

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-501580
(P2023-501580A)

(43)公表日 令和5年1月18日(2023.1.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		
C 1 2 N	15/864 (2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全111頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-527730(P2022-527730)	(71)出願人	518370079
(86)(22)出願日	令和2年11月13日(2020.11.13)		クリスパー セラピューティクス アクチ
(85)翻訳文提出日	令和4年7月5日(2022.7.5)		エンゲゼルシャフト
(86)国際出願番号	PCT/IB2020/060723		スイス国, 6 3 0 0 ツーク, バーラー
(87)国際公開番号	WO2021/095013		シュトラッセ 1 4
(87)国際公開日	令和3年5月20日(2021.5.20)	(74)代理人	100099759
(31)優先権主張番号	62/934,991		弁理士 青木 篤
(32)優先日	令和1年11月13日(2019.11.13)	(74)代理人	100123582
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 三橋 真二
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74)代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
		(74)代理人	100138210
			弁理士 池田 達則
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キメラ抗原受容体を発現するT細胞を作製するための製造プロセス

(57)【要約】

本開示の態様は、従来の製造方法を上回るいくつかの改善を提供し、それにより臨床的に有用なCAR T細胞療法の強力な供給の生成を可能にする、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する遺伝子操作されたT細胞を製造する方法に関する。

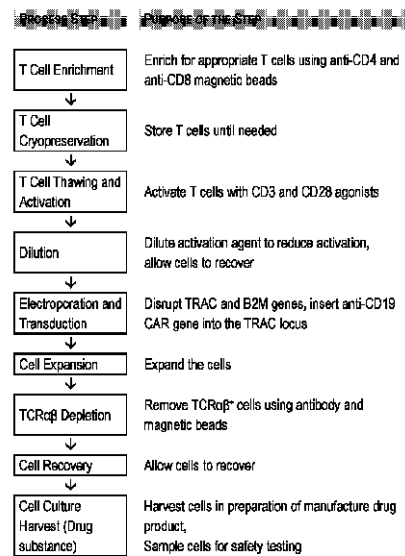


FIG. 7A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子操作された T 細胞を製造する方法であって、

- (i) T 細胞の第 1 の集団を提供する工程と；
- (i i) 細胞培養容器内において、T 細胞活性化剤の存在下で前記 T 細胞の第 1 の集団をインキュベートして、T 細胞の第 2 の集団を生成する工程であって、前記 T 細胞の第 2 の集団は、活性化 T 細胞を含む、工程と；
- (i i i) 前記 T 細胞の第 2 の集団に、第 1 の Cas 9 酵素及び T 細胞受容体 鎖定常領域 (T R A C) 遺伝子を標的化する第 1 のガイド RNA (g R N A) を含む第 1 のリボ核タンパク質 (R N P) 複合体並びに第 2 の Cas 9 酵素及び 2 マイクログロブリン (2 M) 遺伝子を標的化する第 2 の g R N A を含む第 2 の R N P 複合体を導入して、T 細胞の第 3 の集団を生成する工程であって、前記 T 細胞の第 3 の集団は、破壊された前記 T R A C 遺伝子及び破壊された前記 2 M 遺伝子を有する活性化 T 細胞を含む、工程と；
- (i v) 前記 T 細胞の第 3 の集団をアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターとインキュベートして、T 細胞の第 4 の集団を生成する工程であって、前記 A A V ベクターは、キメラ抗原受容体 (C A R) をコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、T R A C 遺伝子座と相同な配列に隣接しており、前記 T 細胞の第 4 の集団は、前記 C A R を発現し、且つ破壊された前記 T R A C 遺伝子及び破壊された前記 2 M 遺伝子を有する活性化 T 細胞を含む、工程と；
- (v) 前記 T 細胞の第 4 の集団を増殖させ、それにより増殖された T 細胞集団を生成する工程と；
- (v i) 前記増殖された T 細胞集団から T C R + T 細胞を除去して、遺伝子操作された T 細胞集団を生成する工程であって、前記遺伝子操作された T 細胞集団は、前記 C A R を発現し、且つ破壊された前記 T R A C 遺伝子及び前記 2 M 遺伝子を有する活性化 T 細胞を含む、工程と；
- (v i i) 前記遺伝子操作された T 細胞集団を採取する工程とを含む方法。

【請求項 2】

前記 T 細胞の第 1 の集団は、ヒト血液細胞から濃縮された凍結保存 T 細胞から誘導される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 T 細胞の第 1 の集団は、(a) ヒトドナーから血液細胞を得る工程と；(b) 前記血液細胞から C D 4 + T 細胞及び / 又は C D 8 + T 細胞を濃縮する工程とを含むプロセスによって調製される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (b) は、抗 C D 4 及び / 又は抗 C D 8 抗体と結合された磁気ビーズを使用して実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 T 細胞の第 1 の集団は、少なくとも約 8 0 % の細胞生存率並びに / 又は少なくとも約 8 0 % の C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞の純度を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

(c) 工程 (b) で生成された前記濃縮された C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞を凍結保存する工程を更に含む、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 T 細胞活性化剤は、C D 3 アゴニスト及び C D 2 8 アゴニストを含み、前記 C D 3 アゴニスト及び C D 2 8 アゴニストは、ナノマトリックス粒子に結合されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (i i) は、約 $2 \times 10^6 / \text{cm}^2$ の細胞播種密度及び約 2×10^6 細胞 / mL の

細胞濃度において、前記細胞培養容器で前記 T 細胞の第 1 の集団を前記 T 細胞活性化剤と約 48 時間にわたってインキュベートすることによって実施される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

混合物中の前記 T 細胞活性化剤対培地の比は、約 1 : 12.5 (v/v) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

活性化を減少させ、且つ工程 (iii) 前に細胞を回復させるために、工程 (ii) 後、前記 T 細胞の第 2 の集団中で前記 T 細胞活性化剤を希釈する工程を更に含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 11】

工程 (iii) は、エレクトロポレーションによって実施される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

工程 (iii) は、1つのエレクトロポレーションイベントを伴う、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記第 1 の RNP 複合体及び前記第 2 の RNP 複合体は、1つのエレクトロポレーションイベントで前記活性化 T 細胞に導入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 の RNP 複合体中の前記第 1 の Cas9 酵素の量は、第 2 の RNA 複合体中の前記第 2 の Cas9 酵素の量と同じである、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 15】

前記第 1 の Cas9 酵素の濃度は、約 0.15 mg/mL であり、前記第 2 の Cas9 酵素の濃度は、約 0.15 mg/mL であり、前記 TRAC 遺伝子を標的化する前記第 1 の gRNA の濃度は、約 0.08 mg/mL であり、及び前記 2M 遺伝子を標的化する前記第 2 の gRNA の濃度は、約 0.2 mg/mL である、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

工程 (iii) の細胞濃度は、約 100×10^6 細胞/mL ~ 約 400×10^6 細胞/mL、任意選択的に約 300×10^6 細胞/mL である、請求項 11 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 17】

工程 (iii) の各容器濃度における細胞数は、約 3×10^8 細胞である、請求項 11 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 AAV ベクターは、約 10,000 ~ 約 80,000 の感染多重度 (MOI) 値を有する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記 AAV ベクターの前記 MOI は、約 20,000 である、請求項 16 に記載の方法。

40

【請求項 20】

前記 AAV ベクターは、AAV 血清型 6 (AAV6) ベクターである、請求項 16 又は 17 に記載の方法。

【請求項 21】

工程 (v) は、約 2×10^5 細胞/cm² ~ 約 7×10^5 細胞/cm² の播種密度において、約 6 日 ~ 約 12 日にわたって細胞培養容器で前記 T 細胞の第 4 の集団を培養することによって実施される、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

50

工程(v)は、約 2×10^5 細胞/cm²～約 5×10^5 細胞/cm²の播種密度において、約7日～約9日にわたって細胞培養容器で前記T細胞の第4の集団を培養することによって実施される、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記T細胞の第4の集団は、約 3×10^5 細胞/cm²～約 5×10^5 細胞/cm²の播種密度において培養される、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記細胞培養容器は、培地交換なしで約10日～約12日にわたる細胞増殖を可能にする静置細胞培養容器である、請求項22又は23に記載の方法。

【請求項25】

前記細胞培養容器は、培地交換なしで約7日～約9日にわたる細胞増殖を可能にする静置細胞培養容器である、請求項21～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

工程(vi)は、前記増殖された細胞を、抗TCR抗体が固定化されてるビーズに接触させ、且つ結合されていない細胞を収集することによって実施される、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記増殖工程は、細胞容器において、約150,000細胞/cm²～約500,000細胞/cm²、任意選択的に約300,000細胞/cm²～約500,000細胞/cm²の密度で前記T細胞を播種する工程を含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記第1のCas9酵素、前記第2のCas9酵素又は両方は、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*) Cas9ヌクレアーゼ(spcas9)である、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

前記第1のCas9酵素及び前記第2のCas9酵素は、同じである、請求項1～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記第1のCas9酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含み、及び/又は前記第2のCas9酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記TRAC遺伝子を標的化する前記第1のgRNAは、配列番号4のスペーサー配列を含む、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

前記TRAC遺伝子を標的化する前記第1のgRNAは、配列番号2のヌクレオチド配列を含む、請求項32に記載の方法。

【請求項33】

前記2M遺伝子を標的化する前記第2のgRNAは、配列番号8のスペーサー配列を含む、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

前記2M遺伝子を標的化する前記第2のgRNAは、配列番号6のヌクレオチド配列を含む、請求項34に記載の方法。

【請求項35】

前記第1のgRNA、前記第2のgRNA又は両方は、1つ以上の2'-O-メチルホスホロチオエート修飾を含む、請求項32～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

前記CARは、癌抗原を標的化する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン及びCD3ζ細胞質シグナル伝達ドメインを含む、請求項1～36のいずれか一項に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 37】

前記 C A R は、C D 19 に結合する、請求項 1 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

前記細胞外ドメインは、単鎖可変断片 (s c F v) を含み、前記膜貫通ドメインは、C D 8 a から誘導され、及び / 又は前記共刺激ドメインは、C D 28 から誘導される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 39】

前記 C A R は、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 40】

前記 C A R は、B C M A に結合する、請求項 1 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記細胞外ドメインは、単鎖可変断片 (s c F v) を含み、前記膜貫通ドメインは、C D 8 a から誘導され、及び / 又は前記共刺激ドメインは、4 - 1 B B から誘導される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 42】

前記 C A R は、配列番号 61 のアミノ酸配列を含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 43】

請求項 1 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法によって生成される、遺伝子操作された T 細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年11月13日に出願された米国仮特許出願第62/934,991号明細書に対する優先権の利益を主張するものであり、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

キメラ抗原受容体 (C A R) T 細胞療法は、血液癌の治療において有望な治療効果を示している。典型的には、C A R - T 細胞は、患者の免疫細胞 (自己) 又は無関係のヒトドナーからの免疫細胞 (同種異系) のいずれかの遺伝子操作によって生成される。高品質の臨床用 C A R - T 細胞の生成は、この技術を幅広く適用するための必要条件である。従って、C A R - T 細胞の大規模生産のための効率的な製造プロセスを開発することは、非常に興味深いことである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本開示は、少なくとも部分的に、従来 of 製造方法を上回るいくつかの改善を提供する、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現する遺伝子操作された T 細胞を製造する方法の開発に基づく。このような改善としては、本明細書に記載の遺伝子改変の一貫性及び効率の改善が挙げられるが、これらに限定されず、それにより臨床的に有用な C A R - T 細胞療法の強力な供給の生成が可能になる。

【0004】

従って、本開示の一態様は、遺伝子操作された T 細胞を製造する方法であって、(i) T 細胞の第 1 の集団を提供する工程と；(i i) 細胞培養容器内において、T 細胞活性化剤の存在下で T 細胞の第 1 の集団をインキュベートして、T 細胞の第 2 の集団を生成する工程であって、T 細胞の第 2 の集団は、活性化 T 細胞を含む、工程と；(i i i) 活性化 T 細胞に、第 1 の C a s 9 酵素及び T 細胞受容体 鎖定常領域 (T R A C) 遺伝子を標的化する第 1 のガイド RNA (g R N A) を含む第 1 のリボ核タンパク質 (R N P) 複合体

10

20

30

40

50

並びに第2のCas9酵素及び2M遺伝子を標的化する第2のgRNAを含む第2のRNP複合体を導入して、T細胞の第3の集団を生成する工程であって、T細胞の第3の集団は、破壊されたTRAC遺伝子及び破壊された2M遺伝子を有するT細胞を含む、工程と；(iv)T細胞の第3の集団をアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターとインキュベートして、T細胞の第4の集団を生成する工程であって、T細胞の第4の集団は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞を含み、AAVベクターは、CARをコードする核酸配列を含み、CARをコードする核酸配列は、第1のgRNAによって標的化されるTRAC遺伝子座と相同な配列に隣接している、工程と；(v)T細胞の第4の集団を増殖させる工程と；(vi)増殖されたT細胞からTCR⁺T細胞を除去して、遺伝子操作されたT細胞集団を生成する工程であって、遺伝子操作されたT細胞集団は、CARを発現し、且つ破壊されたTRAC遺伝子及び2M遺伝子を有するT細胞を含む、工程と；(vii)遺伝子操作されたT細胞集団を収集する工程とを含む方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0005】

いくつかの実施形態では、T細胞の第1の集団は、ヒト血液細胞から濃縮された凍結保存T細胞から誘導される。いくつかの実施形態では、T細胞の第1の集団は、(a)ヒトドナーから血液細胞を得る工程と；(b)CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞を濃縮する工程とを含むプロセスによって調製される。いくつかの実施形態では、(b)は、抗CD4及び/又は抗CD8抗体と結合された磁気ビーズを使用して実施される。いくつかの実施形態では、T細胞の第1の集団は、少なくとも80%の細胞生存率並びに/又は少なくとも80%のCD4⁺及びCD8⁺T細胞の純度を有する。いくつかの実施形態では、方法は、(c)工程(b)で生成された濃縮されたCD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞を凍結保存する工程を更に含む。

【0006】

いくつかの実施形態では、T細胞活性化剤は、ナノマトリックス粒子に結合されたCD3アゴニスト及びCD28アゴニストを含む。いくつかの実施形態では、工程(ii)は、約 $2 \times 10^6 / \text{cm}^2$ の細胞播種密度及び約 2×10^6 細胞/mLの細胞濃度において、細胞培養容器でT細胞の第1の集団をT細胞活性化剤と混合し、且つこのようにして形成された混合物を約48時間にわたってインキュベートすることによって実施される。いくつかの実施形態では、混合物中のT細胞活性化剤対培地の比は、約1:12.5(v/v)である。

【0007】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法は、活性化を減少させ、且つ工程(iii)前に細胞を回復させるために、工程(ii)後、T細胞の第2の集団中でT細胞活性化剤を希釈する工程を更に含む得る。

【0008】

いくつかの実施形態では、工程(iii)は、エレクトロポレーションによって実施される。いくつかの実施形態では、工程(iii)は、1つのエレクトロポレーションイベントを伴う。いくつかの実施形態では、第1のRNP複合体及び第2のRNP複合体は、1つのエレクトロポレーションイベントで活性化T細胞に導入される。いくつかの実施形態では、第1のRNP複合体中の第1のCas9酵素の量は、第2のRNP複合体中の第2のCas9酵素の量と同じである。いくつかの実施形態では、第1のCas9酵素の濃度は、約0.15mg/mLであり、第2のCas9酵素の濃度は、約0.15mg/mLであり、TRAC遺伝子を標的化する第1のgRNAの濃度は、約0.08mg/mLであり、及び2M遺伝子を標的化する第2のgRNAの濃度は、約0.2mg/mLである。いくつかの実施形態では、工程(iii)の細胞濃度は、約 100×10^6 細胞/mL~約 400×10^6 細胞/mLである。いくつかの実施形態では、工程(iii)の細胞濃度は、約 300×10^6 細胞/mLである。他の実施形態では、工程(iii)(例えば、エレクトロポレーション)で使用される各容器の総細胞数は、約 5×10^8 ~約 1×10^9 細胞、例えば約 7×10^8 細胞であり得る。いくつかの例では、複数の容器、例えば約5~10個の容器が工程(iii)(例えば、エレクトロポレーション)で使用

され得る。具体例では、7個もの容器が工程(iii)で使用され得、これは、例えば、エレクトロポレーションのために約 1.5×10^9 ~約 3×10^9 細胞(例えば、約 2.1×10^9 細胞又は約 2.7×10^9 細胞)を含み得る。

【0009】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは、約10,000~約80,000の感染多重度(MOI)値を有する。いくつかの実施形態では、AAVベクターのMOIは、約20,000である。いくつかの実施形態では、AAVベクターは、AAV血清型6(AAV6)ベクターである。

【0010】

いくつかの実施形態では、工程(v)は、約 2×10^5 細胞/cm²~約 7×10^5 細胞/cm²の播種密度において、細胞培養容器でT細胞の第4の集団を播種し、且つ約6日~約12日にわたって細胞を培養することによって実施される。いくつかの実施形態では、T細胞の第4の集団は、約150,000細胞/cm²~約600,000細胞/cm²の播種密度で細胞培養容器に播種され得る。いくつかの実施形態では、工程(v)は、約 2×10^5 細胞/cm²~約 5×10^5 細胞/cm²の播種密度において、約7日~約9日にわたって細胞培養容器でT細胞の第4の集団を培養することによって実施される。いくつかの実施形態では、工程(v)は、約 3×10^5 細胞/cm²~約 5×10^5 細胞/cm²の播種密度において、細胞培養容器でT細胞の第4の集団を播種することによって実施される。いくつかの実施形態では、細胞培養容器は、培地交換なしで約10日~約12日にわたる細胞増殖を可能にする静置細胞培養容器(本明細書では静置培養容器とも交換可能と呼ばれる)である。いくつかの実施形態では、細胞培養容器は、培地交換なしで約7日~約9日にわたる細胞増殖を可能にする静置細胞培養容器である。

【0011】

いくつかの実施形態では、工程(vi)は、増殖された細胞を、抗TCR抗体が固定化されているビーズに接触させ、且つ結合されていない細胞を収集することによって実施される。

【0012】

いくつかの実施形態では、第1のCas9酵素、第2のCas9酵素又は両方は、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*) Cas9ヌクレアーゼ(spCas9)である。いくつかの実施形態では、第1のCas9酵素及び第2のCas9酵素は、同じである。いくつかの実施形態では、第1のCas9酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含み、及び/又は第2のCas9酵素は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、TRAC遺伝子を標的化する第1のgRNAは、配列番号4のスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、TRAC遺伝子を標的化する第1のgRNAは、配列番号2のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、2M遺伝子を標的化する第2のgRNAは、配列番号8のスペーサー配列を含む。いくつかの実施形態では、2M遺伝子を標的化する第2のgRNAは、配列番号6のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、第1のgRNA、第2のgRNA又は両方は、1つ以上の2'-O-メチルホスホロチオエート修飾を含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、CARは、癌抗原を標的化する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン及びCD3ζ細胞質シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、単鎖可変断片(scFv)を含み、膜貫通ドメインは、CD8aから誘導され、且つ/又は共刺激ドメインは、CD28及び/若しくは4-1BBから誘導される。いくつかの実施形態では、CARは、CD19に結合する。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号37のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、CARは、BCMAに結合する。いくつかの実施形態では、CARは、配列番号61のアミノ酸配列を含む。

【0014】

本開示の態様は、本明細書に記載の方法によって生成される、遺伝子操作されたT細胞

10

20

30

40

50

集団を提供する。

【0015】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細を以下の説明に記載する。本発明の他の特徴又は利点は、以下の図面及びいくつかの実施形態の詳細な説明並びに添付の特許請求の範囲からも明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A - 1B】様々な条件下のT細胞の活性化及び増殖を示す図である。図1A：CD25及び/又はCD69を発現する細胞のパーセントとして測定されるT細胞活性化を示すグラフ。図1B：CD25の発現レベルが細胞増殖速度と関連していることを示すグラフ。CD25の発現レベルは、CD25の平均蛍光強度(MFI)として測定された。

10

【図2A - 2D】本明細書に記載の最適化された条件を使用して、静置培養容器内でT細胞が活性化される小規模製造プロセスで調製されたT細胞における編集効率及びCAR発現を示す図を含む。T細胞は、対照としてTフラスコで並行して生成された。UT：未処理T細胞；EP：模擬エレクトロポレーションT細胞；フラスコ：Tフラスコ内のT細胞；及び容器：静置培養容器内のT細胞。図2A：T細胞におけるTCRノックアウト効率を示すグラフ。図2B：T細胞における2Mノックアウト効率を示すグラフ。図2C：T細胞におけるダブルノックアウト(DKO)効率を示すグラフ。図2D：T細胞におけるCARパーセント(CAR%)発現を示すグラフ。

【図3】小規模製造プロセスで調製されたT細胞の編集後のT細胞増殖を示す図である。UT：未処理T細胞；EP：模擬エレクトロポレーションT細胞；フラスコ：Tフラスコ内のT細胞；及び容器：静置培養容器内のT細胞。

20

【図4A - 4F】異なる細胞濃度でエレクトロポレーションされたT細胞における編集効率及びCAR発現を示す図を含む。UT：未処理T細胞；D3：3日目の編集効率；D6：6日目の編集効率；D9：9日目の編集効率；及びD12：12日目の編集効率。図4A： 100×10^6 細胞/mL ~ 300×10^6 細胞/mLの細胞濃度でエレクトロポレーションされたT細胞における2Mノックアウト効率を示すグラフ。図4B： 100×10^6 細胞/mL ~ 300×10^6 細胞/mLの細胞濃度でエレクトロポレーションされたT細胞におけるTCRノックアウト効率を示すグラフ。図4C： 100×10^6 細胞/mL ~ 300×10^6 細胞/mLの細胞濃度でエレクトロポレーションされたT細胞におけるCARパーセント(CAR%)発現を示すグラフ。図4D： 200×10^6 細胞/mL ~ 400×10^6 細胞/mLの細胞濃度でエレクトロポレーションされたT細胞における2Mノックアウト効率を示すグラフ。図4E： 200×10^6 細胞/mL ~ 400×10^6 細胞/mLの細胞濃度でエレクトロポレーションされたT細胞におけるTCRノックアウト効率を示すグラフ。図4F： 200×10^6 細胞/mL ~ 400×10^6 細胞/mLの細胞濃度でエレクトロポレーションされたT細胞におけるCARパーセント(CAR%)発現を示すグラフ。

30

【図5A - 5B】様々なMOIで形質導入されたT細胞におけるCAR⁺発現を示す図を含む。図5A：1.25K ~ 80Kの範囲のMOIで形質導入されたT細胞におけるCAR⁺発現を示すグラフ。UT：未処理T細胞；D3：形質導入の3日後のCAR⁺発現；D6：形質導入の6日後のCAR⁺発現；D10：形質導入の10日後のCAR⁺発現；及びD13：形質導入の13日後のCAR⁺発現。図5B：0.12K ~ 23Kの範囲のMOIで形質導入された11日後に測定されたT細胞におけるCAR⁺発現を示すグラフ。P.C.：陽性対照；EP：エレクトロポレーションのみの対照；及びアイソタイプ：CAR陽性アイソタイプはヤギIgGに置き換えられた。

40

【図6A - 6C】編集されたT細胞の増殖に対する細胞播種密度の影響を示す図を含む。図6A：増殖中の細胞数を示すグラフ。図6B：増殖中の細胞密度を示すグラフ。図6C：増殖中の増殖倍数を示すグラフ。

【図7A - 7E】抗CD19指向性キメラT細胞抗原受容体(CTX110)を発現する遺伝子操作されたT細胞の製造からのデータを示す図を含む。図7Aは、本明細書に記載

50

の技術のいくつかの実施形態による、抗CD19 CARを発現するT細胞を作製するための例示的な製造プロセスのフローチャートを含む。図7B~7Cは、様々なMOIで形質導入されたT細胞におけるCAR⁺発現を示す図を含む。図7B: 0K~80Kの範囲のrAAV-138MOIで形質導入されたT細胞におけるCAR⁺発現を示すグラフ。図7C: 0K~80Kの範囲のrAAV-138MOIで形質導入されたT細胞におけるCAR⁺発現を示すグラフ。20KのrAAV-138MOIによる形質導入を陽性対照として使用した。図7D~7Eは、TCRを標的化するsgRNA(TA-1 sgRNA)又はB2Mを標的化するsgRNA(B2M-1 sgRNA)の異なる濃度から形成されたRNP複合体でエレクトロポレーションされたT細胞における編集効率を示す図を含む。TCR⁺: TCR⁻の編集を有する細胞のパーセント; 2M⁻: 2M⁺の編集を有する細胞のパーセント; 及びダブルノックアウト(DKO): TCR⁺及び2M⁺の編集を有する細胞のパーセント。図7D: 37.5µg/mL~300µg/mLのTA-1を使用して形成されたRNP複合体でエレクトロポレーションされたT細胞のノックアウト効率を示すグラフ。図7E: 37.5µg/mL~300µg/mLのB2M-1を使用して形成されたRNP複合体でエレクトロポレーションされたT細胞のノックアウト効率を示すグラフ。

【図8A-8G】抗BCMA指向性キメラT細胞抗原受容体(CTX120)を発現する遺伝子操作されたT細胞の製造からのデータを示す図を含む。図8Aは、本明細書に記載の技術のいくつかの実施形態による、抗BCMA CARを発現するT細胞を作製するための例示的な製造プロセスのフローチャートを含む。図8B: MOIの増加に伴って形質導入されたT細胞におけるCAR⁺発現を示すグラフ。図8C: CTX120で検出された疲弊マーカーのレベルを示すグラフ。図8D: CTX120のCD8⁺T細胞で検出されたメモリーマーカーのレベルを示すグラフ。図8E: CTX120のCD4⁺T細胞で検出されたメモリーマーカーのレベルを示すグラフ。図8F: CTX120とBCMA⁺腫瘍細胞の共培養によるIFN γ の産生を示すグラフ。図8G: CTX120とBCMA⁺腫瘍細胞の共培養による腫瘍殺傷を示すグラフ。

【図9A-9B】編集後の増殖の日数の関数としての1mL当たりの細胞濃度のグラフを提供する。

【図10A-10B】編集後の増殖の日数の関数として計算された細胞数のグラフを提供する。

【図11A-11B】編集後の増殖の日数の関数としての細胞生存率のパーセンテージのグラフを提供する。

【図12A-12C】様々な再プレーティング及び低プレーティング群で評価されたCAR⁺%(図12A)、TRAC⁻%(図12B)及び2M⁻%(図12C)を含む編集効率を示すグラフを提供する。

【図13A-13B】様々な再プレーティングされた細胞集団におけるCD4⁺及びCD8⁺細胞の比率を提供する。

【図14A-14F】再プレーティングされた集団におけるメモリー細胞サブタイプマーカーの評価を示す棒グラフを提供する。再プレーティングされた集団の細胞は、ナイーブT細胞、セントラルメモリー(CM)T細胞、エフェクターメモリー(EM)T細胞及び末端エフェクター(TE)T細胞として評価された。

【図15A-15F】CAR⁺、CD4⁺/CAR⁺及びCD8⁺/CAR⁺細胞の再プレーティングされた集団における疲弊マーカーの評価を示す棒グラフを提供する。分析された3つの疲弊マーカーはPD1、LAG3及びTIM3であった。

【図16A-16C】フローサイトメトリーに基づく細胞傷害性アッセイを使用して評価された、*in vitro*でCD19陽性Raji標的細胞を殺す、再プレーティング及び低プレーティング密度群のCAR-T細胞の能力を示すグラフを提供する。

【図17A-17D】*in vivo*での3つの異なる用量のCAR細胞での接種後の日数の関数としての腫瘍細胞の生存率を示すグラフを提供する。

【図18A-18D】*in vivo*での3つの用量のCAR細胞での接種後の日数の関

10

20

30

40

50

数としてのマウスの腫瘍量を示すグラフを提供する。

【図19】本開示の一実施形態を示すフローチャートを示す。

【図20】CAR T細胞溶解を測定することによるアッセイ対照FACS分析を示す。CAR T細胞は、CTX110 CAR T細胞であった。T細胞の81%は、CAR⁺であった。

【図21A - 21C】*in vitro*での細胞溶解及びサイトカイン産生を測定するアッセイ対照実験の結果を示す。本アッセイでは、凍結ストックから解凍したCTX110 CAR-T細胞を使用した。T細胞は、HDR後6日目で80%CAR⁺であった。

【図22A - 22C】3人のドナーの各々から誘導されるT細胞が、1倍、2倍及び4倍の培養条件の間で様々な程度の*in vitro*効力を有することを示す*in vitro*効力分析の結果を示す。 10

【図23A - 23C】異なる細胞濃度での細胞溶解の分析の結果を示し、ドナー1及び2から誘導される細胞が、異なるパーセンテージのCAR⁺細胞にもかかわらず同様の応答を示したことを示す。

【図24A - 24B】CAR⁺細胞について正規化した場合の3人のドナーからの細胞溶解の分析の結果を示す。ドナー2及び3は、CAR細胞が正規化されたときのアッセイで同様に挙動した。同じE:Tの比率でドナー2の2倍のCAR-T細胞数でアッセイを繰り返した。

【図25A - 25C】3人のドナー全てについてのCAR細胞の接種後の日数及び*in vivo*での増殖条件の関数としてのマウスの生存率を示す生存曲線を提供する。 20

【発明を実施するための形態】

【0017】

本開示は、少なくとも部分的に、CAR-T細胞、特に同種異系CAR-T細胞を生成するための、製造プロセスの1つ以上の工程について改善された条件を含む改善された製造プロセスの開発に基づく。本明細書では、少なくとも以下の有利な結果につながる改善された製造プロセスが開示される：

(a) 本明細書で提供されるT細胞濃縮条件の改善から生じるT細胞純度の改善及びT細胞生存率の改善。

(b) 本明細書で提供されるT細胞形質導入条件の改善から生じる、CAR発現T細胞を産生するための一貫性の改善及び効率の改善。 30

(c) 本明細書で提供されるCRISPR-Cas9媒介遺伝子編集条件の改善から生じるT細胞におけるTRAC遺伝子及び2M遺伝子破壊の一貫性の改善及び効率の改善。

(d) 本明細書に記載の改善された製造プロセスによって提供される生産時間の短縮及び生産コストの減少から生じるCAR T細胞療法の供給の増加。

(e) 本明細書に記載の改善された製造プロセスを使用した均一で高品質のCAR T療法の生成から生じる生成された製剤の変動性の低減。

(f) T細胞で高いCAR発現レベルを維持しながらのAAV形質導入条件の単純化。

【0018】

従って、本明細書では、癌抗原、例えばCD19又はBCMAを標的化し、ノックアウトされたTRAC及び2M遺伝子を有するCARコンストラクトなどのCARコンストラクトを発現する遺伝子操作されたT細胞を製造する方法が提供される。本明細書に記載される方法によって生成される遺伝子操作されたT細胞集団及びその治療的使用も本開示の範囲内である。 40

【0019】

I. 遺伝子操作されたT細胞の製造

本開示の態様は、破壊された2-マイクログロブリン(2M)遺伝子及び破壊されたT細胞受容体鎖定常領域(TRAC)遺伝子並びにキメラ抗原受容体(CAR)をコードする挿入された核酸を含む遺伝子操作されたT細胞を製造する方法が提供される。

【0020】

2M遺伝子及びTRAC遺伝子の破壊は、遺伝子操作されたT細胞を非同種異系反応 50

性にし、同種異系間移植に適したものにす。CARをコードする核酸の挿入は、遺伝子操作されたT細胞がその表面にCARを発現することを可能にし、そこで遺伝子操作されたT細胞を癌細胞に標的化する。

【0021】

従って、本明細書で開示される遺伝子操作されたT細胞を製造する方法は、いくつかの実施形態では、CRISPR-Cas9遺伝子編集を使用してTRACと2Mの発現を妨害し、アデノ随伴ウイルス(AAV)形質導入を使用してCARをコードする核酸を挿入することを伴う。

【0022】

一般に、本明細書で開示されるCAR-T細胞を製造する方法は、(i)好適なヒト免疫細胞源からCD4⁺/CD8⁺T細胞を濃縮する工程と、(ii)濃縮されたCD4⁺/CD8⁺T細胞を活性化する工程と、(iii)活性化T細胞を遺伝子操作して破壊されたTRAC及びB2M遺伝子を有するCAR-T細胞を生成する工程と、治療的使用のために遺伝子操作されたT細胞を採取する工程とを含み得る。必要に応じて、濃縮されたCD4⁺/CD8⁺T細胞は、将来の使用のために凍結保存を介して保存され得る。代わりに又は加えて、遺伝子操作されたT細胞は、収集前に*in vitro*で増殖させ得る。TCR⁺T細胞は、このようにして生成されたCAR-T細胞集団から枯渇させ得る。

【0023】

(i) T細胞の濃縮

本明細書に開示される製造方法のいずれも出発物質としてヒト血液細胞を使用し得る。例えば、T細胞を、遠心沈降(例えば、FICOLL(商標)分離)などの当業者に公知の技術を使用して、対象から回収される血液の単位から得ることができる。代わりに、遺伝子操作されたT細胞の作製に使用するためのT細胞は、*in vitro*での分化を介して幹細胞(例えば、HSC又はiPSC)から誘導され得る。いくつかの実施形態では、血液細胞は個々のヒトドナーから得ることができる。他の実施形態では、血液細胞は、複数のヒトドナー(例えば、2、3、4又は5人のヒトドナー)から得ることができる。

【0024】

いくつかの例では、好適なヒトドナーからのロイコパック(leukopak)サンプルを使用し得る。当技術分野において公知のとおり、ロイコパックサンプルは、末梢血から収集される濃縮された白血球アフェレーシス(leukapheresis)製品である。ロイコパックサンプルには、典型的には、単球、リンパ球、血小板、血漿及び赤血球などの様々な血液細胞が含まれている。ヒトドナーは、好ましくは、健康なヒトドナーである。例えば、ヒトドナー候補は、HBV、HCV、HIV、HTLV、WNV、クルーズトリパノソーマ及びノ又はCMVのスクリーニングの対象となり得る。スクリーニングで陰性の結果を示したヒト対象は、血液細胞のドナーとして使用され得る。

【0025】

本方法での使用が見出されるT細胞の供給源は特に限定されない。いくつかの実施形態では、T細胞バンクからのT細胞は、本明細書に開示される製造方法のいずれかにおける出発物質として使用することができる。T細胞バンクは、細胞培養におけるT細胞の持続性を改善するために、特定の遺伝子(例えば、細胞の自己再生、アポトーシス及びノ又はT細胞の疲弊又は複製老化に関与する遺伝子)の遺伝子編集を伴うT細胞を含み得る。T細胞バンクは、真正T細胞、例えば、非形質転換T細胞、最終分化T細胞、安定したゲノムを有するT細胞並びにノ又は増殖(proliferation)及び増殖(expansion)のためにサイトカイン及び成長因子に依存するT細胞から生成し得る。代わりに、このようなT細胞バンクは、造血幹細胞(例えば、iPSC)などの前駆細胞、例えば、*in vitro*での培養物から生成し得る。いくつかの例では、T細胞バンク内のT細胞は、細胞の自己複製に関与する1つ以上の遺伝子、アポトーシスに関与する1つ以上の遺伝子及びノ又はT細胞の疲弊に関与する1つ以上の遺伝子の遺伝子編集を含み得、そのような遺伝子の発現を破壊又は低減し、培養の持続性の改善をもたらす。T細胞バ

10

20

30

40

50

ンクで編集された遺伝子の例としては、Tet2、Fas、CD70、Regnase-1又はこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。編集されていないT細胞と比較して、T細胞バンクのT細胞は、培養における増殖能力(expansion capacity)の増強、増殖能力(proliferation capacity)の増強、T細胞の活性化の増大及び/又はアポトーシスレベルの低下を有し得る。

【0026】

好適なT細胞は、従来の方法又は本明細書に開示される方法を使用して、ヒト血液細胞から濃縮することができる。遺伝子操作されたT細胞の作製に使用するためのT細胞は、CD4⁺、CD8⁺又はこれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない1つ以上のT細胞マーカーを発現し得る。いくつかの実施形態では、CD4⁺T細胞は、ヒト血液細胞から濃縮することができる。他の実施形態では、CD8⁺T細胞を濃縮することができる。具体例では、CD4⁺とCD8⁺T細胞のいずれもヒト血液細胞から精製される。

10

【0027】

CD4⁺T細胞及び/又はCD8⁺T細胞は、当技術分野で公知の任意の方法又は本明細書に開示されている方法を使用して、例えば、標的T細胞の特定の細胞表面バイオマーカーに結合することができる抗体、例えば、CD4に特異的な抗体及び/又はCD8に特異的な抗体を使用して、本明細書に記載されているものなどの好適な血液細胞源から単離することができる。いくつかの実施形態では、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞の濃縮は、磁気ビーズに結合した抗CD4及び抗CD8抗体を使用して実施することができる。CD4⁺及びCD8⁺T細胞を含む細胞集団は、好適な条件下で好適な期間、そのような磁気ビーズと共にインキュベートすることができ、ビーズに結合した抗体を介して標的T細胞を磁気ビーズに結合させることができる。非結合細胞は洗浄でき、ビーズに結合したCD4⁺及びCD8⁺T細胞は通常の方法で収集できる。

20

【0028】

濃縮されたT細胞(例えば、CD4⁺T細胞及びCD8⁺T細胞)は、日常的な慣行に従って、細胞生存率及び/又は標的T細胞の純度などの特徴について評価され得る。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される濃縮工程からのT細胞集団は、少なくとも約80%(例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%又はそれを超える)の細胞生存率を有し得る。代わりに又は加えて、濃縮されたT細胞集団は、少なくとも約80%、例えば、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、約98%又はそれを超える標的T細胞(例えば、CD4⁺及び/又はCD8⁺T細胞)の純度を有し得る。代わりに又は加えて、濃縮されたT細胞集団は、少なくとも約70%、例えば、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、約98%又はそれを超える標的T細胞(例えば、CD4⁺及び/又はCD8⁺T細胞)の純度を有し得る。

