

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-543139

(P2022-543139A)

(43)公表日 令和4年10月7日(2022.10.7)

| (51)国際特許分類        |                                    | F I            |               | テーマコード (参考)                 |                    |
|-------------------|------------------------------------|----------------|---------------|-----------------------------|--------------------|
| <b>C 1 2 N</b>    | <b>5/0783(2010.01)</b>             | <b>C 1 2 N</b> | <b>5/0783</b> |                             | <b>4 B 0 6 5</b>   |
| <b>A 6 1 K</b>    | <b>35/17 (2015.01)</b>             | <b>A 6 1 K</b> | <b>35/17</b>  | <b>Z</b>                    | <b>4 C 0 7 6</b>   |
| <b>A 6 1 P</b>    | <b>37/06 (2006.01)</b>             | <b>A 6 1 P</b> | <b>37/06</b>  |                             | <b>4 C 0 8 4</b>   |
| <b>A 6 1 K</b>    | <b>35/12 (2015.01)</b>             | <b>A 6 1 K</b> | <b>35/12</b>  |                             | <b>4 C 0 8 6</b>   |
| <b>A 6 1 P</b>    | <b>35/00 (2006.01)</b>             | <b>A 6 1 P</b> | <b>35/00</b>  |                             | <b>4 C 0 8 7</b>   |
|                   |                                    | 審査請求           | 未請求           | 予備審査請求                      | 未請求 (全106頁) 最終頁に続く |
| (21)出願番号          | 特願2022-506965(P2022-506965)        |                | (71)出願人       | 516040109                   |                    |
| (86)(22)出願日       | 令和2年8月6日(2020.8.6)                 |                |               | イエダ リサーチ アンド ディベロッ          |                    |
| (85)翻訳文提出日        | 令和4年3月25日(2022.3.25)               |                |               | プメント カンパニー リミテッド            |                    |
| (86)国際出願番号        | PCT/IL2020/050865                  |                |               | YEDA RESEARCH AND D         |                    |
| (87)国際公開番号        | WO2021/024264                      |                |               | EVELOPMENT CO. LTD.         |                    |
| (87)国際公開日         | 令和3年2月11日(2021.2.11)               |                |               | イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォ   |                    |
| (31)優先権主張番号       | 62/883,164                         |                |               | ト, ピー. オー. ボックス 95, ア       |                    |
| (32)優先日           | 令和1年8月6日(2019.8.6)                 |                |               | ット ザ ワイツマン インスティテュート        |                    |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US)                             |                |               | オブ サイエンス                    |                    |
| (81)指定国・地域        | AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA      |                |               | at the Weizmann Ins         |                    |
|                   | ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(   |                |               | titute of Science,          |                    |
|                   | AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A   |                |               | P. O. Box 95, 7 6 1 0 0 0 2 |                    |
|                   | T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR |                | (71)出願人       | 500039463                   |                    |
|                   | ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, |                |               | ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ        |                    |
|                   | 最終頁に続く                             |                |               | 最終頁に続く                      |                    |

(54)【発明の名称】 ハプロタイプ一致幹細胞移植における抗ウイルスセントラルメモリーCD8+β細胞

(57)【要約】

セントラルメモリーTリンパ球(T<sub>cm</sub>)表現型を含む非移植片対宿主病(GVHD)誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、細胞が、寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、かつ移植後にリンパ節へホーミングすることができる方法が提供されている。方法、医薬組成物、および治療方法によって生成された細胞も開示される。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

セントラルメモリーＴリンパ球（Ｔｃｍ）表現型を含む非移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、前記細胞が、寛容誘導細胞であり、および／または抗疾患活性を付与され、移植後にリンパ節へホーミングすることができ、前記方法が、

（ａ）ドナー対象由来の第１の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の集団を、ＣＤ１４<sup>+</sup>発現細胞に結合することができる抗体と接触させ、抗原提示細胞に成熟することができるＣＤ１４<sup>+</sup>発現細胞を選択すること、

（ｂ）前記抗原提示細胞にウイルスペプチドを負荷すること、

（ｃ）ＣＤ４５ＲＡ<sup>-</sup>ＣＤ８<sup>+</sup>表現型を発現するメモリーＴ細胞を含む細胞の集団を得るために、前記第１のＰＢＭＣの集団と同じドナー対象の第２のＰＢＭＣの集団を、ＣＤ４<sup>+</sup>、ＣＤ５６<sup>+</sup>およびＣＤ４５ＲＡ<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させることができる１つまたは複数の作用物質で処理すること、

（ｄ）ウイルス反応性メモリーＴ細胞の富化を可能にするように、ＩＬ－２１の存在下で、前記メモリーＴ細胞を含む前記細胞の集団を、工程（ｂ）の前記ウイルスペプチドが負荷された前記抗原提示細胞と接触させること、および

（ｅ）前記Ｔｃｍ表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、ＩＬ－２１、ＩＬ－１５および／またはＩＬ－７の存在下で工程（ｄ）から生じる前記細胞を培養し、それにより、前記Ｔｃｍ表現型を含む非ＧＶＨＤ誘導細胞の単離された集団を生成すること、を含む、方法。

## 【請求項 2】

非移植片対宿主病非移植片対宿主病非移植片対宿主病セントラルメモリーＴリンパ球（Ｔｃｍ）表現型を含む非移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、前記細胞が、寛容誘導細胞であり、および／または抗疾患活性を付与され、移植後にリンパ節へホーミングすることができ、前記方法が、

（ａ）Ｔ細胞を含む細胞の集団を提供することであって、前記細胞の集団の前記Ｔ細胞が、ＣＤ４５ＲＡ<sup>-</sup>ＣＤ８<sup>+</sup>表現型を発現し、ＣＤ４<sup>+</sup>、ＣＤ５６<sup>+</sup>およびＣＤ４５ＲＡ<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させた少なくとも４０％のメモリーＴ細胞を含む、提供すること、および

（ｂ）前記メモリーＴ細胞を含む前記細胞の集団を、ウイルス反応性メモリーＴ細胞の富化を可能にするために、ＩＬ－２１の存在下で、前記ウイルスの少なくとも１つがＢＫウイルスを含む、４～１０種類のウイルスに由来するウイルスペプチドと接触させること、および

（ｃ）前記Ｔｃｍ表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、ＩＬ－２１、ＩＬ－１５および／またはＩＬ－７の存在下で工程（ｂ）から生じる前記細胞を培養し、それにより、前記Ｔｃｍ表現型を含む非ＧＶＨＤ誘導細胞の単離された集団を生成すること、を含む、方法。

## 【請求項 3】

セントラルメモリーＴリンパ球（Ｔｃｍ）表現型を含む非移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、前記細胞が、寛容誘導細胞であり、および／または抗疾患活性を付与され、移植後にリンパ節へホーミングすることができ、前記方法が、

（ａ）ドナー対象由来の第１の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の集団を、ＣＤ１４<sup>+</sup>発現細胞を選択することができる抗体と接触させること、および樹状細胞に成熟することができるＣＤ１４<sup>+</sup>発現細胞を選択すること、

（ｂ）前記樹状細胞に、４～１０種類のウイルスに由来するウイルスペプチドを負荷することであって、前記ウイルスの少なくとも１つがＢＫウイルスを含む、負荷すること、

（ｃ）ＣＤ４５ＲＡ<sup>-</sup>ＣＤ８<sup>+</sup>表現型を発現するメモリーＴ細胞を含む細胞の集団を得るために、前記第１のＰＢＭＣの集団と同じドナー対象の第２のＰＢＭＣの集団を、ＣＤ

10

20

30

40

50

4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させることができる1つまたは複数の作用物質で処理すること、

(d) ウイルス反応性メモリーT細胞の富化を可能にするために、IL-21の存在下で、前記メモリーT細胞を含む細胞の前記集団を、工程(b)の前記ウイルスペプチドが負荷された前記樹状細胞と接触させること、および

(e) 前記Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、IL-21、IL-15および／またはIL-7の存在下で工程(d)から生じる前記細胞を培養し、それにより、前記Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団を生成すること、を含む、方法。

【請求項4】

前記PBMCの前記第1の集団および前記PBMCの前記第2の集団が同じバッチに由来する、請求項1または3に記載の方法。

【請求項5】

前記CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>表現型を発現する前記メモリーT細胞が、前記細胞の集団のT細胞の少なくとも40%を構成する、請求項1、3、または4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

IL-21の存在下での前記接触が12時間～6日間影響を受ける、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

IL-21の前記存在下での前記接触が3日間影響を受ける、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

IL-21、IL-15および／またはIL-7のいずれかの前記存在下での前記培養が6～12日間影響を受ける、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

IL-21、IL-15および／またはIL-7のいずれかの前記存在下での前記培養が9日間影響を受ける、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記培養が、グルコースを少なくとも50mg/dlの濃度まで添加することをさらに含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記ウイルスペプチドが抗原提示細胞に提示される、請求項2または6～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記抗原提示細胞が、前記メモリーT細胞を含む前記細胞の集団と同じドナー対象のものである、請求項1または4～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

CD14<sup>+</sup>発現細胞を前記選択することがプラスチック接着によって影響されない、請求項1または3～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記抗原提示細胞が樹状細胞を含む、請求項1または4～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記ウイルスペプチドが4～10種類のウイルスに由来する、請求項1、4～10、または13～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記ウイルスペプチドが、BKウイルス由来の少なくとも1つのペプチドを含む、請求項1、4～10、13～14、または15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

10

20

30

40

50

前記ウイルスペプチドが、エプスタイン・バーウイルス（EBV）ペプチド、サイトメガロウイルス（CMV）ペプチド、BKウイルスペプチド、およびアデノウイルス（Adv）ペプチドを含む、請求項2～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記ウイルスペプチドが、EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、EBV select、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-ペントン、Adv-ヘキソン、BKV-LT、BKV（カプシドVP1）、BKV（カプシドタンパク質VP2）、BKV（カプシドタンパク質VP2、イソプロムVP3）およびBKV（スモールT抗原）のうちの少なくとも1つを含む、請求項2～17のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項19】

前記ウイルスペプチドが、Adv5 Hexon、hCMV pp65、EBV selectおよびBKV-LTのうちの少なくとも1つを含む、請求項2～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記ウイルスペプチドが、少なくとも1種類の細菌ペプチド、真菌ペプチドまたは腫瘍ペプチドをさらに含む、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記PBM Cが対象に対して非同系である、請求項1、3～10、または13～20のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項22】

T細胞を含む前記細胞の集団が、対象に対して非同系である、請求項2、6～12、または17～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項23】

前記Tcm表現型を有する前記細胞が、非GVHD誘導細胞の前記単離された集団の少なくとも30%を含む、請求項1～22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項24】

セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を有する細胞を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団であって、前記細胞が、寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、かつ移植後にリンパ節へホーミングすることができ、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法に従って作製される、非GVHD誘導細胞の単離された集団。

30

【請求項25】

請求項24に記載の前記非GVHD誘導細胞の単離された集団および薬学的に許容され得る担体を有効成分として含む医薬組成物。

【請求項26】

必要とする対象において疾患を処置する方法であって、治療有効量の請求項24に記載の前記非GVHD誘導細胞の単離された集団を前記対象に投与し、それにより、前記対象において前記疾患を処置することを含む方法。

【請求項27】

疾患の処置を必要とする対象において疾患を処置するために特定される医薬品を製造するための、請求項24に記載の前記非GVHD誘導細胞の単離された集団の使用。

40

【請求項28】

細胞または組織の移植片を前記対象に移植することをさらに含む、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

前記医薬品が細胞または組織の移植片をさらに含む、請求項27に記載の使用。

【請求項30】

遺伝子改変T細胞を前記対象に投与することをさらに含む、請求項26または28に記載の方法。

【請求項31】

50

前記医薬品が遺伝子改変 T 細胞をさらに含む、請求項 27 または 29 に記載の使用。

【請求項 32】

前記遺伝子改変 T 細胞が CAR-T 細胞または TCR-トランスジェニック T 細胞を含む、請求項 30 に記載の方法または請求項 31 に記載の使用。

【請求項 33】

前記疾患が悪性疾患である、請求項 26、28、30、もしくは 32 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 27、29、31、もしくは 32 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 34】

前記悪性疾患が、固形腫瘍、腫瘍の転移、または血液悪性腫瘍である、請求項 33 に記載の方法または使用。

【請求項 35】

前記疾患が非悪性疾患である、請求項 26、28、30、もしくは 32 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 27、29、31、もしくは 32 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 36】

移植片拒絶および／または移植片対宿主病 (GVHD) を軽減する、および／または、必要とする対象においてドナー特異的寛容性を誘導する方法であって、前記対象が非同系の細胞または組織の移植を必要としており、前記方法が、治療有効量の請求項 24 に記載の非 GVHD 誘導細胞の単離された集団を前記対象に投与し、それにより、前記対象における移植片拒絶および／または GVHD を軽減することを含む、方法。

【請求項 37】

移植片拒絶および／または移植片対宿主病 (GVHD) を軽減するため、および／または、必要とする対象においてドナー特異的寛容性を誘導するために特定される医薬品を製造するための、請求項 24 に記載の非 GVHD 誘導細胞の単離された集合の使用であって、前記対象は、前記非同系の細胞または組織の移植を必要とする、使用。

【請求項 38】

非同系の細胞または組織の移植を必要とする対象を処置する方法であって、

(a) 細胞または組織の移植片を前記対象に移植すること、および

(b) 前記治療有効量の請求項 24 に記載の前記非 GVHD 誘導細胞の単離された集団を前記対象に投与し、それにより、細胞または組織の移植を必要とする前記対象を処置することを含む、方法。

【請求項 39】

対象への非同系の細胞または組織の移植のためのアジュバント処置として特定される医薬品を製造するための、請求項 24 に記載の非 GVHD 誘導細胞の単離された集団の使用であって、前記対象が、前記非同系の細胞または組織の移植を必要とする使用。

【請求項 40】

前記非 GVHD 誘導細胞の単離された集団が、前記細胞または組織の移植の後での投与のためのものである、請求項 28、30、32～36、もしくは 38 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 29、31～35、37、もしくは 39 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 41】

前記非 GVHD 誘導細胞の単離された集団が、前記細胞または組織の移植の後の 6～9 日目における投与のためのものである、請求項 28、30、32～36、38、もしくは 40 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 29、31～35、37、39、もしくは 40 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 42】

前記非 GVHD 誘導細胞の単離された集団が、理想体重 1 kg あたり少なくとも  $2.5 \times 10^6$  個の CD8<sup>+</sup> 細胞の用量で投与されるためのものである、請求項 28、30、32～36、38、もしくは 40～41 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 29、

