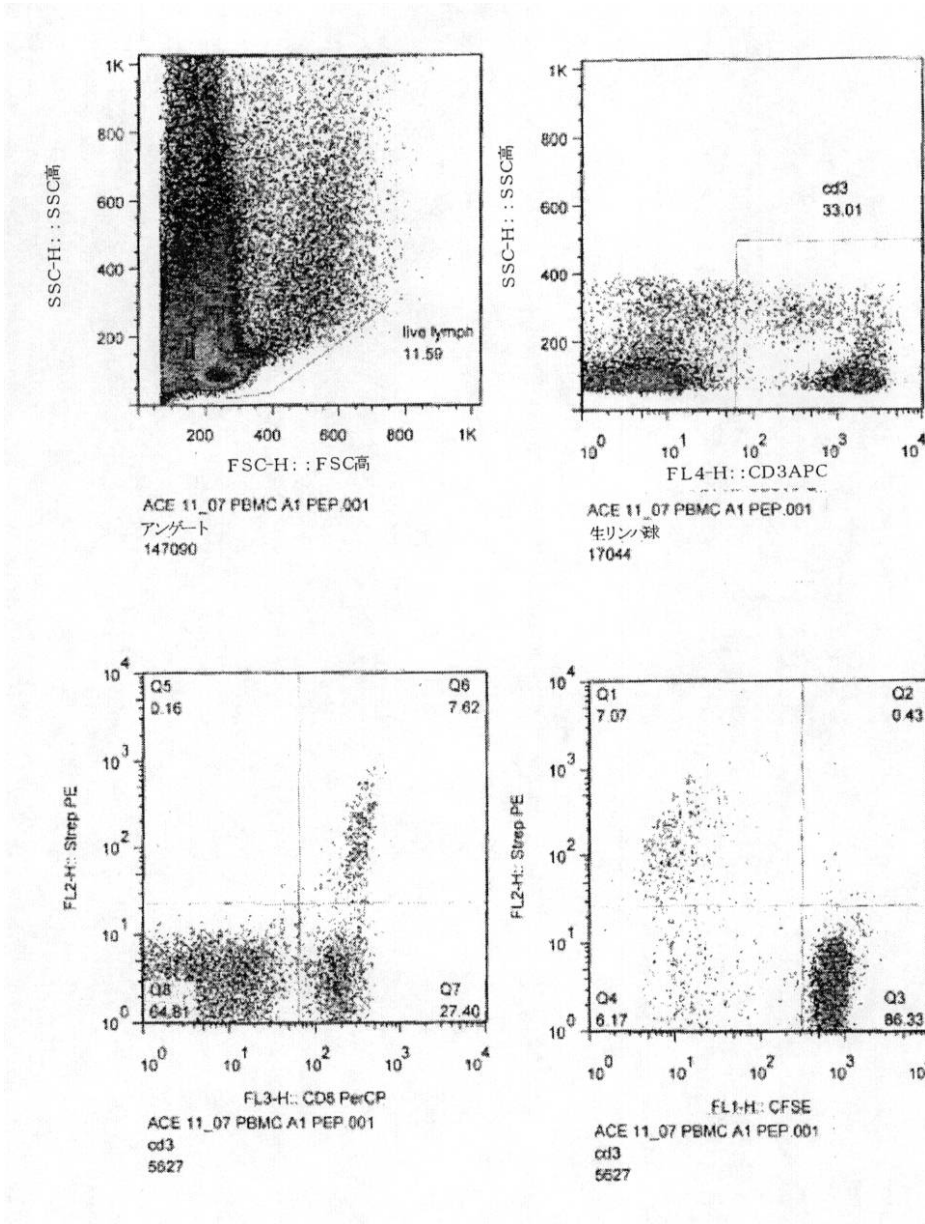


ACE 11_07 PBMC NIL.001
cd3
5798



ACE 11_07 PBMC NIL.001
cd3
5798

【 図 1 3 】



【 配列表 】

2015505852000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成26年8月12日(2014.8.12)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒト療法、例えば造血幹細胞移植後患者のための免疫再構築療法に用いるための、動員血液試料または動員アフエレシスから選択されるか、および/または拡大される治療用T細胞集団、またはそれを含む薬学的組成物であって、選択が、定常状態マーカーおよび/または活性化マーカーに、任意にその後の拡大に基づいており、あるいは前記拡大が抗原、例えばウイルス抗原の存在下である治療用T細胞集団またはそれを含む薬学的組成物。

【 請求項 2 】

前記 T 細胞集団が抗原特異的 T 細胞集団である、請求項 1 に記載の治療用 T 細胞集団またはそれを含む薬学的組成物。

【請求項 3】

前記抗原特異的 T 細胞集団が、ウイルス、例えば、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトパピローマウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、BK ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスおよびヒト T リンパ好性ウイルスからなる群から選択されるウイルスからなる群から選択されるウイルスに、例えばサイトメガロウイルスまたはアデノウイルスに特異的である、請求項 2 に記載の治療用 T 細胞集団またはそれを含む薬学的組成物。

【請求項 4】

前記集団が、例えば特定の H L A : ペプチド複合体、特にテトラ、ペンタおよび / またはヘキサ S t r e p t a m e r による T 細胞受容体の可逆的結紮により、定常状態マーカー、すなわち T 細胞受容体を基礎にして直接的に選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の治療用 T 細胞集団または薬学的組成物。

【請求項 5】

前記活性化マーカーが抗原刺激の結果として上方調節される細胞表面マーカー、例えば C D 2 5、C D 6 9、C D 1 3 7 および C D 1 5 4 からなる群から選択されるものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の治療用 T 細胞集団または薬学的組成物。