30

【0029】

「約」又は「およそ」という用語は、当技術分野の通常の技能の1つによって決定される特定の値の許容可能な誤差範囲内を意味し、これは、値がどのように測定又は決定されるか、すなわち測定システムの制限に部分的に依存する。例えば、「約」は、当技術分野の慣行に従って、許容可能な標準偏差の範囲内を意味し得る。代わりに、「約」とは、所定の値の最大±20%、好ましくは最大±10%、より好ましくは最大±5%、更に好ましくは最大±1%の範囲を意味し得る。代わりに、特に生物学的システム又はプロセスに関して、この用語は、値の1桁以内、好ましくは2倍以内を意味し得る。特定の値が出願及び特許請求の範囲に記載されている場合、特に明記しない限り、「約」という用語は暗黙的であり、これに関連して特定の値の許容可能な誤差範囲内を意味する。

40

【0030】

濃縮されたT細胞集団(これも本開示の範囲内である)は、本明細書に開示されるように、更なる処理のために直ちに使用され得る。代わりに、濃縮されたT細胞集団は、例え

50

ば凍結保存を介して、将来の使用に好適な条件下で保存され得る。更なる処理前に凍結保存T細胞を通常の手順に従って解凍することができる。解凍した細胞の細胞生存率を評価して、解凍した細胞が更なる処理に好適であるかどうかを判断することができる。

【0031】

(ii) T細胞活性化

濃縮されたT細胞はT細胞活性化を受けて、濃縮されたCD4⁺/CD8⁺T細胞の増殖 (proliferation) 及び増殖 (expansion) を可能にし得る。本明細書に開示される方法のいずれかで使用されるT細胞活性化工程は、高いT細胞活性化効率を提供する本明細書に開示されるT細胞活性化条件を含み得る。更に、そこから得られた活性化T細胞は、高い遺伝子編集効率及び編集後の高いT細胞増殖率を示す。以下の例を参照されたい。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、T細胞活性は、T細胞活性化剤又は薬剤、例えば、CD3/TCR媒介性シグナル伝達経路及び/又は共刺激分子 (例えば、CD28) 媒介性シグナル伝達経路を刺激する薬剤を使用して達成することができる。例えば、T細胞活性化剤は、CD3アゴニスト (例えば、アゴニスト抗CD3抗体) であり得、CD3/TCR-媒介性細胞シグナル伝達経路を活性化する。代わりに又は加えて、T細胞活性化剤は、CD28アゴニスト (例えば、抗CD28抗体) であり得、CD28によって媒介される共刺激シグナル伝達経路を活性化する。本明細書に開示される方法で使用するためのT細胞活性化剤のいずれも、ナノマトリックス粒子などの支持部材に結合し得る。具体例では、本明細書に開示される方法で使用するためのT細胞活性化剤は、抗CD3抗体及び抗CD28抗体を含み得、これらは、ナノマトリックス粒子に結合し得る。いくつかの実施形態では、T細胞活性化剤は、ナノマトリックス粒子に結合したCD3アゴニスト及びCD28アゴニストを含む。いくつかの実施形態では、CD3アゴニスト及びCD28アゴニストは、同じナノマトリックス粒子に結合している。いくつかの実施形態では、CD3アゴニスト及びCD28アゴニストは、異なるナノマトリックス粒子に結合している。

20

【0033】

T細胞活性化を達成するために、本明細書で開示される濃縮されたT細胞 (例えば、CD4⁺/CD8⁺T細胞) は、好適な細胞播種密度及び好適な細胞濃度で細胞培養容器に入れ、本明細書に開示されるT細胞活性化剤のいずれかの存在下で好適な期間インキュベートして、T細胞活性化を誘導し得る。

30

【0034】

場合により、細胞培養容器中のT細胞活性化剤対細胞培養培地の比は、約1:10 (v/v) ~ 約1:15 (v/v) の範囲であり得る。いくつかの例では、細胞培養容器中のT細胞活性化剤対細胞培養培地の比は、約1:10 (v/v)、約1:10.5 (v/v)、約1:11 (v/v)、約1:11.5 (v/v)、約1:12 (v/v)、約1:12.5 (v/v)、約1:13 (v/v)、約1:13.5 (v/v)、約1:14 (v/v)、約1:14.5 (v/v) 又は約1:15 (v/v) であり得る。具体例では、細胞培養容器中のT細胞活性化剤対培養培地の比は、約1:12.5 (v/v) である。

40

【0035】

代わりに又は加えて、好適な細胞播種密度は、約 $1.5 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ (例えば、 $2 \times 10^6 / \text{cm}^2$) であり得、好適な細胞濃度は、約 $1.5 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ (例えば、 $2 \times 10^6 / \text{mL}$) であり得る。細胞は、T細胞活性化剤と、約42 ~ 54時間、例えば、約48時間インキュベートされ得る。

【0036】

いくつかの実施形態では、細胞培養容器は、静置培養容器であり得、これは、本明細書に開示されるように、遺伝子操作されたT細胞の比較的大規模な生産を可能にするであろう。従来の細胞培養フラスコと比較して、静置細胞培養容器は、混合又は振盪することなくT細胞に酸素と栄養素を供給する培地の下に沈められた高ガス透過性膜上にT細胞が存

50

在することを可能にする。静置培養容器は、培地を交換することなくT細胞の製造を可能にする。従って、いくつかの実施形態では、本明細書で開示される方法のいずれかにおけるT細胞活性化プロセスは、培地交換を伴わなくてもよい。

【0037】

必要に応じて、活性化剤を細胞培養容器から除去するか、又は後続の遺伝子編集イベント前に希釈し、活性化剤が遺伝子編集に与える可能性のある潜在的な影響を最小限に抑え得る。いくつかの実施形態では、活性化剤は、通常の方法、例えば遠心分離などを使用して細胞培養容器から除去することができる。代わりに、活性化剤は、遺伝子編集前に細胞培養容器で希釈、例えば細胞培養容器に培地を添加することによって希釈され得る。

【0038】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるT細胞活性化プロセスのいずれかから誘導される活性化T細胞は、遺伝子編集前にT細胞を回復させるために一晚（例えば、約16時間）培養され得る。場合により、活性化T細胞の培養物は、依然としてT活性化剤が含まれている場合がある。他の場合、活性化T細胞は、T細胞活性化剤がほとんど又は全く存在しない場合がある。

【0039】

(iii) 活性化T細胞のCRISPR-Cas9媒介遺伝子編集

本明細書で開示される手順のいずれかによって調製される活性化T細胞は、例えば、CRISPR-Cas9遺伝子編集技術を介して、宿主応答関連遺伝子、例えば、TRAC遺伝子及び/又は2M遺伝子をノックアウトするための遺伝子編集を受け得る。

【0040】

TRAC遺伝子は、TCR複合体の構成要素をコードする。TRAC遺伝子の破壊は、TCRの機能喪失をもたらし、この操作されたT細胞を非同種異系反応性にし、且つ同種異系間移植に好適なものにし、移植片対宿主疾患のリスクを最小化する。2M遺伝子は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)I複合体の共通(不変)構成要素をコードする。

2M遺伝子を破壊すると、宿主対治療的同種T細胞応答を防ぐことができる。TRAC遺伝子と2M遺伝子の両方をノックアウトすると、細胞治療に使用する同種異系T細胞の産生がもたらされる。

【0041】

CRISPR-Cas9を媒介した遺伝子編集システム

CRISPR-Cas9システムは、遺伝子編集のために使用されるRNA誘導型DNA標的化プラットフォームとして転用されている、原核生物に天然に存在する防御機構である。CRISPR-Cas9システムは、DNAヌクレアーゼであるCas9と、2つの非コードRNAであるcrisprRNA(crRNA)及びトランス活性化型RNA(tracrRNA)とに依拠するものであり、DNAを切断することを目的としている。CRISPRは、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピートの頭字語であり、例えば原核生物を感染又は攻撃したウイルスによって細胞に以前暴露された外来DNAと類似性を有するDNAの断片(スペーサーDNA)を含有する細菌及び古細菌のゲノムに見られるDNA配列のファミリーである。例えば、同様のウイルスがその後の攻撃時に再導入すると、類似した外来DNAを検出及び破壊するために、これらのDNAの断片が原核生物によって使用される。CRISPR座位の転写によってスペーサー配列を含むRNA分子の形成がもたらされるが、このRNA分子は、外来の外来性DNAを認識して切断することができるCas(CRISPR関連)タンパク質と結合し、標的となる。CRISPR/Casシステムのいくつかの種類及びクラスが記載されている(例えば、Koonin et al., (2017) Curr Opin Microbiol 37: 67-78を参照されたい)。

【0042】

crRNAは、典型的には、標的DNA内の20個のヌクレオチド(nt)の配列とのワトソン-クリック塩基対形成を介して、CRISPR-Cas9複合体の配列認識及び特異性を促進する。crRNA中の5'20ntの配列の変化は、特定の座位へのCRI

10

20

30

40

50

S P R - C a s 9 複合体の標的化を可能にする。C R I S P R - C a s 9 複合体は、標的配列がプロトSpacer隣接モチーフ (P A M) と呼ばれる特定の短い D N A モチーフ (配列 N G G を有する) の後にある場合、c r R N A の最初の 2 0 n t と一致する配列を含む D N A 配列のみに結合する。

【 0 0 4 3 】

T r a c r R N A は、c r R N A の 3 ' 末端とハイブリダイズして R N A 二重鎖構造を形成し、この R N A 二重鎖構造に C a s 9 エンドヌクレアーゼが結合して、触媒活性のある C R I S P R - C a s 9 複合体が形成され、次いでこの C R I S P R - C a s 9 複合体によって標的 D N A を切断することができる。

【 0 0 4 4 】

C R I S P R - C a s 9 複合体が標的部位で D N A に結合すると、C a s 9 酵素内の 2 つの独立したヌクレアーゼドメインがそれぞれ P A M 部位の上流で D N A 鎖の一方を切断し、D N A の両鎖が塩基対で終端する (平滑末端) 二本鎖切断 (D S B) を残す。

【 0 0 4 5 】

C R I S P R - C a s 9 複合体が特定の標的部位で D N A に結合し、部位特異的な D S B が形成された後、以下の重要な工程は、D S B の修復である。細胞は、D S B を修復するために、2 つの主要な D N A 修復経路、非相同末端連結 (N H E J) 及び相同組換え修復 (H D R) を使用する。

【 0 0 4 6 】

N H E J は、非分裂細胞を含む大部分の細胞型において高度に活性であるように見える堅固な修復機構である。N H E J は、誤りがちであり、多くの場合、D S B の部位において 1 ~ 数百のヌクレオチド間で除去又は付加をもたらす可能性があるが、そのような改変は、典型的には < 2 0 n t である。得られた挿入及び欠失 (インデル) は、遺伝子のコード領域又は非コード領域を破壊する可能性がある。代わりに、H D R は、内因的又は外因的に提供される長い一続きの相同性ドナー D N A を使用して、高い忠実度で D S B を修復する。H D R は、分裂細胞においてのみ活性であり、大部分の細胞型において相対的に低い頻度で生じる。本開示の多くの実施形態では、修復オペラントとして N H E J を利用する。

【 0 0 4 7 】

(i) C a s 9

いくつかの実施形態では、C a s 9 (C R I S P R 関連タンパク質 9) エンドヌクレアーゼは、本明細書で開示されるような遺伝子操作された T 細胞を作製するための C R I S P R 法において使用される。C a s 9 酵素は、ストレプトコッカス・ピオゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) に由来するものであり得るが、他の C a s 9 相同体も使用することができる。本明細書に記載されているように、野生型 C a s 9 が使用され得るか、又は C a s 9 の修飾されたバージョンが使用され得る (例えば、C a s 9 の発展させたバージョン又は C a s 9 オルソログ若しくはバリエーション) ことを理解すべきである。いくつかの実施形態では、C a s 9 は、C 末端及び N 末端に S V 4 0 l a r g e T 抗原の核局在配列 (N L S) を含むように改変されているストレプトコッカス・ピオゲネス (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) 由来の C a s 9 ヌクレアーゼタンパク質を含む。得られた C a s 9 ヌクレアーゼ (s N L S - s p C a s 9 - s N L S) は、組み換え大腸菌 (E . c o l i) 発酵によって生成され、クロマトグラフィーによって精製された 1 6 2 k D a のタンパク質である。s p C a s 9 のアミノ酸配列は、U n i P r o t 受入番号 Q 9 9 Z W 2 として見出すことができ、本明細書では配列番号 1 として示される。

【 0 0 4 8 】

(i i) ガイド R N A (g R N A)

本明細書で記載されるような C R I S P R - C a s 9 媒介遺伝子編集は、ガイド R N A 、すなわち g R N A を使用することを含む。本明細書で使用する場合、「g R N A」とは、特定の標的配列で遺伝子を編集するために、C a s 9 を T R A C 遺伝子又は 2 M 遺伝

10

20

30

40

50

子内の特定の標的配列に誘導することができるゲノム標的化核酸を意味する。ガイドRNAは、編集のための標的遺伝子内の標的核酸配列とCRISPR反復配列とにハイブリダイズする、少なくとも1つのスパーサー配列を含む。

【0049】

TRAC遺伝子を標的化する代表的なgRNAは、配列番号2に示される。国際公開第2019/097305A2号パンフレットとして公開された2018年5月11日に出版された国際出願番号PCT/IB2018/001619号も参照され、その関連する開示は、本明細書で参照される主題及び目的のために参照により本明細書に組み込まれる。他のgRNA配列は、14番染色体上に位置するTRAC遺伝子配列を使用して設計され得る(GRCh38:14番染色体:22,547,506-22,552,154; Ensembl; ENSG00000277734)。いくつかの実施形態では、TRACゲノム領域を標的化するgRNA及びCas9は、TRACゲノム領域に切断を生じさせてTRAC遺伝子にインデルをもたらし、mRNA又はタンパク質の発現を阻害する。

10

【0050】

いくつかの実施形態では、TRACゲノム領域を標的とするgRNAにより、表9の配列から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む、TRAC遺伝子におけるインデルが生じる。いくつかの実施形態では、TRACゲノム領域を標的化するgRNA(配列番号2)により、表9の配列から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む、TRAC遺伝子におけるインデルが生じる。

20

【0051】

2M遺伝子を標的化する例示的なgRNAは、配列番号6に示される。国際公開第2019/097305A2号パンフレットとして公開された2018年5月11日に出版された国際出願番号PCT/IB2018/001619号も参照され、その関連する開示は、本明細書で参照される主題及び目的のために参照により本明細書に組み込まれる。他のgRNA配列は、15番染色体上に位置する2M遺伝子配列を使用して設計することができる(GRCh38の座標:15番染色体:44,711,477-44,718,877; Ensembl; ENSG00000166710)。いくつかの実施形態では、2Mゲノム領域を標的化するgRNA及びRNA誘導型ヌクレアーゼは、2Mゲノム領域に切断を生じさせて2M遺伝子にインデルをもたらし、mRNA又はタンパク質の発現を阻害する。

30

【0052】

いくつかの実施形態では、2Mゲノム領域を標的化するgRNAにより、表10の配列から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む、2M遺伝子におけるインデルが生じる。いくつかの実施形態では、2Mゲノム領域を標的化するgRNA(配列番号6)により、表10の配列から選択される少なくとも1つのヌクレオチド配列を含む、2M遺伝子におけるインデルが生じる。

【0053】

II型システムでは、gRNAは、tracrRNA配列と呼ばれる第2のRNAも含む。II型のgRNAでは、CRISPR反復配列及びtracrRNA配列が、互いにハイブリダイズして二重鎖を形成する。V型のgRNAでは、crRNAが二重鎖を形成する。両方のシステムにおいて、二重鎖は部位特異的ポリペプチドに結合し、その結果、ガイドRNAと部位特異的ポリペプチドとで複合体を形成する。いくつかの実施形態では、ゲノム標的化核酸は、この部位特異的ポリペプチドとの会合による複合体に標的的特異性をもたらす。そのため、ゲノム標的化核酸は、部位特異的ポリペプチドの活性を誘導する。

40

【0054】

当業者に理解されているように、各ガイドRNAは、そのゲノム標的配列に相補的なスパーサー配列を含むように設計されている。Jinek et al., Science, 337, 816-821(2012)及びDeltcheva et al., Nat

50

ure, 471, 602 - 607 (2011) を参照されたい。

【0055】

いくつかの実施形態では、ゲノム標的化核酸（例えば、gRNA）は、二重分子ガイドRNAである。いくつかの実施形態では、ゲノム標的化核酸（例えば、gRNA）は、単一分子ガイドRNAである。

【0056】

二重分子ガイドRNAは、2つの鎖のRNA分子を含む。第1の鎖は、5'から3'の方向に、任意選択的なスペーサー延長配列、スペーサー配列及び最小CRISPR反復配列を含む。第2の鎖は、最小tracrRNA配列（最小CRISPR反復配列に相補的）、3'tracrRNA配列及び任意選択的なtracrRNA延長配列を含む。

10

【0057】

II型システムにおける単一分子ガイドRNA（「sgRNA」と呼ばれる）は、5'から3'方向において、任意選択的なスペーサー延長配列、スペーサー配列、最小CRISPR反復配列、単一分子ガイドリンカー、最小tracrRNA配列、3'tracrRNA配列及び任意選択的なtracrRNA延長配列を含む。任意選択的なtracrRNA延長は、ガイドRNAに追加の機能性（例えば、安定性）を付与する要素を含み得る。単一分子ガイドリンカーは、最小CRISPR反復と最小tracrRNA配列とを連結して、ヘアピン構造を形成する。任意選択的なtracrRNA延長は、1つ以上のヘアピンを含む。V型システムにおける単一分子ガイドRNAは、5'から3'方向において、最小CRISPR反復配列及びスペーサー配列を含む。

20

【0058】

「標的配列」とは、PAM配列に隣接している標的遺伝子のことであり、Cas9によって改変される配列のことである。「標的配列」は、「標的核酸」内のいわゆるPAM鎖上にあり、PAM鎖及び相補的な非PAM鎖を含む二本鎖分子である。当業者は、gRNAスペーサー配列が、目的の標的核酸の非PAM鎖に位置する相補的配列にハイブリダイズすることを認識している。そのため、gRNAスペーサー配列は、標的配列のRNA均等物である。

【0059】

例えば、TRAC標的配列が5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3'（配列番号11）である場合、gRNAスペーサー配列は、5'-AGAGCAACAGUGCGUGUGGCC-3'（配列番号5）である。別の例では、2M標的配列が5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC-3'（配列番号：13）である場合、gRNAスペーサー配列は、5'-GCUACUCUCUCUUUCUGGCC-3'である（配列番号：9）。gRNAのスペーサーは、ハイブリダイゼーション（すなわち塩基対形成）を介して配列特異的な様式で目的の標的核酸と相互作用する。そのため、スペーサーのヌクレオチド配列は、目的の標的核酸の標的配列に依存して変化する。

30

【0060】

本明細書のCRISPR/Casシステムでは、スペーサー配列は、このシステムで使用されるCas9酵素によって認識可能なPAMの5'に位置する標的核酸の領域にハイブリダイズするように設計されている。スペーサーは、標的配列と完全に一致し得るか、又はミスマッチを有し得る。各Cas9酵素は、標的DNAにおいて認識する特定のPAM配列を有する。例えば、S.ピオゲネス（S.pyogenes）は、標的核酸において、配列5'-NRG-3'（ここで、Rは、A又はGのいずれかを含み、Nは、任意のヌクレオチドであり、Nは、スペーサー配列により標的化される標的核酸配列の3'の直近にある）を含むPAMを認識する。

40

【0061】

いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、20個の長さのヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、標的核酸は、20個未満の長さのヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、標的核酸は、20個超の長さのヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、標的核酸は、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、2

50

1、22、23、24、25、30個又はそれを超える長さのヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、標的核酸は、最大で5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30個又はそれを超える長さのヌクレオチドを有する。いくつかの実施形態では、標的核酸配列は、PAMの最初のヌクレオチドの5'の直近に20個の塩基を有する。例えば、5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3'を含む配列では、標的核酸は、N(ここで、Nは、任意のヌクレオチドであり得、下線が引かれたNRG配列は、S.ピオゲネス(S. pyogenes)のPAMである)に対応する配列であり得る。

【0062】

gRNAのスペーサー配列は、目的の標的遺伝子の標的配列(例えば、ゲノム標的配列などのDNA標的配列)を定義する配列(例えば、20個のヌクレオチド配列)である。TRAC遺伝子を標的化するgRNAの例示的なスペーサー配列は、配列番号4に示される。2M遺伝子を標的化するgRNAの例示的なスペーサー配列は、配列番号8に示される。

【0063】

本明細書で開示されるガイドRNAは、crRNA内のスペーサー配列によって目的の任意の配列を標的化することができる。いくつかの実施形態では、ガイドRNAのスペーサー配列と標的遺伝子内の標的配列との間の相補性の程度は、約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%又は100%であり得る。いくつかの実施形態では、ガイドRNAのスペーサー配列及び標的配列内の標的配列は、100%相補的である。他の実施形態では、ガイドRNAのスペーサー配列と標的配列内の標的配列は、最大で10個のミスマッチ、例えば最大で9個、最大で8個、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個、最大で3個、最大で2個又は最大で1個のミスマッチを含有し得る。

【0064】

本明細書で提供される使用し得るgRNAの非限定的な例は、国際公開第2019/097305A2号パンフレットとして公開される、2018年5月11日に出願の国際出願番号PCT/IB2018/001619号及び国際公開第2019/215500号パンフレットとして公開される、2019年5月10日に出願の国際出願番号PCT/IB2019/000500号に提供されており、先の出願の各々の関連する開示は、本明細書で参照される目的及び主題のために参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で提供されるgRNA配列のいずれかに関して、改変を明確に示していないものは、未改変の配列と、任意の好適な改変を有する配列との両方を包含することを意味する。

【0065】

本明細書で開示されるgRNAのいずれかにおけるスペーサー配列の長さは、CRISPR/Cas9システム及び更に本明細書で開示される標的遺伝子のいずれかを編集するために使用される構成要素に依存し得る。例えば、異なる細菌種に由来する異なるCas9タンパク質は、様々な最適なスペーサー配列長を有する。従って、スペーサー配列は、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、35、40、45、50又は50個超の長さのヌクレオチドを有し得る。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、18~24個の長さのヌクレオチドを有し得る。いくつかの実施形態では、標的化配列は、19~21個の長さのヌクレオチドを有し得る。いくつかの実施形態では、スペーサー配列は、20個の長さのヌクレオチドを含み得る。

【0066】

いくつかの実施形態では、gRNAは、sgRNAであり得、sgRNA配列の5'末端に20個のヌクレオチドのスペーサー配列を含み得る。いくつかの実施形態では、sgRNAは、sgRNA配列の5'末端に20個未満のヌクレオチドのスペーサー配列を含み得る。いくつかの実施形態では、sgRNAは、sgRNA配列の5'末端に20超のヌクレオチドのスペーサー配列を含み得る。いくつかの実施形態では、sgRNAは、s

10

20

30

40

50

gRNA配列の5'末端に17~30個のヌクレオチドを有する可変長のスペーサー配列を含む。例を実施例7の表8に示す。

【0067】

いくつかの実施形態では、sgRNAは、sgRNA配列の3'末端にウラシルを含まない。他の実施形態では、sgRNAは、sgRNA配列の3'末端に1つ以上のウラシルを含み得る。例えば、sgRNAは、sgRNA配列の3'末端に1~8個のウラシル残基、例えば、sgRNA配列の3'末端に1、2、3、4、5、6、7又は8個のウラシル残基を含むことができる。

【0068】

sgRNAのいずれかを含む、本明細書で開示されるgRNAのいずれも未改変であり得る。代わりに、1つ以上の修飾ヌクレオチド及び/又は修飾主鎖を含み得る。例えば、sgRNAなどの改変gRNAは、5'末端、3'末端のいずれか又は両方に位置し得る1つ以上の2'-O-メチルホスホロチオエートヌクレオチドを含むことができる。

【0069】

特定の実施形態では、2つ以上のガイドRNAをCRISPR/Casヌクレアーゼシステムと共に使用することができる。各ガイドRNAは、CRISPR/Casシステムが2つ以上の標的核酸を切断するように、異なる標的化配列を含有し得る。いくつかの実施形態では、1つ以上のガイドRNAは、Cas9RNP複合体内の活性又は安定性などの同じ又は異なる特性を有し得る。2つ以上のガイドRNAが使用される場合、各ガイドRNAは、同じ又は異なるベクター上にコードされ得る。2つ以上のガイドRNAの発現を駆動するために使用されるプロモーターは、同じであるか又は異なる。

【0070】

2つ以上の好適なCas9及び2つ以上の好適なgRNAを本明細書に記載される方法、例えば当技術分野において公知の又は本明細書で開示される方法に使用することができることが理解されるであろう。いくつかの実施形態では、方法は、当技術分野において公知のCas9酵素及び/又はgRNAを含む。例は、例えば、国際公開第2019/097305A2号パンフレットとして公開された、2018年5月11日出願の国際出願番号PCT/IB2018/001619号及び国際公開第2019/215500号パンフレットとして公開された、2019年5月10日出願の国際出願番号PCT/IB2019/000500号に見出すことができ、各先行出願の関連する開示は、本明細書で言及される目的及び主題に対して本明細書に参照として組み込まれる。

【0071】

TRAC及びB2M遺伝子のCRISPR-Cas9媒介遺伝子編集

いくつかの実施形態では、本明細書で開示される活性化T細胞は、本明細書に開示される条件下において、CRISPR-Cas9媒介性遺伝子編集を介してTRAC遺伝子と2M遺伝子の両方の遺伝子編集を受け得、これにより、従来の条件によって提供されるものと比較してより高く、より一貫した遺伝子編集効率をもたらされる。更に、本明細書で開示される遺伝子編集プロセスから得られるTRAC-/2M-T細胞は、CARコンストラクトをコードするウイルスベクターがTRAC-/2M-T細胞に送達されると、キメラ抗原受容体(CAR)の高い発現レベルを示した。

【0072】

Cas9酵素並びにTRAC遺伝子及び2M遺伝子を標的化するgRNAは、1つ以上のリボ核タンパク質(RNP)複合体を形成することができ、これは、本明細書に開示されるように、活性化T細胞に送達され得る。RNPは、少なくともそれらが、核酸が豊富な細胞環境中での乱雑な相互作用のリスクを最小化し、且つRNAを分解から保護するため、遺伝子編集に有用である。RNPを形成する方法は、当技術分野において知られている。

【0073】

CRISPR-Cas9媒介遺伝子編集プロセスには、2つのリボ核タンパク質複合体が関与する場合がある。第1のRNP複合体は、第1のCas9酵素及びTRAC遺伝子

10

20

30

40

50

を標的化するガイドRNA (gRNA) を含む。第2のRNP複合体は、第2のCas9酵素及び2M遺伝子を標的化するgRNAを含む。いくつかの例では、2つのRNP複合体は、異なるCas9酵素を含む。他の例では、2つのRNP複合体は、同じCas9酵素を含む。具体例では、配列番号1のCas9酵素は、第1及び第2のRNPの両方で使用可能である。

【0074】

いくつかの実施形態では、2つのRNP複合体は、同じ量のCas9酵素を含有し得る。例えば、RNP複合体のいずれも、約0.1~0.3mg/mL (例えば、約0.1~0.2mg/mL) のCas9酵素 (例えば、配列番号1のCas9酵素) を含み得る。いくつかの例では、RNP複合体の各々は、約0.15mg/mLのCas9酵素 (これは、配列番号1のCas9酵素であり得る) を含み得る。 10

【0075】

他の実施形態では、2つのRNP複合体は、異なる量のCas9酵素を含有し得る。いくつかの例では、TRAC遺伝子を標的化するRNP複合体は、2M遺伝子を標的化するRNP複合体と比較してより多量のCas9酵素を含み得る。代わりに、2M遺伝子を標的化するRNP複合体は、TRAC遺伝子を標的化するRNP複合体と比較してより多量のCas9酵素を含み得る。

【0076】

2つのRNP複合体は、同じ量のgRNA (一方はTRACを標的化し、他方は2Mを標的化する) を含み得る。代わりに、2つのRNP複合体は、異なる量のgRNAを含み得る。例えば、TRAC遺伝子を標的化するgRNAの量は、約0.035mg/mL~約0.8mg/mL、例えば、約50µg/mL~約80µg/mLの範囲であり得る。具体例では、TRAC遺伝子を標的化するgRNAの量は、約0.08mg/mLである。代わりに又は加えて、2M遺伝子を標的化するgRNAの量は、約0.075mg/mL~約0.3mg/mL、例えば、約0.1mg/mL~約0.3mg/mLの範囲であり得る。具体例では、2M遺伝子を標的化するgRNAの量は、約0.2mg/mLである。 20

【0077】

具体例では、TRAC遺伝子を標的化するRNP複合体は、約0.15mg/mLのCas9 (例えば、配列番号1のCas9) 及び約0.08mg/mLのTRAC遺伝子を標的化するgRNA (例えば、TA-1のgRNA) を含み得る。代わりに又は加えて、2M遺伝子を標的化するRNP複合体は、約0.15mg/mLのCas9 (例えば、配列番号1のCas9) 及び約0.2mg/mLの2M遺伝子を標的化するgRNA (例えば、B2M-1のgRNA) を含み得る。 30

【0078】

いくつかの実施形態では、2つのRNPは、エレクトロポレーションを介して連続的に、すなわち2つのエレクトロポレーションイベントを介して、活性化T細胞に導入され得る。代わりに、2つのRNPは、同時に、すなわち1つのエレクトロポレーションイベントを介して活性化T細胞に導入され得る。この場合、エレクトロポレーションイベント前に2つのRNPを組み合わせて混合物を形成し得る。 40

【0079】

本明細書に開示されるRNPのいずれかは、RNPを好適な量の活性化T細胞と混合することによって活性化T細胞に導入することができ、こうして形成された混合物は、RNPの細胞への送達を可能にする好適な条件下でエレクトロポレーションに供される。場合により、活性化T細胞の好適な量は、約 100×10^6 細胞/mL~約 300×10^6 細胞/mLの範囲であり得る。例えば、エレクトロポレーション工程用のT細胞の好適な量は、約 200×10^6 細胞/mL~約 300×10^6 細胞/mLの範囲であり得る。いくつかの例では、活性化T細胞の濃度は、約 100×10^6 細胞/mLであり得る。いくつかの実施形態では、活性化T細胞の濃度は、約 200×10^6 細胞/mLであり得る。いくつかの実施形態では、活性化T細胞の濃度は、約 300×10^6 細胞/mLであり得る。 50

。

【0080】

いくつかの実施形態では、活性化T細胞の好適な量は、約 1×10^8 ~ 約 1×10^{10} 細胞、例えば、約 5×10^8 ~ 約 8×10^9 細胞、約 1×10^9 ~ 約 5×10^9 細胞又は約 1×10^9 ~ 約 3×10^9 細胞の範囲であり得る。

【0081】

エレクトロポレーションにおいて使用するためのT細胞は、使用するエレクトロポレーション機器によっては、複数のセルカセットに入れ得る。好適なエレクトロポレーション機器は、当業者に公知であり、静的及び流動エレクトロポレーターを挙げることができ、Lonza Nucleofector、Maxcyte GT及びMaxCyte GTxが含まれる。場合により、複数のセルカセットを、エレクトロポレーションプロセスで使用し得る。更なる詳細は、以下の実施例10で提供される。

10

【0082】

具体例では、合計で約 0.3 mg/mL のCas9酵素（例えば、配列番号1のCas9酵素）、約 0.08 mg/mL のTA-1のgRNA及び約 0.2 mg/mL B2M-1のgRNAを含む上記で開示される2つのRNPは、約 100×10^6 細胞/mL ~ 約 300×10^6 細胞/mL（例えば、約 300×10^6 細胞/mL）の量の活性化T細胞と混合し得る。次に、混合物をエレクトロポレーションに供して、RNPをT細胞に送達する。

【0083】

エレクトロポレーション後、細胞は、回復に好適な期間、新鮮な培地又はエレクトロポレーションバッファーで培養され得る。遺伝子編集効率は、日常的な慣行に従って実施し得る。このように生成される遺伝子編集されたT細胞は、CAR発現のために構成された核酸の送達のためにウイルスベクター形質導入を受け得る。

20

【0084】

(iv) T細胞の形質導入

ノックアウトされたTRAC及び2M遺伝子を有する遺伝子編集されたT細胞は、CARを発現するT細胞の集団を生成するためにキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターなどのウイルスベクターによる形質導入を受け得る。

30

【0085】

キメラ抗原受容体(CAR)

キメラ抗原受容体(CAR)とは、望ましくない細胞、例えば癌細胞などの疾患細胞で発現した抗原を認識して結合するように改変されている人工の免疫細胞受容体を指す。CARポリペプチドを発現するT細胞は、CAR T細胞と呼ばれる。CARは、MHCに制限されない様式において、選択された標的に対するT細胞の特異性及び反応性を再誘導する能力を有する。MHCに制限されない抗原認識は、抗原プロセッシングに非依存的な抗原を認識する能力をCAR-T細胞に与え、それにより腫瘍エスケープの主要な機構をバイパスする。更に、CARは、T細胞に発現する場合、有利には、内在性のT細胞受容体(TCR)のアルファ鎖及びベータ鎖と二量体化しない。

40

【0086】

様々な世代のCARが存在し、その各々は、異なる構成要素を含む。第一世代のCARは、ヒンジ及び膜貫通ドメインを介して抗体に由来するscFvをT細胞受容体のCD3ゼータ(又は ζ)細胞内シグナル伝達ドメインに連結する。第二世代のCARは、共刺激シグナルを供給するための追加の共刺激ドメイン、例えばCD28、4-1BB(41BB)又はICOSを組み込んでいる。第三世代のCARは、TCRのCD3鎖と融合した2つの共刺激ドメイン(例えば、CD27、CD28、4-1BB、ICOS又はOX40の組み合わせ)を含む。Maude et al., Blood, 2015; 125(26): 4017-4023; Kakarla and Gottschalk, Cancer J. 2014; 20(2): 151-155)。様々な世代のCARコンス

50

トラクトは、いずれも本開示の範囲内である。

【0087】

一般に、CARは、標的抗原（例えば、抗体の単鎖可変断片（scFv）又は別の抗体断片）を認識する細胞外ドメインを含む融合ポリペプチドであり、細胞内ドメインは、T細胞受容体（TCR）複合体（例えば、CD3）のシグナル伝達ドメインを含み、そのほとんどの場合に共刺激ドメインである。（Enblad et al., Human Gene Therapy, 2015; 26(8): 498-505）。CARコンストラクトは、細胞外ドメインと細胞内ドメインとの間にヒンジ及び膜貫通ドメインを更に含み得、且つ表面に発現するためにN末端にシグナルペプチドを含み得る。シグナルペプチドの例としては、MLLLVTSLLCELPHPAFLLIIP（配列番号44）及びMALPVTALLPLALLLHAARP（配列番号75）が挙げられる。他のシグナルペプチドを使用し得る。

10

【0088】

(a) 抗原結合細胞外ドメイン

抗原結合細胞外ドメインとは、CARが細胞表面に発現すると、細胞外液にさらされるCARポリペプチドの領域のことである。場合により、細胞表面発現を促進するために、シグナルペプチドがN末端に位置し得る。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、単鎖可変断片（scFv）であり、抗体重鎖可変領域（V_H）と抗体軽鎖可変領域（V_L）とを（いずれかの方向に）含み得る）であり得る。場合により、V_H断片及びV_L断片は、ペプチドリンカーを介して連結され得る。リンカーは、いくつかの実施形態では、可動性のために一続きのグリシン及びセリン並びに可溶性を付与するために一続きのグルタミン酸塩及びリシンを含んだ親水性残基を含む。scFv断片は、親抗体の抗原結合特異性を保持しており、そこからscFv断片が誘導される。いくつかの実施形態では、scFvは、ヒト化V_Hドメイン及び/又はV_Lドメインを含み得る。他の実施形態では、scFvのV_Hドメイン及び/又はV_Lドメインは、完全ヒト型である。

20

【0089】

抗原結合細胞外ドメインは、目的の標的抗原、例えば、腫瘍抗原などの病態抗原に特異的であり得る。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、通常、全く発現されない場合があるか、又は低レベルでのみ発現される場合がある非腫瘍細胞より腫瘍細胞においてより高レベルで発現されるタンパク質などの免疫原性分子を参照する「腫瘍関連抗原」である。いくつかの実施形態では、腫瘍を内部に持つ宿主の免疫系によって認識される腫瘍関連構造は、腫瘍関連抗原と呼ばれる。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原は、大部分のタイプの腫瘍によって広範に発現される場合、普遍的な腫瘍抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原は、分化抗原、変異性抗原、過剰発現された細胞抗原又はウイルス抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、腫瘍細胞に固有のタンパク質などの免疫原性分子を指す「腫瘍特異抗原」又は「TSA」である。腫瘍特異抗原は、腫瘍細胞、例えば、特定のタイプの腫瘍細胞でのみ発現する。

30

【0090】

いくつかの例では、本明細書で開示されるCARコンストラクトは、CD19に結合可能なscFv細胞外ドメインを含む。いくつかの例では、本明細書で開示されるCARコンストラクトは、BCMAに結合可能なscFv細胞外ドメインを含む。抗CD19 CAR及び抗BCMA CARの例は、以下の実施例で提供される。

40

【0091】

(b) 膜貫通ドメイン

本明細書で開示されるCARポリペプチドは、膜をまたがる疎水性のヘリックスであり得る膜貫通ドメインを含み得る。本明細書で使用する場合、「膜貫通ドメイン」とは、好ましくは、真核細胞の細胞膜である細胞膜内で熱力学的に安定な任意のタンパク質構造体を意味する。膜貫通ドメインは、それ自体を含有するCARの安定性をもたらす。

【0092】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるように、CARの膜貫通ドメインは、

50

CD8膜貫通ドメインであり得る。他の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインであり得る。更に他の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメイン及びCD28膜貫通ドメインのキメラである。本明細書に記載されているような他の膜貫通ドメインを使用し得る。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、
 F V P V F L P A K P T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A
 A G G A V H T R G L D F A C D I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y C N
 H R N R (配列番号49);又は
 I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y (配列番号31)
 の配列を含むCD8a膜貫通ドメインである。

【0093】

他の膜貫通ドメインを使用し得る。

【0094】

(c) ヒンジドメイン

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CARの細胞外ドメイン(抗原結合ドメインを含む)と膜貫通ドメインとの間に位置し得るか、又はCARの細胞質ドメインと膜貫通ドメインとの間に位置し得る。ヒンジドメインは、ポリペプチド鎖において膜貫通ドメインを細胞外ドメイン及び/又は細胞質ドメインに連結するように機能する任意のオリゴペプチド又はポリペプチドであり得る。ヒンジドメインは、CAR若しくはそのドメインに可動性をもたらすか、又はCAR若しくはそのドメインの立体障害を防ぐように機能し得る。