10

20

30

40

50

31～35、37、もしくは39～41のいずれか一項に記載の使用。

【請求項43】

前記細胞または組織の移植片が未成熟造血細胞を含む、請求項28、30、32～36、38、もしくは40～42のいずれか一項に記載の方法、または請求項29、31～35、37、もしくは39～42のいずれか一項に記載の使用。

【請求項44】

前記未成熟造血細胞が、  
対象の理想体重1キログラムあたり少なくとも $5 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、および／または  
CD3<sup>+</sup>および／またはCD19<sup>+</sup>発現細胞が枯渇している、および／または  
前記対象の理想体重1kgあたり $5 \times 10^5$ 個未満のCD3<sup>+</sup>発現細胞を含む、ことを含む、請求項43のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項45】

前記移植の前に、前記対象を骨髓非破壊的前処置プロトコルのもとで前処置することをさらに含む、請求項28、30、32～36、38、または40～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

骨髓非破壊的移植前前処置プロトコルをさらに含む、請求項29、31～35、37、または39～44のいずれか一項に記載の使用。

【請求項47】

前記骨髓非破壊的前処置プロトコルが、全身照射(TBI)、部分的身体照射(TLI)、化学療法剤、抗体免疫療法または共刺激遮断のうちの少なくとも1つを含む、請求項45に記載の方法または請求項46に記載の使用。

20

【請求項48】

前記移植の後に治療有効量のシクロホスファミドを前記対象に投与することをさらに含む、請求項28、30、32～36、38、40～45、または47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

治療有効量のシクロホスファミドをさらに含み、前記シクロホスファミドが、前記非同系の細胞または組織の移植の後で前記対象に投与されるべきである、請求項29、31～35、37、39～44、または46～47のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項50】

前記治療有効量の前記シクロホスファミドが、  
前記対象の理想体重1キログラムあたり25～200mgのシクロホスファミドを含む、および／または  
移植後3日目および4日目に2回の用量で前記対象に投与されることになる、請求項48に記載の方法または請求項49に記載の使用。

【請求項51】

未成熟造血細胞移植を必要とする対象を処置する方法であって、

(a) 前記対象を骨髓非破壊的移植前前処置プロトコルのもとで前処置することであって、前記骨髓非破壊的前処置は全身照射(TBI)および化学療法剤を含み、前記TBIおよび前記化学療法剤は、移植前の－7～－1日目に投与される、前処置すること、

40

(b) 前記T細胞枯渇未成熟造血細胞の用量を前記対象に移植することであって、前記T細胞枯渇未成熟造血細胞は、前記対象の理想体重1キログラムあたり $5 \times 10^5$ 個未満のCD3<sup>+</sup>T細胞を含み、かつ、前記T細胞枯渇未成熟造血細胞は、前記対象の理想体重1キログラムあたり少なくとも $5 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含む、移植すること、

(c) 治療有効量のシクロホスファミドを前記対象に投与することであって、前記治療有効量の前記シクロホスファミドが、前記対象の理想体重1キログラムあたり25～200mgのシクロホスファミドを含み、前記治療有効量の前記シクロホスファミドが、前記T細胞枯渇未成熟造血細胞の前記移植の3日後および4日後2回の用量で前記対象に投与

50

されることになること、および

(d) 請求項 24 に記載の治療有効量の非 G V H D 誘導細胞の単離された集団を前記対象に投与することであって、非 G V H D 誘導細胞の前記単離された集団は、前記 T 細胞枯渇未成熟造血細胞の前記移植の後の 6 ～ 9 日目に投与され、

それによって前記未成熟造血細胞移植を必要とする前記対象を処置することを含む、方法。

【請求項 52】

コルチコステロイドが投与されない、請求項 48、50、もしくは 51 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 49 ～ 50 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 53】

前記対象が移植後に G V H D 予防で長期的に処置されていない、請求項 48、50、もしくは 51 ～ 52 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 49 ～ 50、もしくは 52 のいずれか一項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

【0002】

本願は、2019年8月6日に出願された米国仮特許出願第 62 / 883, 164 号の優先権の利益を主張するものであり、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

本発明は、そのいくつかの実施形態では、メモリー T 細胞から生成されたベト細胞に關し、より詳細には、しかし排他的ではなく、安定している長期の細胞の移植または組織の移植を達成するための治療においてそれらを製造および使用する方法に関する。

【0004】

高用量化学放射線療法「前処理」が血液悪性腫瘍に対する同種造血細胞移植（アロー H C T）で永続的寛解を達成するために重要であるというパラダイムは、その後の免疫療法と併せて、新たに形成されたドナー由来免疫系の免疫移植片対悪性腫瘍効果を強調するように移行している。しかしながら、移植後の初期期間中に致死的な感染から患者を保護することができる、より強固な宿主免疫系を保持する前処置の減少はまた、移植片拒絶のリスクの増大に関連する。ハプロタイプ一致 H C T では、移植片中のアロ反応性 T 細胞が宿主 T 細胞を攻撃し、ドナー幹細胞の生着の道を開くことができるので、T 細胞の完全移植を使用することによってこれを克服することができる。しかしながら、そのようなアロ反応性 T 細胞はまた、生命を脅かす移植片対宿主（G V H）反応性に関連し、移植後に強力な免疫抑制薬の使用を必要とする。移植後に高用量シクロホスファミド（C Y）を使用して移植片対宿主病（G V H D）の重症度を軽減することにおいて、近年、いくつかの進歩がなされている。それにもかかわらず、慢性 G V H D は依然として問題であり、移植片対悪性腫瘍効果に悪影響を及ぼす免疫抑制薬の長期使用が必要である。さらに、多くの患者における G V H D の発生は、不良な胸腺機能に関連し、十分な抗腫瘍免疫をさらに制限する。

【0005】

この障害を克服するために、「大量投与」T 細胞枯渇ハプロタイプ一致 H C T を使用することができ、これは移植後免疫抑制療法がなくても G V H D リスクがない。しかしながら、骨髓非破壊的（N M A）前処置後に生着を達成することは、移植前の前処置レジメンを生き残った高レベルの抗ドナー T 細胞クローンに起因して依然として大きな課題である。この課題に対処するために使用される 1 つのアプローチは、移植直後の高用量 C Y の使用である（国際公開第 2013 / 093920 号パンフレットおよび国際公開第 2013 / 093919 号パンフレットに記載されている）。

10

20

30

40

50

さらに、GVH反応性を欠く寛容誘導細胞（例えばベト細胞）の作製および移植片移植のためのアジュバント処置としての使用のために様々なアプローチが企図されており、いくつかを以下に要約する。

【0006】

国際公開第2001/49243号パンフレットは、非アロ反応性抗第三者細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の使用を開示しており、非アロ反応性抗第三者CTLは、ドナーのTリンパ球を1つまたは複数の第三者抗原に対して（外因性IL-2の非存在下で）方向付けることによって生成され、用量は、アロ反応性CTLに発達することができるTリンパ球（例えばCD4<sup>+</sup>T細胞および／またはCD56<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞）を実質的に枯渇させている。

10

【0007】

国際公開第2007/023491号パンフレットは、対象における非同系移植片の移植片拒絶を低減または防止するための寛容原性細胞の使用を開示している。開示される寛容原性T調節細胞（例えばCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞）は、対象および移植片の両方と非同系である任意のドナーに由来し得る（「第三者」寛容原性細胞）。移植片（例えば骨髄）は、対象と同種または異種である任意の移植片ドナーに由来し得る。

【0008】

国際公開第2010/049935号パンフレットは、セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を有し、寛容誘導細胞であり、移植後にリンパ節へホーミングすることができる非GVHD誘導性抗第三者細胞の使用を開示している。国際公開第2010/049935号パンフレットによれば、細胞は、非同系末梢血単核細胞（PBMC）を、サイトカインを欠乏させた培養物中の第三者抗原と接触させ、次いで、Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にする条件下でIL-15の存在下で細胞を培養することによって生成される。

20

【0009】

国際公開第2012/032526号パンフレットは、疾患の処置における、Tcm表現型を有する非GVHD誘導性抗第三者細胞であって、寛容誘導細胞であり、細胞が移植後にリンパ節へホーミングすることができる細胞の使用を開示している。国際公開第2012/032526号パンフレットによれば、細胞は、GVH反応性細胞（例えば、1～5日間の培養）の排除を可能にする条件下でIL-21の存在下または非存在下でPBMCを1つまたは複数の第三者抗原と接触させ、次いでTcm表現型を含む細胞の増殖を可能にする条件下でIL-15の存在下で細胞を培養することによって生成される。

30

【0010】

国際公開第2013/035099号パンフレットは、セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を有し、寛容誘導細胞であり、および／または抗疾患活性を付与され、移植後にリンパ節へホーミングすることができる非GVHD誘導性抗第三者細胞の使用を開示している。国際公開第2013/035099号パンフレットによれば、細胞は、抗原反応性細胞の富化を可能にするようにIL-21の存在下でPBMCを第三者抗原と接触させ、次いで、Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、抗原を含まない環境においてIL-21、IL-15およびIL-7の存在下で細胞を培養することによって生成される。

40

【0011】

国際公開第2018/002924号パンフレットは、メモリーT細胞から生成されたベト細胞、それらの製造方法ならびに移植および疾患の治療における使用を開示している。国際公開第2018/002924号パンフレットによれば、ベト細胞は、Tcm表現型を有する非GVHD誘導性抗第三者細胞であり、寛容誘導細胞であり、および／または抗疾患活性を付与され、移植後にリンパ節にホーミングすることができる。

【0012】

さらなる背景技術としては、国際公開第2017/009852号パンフレット、同第2017/009853号パンフレットおよび同第2018/134824号パンフレット

50

トが挙げられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】国際公開第2013/093920号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2013/093919号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2001/49243号パンフレット

【特許文献4】国際公開第2007/023491号パンフレット

【特許文献5】国際公開第2010/049935号パンフレット

【特許文献6】国際公開第2012/032526号パンフレット

10

【特許文献7】国際公開第2013/035099号パンフレット

【特許文献8】国際公開第2018/002924号パンフレット

【特許文献9】国際公開第2017/009852号パンフレット

【特許文献10】国際公開第2017/009853号パンフレット

【特許文献11】国際公開第2018/134824号パンフレット

【発明の概要】

【0014】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を含む非移植片対宿主病（GVHD）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、細胞が、寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、かつ移植後にリンパ節へホーミングすることができる方法が提供され、方法は、

20

（a）ドナー対象由来の末梢血単核細胞（PBMC）の第1の集団を、CD14<sup>+</sup>発現細胞に結合することができる抗体と接触させること、および抗原提示細胞に成熟することができるCD14<sup>+</sup>発現細胞を選択すること、

（b）抗原提示細胞にウイルスペプチドを負荷すること、

（c）CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>表現型を発現するメモリーT細胞を含む細胞の集団を得るために、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させることができる1つまたは複数の作用物質で第1のPBMCの集団と同じドナー対象の第2のPBMCの集団を処置すること、

（d）ウイルス反応性メモリーT細胞の富化を可能にするために、IL-21の存在下で、メモリーT細胞を含む細胞の集団を工程（b）のウイルスペプチドが負荷された抗原提示細胞と接触させること、および

30

（e）Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、IL-21、IL-15および／またはIL-7の存在下で工程（d）から得られた細胞を培養し、それにより、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団を作製することを含む。

【0015】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を含む非移植片対宿主病（GVHD）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、細胞が、寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、かつ移植後にリンパ節へホーミングすることができる方法が提供され、方法は、

40

（a）T細胞を含む細胞の集団を提供することであって、細胞の集団のT細胞は、CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>表現型を発現し、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させた少なくとも40%のメモリーT細胞を含む、提供すること、

（b）メモリーT細胞を含む細胞の集団に、4～10種類のウイルスに由来するウイルスペプチドを接触させることであって、前記ウイルスの少なくとも1つが、ウイルス反応性メモリーT細胞の富化を可能にするために、IL-21の存在下で、BKウイルスを含む、接触すること、および

（c）Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、IL-21、IL-15および／またはIL-7の存在下で工程（b）から得られた細胞を培養し、それにより、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団を作製することを含む。

50

## 【0016】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、セントラルメモリーＴリンパ球（Ｔｃｍ）表現型を含む非移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、細胞が、寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、かつ移植後にリンパ節へホーミングすることができる方法が提供され、方法は、

（ａ）ドナー対象由来の第１の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の集団を、ＣＤ１４<sup>+</sup>発現細胞を選択することができる抗体と接触させ、樹状細胞に成熟することができるＣＤ１４<sup>+</sup>発現細胞を選択すること、

（ｂ）樹状細胞に、４～１０種類のウイルスに由来するウイルスペプチドを負荷することであって、前記ウイルスの少なくとも１つがＢＫウイルスを含む負荷すること、

（ｃ）ＣＤ４５ＲＡ<sup>-</sup>ＣＤ８<sup>+</sup>表現型を発現するメモリーＴ細胞を含む細胞の集団を得るために、ＣＤ４<sup>+</sup>、ＣＤ５６<sup>+</sup>およびＣＤ４５ＲＡ<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させることができる１つまたは複数の作用物質で第１のＰＢＭＣの集団と同じドナー対象の第２のＰＢＭＣの集団を処置すること、

（ｄ）ウイルス反応性メモリーＴ細胞の富化を可能にするために、ＩＬ－２１の存在下で、メモリーＴ細胞を含む細胞の集団を工程（ｂ）のウイルスペプチドが負荷された樹状細胞と接触させること、および

（ｅ）Ｔｃｍ表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、ＩＬ－２１、ＩＬ－１５および／またはＩＬ－７の存在下で工程（ｄ）から得られた細胞を培養し、それにより、Ｔｃｍ表現型を含む非ＧＶＨＤ誘導細胞の単離された集団を作製することを含む。

10

20

## 【0017】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、セントラルメモリーＴリンパ球（Ｔｃｍ）表現型を有する細胞を含む非ＧＶＨＤ誘導細胞の単離された集団であって、本発明のいくつかの実施形態の方法に従って作製され、細胞が寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、移植後にリンパ節へホーミングすることができる集団が提供される。

## 【0018】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、本発明のいくつかの実施形態の非ＧＶＨＤ誘導細胞の単離された集団と、薬学的に許容され得る担体とを有効成分として含む薬学的組成物が提供される。

30

## 【0019】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、必要とする対象において疾患を処置する方法であって、治療有効量の本発明のいくつかの実施形態の非ＧＶＨＤ誘導細胞の単離された集団を対象に投与し、それにより、対象において疾患を処置することを含む方法が提供される。