【請求項 6】

前記 T 細胞生成物が、特に抗原特異的方式で拡大される拡大 T 細胞生成物である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の治療用 T 細胞集団または薬学的組成物。

【請求項 7】

前記集団が、C D 2 5 マーカーを有する細胞に関して実質的に陰性である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の治療用 T 細胞集団または薬学的組成物。

【請求項 8】

前記 T 細胞集団が同種異系である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の治療用 T 細胞集団または薬学的組成物。

【請求項 9】

免疫再構築療法のための医薬品の製造のための、請求項 1 ~ 8 のいずれかで定義されるような治療用 T 細胞集団または薬学的組成物の使用。

【請求項 10】

動員血液または動員アフレスシス試料からのウイルスに特異的である標的 T 細胞集団を選択し、および / または拡大する方法であって、選択が、T 細胞の表面の定常状態マーカーまたは活性化マーカーをターゲティングすることを用い、そして拡大が、特に同種異系ドナーに由来する抗原特異的 T 細胞集団の拡大に適した条件を用いる、方法。

【請求項 11】

前記標的抗原が、例えば D N A ウィルスまたは R N A ウィルスから選択されるウイルス抗原、例えば D N A ウィルスである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ウイルスが、サイトメガロウイルス、アデノウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヒトパピローマウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、BK ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスおよびヒト T リンパ好性ウイルス、例えばサイトメガロウイルスまたはアデノウイルスからなる群から選択される、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

前記定常状態マーカーが、T 細胞受容体 (T C R) であり、例えば前記 T 細胞集団が、直接選択の工程において特定の H L A : ペプチド複合体による T C R の可逆的結紮により選択される、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記直接選択が、多量体 H L A : ペプチド複合体、例えばテトラ-、ペンタ-、ヘキサ-

およびStreptamerを用いる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記HLAペプチドまたは多量体が、特定のHLA型、例えばA1、A2、B7、A24、B35、例えばA0201またはB0702を有する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

前記活性化マーカーが、抗原刺激の結果として上方調節される細胞表面マーカー、例えばCD25、CD69、CD137、CD154およびその組合せから選択されるものである、請求項10～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

前記T細胞集団が、このような活性化マーカーに対して向けられる単量体、二量体または多量体抗体または抗体断片による活性化マーカーの可逆的結紮により選択される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記定常状態マーカーが、標的ウイルスに関連した刺激に曝露後5～25時間、例えば6～24時間で発現される、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

前記標的T細胞集団が、特に抗原の存在下で、T細胞拡大培地中で培養することにより拡大される、請求項10～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記標的細胞集団が、定常状態または活性化マーカーによる前もっての選択なしに、動員アフェレシスから選択的に拡大される請求項10～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記拡大が迅速拡大工程、例えば15日以下、例えば14、13、12、11、10、9、8または7日、例えば約10日である、請求項19または20に記載の方法。

【請求項22】

前記培地が、拡大期間に亘って、変化しないまま且つ補足されないままである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

請求項10～22のいずれか一項に記載の方法から得られるかまたは獲得可能であるウイルス特異的拡大T細胞生成物またはそれを含む薬学的組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/053114

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. 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) C12N		
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EDUARD R. SAMUEL ET AL: "CMV-reactive T cells can be isolated from G-CSF mobilised peripheral blood apheresates", BLOOD, vol. 116, no. 21, 19 November 2010 (2010-11-19), page 546, XP009170841, ISSN: 0006-4971 the whole document ----- -/--	1-28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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
4 July 2013		15/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Grötzingler, Thilo

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/053114

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J HASSKARL ET AL: "Induction of graft versus malignancy effect after unrelated allogeneic PBSCT using donor lymphocyte infusions derived from frozen aliquots of the original graft", BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 47, no. 2, 4 April 2011 (2011-04-04), pages 277-282, XP055069640, ISSN: 0268-3369, DOI: 10.1038/bmt.2011.45 abstract page 278, left-hand column - last paragraph page 280, left-hand column - paragraph 1 -----	1-28
X	K. S. PEGGS ET AL: "Directly Selected Cytomegalovirus-Reactive Donor T Cells Confer Rapid and Safe Systemic Reconstitution of Virus-Specific Immunity Following Stem Cell Transplantation", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, vol. 52, no. 1, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 49-57, XP055069249, ISSN: 1058-4838, DOI: 10.1093/cid/ciq042 abstract page 50, left-hand column - last paragraph page 52; figure 2 -----	1-28
X,P	EDWARD R. SAMUEL ET AL: "Successful isolation and expansion of CMV-reactive T cells from G-CSF mobilized donors that retain a strong cytotoxic effector function", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 160, no. 1, 9 October 2012 (2012-10-09), pages 87-100, XP055069211, ISSN: 0007-1048, DOI: 10.1111/bjh.12082 abstract page 88, right-hand column - paragraph 2 page 94, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 3 -----	1-28

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 L 31/00 (2006.01)	A 6 1 L	31/00	T
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 L
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	
C 0 7 K 14/005 (2006.01)	C 0 7 K	14/005	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ケイティ・レベッカ・ニュートン
イギリス・ロンドン・NW1・0QG・セント・パンクラス・ウェイ・8-14・カナル・スタジオ
オズ・1・セル・メディカ・リミテッド内

(72) 発明者 エドワード・サミュエル
イギリス・ロンドン・NW1・0QG・セント・パンクラス・ウェイ・8-14・カナル・スタジオ
オズ・1・セル・メディカ・リミテッド内

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA95X AA95Y CA24 CA44 CA46
4C081 AB11 BA14 CD34
4C087 AA01 AA02 AA03 BB34 BB43 CA04 MA01 NA14 ZB09 ZB33
4H045 AA11 AA30 BA10 BA16 BA17 CA01 CA40 DA86 EA20 EA50