【0095】

いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、最大で300個のアミノ酸(例えば、10~100個のアミノ酸又は5~20個のアミノ酸)を含み得る。いくつかの実施形態では、CARの他の領域に1つ以上のヒンジドメインが含まれ得る。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、CD8ヒンジドメインであり得る。他のヒンジドメインを使用し得る。

【0096】

(d) 細胞内シグナル伝達ドメイン

CARコンストラクトのいずれかは、受容体の機能的末端である1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン(例えばCD3及び任意選択的に1つ以上の共刺激ドメイン)を含む。抗原認識後、受容体クラスター及びシグナルは、細胞に伝達される。

【0097】

CD3は、T細胞受容体複合体の細胞質シグナル伝達ドメインである。CD3は、T細胞が同種抗原と会合した後にT細胞に活性化シグナルを伝達する3つの免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)を含む。多くの場合、CD3は、一次T細胞の活性化シグナルを提供するが、十分に適格な活性化シグナルではなく、共刺激シグナル伝達を必要とする。

【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるCARポリペプチドは、1つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを更に含み得る。例えば、CD3によって媒介される一次シグナル伝達と共に、CD28及び/又は4-1BBの共刺激ドメインを使用して、十分な増殖シグナル/生存シグナルを伝達し得る。いくつかの例では、本明細書で開示されるCARは、CD28共刺激分子を含む。他の例では、本明細書で開示されるCARは、4-1BB共刺激分子を含む。いくつかの実施形態では、CARは、CD3シグナル伝達ドメイン及びCD28共刺激ドメインを含む。他の実施形態では、CARは、CD3シグナル伝達ドメイン及び4-1BB共刺激ドメインを含む。更に他の実施形態では、CARは、CD3シグナル伝達ドメイン、CD28共刺激ドメイン及び4-1BB共刺激ドメインを含む。

【0099】

本明細書に記載される方法は、CARを発現する遺伝子操作されたT細胞、例えば当技

10

20

30

40

50

術分野において公知の又は本明細書で開示される遺伝子操作されたT細胞を生成するために使用することができる2つ以上の好適なCARを包含することが理解されるであろう。例は、例えば、国際公開第2019/097305A2号パンフレットとして公開された2018年5月11日に出願されたPCT/IB2018/001619号に見出すことができ、その関連する開示は、本明細書で参照される目的及び主題のために参照により本明細書に組み込まれる。別の例では、CARはCD19に結合する(「CD19 CAR」又は「抗CD19 CAR」とも呼ばれる)。CD19に結合する例示的なCARのアミノ酸配列は、配列番号37に提供されている(以下の実施例7、表11を参照されたい)。更に別の例では、CARはBCMAに結合する(「BCMA CAR」又は「抗BCMA CAR」とも呼ばれる)。BCMAに結合する例示的なCARのアミノ酸配列は、配列番号61に提供されている(以下の実施例8、表16及び17を参照されたい)。

10

【0100】

CARコンストラクトをT細胞に送達するためのAAVベクター

CARコンストラクトをコードする核酸は、アデノ随伴ウイルス(AAV)を使用して細胞に送達され得る。AAVは、宿主ゲノムに部位特異的に組み込み、従ってCARなどの導入遺伝子を送達し得る小型のウイルスである。逆位末端配列(ITR)は、AAVゲノム及び/又は目的の導入遺伝子に隣接して存在し、複製開始点として機能する。また、AAVゲノムには、転写された場合にAAVゲノムをカプセル化して標的細胞に送達するためのカプシドを形成するrepタンパク質及びcapタンパク質も存在する。これらのカプシド上の表面受容体によってAAVの血清型が付与され、カプシドがどの標的臓器に最初に結合するのか、従っていずれの細胞にAAVが最も効率的に感染するのかが決定される。現在知られているヒトAAVの血清型は、12種類である。いくつかの実施形態では、CARをコードする核酸を送達するのに使用されるAAVは、AAV血清型6(AAV6)である。

20

【0101】

アデノ随伴ウイルスは、いくつかの理由のために遺伝子療法に最も頻繁に使用されるウイルスの1つである。第一に、AAVは、ヒトを含む哺乳動物への投与時に免疫応答を誘発しない。第二に、AAVは、特に適切なAAV血清型の選択を考慮に入れる場合、標的細胞に効率的に送達される。最後に、AAVは、ゲノムが組み込みを伴わずに宿主細胞において存続し得ることから、分裂細胞及び非分裂細胞の両方に感染する能力を有する。この特質により、AAVは、遺伝子療法の理想的な候補となる。

30

【0102】

CARをコードする核酸は、宿主T細胞内の目的のゲノム部位に挿入するように設計することができる。いくつかの実施形態では、標的ゲノム部位は、セーフハーバー座位内に存在し得る。

【0103】

いくつかの実施形態では、CARをコードする核酸は、(例えば、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターなどのウイルスベクターによって運ぶことが可能なドナー鑄型を介して)遺伝子操作されたT細胞内のTRAC遺伝子を破壊してCARポリペプチドを発現させるために、TRAC遺伝子内の位置に挿入することができるように設計することができる。TRACの破壊は、内因性TCRの機能喪失をもたらす。例えば、本明細書に記載されるようなエンドヌクレアーゼ及び1つ以上のTRACゲノム領域を標的化する1つ以上のgRNAにより、TRAC遺伝子の破壊を生じさせることができる。この目的のために、TRAC遺伝子及び標的部位に特異的なgRNAのいずれか、例えば本明細書で開示されるものを使用することができる。

40

【0104】

いくつかの実施例では、相同組換え修復、すなわちHDR(例えば、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターなどのウイルスベクターの一部であり得るドナー鑄型を使用した)により、TRAC遺伝子内のゲノム欠失と、CARをコードするセグメントによる置換とを生じさせることができる。いくつかの例では、gRNA標的配列又はその一部が削除さ

50

れる（例えば、配列番号17）。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるようなエンドヌクレアーゼ及び1つ以上のTRACゲノム領域を標的化する1つ以上のgRNAにより、且つCARをコードするセグメントをTRAC遺伝子に挿入することにより、TRAC遺伝子の破壊を生じさせることができる。

【0105】

本明細書で開示されるようなドナー鑄型は、CARのコード配列を含有し得る。いくつかの実施例では、CARをコードする配列は、CRISPR-Cas9遺伝子編集技術を使用して、目的の遺伝子位置、例えばTRAC遺伝子で効率的なHDRを行うことができるように、2つの相同性領域に隣接し得る。この場合、標的座位に特異的なgRNAによって誘導されたCRISPR-Cas9酵素により、DNAの両方の鎖を標的座位で切断することができる。次いで、HDRが発生して二重鎖切断(DSB)を修復し、CARをコードするドナーDNAを挿入する。これを正しく発生させるために、ドナー配列は、TRAC遺伝子などの標的遺伝子のDSB部位を取り囲む配列に相補的な隣接残基（以下では「相同性アーム」）を有するように設計されている。これらの相同性アームは、DSB修復のための鑄型として機能し、HDRを本質的に誤りのない機構とすることを可能にする。相同組換え修復(HDR)の割合は、変異部位と切断部位との間の距離の関数であり、そのため、重複しているか又は近傍の標的部位を選択することが重要である。鑄型は、相同領域に隣接した余分な配列を含むことができるか、又はゲノム配列と異なる配列を含むことができ、これによって配列編集が可能になる。

10

【0106】

代わりに、ドナー鑄型は、DNAの標的化された位置と相同性のある領域がなくともよく、標的部位で切断された後にNHEJ依存的末端連結により組み込まれ得る。

20

【0107】

ドナー鑄型は、一本鎖及び/又は二重鎖のDNA又はRNAであり得、直鎖状又は環状の形態で細胞に導入することができる。直鎖状形態で導入される場合、ドナー配列の末端は、当業者に既知の方法により（例えば、エキソヌクレアーゼによる分解から）保護することができる。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基を直鎖状分子の3'末端に付加し、且つ/又は自己相補的オリゴヌクレオチドを一方又は両方の末端に連結する。例えば、Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272: 886-889を参照されたい。外来性のポリヌクレオチドを分解から保護するための更なる方法として、末端アミノ基の付加並びに例えばホスホロチオエート、ホスホロアミデート及びO-メチルリボース又はデオキシリボース残基などの修飾ヌクレオチド間結合の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0108】

ドナー鑄型は、例えば、複製開始点、プロモーター及び抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞に導入され得る。更に、ドナー鑄型は、裸の核酸として、リポソーム若しくはポロキサマーなどの薬剤と複合体を形成した核酸として細胞に導入することができるか、又はウイルス（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス及びインテグラーゼ欠損レンチウイルス(IDLV)）により送達することができる。

40

【0109】

いくつかの実施形態では、ドナー鑄型は、その発現が内在性プロモーターによって駆動することができるように、内在性プロモーターの近傍の部位（例えば、下流又は上流）に挿入することができる。他の実施形態では、ドナー鑄型は、CAR遺伝子の発現を制御するために、外来性プロモーター及び/又はエンハンサー、例えば、構成的プロモーター、誘導性プロモーター又は組織特異的プロモーターを含み得る。いくつかの実施形態では、外来性プロモーターは、EF1プロモーターである。他のプロモーターを使用し得る。

【0110】

更に、外来性配列は、転写又は翻訳調節配列、例えばプロモーター、エンハンサー、イ

50

ンスレーター、配列内リボソーム進入部位、2 A ペプチドをコードする配列及び/又はポリアデニル化シグナルも含み得る。

【0111】

T細胞の形質導入

本明細書に開示されるCARコンストラクト(例えば、抗CD19 CAR又は抗BCMA CAR)をコードするAAVベクターなどの任意の好適な量のウイルスベクターは、好適な量のT細胞、例えば、本明細書に開示される遺伝子編集されたT細胞と、ウイルスベクターのT細胞への侵入を可能にするために好適な期間インキュベートし得る。例えば、形質導入プロセスは、CAR⁺T細胞の割合を増加させる一連の最適化された感染多重度(MOI)の使用を伴い得る。場合により、形質導入プロセスにおけるAAVベクターのMOIは、約1,000~約150,000、例えば約10,000~約80,000などの範囲であり得る。いくつかの例では、形質導入プロセスで使用されるAAVベクターのMOIは、約1,000~約150,000、約5,000~約100,000、約10,000~約100,000、約10,000~約90,000、約10,000~約80,000、約10,000~約70,000、約10,000~約60,000、約10,000~約50,000、約10,000~約40,000、約10,000~約30,000、約10,000~約20,000、約20,000~約80,000、約30,000~約80,000、約40,000~約80,000、約50,000~約80,000、約60,000~約80,000又は約70,000~約80,000であり得る。いくつかの例では、形質導入プロセスで使用されるAAVベクターのMOIは、約1,000、約2,500、約5,000、約10,000、約15,000、約20,000、約25,000、約30,000、約31,000、約32,000、約33,000、約34,000、約35,000、約40,000、約50,000、約60,000、約70,000、約80,000、約90,000、約100,000、約110,000、約120,000、約130,000、約140,000又は約150,000であり得る。

【0112】

いくつかの実施形態では、AAVベクターは抗CD19 CARをコードし(例えば、以下の実施例7で開示される)、形質導入プロセスで使用するためのこのようなAAVベクターのMOIは、約20,000である。他の実施形態では、AAVベクターは抗BCMA CARをコードし(例えば、以下の実施例8で開示される)、形質導入プロセスで使用するためのこのようなAAVベクターのMOIは、約20,000である。

【0113】

形質導入後、T細胞は、回復のために好適な期間、好適な細胞培養培地で培養され得る。ロックアウトされたTRAC及び2M遺伝子を有し、CARを発現する遺伝子操作されたT細胞は、以下に開示されるとおり、in vitroで増殖させ得る。

【0114】

(v) T細胞の増殖

本明細書で開示される遺伝子操作されたT細胞は、好適な条件下でin vitroで増殖させて、遺伝子操作されたT細胞の集団を臨床的に適切な規模で生成し得る。この増殖工程で使用される細胞培養条件は、少なくとも部分的に、より短いインキュベーション期間でより高い最終細胞密度を達成し(それにより製造コストを削減し)、細胞治療で使用するためのより強力なT細胞を達成することを意図している。効力は、様々なT細胞機能、例えば、増殖、標的細胞殺傷、サイトカイン産生、活性化、遊走及びそれらの組み合わせによって示され得る。

【0115】

いくつかの実施形態では、T細胞増殖工程は、細胞容器中約150,000細胞/cm²~約600,000細胞/cm²の播種密度で、T細胞集団(例えば、本明細書で開示される遺伝子操作されたT細胞)を、細胞培養容器に播種することによって実施され得る。例えば、T細胞は、細胞容器中約300,000細胞/cm²~約500,000細胞

10

20

30

40

50

／ cm^2 で播種され得る。いくつかの態様では、T細胞増殖は、少なくとも約60,000細胞／ cm^2 、少なくとも約62,500細胞／ cm^2 又は少なくとも約83,000細胞／ cm^2 の播種密度で、T細胞集団を細胞培養容器に播種することによって実施される。いくつかの態様では、T細胞増殖は、少なくとも約150,000細胞／ cm^2 、又は少なくとも約250,000細胞／ cm^2 、又は少なくとも約300,000細胞／ cm^2 、又は少なくとも約400,000細胞／ cm^2 、又は少なくとも約500,000細胞／ cm^2 、又は少なくとも約600,000細胞／ cm^2 の播種密度で、T細胞集団を細胞培養容器に播種することによって実施される。いくつかの態様では、播種密度は、約250,000細胞／ cm^2 である。他の態様では、播種密度は、約500,000細胞／ cm^2 である。他の態様では、播種密度は、約600,000細胞／ cm^2 である。 10

【0116】

いくつかの実施形態では、T細胞増殖工程は、約 2×10^5 細胞／ cm^2 ～約 7×10^5 細胞／ cm^2 の播種密度で、T細胞集団（例えば、本明細書で開示される遺伝子操作されたT細胞）を、細胞培養容器に播種し、約6日～約12日にわたって細胞を培養することによって実施され得る。いくつかの例では、T細胞増殖は、約 2×10^5 細胞／ cm^2 ～約 7×10^5 細胞／ cm^2 、約 2×10^5 細胞／ cm^2 ～約 5×10^5 細胞／ cm^2 、約 2×10^5 細胞／ cm^2 ～約 4×10^5 細胞／ cm^2 、 2×10^5 細胞／ cm^2 ～約 3×10^5 細胞／ cm^2 、 3×10^5 細胞／ cm^2 ～約 5×10^5 細胞／ cm^2 又は 4×10^5 細胞／ cm^2 ～約 5×10^5 細胞／ cm^2 の播種密度で、T細胞集団を細胞培養容器に播種し、約6日～約12日、約6日～約11日、約6日～約10日、約6日～約9日、約6日～約8日、約6日～約7日、約7日～約12日、約7日～約11日、約7日～約10日、約7日～約9日、約7日～約8日、約8日～約12日、約8日～約9日、約9日～約12日、約10日～約12日又は約11日～約12日にわたって細胞を培養することによって実施される。いくつかの実施形態では、T細胞増殖は、約 3×10^5 細胞／ cm^2 ～約 5×10^5 細胞／ cm^2 の播種密度において、細胞培養容器でT細胞集団を播種し、約7日～約9日にわたって細胞を培養することによって実施される。 20

【0117】

いくつかの実施形態では、T細胞増殖工程は、細胞培養物を再プレーティングすること（すなわち細胞培養物を新しい培養容器に分割すること）を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞培養物は、編集後3、4、5、6又は7日目に1：4の比率（1つの容器を4つの新しい容器に分割）で再プレーティングして、更に増殖させることができる。 30

【0118】

T細胞増殖は静置培養容器で行うことができ、これは、培地を交換することなくT細胞を増殖させることができる。例えば、T細胞は、静置培養容器内で、培地を交換せずに、約7日～約12日又は約7日～約9日にわたって増殖させることができる。

【0119】

(vi) TCR + T細胞の枯渇

いくつかの実施形態では、TCR + T細胞は、本明細書に開示される増殖されたT細胞集団から枯渇して、細胞治療で使用するための同種異系T細胞の集団を生成し得る。本明細書で使用する場合、「TCR + T細胞の枯渇」は、そのようなものを含む細胞の集団からTCR + T細胞を枯渇させることを指す。TCR + T細胞の枯渇に続いて、得られたT細胞集団は、実質的に低レベルのTCR + T細胞を有し得る（例えば、全細胞集団の3%未満又は2%未満、1%未満又は全細胞集団の0.5%未満）。いくつかの例では、得られたT細胞集団はTCR + T細胞を含まなくてもよく、すなわち、TCR + T細胞の存在は、従来の方法（例えば、TCR + に結合する抗体を使用するイムノアッセイ又はフローサイトメトリー）では日付が与えられない。 40

【0120】

TCR + T細胞の枯渇は、TCR + T細胞を認識してTCR + T細胞を捕捉する薬剤を使用して実施し、それにより、例えば、磁気細胞分離を実施することにより、TCR + を欠くものからそれらを分離し得る。このような方法は、上記で開示され 50

た増殖されたT細胞を、抗TCR抗体が固定化されているビーズに接触させ、且つ結合されていない細胞を収集することによって実施され得る。このように収集された非結合細胞(TCR⁺を欠くもの)は、事前に細胞を回復させるために培養することができ、例えば非結合細胞を一晩培養して細胞を回復させ得る。

【0121】

(vii) 遺伝子操作されたT細胞の採取

次いで、本明細書で開示される方法のいずれかによって生成される遺伝子操作されたT細胞は、当技術分野で公知の従来の方法を使用して治療的使用のために採取することができる。例えば、遺伝子操作されたT細胞の採取は、TCR⁺が枯渇した細胞の収集を含み得る。採取した遺伝子操作されたT細胞の集団は、原薬として使用し得る。本明細書で使用する場合、「原薬」は、患者に投与され得る遺伝子操作されたT細胞の集団を指す。原薬は、治療的使用のために製剤化、例えば、保存培地(例えば、CryoStor CS5)中で製剤化され、将来の使用のために凍結保存され得る。

10

【0122】

原薬は、1つ以上の汚染物質、例えばマイコプラズマ、ヒトウイルス(例えば、HIV、HBV、HCV、CMV)及び細菌内毒素について試験される場合がある。代わりに又は加えて、原薬は、滅菌について試験される場合がある。汚染のない原薬は、個々の患者の用量に分取され得る。代わりに又は加えて、汚染のない原薬は、治療的使用のために保存され得る。

【0123】

従って、本開示の態様は、遺伝子操作されたT細胞の集団(原薬)を提供する。遺伝子操作されたT細胞の集団は、破壊されたTRAC遺伝子、破壊された2M遺伝子及びCARをコードする核酸、例えば、本明細書に記載されるものを有する。いくつかの実施形態では、CARは、病的な細胞上で発現される抗原に結合する。いくつかの実施形態では、CARは、CD19に結合する。いくつかの実施形態では、CARは、BCMAに結合する。

20

【0124】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載された方法によって生成される遺伝子操作されたT細胞の集団の少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%又は少なくとも95%は、CARを発現する。他の態様では、CARを発現するこれらの細胞は、検出可能なレベルの表面TCR及び/又は検出可能なレベルの表面2Mを更に発現しない。

30

【0125】

他の実施形態では、本明細書に記載された方法によって生成される遺伝子操作されたT細胞の集団の少なくとも30%がCARを発現する場合、細胞の集団は、約1.0%以下、約0.5%以下、約0.4%以下又は約0.15%以下の表面TCRを発現するT細胞(例えば、TCR⁺細胞)を含む。

【0126】

他の実施形態では、本明細書に記載された方法によって生成される遺伝子操作されたT細胞の集団の少なくとも30%がCARを発現する場合、細胞の集団は、約50%以下、約40%以下又は約30%以下の表面2Mを発現するT細胞を含む。

40

【0127】

Cas9酵素、TRAC遺伝子を標的化するgRNA、2M遺伝子を標的化するgRNA及びCARをコードする核酸配列を含むAAVベクター(例えば、CD19 CAR又はBCMA CAR)を含む、本明細書に記載された方法によって生成される遺伝子操作されたT細胞の集団も本発明の範囲内である。

【0128】

II. 治療用途

本明細書に記載された方法によって生成される遺伝子操作されたT細胞の集団は、治療目的、例えば、遺伝子操作されたT細胞の集団によって発現されるCARコンストラクト

50

によって標的化される癌の治療のために対象に投与され得る。

【0129】

対象は、診断、処置又は治療が望まれている任意の対象であり得る。いくつかの実施形態では、この対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、この対象は、ヒトである。

【0130】

本明細書に記載された方法によって生成される遺伝子操作されたT細胞の集団を使用して治療され得る癌の非限定的な例としては、多発性骨髄腫、白血病（例えば、T細胞白血病、B細胞急性リンパ性白血病（B-ALL）及び/又は慢性リンパ性白血病（C-CLL））、リンパ腫（例えば、B細胞非ホジキンリンパ腫（B-NHL）、ホジキンリンパ腫及び/又はT細胞リンパ腫）及び/又は明細胞腎細胞癌（ccRCC）、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌、腎臓癌、甲状腺癌、上咽頭癌、非小細胞肺（NSCLC）、神経膠芽腫及び/又は黒色腫が挙げられるがこれらに限定されない。

【0131】

投与は、望ましい効果を生じさせることができるように、腫瘍部位などの所望の部位に遺伝子操作されたT細胞集団の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法又は経路により、遺伝子操作されたT細胞集団を、対象に配置する（例えば、移植する）ことを含み得る。対象の所望の位置に送達をもたらす任意の適切な経路によって遺伝子操作されたT細胞集団を投与することができるが、この場合、移植された細胞又はこの細胞の構成要素の少なくとも一部は、生存したままである。対象への投与後の細胞の生存期間は、数時間（例えば、24時間）の短い期間から数日、数年又は更に対象の寿命（すなわち長期の生着）までであり得る。例えば、本明細書に記載されるいくつかの態様では、有効量の遺伝子操作されたT細胞集団を、腹腔内又は静脈内経路などの全身性の投与経路を介して投与することができる。

【0132】

いくつかの実施形態では、遺伝子操作されたT細胞集団を全身に投与し、これは、細胞の集団を標的部位、組織又は臓器に直接投与するのではなく、代わりに対象の循環系に入り、それにより代謝及び他の同様のプロセスを受けるように投与することを意味する。好適な投与の様式としては、注射、注入、点滴又は経口摂取が挙げられる。注射としては、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、脳室内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節腔内、被膜下、くも膜下、脊髄内、脳脊髄内及び胸骨内注射並びに注入が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、経路は、静脈内である。

【0133】

有効量とは、医学的状態（例えば、癌）の少なくとも1つ以上の徴候又は症状を予防又は軽減するのに必要な遺伝子操作されたT細胞集団の量を意味し、所望の効果をもたらす、例えば医学的状態を有する対象を治療するのに十分な量の遺伝子操作されたT細胞集団を意味する。有効量としては、疾患の症状の発症を予防するか若しくは遅らせるか、疾患の症状の経過を変える（例えば、限定されないが、疾患の症状の進行を遅らせる）か、又は疾患の症状を逆転させるのに十分な量も挙げられる。任意の所与の場合に関して、適切な有効量は、通常の実験により当業者によって決定することができることが理解される。

【0134】

有効量の遺伝子操作されたT細胞の集団は、少なくとも 10^2 細胞、少なくとも 5×10^2 細胞、少なくとも 10^3 細胞、少なくとも 5×10^3 細胞、少なくとも 10^4 細胞、少なくとも 5×10^4 細胞、少なくとも 10^5 細胞、少なくとも 2×10^5 細胞、少なくとも 3×10^5 細胞、少なくとも 4×10^5 細胞、少なくとも 5×10^5 細胞、少なくとも 6×10^5 細胞、少なくとも 7×10^5 細胞、少なくとも 8×10^5 細胞、少なくとも 9×10^5 細胞、少なくとも 1×10^6 細胞、少なくとも 2×10^6 細胞、少なくとも 3×10^6 細胞、少なくとも 4×10^6 細胞、少なくとも 5×10^6 細胞、少なくとも 6×10^6 細胞、少なくとも 7×10^6 細胞、少なくとも 8×10^6 細胞、少なくとも 9×10^6 細胞、

10

0⁶細胞又はその複合を含み得る。

【0135】

本明細書に記載されるように生成される遺伝子操作されたT細胞集団を用いた治療の有効性は、当業者によって決定することができる。治療は、一例ではあるが、任意の1つ又は全ての徴候又は症状の機能的標的のレベルが有利な様式で変えられる（例えば、少なくとも10%増加する）か、又は疾患（例えば、癌）の他の臨床的に認められている症状又はマーカーが改善されるか又は緩和される場合、「有効」とみなされる。有効性は、入院又は医学的介入の必要性により評価された場合、対象が悪化しないことによっても測定され得る（例えば、疾患の進行が止まるか又は少なくとも遅くなる）。これらの指標を測定する方法は、当業者に公知であり、且つ/又は本明細書に記載されている。治療は、対象における疾患の任意の治療を含み、且つ（1）疾患を阻害すること、例えば症状の進行を止めるか若しくは遅くすること、又は（2）疾患を軽減すること、例えば症状の退行をもたらすこと、及び（3）症状の発症の可能性を予防するか若しくは減少させることを含む。

10

【0136】

本明細書に記載されるように生成される遺伝子操作されたT細胞集団は、組み合わせ療法でも使用され得る。例えば、本明細書に記載されるように生成される遺伝子操作されたT細胞集団は、同じ適応症を治療するか若しくは遺伝子操作されたT細胞集団の有効性を高め、且つ/又は遺伝子操作されたT細胞集団の副作用を低減させるために他の治療薬と併用され得る。

20

【0137】

一般的技術

本開示の実施では、別段の指摘がない限り、当技術分野の範囲内にある分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技術が用いられる。こうした技術は、例えば下記の文献で詳細に説明されている：Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed. 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.): Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., eds. 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies:

30

40

50

a practice approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); DNA Cloning: A practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, (1986; and B. Perbal, A practical Guide To Molecular Cloning (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.)).

【0138】

当業者であれば、更に詳細に述べることなく上記説明に基づいて本発明を最大限利用することができると考えられる。従って、以下の特定の実施形態は、単なる例示として解釈すべきであり、決して以下の本開示を限定するものではない。本明細書で引用する全ての刊行物は、本明細書で言及される目的のために又は主題に対して参考として組み入れられる。

【実施例】

【0139】

記載されている本発明をより詳細に理解できるように、以下の実施例が説明される。本出願で記載される実施例は、本明細書で提供される方法及び組成物を説明するために提供されており、それらの範囲を限定するものとしていかなる方法でも解釈されるべきではない。

【0140】

実施例1：T細胞濃縮のための最適化条件の特定。

本実施例では、自動細胞処理システムを使用してロイコパックからCD4⁺及びCD8⁺T細胞を濃縮するための、T細胞濃縮のための最適化条件の特定について報告する。

【0141】

方法

ロイコパック及びバッファー調製

ヒトロイコパックはHemaCare又はStemExpressから収集され、T細胞濃縮のために処理された。PBS/EDTAバッファー(リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.2、1mM EDTAを添加)に0.5%ヒト血清アルブミン(HSA)を添加し、T細胞選択中の処理、プライム化、洗浄及び溶出に使用した。

【0142】

ロイコパックドナーは、以下についてスクリーニングされた。

- ・ B型肝炎表面抗原(HBsAg EIA)
- ・ C型肝炎ウイルス抗体(抗HCV EIA)
- ・ ヒト免疫不全ウイルス抗体(HIV 1/2 plus O)
- ・ ヒトT-リンパ球向性ウイルス抗体(HTLV-I/II)
- ・ HIV-1/HCV/HBV核酸試験
- ・ WNV核酸試験
- ・ クルーズトリパノソマ(Trypanosoma Cruzi)抗体(選択的シャー

ガス病検査、ドナーごとに1回の生涯検査)

・H I V / H B V / H C V

・C M V

【0143】

上記のテストのいずれかで陽性の結果を示したドナーは除外された。本明細書に開示される実施例で使用されるドナーの個体群統計情報を表1に示す。

【0144】

【表1】

表1.ドナーの個体群統計学及び血液学パラメーター。全てのドナーが男性であった。

バッチ	供給元	ドナー源 ID	年齢	ドナー体重 (lb)	BMI	民族性	ABO/Rh	製品体積 (mL)	WBC (x10 ⁶)	リンパ球%
1	HemaCare	D327083	26	144	19.0	ラテン アメリカ系 (Hispanic/ Latino)	O-POS	279	9.77	79
2	HemaCare	141402	29	160	22.9	白人	A-POS	302	13.59	75.9
3	HemaCare	141121	26	154	24.8	ラテン アメリカ系 (Hispanic)	O-POS	250	8.75	74.7
4	HemaCare	136723	20	130	20.9	白人	A-POS	305	12.81	70.1
5	HemaCare	D64140	28	272	42.6	ラテン アメリカ系 (Hispanic/ Latino)	A-POS	339	21.36	81.1
6	Stcm Express	D0010038 64	33	176	24.0	白人	A-POS	140	8.14	70.9
7	HemaCare	141722	20	135	19.9	ラテン アメリカ系 (Hispanic)	O-POS	308	13.24	78.5
8	HemaCare	D327737	36	200	26.4	アフリカ系 アメリカ人	B-POS	310	14.57	81.3
9	HemaCare	D326737	31	225	29.7	アフリカ系 アメリカ人	AB- POS	314	10.99	77.9

【0145】

S y s m e x によるロイコパック血液学分析

入ってくるロイコパックからのサンプルは、製造元の指示に従って、S y s m e x X P 3 0 0 (S y s m e x 、シリアル番号 B 0 6 2 8) を使用して血液学的分析のために処理された。白血球 (W B C) カウントを使用して、自動化細胞処理システムにロードされた総細胞量を計算した。

【0146】

T細胞の濃縮

処理バッファー、ロイコパック、C D 4 マイクロビーズ及びC D 8 マイクロビーズを、実行を開始する前に自動化細胞処理システムにロードした。細胞を洗浄し、分離のためにチャンバー内でマグネットカラムに向けて標識した。C D 4 + 及びC D 8 + T細胞を捕捉し、処理バッファー中のターゲットバッグに更に溶出した。

【0147】

細胞数及び生存率

細胞数及び生存率の評価は、デフォルトのプロファイルを使用してC O U N T E S S (登録商標) I I (L i f e T e c h n o l o g i e s 、カタログ: A M Q A X 1 0 0 0) で実施した。細胞 (2 0 μ L) を、気泡を導入せずに数回上下にピペティングすることにより、トリパンプルー (2 0 μ L) と混合した。細胞/トリパンプルー混合物 (1 0 μ L) をC O U N T E S S (登録商標) I I 細胞計数チャンバースライドにロードした。

【0148】

フローサイトメトリー

10

20

30

40

50

約 1×10^6 の全核細胞を、 $95 \mu\text{L}$ の染色バッファー（ 0.5% ウシ血清アルブミン（BSA）/DPBS）中の $5 \mu\text{L}$ のヒト TruStain FcX（商標）で室温（RT）において 10 分間ブロックした。細胞を、Pacific blue 結合抗ヒト CD45 抗体（ $1:50$ ）、BV510 結合抗ヒト CD3 抗体（ $1:50$ ）、APC-Cy7 結合抗ヒト CD4 抗体（ $1:50$ ）、PE-Cy7 結合抗ヒト CD8 抗体（ $1:50$ ）、APC 結合抗ヒト CD19 抗体（ $1:50$ ）、FITC 結合抗ヒト CD56 抗体（ $1:50$ ）及び PE 結合抗ヒト CD33 抗体（ $1:50$ ）で、4 において 30 分間更にインキュベートした。次いで、 $5 \mu\text{L}$ の 7-アミノ-アクチノマイシン D（7-AAD）生存率染色液を含む 1 mL の塩化アンモニウム-カリウム（ACK）溶解バッファーを各サンプルに適用した。ACK 溶解バッファーを RT で 10 分間インキュベートした後、Novo Cytte-3000 フローサイトメーターで細胞を取得した。

10

【0149】

結果

ロイコパックサンプル中の白血球（WBC）

試験したロイコパックの WBC は、 $8.14 \times 10^9 \sim 21.36 \times 10^9$ 細胞の範囲であり、 $5.77 \times 10^9 \sim 17.32 \times 10^9$ の範囲のリンパ球数を有した。

【0150】

CD4 及び CD8 の濃縮 - 純度、生存率、細胞回復率及び収率

試験された 9 つのバッチのうち、4 つはプログラム A で評価され、5 つはプログラム B で評価された。全てのバッチで、純度が $> 90\%$ 、生存率が $> 90\%$ の T 細胞が得られた（表 2）。プログラム A からの細胞回復率は 31% であったが、プログラム B からの細胞回復率は 55.69% であった。

20

【0151】

【表 2】

表 2. CD4 及び CD8 の濃縮結果

バッチ	プログラム	ロイコパック CD3%	非標的細胞 CD3%	標的細胞			
				細胞数 ($\times 10^9$)	CD3%	生存率 (%)	回復率 (%)
1	A	73.20	50.80	1.32	96.20	96.50	29.24
2		72.30	60.40	2.76	96.30	93.50	27.00
3		64.90	46.00	2.32	96.80	95.00	39.15
4		63.50	55.00	2.59	89.70	94.00	30.77
平均(A)		68.48	53.05	2.25	94.75	94.75	31.54
5	B	70.30	15.70	6.00	94.50	93.00	39.75
6		56.00	3.17	2.14	92.80	96.00	47.10
7		69.00	16.80	4.68	96.60	93.00	49.10
8		59.40	15.20	6.82	92.60	96.00	75.87
9		55.50	11.20	3.88	93.60	98.00	61.65
平均(B)		62.04	12.41	4.70	94.02	95.20	54.69

30

40

【0152】

まとめると、これらの結果は、健康なドナー（HD）ロイコパックからの T 細胞が、CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞に対して高純度（ $> 90\%$ ）及び高生存率（ $> 90\%$ ）で濃縮されたことを示している。

【0153】

実施例 2：T 細胞活性化のための最適化条件の特定

本実施例では、組換えヒト化 CD3 及び CD28 アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックスを使用して、T 細胞活性化のための最適化条件の特定について報告する。

50

【 0 1 5 4 】

静置培養容器におけるT細胞活性化のための最適化条件の特定

簡単に説明すると、健康なドナーロイコパックからの凍結保存T細胞を解凍し、ポリマーナノマトリックスに結合した組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストで、対照又は静置培養容器としてTフラスコ内で48時間活性化した。T細胞の活性化は、細胞活性化マーカーCD25及びCD69の表面発現をモニタリングし、細胞増殖をモニタリングすることによって評価された。細胞播種密度、培地量及びポリマーナノマトリックスに結合した組換えヒト化CD3及びCD28アゴニスト(「CD3/CD28アゴニスト」)濃度を含む静置培養容器での活性化のための様々なT細胞活性化条件を試験した(表3)。T細胞の活性化は、細胞活性化マーカーCD25及びCD69の表面発現をモニタリングし、細胞増殖をモニタリングすることによって評価された。TフラスコでのT細胞活性化を陽性対照(PC)として使用した(表3)。

10

【 0 1 5 5 】

【表3】

表3. 試験されるT細胞活性化条件

条件	容器	1cm ² 当たりの細胞数	培地体積(mL)	1mL当たりの細胞密度	CD3/CD28アゴニスト(1×10 ⁶ 細胞当たりのμl)	CD3/CD28アゴニスト対培地の比
1	静置容器	1.00×10 ⁷	8	2.50×10 ⁶	40	1:10
2		1.00×10 ⁷	4	5.00×10 ⁶	40	1:5
3		1.00×10 ⁷	2	1.00×10 ⁷	40	1:2.5
4		1.00×10 ⁷	4	5.00×10 ⁶	8	1:25
5		1.00×10 ⁷	2	1.00×10 ⁷	4	1:25
6		2.00×10 ⁶	4	1.00×10 ⁶	40	1:25
7		2.00×10 ⁶	2	2.00×10 ⁶	40	1:12.5
8		2.00×10 ⁶	2	2.00×10 ⁶	20	1:12.5
陽性対照(PC)	Tフラスコ		10	1.00×10 ⁶	40	1:25

20

30

【 0 1 5 6 】

図1Aに示すように、CD25及びCD69を発現する細胞の割合は、試験した条件間で類似していた。条件3では、CD69⁺細胞及びCD25⁺CD69⁺細胞のわずかに高い(約10%高い)集団が観察された(図1A)。

【 0 1 5 7 】

しかし、細胞増殖率は、CD69の発現レベルとは相関しておらず、むしろCD25の平均蛍光強度(MFI)で測定した場合、CD25の発現レベルと相関していた(図1B)。試験された条件の中では、陽性対照と比較した場合、条件7がCD25MFIと細胞増殖の間に最も類似した相関関係があった(図1B)。CD25及びCD69はT細胞活性化マーカーであり、初期の上方制御と後期の上方制御が活性化状態と相関している。

40

【 0 1 5 8 】

要するに、これらの結果は、表3の条件7が、静置培養容器において優れたT細胞活性化効果をもたらしたことを示している(条件7: 2.00×10⁶細胞/cm²; 2.00×10⁶細胞/mL; 40μLの組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックス/1×10⁶細胞; 及び1:12.5の組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックス対培

50

地の比)。

【0159】

小規模製造プロセスにおける任意選択的なT細胞活性化条件の検証

次に、特定されたT細胞活性化条件(条件7: 2.00×10^6 細胞/cm²; 2.00×10^6 細胞/mL; 40 μ Lの組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックス/ 1×10^6 細胞; 及び1:12.5の組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックス対培地の比)を、小規模製造プロセスにおいて(静置培養容器において)試験し、活性化T細胞を、キメラ抗原受容体(CAR)、T細胞受容体鎖定常領域(TRAC)ノックアウト及び/又は-2-ミクログロブリン(2M)ノックアウトの発現に関する遺伝子編集効率について調査した。Tフラスコ(フラスコ)におけるT細胞の活性化及び編集を、静置細胞培養容器(容器)におけるものと比較した。TRAC及び2MのエレクトロポレーションされたT細胞(EP)並びに未処理T細胞(UT)を対照として使用した。