## 【0020】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、必要とする対象において疾患を処置するために特定される医薬品を製造するための、本発明のいくつかの実施形態の非ＧＶＨＤ誘導細胞の単離された集団の使用が提供される。

## 【0021】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、移植片拒絶および／または移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を軽減する、および／または、必要とする対象においてドナー特異的寛容性を誘導する方法であって、対象が非同系の細胞または組織の移植を必要としており、方法が、治療有効量の本発明のいくつかの実施形態の非ＧＶＨＤ誘導細胞の単離された集団を対象に投与し、それにより、対象における移植片拒絶および／またはＧＶＨＤを軽減することを含む、方法が、提供される。

40

## 【0022】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、移植片拒絶および／または移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を軽減するため、および／または、必要とする対象においてドナー特異的寛容性を誘導するために特定される医薬品を製造するための、本発明のいくつかの実施形

50

態の非GVHD誘導細胞の単離された集合の使用であって、対象は、非同系の細胞または組織の移植を必要とする、使用が提供される。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、非同系の細胞または組織の移植を必要とする対象を処置する方法であって、

(a) 細胞または組織の移植片を対象に移植すること、および

(b) 本発明のいくつかの実施形態の治療有効量の非GVHD誘導細胞の単離された集団を対象に投与し、それにより、細胞または組織の移植を必要とする対象を処置することを含む、方法が提供される。

【0024】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、対象への非同系の細胞または組織の移植のためのアジュバント処置として特定される医薬品を製造するための、本発明のいくつかの実施形態の非GVHD誘導細胞の単離された集団の使用であって、対象が、非同系の細胞または組織の移植を必要としている使用が提供される。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、未成熟造血細胞移植を必要とする対象を処置する方法であって、

(a) 対象を骨髄非破壊的移植前処置プロトコルのもとで前処置することであって、骨髄非破壊的前処置は全身照射(TBI)および化学療法剤を含み、TBIおよび化学療法剤は、移植前の-7~-1日目に投与される(例えば移植前の-7~-2日目、例えば-6~-1日目に)、前処置すること、

(b) T細胞枯渇未成熟造血細胞の用量を対象に移植することであって、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $5 \times 10^5$ 個未満のCD3<sup>+</sup>T細胞を含み、かつ、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり少なくとも $5 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含む、移植すること、

(c) 治療有効量のシクロホスファミドを対象に投与することであって、治療有効量のシクロホスファミドが、対象の理想体重1キログラムあたり25~200mgのシクロホスファミドを含み、治療有効量のシクロホスファミドが、T細胞枯渇未成熟造血細胞の移植の3日後および4日後2回の用量で対象に投与されることになること、および

(d) 治療有効量の本発明のいくつかの実施形態の非GVHD誘導細胞の単離された集団を対象に投与することであって、非GVHD誘導細胞の単離された集団は、T細胞枯渇未成熟造血細胞の移植の後の6~9日目に投与され、

それによって未成熟造血細胞移植を必要とする対象を処置することを含む、方法が提供される。

【0026】

本発明のいくつかの実施形態によれば、PBMCの第1の集団およびPBMCの第2の集団は、同じバッチに由来する。

【0027】

本発明のいくつかの実施形態によれば、CD45RA-CD8<sup>+</sup>表現型を発現するメモリーT細胞は、細胞の集団のT細胞の少なくとも40%を構成する。

【0028】

本発明のいくつかの実施形態によれば、薬剤は抗体である。

【0029】

本発明のいくつかの実施形態によれば、IL-21の存在下での接触は、12時間~6日間影響を受ける。

【0030】

本発明のいくつかの実施形態によれば、IL-21の存在下での接触は、3日間影響を受ける。

【0031】

本発明のいくつかの実施形態によれば、IL-21、IL-15および／またはIL-

10

20

30

40

50

7のいずれかの存在下での培養は、6日間～12日間影響を受ける。

【0032】

本発明のいくつかの実施形態によれば、IL-21、IL-15および／またはIL-7のいずれかの存在下での培養は、9日間影響を受ける。

【0033】

本発明のいくつかの実施形態によれば、培養は、グルコースを少なくとも50mg/dlの濃度まで添加することをさらに含む。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、抗原提示細胞にて提示される。

【0035】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原提示細胞は、ドナー対象由来のPBMCを、CD14<sup>+</sup>発現細胞に結合することができる抗体と接触させ、抗原提示細胞に成熟することができるCD14<sup>+</sup>発現細胞を選択することを含む方法により得られる。

【0036】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原提示細胞は、メモリーT細胞を含む細胞の集団と同じドナー対象のものである。

【0037】

本発明のいくつかの実施形態によれば、CD14<sup>+</sup>発現細胞を選択することは、プラスチック接着によって影響されない。

【0038】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原提示細胞は樹状細胞を含む。

【0039】

本発明のいくつかの実施形態によれば、樹状細胞は成熟樹状細胞である。

【0040】

本発明のいくつかの実施形態によれば、樹状細胞は、樹状細胞成熟因子を含む培養物中でCD14<sup>+</sup>発現細胞を培養することを含む方法によって得られる。

【0041】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、1～10種類のウイルスに由来する。

【0042】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、2～10種類のウイルスに由来する。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4～10種類のウイルスに由来する。

【0044】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドの少なくとも1つは、BKウイルス由来の少なくとも1つのペプチドを含む。本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、エプスタイン・バーウイルス（EBV）ペプチド、サイトメガロウイルス（CMV）ペプチド、BKウイルスペプチドおよびアデノウイルス（Adv）ペプチドを含む。

【0045】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、EBV select、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-ペントン、Adv-ヘキソン、BKV LT、BKV（カプシドVP1）、BKV（カプシドタンパク質VP2）、BKV（カプシドタンパク質VP2、イソプロムVP3）およびBKV（スモールT抗原）のうちの少なくとも1つを含む。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、Adv5 Hexon、

10

20

30

40

50

h C M V p p 6 5、E B V s e l e c t および B K V L T のうちの少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 4 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、A d V 5 H e x o n、h C M V p p 6 5、E B V s e l e c t および B K V L T を含む。

【 0 0 4 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチドは、少なくとも 1 種類の細菌ペプチド、真菌ペプチドまたは腫瘍ペプチドをさらに含む。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチド、および少なくとも 1 種類の細菌ペプチド、真菌ペプチド、または腫瘍ペプチドと一緒に利用される。 10

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態によれば、ウイルスペプチド、および細菌ペプチド、真菌ペプチド、または腫瘍ペプチドの少なくとも 1 種類が別個に利用される。

【 0 0 5 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、P B M C は、対象に対して非同系である。

【 0 0 5 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、P B M C は、対象に対して同系である。

【 0 0 5 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、メモリー T 細胞を含む細胞の集団は、対象に対して非同系である。 20

【 0 0 5 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、メモリー T 細胞を含む細胞の集団は、対象に対して同系である。

【 0 0 5 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、T c m 表現型を有する細胞は、C D 3 <sup>+</sup>、C D 8 <sup>+</sup>、C D 6 2 L <sup>+</sup>、C D 4 5 R A <sup>-</sup>、C D 4 5 R O <sup>+</sup> のシグネチャを含む。

【 0 0 5 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、T c m 表現型を有する細胞は、非 G V H D 誘導細胞の単離された集団の少なくとも 3 0 % を構成する。 30

【 0 0 5 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非 G V H D 誘導細胞の単離された集団は、新鮮な細胞として投与するために処方される。

【 0 0 5 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非 G V H D 誘導細胞として投与するために処方される。

【 0 0 5 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、方法は、細胞または組織の移植片を対象に移植することをさらに含む。

【 0 0 6 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、医薬品は、細胞または組織の移植片をさらに含む。 40

【 0 0 6 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、方法は、対象に遺伝子改変 T 細胞を投与することをさらに含む。

【 0 0 6 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、医薬品は、遺伝子改変 T 細胞をさらに含む。

【 0 0 6 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、遺伝子改変 T 細胞は、C A R - T 細胞または T C R - トランスジェニック T 細胞を含む。 50

## 【0064】

本発明のいくつかの実施形態によれば、細胞または組織の移植片は未成熟造血細胞を含む。

## 【0065】

本発明のいくつかの実施形態によれば、疾患は悪性疾患である。

## 【0066】

本発明のいくつかの実施形態によれば、悪性疾患は、固形腫瘍または腫瘍転移である。

## 【0067】

本発明のいくつかの実施形態によれば、悪性疾患は血液悪性腫瘍である。

## 【0068】

本発明のいくつかの実施形態によれば、悪性疾患は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、肉腫、神経芽細胞腫、結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、食道癌、滑膜細胞癌、肝癌、膵臓癌、および転移、または再発からなる群から選択される。

## 【0069】

本発明のいくつかの実施形態によれば、疾患は非悪性疾患である。

## 【0070】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非悪性疾患は、臓器機能不全または臓器不全、血液学的疾患、移植片関連疾患、感染性疾患、遺伝性疾患または障害、鎌状赤血球症、自己免疫疾患、および代謝障害、外傷および傷害からなる群から選択される。

## 【0071】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非悪性疾患は、再生不良性貧血、重度の免疫不全および非悪性骨髄不全からなる群から選択される。

## 【0072】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非GVHD誘導細胞の単離された集団は、細胞または組織の移植（例えば、非同系の細胞または組織の移植）後における投与のためのものである。

## 【0073】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非GVHD誘導細胞の単離された集団は、細胞または組織の移植（例えば、非同系の細胞または組織の移植）の6～9日後における投与のためのものである。

## 【0074】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非GVHD誘導細胞の単離された集団は、細胞または組織の移植（例えば、非同系の細胞または組織の移植）の7日後における投与のためのものである。

## 【0075】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非GVHD誘導細胞の単離された集団が、理想体重1kgあたり少なくとも $2.5 \times 10^6$ 個のCD8<sup>+</sup>細胞の用量で投与されるためのものである。

## 【0076】

本発明のいくつかの実施形態によれば、非同系の細胞または組織の移植片は未成熟造血細胞を含む。

## 【0077】

本発明のいくつかの実施形態によれば、未成熟造血細胞は、T細胞枯渇未成熟造血細胞を含む。

## 【0078】

本発明のいくつかの実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり少なくとも $5 \times 10^6$ CD34<sup>+</sup>を含む。

## 【0079】

本発明のいくつかの実施形態によれば、未成熟造血細胞は、CD3<sup>+</sup>細胞および／またはCD19<sup>+</sup>細胞が枯渇している。

10

20

30

40

50

## 【0080】

本発明のいくつかの実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $4 \times 10^5$ 未満のCD3<sup>+</sup>発現細胞を含む。

## 【0081】

本発明のいくつかの実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $3 \times 10^5$ 未満のCD3<sup>+</sup>発現細胞を含む。

## 【0082】

本発明のいくつかの実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $2 \times 10^5$ 未満のCD3<sup>+</sup>発現細胞を含む。

## 【0083】

本発明のいくつかの実施形態によれば、方法は、移植の前に、対象を骨髄非破壊的前処置プロトコルのもとで前処置することをさらに含む。

## 【0084】

本発明のいくつかの実施形態によれば、方法はさらに、骨髄非破壊的移植前前処置プロトコルを含む。

## 【0085】

本発明のいくつかの実施形態によれば、骨髄非破壊的前処置プロトコルは、全身照射（TBI）、部分的身体照射（TLI）、化学療法剤、抗体免疫療法または共刺激遮断のうちの少なくとも1つを含む。

## 【0086】

本発明のいくつかの実施形態によれば、TBIは、1～5 Gyの範囲内の単回照射線量または分割照射線量を含む。

## 【0087】

本発明のいくつかの実施形態によれば、TBIは移植の－1日前に投与される。

## 【0088】

本発明のいくつかの実施形態によれば、TBIは移植の日に、例えば0日目の朝に投与され、移植は同日に、例えば夕方に行われる。

## 【0089】

本発明のいくつかの実施形態によれば、化学療法剤は、フルダラビン、シクロホスファミド、ラパマイシン、ブスルファン、トリスルファン、メルファランまたはチオテパのうちの少なくとも1つを含む。

## 【0090】

本発明のいくつかの実施形態によれば、骨髄非破壊的前処置プロトコルはT細胞減量を含む。

## 【0091】

本発明のいくつかの実施形態によれば、骨髄非破壊的前処置プロトコルはT細胞減量含まない。

## 【0092】

本発明のいくつかの実施形態によれば、T細胞減量は抗胸腺細胞グロブリン（ATG）抗体、抗CD52抗体、または抗CD3（OKT3）抗体の少なくとも1つにより影響される。

## 【0093】

本発明のいくつかの実施形態によれば、方法は、移植の後に治療有効量のシクロホスファミドを対象に投与することをさらに含む。

## 【0094】

本発明のいくつかの実施形態によれば、治療有効量のシクロホスファミドをさらに含み、シクロホスファミドが、非同系の細胞または組織の移植の後で対象に投与される。

## 【0095】

本発明のいくつかの実施形態によれば、治療有効量のシクロホスファミドは、対象の理想体重1キログラムあたり25～200 mgのシクロホスファミドを含む。

10

20

30

40

50

## 【0096】

本発明のいくつかの実施形態によれば、治療有効量のシクロホスファミドが、対象に、移植後3日目および4日目に2回の用量で投与されることになる。

## 【0097】

本発明のいくつかの実施形態によれば、骨髄非破壊的移植前前処置プロトコルはT細胞減量を含む。

## 【0098】

本発明のいくつかの実施形態によれば、T細胞減量は抗胸腺細胞グロブリン（ATG）によって影響される。

## 【0099】

本発明のいくつかの実施形態によれば、骨髄非破壊的移植前前処置プロトコルはT細胞減量を含まない。

## 【0100】

本発明のいくつかの実施形態によれば、コルチコステロイドは投与されない。

## 【0101】

本発明のいくつかの実施形態によれば、対象は、移植後にGVHD予防によって長期的に処置されない。

## 【0102】

本発明のいくつかの実施形態によれば、対象はヒト対象である。

## 【0103】

特に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および／または科学用語は、本発明が関係する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験に使用することができるが、例示的な方法および／または材料を以下に記載する。矛盾する場合、定義を含む特許明細書が支配する。さらに、材料、方法、および例は単なる例示であり、必ずしも限定することを意図するものではない。

## 【0104】

本明細書では、本発明のいくつかの実施形態を、単なる例として、添付の図面を参照して説明する。これより図面を詳細に具体的に参照すると、示されている詳細は例としてであり、本発明の実施形態の例示的な説明の目的のためであることが強調される。これに関して、図面と共に得られる説明は、本発明の実施形態がどのように実施され得るかを当業者に明らかにする。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0105】