10

【0160】

小規模製造プロセス

クライオバイアルを液体窒素保存から回収し、少量の凍結物質が残るまで水浴で解凍した。次いで、細胞を10倍量の完全増殖培地(X-VIVO(商標)15(Lonza)、5%のヒトAB血清、100U/mLのIL2、100U/mLのIL7)に滴下し、300gで室温において10分間遠心分離してペレット化した。細胞を 1×10^6 細胞/mLの濃度に再懸濁し、組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストを介した活性化に結合したコロイド状ポリマーナノマトリックスに供し、下流の修飾を改善した。簡単に言えば、単離されたT細胞は、コロイド状ポリマーナノマトリックスに共有結合した組換えCD3及びCD28で活性化された。組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックスを、未処理のフラスコ内の1:25の比率又は 1×10^6 細胞当たり40 μ Lで細胞に適用した。細胞は、組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックス中で、37、5%CO₂のインキュベーターで2日間(48時間)維持した。インキュベーション後、細胞を300gで10分間室温において遠心分離する。次いで、細胞ペレットを完全増殖培地に再懸濁し、遺伝子改変前に 1×10^6 細胞/mLの濃度で一晩培養した。

20

【0161】

組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックスを含まない完全培地で一晩培養した後、トリパンブルーを添加してCOUNTES S(登録商標)サイトメーターでカウントすることにより、総細胞数及び細胞生存率を定量した。次いで、細胞を300gで10分間室温において遠心分離した。細胞ペレットを10mLのエレクトロポレーションバッファーで洗浄し、再度遠心分離した。細胞を遠心分離する間に、リボ核タンパク質(RNP)複合体を調製した。2つの分離したRNP複合体が形成された。B2M sgRNA及びCas9をそれぞれ150 μ g/mL及び150 μ g/mLの濃度で含む1つのRNPが形成された。TCR sgRNA及びCas9をそれぞれ150 μ g/mL及び150 μ g/mLの濃度で含む別のRNPが形成された。sgRNA及びCas9を含むRNP複合体は、室温で10分間のインキュベーションによって形成された。一方のRNP複合体はCas9(Cas9; 配列番号1)及び2M遺伝子を標的化するgRNA(B2M-1; 配列番号6)を含んで形成され、他方のRNP複合体はCas9(Cas9; 配列番号1)及びTCR遺伝子を標的化するgRNA(TA-1; 配列番号2)を含んで形成された。遠心分離後、細胞ペレットをエレクトロポレーションバッファーに再懸濁して 400×10^6 細胞/mLの濃度にした。得られた細胞懸濁液を使用して、 300×10^6 細胞/mL、 200×10^6 細胞/mL、 150×10^6 細胞/mL及び 100×10^6 細胞/mLの最終細胞濃度を有する更なる希釈液を生成した。分離したRNP複合体を合わせて、エレクトロポレーションキュベットにピペットで移した。様々な濃度の細胞をRNP複合体に添加し、上下に5回ピペッティングした。

30

40

50

【0162】

フローエレクトロポレーションに基づくトランスフェクションシステムを使用して、細胞をエレクトロポレーションした。各個々のキュベットをエレクトロポレーションしたら、細胞及びRNP溶液を未処理の12ウェルプレートに分注し、各ウェルに500 μ LのX-VIVO(商標)15培地(ヒトAB血清、IL2及びIL7を含まない)を入れた。細胞をインキュベーター内で20分間休止させた。トリパンブルーを添加し、COUNTES(登録商標)サイトメーター又はNC-200でカウントすることにより、総細胞数及び細胞生存率を定量した。

【0163】

休止後の総細胞数に基づいて、細胞を、X-VIVO(商標)15(ヒトAB血清、IL2又はIL7を含まない)で更に希釈し、所望の濃度に到達させる必要がある場合がある。形質導入を行うために必要なAAVの量を計算するには、総細胞数が必要である。必要なAAVの μ L = (総細胞数)(所望のMOI(すなわち20,000))/(ウイルスvg/mL(すなわち 1.5×10^{13}))

10

【0164】

AAV及び細胞懸濁液を混合し、未処理のフラスコ内で37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で1時間インキュベートした。AAVを含む全量を、100mLの完全培地を含む静置培養容器に添加した。静置培養容器を3日間インキュベートして細胞増殖させた。

【0165】

エレクトロポレーション後、静置培養容器の各ウェルに100mLの完全増殖培地を充填した。遺伝子改変細胞は、完全増殖培地に 5×10^5 細胞/mL \sim 1×10^6 細胞/mLの濃度で播種された。IL2又はIL7は、3 \sim 4日ごとに100U/mLの最終作業濃度まで補充された。総細胞数は、トリパンブルーを添加し、COUNTES(登録商標)サイトメーターでカウントすることにより、3 \sim 4日ごとに定量された。エレクトロポレーション後、細胞を培養で9 \sim 12日間維持し、 30×10^6 細胞/mLの飽和濃度に基づいて最大の総細胞数を達成した。細胞がこの閾値に達すると、TCR又はを発現した任意の残存する未編集細胞の枯渇を実施して、これらの細胞不純物を除去した。

20

【0166】

静置培養容器での増殖期の間、細胞はプラトー期に達する可能性があり、それにより、静置培養容器内で最大数の細胞に到達する。この段階では、総細胞集団はTCR及び陽性発現細胞の6%以下で構成されていた。TCR及び陽性細胞は、移植片対宿主反応に寄与する可能性があるため、集団から枯渇し得る。静置培養容器で体積減少を行い、体積の90%を除去し、体積の残りの10%は細胞を含んでいた。細胞を、枯渇を実施するために使用されるチューブセットに滅菌溶接されたトランスファーバッグにロードした。TCR及び陽性細胞を、抗ビオチンビーズによって捕捉される場合があるビオチン抗TCRを含むTCR枯渇キットを使用して主要な集団から除去した。TCR陽性が枯渇した細胞はターゲットバッグに溶出され、静置培養容器に戻され、更に1日間培養した。次いで、細胞をCS5で凍結保存し、-145 $^{\circ}$ Cで保存した。

30

【0167】

培養物からの新鮮な細胞又はクライオバイアルから解凍した細胞を染色バッファーで洗浄し、1500rpmで5分間遠心分離した。陰性対照として、 1×10^6 個の細胞を、Fab-ビオチン又はIgG-ビオチン抗体とインキュベートした。細胞を染色用バッファーで洗浄し、過剰な一次抗体を捕捉するためにマウス抗IgGと共にインキュベートした。細胞を再度洗浄し、二次抗体(CD45、CD5、CD4、CD8、B2M、TCR、ストレプトアビジン-APC)及び生存率色素のフルパネルとインキュベートした。最後に細胞を染色用緩衝液で洗浄し、フローサイトメーターにかけて様々に染色された集団を捕捉した。

40

【0168】

フローサイトメトリーを使用して、インプロセスサンプル並びに凍結保存された製品に存在する多様な集団を定量化した。本明細書に記載されているゲーティング戦略は、亜集

50

団を区別するために使用した。要約すると、使用される戦略は、最初にリンパ球集団をゲーティングし、一重項細胞集団を選択し、CD45⁺又はCD5⁺集団をゲーティングすることに基づく。編集効率は、B2M⁻及びTRAC⁻染色された細胞を親のCD45⁺又はCD5⁺集団の割合として視覚化することによって決定した。同様に、CD4及びCD8⁺集団の比率は、CD45⁺又はCD5⁺集団の比率としてプロットした。アイソタイプコントロールを使用して、APCチャンネルでのCAR⁺発現のゲートを設定した。

【0169】

結果

本明細書で開示される小規模製造プロセスにおいて、T細胞を静置培養容器及び同じ活性化条件下のTフラスコで活性化し(条件7)、次いで得られた活性化T細胞を2つのリボ核タンパク質(RNP)複合体の存在下でフローエレクトロポレーションに基づくトランスフェクションシステムを使用してエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、細胞に、感染多重度(MOI)20,000で抗CD19 CAR(抗CD19 CAR; 配列番号53)を発現させるためのrAAVベクターを形質導入し、増殖させた。TCR⁻及びB2M⁻のノックアウト効率、抗CD19 CAR発現並びに細胞増殖を細胞増殖中に評価した。TCR⁻の枯渇は、自動化細胞処理システムを使用して実施した。処理バッファー、細胞産物及びビオチンに結合した抗TCR⁻/モノクローナル抗体を含むTCR⁻キットを、実行前に自動化細胞処理システムにロードした。細胞を洗浄し、分離のためにチャンパー内でマグネットカラムに向けて標識した。非結合細胞(TCR⁻)を処理バッファー中のターゲットバッグに収集した。

10

20

【0170】

このようにして得られた細胞をフローサイトメトリーで分析し、T細胞活性化効率(CD25⁺%, CD69⁺%及び蛍光強度又はMFIで表される)、遺伝子編集効率(%及びB2M%)、TCR⁻枯渇効率及びCAR発現効率を調べた。下記の表4を参照されたい。

【0171】

【表4】

表4. フローサイトメトリー用Flowパネル。

パネル	目的	非結合抗体	非結合抗体
T細胞活性化パネル	T細胞活性化状態: CD25%, CD25平均蛍光強度(MFI), CD69%		CD45-Pacific Blue; CD5-FITC; CD4-APC-Cy7; CD3-BV510; CD4-APC-Cy7; CD8-Percp5.5; CD25-PE; CD69-APC; 7-AAD
CARフルパネル (インプロセス)	編集結果及びTCR $\alpha\beta$ 枯渇効率: $\alpha\beta$ -%, β 2M-%及びCAR+%	ビオチン-抗マウスFab'	CD45-Pacific Blue; CD5-FITC; CD4-APC-Cy7; CD8-Percp5.5; TCRab-PE; B2M-PE-Cy7; Live-Dead-HV500
CAR縮小パネル (解凍後)	編集結果: CAR+%	ビオチン-抗マウスFab'	CD45-Pacific Blue; Streptavidin-APC; Live-Dead-HV500
TCRパネル (解凍後)	編集結果: TCR $\alpha\beta$ -%, β 2M-%		CD45-Pacific Blue; CD5-FITC; CD4-APC-Cy7; CD8-Percp5.5; TCRab-PE; B2M-PE-Cy7; Live-Dead-HV500

30

40

【0172】

要約すると、合計 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ の細胞を、CARフルパネル及びCAR減少パネル用の一次非結合抗体で4において20分間インキュベートした。非結合の抗体を1mLの染色バッファー(DPBS/0.5%BSA)で洗浄して除去し、次いで細

50

胞を $100 \mu\text{L}$ の染色バッファー中の $1 \mu\text{g}$ の対照マウス IgG と室温 (RT) で 10 分間インキュベートした。次いで、LIVE / DEAD (商標) Fixable Dead Cell Stain (Thermo Fisher) を含むコンジュゲート抗体 (すべてのパネル) (T細胞活性化パネルを除く) で、細胞を、光から保護された 4 において 30 分間染色した。インキュベーション後、細胞を染色バッファーで洗浄し、T細胞活性化パネルを除いて、染色バッファーに再懸濁させ、これを 7 - AAD を含む染色バッファーに再懸濁させた。

【0173】

静置培養容器で活性化された T細胞は、Tフラスコで活性化された T細胞と比較して、同等以上の TCR 及び 2Mノックアウト効率並びに CAR%発現を示した (図 2A ~ 2D)。編集は、編集効率が監視される 12 日間にわたって持続したままであった (図 2A ~ 2D)。9 日目の未処理 T細胞 (UT) における CAR%発現のレベルの上昇は、フローサイトメトリー中の技術的問題に起因し、3、6 及び 12 日目に測定された CAR%発現と一致しなかった (図 2D)。

10

【0174】

静置培養容器で活性化された T細胞は、Tフラスコで活性化された T細胞と比較して、編集後に有意に高い増殖倍数を示した (58.46 倍と比較して 98.66 倍; 図 3)。未処理 T細胞の編集後の増殖倍数 (84.61 倍) 及び模擬エレクトロポレーション T細胞の編集後の増殖倍数 (71.77 倍) は、Tフラスコで活性化された T細胞で観察されたもの (58.46 倍) よりも高かったが、静置培養容器で活性化された T細胞で観察されたもの (98.66 倍) よりも低かった (図 3)。

20

【0175】

まとめると、これらの結果は、T細胞活性化の特定された最適条件が、対照 Tフラスコと比較して、小規模製造プロセス (静置培養容器で表される) で同様の高い T細胞活性化効率を示したことを示している。更に、静置培養容器で生成された結果として得られた活性化 T細胞は、Tフラスコで生成された活性化 T細胞と比較して、同等以上の編集効率、CAR発現効率及び編集後のより大きい細胞増殖を示した。

【0176】

実施例 3 : T細胞のエレクトロポレーションのための最適化条件の特定

本実施例では、TRAC 及び 2M 遺伝子座での最適な CRISPR - Cas9 依存性遺伝子編集のための T細胞濃度の範囲を含む、エレクトロポレーションによる T細胞の遺伝子編集のための最適化された条件の特定を報告する。本実施例において、固定濃度の gsRNA 及び Cas9 は、エレクトロポレーションによって増加する T細胞濃度に導入され、編集効率はフローサイトメトリーによって決定された。

30

【0177】

100×10^6 細胞 / mL ~ 300×10^6 細胞 / mL の細胞濃度で効率的な編集が可能
固定濃度の B2Ms gRNA (B2M - 1 ; 配列番号 6)、TRAC s gRNA (TA - 1、配列番号 2) 及び CAS9 (配列番号 1) を使用して、それぞれ、 $150 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、 $150 \mu\text{g} / \text{mL}$ 及び $300 \mu\text{g} / \text{mL}$ で、細胞濃度を上げながら (100×10^6 細胞 / mL ~ 400×10^6 細胞 / mL) エレクトロポレーションを行った。フローサイトメトリーを使用して遺伝子編集後、編集効率を 3 日ごとに監視した。各サンプルの濃度を表 5 にまとめる。

40

【0178】

【表 5】

表5. エレクトロポレーションのための細胞濃度。

細胞濃度 ($10^6/\text{mL}$)	B2M-1 256117 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	TA-1 256116 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CAS9 E0417 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	カセット	体積 (μL)
100	150	150	150	100 μL 体積	100
150	150	150	150	100 μL 体積	100
200	150	150	150	100 μL 体積	100
300	150	150	150	100 μL 体積	100
200	150	150	150	100 μL 体積	50
300	150	150	150	100 μL 体積	50
400	150	150	150	100 μL 体積	50

10

【0179】

100 × 10⁶細胞/mL ~ 300 × 10⁶細胞/mLの範囲の細胞濃度で、編集された細胞のB2M(-)及びTCR(-)亜集団は、それぞれ、>80%及び>98%であった(図4A~4B)。細胞を100 × 10⁶細胞/mL ~ 300 × 10⁶細胞/mLの範囲の濃度でエレクトロポレーションした場合、CAR⁺発現は>40%であった(図4C)。400 × 10⁶細胞/mLの細胞濃度の場合、B2M(-)及びTCR(-)亜集団は、それぞれ、<80%及び<87%であった(図4D~4E)。CAR⁺発現は、400 × 10⁶細胞/mLの密度でエレクトロポレーションされた細胞でもわずかに減少した(図4F)。

20

【0180】

要するに、これらの結果は、100 × 10⁶細胞/mL ~ 300 × 10⁶細胞/mLの範囲の細胞濃度が内因性 2M及びTCR遺伝子座での効率的な編集を可能にすることを示している。

30

【0181】

実施例4：T細胞形質導入のための最適化条件の特定

本実施例では、T細胞におけるCAR⁺発現をもたらす、キメラ抗原受容体をコードするrAAVベクターの最適なT細胞形質導入のためのMOIの範囲の特定を報告する。本実施例において、T細胞はMOIの増加と共にrAAVベクターによって形質導入され、CAR⁺発現はフローサイトメトリーによって定量化された。

【0182】

要約すると、健康なドナーロイコパックからの凍結保存されたT細胞を解冻し、48時間活性化した。Cas9及びTCRを標的化するsgRNA(TA-1;配列番号2/Cas9;配列番号1)並びにCas9及び2Mを標的化するsgRNA(B2M-1;配列番号6/Cas9;配列番号1)を含むRNP複合体の存在下で、1 × 10⁶の細胞濃度で、細胞を、大量にエレクトロポレーションし、各複合体には150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のsgRNA及び150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が含まれていた(表6)。上記の実施例1~3も参照されたい。

40

【0183】

エレクトロポレーション後、細胞を再懸濁し、インキュベーター内で20分間静置した。次いで、エレクトロポレーションした細胞を様々なアリコートに分離し、37°Cで1時間rAAVのMOIを増加させて形質導入した(表6)。CAR⁺発現は、3、6、10及び13日目のエレクトロポレーション及び形質導入後のフローサイトメトリーによって決定された。

50

【 0 1 8 4 】

【 表 6 】

表6. 試験されるT細胞形質導入条件。

	B2M-1 256162 ($\mu\text{g/mL}$)	TA-1 256161 ($\mu\text{g/mL}$)	CAS9 E0417 ($\mu\text{g/mL}$)	キュベット	体積	MOI (vg/細胞)
1	150	150	150	400 μL 体積	400	80K
2	150	150	150	400 μL 体積	400	40K
3	150	150	150	400 μL 体積	400	20K
4	150	150	150	400 μL 体積	400	10K
5	150	150	150	400 μL 体積	400	5K
6	150	150	150	400 μL 体積	400	1.25K
7	未処理	未処理	未処理	NA	NA	NA

10

【 0 1 8 5 】

図 5 A に示すように、20K の MOI は、試験される期間にわたって少なくとも 50% の CAR⁺ 発現を達成するのに十分であった。CAR⁺ 発現は、MOI が 10K、20K、40K 及び 80K で飽和していた (図 5 A)。MOI を変化させても、細胞の生存率及び細胞の増殖には影響しなかった (データは示さず)。大量のエレクトロポレーションが実施され、B2M 及び TRAC のノックダウンは未処理の細胞を除いて全てのサンプルで一貫していたため、CAR⁺ 発現の差異は、遺伝子編集の非効率性によるものではなかった (データは示さず)。1.25K ~ 10K の間の MOI は、CAR⁺ 発現の減少と線形相関しているように見えた (図 5 A)。0K ~ 23K の MOI で T 細胞が漸進的に形質導入された更なる実験は、CAR⁺ 発現と 0.12K ~ 4.7K の範囲の MOI との間に線形相関を示した (図 5 B)。

20

【 0 1 8 6 】

まとめると、これらの結果は、CAR⁺ 発現が 10K ~ 80K の MOI で形質導入された T 細胞で飽和し、CAR⁺ 発現が 0.12K ~ 4.7K の MOI で形質導入された T 細胞の MOI と線形相関したことを示している。

30

【 0 1 8 7 】

実施例 5 : T 細胞増殖のための最適化条件の特定

本実施例では、優れた T 細胞増殖のための任意選択的な細胞播種密度の特定を報告する。本実施例において、T 細胞を増加する密度で播種し、細胞増殖を経時的に監視した。

【 0 1 8 8 】

要約すると、健康なドナーロイコパックからの凍結保存された T 細胞を解凍し、48 時間活性化した。次いで、Cas9 及び TCR を標的化する sgRNA (TA-1 ; 配列番号 2 / Cas9 ; 配列番号 1) 並びに Cas9 及び B2M を標的化する sgRNA (B2M-1 ; 配列番号 6 / Cas9 ; 配列番号 1) を含む RNP 複合体の存在下で、細胞をエレクトロポレーションし、各複合体には 150 $\mu\text{g/mL}$ の sgRNA 及び 150 $\mu\text{g/mL}$ が含まれていた。エレクトロポレーション後、細胞を 20,000 の MOI の rAAV で形質導入し、次いで静置培養容器で増殖させた。詳細については上記の実施例 1 ~ 4 を参照されたい。

40

【 0 1 8 9 】

編集後、細胞を、最大 12 日の増殖のために、 5×10^4 細胞 / cm^2 (50,000)、 1×10^5 細胞 / cm^2 (100,000)、 2×10^5 細胞 / cm^2 (200,000)、 3×10^5 細胞 / cm^2 (300,000) 及び 5×10^5 細胞 / cm^2 (50

50

0, 000) で、静置培養容器に播種した。細胞数及び生存率は3日ごとに評価した。増殖倍数は、終了細胞数と開始細胞数の比として計算した。

【0190】

図6A～6Bに示すように、 5×10^5 細胞/cm²の密度で播種された細胞は、9日で成長プラトーに達した。 3×10^5 /cm²の密度で播種された細胞は12日目までに、 5×10^5 細胞/cm²で播種された細胞が9日目に到達した細胞数に匹敵する細胞数に達した(図6A～6B)。 2×10^5 細胞/cm²及び 1×10^5 細胞/cm²の密度で播種された細胞は、12日目までに成長プラトーに達することなく適度な増殖を示した(図6A～6B)。試験された播種密度の中では、 5×10^4 細胞/cm²細胞の密度で播種された細胞において、最低レベルの増殖が観察された(図6A～6B)。 1×10^5 細胞/cm²の密度で播種された細胞は、 2×10^5 細胞/cm²(185.5倍)及び 3×10^5 細胞/cm²(164.6倍)の密度で播種された細胞と比較して、総細胞数は少ないが、より強い増殖倍数率(223.4倍)を示した(図6C)。 5×10^5 細胞/cm²及び 5×10^4 細胞/cm²のいずれかで播種された細胞の増殖倍数率は約100倍であった(図6C)。

10

【0191】

要約すると、これらの結果は、 3×10^5 細胞/cm²～ 5×10^5 細胞/cm²の間の細胞播種密度の範囲が編集後の効率的なT細胞増殖を提供したことを示す。

【0192】

実施例6：TCR 枯渇のための最適化条件の特定

20

本実施例では、編集後に残存するTCR⁺細胞の最適な枯渇のための条件の特定について報告する。CRISPR-Cas9媒介性遺伝子編集は、典型的には、T細胞の>90%でTCR⁺発現のアブレーションをもたらす。移植片対宿主病(GvHD)の可能性を最小限に抑えるために、残存するTCR⁺T細胞は、TCR⁺枯渇プロセスによって更に減少させる場合がある。

【0193】

要約すると、細胞をビオチン結合-TCR⁺抗体及び抗ビオチンマイクロビーズとインキュベートした。過剰な非結合抗体及びμビーズを除去した後、細胞をマグネットカラムに通し、標識されたTCR⁺細胞をカラムに捕捉した。非結合のTCR⁻細胞は、PBS/EDTAバッファー中の0.5% HSAを含むターゲットバッグに溶出される。溶出した細胞を一晩培養して細胞を回復させ、その後、製剤配合のために採取した。

30

【0194】

CARを発現するT細胞産物の4つのバッチをTCR⁺枯渇のために処理した。本格的規模プロセスから3つのバッチを生成し、中規模プロセスから1つのバッチ(CTX110-18-01)を生成した。インプット細胞数は、ドナーの変動及び増殖規模により、 7.4×10^9 細胞～ 32.0×10^9 細胞まで変動した(表7)。枯渇後の細胞数の回復率は75%～113.33%の範囲であった(表7)。100%又は113%の細胞数の回復率は、インプット細胞数の過小評価が原因である場合がある(表7)。CTX110-18-01バッチからのインプット細胞(84.5%)を除いて、インプット及びアウトプット細胞の生存率は90%を超えていた(表7)。インプット細胞及びアウトプット細胞のTCR⁺の平均パーセントは、それぞれ、2.06%及び0%であった。

40

【0195】

【表 7】

表 7. 4つのバッチの製剤の TCR $\alpha\beta$ 枯渇。

バッチ	インプット細胞				アウトプット細胞				
	細胞数 (x10 ⁹)	生存率 (%)	TCR $\alpha\beta$ +%	TCR $\alpha\beta$ + 細胞数 (x10 ⁹)	細胞数 (x10 ⁹)	生存率 (%)	細胞 回復率(%)	TCR $\alpha\beta$ +%	TCR $\alpha\beta$ + 細胞数 (x10 ⁹)
CTX110-18-01	7.40	84.50	1.98	0.15	6.32	93.00	85.41	0.000	0.00
CTX110-18-02	32.00	93.50	0.71	0.23	24.00	96.00	75.00	0.000	0.00
CTX110-18-03	8.48	93.50	2.76	0.23	9.61	97.00	113.33	0.000	0.00
CTX110-18-04	14.30	92.00	2.78	0.40	14.40	96.00	100.70	0.003	0.00
平均	15.55	90.88	2.06	0.25	13.58	95.50	93.61	0.00	0.00

10

【0196】

要するに、これらの結果は、TRAC遺伝子及び 2M遺伝子が遺伝的に破壊された CAR発現T細胞からのTCR の効率的な枯渇を示している。

【0197】

実施例7：抗CD19CARを発現し、遺伝子破壊されたTRAC及び 2M遺伝子をもつ遺伝子操作されたT細胞を作製するための製造プロセス開発(CTX110)。

概略

CTX110は、CRISPR/Cas9(クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート/CRISPR関連タンパク質9)遺伝子編集構成要素(sgRNA及びCas9ヌクレアーゼ)を使用する、ex vivoで遺伝子改変された同種T細胞で構成されるCD19指向性T細胞免疫療法である。

【0198】

改変には、TRAC及び 2M遺伝子の標的破壊が含まれる。TRAC座位を破壊することで、T細胞受容体(TCR)の発現の減少がもたらされ、移植片対宿主病(GvHD)の可能性を低減させることが意図される一方、2M座位を破壊することで、主要組織適合複合体タイプI(MHC I)タンパク質の発現の減少がもたらされ、宿主拒絶反応の可能性を低減させることによって持続性を向上させることが意図される。抗CD19CARを加えることにより、改変T細胞がCD19発現腫瘍細胞に誘導される。

【0199】

CARは、抗CD19 scFv、CD8膜貫通ドメイン、CD28共刺激ドメイン及びCD3シグナル伝達ドメインで構成されている。CTX110 CARの発現は、EF-1プロモーターによって誘導される。

【0200】

CTX110の例示的な製造プロセスが図7Aに示されている。

【0201】

製造プロセスの発展

CTX110の製造プロセスは、研究規模、開発規模及び臨床規模を含む3つの生産規模で実施した。研究規模プロセスは小規模で実施し、研究規模プロセスを規模拡大して、開発規模プロセス及び臨床規模プロセスに移行した。初期開発キャンペーン(4ロット)は、実現可能性及び操作パラメータの調整のために、原薬の実験室グレードの出発物質を使用して実施した。その後、GMP由来の出発物質(sgRNA、Cas9及びrAAV-138)の使用及び定量的許容基準を、開発規模プロセスと運用上同一である臨床規模プロセスに実装した。

【0202】

20

30

40

50

出発物質の選択

C T X 1 1 0 の生成用出発物質は、以下のとおりである：

- 健康なドナーから収集されたロイコパック、
- 細菌由来の C a s 9ヌクレアーゼ、
- 2つの単一ガイドRNA (s g RNA)、T R A C 遺伝子座を標的化する T A - 1 及び 2 M 遺伝子座を標的化する 2 M - 1、及び
- 抗 C D 1 9 C A R 遺伝子をコードする組換え A A V - 6 ベクター (r A A V - 1 3 8)。

【 0 2 0 3 】

C T X 1 1 0 の遺伝子改変並びに編集された T R A C 及び 2 M 遺伝子座の作製に使用される構成要素についての構造情報を以下に示す。 10

C a s 9ヌクレアーゼのアミノ酸配列 (配列番号 1) :

【 化 1 】

```

MDKKYSIGLDIGTNSVCWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLICALLFDSGETAEATRL
KRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAY
HEKYPTIYHLRKKLV DSTKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTY
NQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALLSLGLTPNFKSNF
DLAEDAQLQLSKDTYDDDLNLLAQICDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS
MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD
GTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLCGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRI
PYYVGPLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHS
LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD
SVEISQVEDRFNASLCTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYA
HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTF
KEDIQKAQVSGQDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQ
TTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINR
LSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRCKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRK
FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILD SRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS
KLVSDFRKDFQFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVGCTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAK
SEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL S
MPQVNIVKKTEVQTTGGF'SKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKG
KSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLELENGRKRMLAS
AGELQKCNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLCSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEF SKRV
ILADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLD
ATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD

```

【 0 2 0 4 】

40

50

【表 8】

表 8. sgRNA 配列及び標的遺伝子配列。

sgRNA 配列		配列番号	
<i>TRAC</i> sgRNA (TA-1)	改変	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcua gaaaauagcaaguuuuuuuaaggcuaguccguuauc aacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U	2
	未改変	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaa auagcaaguuuuuuuaaggcuaguccguuaucac uugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU	3
<i>TRAC</i> sgRNA スペーサー	改変	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC	4
	未改変	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC	5
<i>β2M</i> sgRNA (B2M-1)	改変	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcua gaaaauagcaaguuuuuuuaaggcuaguccguuauc aacuugaaaaaguggcaccgagucggugcU*U*U*U	6
	未改変	GCUACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaa auagcaaguuuuuuuaaggcuaguccguuaucac uugaaaaaguggcaccgagucggugcUUUU	7
<i>β2M</i> sgRNA spacer	改変	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC	8
	未改変	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC	9
標的配列(PAM)			
<i>TRAC</i> sgRNA	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG)	10	
<i>TRAC</i> sgRNA	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC	11	
<i>β2M</i> sgRNA	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (TGG)	12	
<i>β2M</i> sgRNA	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC	13	
例示的な sgRNA 式			
sgRNA 配列	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuuagagcuagaaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucg gugcuuuu	14	
sgRNA 配列	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuuagagcuagaaaauagcaaguua aaaauaaggcuaguccguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucg gugc	15	
sgRNA 配列	n ₍₁₇₋₃₀₎ guuuuagagcuagaaaauagcaaguuaaaaauaaggcuaguc cguuaucacuugaaaaaguggcaccgagucggugcu ₍₁₋₈₎	16	

*2'-O-メチルホスホロチオエート修飾を含むヌクレオチドを指す

「n」は、5'末端でのスペーサー配列を指す

【 0 2 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. 編集された *TRAC* 遺伝子配列

説明	配列(欠失は破線(-)によって示される; 挿入は太字によって示される)	配列番号
<i>TRAC</i> 遺伝子編集	AA-----GAGCAACAAATCTGACT	17
<i>TRAC</i> 遺伝子編集	AAGAGCAACAGTGCTGT-GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	18
<i>TRAC</i> 遺伝子編集	AAGAGCAACAGTG-----CTGGAGCAACAAATCTGACT	19
<i>TRAC</i> 遺伝子編集	AAGAGCAACAGT-----GCCTGGAGCAACAAATCTGACT	20
<i>TRAC</i> 遺伝子編集	AAGAGCAACAGTG-----CTGACT	21
<i>TRAC</i> 遺伝子編集	AAGAGCAACAGTGCTGT GGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	22
<i>TRAC</i> 遺伝子編集	AAGAGCAACAGTGC--TGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	23
<i>TRAC</i> 遺伝子編集	AAGAGCAACAGTGCTGT TGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	24

10

【0206】

【表 10】

表 10. 編集された $\beta 2M$ 遺伝子配列。

説明	配列(欠失は破線(-)によって示される; 挿入は太字によって示される)	配列番号
$\beta 2M$ 遺伝子編集	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	25
$\beta 2M$ 遺伝子編集	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTC-- GCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	26
$\beta 2M$ 遺伝子編集	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTT----- CTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	27
$\beta 2M$ 遺伝子編集	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT GGATAG CCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	28
$\beta 2M$ 遺伝子編集	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGC----- ---GCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	29
$\beta 2M$ 遺伝子編集	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCT TGTGGCC TGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	30

20

30

【0207】

40

50

【表 1 1】

表11. 抗CD19 CARコンストラクト構成要素の配列

名称 説明	配列	配列 番号
CD8a 膜貫通ドメイン	IYIWAPLAGTCCGVL ₂ LSLVIT ₂ Y	31
CD28ヌクレオチド 配列	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACT CCTCGCCCGCCTGGGCCGACAACAAAACATTACCAACCCTATGCC CCCCACCACACTTCGCTGCCTACAGGTCC	32
CD28アミノ酸 配列	SKRSRL ₂ LHSDYMNMT ₂ PRRP ₂ GPTRKH ₂ YQ ₂ PYAPPR ₂ DFAAYRS	33
CD3 _ε ヌクレオチド 配列	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAA GGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAG GAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGMAATG GGCGGTAAACCCCGAAGAAAAGAATCCCAAGAAGGACTCTACAAT GAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGT ATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTAC CAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGCACTGCAT ATGCAGGCCCTGCCTCCAGA	34
CD3 _ε アミノ酸 配列	RVKF ₂ SRSADAPAYQQGQ ₂ NQL ₂ YNFL ₂ NLGRREEYD ₂ VLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQ ₂ EGLYNELQ ₂ KDKMAEAYSEIGMKGERRR ₂ KGK ₂ GH ₂ DGLY QGLSTATKDTYDALHM ₂ QALPPR	35
抗CD19 CAR FMC63-28Z(FMC63- CD8[tm]-CD28 [共刺激ドメイン]- CD3 _z)核酸	ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCTCAT CCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGACTCAGACCACC AGTACTTGTCTGCCTCACTGGCAGACCCGACTAACAATCTCCTCC AGCCCAACTCAAGACATAGCAAATACCTCAATTGCTACCAGCAC AAGCCCCACGGAACGGTAAAACTCCTCATCTATCATACTCAAGC TTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGA ACTGACTATTCTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATT GCGACATATTTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTACACTTTC CGAGGACGAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCACTGGCTCT GGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAG CTCCAGGAGAGCGGCCCGGTCCTGTTGCCCCAGTCAAAGCCTC TCTGTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGC GTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGGAAAGGGTCTTGAATGGCTT GGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTC AAAAGTCGCTTGACGATAATAAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTT TTCCTTAAAATGAACACTTTGCAGACTGACCATAACCGCTATATAT TATTGTCCTAAACATATTAFACTACGGCCGTAGTTACCGGATGCAT TATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTCACAGTCAGTAGTGCTGCTGCC TTTGTCCCGGATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCC CCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCAACATCGCCTCTCAACCTCTT AGTCTTCCCCCGAGCCATCCCGACCCGCCCGCCCGGCTGCTGTT CATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCT CCGTTGGCGGGTACGTGCGGGCTCCTTTTGTGTACTCGTTATT ACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTG	36

10

20

30

40

【 0 2 0 8 】

【表 1 2】

名称 説明	配列	配列 番号
	TTGCATTCCCATTACATGAATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCG ACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCT CGGTACAGGTCCCAGTGAAGTTTTCCCAAGCGCAGACGCTCCG GCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTG CGACCCCGCAGGAGTATGACGTGCTTCATAAACGCCGGGGCAGA GACCCGGAAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAAATCCCCAAGAA GGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTAC TCACAAATACGTATGAACCCCGAACGACGACCGCGAAAAGCTCAC GATGGCCTCTACCAAGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTAC GATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA	10
抗CD19 CAR FMC63-28Z(FMC63- CD8[tm]-CD28 [共刺激ドメイン]- CD3z)アミノ酸	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISC RASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGS TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGS GKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG VSWIRQPPRKGLEWLVGIWGSETTYYNALKSRLTIKDNSKSQV FLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYCGSYAMDYWGQTSVTVSSAAA FVPVFLPAKPTTTPAPRPTPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGCAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCNHRNRSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHVQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNEINLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE CLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRCKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	37
左ITR (5' ITR) (代替)	CCTGCAGCCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCCGCCCGGG CGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CGCAGACACGGAGTGCCCAACTCCATCACTAGGGGTTCT	38
右ITR(3' ITR) (代替)	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTC GCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGTCCGCCGACGCCCGG GCTTTGCCCGGGCGCCTCACTGAGCCAGCCAGCCCGCAGCTGCC TGCAGG	39
TRAC-LHA (800bp)	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAG TAAACGGTACTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTCTTCIGATTTATAG TTCAAAACCTCTAICAAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGAT AGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTOCCATTCTG CTAATGCCCGACCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTCCAGAT GTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCIGCCTTTACT CTGCCAGAGTTATATGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAA TAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTACCCCTGCATTTACAGTTT CCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTCACTGAAATC ATGCCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCCTGCCCTGAGTC CCAGTCCATCAGCAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTA TAAAGCATGAGACCGTACTTGGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCT TGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGA GGGAAATGAGATCATCTCCTAACCTCATCCTCTTGTCCCACAGA TATCCAGAACCCTGACCCCTGCCGTGTACCAGCTGAGACACTCTAA ATCCAGTGACAAGTCTGCTGCTATTACCGATTTTGATTCTCA AACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGA CAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCA	40
TRAC-RHA (800bp)	TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAAC AGCATTATCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCAGGTAAGGGC	41

10

20

30

40

【 0 2 0 9 】

【表 1 3】

名称 説明	配列	配列 番号
	AGCTTTCCGTCCTTCCAGGCTGTTTCCTTCCTTCAGGAATGCC AGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACCTCTCTG ATTGGTGGTCTCGCCCTTATCCATTGCCACCAAAACCTCTTTTT ACTAAGAAACAGTGAAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATGACAC GGGAAAAAAGCAGATCAAGACAAGCTCCAGGAGAGGCCACCTGC CCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTGAGTTCCCTGCCTGCCTTTG CTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCCTCATTCTAAG CCCCTTCTCCAAGTTCCTCTCCTTATTTCTCCCTGCTGCCAAA AAATCTTTCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATT AACCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCCACAGGTG TTCAAGTGCAGGAATIAAAAAGTCAGATGAGGGGTCTGCCACAC CAAGCACATTCTAGTTGCCCGAGCCCATCTGTACCTGGGAAAA GTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAG AAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGCAAGCCCTCTCTCAA GAAATGCTACTTGAACATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGC ACCCTATAGAGGCCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAG	10
EF1α	CGCTCCGCTGCCCTCAGTCCGCAGAGCCACATCGCCACACTC CCCGAGAAGTTGGGGGAGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAG AGAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGAATGCTGTACTGG CTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCA CTAGTCCCGTGAACCTTCTTTTTCCGAACGGTTTGGCCGACGA ACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCGCCGGGCTGGCCTCTTT ACGGGTTATGGCCCTTGGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGC AGTACGIGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGG AGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTT GAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCT GGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAG CCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGC AACATAGTCTTGTAAATCCCGGCCAACATCTCCACACTGGTATTT CGGTTTTTGGGGCCGGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGTCCCAGC GCACATCTTCCCGAGCCGGGGCCTGCCAGCCGGCCACCGACAA TCGACCCGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTG GCCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGCAAGGCTGG CCCGGTCCGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCG GCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACCGCGCTCGGGAG AGCCGGCCGGTGAAGTCAACACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGGT CCTCAGCCGTCGCTTCAATGACTCCACGGAGTACCGGGCCCGT CCAGGCACCTCGATTAGTTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTT TAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTG AGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAAT TCTCCTTCCAATTTGCCCTTTTTCAGTTTCGATCTGCTTCATTC TCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTCCATTTCAGG TCTCGTGA	42
GM-CSFシグナル ペプチド	ATGCTTCTTTGGTTACGTCTCTGTTCCTTTGCCAACTTCCTCAT CCAGCCTTCTTGCTGATCCCC	43
GM-CSFシグナル ペプチド	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	44
抗CD19 scFv	GATATTCAGATGACTCAGACCACAGTAGCTTGTCTGCCTCACTG CGACACCGAGIAACAATCTCCTCCAGGCCAAGTCAAGACATTAGC	45