【図1】本発明のいくつかの実施形態による抗ウイルスCD8<sup>+</sup>β細胞枯渇細胞の処理および試験を概説するフロー図である。

【図2】本発明のいくつかの実施形態によるCD34<sup>+</sup>富化およびCD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>枯渇細胞の処理および試験を概説するフロー図である。

【図3】本発明のいくつかの実施形態による使用のための新鮮な未成熟造血細胞移植を伴うレシピエント対象の前処置レジメンの概略図である。

【図4】本発明のいくつかの実施形態による使用のための凍結保存の未成熟造血細胞移植を伴うレシピエント対象の前処置レジメンの概略図である。

【図5】T細胞減量（ATGを用いる）、フルダラビンおよび3GYのTBIによる骨髄非破壊的前処置の後での、ミスマッチ大量投与T細胞枯渇造血幹細胞移植を、移植後の高用量CYと組み合わせる併用プロトコルの概略図である。

【図6】7日目のβ細胞の注入が、レシピエントのT細胞減量の非存在下で移植片拒絶を克服することを可能にすることを示すグラフである。C3Hレシピエントマウスに、3.5GYのTBI後に、大量投与T細胞枯渇Balb／Nude（H2<sup>d</sup>）BM細胞を移植した。移植マウスはまた、3～4日目にCY移植後（100mg／kg）（Nu／BN＋CTXと命名）、または移植後7日目に5×10<sup>6</sup>Balb／cβTcm（H2<sup>d</sup>）

10

20

30

40

50

(Nu/BN+TcmD-7と命名)、またはその両方(Nu/BN+TcmD7+CTXと命名)を受けた。末梢血中のドナー細胞の割合を、抗ドナーおよび抗宿主(H2<sup>d</sup>およびH2<sup>k</sup>)抗体を使用してFACSによって分析した。各ドットは、適切な群に属する1匹のマウスを表す。

【図7】7日目のベト細胞の投与によって置き換えられるATGを含まない治療プロトコルの概略図である。

【図8A】INF- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ の細胞内染色によって決定されるTcm細胞の抗ウイルス活性を示す。ベト-Tcm細胞を、ブレフェルジンA(eBioscience)の存在下、37℃で5%CO<sub>2</sub>で6時間、それぞれのウイルスペプチド混合物(EBV、CMV、Adeno、BKV)と共培養した。細胞を固定し、透過処理し(Invirogen Fix&Permセット)、CD45、CD3、CD8、IFN $\gamma$ およびTNF $\alpha$ (BD)について免疫染色した。陽性対照には、PMA/イオノマイシンによるTCR非依存性刺激が含まれた。細胞をCD45<sup>+</sup>/FSCリンパ球ゲートおよびCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>でゲートした。

【図8B】INF- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ の細胞内染色によって決定されるTcm細胞の抗ウイルス活性を示す。ベト-Tcm細胞を、ブレフェルジンA(eBioscience)の存在下、37℃で5%CO<sub>2</sub>で6時間、それぞれのウイルスペプチド混合物(EBV、CMV、Adeno、BKV)と共培養した。細胞を固定し、透過処理し(Invirogen Fix&Permセット)、CD45、CD3、CD8、IFN $\gamma$ およびTNF $\alpha$ (BD)について免疫染色した。陽性対照には、PMA/イオノマイシンによるTCR非依存性刺激が含まれた。細胞をCD45<sup>+</sup>/FSCリンパ球ゲートおよびCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>でゲートした。

【図8C】INF- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ の細胞内染色によって決定されるTcm細胞の抗ウイルス活性を示す。ベト-Tcm細胞を、ブレフェルジンA(eBioscience)の存在下、37℃で5%CO<sub>2</sub>で6時間、それぞれのウイルスペプチド混合物(EBV、CMV、Adeno、BKV)と共培養した。細胞を固定し、透過処理し(Invirogen Fix&Permセット)、CD45、CD3、CD8、IFN $\gamma$ およびTNF $\alpha$ (BD)について免疫染色した。陽性対照には、PMA/イオノマイシンによるTCR非依存性刺激が含まれた。細胞をCD45<sup>+</sup>/FSCリンパ球ゲートおよびCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>でゲートした。

【発明を実施するための形態】

【0106】

本発明は、そのいくつかの実施形態では、メモリーT細胞から生成されたベト細胞に関し、より詳細には、しかし排他的ではなく、安定している長期の細胞の移植または組織の移植を達成するための治療においてそれらを製造および使用方法に関する。

【0107】

本発明の原理および動作は、図面および添付の説明を参照してよりよく理解され得る。

【0108】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、以下の説明に記載されるか実施例によって例示される詳細に必ずしも限定されないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態が可能であり、または様々な方法で実施または実行することができる。また、本明細書で使用される表現および用語は、説明目的のためのものであり、限定するものと見なされるべきではないことを理解されたい。

【0109】

本発明を実施に移している間に、本発明者らは、移植片対宿主(GVH)反応を誘導することなく、抗疾患活性(例えば抗ウイルス活性)も含む大規模な用量の寛容誘導細胞(例えばベト細胞)を作製するための改善されたプロトコルを明示した。これらの細胞は、ウイルス提示樹状細胞を産生(PBMCからのCD14<sup>+</sup>細胞の選択、成熟因子における培養、およびウイルスペプチドの特定の組み合わせによる負荷による)し、次いで、ウイルス抗原活性化に使用されるウイルスペプチドの特定の組み合わせによってメモリーCD

8 T細胞からアロ反応性クローンを枯渇させることによって、生成された。本発明者らはさらに、T細胞枯渇大量投与同種造血細胞移植（アローHCT）を、これらの移植を促進するベト細胞（例えば、HCT後に、例えば、HCT後+7日目に投与される）で補うことにより、宿主抗ドナーT細胞が寛容化され、安全な骨髓非破壊的（NMA）前処置（例えば、TBIおよびフルダラビンなどの化学療法剤を含む）後のGVHDの非存在下での生着が、シクロホスファミド（例えば、HCT後+3日目および+4日目に投与）を含む最小限の移植後免疫抑制療法で可能になることを発見した。

#### 【0110】

簡潔には、非動員末梢血単核細胞（PBMC）を細胞のドナーから得て、Ficollを使用して分画して単核細胞（MNC）を得た。MNCを2つの画分に分離し、1つは刺激細胞（すなわち、ウイルスペプチドを提示する抗原提示細胞）を生成するためのものであり、第2のものは抗ウイルスセントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベト細胞を生成するためのものであった。したがって、CD14結合モノクローナル抗体を使用してMNC画分からCD14<sup>+</sup>発現細胞を選択することによって、第1のMNC画分から刺激細胞を生成し、CD14<sup>+</sup>発現細胞を、IL-4、GM-CSF、IFN-γおよびLPSを含む樹状細胞成熟因子と共に16時間増殖させた。次いで、成熟樹状細胞（mDC）に、EBV、CMV、BKV、およびアデノウイルスを含むウイルスペプチドを負荷し、放射線照射した（例えば25 Gyによって）。同時に、メモリー細胞を、超常磁性粒子にコンジュゲートしたCD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>、およびCD45RA<sup>+</sup>抗体を使用したCD4<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>発現細胞の陰性の選択によって、第2のMNC画分から富化した。CD4<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>枯渇細胞を、サイトカインを含まず、IL-21のみを補充したT細胞増殖培地（このような条件は、ウイルス反応性メモリーCD8T細胞の増殖、およびGVH反応性細胞の排除を可能にする）の中で、ウイルス負荷樹状細胞（DCに対する5:1細胞の比で）と3日間共培養した。3日後、T細胞をIL-21、IL-15、およびIL-7の存在下でさらに9日間培養した（そのような条件は、Tcmの表現型を含む細胞の増殖を可能にする）。細胞培地を2日ごとに交換し、グルコースおよびPHの値をモニターし、必要に応じて調整した。得られた細胞の集団は、免疫表現型検査（例えば、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>の発現によって）および機能的免疫研究によって（例えば、抗ウイルス活性を評価することによって、例えば、培養の開始時に使用した元のウイルスペプチドに対してTcm細胞を再刺激し、INFγ<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>細胞のパーセンテージを、例えばFACSによって測定することによって）決定される抗ウイルス性セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベト細胞を含む。

#### 【0111】

抗ウイルス性セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベト細胞は、骨髓非破壊的（NMA）前処置レジメン後の同種異系CD34<sup>+</sup>リッチなCD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>枯渇造血細胞の移植（すなわち、大量投与T細胞枯渇同種異系造血幹細胞（HSC）の移植）の生着を促進する。したがって、例えば、レシピエントの対象は、調製レジメンとして、-6日目~-3日目に（または-7日目~-4日目に）フルダラビンで毎日処置され、続いて-1日目に（または-2日目に）低用量TBI（すなわち、それぞれ移植前の6~3日目、7~4日目、1日目、または2日目に）で処置され得る。+3日目および+4日目（すなわち移植後3~4日目に）、患者はシクロホスファミド（CY）を受け、続いて+7日目（すなわち、移植後+7日目）にベト細胞の注入を受ける。場合により、レシピエントの対象においてT細胞の減量を誘導するために、ATGを移植前の-9~-7日目（または-10~-8日目）に毎日投与することができる。

#### 【0112】

まとめると、抗ウイルス性セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベト細胞は、ドナー細胞に対する免疫寛容を誘導するそれらの能力のために、ドナー造血始原体の生着の増強と相まって、疾患の処置（例えば、ウイルス感染からの保護またはウイルス感染の治療）を提供する。さらに、ベト細胞は、安全な骨髓非破壊的レジメンの後、長期の免疫抑制を伴うことなく、大量投与T細胞枯渇同種HSC移植の生着を可能にする。さらに、提供された大規模な

プロトコルは、ヒトの対象の治療に使用するのに適した用量で抗ウイルス性セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベト細胞を生成することを可能にする。

【0113】

したがって、本発明の一態様によれば、セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を含む非移植片対宿主病（GVHD）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、細胞が、寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、かつ移植後にリンパ節へホーミングすることができる方法が提供され、方法は、

（a）ドナー対象由来の末梢血単核細胞（PBMC）の第1の集団を、CD14<sup>+</sup>発現細胞に結合することができる抗体と接触させること、および抗原提示細胞に成熟することができるCD14<sup>+</sup>発現細胞を選択すること、

10

（b）抗原提示細胞にウイルスペプチドを負荷すること、

（c）CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>表現型を発現するメモリーT細胞を含む細胞の集団を得るために、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させることができる1つまたは複数の作用物質で第1のPBMCの集団と同じドナー対象の第2のPBMCの集団を処置すること、

（d）ウイルス反応性メモリーT細胞の富化を可能にするために、IL-21の存在下で、メモリーT細胞を含む細胞の集団を工程（b）のウイルスペプチドが負荷された抗原提示細胞と接触させること、および

（e）Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、IL-21、IL-15および／またはIL-7の存在下で工程（d）から得られた細胞を培養し、それにより、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団を作製することを含む。

20

【0114】

本発明の一態様によれば、セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を含む非移植片対宿主病（GVHD）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、細胞が、寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、かつ移植後にリンパ節へホーミングすることができる方法が提供され、方法は、

（a）T細胞を含む細胞の集団を提供することであって、細胞の集団のT細胞は、CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>表現型を発現して、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させた少なくとも40%のメモリーT細胞を含む、提供すること、

（b）メモリーT細胞を含む細胞の集団に、4～10種類のウイルスに由来するウイルスペプチドを接触させることであって、ウイルスの少なくとも1つが、ウイルス反応性メモリーT細胞の富化を可能にするために、IL-21の存在下で、BKウイルスを含む、接触すること、および

30

（c）Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、IL-21、IL-15および／またはIL-7の存在下で工程（b）から得られた細胞を培養し、それにより、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団を作製することを含む。

【0115】

「単離された」という用語は、それらの天然環境（例えば、人体）から単離された細胞を指す。

【0116】

40

一実施形態によれば、細胞の集団は、不均一な細胞混合物を指す。

【0117】

本明細書で使用される「非GVHD」または「非移植片対宿主病」という用語は、移植片対宿主（GVH）誘導反応性が実質的に低下しているか、またはまったくないことを指す。したがって、本発明のいくつかの実施形態の細胞は、移植後30～120日の移植された対象の生存、体重および全体的な外観によって証明されるように、移植片対宿主疾患（GVHD）を顕著には引き起こさないように作製される。GVHDの減少について対象を評価する方法は、当業者に周知である。

【0118】

一実施形態によれば、本発明のいくつかの実施形態の細胞は、本教示に従って作製され

50

ていない細胞と比較して、宿主に対する反応性が少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはさらには100%低下している。

【0119】

本明細書で使用される「セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型」という語句は、リンパ節にホーミングするT細胞のサブセットを指す。Tcm表現型を有する細胞は、ヒトでは、典型的には、 $CD3^+ / CD8^+ / CD62L^+ / CD45RO^+ / CD45RA^-$ シグネチャを含む。Tcm細胞は、単一細胞のシグネチャマーカのすべてを発現し得るか、または単一細胞のシグネチャマーカの一部のみを発現し得ることが理解されよう。細胞表現型の判定は、当業者に公知の任意の方法を使用して、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）または捕捉ELISA標識などによって行うことができる。

10

【0120】

一実施形態によれば、非GVHD誘導細胞の単離された集団の少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、またはさらには100%が、Tcm細胞シグネチャを有する。

20

【0121】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を有する細胞は、非GVHD誘導細胞の単離された集団の20%を構成する。

【0122】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を有する細胞は、非GVHD誘導細胞の単離された集団の30%を構成する。

【0123】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を有する細胞は、非GVHD誘導細胞の単離された集団の40%を構成する。

【0124】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を有する細胞は、非GVHD誘導細胞の単離された集団の50%を構成する。

30

【0125】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を有する細胞は、非GVHD誘導細胞の単離された集団の60%を構成する。

【0126】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を有する細胞は、非GVHD誘導細胞の単離された集団の70%を構成する。

【0127】

具体的な実施形態によれば、非GVHD誘導細胞の単離された集団の約10~20%、約10~30%、約10~40%、約10~50%、約20~30%、約20~40%、約30~50%、約40~60%、約50~70%、約60~80%、約70~90%、約80~100%または約90~100%がTcm細胞シグネチャを有する。

40

【0128】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を有する細胞は、非GVHD誘導細胞の単離された集団の10~30%を構成する。

【0129】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を有する細胞は、非GVHD誘導細胞の単離された集団の10~50%を構成する。

【0130】

50

具体的な実施形態によれば、T c m表現型を有する細胞は、非 G V H D 誘導細胞の単離された集団の 20 ~ 40 % を構成する。

【0131】

具体的な実施形態によれば、T c m表現型を有する細胞は、非 G V H D 誘導細胞の単離された集団の 30 ~ 50 % を構成する。

【0132】

具体的な実施形態によれば、T c m表現型を有する細胞は、非 G V H D 誘導細胞の単離された集団の 50 ~ 70 % を構成する。

【0133】

本発明の T c m表現型を含む非 G V H D 誘導細胞はまた、本明細書で「T c m細胞」とも称される。

10

【0134】

述べられたように、T c m細胞は、典型的には、移植後にリンパ節にホーミングする。いくつかの態様によれば、本発明のいくつかの態様の単離された細胞の集団は、移植後のリンパ節のいずれか、例えば末梢リンパ節および腸間膜リンパ節にホーミングし得る。これらの細胞のホーミング特性は、それらがそれらの拒否効果を迅速かつ効率的に発揮することを可能にする。

【0135】

本発明のいくつかの実施形態の T c m表現型を含む非 G V H D 誘導細胞は、寛容誘導細胞である。

20

【0136】

「寛容誘導細胞」という言い回しは、本明細書の中で使用されるとき、投与された寛容誘導細胞の非存在下におけるレシピエントの細胞の応答性と比較して、レシピエントの細胞（例えばレシピエントの T 細胞）がドナーの細胞と接触するとき、応答性の低下を引き起こす細胞のことを指す。寛容誘導細胞には、国際公開第 2001 / 049243 号パンフレットおよび国際公開第 2002 / 102971 号パンフレットに以前に記載されたようなベト細胞（すなわち、宿主 T 細胞と接触すると宿主 T 細胞のアポトーシスを引き起こす T 細胞）が含まれる。

【0137】

「ベト活性」という用語は、ベト細胞を認識して結合すると抗ドナーレシピエント T 細胞の不活性化をもたらす免疫細胞（例えばドナー由来 T 細胞）に関する。一実施形態によれば、不活性化は、抗ドナーレシピエント T 細胞のアポトーシスをもたらす。

30

【0138】

本発明の T c m表現型を含む非 G V H D 誘導細胞は、本明細書で「ベト細胞」とも称される。

【0139】

加えて、または、代替において、本発明のいくつかの実施形態の T c m表現型を含む非 G V H D 誘導細胞の単離された集団は、抗疾患活性を含む。

【0140】

「抗疾患活性」という用語は、異常細胞に対する T c m細胞の機能を指す。抗疾患活性は、異常細胞に対して直接的、例えば、異常細胞の死滅能力であり得る。この活性は、L F A 1 - I / C A M 1 結合によって媒介される T C R 非依存性殺傷に起因し得る [A r d i t t i e t a l . , B l o o d ( 2 0 0 5 ) 1 0 5 ( 8 ) : 3 3 6 5 - 7 1 . E p u b 2 0 0 4 7 月 6 日]。追加的または代替的に、抗疾患活性は、例えば、異常細胞（例えば、死滅、アポトーシスによって、または他の因子、例えば抗体、サイトカインなどの分泌によって）の死をもたらす他の種類の細胞（例えば、C D 4 + T 細胞、B 細胞、単球、マクロファージ、N K 細胞）の活性化によって間接的であり得る。

40

【0141】

「抗ウイルス活性」という用語は、ウイルス感染細胞（例えば、細胞表面の M H C - ペプチド複合体に関連してウイルスの抗原を発現させる）に対する T c m細胞の機能を指す

50

。典型的には、抗ウイルス活性は、ウイルス感染細胞の死滅をもたらす。

【0142】

「抗腫瘍活性」という用語は、腫瘍細胞に対するTcm細胞の機能を指す。典型的には、抗腫瘍活性は腫瘍細胞の死滅をもたらす。具体的な実施形態によれば、抗腫瘍活性は、移植片対白血病／リンパ腫（GVL）の活性を含む。

【0143】

異常細胞は、例えば、ウイルス感染細胞、細菌感染細胞、癌細胞〔例えば、固形腫瘍の細胞または白血病／リンパ腫細胞（本明細書ではTcm細胞の移植片対白血病（GVL）活性とも呼ばれる）〕、自己免疫疾患に関連する細胞、アレルギー反応に関連する細胞、またはストレス、放射線もしくは年齢によって変化した細胞を含み得る。

10

【0144】

いくつかの実施形態によれば、Tcm表現型を含む本発明のいくつかの実施形態の非GVHD誘導細胞は、必要とされる用途（例えば、治療される疾患に対して）に応じて、非遺伝子改変細胞または遺伝子改変細胞（例えば、特定の遺伝子、マーカーもしくはペプチドを発現するかもしくは発現しないように、または特定のサイトカインを分泌するかもしくは分泌しないように遺伝子操作された細胞）であり得る。そのような判定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0145】

一実施形態によれば、Tcm細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）または改変T細胞受容体（TCR）を発現する。

20

【0146】

したがって、本発明のいくつかの実施形態のTcm細胞は、TCRまたはCARを発現するように形質導入され得る。

【0147】

本明細書で使用される場合、「TCRによる形質導入」は、T細胞受容体（TCR）のアルファ鎖、TCRのベータ鎖、TCRのガンマ鎖、TCRのデルタ鎖、またはそれらの組み合わせ（例えば、 $\alpha\beta$ 鎖または $\gamma\delta$ 鎖）などの2つの鎖（すなわち、ポリペプチド鎖）のクローニングを指す。一実施形態によれば、TCRは、TCRの可変領域（例えば、 $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖または $\gamma$ 鎖および $\delta$ 鎖）を含む。細胞（例えば、T細胞）にTCR（例えば、生成されたTCR-T細胞）を形質導入する方法は、当技術分野で公知であり、例えばNicholson et al. Adv Hematol. 2012; 2012: 404081; Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar; 22(2): 85-94; およびLamers et al., Cancer Gene Therapy (2002) 9, 613-623において開示されている。

30

【0148】

本明細書で使用される場合、「CARによる形質導入」は、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列のクローニングを指し、CARは、抗原認識部分およびT細胞活性化部分を含む。キメラ抗原受容体（CAR）は、T細胞シグナル伝達ドメインまたはT細胞活性化ドメインに連結された抗体（例えば、一本鎖可変フラグメント（scFv））の抗原結合ドメインを含有する人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドである。細胞（例えば、T細胞）にCAR（例えば、CAR-Tを作製）を形質導入する方法は当技術分野で公知であり、例えばDavila et al. Oncoimmunology. 2012 Dec 1; 1(9): 1577-1583; Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar; 22(2): 85-94; およびMaus et al. Blood. 2014 Apr 24; 123(17): 2625-35において開示されている。

40

【0149】

一実施形態によれば、遺伝子改変Tcm細胞は、トランスジェニックTCR（TCR-T）またはCAR（CAR-T）を発現する。

50

## 【0150】

したがって、本発明のいくつかの実施形態のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団は、T細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)による形質導入によって疾患の抗原(例えば腫瘍抗原)を標的とする受容体の提示を促進することによって、細胞特異性(例えば、T細胞特異性)を再指向させることによって、治療(例えば、抗癌細胞療法)のために遺伝子改変され得る。例えば、TCRまたはCARを発現するTcm細胞は、悪性の疾患、例えば、濾胞性リンパ腫(CD20またはGD2)、神経芽腫(CD171)、非ホジキンリンパ腫(CD20)、リンパ腫(CD19)、神経膠芽腫(IL13Rα2)、慢性リンパ性白血病またはCLLおよび急性リンパ性白血病またはALL(両方ともCD19)を標的とするために作製され得る。

10

## 【0151】

本発明のいくつかの実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団を生成する方法が提供される。

## 【0152】

一実施形態によれば、本方法は、ドナー対象由来の末梢血単核細胞(PBMC)の第1の集団を、CD14<sup>+</sup>発現細胞に結合することができる抗体と接触させること、および抗原提示細胞に成熟することができるCD14<sup>+</sup>発現細胞を選択することを含む。

## 【0153】

「ドナー対象」という用語は、ヒトを指す。

## 【0154】

一実施形態によれば、ドナー対象は、本明細書の以降で詳しく論じられるように、対象(例えば同種異系)に対して非同系である。

20

## 【0155】

「末梢血単核球(PBMC)」という用語は、リンパ球(T細胞、B細胞、NK細胞などを含む)および単球を含む血液試料の画分を指す。

## 【0156】

一実施形態によれば、PBMCは、本明細書の以降で詳しく論じられるように、レシピエントの対象(例えば同種異系)に関して非同系である。

## 【0157】

一実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞を生成するために使用されるPBMCは、動員されない(すなわち、プライミングされていない)PBMC、すなわち、造血前駆体(例えば、幹細胞)の骨髄から末梢血循環への移動に影響を及ぼす薬物を使用することによって得られない細胞である。

30

## 【0158】

一実施形態によれば、PBMCが、本明細書の以降で詳しく論じられるように、造血細胞(HCT)の計画された移植日(すなわち、0日目)の5~15日前(例えば7~10日間、例えば7日間、例えば8日間)に収集される。しかしながら、PBMCは、計画された移植日より前の任意の時点で収集されることが理解されるべきである。そのようなPBMCは、そのまま保存することができるか、または後述するように処理し、その後、将来の使用のために保存することができる(例えば、凍結保存)。

40

## 【0159】

一実施形態によれば、PBMCは、標準的な技術を使用してドナー対象から収集される。具体的な実施形態によれば、PBMCは、白血球除去療法(すなわち、PBMCをドナー対象から本質的に除去し、残りの血液成分をドナー対象に戻すプロセス)を使用して回収される。

## 【0160】

一実施形態によれば、PBMC回収処置(例えば白血球アフェレーシス)により、例えば $0.01 \sim 1000 \times 10^{10}$ の単核細胞(MNC)、例えば $0.1 \sim 100 \times 10^{10}$ 、例えば $1 \times 10^{10}$ のMNCが得られる。

## 【0161】

50

一実施形態によれば、P B M C採取処置（例えば白血球アフェレーシス）により、最小  $500 \times 10^6$  の単核細胞（M N C）、例えば  $500 \times 10^{10} \sim 1000 \times 10^{10}$  の M N C、例えば  $1 \times 10^{10}$  の M N C が得られる。

【0162】

一実施形態によれば、P B M C は単一の収集処置で収集される。

【0163】

一実施形態によれば、P B M C は、2、3、4、5、またはそれより多い収集手順（例えば、必要な数の M N C を得るために）で収集される。

【0164】

一実施形態によれば、P B M C が2つ以上の収集手順で収集される（例えば、同じドナー対象からのもの）場合、P B M C は一緒にプールされる（例えば、さらなる処理のために）か、または別々に使用され得る。

【0165】

一実施形態によれば、上記の収集物のいずれもバッチと呼ぶことができる。あるいは、任意のグループの集合（例えば、数日間、例えば1、2、3、4、5日間、例えば3日間にわたる収集の状況で同じドナー対象からのもの）をバッチと呼ぶことができる。

【0166】

一実施形態によれば、上記の P B M C の収集物のいずれも、さらなる処理（例えば、以下に記載されるような M N C の分離）の前に、1日間または複数日間（例えば、1、2、3、4、5日間、例えば1～2日間）にわたって収集管に保持され得る。

【0167】

一実施形態によれば、単核細胞（M N C）が P B M C から単離される。当技術分野で公知の任意の標準的な技術を、P B M C からの M N C 単離に使用することができる。例えば、一実施形態によれば、収集した P B M C を、例えばカルシウムもマグネシウムを含まず、例えば 0.6% A C D - A および 25% H A S の 0.5% を補充したダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（D P B S）で希釈し（例えば、1:2）、M N C をフィコール密度勾配分離によって単離する。フィコール密度勾配分離後、一実施形態の M N C 調製物を、手動の遠心分離によって例えば1～5回、例えば1～3回、例えば2回血小板洗浄（すなわち、血栓の洗浄）をし、洗浄緩衝液（例えば、A C D - A および 25% H S A の 0.5% を含む P B S）で再懸濁する。

【0168】

本発明のいくつかの実施形態の P B M C 調製物または M N C 調製物は、2つの画分（例えば等しい画分）に分けられる。1つの P B M C または M N C 画分が抗原提示細胞（すなわち、本明細書では P B M C の第1の集団と呼ばれる）にさらにプロセッシングされ、第2の P B M C または M N C 画分（すなわち、本明細書では P B M C の第2の集団と呼ばれる）が C D 8 + メモリー T 細胞について富化される。

【0169】

一実施形態によれば、P B M C の第1の集団および P B M C の第2の集団は、同じバッチに由来する。

【0170】

あるいは、異なる P B M C 収集処置からの2つの P B M C 調製物を使用してもよい。したがって、一実施形態によれば、P B M C の第1の集団および P B M C の第2の集団は、多様なバッチに由来する。

【0171】

一実施形態によれば、抗原提示細胞（例えば樹状細胞）は、最初に P B M C の第1の集団を C D 1 4 + 発現細胞に結合することができる抗体と接触させ、C D 1 4 + 発現細胞を選択することによって生成される。

【0172】

一実施形態によれば、C D 1 4 + 発現細胞に結合することができる抗体は、C D 1 4 モノクローナル抗体である。そのような抗体は、例えば B D B i o s c i e n c e s 、 S

10

20

30

40

50

anta Cruz Biotechnology、および R & D Systems から商業的に入手することができる。

【0173】

CD14モノクローナル抗体を使用してCD14<sup>+</sup>発現細胞を選択することは、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、例えば、Miltenyi Biotecから入手可能な磁気活性化細胞選別(MACS(商標))、FACS選別機および／またはcapture ELISAの標識の使用によって行うことができる。

【0174】

一実施形態によれば、異なる枯渇／分離方法を組み合わせることができ、例えば、分離の質を高めるために、または複数のパラメータによる選別を可能にするために、磁気細胞選別をFACSと組み合わせることができる。

【0175】

一実施形態によれば、CD14<sup>+</sup>発現細胞の選択は、プラスチック接着によって影響されない。

【0176】

一実施形態によれば、CD14<sup>+</sup>発現細胞は、磁気分離技術によって選択される。例えば、Dyna1(ノルウェー)、Advanced Magnetix(ケンブリッジ、マサチューセッツ州、米国)、Immuncon(フィラデルフィア、米国)、Immunotec(マルセイユ、フランス)、Invitrogen、Stem cell Technologies(米国)、Cellpro(米国)およびMiltenyi Biotec GmbH(ドイツ)を含むいくつかの供給源から異なる磁気ビーズが入手可能である。あるいは、抗体をビオチン化またはジゴキシゲニンとコンジュゲート化し、アビジンまたは抗ジゴキシゲニン被覆アフィニティーカラムと組み合わせて使用することができる。