【 0 2 1 0 】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

名称 説明	配列	配列 番号
	AAATACCTCAATTTCGTACCAGCACAAAGCCCCACGGAACGGTAAAA CTCCTCATCTATCATACGTCAAGGTTCATTCGGGAGTACCGTCA CGATTTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAALCTGACTATTCCCTTGACTATT TCAAACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTGTCAA GGTAATAACCTCCCTTACACTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAA ATTACCGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAA CGITCCACTAAAGCCGACGTCAACCTCCAGCAGACCGCCCCCGGT CTCGTTGCCCCACTCAAACCTCTCTGTAACCTGCACAGTGA GGTGTATCATTGCCTGATTATGGCGTCTCCTGGATAAGGCAGCCC CCCGCAAAGGGTCTTGAATGGCTTGGGTAATATGGGCTCACAG ACAACGTATTATAACCCGCTCTCAAAGTCCGCTGACGATAATA AAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTTCCTTAAAAATGAACAGTTT CAGACTGACGATACCGCTATATATTATTGTGCTAAACATTATTAC TACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGCAGGGGACTTCT GTCACACTCAGTAGT	10
CD19 scFvアミノ酸 配列 下線が付された リンカー	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSCTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPHYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG LVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLWLVGIWSE TTYNSALKSRLTIIKDNSKSQLVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQTSVTVSS	46
CD8a細胞外 + CD8a膜貫通 + 5'リンカー (下線)	GCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCAG ACTCCCGCCCCCGCCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCT CAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCCGGG CGTGCTGTTTCATACGAGGGCTTGGACTTCGCTTGATATTTAC ATTTGGCTCCGTTGGCCGCTACGTGCCGCCCTCTTTTCTTGTCA CTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGC	47
CD8a細胞外 + CD8a膜貫通 (リンカー無し)	TTTCTCCCCGATTTTCTCCCAGCCAAACCGACCAGACTCCCCC CCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCACCATCGCCTCTCAAACCTCT AGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCCGGGCTGCTCTT CATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGATATTTACATTTGGGCT CCGTTGGCCGCTACGTGCCGCCCTTTTGTGTCACCTCGTTATT ACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGC	48
CD8a細胞外 + CD8a膜貫通	FVPVFLPAKPTTTPAPRPTPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR	49
CD19 VH	EVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLVGIWSETTYNSALKSRLTIIKDNSKSQLVFLKMNSLQDDT AIYYCAKHYYCGSYAMDYWGQTSVTVSS	50
CD19 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQ GNTLPHYTFGGGKLEIT	51
CD19リンカー	GSTSGSGKPGSGEGSTK	52
rAAV	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGG CGTCGGGCGACCTTGGTCGCCCCGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG CCGACACACCGAGTCCCAACTCCATCACTAGGGCTTCTGCGGC CGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCT TATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCT GATTTATACTTCAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGG TAATGTCATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCT	53

10

20

30

40

【 0 2 1 1 】

【表 1 6】

名称 説明	配列	配列 番号
	<p>ACCAGTGCCTCTGCGAAGCCTGGCAGTGGACAAGGTTCCACTAAA GGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCGGTCTCGTTGCCCC AGTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGCLACAGTGAGTGGTGTATCATTG CCTGATTATGGCGTCTCCTGGATAAAGGCAGCCCCCGGAAAGGGT CTTGAATGGCTTGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTAT AACTCCGCTCTCAAAGTCGCTTGACGATAATAAAGATAAATCC AACAGTCAACTTTTCCTTAAAATCAACACTTTCAGACTGACCAT ACCCCTATATATTATTCCTAAACATTATTACTACGCCGGTAGT TACGCGATGGATTATTGGGGCAGGGGACTTCTGTACAGTCAGT AGTGCTGTGCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACC ACGACTCCCGCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCC TCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCC GGGGGTGCTGTTCAACAGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATT TACATTTGGGCTCCGTTGGCGGTACGTGCGCGTCCCTTTGTG TCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCCCTCAAAG CGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGC CGCCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCCCCA CGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCAGTGAAGTTTCCGAAGC GCAGACGCTCCGGCATAACAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAAC GAACTGAATTGGGACGCCCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAA CCCCGGCCAGACACCCGAAATGGCCCTAAACCCCAAGAAAAC AATCCCAACAAGCACTCTACAATGAATCCAGAACGATAAGATG GCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGCG GGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACC AAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA TAATAATAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTT TTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACCCCT TCAACAACAGCATTATCCAGAAGACACCTTCTCCCCAGCCAG GTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTCCCTTGCTTCAG GAATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAA CTCCTCTGATTGGIGTCTCGGCCTTATCCATGCCACCAAAACC CTCTTTTACTAAGAAACAGTGAAGCTTGTTCGGCAGTCCAGAG AATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGCCAGGAGAGG CCACGTGCCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACCTCAGTTCCTGCCTGCC TGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTC ATTCTAAGCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTCTCCCTGT CTGCCAAAAAATCTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGT CACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGC ACCAGGTGTTGAAGTCCAGCAATTAAGAATCAGATGAGGGGTGT GCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGAGCCCATCTGTCAGC TGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTAACTCA CGCTTCACAAAACAGCTACCTTACCACAAAAGTCAAGGAAGCC TCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCA GGGAGAGGACCCTATAGAGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAA GGTAACCACGTCCGGACCGAGCCTGCAGCGTCTCTCCCTACGA ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTC CCTCACTCAGGCCCGGCCACCAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTT TGCCCGGGCGGCTCAGTGAAGGAGCGAGCGGCAGCTGCCTGCA GG</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>

【 0 2 1 3】

【表 17】

名称 説明	配列	配列 番号
LHAからRHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTCACTTGGCTCAAGGCCTTATATCGAC TAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAG TTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGAT AGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTG CTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCCTCCAGATTC AACAT GTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCTGCTTTACT CTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAA TAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTACCCCTCCATTTAGCTTT CCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATC ATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTC CCAGTCCATCACCAGCAGCTGGTTTTCTAAGATGCTATTTCCCTA TAAAGCATGAGACCGTCACTTGGCAGCCCCACAGACCCCCGCCCT TGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTGGGGCAAAGA CGCAAATCAGATCATCTCCTAACCCCTGATCCTCTTGTCCCACAGA TATCCAGAACCCTCACCCCTGCCGTCTACCACCIGAGACACTCTAA ATCCAGTGACAAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCA AACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGA CAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTG CCCGTCACTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGT TGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGC GCGGGGTAACCTGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCCTTT TTCCCGACCGTGGCCGACAACCCTATATAACTGCACTACTCGCCC TGAACGTTCTTTTTCCGCAACGGGTTTGGCCGACAGACAGGTAA GTCCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATG GCCCTTGCCTGCCTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCCGAG GCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCCCTCGTGCTTGAGTTGAGGC CTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCT TCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAA TTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGTAGTCT TGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTTTGG GGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTT GGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGATCGGACGGGG CTAGTCTCAAGCTCGCCCGCCTGCTCTGCTCCCTCGCCTCGCGCC GCCGTGTATCGCCCCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGGC ACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGC AGGGAGCTCAAAATGGAGGACCGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCCGG TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGT CGCTTCATGTGACTCCACCGAGTACCGGCCCCCGTCCAGGCACCT CGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGTTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGA GACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGG ATTTGCCCTTTTTGAGTTGGATCTTGGTTTATTCTCAAGCCTCA GACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGACC ACCATGCTTCTTTTGGTTACCTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCT CATCCAGCGTTCTTGTGATCCCGATATTAGATGACTCAGACC ACCAGTACCTTGTCTCCCTCACTCGGACCCGACTAACAAATCTCC TGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGTACCAG CAGAAGCCCGACGGAACGGTAAAACCTCCTCATCTATCATACGTCA	54

10

20

30

40

【 0 2 1 4 】

ドナー間での T 細胞の分離はすべて、CTX110 の製造に受け入れられると見なされ、堅牢な生成プロセスを示している。

【0217】

【表19】

表 12. 10 人の男性ドナー全体の編集結果。

ドナー	血液型	年齢	BMI	%TCR $\alpha\beta$	%B2M ⁺	%CAR ⁺	増殖倍数
TA-1 = 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, B2M-1 = 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cas9 = 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$							
1	A+	49	40.1	99.00	89.00	46.30	13.41
2	A+	28	42.6	99.99	95.00	68.20	62.64
3	A+	36	29	99.00	85.00	66.30	63.00
4	A+	33	24	99.96	91.00	53.10	42.16
TA-1 = 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, B2M-1 = 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cas9 = 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$							
40	A-	19	25.2	95.00	82.33	49.00	53.57
41	A+	31	24	98.00	86.33	59.67	76.07
43	O+	29	25.7	96.00	81.67	59.00	69.83
A	O+	23	24.4	98.00	86.67	63.00	63.53
44	O+	30	26.5	98.00	83.00	60.00	76.37
45	A+	35	27.2	97.00	84.33	62.00	59.40
平均				98.00	86.43	58.66	58.00
SD				1.54	3.98	6.78	17.72
%CV				1.57	4.61	11.55	30.56

10

20

略語。B2M = $\beta 2$ マイクログロブリン, BMI = ボディマス指数, CAR = キメラ抗原受容体, CV = 変動係数, SD = 標準偏差, TCR $\alpha\beta$ = T 細胞受容体 α 鎖 + T 細胞受容体 β 鎖。

【0218】

(ii) Cas9ヌクレアーゼ

配列番号1のCas9ヌクレアーゼを本実施例で使用した。以下の表14にまとめられた結果は、同様のレベルのTCR $\alpha\beta$ 及びB2M⁺細胞並びに二重陰性細胞が存在したことを示す。

30

【0219】

(iii) rAAV-138ベクター

上記で開示されたrAAV-138ベクターを使用して、MOIの影響を評価し、目的のCAR⁺発現を達成した。MOIを増加させて細胞を形質導入し、CAR⁺発現を定量化した。上記の実施例4を参照されたい。図7Bに提示されたデータは、20,000のMOIの選択を支持する。

【0220】

規模拡大の開発のために、選択されたMOIの上記の出発物質との適合性を検証するための研究を実施した。細胞を、0~23,000の範囲のMOIで形質導入した。エレクトロポレーション及びウイルス感染とそれに続く11日間の増殖後、CAR⁺発現をフローサイトメトリーによって定量化した。結果を図7Cに示す。AAV用量依存性であるCAR⁺発現は、MOIが0の場合の2.1%CAR⁺から、MOIが23,000の場合の56.2%CAR⁺の範囲であった。CAR⁺発現は、4,700のMOIで飽和した。

40

【0221】

GMP rAAV-138 (MOI 23,000)に感染した細胞のCAR⁺発現は、非GMPベクター (MOI 20,000)で得られたものと同等であり、それぞれ、56.2%及び55.4%であった。規模拡大の生成には、20,000のMOIが選択された。

50

【0222】

(iv) リボ核タンパク質複合体 (RNP) の *in situ* での形成

固定濃度の細胞を使用して、TCRを標的化するsgRNA (TA-1、配列番号2) 及び B2M (B2M-1; 配列番号6) を標的化するsgRNAとCas9 (配列番号1) のインキュベーションによって形成されるRNP複合体の濃度を増加させてエレクトロポレーションを行った。TA-1/Cas9及び B2M/Cas9複合体の*in situ*での形成は、300 µg/mLのCas9ヌクレアーゼの最終結合濃度 (各ガイドと結合した150 µg/mLのCas9ヌクレアーゼの最終濃度に相当) を使用して評価した。TA-1及び B2M-1の最終濃度は、37.5 µg/mL ~ 300 µg/mLまで変化した。

10

【0223】

図7Dで示すように、37.5 µg/mL ~ 75 µg/mLのTA-1 sgRNA濃度は、TCR のより高い編集をもたらした。150 µg/mL又は300 µg/mLのTA-1 sgRNA濃度では、TCR の更なる編集は提供されず、B2Mの編集は減少した。試験した濃度の中で、75 µg/mLのTA-1 sgRNAは、TCR、B2M及びTCR と B2Mのダブルノックアウト (DKO) の編集に最高の効率を提供した。図7Eで示すように、75 µg/mL ~ 150 µg/mLのB2M-1 sgRNA濃度は、B2Mのより高い編集をもたらし、TA-1 sgRNAの濃度よりも高いB2M-1 sgRNAの濃度を使用して効率的な編集が達成される場合があることを示唆している。

20

【0224】

要するに、これらの結果は、それぞれ0.3 mg/mL、0.08 mg/mL及び0.2 mg/mLである最終濃度のCas9、TA-1 sgRNA及びB2M-1 sgRNAを用いてT細胞の効率的な編集を示している。これらの濃度を達成するために、TA-1 sgRNA/Cas9及びB2M-1 sgRNA/Cas9の混合物を、それぞれ2.7 : 1及び6.7 : 1のモル比で調製した。

【0225】

RNP複合体で検出された遊離Cas9の割合を決定するには、TA-1 sgRNA (TA-1; 配列番号2) とCas9 (Cas9; 配列番号1) 及びB2M-1 sgRNA (B2M-1; 配列番号6) とCas9 (Cas9; 配列番号1) の混合物は、それぞれ2.7 : 1及び6.7 : 1のモル比で調製した。混合物を10分間インキュベートした後、CEX HPLCで分析して、遊離Cas9の量を定量した。表13で示すように、混合物で検出された遊離Cas9の割合が低いことは、RNP複合体が効率的に形成されたことを示唆している。

30

【0226】

【表20】

表 13. RNP 複合体中の遊離 Cas9 の割合。

	遊離 Cas9 (%)
B2M-1	16 ± 2 (n = 9)
TA-1	3 ± 2 (n = 9)

40

【0227】

これらの結果は、Cas9とsgRNAのインキュベーションにより、Cas9の大部分がRNP複体内に含まれるようになることを示している。

【0228】

製造プロセスの開発

(i) 研究プロセス

50

合計 22 の研究ロットを、17 人の健康なボランティアからの T 細胞を使用した研究規模プロセスによって生成した。研究規模プロセスで特定された条件を、開発規模プロセスを実施するための規模拡大のために検証及び調整した。最後に、GMP 由来の重要な出発物質を、臨床規模プロセスでの臨床材料の調製について評価した。効果的には、開発規模プロセス及び臨床規模プロセスは操作上同じである。

【0229】

研究規模のプロセスは、図 7 A に示されるプロセスと同じ工程に従った。要約すると、PBM C の凍結バイアル (ロット 1 ~ 14、16、21、22) 又は白血球アフェレーシス製品から濃縮された凍結 T 細胞 (ロット 12 ~ 15、17 ~ 20) のいずれかからの T 細胞を、ゲンタマイシン又はフェノールレッドを含まない X - V I V O (商標) 15、5 % ヒト A B 血清、r h I L - 2 及び r h I L - 7 からなる「T 細胞培地」で 2 ~ 3 日間、C D 3 / C D 2 8 アゴニストに結合したコロイド状ナノマトリックス粒子で活性化した。2 日目又は 3 日目に、組換えヒト化 C D 3 及び C D 2 8 アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックスを新鮮な培地で希釈するか、又は細胞を洗浄して遠心分離することのいずれかにより除去した。翌日、T 細胞は、フローエレクトロポレーションに基づくトランスフェクションシステムを含むエレクトロポレーション系トランスフェクションシステムを使用して、C a s 9 及び s g R N A でエレクトロポレーションした。

10

【0230】

エレクトロポレーションからおよそ 20 ~ 60 分後、細胞を未処理のままにするか、又は 1 細胞当たり 20,000 若しくは 50,000 のいずれかの遺伝子コピーの M O I で A A V 6 r A A V - 138 に感染させた。感染からおよそ 1 時間後、細胞を洗浄し、T 細胞培地にプレATINGした。

20

【0231】

ゲノム編集からおよそ 1 週間後、フローサイトメトリーにより、細胞の T C R / 2 M ノックアウト及び C A R 発現を評価した。続いて、T C R⁻、B 2 M⁻、C D 4⁺、C D 8⁺ 及び C A R⁺ である細胞のパーセンテージを計算した。

【0232】

遺伝子編集後に T C R⁻ 及び B 2 M の表面発現を失い、細胞表面で検出可能な C A R を発現した細胞のパーセンテージを、各プロセスのフローサイトメトリーで評価した (表 14)。研究ロット全体 (n = 22) で、細胞の 43 ± 16 % (18 ~ 72 %) が抗 C D 19 C A R の望ましい表面発現を達成し、T C R⁻ の表面喪失 (98 ± 0.66 %、97 ~ 99 %) 及び B 2 M (79 ± 9.6 %、54 ~ 86 %) の表面喪失も示した (表 14)。開発規模プロセス及び臨床規模プロセスでも同様の結果が得られた (表 14)。研究ロットで完全に編集された細胞 (T C R⁻ B 2 M⁻ C A R⁺) の平均パーセンテージは、31 ± 13 % (15 ~ 59 %) であった。

30

【0233】

C D 3 の表面発現は、T C R との複合体の形成に依存する。そのようなものであるから、これは、T C R の喪失に加えて、T C R の喪失の機能的な生化学的マーカーとして機能する。C D 3 表面発現の喪失は、研究ロットで平均 96 ± 3.5 % (85 ~ 99 %) であった。

40

【0234】

亜集団の C D 4 / C D 8 頻度を、遺伝子編集成分を含まないエレクトロポレーションによって処理された対照 T 細胞と比較した。研究ロットの場合、編集された細胞 (T C R⁻ B 2 M⁻ C A R⁺、ロット 1 ~ 11、16 ~ 22) には、平均して 50 ± 12 % の C D 4 細胞及び 45 ± 14 % の C D 8 細胞が含まれていた。エレクトロポレーションされた対照 T 細胞 (ロット 1 ~ 11、16 ~ 21) には、57 ± 12 % の C D 4 細胞及び 40 ± 12 % の C D 8 細胞が含まれていた。編集済み T 細胞と対照 T 細胞を比較した場合、C D 4 又は C D 8 の頻度の間に統計的に有意な差は観察されなかった (対にならない両側スチューデントの t 検定)。

【0235】

50

(i i) 開発及び臨床プロセス

研究プロセスを、臨床材料の規模拡大及び生成のために GMP 施設に移管した。研究プロセスで特定された条件を、規模拡大（開発プロセス）のために検証及び調整した。最後に、GMP 由来の重要な出発物質を、臨床材料の調製について評価した（臨床プロセス）。効果的には、開発及び臨床プロセスは操作上同じである。結果を以下の表 14 に提示する。

【 0 2 3 6 】

(i i i) 製造プロセス全体での遺伝子編集の比較可能性

研究プロセス及び初期規模拡大に対する臨床ロット並びに非臨床ロットの結果の比較を表 14 に示す。

【 0 2 3 7 】

【表 2 1】

表 14. 生成プロセス全体の結果。

パラメータ	研究規模 プロセス	開発規模 プロセス	臨床規模 プロセス
細胞生存率(%)	N.D.	86.4 ± 7.1	92.5 (平均, n = 2)
%CAR ⁺ T 細胞	43.0 ± 16.0	49.0 ± 12.7	58.0 ± 12.0
CD3 ζ	96 ± 3.5	N.D.	N.D.
%TCR $\alpha\beta$	98.0 ± 0.7	99.8 ± 0.2	99.8 ± 0.1
%B2M ⁻	79.0 ± 9.6	84.8 ± 1.6	83.9 ± 1.1

【 0 2 3 8 】

プロセスパラメータの評価

製造運転パラメータを、表 15 にまとめられている一連の小規模及び本格的規模の実験で評価した。

【 0 2 3 9 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 15. プロセス開発研究結果

パラメータ	結果及び結論
T 細胞の濃縮	
自動化細胞処理システムによる CD4_CD8 T 細胞の単離	CD4_CD8 濃縮プログラムを使用して単離された T 細胞は、高純度及び高生存率のものであった。
T 細胞活性化	
ガス透過急速増殖システムにおける T 細胞活性化: 細胞密度、細胞濃度、組換えヒト化 CD3 及び CD28 アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックスの用量及び希釈	<p>CTX110 の生成に望ましい編集及び細胞増殖を実現するために、以下の条件が特定された:</p> <p>1)細胞播種密度: $2 \times 10^6/\text{cm}^2$</p> <p>2)細胞播種濃度: $2 \times 10^6/\text{mL}$</p> <p>3)組換えヒト化 CD3 及び CD28 アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックス: $40\mu\text{L}/1 \times 10^6$ 細胞</p> <p>4)活性化の 48 時間後に組換えヒト化 CD3 及び CD28 アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックスを 10 倍希釈</p>
エレクトロポレーション及び形質導入	
sgRNAs 及び Cas9 の濃度	<p>$37.5\sim 150 \mu\text{g}/\text{mL}$ の TA-1 sgRNA 濃度、$75\sim 150 \mu\text{g}/\text{mL}$ の B2M-1 sgRNA 濃度、及び $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Cas9 濃度が、同等の $\text{TCR}\alpha\beta$ 及び B2M 編集効率を達成する。</p> <p>最終的な生成プロセスでは、次の条件が選択された: $0.08 \text{ mg}/\text{ml}$ TA-1, $0.2 \text{ mg}/\text{ml}$ B2M-1 及び $0.3 \text{ mg}/\text{ml}$ Cas9</p>

10

20

【 0 2 4 0】

30

40

50

【表 2 3】

細胞濃度	<p>100-400 × 10⁶ 細胞/mL の範囲の細胞濃度を固定濃度の RNP(B2M-1, TA-1 gRNAs 及び Cas9 を、それぞれ、150 μg/mL, 150 μg/mL 及び 300 μg/mL で)とインキュベートした。</p> <p>100-300 × 10⁶ 細胞/mL の細胞濃度では、B2M 及び TCR αβ の重集団は、それぞれ、> 80% 及び > 98% であった。</p> <p>400 × 10⁶ 細胞/mL の細胞濃度では、B2M 及び TCR αβ の重集団は、< 80% 及び < 87% であり、効率が低いことを示した。</p>	10
エレクトロポレーション中の EP 培地の影響	<p>同等の TCRαβ 及び B2M の編集効率、並びに CAR 発現は、エレクトロポレーション中に最大 10% の培地で達成され、CTX110 編集に対する残留培地の悪影響がないことを示した。</p>	
rAAV-138 の形質導入	<p>臨床的 AAV 形質導入プロセスには以下が含まれる:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) AAV 形質導入前後の洗浄工程の排除 2) AAV 形質導入の細胞密度: 10 × 10⁶ /mL 3) AAV MOI: 20,000 (ロットごとに決定) 	
細胞増殖		
ガス透過急速増殖システム 培養容器のための播種密度	<p>エレクトロポレーション後に 3 × 10⁵ 細胞/cm² ~ 5 × 10⁵ 細胞/cm² の播種密度を試験した。</p> <p>3 ~ 5 × 10⁵ 細胞/cm² を播種された細胞は、7 ~ 9 日間の培養後、約 30 × 10⁶ 細胞/cm² 及び最大 50 × 10⁶ 細胞/cm² の最終細胞密度を達成した。</p>	20
異なるサイズのガス透過急速増殖システム培養容器における細胞増殖	<p>60 cm², 100 cm², 及び 500 cm² のガス透過膜表面ガス透過性細胞培養デバイスに播種した場合の細胞増殖を比較することにより、ガス透過性急速増殖システムによる細胞増殖の規模適応性を評価した。結果は、改変された T 細胞が、採取時の同じ細胞密度で異なる血管サイズで同等の増殖を達成できることを示しており、したがって、60 cm² のガス透過膜表面ガス透過細胞培養デバイスでサテライトプレーティング (satellite plating) を使用して、CTX110 生成プロセス用の 500 cm² ガス透過膜表面ガス透過細胞培養デバイスの細胞増殖を監視する手順をサポートする。</p>	30
TCRαβ⁺細胞の枯渇		
枯渇パフォーマンスの評価	<p>TCRαβ 枯渇のためのカスタマイズされたプログラムは、自動化された細胞処理システムを使用して開発された。このプログラムを使用した枯渇プロセスのパフォーマンスは、4 つのバッチで評価され、平均 70% の細胞回収率及び > 90% の生存率で高い枯渇効率 (インプット 2% → アウトプット < LOQ TCRαβ⁺ 細胞) を示した。</p>	40

【0 2 4 1】

実施例 8 : 抗 B C M A C A R を発現し、遺伝子破壊された T R A C 及び B 2 M 遺伝子を有する遺伝子操作された T 細胞を製造する方法 (C T X 1 2 0) 。

C T X 1 2 0 は、C R I S P R / C a s 9 (クラスタ化して規則的な配置の短い回文配列リピート / C R I S P R 関連タンパク質 9) 遺伝子編集構成要素 (s g R N A (単一ガイド R N A) 及び C a s 9 ヌクレアーゼ) を使用する、エキソピボで遺伝子改変されたヒト同種 T 細胞で構成される B C M A 指向性 T 細胞免疫療法である。

【0 2 4 2】

改変には、T R A C 及び B 2 M 遺伝子座の標的破壊及び組換えアデノ随伴ウイルスベク

10

20

30

40

50

ター (r A A V 1 6 6、抗 B C M A 指向性キメラ T 細胞抗原受容体をコードする血清型 6 r A A V) を使用した T R A C 遺伝子座への抗 B C M A キメラ抗原受容体 (C A R) 導入遺伝子の挿入が含まれる。

【 0 2 4 3 】

C A R は、 B C M A に特異的なヒト化単鎖可変断片 (s c F v) と、それに続く C D 8 ヒンジ並びに C D 1 3 7 (4 - 1 B B) 及び C D 3 の細胞内シグナル伝達ドメインに融合した膜貫通領域で構成されている。 C T X 1 2 0 C A R の発現は、伸長因子 1 (E F - 1) プロモーターによって誘導される。

【 0 2 4 4 】

C T X 1 2 0 の製造プロセスを図 8 A に示す。細菌由来の C a s 9 ヌクレアーゼを含む出発物質の構造情報 ; 2 つの単一ガイド R N A (s g R N A)、 T R A C 遺伝子座を標的化する T A - 1 及び 2 M 遺伝子座を標的化する B 2 M - 1 は、上記の実施例 7 に提供されている。 r A A V ベクター中の抗 B C M A C A R のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を以下に示す (表 1 6 及び 1 7) 。

【 0 2 4 5 】

【 表 2 4 】

表16. 抗BCMA CARコンストラクト構成要素のヌクレオチド配列。

名称 説明	ヌクレオチド配列	配列 番号
CTX-166b rAAV	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGG TCCGCCGACCTTTGGTCCGCCCGCCCTCAGTGAGCCGACCCAGCCGCCA GAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCTGCGGCCGCACG CGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTIATATCGA GTAAACCCTACTGCTCGCGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGT TCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGA TTTCCCAACTTAAATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAAT GCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCGAAGATGTACAGT TTGCTTTGCTGGGCTTTTCCCATGCCTGCCITTTACTCTGCCAGAG TTATATTGCTCGGCTTTTCAAGAAGATCCTATIAAATAAAAAGAATAA GCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAG GCCAGGCCTGGCCGTCAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGCCCA AGATTGATAGCTTGTGCCGTGTCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCA GCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGAC TTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGA CTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGAAATCAGATCATGTCTAATAC CCTGATCCTCTTGTCCCACAGATAATCCAGAACCCTGACCCCTGCCGTG TACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATT CACCGATTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTTCTG ATGTGTATATCACAGACAAAATGTGCTAGACATGAGGTCTATGGAC TTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAG TCCCCGAGAACTTGGCGGCAGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCCTAG	55

【 0 2 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

名称 説明	ヌクレオチド配列	配列 番号
	AGAAGAAGAAGGACGATGTGAACCTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCG CAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAA CTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCG CGGACACACCCGGAAATCGGGCGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCC AAGAAGGACTCTACAATGAACCTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCC TACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCA CGATCGCCTCTACCAAGGCTTGACTACGCCAACCAAAGATACCTACC ATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCCTCCAGATAATAATAAAATCGC TATCCATCGAAGATGGATGTGTGTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAAC AAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCCTTCAACAACAGCATATATCC AGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCT TCGCAGGCTGTTTTCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCAGAG CTCTGGTCAATGATGTCTAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCT TATCCATTGCCACCAAACCCCTCTTTTACTAAGAAAACAGTGAGCCT TGTTCAGAGAAAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAG AAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCAGCCTCAGTCTCTCCAACTG AGTTCCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCT CTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTAT TTCICCTGTCTGCCAAAAATCTTCCCAGCTCACTAAGTCACTCT CACGCAGTCACTCATTAAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACAT GAATGCACCAGCTCTTGAAGTCCAGGAATTA AAAAGT CAGATGAGGG GTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCA CGTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCA GGTTCAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAAGGCTC TCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGA GAGGACCCTATAGAGCCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAAGGTAAC CACGTGGGACCCGAGGCTGCACCGTGGTCTCCCTAGGAACCCCTAG TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG GCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCGGGGCGGC CTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG	10
5' ITR	CCTGCAGCCAGCTGCCCCCTCCCTCCCTCACTGAGCCGCCCCGGCG TCGGGCGACCTTTGCTCGCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA GAGAGGGAGTGGCCAACCCATCACTAGGGGTTCCCT	38
3' ITR	AGGAACCCCTAGTGTGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCC TCGCTCACTGAGGCCGGGGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGCTT TGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCSCAGCTGCCTGCAGG	39
LHAから RHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCGAGTA AACGGTAGTGCIGGGGCTTAGACGCAGGTCCTCTGATTTATAGTTCA AAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGIGATAGATTT CCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCC CAGCCTAAGTTGGCCAGACCACTCCAGATCCAAGATGTACAGTTG CTTTGTGGGCTTTTTCCCATGGCTGCCTTACTCTGCCAGAGTTA TATTGCTGGGGTTTTCAAGAAGATCCATTAATAAAAAGAATAAGCA GTATTATTAAGTAGCCCTGCATTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCC AGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGCCAAAGA TTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCT GGTTCATAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGAAGT CCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTGGACTC	76

10

20

30

40

【 0 2 4 8 】

【表 2 9】

名称 説明	ヌクレオチド配列	配列 番号
	CGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCGATG TGTATATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATGAGGTCATGGACTTC A	
<i>TRAC- RHA</i> (800bp)	TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCTTCMAACAACAG CATTATTCAGAAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCT TTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTTC TCCCCAGACCTCTCGTCAATGATGTCTAAAACCTCTCTGATTGCTGC TCTCGGCCTTATCCATTCCCACCAAACCTCTTTTTACTAAGAAAC AGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCA GATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCT CTCCAACCTGACTTCTGCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTCCCC CTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCC TCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTA AGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAAACCCACCAATCACTGATTGTG CCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAAGTC AGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCC CATCTGTGAGCTGGGAAAAGTCCAATAACTTCAGATGGGAATGTGT TTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGG CAAGGGCTCTCTGAACAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAA GGCCAGGGAGAGGACCCCTATAGAGCCCTGGGACAGGAGCTCAATGAG AAAGG	41
		10
		20
		30
		40
		50

【 0 2 5 1】

【表 3 0】

名称 説明	ヌクレオチド配列	配列 番号
抗 BCMA CAR (CTX- 166b)	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCT CCACGCAGCAAGGCCGAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGC TCAACAACCCCGGAGCCTCCGTCAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCCGGC AACACCCTGACCAACTACCTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGG CCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGACCTGA CCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCAGGGAT AACAGCCCTCCACCCCTATATGCAGCTCACCAGCCTGAGGACCGA GGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCT TTGACCCCTGGGGCCAGGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGGCGG GGAGGCAGCGGGCGGGCAGCCGGGAGGGCGAAGCGAAATCGT GATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGG CCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGC AACACCCACCTGCAGTGGTACCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCCAG GCTCCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTCTCCGAGGTGCCTCCCA GGTITTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGC AGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAG CCACATCCCTTACACCTTCGGCGGGCCACCAAGCTGGAGATCAAAA GTGCTGTCCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAAGCCAAACCGACCAG ACTCCCGCCCCCGGCCCTCCGACACCCCGCTCCCAACATCGCCTCTCA ACCTCTTAGTCTTCGCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCGGGGGTG CTGTTTCATACCAGGGCCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGC GCTCCSTTGGCGGGTACGTGCGCGCTCCTTTTGTGTCACTCGTTAT TACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAAAC TCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACT CAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGGAAGG AGGATGTGAAGTGGAGTGAAGTTTTCGCAAGCGCAGACGCTCCGG CATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAAGTGAATTTGGGA CGCCCGGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCC GGAAATGGGGGTAAACCCGAAAGAAAGAAATCCCAAGAAGGACTCT ACAATGAAGTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATA GGTATCAAGCGCCGAACGACGACCGGCAAAAAGGTCACCATGGCCTCTA CCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGCACTGCATA TCCACGCCCTGCCTCCACA	56
抗 BCMA scFv (CTX-166 & CTX- 166b)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGC CTCCGTGAAGGTGACCTGCAAGGCCAGCCCAACACUCTCACCACCT ACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGCCAAAGGCTGGAGTGG ATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAA GTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCG CCTATATGGAGCTGACGACCTCAGGAGCGGAGACACCGCTGTGTAC TACTCTACAAGCTGGACTGGGACCGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCA GGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGGCGGGAGGCAGCGGGCGGCG CCGGCAGCGGGGAGGGCGAACCAGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCC GCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAG GGCTAGCCAAACCTGGTGCACAGCAACGCCAACACCCACCTGCACT GGTACCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGC GTCAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCACCCG AAGCGGCACCGACTTTACCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGAGG	57

10

20

30

40

【 0 2 5 2】

【表 3 1】

名称 説明	ヌクレオチド配列	配列 番号
	ACTTCGCCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTACACC TTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAA	
4-1BB ヌクレオチド 配列	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATAATCAAACAACCATTAT GAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGAT TTCCAGAACAACAACAACCAGCATCTGAACCTG	58
4-1BB アミノ酸 配列	KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	59
CD3 ζ	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGG ACAGAATCAGCTGTATAACGAACGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGT ATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGT AAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAAGAAAGGACTCTACAAATGAACCTCA CAAGGATAACATGCCCGACGCCCTACTCAGAAATAGCTATGAACCGCC AACCACGACCGCGAAACCTCAGCATGCCCTCTACCAAGCGTTGAGT ACGGCAACCAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCC TCCCAGA	31
EF-1 α プロモーター	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCC CGACAAGTTGGGGGAGCGGTCCGCCAATTC AACCGGTGCCTAGAGAA GGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGC CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCCG CGTGAACCTCTTTTTTCGCAACCGGTTTGGCCCGCAGAACACAGCTAA GTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCCTCTTTACGGGTTATGGC CCTTGCCTGCCTTGAATTAAGTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTT GATCCCGAGCTTCGGGTGGGAAGTGGGTGGGAGAGTTGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCTTCGCCCTCGTGTGAGTTGAGGCCTGGCCTG GGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGT CTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAAAATTTTIGATGACC TGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCC AACATCTGCACACTGCTATTTCCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGAC GGGGCCCGTGGCTCCAGCGCACATGTTGGGCGAGGCGGGGCGCTGCG AGCGCGGCCACCGAGAAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC CTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGG CGGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATG CCCCGCTTCCCCGCCCTGCTGCACGCACCTCAAAATCCAGCACCGCGC GCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACCCACACAAAGGAAAAGGGCC TTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCT CTTTAGGTTGGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACT GAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATT CTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTGGATCTTGGTTTCATTCTCA	42

10

20

30

40

【 0 2 5 3 】

50

【表 3 2】

名称 説明	ヌクレオチド配列	配列 番号
	AGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCG TGA	
3'ポリA	AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTG TG	60

10

【 0 2 5 4 】

20

【表 3 3】

表 17. 抗 BCMA CAR コンストラクト構成要素のアミノ酸配列。

名称 説明	アミノ酸配列	配列 番号
CAR (CTX-166b)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAELKKPGASVKVSC KASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQ GRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRWDWDGFFDPW GQGTTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGER ASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFS EVPARFSGSGTDFTLTISSESEDFAVYYCSQTSHIPYTFG GGTKLEIKSAAAFVFPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCNHRNRKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNLNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	61
scFv (CTX-166 (BCMA-11, & CTX-166b)	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQ RLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSL RSEDVAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVTSSGGGGSGGGGSG GGGSEIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLH WYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGTDFTLTISSE VESEDFAVYYCSQTSHIPYTFGGGTKLEIK	62
V _H (CTX-166)	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGNTLTNYVIHWVRQAPGQ RLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSL RSEDVAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVTSS	63
V _L (CTX-166)	EIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQ RPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGTDFTLTISSE DFAVYYCSQTSHIPYTFGGGTKLEIK	64
V _L CDR1 (Kabat)	RASQSLVHSNGNTHLH	65

30

40

50

【 0 2 5 5 】

【 表 3 4 】

名称 説明		アミノ酸配列	配列 番号
V _L CDR2	又は Chothia)	SVSNR	66
V _L CDR3		SQTSHIPYT	67
V _H CDR1		NYVIH	68
V _H CDR2	(Kabat)	YILPYNDLTKYSQKFQG	69
V _H CDR3		WDWDGFFDP	70
V _H CDR1		GNTLTNY	71
V _H CDR2	(Chothia)	LPYNDL	72
V _H CDR3		WDWDGFFDP	73
リンカー		GGGSGGGSGGGGS	74
CD8 シグナル ペプチド		MALPVTALLLPLALLLHAARP	75
CD8a 膜貫通 ドメイン		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY	34
4-1BB		KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	59
CD3ζ		RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	35

10

20

【 0 2 5 6 】

CTX120原薬の生成には、濃縮されたT細胞の解凍と、それに続く活性化及びエレクトロポレーション/形質導入が含まれ、その時点で細胞が増殖した。増殖後、TCR⁺細胞は枯渇した。細胞を一晩培養し、採取し、原薬試験のためにサンプリングした。図8Aを参照されたい。CTX120製造のいずれ工程でも再処理は実施されなかった。

30

【 0 2 5 7 】

T細胞の濃縮

T細胞は、自動化細胞処理システムを使用して、抗CD8及び抗CD4抗体でコーティングされた磁気ビーズの混合物を使用した磁気分離により、白血病アフェレーシス材料(ロイコパック)から濃縮した。濃縮前にロイコパックを細胞数及び生存率(80%)についてサンプリングした。濃縮した細胞を、HSAを含むPBS/EDTAバッファーで単離し、次いで、細胞数、生存率(80%)、T細胞純度(70%CD3)及び無菌性についてサンプリングした。次いで、細胞を4±1で遠心分離し、CryosTORCS5に50×10⁶生細胞/mLの目標濃度で再懸濁させた。

40

【 0 2 5 8 】

T細胞の凍結保存

細胞数、生存率(80%)について細胞をサンプリングし、次いで2,500×10⁶細胞/バッグ(細胞懸濁液30~70mL)の標的細胞数でエチレン酢酸ビニルクライオバッグに分注した。1~2バッグのT細胞を生成するには1つのロイコパックで十分であった。各バッグをヒートシールし、ラベルを付け、制御速度の冷凍庫に移すまで2~8で保管し、その後、保管のために気相液体窒素に移した。

【 0 2 5 9 】

50

*in situ*での2つのリボ核タンパク質複合体(RNP)の形成は、上記の実施例7の記載に従って実施した。上記の表13に示されている結果も参照されたい。

【0266】

相同組換え修復(HDR)は、DNA二本鎖切断のための忠実度の高い細胞修復メカニズムである。HDRは、CAR遺伝子の両端にある相同配列を使用して、AAV鑄型から目的のTRAC遺伝子座にCAR遺伝子を導入するために使用される。

【0267】

TRAC遺伝子座での抗BCMA CARを評価するために、ddPCRアッセイが開発された。TRAC部位固有のPCRプライマーセットは、統合された抗BCMA CAR配列を増幅し、CAR遺伝子が挿入された細胞の割合を決定するように設計した。3つのロットのCTX120をddPCRによって評価し、%HDRを表18に示す。これらの結果は、TRAC遺伝子座に抗BCMACARが挿入されていることを確認する。

【0268】

【表35】

表18. CTX120の開発ロットにおけるHDRパーセント

ロット番号	% HDR
CTX120-L-3	46.2%
CTX120-L-4	43.2%
P22T090	34.6%

【0269】

細胞増殖

細胞を、補充されたX-VIVO(商標)15培地で希釈し、細胞生存率(70%)及び細胞数についてサンプリングし、 $0.2 \sim 0.5 \times 10^6$ 生細胞/cm²の密度まで2つの静置培養容器及び1つの更なる静置培養容器(細胞監視のためのサテライト培養)に播種した。静置培養容器を 37 ± 1 及び 5 ± 1 %CO₂でインキュベートした。細胞培養物を最大9日間インキュベートした。この間、培養物は3~4日ごとに1mLの培養液用量当たり100IUのrhIL2及びrhIL7で補充した。サテライト静置細胞培養容器は、増殖全体の細胞数、生存率及びT細胞純度について試験した。サテライト培養容器内の細胞密度が 30×10^6 /cm²に達したとき、TCRの枯渴を実施した。サテライト培養容器の細胞密度が 30×10^6 /cm²に達しなかった場合、9日目にメイン培養でTCRの枯渴を実施した。

【0270】

TCRの枯渴

各静置細胞培養容器の培地は、静置培養容器のディップチューブに接続されたポンプを使用して、約500mLの最終容量まで減少させた。培地の大部分を除去した後、静置培養容器を穏やかに回転させて、細胞を培地に再懸濁させた。

【0271】

細胞を、静置培養容器に接続するディップチューブを備えた500mLの遠心分離チューブに移した。生存率(70%)、細胞数及び%CAR⁺細胞について細胞をサンプリングした。次いで、細胞を $540 \times g$ 、 20 ± 1 で15分間、遠心分離した。細胞ペレットを再懸濁させ、0.5%HSAを含む650mL未満のPBS/EDTAにプールした。細胞懸濁液を、自動化細胞処理システムに接続されている滅菌バッグに移した。自動化細胞処理システムは、ビオチン結合抗TCR抗体と共に細胞をインキュベートした。自動化細胞処理システムを使用してTCR⁺細胞を枯渴させるために、細胞を洗浄し、抗ビオチン磁気ビーズと共にインキュベートした。細胞数、生存率(70%)及び

%CAR⁺細胞について細胞を試験した。

【0272】

細胞の回復

枯渇した細胞を補充されたX-VIVO(商標)15培地に再懸濁させ、3Lバッグ(複数可)に移し、静置細胞培養容器(複数可)に播種し、37±1及び5±1%CO₂で一晩インキュベートした。

【0273】

細胞採取(原薬)

細胞を採取するために、静置培養容器をインキュベーターから取り外し、細胞沈降のために休ませた。ポンプを使用して、各静置培養容器から最終容量が約500mLになるまで成長培地を除去した。除去した培地を、無菌のためにサンプリングした。静置培養容器を穏やかに回転させて、細胞を培地に再懸濁させた。各静置培養容器の内容物は、ポンプを使用して3Lの移送バッグに移送され、重力によって40µm輸血フィルターを通して別個の滅菌3Lバッグに濾過された。細胞を、濃度及び生存率についてサンプリングした。

10

【0274】

本明細書に開示される製造プロセスによって生成されるCTX120の細胞表現型

CTX120製剤開発ロットを、T細胞集団について分析した。フローパネルを表19に示す。

【0275】

【表36】

20

表 19. T細胞集団の特性評価のための Flow パネル

疲弊	サブセット
CD4	CD4
CD8	CD8
CD95	CD45RO
CAR	CD45RA
CD57	CD62L
Lag3	CD27
PD1	CCR7

30

【0276】

疲弊マーカー

CD57、Lag3及びPD1は、T細胞の疲弊に関連するマーカーである。表19に定義されているマーカーを使用して、CTX120医薬品の疲弊状態を評価した。図8C及び表20で示すように、低レベルの疲弊マーカーがCAR⁺CTX120製剤細胞で見つかった。

【0277】

【表37】

40

表 20. 様々な疲弊マーカーによる CAR⁺細胞の割合

マーカー	CTX120-L-3	CTX120-L-4	P22T090
%Lag3 ⁺	8.19	5.99	2.46
%CD57 ⁺	4.86	5.31	0.62
%PD1 ⁺	2.83	4.36	2.66
%Tim3 ⁺	5.15	4.03	7.01

50

【0278】

CTX120製剤を、メモリー細胞マーカーについて評価した。CD45ROゲートでは、CD62L、CCR7及びCD27がセントラルメモリーに関連するマーカーであった。CD45RAゲートでは、CD62Lが幹細胞メモリーのためのマーカーであった。CD62L及びCCR7⁺である細胞は、セントラルメモリー及び幹細胞メモリーのためのマーカーであった。CD8⁺T細胞に関する結果を図8D及び表21に示す。CD4⁺T細胞に関する結果を図8E及び表22に示す。

【0279】

【表38】

表 21. CD8⁺T細胞におけるセントラルメモリー及び幹細胞メモリーマーカー

マーカー	T細胞集団	CTX120-L-3	CTX120-L-4	P22T090
CD45RA/CD62L	幹細胞メモリー	36.97	37.63	66.13
CD45RO/CD27	セントラルメモリー	48.93	50.77	59.90
CD45RO/CD62L	セントラルメモリー	28.63	44.63	83.03
CD45RO/CCR7	セントラルメモリー	9.28	15.20	41.47
CD62L/CCR7	幹細胞メモリー/セントラルメモリー	36.40	39.93	57.03

10

20

【0280】

【表39】

表 22. CD4⁺T細胞におけるセントラルメモリー及び幹細胞メモリーマーカー

マーカー	T細胞集団	CTX120-L-3	CTX120-L-4	P22T090
CD45RA/CD62L	幹細胞メモリー	50.13	41.00	54.10
CD45RO/CD27	セントラルメモリー	24.30	26.13	45.33
CD45RO/CD62L	セントラルメモリー	34.63	55.03	71.87
CD45RO/CCR7	セントラルメモリー	15.03	17.90	52.53
CD62L/CCR7	幹細胞メモリー/セントラルメモリー	51.17	39.60	58.73

30

【0281】

CTX120の生物活性

BCMA抗原で刺激したときのCAR T細胞製剤の生物活性を測定する2つのアッセイが開発された。まず、T細胞活性化時のIFN γ 分泌を測定した。要約すると、CAR T細胞を組換えヒトBCMAとインキュベートした。CAR T細胞が活性化されると、分泌されたIFN γ のレベルがMeso-Scale Delivery (MSD)によって測定された。結果を図8Fに示す。

40

【0282】

次に、BCMA陽性MM.1S標的細胞を殺すCTX120 CAR-T細胞の能力は、フローサイトメトリーに基づく細胞傷害性アッセイを使用して評価した。要約すると、標的細胞をeFluor670で標識し、CTX120細胞と様々な比率でインキュベートした。CTX120の細胞傷害性は、対照サンプルと比較してライブゲート内の標識細胞を評価することにより、4時間で分析した。結果を図8Gに示す。CTX120の3つの開発ロットはすべて、用量依存的な標的細胞の細胞傷害性を示した。

【0283】

まとめると、これらの結果は、抗BCMA CAR発現T細胞の生成を示した。本明細書に記載されるように生成された抗BCMA CAR発現T細胞は、TCR及び2Mの

50

低い発現レベルを示し、それにより、宿主拒絶の可能性を低減した。更に、抗BCMA CAR発現T細胞は、T細胞の活性化時にBCMA陽性細胞の標的細胞死滅を示した。

【0284】

実施例9：規模拡大のT細胞増殖のための最適化条件の特定

本実施例では、優れたT細胞増殖及び収量の増加のための最適なプレティング又は再プレティング条件の特定を報告する。本実施例において、T細胞は、編集後の同じ日に500K/cm²よりも低い密度でプレティングするか、又は500K/cm²の密度で播種し、編集後の異なる日に再プレティングした。細胞増殖を時間の経過に沿って監視した。

【0285】

要約すると、健康なドナーロイコパックからの凍結保存されたT細胞を解凍し、48時間活性化した。次いで、Cas9(150µg/mL)及びTCRを標的化するsgRNA(TA-1;配列番号2/Cas9;配列番号1)(80µg/mL)並びにCas9(150µg/mL)及び2Mを標的化するsgRNA(B2M-1;配列番号6/Cas9;配列番号1)(200µg/mL)を含むRNP複合体の存在下で、細胞をエレクトロポレーションした。エレクトロポレーション後、細胞を20,000のMOIのrAAVで形質導入し、次いで静置培養容器で増殖させた。詳細については上記の実施例1~4を参照されたい。

【0286】

編集後、細胞を、増殖のために静置培養容器に166K/cm²、125K/cm²又は83K/cm²で播種した。編集後に細胞の別のセットを500K/cm²で播種し、編集後3、4、5、6又は7日目に1:4の比率(1つの容器を4つの新しい容器に分割)で再プレティングして、更に増殖させた。再プレティングせずに500K/cm²で再プレティングした細胞を、CTX110基準グループとして使用した。細胞密度が3~4x10⁶/mLに達するまで全ての群が増殖し、その時点で細胞を採取した(表23)。細胞数及び生存率は1~3日ごとに評価した。

【0287】

【表40】

表 23

群	採取ポイント	期待される収量	採取日
1 CTX110 500K 基準	3x10 ⁶ /mL	1x	7日目
	4x10 ⁶ /mL		
2 CTX110 166K	4x10 ⁶ /mL	3X	10日目(+3日)
3 CTX110 125K	4x10 ⁶ /mL	4X	11日目(+3日)
4 CTX110 83K	4x10 ⁶ /mL	6X	14日目(+7日)
5 CTX110 D3 再プレティング 1:4 分割	4x10 ⁶ /mL	4X	10日目(+3日)
6 CTX110 D4 再プレティング 1:4 分割	4x10 ⁶ /mL		10日目(+3日)
7 CTX110 D5 再プレティング 1:4 分割	3x10 ⁶ /mL		10日目(+3日)
	4x10 ⁶ /mL		
8 CTX110 D6 再プレティング 1:4 分割	3x10 ⁶ /mL		18日目(+11日)
	4x10 ⁶ /mL		14日目(+7日)
9 CTX110 D7 再プレティング 1:4 分割	3x10 ⁶ /mL		17日目(+10日)
	4x10 ⁶ /mL		18日目(+11日)

【0288】

対照 C T X 1 1 0 基準（再プレーティングされなかった）は、7日間で $3 \sim 4 \times 10^6$ / mL の濃度に達した（図 9 A ~ 9 B）。3、4 及び 5 日目に再プレーティングされた細胞（「D 3、D 4、D 5」）は、10日間で約 $3 \sim 4 \times 10^6$ / mL の細胞濃度に達した（図 9 A ~ 9 B）。6日目（「D 6」）及び7日目（「D 7」）に再プレーティングされた細胞は、約 14 ~ 18日間で $3 \sim 4 \times 10^6$ / mL の細胞濃度に達した（図 9 A ~ 9 B）。D 3、D 4 及び D 5 は、D 6 及び D 7 よりも約 4 ~ 8日早く $3.0 \sim 4.0 \times 10^6$ / mL の細胞濃度の目標に達した。166 K / cm²、125 K / cm² 又は 83 K / cm² でプレーティングされた細胞は、採取ポイントに達するまでに 10、11 及び 14日かかった。これは、基準グループより 3、4 及び 7日長かった。

【0289】

10

図 10 A 及び 10 B は、7日目に C T X 1 1 0 基準から合計 $4 \sim 4.5 \times 10^8$ の細胞が採取され、3、4、5、6 及び 7日目の再プレーティンググループから採取された総細胞数が $1.3 \times 10^9 \sim 2 \times 10^9$ であることを示し、これは、C T X 1 1 0 対照基準よりも 3 ~ 5倍多い細胞であった。

【0290】

合計 1.2×10^9 、 1.64×10^9 及び 2.32×10^9 の細胞は、166 K / cm²、125 K / cm² 又は 83 K / cm² のプレーティング群から採取され、これらの群は、C T X 1 1 0 対照基準と比較して 3 ~ 6倍多い細胞であった。

【0291】

すべての再プレーティング群及び低密度プレーティング群の細胞生存率は、C T X 1 1 0 基準と同様であった（図 11 A 及び 11 B）。

20

【0292】

D 3、D 4 及び D 5 の再プレーティング、166 K / cm² プレーティング及び 125 K / cm² プレーティングにより、最低日数で期待される細胞数が得られることがわかった。

【0293】

C A R⁺ %、T R A C⁻ % 及び B 2 M⁻ % を含む編集効率は、全て再プレーティング群と低プレーティング群から評価された。（図 12 A ~ 12 C）C T X 1 1 0 基準の C A R⁺ % は 55.9% であった。D 3、D 4 及び D 5 の再プレーティング群は、C A R⁺ % を 57.9%、56% 及び 52.62% に維持したが、D 6 及び D 7 は、C A R⁺ % を 38.65% 及び 35.45% に減少させた。166 K / cm²、125 K / cm² 又は 83 K / cm² からの C A R⁺ % は、C T X 1 1 0 基準からの有意な変化なしに、59.3%、54.9% 及び 52.9% であった。C T X 1 1 0 基準群の T R A C⁻ % は 94.24% であった。D 3、D 4 及び D 5 の再プレーティング群並びに 166 K / cm² のプレーティング群は、93.5%、93.6%、93.15% 及び 93.9% と同等の T R A C⁻ % を維持した。T R A C⁻ % のわずかな減少は、125 K / cm² と 83 K / cm² で 91.5% と 91.2% として観察された。T R A C⁻ % の大幅な減少は、D 6 及び D 7 の再プレーティング群で 88% 及び 87.2% として見られた。同様の傾向は、B 2 M⁻ % でも示された。C T X 1 1 0 基準群の B 2 M⁻ % は 77.93% であった。D 3、D 4 及び D 5 の再プレーティング群並びに 166 K / cm² のプレーティング群は、75.51%、75.39%、76.77% 及び 76.31% と同等の T R A C⁻ % を維持した。B 2 M⁻ % のわずかな減少は、125 K / cm² と 83 K / cm² で 71.74% と 69.19% として観察された。B 2 M⁻ % の大幅な減少は、D 6 及び D 7 の再プレーティング群で 60.37% 及び 58.29% として見られた。

30

40

【0294】

D 3、D 4 及び D 5 の再プレーティング、166 K / cm² のプレーティング及び 125 K / cm² のプレーティングが、C T X 1 1 0 基準と最も同等の編集効率を提供すると決定した。

【0295】

再プレーティングされた集団の細胞表現型は、C D 9 5、C D 4 5 R O、C D 5 7、C

50

D 2 7 及び C C R 7 を除き、T i m 3 を含む実施例 8 及び表 1 9 に記載されているように、フローパネルを使用して決定された。図 1 3 A 及び 1 3 B は、再プレATINGされた集団における C D 4 + 及び C D 8 + 細胞の比率並びに C T X 1 1 0 基準を示す。C D 4 及び C D 8 の比率は、D 3、D 4 及び D 5 の再プレATING群並びに 1 6 6 k 及び 1 2 5 k の低密度プレATING群で十分に維持されていた。C D 8 + 細胞の増加は、D 6 及び D 7 再プレATING群及び 8 3 K 低密度プレATING群で見られた。

【 0 2 9 6 】

再プレATING集団は、メモリー細胞マーカーについて評価した。C A R +、C D 4 + C A R + 及び C D 8 + C A R + 集団内で、C D 4 5 R A + C D 6 2 L + 細胞、C D 4 5 R A - C D 6 2 L + 細胞、C D 4 5 R A - C D 6 2 L - 細胞及び C D 4 5 R A + C D 6 2 L - 細胞は、それぞれ、ナイーブT細胞、セントラルメモリー (C M) T 細胞、エフェクターメモリー (E M) T 細胞及びターミナルエフェクター (T E) T 細胞として定義された。C T X 1 1 0 製品内のこれらの集団は、サブセットとして定義された。図 1 4 A ~ 1 4 F は、再プレATING集団及び低密度プレATING群に見られるサブセットの組成を示している。C A R +、C D 4 + C A R + 及び C D 8 + C A R + の集団内では、再プレATING及び低密度プレATING群のほとんどが、ナイーブT細胞の減少を示した。セントラルメモリーT細胞の減少は、D 6 及び D 7 の再プレATING群で検出されたが、D 3、D 4 及び D 5 の再プレATING群では有意ではなかった。ほとんどの群は、エフェクターメモリーT細胞の増加を示した。ターミナル分化細胞の増加は、C A R + 及び C D 8 + C A R + 細胞で見られたが、C D 4 + C A R + 細胞のほとんどでは見られなかった。

【 0 2 9 7 】

図 1 5 A ~ 1 5 F で示すように、低レベルの疲弊マーカーが C A R +、C D 4 + / C A R + 及び C D 8 + / C A R + 再プレATING集団で見つかった。C T X 1 1 0 基準と比較して、実験の 1 つにおいて、D 6 及び D 7 の再プレATING細胞で L A G 3 発現が増加した (図 1 5 A 及び 1 5 C)。全体として、3 つ全ての疲弊マーカー (P D 1、L A G 3 及び T I M 3) の発現は増加しなかった。全ての群で P D 1 の発現はなかったか又は非常に低かった。

【 0 2 9 8 】

In vitro での細胞殺傷アッセイ

次に、C D 1 9 陽性 R a j i 標的細胞を殺す、再プレATING及び低プレATING密度群の C A R - T 細胞の能力は、フローサイトメトリーに基づく細胞傷害性アッセイを使用して評価された。要約すると、標的細胞を e F l u o r 6 7 0 で標識し、C A R - T 細胞と様々な比率でインキュベートした。C T X 1 1 0 の細胞傷害性は、対照サンプルと比較してライブゲート内の標識細胞を評価することにより、24 時間で分析した。結果を、図 1 6 A ~ 1 6 C で示す。C T X 1 1 0 の全ての再プレATING及び低密度プレATING群は、C T X 1 1 0 基準と同等のレベルで用量依存的な標的細胞の細胞傷害性を示した。

【 0 2 9 9 】

要するに、これらの *in vitro* の結果は、D 3、D 4 及び D 5 の再プレATING群並びに 1 6 6 K / c m ² 及び 1 2 5 K / c m ² の播種密度が、C T X 1 1 0 基準として十分な増殖、編集効率及び細胞傷害性を提供したことを示している。

【 0 3 0 0 】

in vivo での研究

次に、再プレATING及び低密度プレATING群の C A R - T 細胞がマウスの腫瘍を殺す能力は、2 つの独立した研究で *in vivo* で研究した (表 2 4 及び 2 5)。N a l m 6 - F l u c - G F P 腫瘍細胞を、C A R - T 投与の 4 日前に C I E A N O G マウスに接種した。毎週の生物発光 (B L I、フォトン / 秒) 評価により、マウスの腫瘍量を評価できる。*in vivo* での研究 # 1 では、再プレATINGされた D 5、D 6 及び D 7 並びに C T X 1 1 0 基準が、1 マウス当たり 2 e 6、4 e 6 及び 1 0 e 6 の C A R +

細胞の用量で投与された。群ごと及び用量ごとに6匹のマウスが含まれた。未処理のマウスを陰性対照として使用した。in vivoでの研究#2では、低密度プレーティング群(166K/cm²、125K/cm²及び83K/cm²)及び再プレーティング群(D3、D4及びD6の再プレーティング)は、1マウス当たり4e6 CAR⁺細胞の用量で投与された。群ごとに4人のレシピエントが含まれていた。

【0301】

【表41】

表 24: in vivo での研究 1

	群	用量	レシピエントの番号
1	未処理	0	5
2	CTX110 基準	2x10 ⁶ CAR ⁺	6
3		4x10 ⁶ CAR ⁺	6
4		10x10 ⁶ CAR ⁺	6
5	5日目 再プレーティング 1:4 分割	2x10 ⁶ CAR ⁺	6
6		4x10 ⁶ CAR ⁺	6
7		10x10 ⁶ CAR ⁺	6
8	6日目 再プレーティング 1:4 分割	2x10 ⁶ CAR ⁺	6
9		4x10 ⁶ CAR ⁺	6
10		10x10 ⁶ CAR ⁺	6
11	7日目 再プレーティング 1:4 分割	2x10 ⁶ CAR ⁺	6
12		4x10 ⁶ CAR ⁺	6
13		10x10 ⁶ CAR ⁺	6

10

20

【0302】

【表42】

表 25: in vivo での研究 2

	群	用量	レシピエントの番号
1	未処理		3
2	110 基準	4x10 ⁶ CAR ⁺	4
3	166K/cm ² (3x)		4
4	125K/cm ² (4x)		4
5	83K/cm ² (6x)		4
6	3日目 再プレーティング 1:4 分割		4
7	4日目 再プレーティング 1:4 分割		4
8	5日目 再プレーティング 1:4 分割		4

30

40

【0303】

in vivoでの研究#1は、3回の投与全てでD5再プレーティング群とCTX110基準の間で同等の生存率を示した。(図17A~17C) 83K/cm²及び166K/cm²プレーティング群並びにD4の再プレーティング群は、他の試験群並びにCTX110基準と比較して生存率が低下していた。(図17D) 中程度の生存率を表26及び27に示す。

【0304】

50

【表 4 3】

表 26. in vivo での研究 1

	群	用量	生存期間の中央値
1	未処理	0	26
2	CTX110 基準	2x10 ⁶ CAR ⁺	34
3		4x10 ⁶ CAR ⁺	40.5
4		10x10 ⁶ CAR ⁺	66.5
5	5 日目 再プレーティング 1:4 分割	2x10 ⁶ CAR ⁺	33.5
6		4x10 ⁶ CAR ⁺	40.5
7		10x10 ⁶ CAR ⁺	79
8	6 日目 再プレーティング 1:4 分割	2x10 ⁶ CAR ⁺	28
9		4x10 ⁶ CAR ⁺	32
10		10x10 ⁶ CAR ⁺	34
11	7 日目 再プレーティング 1:4 分割	2x10 ⁶ CAR ⁺	30
12		4x10 ⁶ CAR ⁺	34
13		10x10 ⁶ CAR ⁺	43.5

10

【0305】

20

【表 4 4】

表 27. in vivo での研究 2

	群	用量	生存期間の中央値
1	未処理		25
2	110 基準		70.5
3	166K/cm ² (3x)	4x10 ⁶ CAR ⁺	68.5
4	125K/cm ² (4x)		未定義
5	83K/cm ² (6x)		51.5
6	3 日目 再プレーティング 1:4 分割		68.5
7	4 日目 再プレーティング 1:4 分割		61.5
8	5 日目 再プレーティング 1:4 分割		未定義

30

【0306】

両研究における未処理のマウスからの BLI は、25 日目及び 18 日目に高い腫瘍負荷を示す罹患率の状態に達した。研究 # 1 では、D 6 及び D 7 の再プレーティング群は、3 つの用量全てで D 5 及び CTX 110 基準と比較して BLI の早期の増加を示した (1 マウス当たり 2 e 6、4 e 6 及び 1 0 e 6 CAR⁺ 細胞; それぞれ図 18 A ~ 18 C)。D 5 及び CTX 110 基準は、同様の腫瘍増殖動態を示した。研究 # 2 では、83 K / c

40

【0307】

中程度の生存率及び BLI によると、D 6 及び D 7 の再プレーティング群ではなく、D 5 の再プレーティング群は、CTX 110 基準として in vivo での有効性を維持した。

【0308】

増殖期間、収量、編集、疲弊 / サブセットマーカー、in vitro 及び in vivo での効力を使用して、最適な播種密度及び / 又は再プレーティング条件を決定した。

50

分析のまとめを表 28 に示す。5 日目に 1 : 4 の比率で再プレATINGすると、増殖及び編集効率が向上した。

【 0 3 0 9 】

【 表 4 5 】

表 28

群	収率	増殖期間	編集	疲弊(CAR ⁺)	サブセット(CAR ⁺)	in vitro での有効性	in vitro での有効性及び持続性	
CTX110 166K	3x	+3 日	維持			維持	維持	
CTX110 125K	4x	+3 日	減少したが、仕様の範囲内				維持	
CTX110 83K	6x	+7 日	減少し、仕様をわずかに下回る				欠陥あり	
CTX110 D3 再プレATING 1:4 分割	4x	+3 日	維持				維持	
CTX110 D4 再プレATING 1:4 分割		+3 日	維持				保留中 欠陥あり	
CTX110 D5 再プレATING 1:4 分割		+3 日	維持	TIM3 の減少、TAG3 の増加、PD1 の増加	同等		維持	維持
CTX110 D6 再プレATING 1:4 分割		+7 又は 11 日	減少	Tim3 の減少、LAG3 の増加	TE の増加		維持	欠陥あり
CTX110 D7 再プレATING 1:4 分割		+10 又は 11 日	減少	Tim3 の減少	ナイーブの減少	維持	欠陥あり	

10

20

30

【 0 3 1 0 】

実施例 10 : 細胞増殖の改善

(A) C T X 1 1 0 及び C T X 1 2 0 細胞増殖アウトプットの増加のために最適化されたエレクトロポレーション

本開示に記載される方法は、エレクトロポレーションを利用して、例えば、C a s 9 及びガイドRNA複合体を含む様々なリボ核タンパク質 (R N P) 複合体を含む様々な核酸及びポリペプチドを、レシピエント T 細胞に送達する。様々な製造業者からの任意の好適なエレクトロポレーション機器が、本明細書に記載の方法での使用を見つかることができるため、エレクトロポレーションプロセスで使用される機器は、特に限定されない。エレクトロポレーションで使用される細胞播種密度は、特に限定されない。

40

【 0 3 1 1 】

本実施例では、効率的な編集を維持しながら、より多くの容量を保持できるカセット内の細胞の数を増やしてエレクトロポレーションできるエレクトロポレーション機器を使用する。より大きいエレクトロポレーション容量は、形質導入及び増殖のためにより多くの編集された細胞を提供することにより、例えば、任意の所与の操作された T 細胞、例えば、C T X 1 1 0 又は C T X 1 2 0 の操作された T 細胞製品のアウトプットを 2 倍にするのと同じくらい増加する。この容量の増加は、プロセス期間及び又は細胞の増殖を延長する必要がないため、これは、製造における利点である。

【 0 3 1 2 】

50

例えば、2つ以上の異なる培養容器などの異なるT細胞培養容器(5000 mLの培地容量で500 cm²のガス透過膜表面積)に播種するために異なる細胞を利用できる。例えば、細胞数の増加に伴い、最大4xの培養容器に播種することができ、ここで300 e 6 x 600 e 6の細胞を2xの培養容器に播種でき、600 e 6 x 800 e 6の細胞を3xの培養容器に播種できるか、又は800 e 6の細胞を4x培養容器に播種することができる。

【0313】

いくつかの態様では、培養容器1つ当たり約400,000細胞/cm²~500,000細胞/cm²が播種される。代わりに、培養容器1つ当たり約250,000細胞/cm²~500,000細胞/cm²が播種されるか、又は約300,000細胞/cm²~500,000細胞/cm²が播種されるか、又は培養容器1つ当たり約150,000細胞/cm²~250,000細胞/cm²が播種されるか、又は培養容器1つ当たり約150,000細胞/cm²~500,000細胞/cm²が播種されるか、又は培養容器1つ当たり約150,000細胞/cm²~600,000細胞/cm²が播種される。

【0314】

いくつかの態様では、標的播種密度は、少なくとも約150,000細胞/cm²、又は少なくとも約250,000細胞/cm²、又は少なくとも約300,000細胞/cm²、又は少なくとも約400,000細胞/cm²、又は少なくとも約500,000細胞/cm²である。

【0315】

いくつかの態様では、標的播種密度は、約250,000細胞/cm²である。他の態様では、標的播種密度は、約500,000細胞/cm²である。

【0316】

最大1 mLの容量を保持できるエレクトロポレーションカセットを使用できる。このシステムを使用すると、2.7 x 10⁹細胞を最大7個のG1000カセットにエレクトロポレーションできる。3 mLシリンジに取り付けられた使い捨ての鈍い先端の針を備えたカセットから細胞を回収することで、マイクロピペットの先端が三角フラスコに放出されるリスクも排除される。

【0317】

より大きい容量を有するシステムを使用すると、細胞の形質導入工程も容易になる。形質導入のための現在の最大7 e 8細胞を1.4 e 9細胞に倍増すると、増殖のために最大4つの細胞培養容器に播種するのに十分な材料が生成される。従って、固定された9日目の枯渇を維持でき、同じ処理時間で1回の実行当たりのアウトプットを実質的に2倍にすることができる。

【0318】

実施例の他の工程は、上記から変更されなかった。

【0319】

(B) 製剤の収量を増やすために3つのT細胞ドナーロットを使用した方法の最適化及び比較

このセクションでは、1x、2x、4x及び4xでのCAR T細胞の生成について記載し、4日目に分割して、増殖法の堅牢性を実証し、現在の製剤(DP)のような材料と選択した細胞培養条件との比較分析のための材料を生成する。

【0320】

このバッチの出発物質は、3人の健康なドナーアフエレーシスロットからのCD4/CD8 T細胞の選択であった。CTX110 CAR T細胞の選択された増殖条件は、G-Rex500M-CSチャンパーに播種された。

【0321】

G-Rex500M-CSでの以前のCTX110 CAR T増殖播種及び採取細胞密度は、それぞれ500,000/cm²及び30 x 10⁶/cm²であり、30 x 10

⁹ の C A R T 細胞を生成した。G - R e x 5 0 0 M - C S 培養容器内の C A R T 細胞の D P 収量を増加させるために、本実施例が開発された。以下の表 2 9 に記載されている 3 つの選択条件を選択して、3 人の異なるドナーとの C T X 1 1 0 D P のような比較可能性を評価し、複数の下流分析アッセイに十分なサンプル細胞を生成した。

【 0 3 2 2 】

【 表 4 6 】

表 29. 増殖単位操作中に CART 収量を増加させるために選択された細胞培養条件

サンプル ID	条件	播種密度 (播種する総細胞)	分割 (増殖日数)	パッセージ 1 (播種される体積)	TCRab 枯渇のための採取 (増殖日数)
S1	1X 生成プロセス	250.0x10 ⁶	-	-	7
S2	2x	125.0x10 ⁶	-	-	8
S3	4x	62.5x10 ⁶	-	-	9
S4	4x(4 日目分割あり)	250.0x10 ⁶	4	¼ 採取体積	9

10

【 0 3 2 3 】

詳細なプロトコルを以下に提供する。

a . C T X 1 1 0 D S プロセス全体のために、全ての培地、G M P I L - 2 及び G M P I L - 7 を準備した：

- 1 . T 細胞は、フル大規模 (3 x G - R e x 5 0 0 M - C S) に従って活性化した
- 2 . C A R T 細胞は、1 x G - R e x 5 0 0 M - C S 及び小規模 (1 x ウェル G R e x 6 M) で、選択した播種密度において 1 x ウェルで増殖させるために播種された。
- 3 . C A R T 細胞は、大規模の 2 分の 1、条件ごとに 1 x G - R e x 5 0 0 M - C S に従って、枯渇後に播種された。

b . フル大規模 (3 x G - R e x 5 0 0 M - C S) を実施するために、適切な数の T 細胞を解凍した。

c . フル大規模 (3 x G - R e x 5 0 0 M - C S) を実施するために、適切な数の T 細胞を活性化した。

d . 活性化剤を希釈した。

e . フル大規模 (3 x G - R e x 5 0 0 M - C S) でのエレクトロポレーション (E P) のために細胞を採取した。

f . 2 , 0 4 0 x 1 0 ⁶ ~ 2 , 1 6 0 x 1 0 ⁶ の T 細胞のエレクトロポレーション (1 7 ~ 1 8 O C 4 0 0 カセット) 。

g . 6 ウェルファルコンプレートの 2 x ウェル間で細胞を均等に移し、2 0 分間インキュベートした。

h . i n v i t r o での有効性 + E P - A A V 対照について、E P T 細胞を希釈し、5 . 0 x 1 0 ⁶ の総細胞を小規模 (1 x ウェル G - R e x 6 M) で播種した。

i . 1 , 0 0 0 x 1 0 ⁶ 個の T 細胞を形質導入した。

j . 増殖のために適切な培養容器に適切な数の T 細胞を播種した：

1 . S 1 : G - R e x 5 0 0 M - C S に播種された合計 2 5 0 x 1 0 ⁶ 個の細胞、小規模 (1 x ウェル G - R e x 6 M) で合計 5 . 0 x 1 0 ⁶ 個の細胞。

2 . S 2 : G - R e x 5 0 0 M - C S に播種された合計 1 2 5 x 1 0 ⁶ 個の細胞、小規模 (1 x ウェル G - R e x 6 M) で合計 2 . 5 x 1 0 ⁶ 個の細胞。

3 . S 3 : G - R e x 5 0 0 M - C S に播種された合計 6 2 . 5 x 1 0 ⁶ 個の細胞、小規模 (1 x ウェル G - R e x 6 M) で合計 1 . 2 5 x 1 0 ⁶ 個の細胞。

4 . S 4 : G - R e x 5 0 0 M - C S に播種された合計 2 5 0 x 1 0 ⁶ 個の細胞、小規模 (1 x ウェル G - R e x 6 M) で合計 5 . 0 x 1 0 ⁶ 個の細胞

k . 各条件の詳細に従って C A R T 増殖を実施した：

20

30

40

50

1. S1: G-Resx500M-CS及びG-Resx6Mに、100IU/mLのIL-2及び100IU/mLのIL-7を3日に1回よく補充した。TCRab Flowパネル用のG-Resx6Mからサンプルを取り出し、増殖の7日目にTCRabの枯渇に進んだ。

2. S2: G-Resx500M-CS及びG-Resx6Mに、100IU/mLのIL-2及び100IU/mLのIL-7を3日に1回よく補充した。TCRab Flowパネル用のG-Resx6Mからサンプルを取り出し、増殖の8日目にTCRabの枯渇に進んだ。

3. S3: G-Resx500M-CS及びG-Resx6Mに、100IU/mLのIL-2及び100IU/mLのIL-7を3日に1回よく補充した。TCRab Flowパネル用のG-Resx6Mからサンプルを取り出し、増殖の9日目にTCRabの枯渇に進んだ。

4. S4:

a. 増殖の4日目

a. 上清を除去し、GathResxポンプを使用してG-Resx500M-CSから細胞を採取し、細胞の量を記録した。

b. 重力により、新しいG-Resx500M-CSに5000mLの培養培地を充填し、充填した培養容器に採取した細胞量の4分の1を播種した。培養容器をインキュベーターに戻した。

c. 血清学的ピペットで、G-Resx6Mの新しい単一ウェルに75mLの培地を充填した。血清学的ピペットで、G-Resx6Mウェルで細胞をホモジナイズし、充填した培養容器に25mLの細胞を移した。培養容器をインキュベーターに戻した。

b. G-Resx500M-CS及びG-Resx6Mに、100IU/mLのIL-2及び100IU/mLのIL-7を3日に1回よく補充した。TCRab Flowパネル用のG-Resx6Mからサンプルを取り出し、形質導入後の増殖9日目にTCRabの枯渇に進んだ。

l. 大規模の2分の1(1x G-Resx500M-CS)でTCRabの枯渇を実施した。適切なフロー分析のために、枯渇前のサンプルを取得した。

m. 適切なフロー分析のために枯渇後のサンプルを取得し、枯渇後の標的T細胞を播種して、大規模の2分の1(1x G-Resx500M-CS)を実施した。

n. 大規模の2分の1(1x G-Resx500M-CS)で採取を実施した。採取した細胞数及び得られた枯渇後の%CAR+に基づく:

1. 計算されたDP製剤の生細胞濃度:

【0324】

【数1】

$$\frac{\text{スピン採取前 総生細胞数}}{1} * \frac{\%CAR+}{25 \times 10^6 \text{ CAR+細胞/mL}} = \text{DP形成濃度 [総生細胞]}$$