【0177】

一実施形態によれば、CD14モノクローナル抗体は、磁性粒子にコンジュゲートされる。

【0178】

具体的な実施形態によれば、磁性粒子は、超常磁性鉄デキストラン粒子を含む。

【0179】

具体的な実施形態によれば、CD14標識細胞は、CliniMACS(登録商標)カラムで処理される。

【0180】

具体的な実施形態によれば、CD14標識細胞は、XS Separation Columnを使用してSuperMACS(商標)IIで選択される。

【0181】

一実施形態によれば、CD14磁気標識細胞(すなわちCD14<sup>+</sup>発現細胞)を分離カラム(すなわち、陽性選択)によって保持し、CD14<sup>-</sup>細胞を除去する。次いで、CD14<sup>+</sup>細胞をカラムから放出させ、回収する。一実施形態によれば、細胞数、生存率および／または免疫表現型検査のために、各画分からの試料を除去する。

【0182】

一実施形態によれば、生存率が、7AAD、すなわち、7AAD<sup>+</sup>細胞の陽性発現によって評価される。

【0183】

一実施形態によれば、CD14<sup>+</sup>富化細胞調製物を、細胞培養培地(例えば樹状細胞培養培地、例えばCellGro/1% HSA)に、例えば1~10×10<sup>6</sup>細胞/ml、例えば3×10<sup>6</sup>細胞/mlの細胞濃度で再懸濁する。一実施形態によれば、細胞培養培地には、サイトカインおよび成長因子が補充される。使用されるサイトカインおよび成長因子の決定は、当業者の技術の範囲内である。例えば、細胞培養培地には、IL-4(例えば200~2000 IU/ml、例えば1000 IU/ml)およびGM-CSF(例

10

20

30

40

50

例えば1000～4000 IU/mL、例えば2000 IU/mL)が補充される。次いで、細胞懸濁液を播種し(例えば細胞培養プレート、例えばCell Factoryプレート)、37℃、5%CO<sub>2</sub>で12～36時間、例えば16～24時間、例えば24時間インキュベートする。

【0184】

一実施形態によれば、CD14<sup>+</sup>発現細胞の抗原提示細胞(例えば樹状細胞)への成熟を誘導するために、CD14<sup>+</sup>富化細胞調製物を成熟因子(例えば樹状細胞成熟因子)の存在下で培養する。使用される成熟因子の決定は、当業者の技術の範囲内である。したがって、一実施形態によれば、播種した(例えば、細胞培養プレート、例えば、Cell Factoryプレートにおいて)CD14<sup>+</sup>富化細胞を、IL-4(例えば200～2000 IU/mL、例えば1000 IU/mL)、GM-CSF(例えば1000～4000 IU/mL、例えば2000 IU/mL)、LPS(例えば10～100 ng/mL、例えば40 ng/mL)、およびIFN-γ(例えば50～500 IU/mL、例えば200 IU/mL)の存在下、37℃、5%CO<sub>2</sub>で10～24時間、例えば14～18時間、例えば16時間培養する。

10

【0185】

培養期間の後、細胞培養物から抗原提示細胞(例えば、成熟樹状細胞、すなわちmDC)が得られる。一実施形態によれば、非接着性細胞が除去され、抗原提示細胞(すなわち、接着細胞)が、当技術分野において知られているいずれかの方法(例えば、氷冷緩衝液、例えば25%HASO.5%を含むACD-AおよびDPBS緩衝液を添加し、氷上または凍結ゲルパック上で10～60分間、例えば30分間インキュベートすることによる)を使用して培養プレートから剥離される。次いで、収集した抗原提示細胞を遠心分離し、洗浄し、再懸濁する(例えば、25%HASO.5%およびDPBS緩衝液を含むACD-Aで)。

20

【0186】

一実施形態によれば、抗原提示細胞(例えばmDC)に1つまたは複数の抗原を負荷する。

【0187】

本明細書で使用される場合、「負荷」という語句は、抗原提示細胞(APC)の表面上のペプチド-MHC複合体に提示されたMHCペプチド(例えばMHCクラスIまたはII)への1つまたは複数の抗原(例えばペプチド)の付着を指す。

30

【0188】

本明細書で使用される場合、表現「1つまたは複数の抗原」は、免疫応答を誘導することができる可溶性または不溶性の(例えば、膜結合型の)分子を示す。

【0189】

例えば、1つまたは複数の抗原は、細胞全体(例えば、生細胞または死細胞)、細胞画分(例えば溶解細胞)、細胞抗原(例えば、細胞表面抗原)、タンパク質抽出物、精製タンパク質または合成ペプチドであり得る。

【0190】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原はウイルス抗原を含む。

40

【0191】

一実施形態によれば、ウイルス抗原は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、またはそれ以上の異なる種類のウイルスに由来する。

【0192】

一実施形態によれば、ウイルス抗原は、1～50、1～40、1～30、1～25、1～20、1～15、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～50、2～40、2～30、2～20、2～10、2～8、2～6、2～4、3～50、3～40、3～30、3～20、3～10、3～9、3～7、3～5、3～4、4～50、4～40、4～30、4～20、4～10、4～8、または4～6種類のウイルスに由来する。

50

## 【0193】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は1～20種類のウイルスに由来する。

## 【0194】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は1～10種類のウイルスに由来する。

## 【0195】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は1～4種類のウイルスに由来する。

## 【0196】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は、2～10種類のウイルスに由来する。

## 【0197】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は2～4種類のウイルスに由来する。

10

## 【0198】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は4～20種類のウイルスに由来する。

## 【0199】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は4～10種類のウイルスに由来する。

## 【0200】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は4～8種類のウイルスに由来する。

## 【0201】

具体的な実施形態によれば、ウイルス抗原は4～6種類のウイルスに由来する。

## 【0202】

抗原を誘導する（すなわち、起源とする）ことができる例示的なウイルスとしては、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、アデノウイルス（Adv）、サイトメガロウイルス（CMV）、風邪ウイルス、インフルエンザウイルス、A型、B型およびC型肝炎ウイルス、単純ヘルペス、HIV、インフルエンザ、日本脳炎、麻疹、ポリオ、狂犬病、呼吸器合胞体、風疹、天然痘、水痘帯状疱疹、ロタウイルス、ウエストナイルウイルス、ポリオマウイルス（例えば、BKウイルス）、ジカウイルス、パルボウイルス（例えば、パルボウイルスB19）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、重症急性呼吸器症候群（SARS）、ならびに重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0203】

ウイルスおよびそれらのそれぞれの抗原の特定の例としては、限定されないが、BKウイルス抗原として、限定されないが、BKV LT；BKV（カプシドVP1）、BKV（カプシドタンパク質VP2）、BKV（カプシドタンパク質VP2、イソプロムVP3）、BKV（スモールT抗原）が挙げられる；アデノウイルス抗原としては、Adv-ペントンまたはAdv-ヘキソンが挙げられるが、これらに限定されない；CMV抗原としては、限定されないが、エンベロープ糖タンパク質B、CMV IE-1およびCMV pp65、UL28、UL32、UL36、UL40、UL48、UL55、UL84、UL94、UL99、UL103、UL151、UL153、US29、US32が挙げられる；EBV抗原としては、EBV LMP2、EBV BZLF1、EBV EBNA1、EBV P18およびEBV P23が挙げられるが、これらに限定されない；肝炎抗原としては、限定されないが、B型肝炎ウイルスのS、MおよびLタンパク質、B型肝炎ウイルスのプレS抗原、HBcAg DELTA、HBV HBe、C型肝炎ウイルスRNA、HCV NS3およびHCV NS4が挙げられる；単純ヘルペスウイルス抗原としては、限定されないが、前初期タンパク質および糖タンパク質Dが挙げられる；HIV抗原としては、限定されないが、HIV gp32、HIV gp41、HIV gp120、HIV gp160、HIV P17/24、HIV P24、HIV P55 GAG、HIV P66 POL、HIV TAT、HIV GP36、Nefタンパク質および逆転写酵素などのgag、polおよびenv遺伝子の遺伝子産物が挙げられる；インフルエンザ抗原としては、ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼが挙げられるが、これらに限定されない；日本脳炎ウイルス抗原としては、タンパク質E、M-E、M-E-NS1、NS1、NS1-NS2Aおよび80% Eが挙げられるが、これらに限

30

40

50

定されない；はしか抗原としては、限定されないが、はしかウイルス融合タンパク質が挙げられる；狂犬病抗原としては、限定されないが、狂犬病糖タンパク質および狂犬病核タンパク質が挙げられる；呼吸器合胞体ウイルス抗原としては、RSV融合タンパク質およびM2タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない；ロタウイルス抗原としては、VP7s cが挙げられるが、これに限定されない；風疹抗原としては、タンパク質E1およびE2が挙げられるが、これらに限定されない；重症急性呼吸器症候群（SARS-CoV）抗原としては、S1、RBD、NucleocapsidおよびPlproが挙げられるが、これらに限定されない；重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（SARS-CoV-2）抗原としては、S1、S2、S1+S2 ECD、RBD、N抗原、S抗原およびヌクレカプシドが挙げられるが、これらに限定されない；また水痘帯状疱疹ウイルス抗原としては、gp1およびgp11が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0204】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原はウイルスペプチド（またはそのフラグメント）を含む。

#### 【0205】

一実施形態によれば、ウイルスペプチドは、1～50、1～40、1～30、1～25、1～20、1～15、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～50、2～40、2～30、2～20、2～10、2～8、2～6、2～4、3～50、3～40、3～30、3～20、3～10、3～9、3～7、3～5、3～4、4～50、4～40、4～30、4～20、4～10、4～8、または4～6のウイルスペプチドを含む。

20

#### 【0206】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4～50個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

#### 【0207】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4～40個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

#### 【0208】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4～30個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

30

#### 【0209】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4～20個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

#### 【0210】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4～10個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

#### 【0211】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4～8個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

#### 【0212】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4～6個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

40

#### 【0213】

一実施形態によれば、ウイルスペプチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、または50個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

#### 【0214】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、4つのウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

50

## 【0215】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、5つのウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0216】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、6つのウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0217】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、8つのウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0218】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、10個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0219】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、15個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0220】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、20個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0221】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、30個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0222】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、40個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0223】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、50個のウイルスペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）を含む。

## 【0224】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、単一の生物（すなわち、1つのウイルス型から）由来のペプチドを含む。

## 【0225】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、2つまたはそれを超える生物（すなわち、2、3、4、5、またはそれより多いウイルス型の混合物）に由来するペプチドを含む。

## 【0226】

一実施形態によれば、ウイルスペプチドは、BKウイルスペプチドを含む。

## 【0227】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、エプスタイン・バーウイルス（EBV）ペプチド、サイトメガロウイルス（CMV）ペプチド、BKウイルスペプチドおよびアデノウイルス（AdV）ペプチドのうちの少なくとも1つを含む。

## 【0228】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、エプスタイン・バーウイルス（EBV）ペプチド、サイトメガロウイルス（CMV）ペプチド、BKウイルスペプチドおよびアデノウイルス（AdV）ペプチドを含む。

## 【0229】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、EBV-BRAF1、EBV-BMLF1、EBV-GP340/350 EBNA2、EBV-EBNA3a、EBV-EBNA3b、EBV-EBNA3c、CMV-pp65、CMV-IE-1、AdV-ペントン、AdV-ヘキソン、BKV-LT、BKV（カプシドVP1）、BKV（カプシドタンパク質VP2）、

10

20

30

40

50

BKV（カプシドタンパク質VP2、イソプロムVP3）およびBKV（スモールT抗原）のうちの少なくとも1つを含む。

【0230】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、Adv5 Hexon、hCMV pp65、EBV select（後述）およびBKV LTのうちの少なくとも1つを含む。

【0231】

専用のソフトウェアを使用して抗原配列を分析し、免疫原性短ペプチド、すなわち主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスIまたはMHCクラスIIに関連して提示可能なペプチドを同定することができる。

【0232】

具体的な実施形態によれば、1つまたは複数の抗原は、CMV、EBVおよびAdeno（そのようなペプミックスは、例えば、JPT Technologies、ベルリン、ドイツ、から商業的に購入することができる）の3つのウイルスの全タンパク質配列に及ぶ重複ペプチドライブラリー（例えば、11アミノ酸が重複する15量体）であるペプミックスの混合物を含む。

【0233】

具体的な実施形態によれば、ウイルスペプチドは、「EBV select」、すなわちEBV由来の13種の異なるタンパク質由来の43種のMHCクラス1およびクラス2拘束性ペプチドを含むMiltenyi Biotechからの市販の品を含む（例えば、MACS GMP Peptivator（登録商標）EBV Select、例えばカタログ番号170-076-143）。追加的または代替的に、ウイルスペプチドは、「回収EBV」を含み、すなわち、JPTの市販品は、14種の異なるEBV抗原由来のペプチドを含むペプミックスを含む。追加的または代替的に、ウイルスペプチドは、Pep Mix（商標）BKV（カプシドタンパク質VP1）、Pep Mix（商標）BKV（カプシドタンパク質VP2）、Pep Mix（商標）BKV（カプシドタンパク質VP2、アイソフォームVP3）、Pep Mix（商標）BKV（ラージT抗原）、Pep Mix（商標）BKV（スモールT抗原）、JPTから市販されているものを含む。

【0234】

別の具体的な実施形態によれば、1つまたは複数の抗原は、EBV-LMP2、EBV-BZLF1、EBV-EBNA1、CMV-pp65、CMV-IE-1、Adv-ペントンおよびAdv-ヘキソンにまたがる7種類のペプミックスの混合物を、例えば、100ng／ペプチドまたは700ng／7種類のペプチドの混合物の濃度で含むものである。

【0235】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原は、典型的には免疫を含む対象、例えば移植患者に影響を及ぼす感染性生物（例えば、細菌、真菌生物）の1つまたは複数の抗原を含む。

【0236】

一実施形態によれば、抗原は、限定されないが、細菌抗原、例えば炭疽の抗原；グラム陰性桿菌、クラミジア、ジフテリア、インフルエンザ菌、ピロリ菌、マラリア、結核菌、百日咳毒素、肺炎球菌、リケッチア、ブドウ球菌、連鎖球菌および破傷風である。

【0237】

細菌抗原のさらなる特定の例として、炭疽抗原としては、限定されないが、炭疽保護抗原が挙げられる。グラム陰性桿菌抗原には、リポ多糖が含まれるが、これらに限定されない。ヘモフィルスインフルエンザ抗原としては、限定されないが、莢膜多糖類が挙げられる。ジフテリア抗原としては、限定されないが、ジフテリア毒素が挙げられる。結核菌抗原としては、限定されないが、ミコール酸、熱ショックタンパク質65（HSP65）、30kDaの主要分泌タンパク質および抗原85Aが挙げられる。百日咳毒素抗原としては、ヘマグルチニン、ペルタクチン、FIM2、FIM3およびアデニル酸シクラーゼが

10

20

30

40

50

挙げられるが、これらに限定されない。肺炎球菌抗原としては、ニューモリシンおよび肺炎球菌莢膜多糖類が挙げられるが、これらに限定されない。リケッチア抗原としては、限定されないが、r o m p Aが挙げられる。連鎖球菌抗原としては、限定されないが、Mタンパク質が挙げられる。および破傷風抗原としては、限定されないが、破傷風毒素が挙げられる。

#### 【0238】

一実施形態によれば、抗原はスーパーバグ抗原（例えば多剤耐性細菌）である。スーパーバグの例としては、限定されないが、エンテロコッカス・フェシウム、クロストリジウム・ディフィシル、アシネトバクター・バウマンニ、緑膿菌および腸内細菌科（大腸菌（*Escherichia coli*）、肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）、エンテロバクター属（*Enterobacter spp.*）を含む）が挙げられる。

10

#### 【0239】

一実施形態によれば、抗原は真菌抗原である。真菌の例としては、カンジダ、コクシジオデス、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、リーシュマニア、プラスモジウム、原虫、寄生虫、住血吸虫、白癬、トキソプラズマ、およびクルーズトリパノソーマが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0240】

真菌抗原のさらなる特定の例として、コクシジウム抗原としては、限定されないが、球状体抗原が挙げられる。クリプトコッカス抗原としては、限定されないが、莢膜多糖類が挙げられる。ヒストプラズマ抗原としては、限定されないが、熱ショックタンパク質60（HSP60）が挙げられる。リーシュマニア抗原としては、限定されないが、gp63およびリポホスホグリカンが挙げられる。熱帯熱マラリア原虫抗原は、限定されないが、メロゾイト表面抗原、スポロゾイト表面抗原、サーカムスポロゾイト抗原、配偶子細胞／配偶子表面抗原、原虫および他の寄生虫抗原、例えば血液段階抗原pf 155／RESAを含む。住血吸虫抗原は、限定されないが、グルタチオン-S-トランスフェラーゼおよびパラミオシンが含まれる。白癬真菌抗原には、限定されないが、トリコフィチンが含まれる。トキソプラズマ抗原は、限定されないが、SAG-1およびp30が挙げられる。クルーズトリパノソーマ抗原は、限定されないが、75～77kDa抗原および56kDa抗原が挙げられる。

20

30

#### 【0241】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原は、悪性疾患（例えば腫瘍抗原）に関連する抗原を含む。

#### 【0242】

一実施形態によれば、抗原は、腫瘍細胞によって発現される抗原（またはその一部、例えば抗原エピトープ）である。一実施形態によれば、抗原（またはその一部）は、造血組織において発現されるタンパク質（例えば、白血病抗原などの造血悪性腫瘍）、または固形腫瘍において発現されるタンパク質（例えば、黒色腫、膵臓癌、肝臓癌、胃腸癌など）に由来する。

#### 【0243】

腫瘍抗原の例には、A33、BAGE、Bcl-2、B細胞成熟抗原（BCMA）、BCR-ABL、β-カテニン、癌精巢抗原（CTA、例えばMAGE-1、MAGE-A2／A3およびNY-ESO-1）、CA1.25、CA19-9、CA50、CA27.29（BR27.29）、CA15-3、CD5、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD37、CD45、CD123、CEA、c-Met、CS-1、サイクリンB1、DAGE、EBNA、EGFR、ELA2、エフリンB2、エストロゲン受容体、FAP、フェリチン、葉酸結合タンパク質、GAGE、G250／CA IX、GD-2、GM2、gp75、gp100（Pmel17）、HA-1、HA-2、HER-2／neu、HM1.24、HPV E6、HPV E7、hTERT、Ki-67、LRP、メソテリン、ムチン様癌関連抗原（MCA）、MUC1、p53、PR1、

40

50

PRAME、PRTN3、RHAMM (CD168)、WT-1が含まれるが、これらに限定されない。さらなる腫瘍抗原は、Molldrem J. Biology of Blood and Marrow Transplantation (2006) 12: 13-18; Alatrash G. and Molldrem J., Expert Rev Hematol. (2011) 4 (1): 37-50; Renkvist et al., Cancer Immunol Immunother (2001) 50: 3-15; van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immun (2013), www(dot) cancerimmunity(dot) org/peptide/; Rittenhouse, Manderino, and Hass, Laboratory Medicine (1985) 16 (9) 556-560において提供されており、これらのすべては、参照により本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0244】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原は、抗原の混合物（例えば、議論されるような抗原の1つの群の抗原、例えばウイルス抗原の混合物；または抗原の異なる群からの抗原の混合物、例えばウイルス抗原と細菌抗原、ウイルス抗原と腫瘍抗原）を含む。

#### 【0245】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原は、ウイルスペプチドと腫瘍ペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）の混合物を含む。

20

#### 【0246】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原は、ウイルスペプチドと細菌ペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）との混合物を含む。

#### 【0247】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原は、ウイルスペプチドと真菌ペプチド（例えば、単一の処方またはいくつかの処方）の混合物を含む。

#### 【0248】

一実施形態によれば、抗原提示細胞（例えばmDC）への1つまたは複数の抗原の負荷は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて行うことができる。

#### 【0249】

一実施形態によれば、ウイルスペプチドを抗原提示細胞（例えばmDC）に負荷する（例えば、提示する）ために、ウイルスペプチドを抗原提示細胞（例えばmDC）と、37℃、5%CO<sub>2</sub>で、30分～3時間（例えば1時間）に共培養する。例えば、抗原提示細胞（例えばmDC）に、5%CO<sub>2</sub>、37℃で30分～3時間（例えば1時間）のインキュベーションによって、ペプタイゼーター（例えば、AdV5 Hexon、HCMV pp65、EBV selectおよびBKV LT）を負荷し得る。

30

#### 【0250】

インキュベーション後、ウイルスペプチドを負荷した抗原提示細胞（例えばmDC）を洗浄し、例えば25%HASO、5%およびDPBS緩衝液を含むACD-Aで遠心分離し、細胞増殖培地（例えばT細胞増殖培地）に再懸濁する。

40

#### 【0251】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原（例えばウイルスペプチド）負荷抗原提示細胞（例えばmDC）は、X線源を介して照射される。したがって、一実施形態によれば、負荷された抗原提示細胞（例えばmDC）は、1～5 Gy、約5～10 Gy、約10～20 Gy、約10～30 Gy、約10～40 Gy、約10～50 Gy、約20～30 Gy、約20～40 Gy、約20～50 Gyで照射される。具体的な実施形態によれば、DCは、約10～40 Gy（例えば25～30 Gy、例えば30 Gy）で照射される。

#### 【0252】

照射が完了すると、負荷された抗原提示細胞（例えば、ウイルスペプチド負荷mDC）を洗浄し、遠心分離し、細胞増殖培地（例えばT細胞増殖培地）に再懸濁する。

50

## 【0253】

次いで、抗原負荷抗原提示細胞（例えばmDC）は、本発明のいくつかの実施形態によるメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を含む細胞の集団からのTcm細胞の生成に使用する準備が整う。

## 【0254】

具体的な実施形態によれば、抗原提示細胞は樹状細胞（DC）を含む。

## 【0255】

具体的な実施形態によれば、抗原提示細胞は、成熟樹状細胞（mDC）を含む。

## 【0256】

具体的な実施形態によれば、抗原提示細胞の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%が成熟樹状細胞（mDC）を含む。 10

## 【0257】

具体的な実施形態によれば、抗原提示細胞は、照射された樹状細胞を含む。

## 【0258】

一実施形態によれば、抗原提示細胞は、（下記で論じられるように）細胞の集団と同じドナー対象のものである。

## 【0259】

細胞は、単一細胞の抗原のすべてを発現し得るか、または単一細胞に抗原の一部のみを発現し得ることが理解されよう。さらに、異なる抗原提示細胞（例えば、同じ調製物中で）は、異なる抗原を発現し得る。したがって、抗原提示細胞（例えば、mDC）は、不均 20

## 【0260】

本発明のいくつかの実施形態によれば、1つまたは複数の抗原（例えばウイルスペプチド）は、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞（例えば、1つまたは複数の抗原をトランスフェクトした細胞株）によって認識可能なMHC抗原（ヒト白血球抗原（HLA）とも呼ばれる）を示す遺伝子組換え抗原提示細胞または人工抗原提示細胞によって提示され得る。追加的または代替的に、本発明のいくつかの実施形態の1つまたは複数の抗原（例えばウイルスペプチド）は、人工ビヒクル（例えばリポソーム）に提示することができる。

## 【0261】

したがって、抗原提示細胞（上記のような）、細胞株、人工ビヒクル（リポソームなど） 30  
または人工抗原提示細胞（例えば、1つまたは複数の抗原をトランスフェクトした白血病細胞株または線維芽細胞株）を使用して、それに融合もしくは負荷された短い合成ペプチドを提示するか、またはタンパク質抽出物もしくは精製タンパク質を提示することができる。そのような短いペプチド、タンパク質抽出物または精製タンパク質は、ウイルス、細菌、真菌または腫瘍抗原由来のペプチド、または任意の他の抗原を表すペプチドであり得る。

## 【0262】

上述のように、本発明のいくつかの実施形態の方法は、T細胞を含む細胞の集団を提供することによって影響され、細胞の集団のT細胞は、CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>表現型を発現し、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させた少なくとも40 40  
%のメモリーT細胞を含む。

## 【0263】

「T細胞を含む細胞の集団」という用語は、T細胞、B細胞および骨髄系細胞を含むPBMCの不均一な混合物を指す。T細胞を含む細胞の集団は、典型的には、多数のシグネチャ、機能を有し、様々な抗原（例えば、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞、エフェクターT細胞など）に結合することができるT細胞を含む。

## 【0264】

一実施形態によれば、T細胞を含む細胞の集団は、赤血球および顆粒球を含まない。

## 【0265】

本明細書で使用される「メモリーT細胞」という用語は、抗原経験T細胞とも呼ばれる 50

、抗原に以前に遭遇し、それに応答したＴリンパ球のサブセットを指す。

【０２６６】

一実施形態によれば、メモリーＴ細胞は、細胞の集団のＴ細胞の少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、またはさらに１００％を構成する。

【０２６７】

正常条件下（すなわち、健康な対象において決定されるように）では、メモリーＴ細胞のレベルは、Ｔ細胞を含む細胞の集団の細胞の総数の２０％未満を含むことが理解されよう。

【０２６８】

一実施形態によれば、メモリーＴ細胞は、ＣＤ８マーカー（すなわち、ＣＤ８<sup>+</sup>Ｔ細胞）を発現するＴ細胞を含む。

【０２６９】

別の実施形態によれば、メモリーＴ細胞はＣＤ８<sup>+</sup>ＣＤ４５ＲＯ<sup>+</sup>表現型を含む。

【０２７０】

別の実施形態によれば、メモリーＴ細胞はＣＤ８<sup>+</sup>ＣＤ４５ＲＡ<sup>-</sup>表現型を含む。

【０２７１】

別の実施形態によれば、メモリーＴ細胞は、ＣＤ８<sup>+</sup>ＣＤ４５ＲＯ<sup>+</sup>ＣＤ４５ＲＡ<sup>-</sup>表現型を含む。

【０２７２】

一実施形態によれば、メモリーＴ細胞はＣＤ４５ＲＡ<sup>+</sup>細胞を欠いている。

【０２７３】

一実施形態によれば、メモリーＴ細胞はＣＤ４<sup>+</sup>および／またはＣＤ５６<sup>+</sup>細胞を欠いている。

【０２７４】

メモリーＣＤ８<sup>+</sup>Ｔ細胞の選択は、ＣＤ８<sup>+</sup>およびＣＤ４５ＲＡ<sup>-</sup>を共発現する細胞および／またはＣＤ８<sup>+</sup>およびＣＤ４５ＲＯ<sup>+</sup>を共発現する細胞の選択によって影響され得、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、例えば、アフィニティーベースの精製（例えば、ＭＡＣＳビーズ、ＦＡＣＳソーターおよび／または捕捉ＥＬＩＳＡ標識の使用などによる）によって行われ得る。

【０２７５】

メモリーＣＤ８<sup>+</sup>Ｔ細胞の選択は、エフェクターＴ細胞およびセントラルメモリーＴ細胞の選択によってさらに影響され得、セントラルメモリーＴ細胞は、例えば、ＣＤ６２Ｌ、ＣＣＲ７、ＣＤ２７および／またはＣＤ２８を発現する。

【０２７６】

Ｔ細胞の集団が高純度のメモリーＴ細胞（例えば、少なくとも約３０～５０％のメモリーＴ細胞、例えば４０％のメモリーＴ細胞）を含む細胞の集団を得るために、またはメモリーＴ細胞の数を増加させるために、ＰＢＭＣは、ナイーブ細胞、例えばＣＤ４５ＲＡ<sup>+</sup>細胞、ＣＤ４<sup>+</sup>細胞（例えば、Ｔヘルパー細胞）、ＣＤ５６<sup>+</sup>細胞（例えばＮＫ細胞）、またはメモリーＴ細胞表現型を含まない任意の他の細胞が枯渇し得る。

【０２７７】

ナイーブＴ細胞（例えばＣＤ４５ＲＡ<sup>+</sup>細胞を発現する）、ＣＤ４<sup>+</sup>および／またはＣＤ５６<sup>+</sup>細胞の枯渇は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、例えば親和性に基づく精製（例えば、ＭＡＣＳビーズ、ＦＡＣＳソーターおよび／または捕捉ＥＬＩＳＡ標識の使用などによる）によって行われ得る。

【０２７８】

一実施形態によれば、メモリーＴ細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から得られる。

【０２７９】

一実施形態によれば、メモリーＴ細胞は、ＣＤ４５ＲＡ<sup>-</sup>ＣＤ８<sup>+</sup>表現型を発現する少

10

20

30

40

50

なくとも40%のメモリーT細胞を含む細胞の集団を得るために、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させることができる1つまたは複数の作用物質で第1のPBMCの集団と同じドナー対象の第2のPBMCの集団を処理することを含む方法によって得られる。