【0325】

2. 採取した総生細胞数をDP製剤濃度で割って、目標の細胞濃度に到達するために必要な量を計算した。

【0326】

【数2】

10

20

30

40

50

$$\frac{\text{スピン採取前総生細胞数}}{1} * \frac{mL}{\text{DP形成総生細胞}} = \text{標的体積CS5}$$

【0327】

3. 細胞を0.5倍の目標の容量まで再懸濁した。
4. 再懸濁した細胞ペレットで2回目の細胞カウントを実施した。
5. 目標の生細胞濃度に到達するために細胞を再懸濁するために計算された残りの容量。 10
6. 採取細胞数の計算に基づいて、目標細胞濃度まで希釈した。
- o. 追加のフロー特性評価及び比較可能性分析のために、適切な数の細胞を凍結保存した。

【0328】

(C) 細胞傷害性アッセイによって評価された細胞増殖最適化の *in vitro* での有効性

本実施例は、上記の実施例(B)で調製した細胞の *in vitro* での有効性細胞傷害性アッセイを記載している。このアッセイでは、共培養アッセイにおける生細胞の絶対量を測定した。

【0329】

Raji 標的癌細胞 (CD19⁺) を eFluor 670 (APCチャネル) 増殖色素で標識し、1ウェル当たり50K細胞でプレATINGした。試験した各条件に対して、様々な比率の非標識エフェクターCAR T細胞を添加した。エフェクターCAR T細胞による標的細胞の細胞死滅は、DAPI生/死染色 (Pacific Blueチャネル) による24時間の培養後に測定された。サンプル間を正規化するために、フロー分析中にビーズのカウントを追加した。試験サンプル中の生細胞数 (DAPI陰性) を数え、標的細胞のみを含むウェル内の生細胞数に正規化して、細胞溶解のパーセンテージを計算した。CAR-Tによる培養培地へのサイトカイン放出は、多重ELISAアッセイ (Luminex) で分析した。

【0330】

これらの実験では、1x対2x及び4xのCTX110製造条件を評価した。3人の異なるドナーからのT細胞を並行して分析した。*In vitro* での有効性は、24時間の細胞傷害性アッセイ及びサイトカイン産生の2つの測定基準によって確認した。

【0331】

【表 4 7】

表 30

サンプル ID	試料説明	播種密度 (k 細胞/cm ²)	分割日 (該当する 場合)	%CAR ⁺ (新鮮)	%CAR ⁺ (解凍後)
DP20-07-S1	ドナー #1 - Std. (1x)	500	N/A	64.16	66.6
DP20-07-S2	ドナー #1 - 2x	250	N/A	63.13	58.5
DP20-07-S3	ドナー #1 - 4x	125	N/A	54.28	67.6
DP20-07-S4	ドナー #1 - HY D4 分割	500	4 日目	62.70	
DP20-08-S1	ドナー #2 - Std.(1x)	500	N/A	34.65	36.6
DP20-08-S2	ドナー #2 - 2x	250	N/A	34.07	35.8
DP20-08-S3	ドナー #2 - 4x	125	N/A	33.99	34.0
DP20-09-S1	ドナー #3 - Std.(1x)	500	N/A	68.66	64.7
DP20-09-S2	ドナー #3 - 2x	250	N/A	66.70	68.9
DP20-09-S3	ドナー #3 - 4x	125	N/A	65.34	63.9

10

20

【 0 3 3 2 】

図 2 0 は、C A R⁺ T 細胞溶解を測定することによるアッセイ対照 F A C S 分析を示す。C A R⁺ T 細胞は、C T X 1 1 0 C A R⁺ T 細胞であった。T 細胞の 8 1 % は、C A R⁺ であった。

【 0 3 3 3 】

図 2 1 A ~ 2 1 C は、i n v i t r o での細胞溶解及びサイトカイン産生を測定するアッセイ対照実験の結果を示す。本アッセイでは、凍結ストックから解凍した C T X 1 1 0 C A R⁺ T 細胞を使用した。T 細胞は H D R 後 6 日目で 8 0 % C A R⁺ であった。

【 0 3 3 4 】

図 2 2 A ~ 2 2 C は、3 人のドナーの各々に由来する T 細胞が、1 倍、2 倍及び 4 倍の培養条件の間で様々な程度の i n v i t r o 効力を有することを示す i n v i t r o 効力分析の結果を示す。

30

【 0 3 3 5 】

図 2 3 A ~ 2 3 C は、異なる細胞濃度での細胞溶解の分析の結果を示し、ドナー 1 及び 2 に由来する細胞が、異なるパーセンテージの C A R⁺ 細胞にもかかわらず同様の応答を示したことを示している。

【 0 3 3 6 】

図 2 4 A ~ 2 4 B は、C A R⁺ 細胞について正規化した場合の 3 人のドナーからの細胞溶解の分析の結果を示す。ドナー 2 及び 3 は、C A R⁺ 細胞が正規化される場合のアッセイで同様に挙動した。同じ E : T の比率でドナー 2 の 2 倍の C A R⁺ T 細胞数でアッセイを繰り返した。

40

【 0 3 3 7 】

I F N 産生は、E L I S A によって上清でも測定した。I F N サイトカイン分析は、E : T 比に関連する用量反応の観点から細胞殺傷の結果を反映しており、ドナーの応答の間にいくらかの変動があった。I L 2 の測定値は、ドナー間でより変動した。ドナー 2 細胞の培地では、I L 2 の産生の大幅な減少が観察された。

【 0 3 3 8 】

要約すると、評価された各ドナーについて、2 x 及び 4 x の培養条件の両方が 1 x の製造プロトコルと同様の i n v i t r o 有効性を示している。

【 0 3 3 9 】

50

(D) 細胞増殖最適化の *in vivo* での有効性 (*in vivo* での生存分析)

上記の実施例 (C) に従って調製された CTX110 細胞は、以下の表 31 に示されるように、NALM6 異種移植腫瘍モデルにおいてマウスに 4×10^6 CAR⁺T 細胞の用量で投与した。NALM6-Fluc-GFP 腫瘍細胞を、CAR-T 投与の 4 日前に CIEANOG マウスに接種した。毎週の生物発光 (BLI、フォトン/秒) 評価により、マウスの腫瘍量を評価できる。

【0340】

【表48】

表31

群	群説明	腫瘍細胞	投与される細胞	群当たりのレシピエント
1	非処理	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
2	DP20-07-S1	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
3	DP20-07-S2	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
4	DP20-07-S3	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
5	DP20-07-S4	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
6	DP20-08-S1	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
7	DP20-08-S2	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
8	DP20-08-S3	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
9	DP20-09-S1	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
10	DP20-09-S2	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
11	DP20-09-S3	5.0e5	4.0e6 CAR-T	10
合計				110

10

20

【0341】

以下の表 32 に示すように、3 人のドナー全て及び増殖条件について、CAR⁺細胞を投与した動物は、しなかった未処理の対照細胞を投与した動物と異なり、38 日目も生存し続けた。CAR⁺細胞を投与されたマウスからの BLI は、同様の腫瘍増殖動態を示した。

【0342】

【表49】

表32: 生存期間の中央値

1. 非処理	2. ドナー#1, 1x	3. ドナー#1, 2x	4. ドナー#1, 4x	5. ドナー#1, HY 4x, D4	6. ドナー#2, 1x	7. ドナー#2, 2x	8. ドナー#2, 4x	9. ドナー#3, 1x	10. ドナー#3, 2x	11. ドナー#3, 4x
23	未定義	未定義	38.5	39	未定義	未定義	未定義	未定義	未定義	未定義

30

【0343】

実施例 11: キメラ抗原受容体を発現し、遺伝子破壊された TRAC 及び 2M 遺伝子を有する遺伝子操作された T 細胞を製造する方法。

以下は、CRISPR/Cas9 (クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート/CRISPR 関連タンパク質 9) 遺伝子編集構成要素 (sgRNA (単一ガイド RNA) 及び Cas9ヌクレアーゼ) を使用する、*ex vivo* で遺伝子改変されるヒト同種 T 細胞で構成される T 細胞免疫療法の生成のための例示的なプロセスについて記載している。

40

【0344】

改変には、TRAC 及び 2M 遺伝子座の標的化破壊及び組換えアデノ随伴ウイルスベクター (例えば、抗原指向性キメラ T 細胞抗原受容体をコードする血清型 6rAAV) を使用した TRAC 遺伝子座へのキメラ抗原受容体 (CAR) 導入遺伝子の挿入が含まれる。

【0345】

この製造プロセスを、図 19 に図示する。細菌由来の Cas9ヌクレアーゼを含む出発

50

物質の構造情報；2つの単一ガイドRNA (sgRNA)、TRAC遺伝子座を標的化する領域1つのsgRNA (例えば、TA-1) 及び 2M遺伝子座を標的化する第2のsgRNA (例えば、B2M-1) が、本明細書で提供される。rAAVベクター中のCARの例示的なアミノ酸配列及びヌクレオチド配列も提供される。

【0346】

T細胞の濃縮

T細胞は、自動化細胞処理システムを使用して、抗CD8及び抗CD4抗体でコーティングされた磁気ビーズの混合物を使用した磁気分離により、白血病アフェレーシス材料(ロイコパック)から濃縮した。濃縮前にロイコパックを細胞数及び生存率(80%)についてサンプリングした。濃縮した細胞を、HSAを含むPBS/EDTAバッファーで分離し、細胞数、生存率(80%)、T細胞純度(70%CD3)及び無菌性についてサンプリングした。

10

【0347】

T細胞の凍結保存

次いで、細胞を 4 ± 1 で遠心分離し、Cryosstor CS5に 50×10^6 生細胞/mLの目標濃度で再懸濁させた。細胞数、生存率(80%)について細胞をサンプリングし、次いで $2, 500 \times 10^6$ 細胞/バッグ(細胞懸濁液30~70mL)の標的細胞数でエチレン酢酸ビニルクライオバッグに分注した。1~2バッグのT細胞を生成するには1つのロイコパックで十分であった。各バッグをヒートシールし、ラベルを付け、制御速度の冷凍庫に移すまで2~8 で保管し、その後、保管のために気相液体窒素に移した。

20

【0348】

T細胞の解凍及び活性化

濃縮されたT細胞の凍結バッグ1つを解凍し、3Lのバッグに移し、補充されたX-VIVO(商標)15培地(X-VIVO(商標)15、5%ヒト血清、100IU/mLのrhIL2、100IU/mLのrhIL7)で希釈した。細胞を、細胞数及び生存率(70%)についてサンプリングした。細胞を540g、 20 ± 1 で15分間遠心分離した。次いで、補充されたX-VIVO(商標)15培地に細胞を再懸濁させ、細胞数及び生存率(70%以上)についてサンプリングした。組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合した可溶性コロイド状ポリマーナノマトリックス溶液を、1:12.5(v/v)の比率で添加して、細胞を活性化した。

30

【0349】

約500mLの補充されたX-VIVO(商標)15培地/組換えヒト化CD3及びCD28アゴニストに結合したコロイド状ポリマーナノマトリックスの各々の総量で、細胞を 2×10^6 生細胞/mLの目標密度まで2つの静置細胞培養容器に播種した。静置培養容器を 37 ± 1 及び $5 \pm 1\%$ CO₂で 48 ± 4 時間インキュベートした。プロセス全体を通して、静置培養容器を取り扱うときはいつでも、裂け目及び漏れ並びに透明な黄色の培地の存在について検査した。

【0350】

希釈

2日後、補充されたX-VIVO(商標)15培地を各静置培養容器に5Lまで添加した。細胞を更に 37 ± 1 及び $5 \pm 1\%$ CO₂で一晩インキュベートした。

40

【0351】

エレクトロポレーション及び形質導入

エレクトロポレーションのための調製において、補充されたX-VIVO(商標)15培地の量は、静置培養容器のディップチューブに接続されたポンプを使用して最終容量を約500mLまで減少させ、これを穏やかに回転させて、細胞を培地に再懸濁させた。細胞を、細胞数及び生存率(70%)についてサンプリングした。細胞を500mLの遠心分離管に移し、540g、 20 ± 1 で15分間遠心分離した。細胞ペレットをエレクトロポレーションバッファーに再懸濁させ、同一条件下で再度遠心分離した。細胞を、3

50

0.0 × 10⁶ 細胞 / mL の目標濃度になるまで、エレクトロポレーションバッファーに 2 回再懸濁させた。

【0352】

Cas9ヌクレアーゼを、TRACを標的化するsgRNAと混合するか、Cas9ヌクレアーゼを別のマイクロ遠心チューブで 2Mを標的化するsgRNAと混合した。各溶液を室温で10分以上インキュベートして、各リボ核タンパク質複合体(RNP)を形成した。2つのCas9 / sgRNA混合物を組み合わせ、細胞と混合して、Cas9、TRAC、sgRNA及び2M sgRNAを、それぞれ最終濃度0.3mg/mL、0.08mg/mL及び0.2mg/mLにした。混合物を取り出し、ピペティングによりエレクトロポレーションカセットにロードした。カセットにフタをし、トランスフェクションシステムを使用した静的エレクトロポレーションによって順次エレクトロポレーションを実施した。エレクトロポレーション後、細胞を各カセットから125mL三角フラスコにプールし、37℃で20分以上インキュベートした。細胞を、生存率(70%)についてサンプリングした。

10

【0353】

形質導入は、以下のように実施した。細胞をX-VIVO(商標)15培地で10⁷細胞/mLに希釈し、解凍したばかりのrAAVを20,000vg/細胞のMOIで添加した。細胞を37℃、5%CO₂で60分以上にわたってインキュベートした。

【0354】

相同組換え修復(HDR)は、DNA二本鎖切断のための忠実度の高い細胞修復メカニズムである。HDRは、CAR遺伝子の両端にある相同配列を使用して、AAV鑄型から目的のTRAC遺伝子座にCAR遺伝子を導入するために使用される。

20

【0355】

細胞増殖

細胞を、補充されたX-VIVO(商標)15培地で希釈し、細胞生存率(70%)及び細胞数についてサンプリングし、0.2~0.5 × 10⁶ 生細胞/cm²の密度まで2つの静置培養容器及び1つの更なる静置培養容器(細胞監視のためのサテライト培養)に播種した。静置培養容器を37 ± 1℃及び5 ± 1%CO₂でインキュベートした。細胞培養物を最大9日間インキュベートした。この間、培養物は3~4日ごとに1mLの培養液用量当たり100IUのrhIL2及びrhIL7で補充した。サテライト静置細胞培養容器は、増殖全体の細胞数、生存率及びT細胞純度について試験した。サテライト培養容器内の細胞密度が約30 × 10⁶ / cm²に達したとき、TCR⁺の枯渇を実施した。サテライト培養容器の細胞密度が30 × 10⁶ / cm²に達しなかった場合、9日目にメイン培養でTCR⁺の枯渇を実施した。

30

【0356】

TCR⁺の枯渇

各静置細胞培養容器の培地は、静置培養容器のディップチューブに接続されたポンプを使用して、約500mLの最終容量まで減少させた。培地の大部分を除去した後、静置培養容器を穏やかに回転させて、細胞を培地に再懸濁させた。

【0357】

細胞を、静置培養容器に接続するディップチューブを備えた500mLの遠心分離チューブに移した。生存率(70%)、細胞数及び%CAR⁺細胞について細胞をサンプリングした。次いで、細胞を540 × g、20 ± 1秒で15分間、遠心分離した。細胞ペレットを再懸濁させ、0.5%HSAを含む650mL未満のPBS/EDTAにプールした。細胞懸濁液を、自動化細胞処理システムに接続されている滅菌バッグに移した。自動化細胞処理システムは、ビオチン結合抗TCR⁺抗体と共に細胞をインキュベートした。自動化細胞処理システムを使用してTCR⁺細胞を枯渇させるために、細胞を洗浄し、抗ビオチン磁気ビーズと共にインキュベートした。細胞数、生存率(70%)及び%CAR⁺細胞(30~40%)について細胞を試験した。

40

【0358】

50

細胞の回復

枯渇した細胞を補充された X - V I V O (商標) 1 5 培地に再懸濁させ、3 L バッグ (複数可) に移し、静置細胞培養容器 (複数可) に播種し、 37 ± 1 及び $5 \pm 1 \% \text{CO}_2$ で一晚インキュベートした。

【0359】

細胞採取 (原薬)

細胞を採取するために、静置培養容器をインキュベーターから取り外し、細胞沈降のために休ませた。ポンプを使用して、各静置培養容器から最終容量が約 500 mL になるまで成長培地を除去した。除去した培地を、無菌のためにサンプリングした。静置培養容器を穏やかに回転させて、細胞を培地に再懸濁させた。各静置培養容器の内容物は、ポンプを使用して 3 L の移送バッグに移送され、重力によって $40 \mu\text{m}$ 輸血フィルターを通して別個の滅菌 3 L バッグに濾過された。細胞を、濃度及び生存率についてサンプリングした。

10

【0360】

均等物

本明細書でいくつかの本発明の実施形態を説明及び図示してきたが、当業者であれば、本明細書で説明される機能を実施し、且つ / 又は結果及び / 若しくは 1 つ以上の利点を得るための様々な他の手段及び / 又は構造を容易に想定するものであり、こうした変形及び / 又は修正のそれぞれは、本明細書で説明される本発明の実施形態の範囲内にあるものと見なされる。より一般的には、当業者であれば、本明細書で説明される全てのパラメータ、寸法、材料及び構成は例示的であることを意図し、実際のパラメータ、寸法、材料及び / 又は構成は、本発明の教示が適用される特定の用途に依存することを容易に理解するものである。当業者は、本明細書に記載された特定の本発明の実施形態に対する多く均等物を、日常の実験のみを用いて認識するか又は確認可能である。従って、上述の実施形態は単に例として提示されており、また、添付の特許請求の範囲及びその均等物の範囲内において、本発明の実施形態が、具体的に説明及び特許請求される以外の別の方法で実践され得ることを理解されたい。本開示の本発明の実施形態は、本明細書で説明される各個別の特徴、システム、物品、材料、キット及び / 又は方法を対象とする。加えて、2 つ以上のこうした特徴、システム、物品、材料、キット及び / 又は方法の任意の組み合わせは、こうした特徴、システム、物品、材料、キット及び / 又は方法が相互に矛盾しない場合、本開示の本発明の範囲内に含まれる。

20

30

【0361】

本明細書中で定義され用いられる全ての定義は、辞書の定義、参照により組み込まれる文献中の定義及び / 又は定義される用語の普通の意味を超えて優先されるものと理解されたい。

【0362】

本明細書に開示されている全ての参考文献、特許及び特許出願は、それぞれ引用されている主題に関して参照により組み込まれており、場合により文献の全体を包含する場合がある。

【0363】

不定冠詞「1つの (a)」及び「1つの (a n)」は、本明細書及び特許請求の範囲において使用される場合、反対に明確に示されない限り、「少なくとも 1 つ」を意味するものと理解されるべきである。

40

【0364】

本明細書及び特許請求の範囲で使用するとき、「及び / 又は」という表現は、等位結合される要素、すなわち一部の場合に接続的に提示され、他の場合に離接的に提示される要素の「いずれか又は両方」を意味するものとして理解されたい。「及び / 又は」と共に列挙される複数の要素は、同じように、すなわちそのように結合された要素の「1 つ以上」と解釈されるべきである。「及び / 又は」の節によって具体的に特定される要素以外に、具体的に特定された要素に関連する又は関連しないにかかわらず、他の要素が任意選択的

50

に提示され得る。従って、非限定的な例として、「A及び/又はB」に対する参照は、「～を備える」などのオープンエンド用語と共に使用される場合、一実施形態ではAのみ（任意選択的にB以外の要素を含む）、別の実施形態ではBのみ（任意選択的にA以外の要素を含む）、更に別の実施形態ではA及びBの両方（任意選択的に他の要素を含む）などを指し得る。

【0365】

本明細書及び特許請求の範囲で使用するとき、「又は」は、上記で定義される「及び/又は」と同じ意味を有するものと理解されるべきである。例えば、リスト中の項目を分離する際に、「又は」又は「及び/又は」は、包括的である、すなわち要素のリストの少なくとも1つを含むが、2つ以上の数及び任意選択的に追加的な列挙されていない項目も含むものと解釈されるべきである。「～の1つのみ」若しくは「～の厳密に1つ」又は特許請求の範囲で使用されるとき「～からなる」など、反対を明らかに示す用語のみが多数の要素又は要素のリストの厳密に1つの要素の包含を指す。一般に、本明細書で使用するとき、用語「又は」は、「いずれか」、「～の1つ」、「～の1つのみ」又は「～の厳密に1つ」などの排他性の用語が先行する場合のみ、排他的代替用語（すなわち「一方又は他方であるが両方ではない」）を示すと解釈されるものとする。「本質的に～からなる」は、特許請求の範囲内で使用されるとき、特許法の分野で使用されるその通常の意味を有するものとする。

10

【0366】

本明細書で使用する場合、本明細書及び特許請求の範囲における、1つ以上の要素の列挙に関する「少なくとも1つ」という語句は、要素の列挙内の要素の任意の1つ以上から選択される少なくとも1つの要素であるが、要素の列挙内に具体的に列挙されたあらゆる要素の少なくとも1つを必ずしも含まず、且つ要素の列挙内の要素の任意の組み合わせを必ずしも除外しないことを意味するものと理解すべきである。この定義により、具体的に特定されるそれらの要素に関係するか否かにかかわらず、「少なくとも1つ」という語句が意味する要素の列挙内に具体的に特定される要素以外の要素が任意選択的に存在し得ることも可能になる。従って、非限定的な例として、「A及びBの少なくとも1つ」（換言すると「A又はBの少なくとも1つ」、換言すると「A及び/又はBの少なくとも1つ」は、一実施形態では、任意選択的に2つ以上のAを含み、Bが存在しない（及び任意選択的にB以外の要素を含む）少なくとも1つを指すことができ、別の実施形態では、任意選択的に2つ以上のBを含み、Aが存在しない（及び任意選択的にA以外の要素を含む）少なくとも1つを指すことができ、更に別の実施形態では、任意選択的に2つ以上のAを含む少なくとも1つ、且つ任意選択的に2つ以上のBを含む少なくとも1つ（及び任意選択的に他の要素を含む）を指すなどであり得る。

20

30

【0367】

同様に、反対に明確に示されない限り、2つ以上の工程又は行為を含む、本明細書で特許請求される任意の方法において、この方法の工程又は行為の順序は、必ずしもこの方法の工程又は行為が列挙される順序に限定されないことも理解されるべきである。

40

50

【 図 面 】

【 図 1 A - 1 B 】

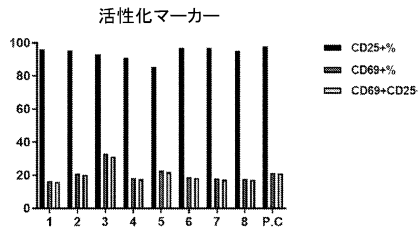


図1A

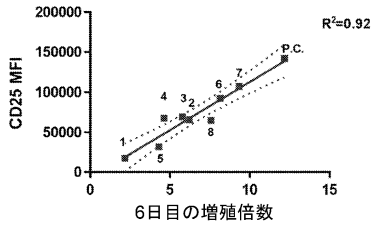


図1B

【 図 2 A - 2 B 】

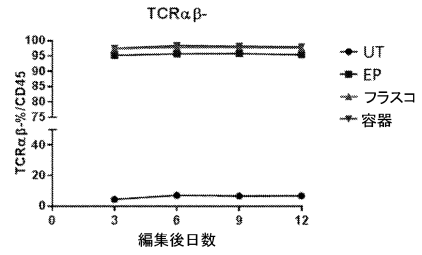


図2A

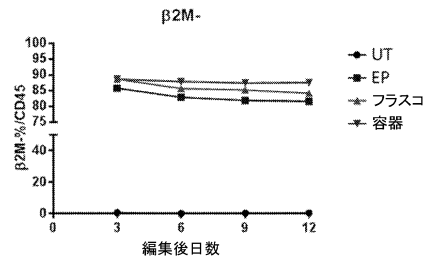


図2B

10

20

【 図 2 C - 2 D 】

【 図 3 】

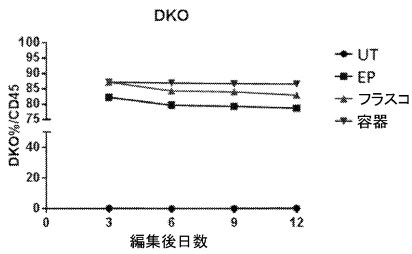


図2C

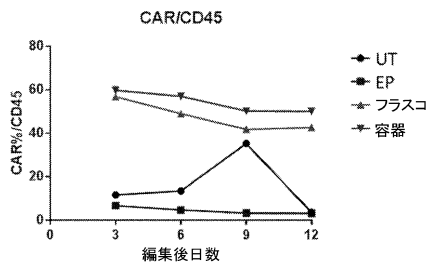


図2D

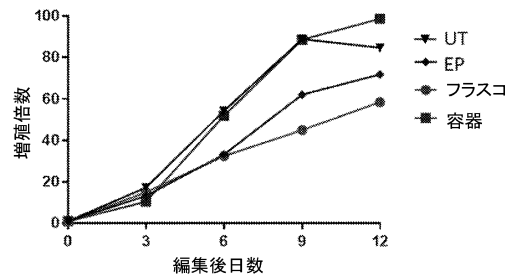


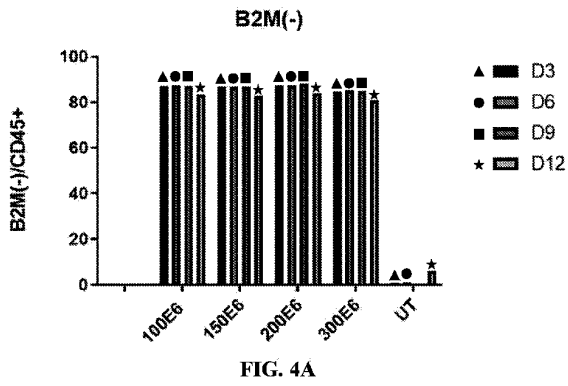
図3

30

40

50

【 図 4 A 】



【 図 4 B - 4 C 】

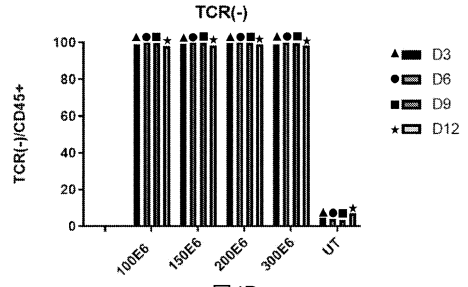
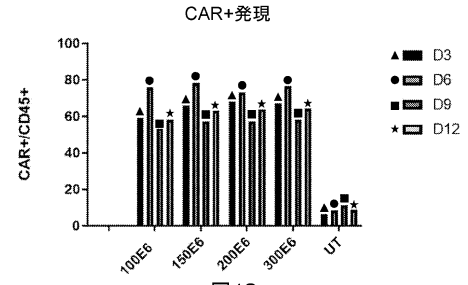


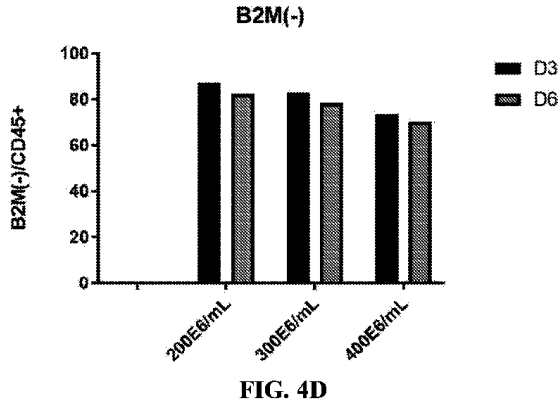
図4B



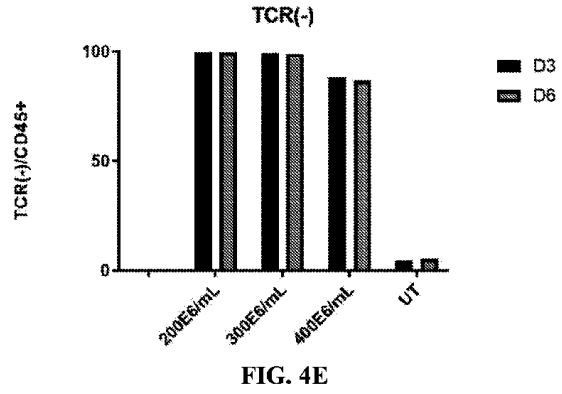
10

20

【 図 4 D 】



【 図 4 E 】



30

40

50

【 図 4 F 】

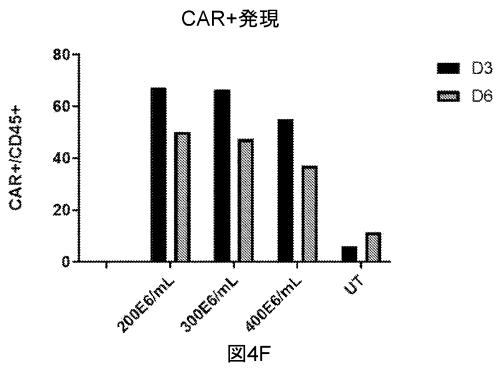


図4F

【 図 5 A 】

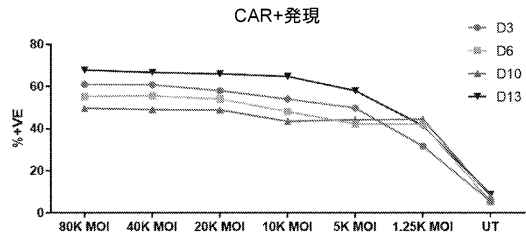


図5A

10

【 図 5 B 】

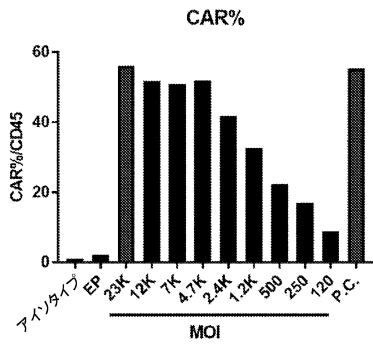


図5B

【 図 6 A 】

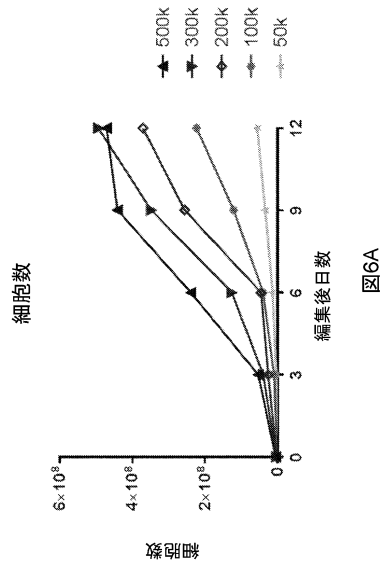


図6A

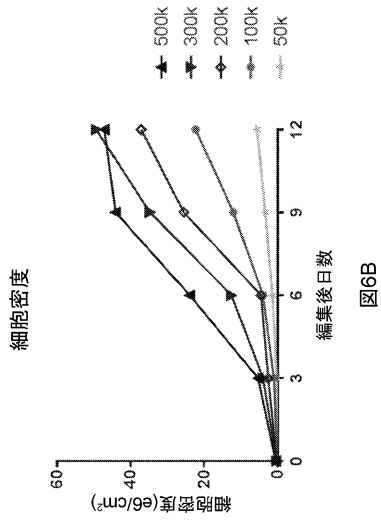
20

30

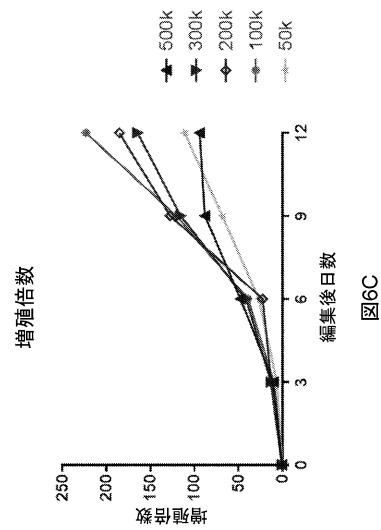
40

50

【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



10

20

【 図 7 A 】

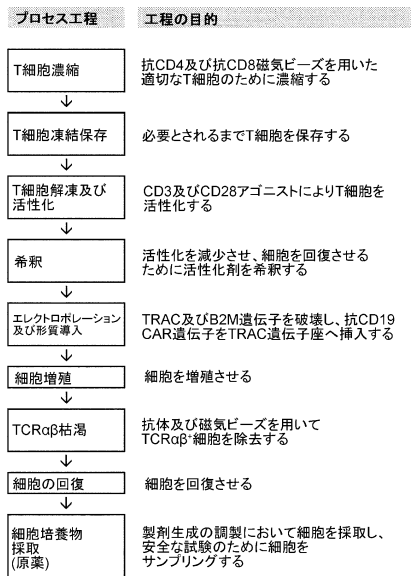


図7A

【 図 7 B 】

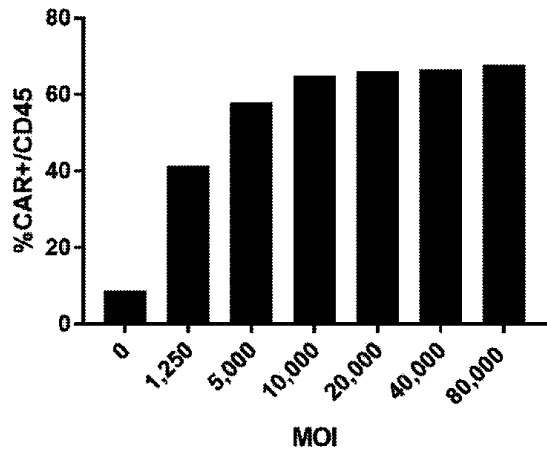


FIG. 7B

30

40

50

【 図 7 C 】

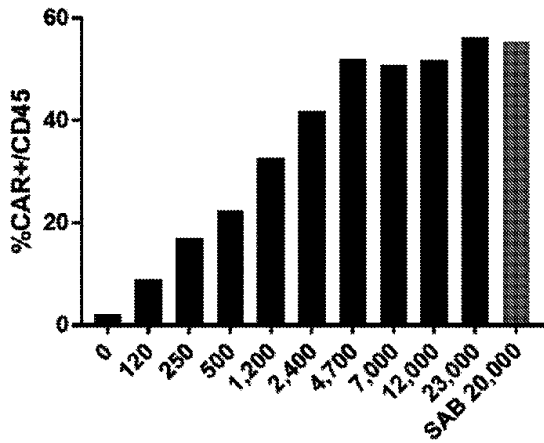


FIG. 7C

【 図 7 D 】

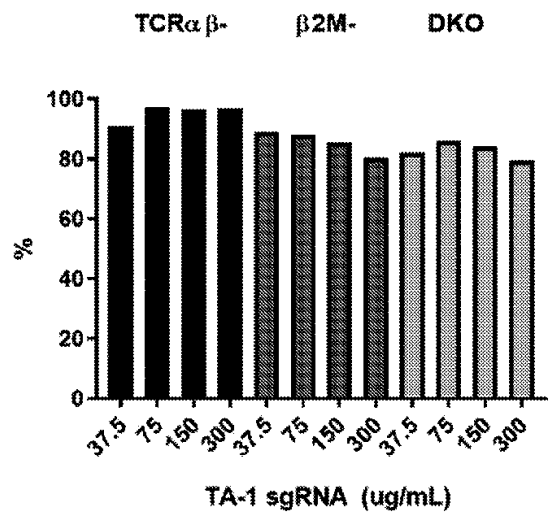


FIG. 7D

10

20

【 図 7 E 】

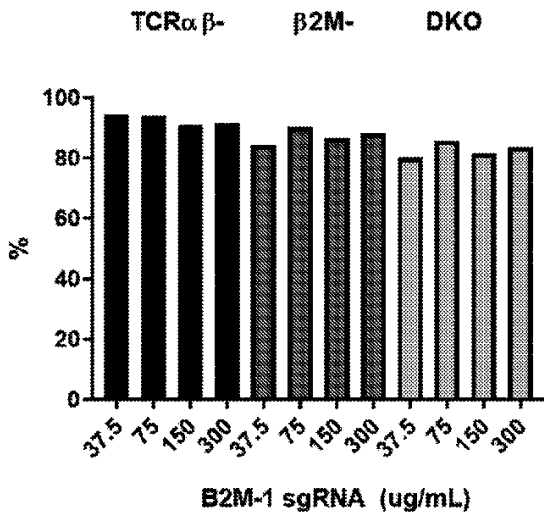


FIG. 7E

【 図 8 A 】

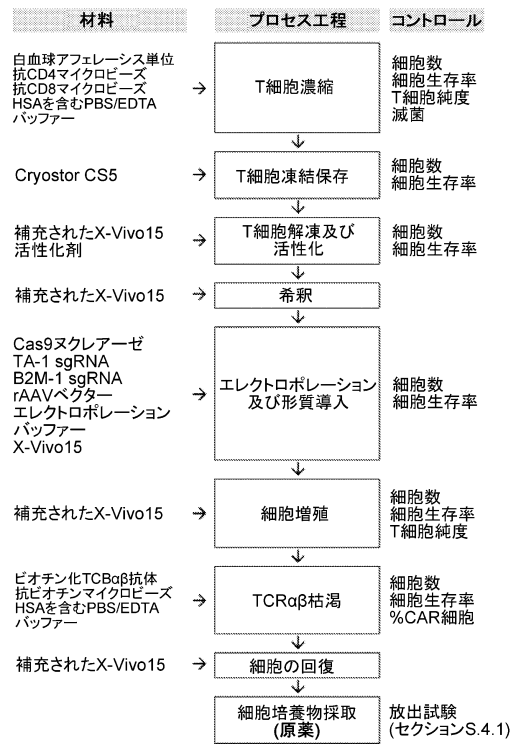


図8A

30

40

50

【 8 B 】

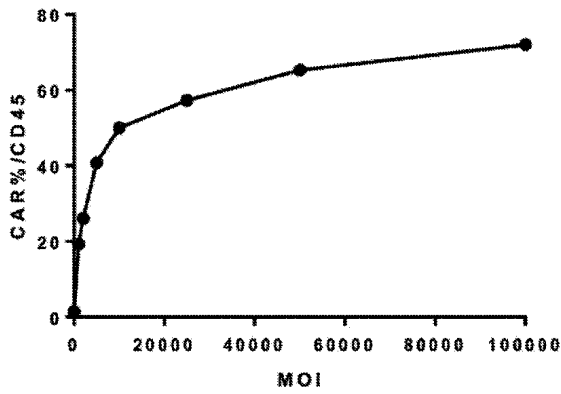


FIG. 8B

【 8 C 】

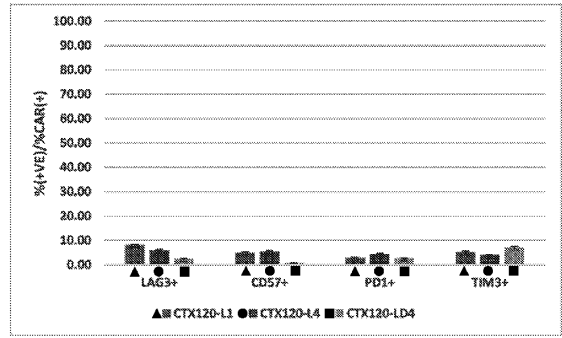


FIG. 8C

10

【 8 D 】

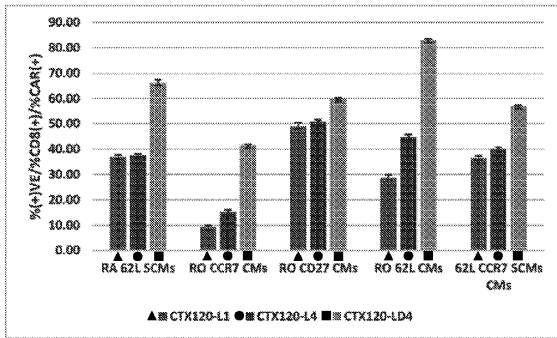


FIG. 8D

【 8 E 】

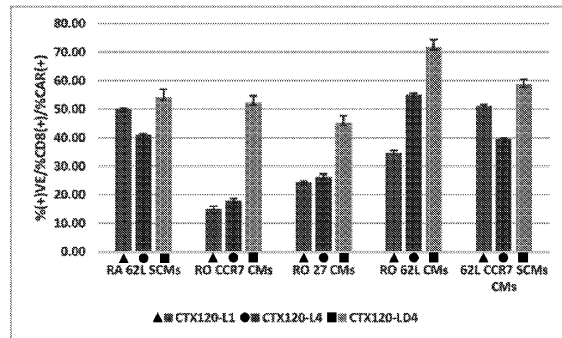


FIG. 8E

20

30

40

50

【 図 8 F - 8 G 】

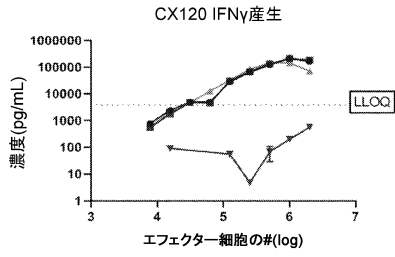


図8F

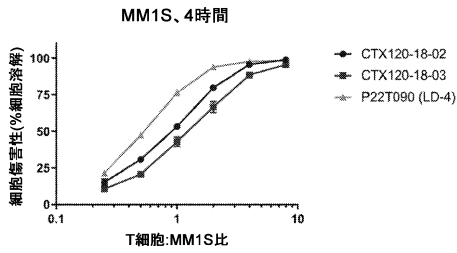


図8G

【 図 9 A - 9 B 】

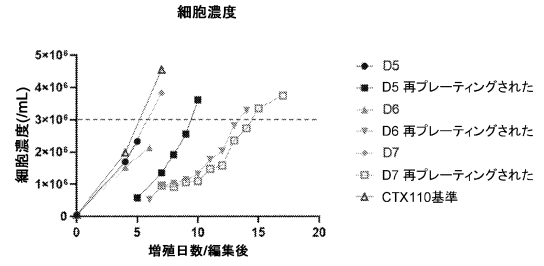


図9A

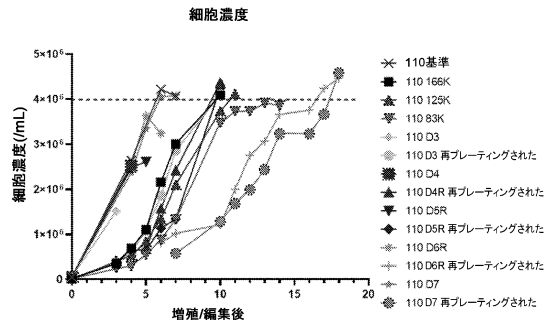


図9B

10

20

【 図 1 0 A - 1 0 B 】

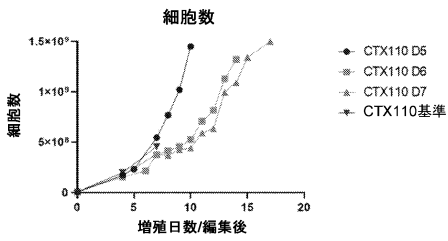


図10A

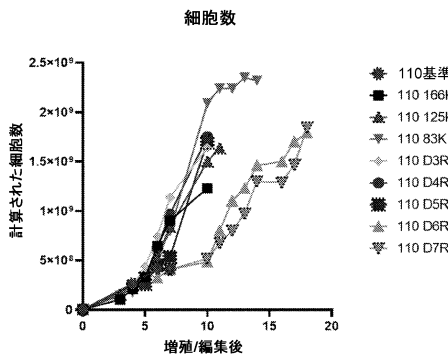


図10B

【 図 1 1 A - 1 1 B 】

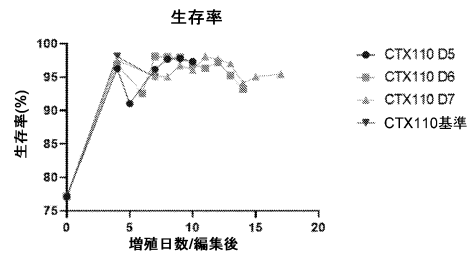


図11A

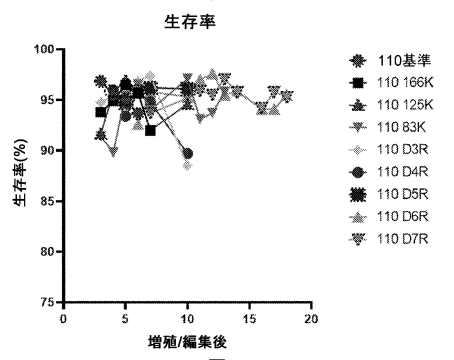


図11B

30

40

50

【 図 1 2 A - 1 2 B 】

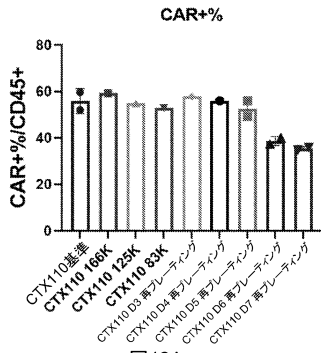


図12A

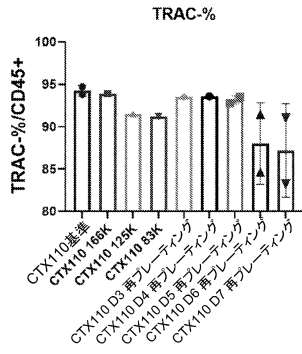


図12B

【 図 1 2 C 】

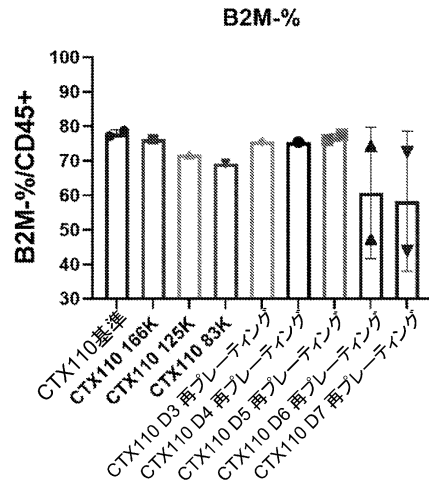


図12C

10

20

【 図 1 3 A 】

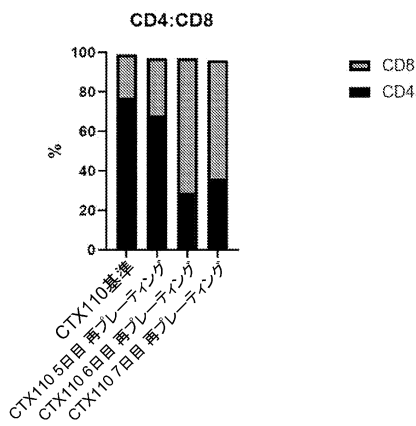


図13A

【 図 1 3 B 】

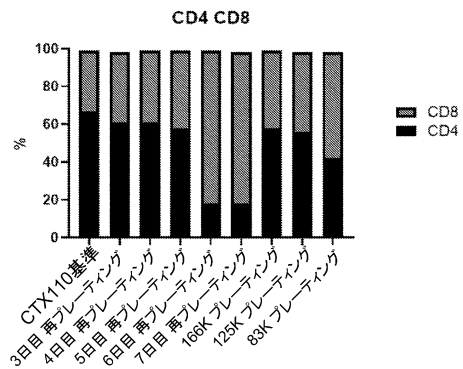


図13B

30

40

50

【 図 1 4 A 】

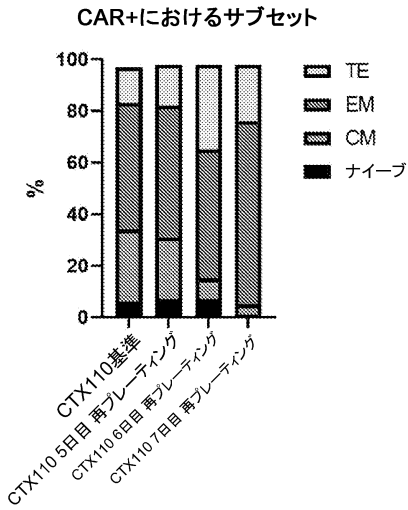


図14A

【 図 1 4 B - 1 4 C 】

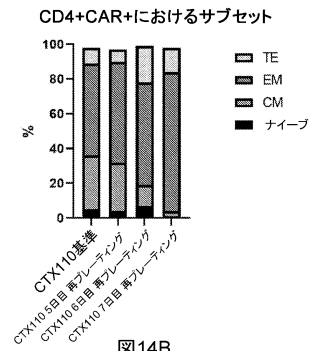


図14B

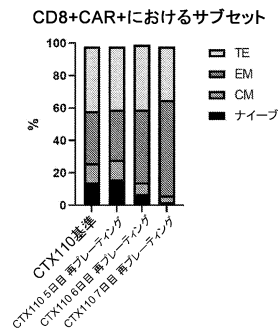


図14C

10

20

【 図 1 4 D - 1 4 E 】

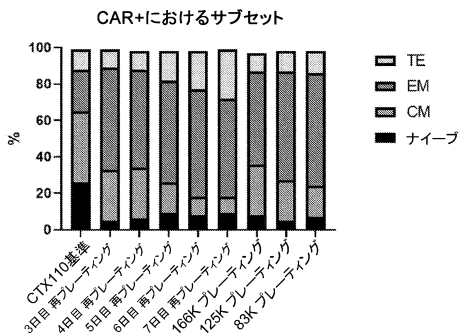


図14D

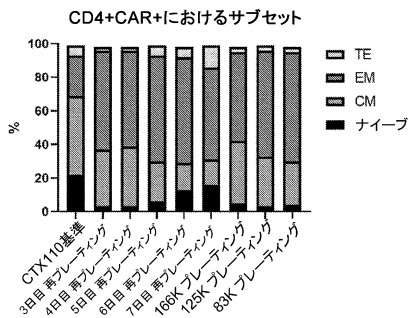


図14E

【 図 1 4 F 】

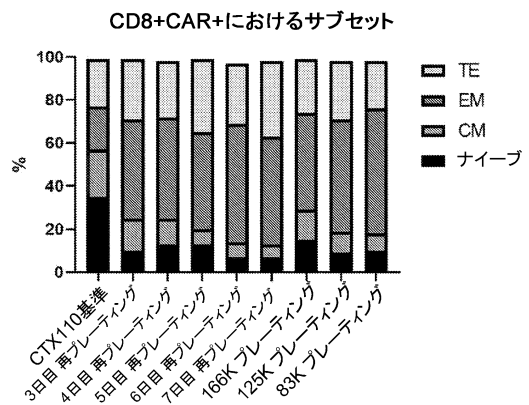


図14F

30

40

50

【 図 15 A 】

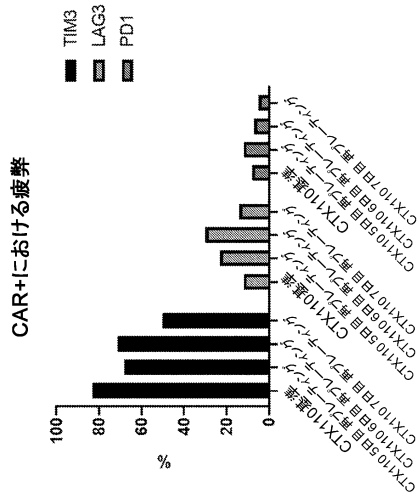


図 15A

【 図 15 B 】

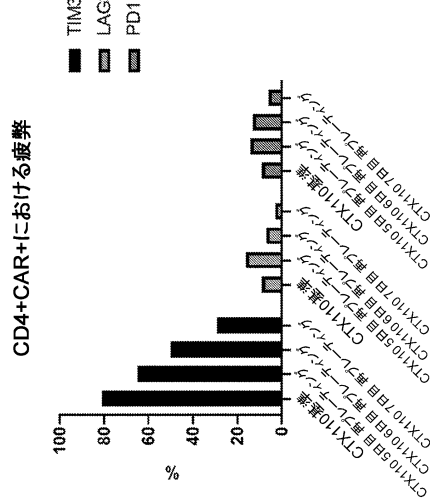


図 15B

10

【 図 15 C 】

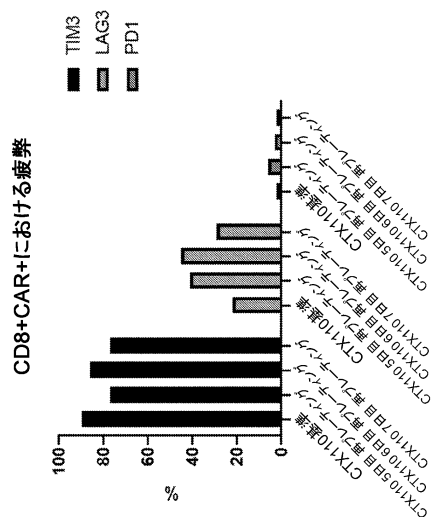


図 15C

【 図 15 D 】

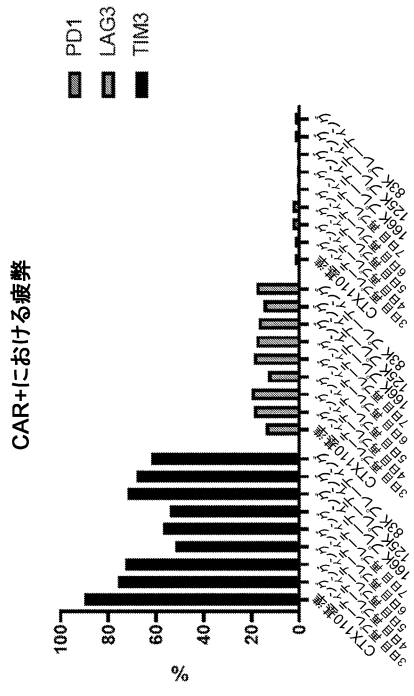


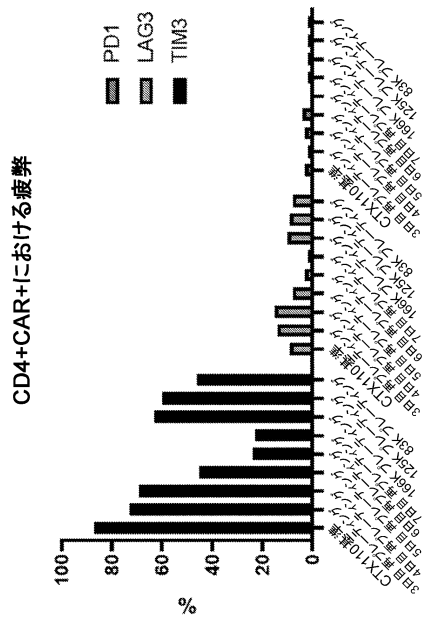
図 15D

30

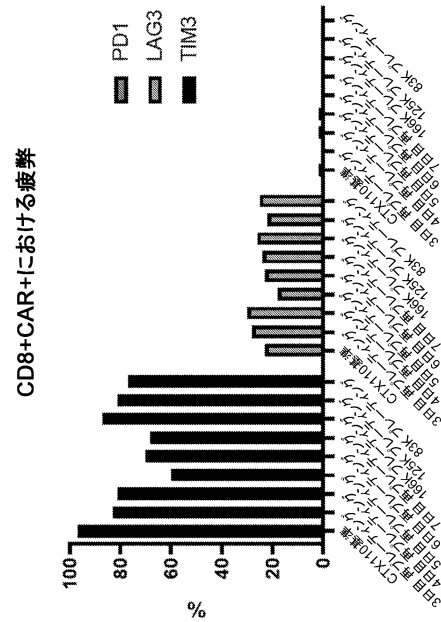
40

50

【 図 1 5 E 】



【 図 1 5 F 】

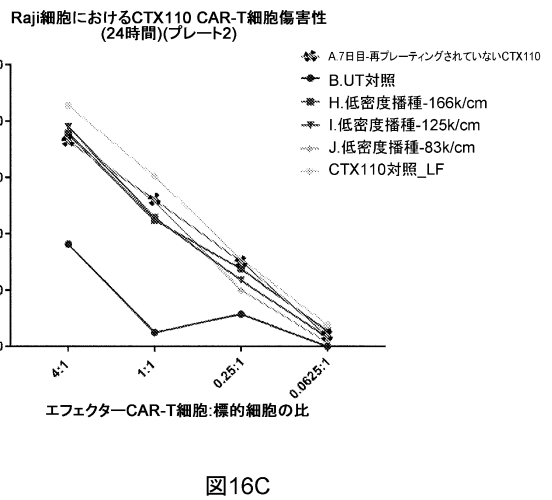
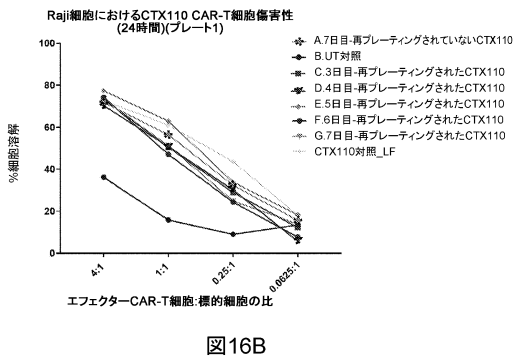
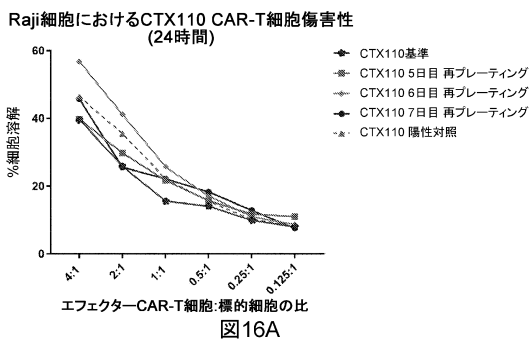


10

20

【 図 1 6 A - 1 6 B 】

【 図 1 6 C 】



30

40

50

【 図 17 A 】

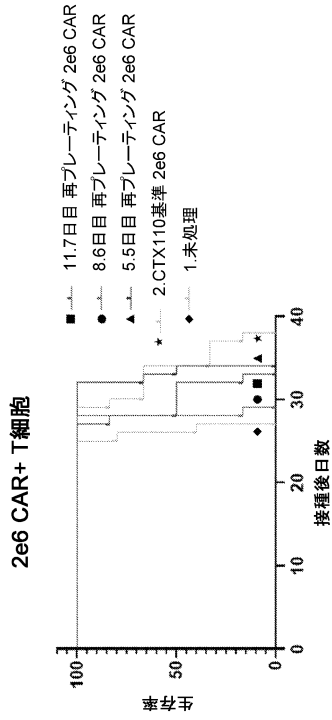


図17A

【 図 17 B 】

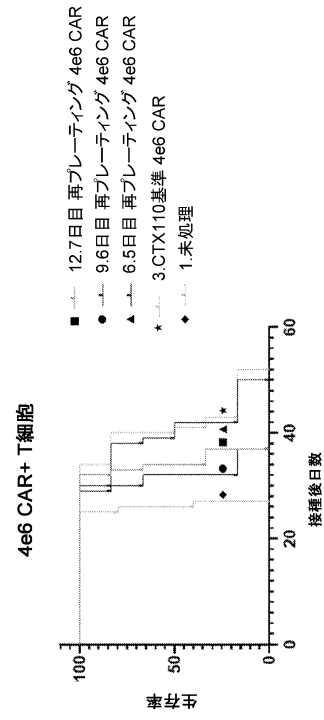


図17B

10

20

【 図 17 C 】

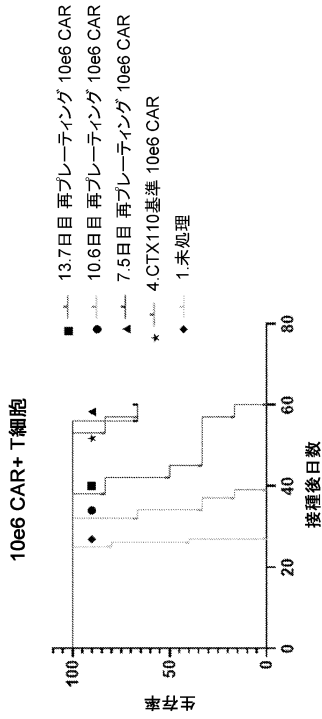


図17C

【 図 17 D 】

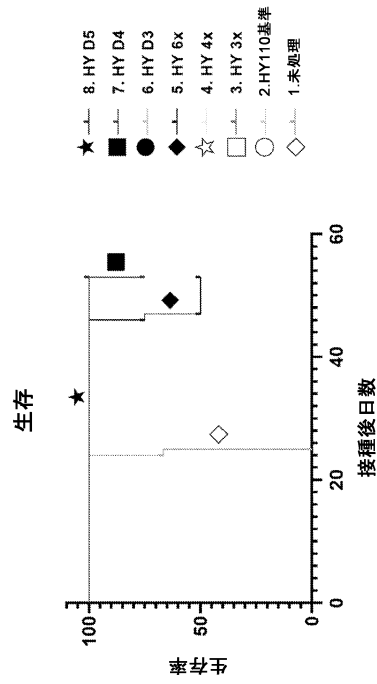


図17D

30

40

50

【 図 1 8 A 】

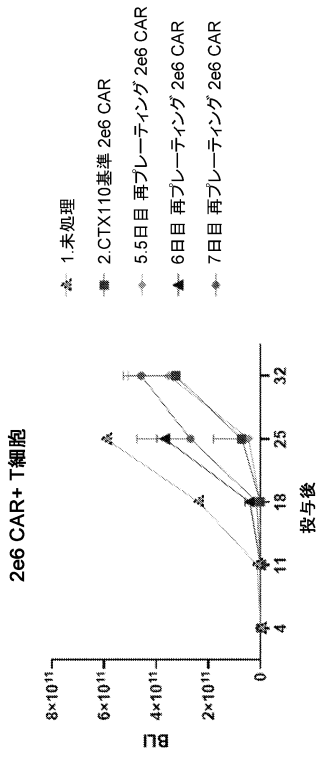


図18A

【 図 1 8 B 】

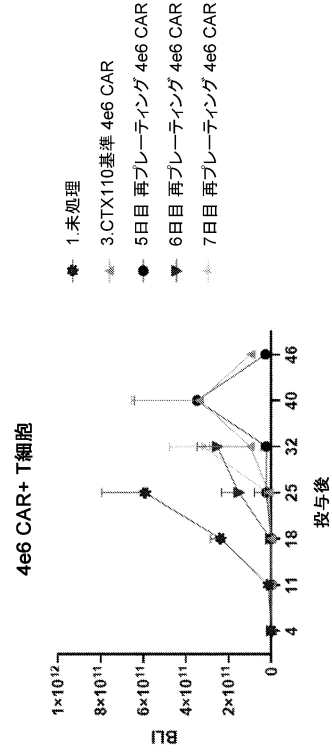


図18B

10

20

【 図 1 8 C 】

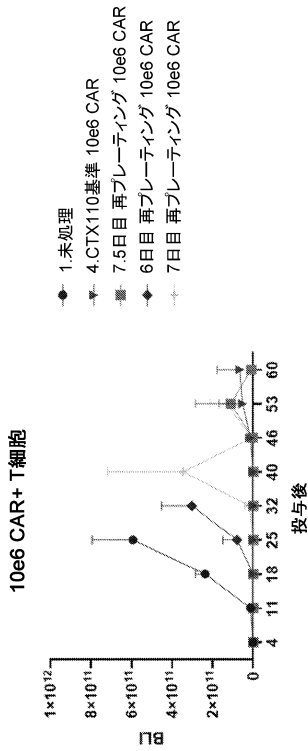


図18C

【 図 1 8 D 】

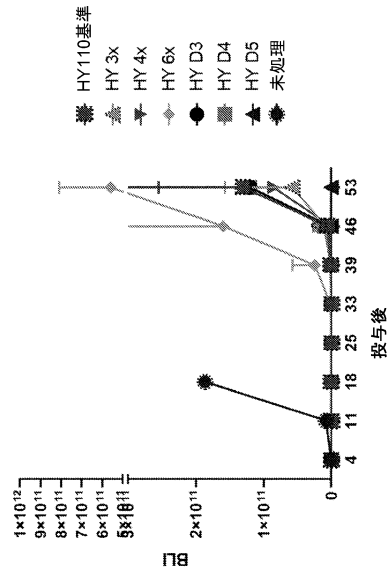


図18D

30

40

50

【 図 19 】

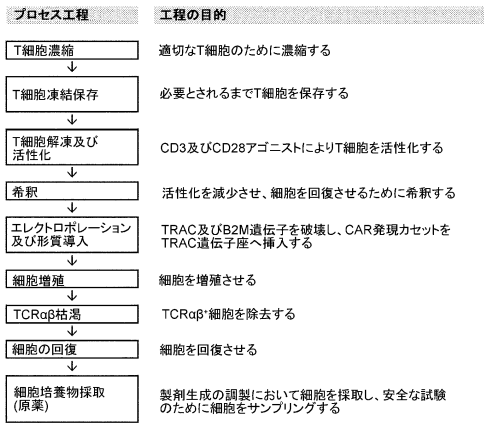


図19

【 図 20 】

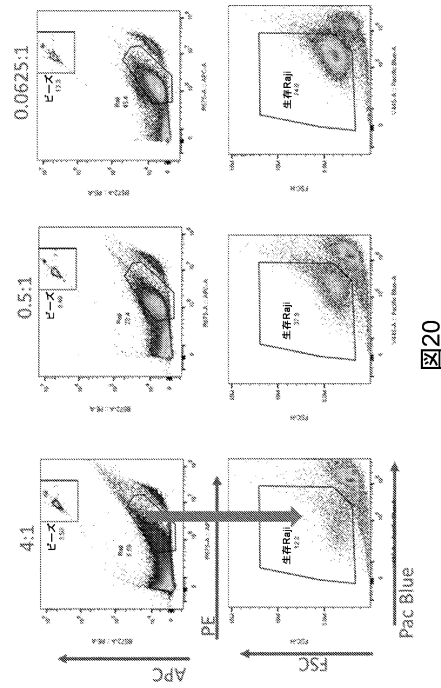


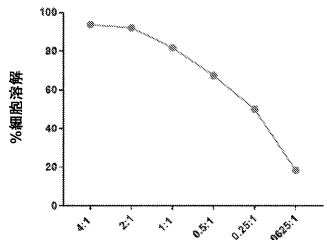
図20

10

20

【 図 21 A - 21 B 】

抗CD19CAR T細胞:Raji細胞傷害性(24時間)



エフェクターCAR-T細胞:標的細胞の比

図21A

培養培地におけるIL2産生

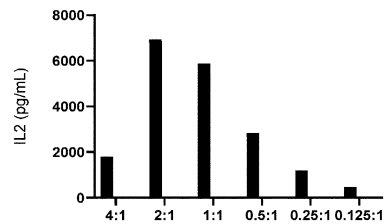
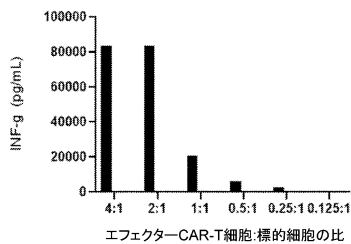


図21C

培養培地におけるIFNγ産生



エフェクターCAR-T細胞:標的細胞の比

図21B

30

40

50

【 図 2 2 A 】

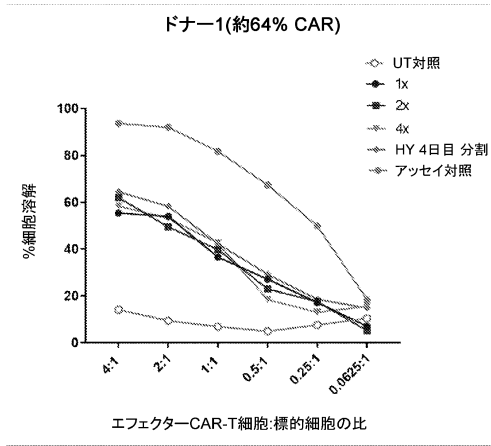


図22A

【 図 2 2 B - 2 2 C 】

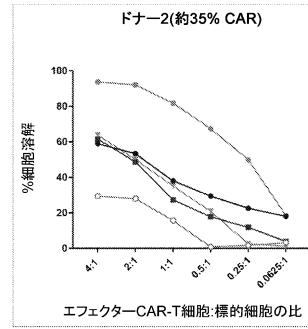


図22B

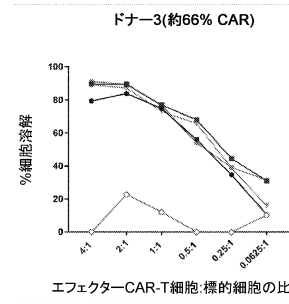


図22C

10

20

【 図 2 3 A - 2 3 B 】

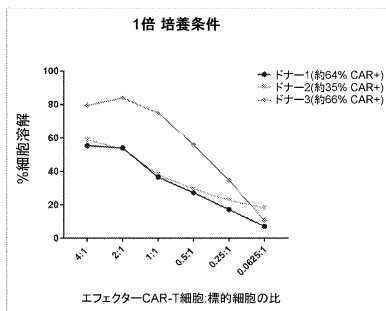


図23A

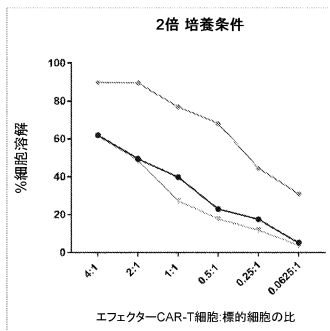


図23B

【 図 2 3 C 】

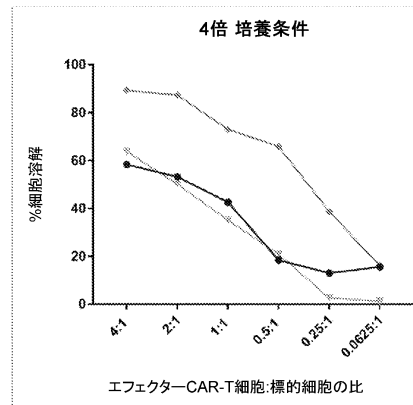


図23C

30

40

50

【 図 2 4 A 】

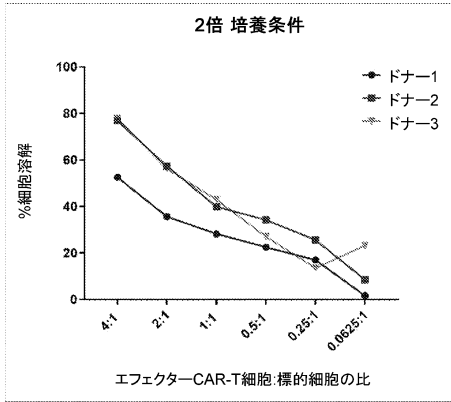


図24A

【 図 2 4 B 】

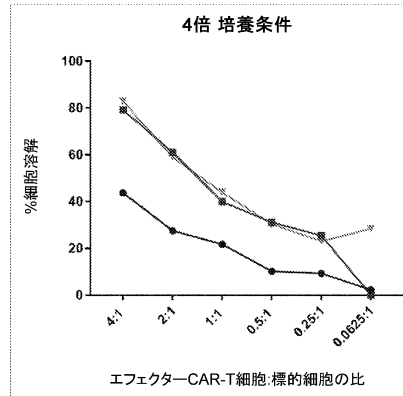


図24B

10

【 図 2 5 A 】

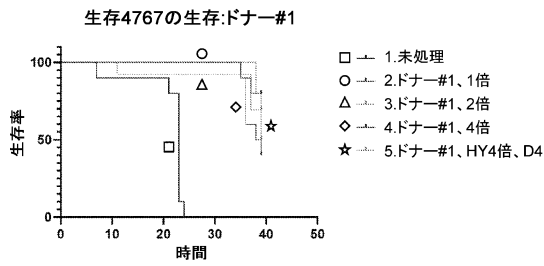


図25A

【 図 2 5 B - 2 5 C 】

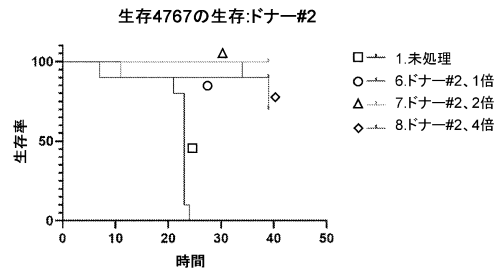


図25B

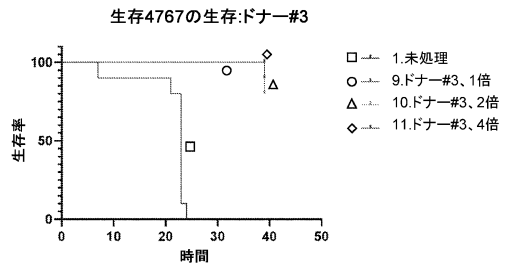


図25C

20

30

40

50

【配列表】

2023501580000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/IB2020/060723
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0783 C07K14/725 C12N15/85 C07K14/705 C07K16/28 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 C07K		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/097305 A2 (CRISPR THERAPEUTICS AG [CH]) 23 May 2019 (2019-05-23) cited in the application abstract page 2, line 18 - line 22 page 3, line 9 - line 18 page 8, line 20 - line 29 page 22, line 22 - line 25 page 153, line 6 - page 154, line 5 page 205; example 24 -----	1-43
X	WO 2016/069282 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 6 May 2016 (2016-05-06) abstract page 3, line 31 - line 34 page 27, line 29 - page 28, line 2 page 77, line 12 - line 34 page 76, line 22 - line 27 ----- -/--	1-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 18 December 2020		Date of mailing of the international search report 18/01/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Grötzing, Thilo

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2020/060723

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2018/115887 A1 (UCL BUSINESS PLC [GB]) 28 June 2018 (2018-06-28) abstract page 5, line 6 - line 10 page 6, line 1 - line 5 page 19, line 18 - line 25 page 22, line 14 - line 23 page 27, line 25 - line 31 page 33, line 22 - line 25 page 51, line 30 - page 52, line 17 page 58, line 11 - line 28 page 68; example 6</p> <p>-----</p>	1-43
X	<p>JIANGTAO REN ET AL: "Multiplex Genome Editing to Generate Universal CAR T Cells Resistant to PD1 Inhibition", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 23, no. 9, 4 November 2016 (2016-11-04), pages 2255-2266, XP055565027, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1300 abstract page 2, paragraphs 3,4 page 4, paragraph 5 page 9, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-43

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2020/060723

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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2020/060723

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019097305 A2	23-05-2019	AU 2018367896 A1	31-10-2019
		BR 112019023608 A2	26-05-2020
		CA 3062506 A1	23-05-2019
		CN 110914289 A	24-03-2020
		CO 2019013821 A2	31-01-2020
		EP 3621981 A2	18-03-2020
		JP 2020519277 A	02-07-2020
		KR 20200005596 A	15-01-2020
		PH 12019502529 A1	13-07-2020
		US 2018325955 A1	15-11-2018
		US 2019314413 A1	17-10-2019
		US 2019314414 A1	17-10-2019
		US 2019365808 A1	05-12-2019
		US 2019365809 A1	05-12-2019
		US 2020330518 A1	22-10-2020
		WO 2019097305 A2	23-05-2019
		WO 2016069282 A1	06-05-2016
AU 2015339744 A1	27-04-2017		
BR 112017008693 A2	27-02-2018		
CA 2964948 A1	06-05-2016		
CA 2964953 A1	06-05-2016		
CN 107206024 A	26-09-2017		
CN 107249606 A	13-10-2017		
EA 201790953 A1	31-10-2017		
EP 3215166 A1	13-09-2017		
EP 3215168 A1	13-09-2017		
HK 1243332 A1	13-07-2018		
JP 2017535261 A	30-11-2017		
JP 2018500006 A	11-01-2018		
KR 20170074245 A	29-06-2017		
KR 20170075013 A	30-06-2017		
US 2017290858 A1	12-10-2017		
US 2017335331 A1	23-11-2017		
US 2018312848 A1	01-11-2018		
WO 2016069282 A1	06-05-2016		
WO 2016069283 A1	06-05-2016		
WO 2018115887 A1	28-06-2018	EP 3559214 A1	30-10-2019
		US 2020087681 A1	19-03-2020
		WO 2018115887 A1	28-06-2018

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 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	

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,N
E,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,K
E,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,N
G,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,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ユイ ホイ

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, メイン ストリート 6 1 0 , シ
ーノオー クリスパー セラピューティクス アクチェンゲゼルシャフト

(72)発明者 デメトリオス カライツィディス

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, メイン ストリート 6 1 0 , シ
ーノオー クリスパー セラピューティクス アクチェンゲゼルシャフト

(72)発明者 タン スーユアン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 3 9 , ケンブリッジ, メイン ストリート 6 1 0 , シ
ーノオー クリスパー セラピューティクス アクチェンゲゼルシャフト

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA28

FA74