【0280】

一実施形態によれば、細胞の集団は、B細胞および骨髄系細胞をさらに含む。

【0281】

一実施形態によれば、第1の細胞の集団から収集されたCD14<sup>-</sup>細胞は、メモリーT細胞の富化の前に第2の細胞の集団と組み合わせられる。

【0282】

一実施形態によれば、メモリーT細胞の富化の前に、第1の細胞の集団から得られたCD14<sup>-</sup>細胞および／または第2の細胞の集団から得られたPBMCを遠心分離し、細胞増殖培地、例えばT細胞増殖培地（例えば、1:100 GlutaMaxeおよび5%ヒトAB血清を補充した高度RPMI1640を含むクリック培地）中に、IL-7（30IU/mL）と共に、例えば10-50×10<sup>6</sup>細胞/mL、例えば30×10<sup>6</sup>細胞/mLの濃度で再懸濁する。一実施形態によれば、細胞増殖培地には、IL-7（例えば1~100IU/mL、例えば30IU/mLの濃度で）が補充される。次いで、細胞懸濁液を播種し（例えば組織培養フラスコ内で）、37℃、5%のCO<sub>2</sub>で12~36時間、例えば16~24時間、例えば24時間インキュベートする。

【0283】

一実施形態によれば、第2のPBMCの集団を遠心分離し、緩衝液（例えば、CliniMACS（登録商標）/0.5%HSA緩衝液）中に最小1:2の比まで再懸濁する。

【0284】

一実施形態によれば、第2のPBMCの集団を血小板洗浄し（例えば、血栓の洗浄）、遠心分離し、緩衝液（例えば、CliniMACS（登録商標）/0.5%HSA緩衝液）に再懸濁する。

【0285】

一実施形態によれば、一実施形態の血小板除去後細胞調製物をIVIgで5~30分間、例えば10~15分間インキュベートする。最初のインキュベーションの後、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>結合剤を細胞調製物に添加し、オービタルロテータにて例えば10~60分間、例えば30分間インキュベートする。

【0286】

一実施形態によれば、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>および／またはCD45RA<sup>+</sup>結合剤は抗体である。

【0287】

具体的な実施形態によれば、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>、および／またはCD45RA<sup>+</sup>結合剤はモノクローナル抗体である。

【0288】

具体的な実施形態によれば、CD4<sup>+</sup>モノクローナル抗体、CD56<sup>+</sup>モノクローナル抗体、および／またはCD45RA<sup>+</sup>モノクローナル抗体が磁性粒子にコンジュゲートされる。

【0289】

具体的な実施形態によれば、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>および／またはCD45RA<sup>+</sup>モノクローナル抗体は、超常磁性粒子にコンジュゲートされる。

【0290】

一実施形態によれば、インキュベーションの最後に、細胞を遠心分離によって洗浄し、細胞ペレットを緩衝液（例えば、CliniMACS（登録商標）/0.5%HSA緩衝液）に再懸濁して過剰な試薬を除去する。

【0291】

一実施形態によれば、CD4<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>標識細胞は、磁気分離技

10

20

30

40

50

術（本明細書にて上で詳しく論じられているように）によって選択される。

【0292】

具体的な実施形態によれば、 $CD4^+ / CD56^+ / CD45RA^+$  標識細胞は、*CliniMACS*（登録商標）カラムで処理される。

【0293】

一実施形態によれば、 $CD4^+ / CD56^+ / CD45RA^+$  磁気標識細胞（すなわち、 $CD4^+ / CD56^+ / CD45RA^+$  発現細胞）を分離カラム（すなわち、陰性の選択）によって保持し、 $CD4^- / CD56^- / CD45RA^-$  細胞を回収する。一実施形態によれば、収集された細胞が洗浄され、T細胞増殖培地に再懸濁される。一実施形態によれば、細胞数、生存率および／または免疫表現型検査のために、各画分からの試料を除去する。

10

【0294】

一実施形態によれば、回収された  $CD4^- / CD56^- / CD45RA^-$  細胞画分は、サイトカインおよび増殖因子を補充したT細胞増殖培地中で  $0.01 \sim 10 \times 10^6$  細胞／ml、例えば  $2 \times 10^6$  細胞／ml に調整される。使用されるサイトカインおよび成長因子の決定は、当業者の技術の範囲内である。例えば、T細胞増殖培地に IL-7（例えば  $1 \sim 100$  IU／ml、例えば  $30$  IU／ml の濃度で）を補充する。次いで、細胞懸濁液を播種し（例えば、*G-Rex*（登録商標）100）、 $37^\circ\text{C}$ 、5%の $\text{CO}_2$ で12～36時間、例えば16～24時間、例えば24時間インキュベートする。

【0295】

抗原（例えばウイルス抗原）活性化によってメモリーT細胞プールからアロ反応性クローンを枯渇させるために、メモリーT細胞を抗原性ペプチド、例えばウイルスペプチドと接触させる。

20

【0296】

典型的には、本発明の *Tcm* 表現型を含む非GVHD誘導細胞は、メモリーT細胞を含む細胞の集団を、IL-21（例えば、他の点ではサイトカインを含まない培養において、すなわち、いかなる追加のサイトカインも添加せず）を補充した培養物中で抗原性ペプチド、例えばウイルスペプチド（上記のような）が負荷された抗原提示細胞と接触させることによって作製される。この工程は、典型的には、約12～24時間、約12～36時間、約12～72時間、12～96時間、12～120時間、約24～36時間、約24～48時間、約24～72時間、約36～48時間、約36～72時間、約48～72時間、約48～96時間、約48～120時間、0.5～1日、0.5～2日、0.5～3日、0.5～5日、1～2日、1～3日、1～5日、1～7日、1～10日、2～3日、2～4日、2～5日、2～6日、2～8日、3～4日、3～5日、3～7日、4～5日、4～8日、5～7日、6～8日、または8～10日行われ、抗原（例えばウイルス抗原）反応性細胞の富化を可能にする。

30

【0297】

具体的な実施形態によれば、 $CD4^+$  細胞、 $CD56^+$  細胞および  $CD45RA^+$  細胞が枯渇され、かつ、メモリー  $CD8^+$  T細胞（例えば、T細胞を含む細胞の集団であって、細胞の集団のT細胞が少なくとも40%のメモリーT細胞を含む）を含むPBMCの集団を、IL-21が補充される培養物（そうでなければ、サイトカインを含まない培養物）において1つまたは複数の抗原（例えば、上で記載されるような）と接触させることが、12時間～6日間（例えば3日）にわたって実行される。

40

【0298】

IL-21を補充した培養物中でメモリー  $CD8^+$  T細胞を含む細胞の集団と1つまたは複数の抗原（上記のような）とを接触させることは、典型的には、約  $0.001 \sim 3000$  IU／ml、 $0.01 \sim 3000$  IU／ml、 $0.1 \sim 3000$  IU／ml、 $1 \sim 3000$  IU／ml、 $10 \sim 3000$  IU／ml、 $100 \sim 3000$  IU／ml、 $1000 \sim 3000$  IU／ml、 $0.001 \sim 1000$  IU／ml、 $0.01 \sim 1000$  IU／ml、 $0.1 \sim 1000$  IU／ml、 $1 \sim 1000$  IU／ml、 $10 \sim 1000$  IU／ml

50

、100～1000 IU/ml、250～1000 IU/ml、500～1000 IU/ml、750～1000 IU/ml、10～500 IU/ml、50～500 IU/ml、100～500 IU/ml、250～500 IU/ml、100～250 IU/ml、0.1～100 IU/ml、1～100 IU/ml、10～100 IU/ml、30～100 IU/ml、50～100 IU/ml、1～50 IU/ml、10～50 IU/ml、20～50 IU/ml、30～50 IU/ml、1～30 IU/ml、10～30 IU/ml、20～30 IU/ml、10～20 IU/ml、0.1～10 IU/ml、または～10 IU/mlのIL-21の存在下で行われる。具体的な実施形態によれば、IL-21の濃度は50～500 IU/ml（例えば100 IU/ml）である。

【0299】

10

具体的な実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を含む細胞の集団を、1つまたは複数の抗原と接触させることは、サイトカインを含まない培養（例えば、IL-21のみが補充される）において影響を受け、そのような培養条件は、1つまたは複数の抗原による刺激および活性化を受ける細胞（すなわち、抗原反応性細胞、例えばウイルス反応性メモリーT細胞）のみの生存および富化を可能にする。なぜなら、これらの細胞は、それらの生存を可能にするサイトカイン（例えばIL-2）を分泌するからである（残りの細胞はすべて、これらの培養条件下で死ぬ）。

【0300】

一実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞（すなわち、CD4<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>細胞）を含む細胞の集団と抗原性（例えばウイルス）ペプチド負荷抗原提示細胞（例えばmDC）との比は、典型的には約2：1～約10：1、例えば約2：1、約3：1、約4：1、約5：1、約6：1、約8：1、または約10：1である。具体的な実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞（すなわち、CD4<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>細胞）を含む細胞の集団の、抗原性（例えばウイルス）ペプチド負荷抗原提示細胞（例えばmDC）に対する比は、約2：1～8：1、例えば、約5：1である。

20

【0301】

具体的な実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞（すなわち、CD4<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>細胞）を含む細胞の集団を、ウイルスペプチド負荷抗原提示細胞（例えばmDC）と一緒に、約2：1～約8：1の比、例えば約5：1（メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞：抗原提示細胞（例えば、mDC））で、IL-21（例えば、50～500 IU/ml、例えば100 IU/mlの濃度で）と共に、T細胞増殖培地中に、37℃、5%CO<sub>2</sub>で1～5日間（例えば3日）にわたって、0.01～10×10<sup>6</sup>細胞/ml、例えば1×10<sup>6</sup>細胞/mlの濃度で、播種する（例えば、G-Rex（登録商標）100）。

30

【0302】

次に、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞（すなわち、IL-21との培養後）を含む得られた細胞の集団を、Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、IL-21、IL-15、および／またはIL-7の存在下で培養する。この工程は、典型的には、約12～24時間、約12～36時間、約12～72時間、約12～96時間、約12～120時間、約12～240時間、24～36時間、24～48時間、約24～72時間、24～96時間、24～120時間、24～240時間、約48～72時間、約48～120時間、約48～240時間、約96～240時間、約120～144時間、約120～240時間、約144～240時間、0.5～1日、0.5～2日、0.5～3日、0.5～5日、0.5～10日、1～2日、1～3日、1～4日、1～6日、1～8日、1～9日、1～10日、2～3日、2～4日、2～5日、2～6日、2～8日、2～9日、2～10日、4～5日、4～6日、4～8日、4～9日、4～10日、5～6日、5～7日、5～8日、5～9日、5～10日、5～15日、6～7日、6～8日、6～9日、6～10日、6～12日、7～8日、7～9日、7～11日、7～13日、7～15日、8～9日、8～10日、9～10日、9～12日、9～15日、10～12日、10～15日、12～15日、14～16日、14～18日、16～18日、または18～20日実行される。具体的な実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞（すなわち、IL-21との培養

40

50

後)を含む得られた細胞の集団を、IL-21、IL-15およびIL-7の存在下において約6日間～12日間(例えば9日)培養する。

【0303】

この工程は、典型的には、IL-21の存在下、約0.001～3000IU/ml、0.01～3000IU/ml、0.1～3000IU/ml、1～3000IU/ml、10～3000IU/ml、100～3000IU/ml、1000～3000IU/ml、0.001～1000IU/ml、0.01～1000IU/ml、0.1～1000IU/ml、1～1000IU/ml、10～1000IU/ml、100～1000IU/ml、250～1000IU/ml、500～1000IU/ml、750～1000IU/ml、10～500IU/ml、50～500IU/ml、100～500IU/ml、250～500IU/ml、100～250IU/ml、0.1～100IU/ml、1～100IU/ml、10～100IU/ml、30～100IU/ml、50～100IU/ml、1～50IU/ml、10～50IU/ml、20～50IU/ml、30～50IU/ml、1～30IU/ml、10～30IU/ml、20～30IU/ml、10～20IU/ml、0.1～10IU/ml、または1～10IU/mlのIL-21の濃度で行われる。具体的な実施形態によれば、IL-21の濃度は50～500IU/ml(例えば100IU/ml)である。

10

【0304】

この工程は、さらに、IL-15の存在下、約0.001～3000IU/ml、0.01～3000IU/ml、0.1～3000IU/ml、1～3000IU/ml、10～3000IU/ml、100～3000IU/ml、125～3000IU/ml、1000～3000IU/ml、0.001～1000IU/ml、0.01～1000IU/ml、0.1～1000IU/ml、1～1000IU/ml、10～1000IU/ml、100～1000IU/ml、125～1000IU/ml、250～1000IU/ml、500～1000IU/ml、750～1000IU/ml、10～500IU/ml、50～500IU/ml、100～500IU/ml、125～500IU/ml、250～500IU/ml、250～500IU/ml、125～250IU/ml、100～250IU/ml、0.1～100IU/ml、1～100IU/ml、10～100IU/ml、30～100IU/ml、50～100IU/ml、1～50IU/ml、10～50IU/ml、20～50IU/ml、30～50IU/ml、1～30IU/ml、10～30IU/ml、20～30IU/ml、10～20IU/ml、0.1～10IU/ml、または1～10IU/mlのIL-15の濃度で行われる。具体的な実施形態によれば、IL-15の濃度は50～500IU/ml(例えば125IU/ml)である。

20

30

【0305】

この工程は、さらに、IL-7の存在下、約0.001～3000IU/ml、0.01～3000IU/ml、0.1～3000IU/ml、1～3000IU/ml、10～3000IU/ml、30～3000IU/ml、100～3000IU/ml、1000～3000IU/ml、0.001～1000IU/ml、0.01～1000IU/ml、0.1～1000IU/ml、1～1000IU/ml、10～1000IU/ml、30～1000IU/ml、100～1000IU/ml、250～1000IU/ml、500～1000IU/ml、750～1000IU/ml、10～500IU/ml、30～500IU/ml、50～500IU/ml、100～500IU/ml、250～500IU/ml、250～500IU/ml、100～250IU/ml、0.1～100IU/ml、1～100IU/ml、10～100IU/ml、30～100IU/ml、50～100IU/ml、1～50IU/ml、10～50IU/ml、20～50IU/ml、30～50IU/ml、1～30IU/ml、10～30IU/ml、20～30IU/ml、10～20IU/ml、0.1～10IU/ml、または1～10IU/mlのIL-7の濃度で行われる。具体的な実施形態によれば、IL-7の濃度は1～100IU/ml(30IU/ml)である。

40

50

## 【0306】

具体的な実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を含む得られた細胞の集団を含む細胞培養物（すなわち、IL-21との培養後）に、IL-7（例えば、例えば1~100 IU/mL、例えば30 IU/mLの濃度で）、IL-15（例えば、例えば50~500 IU/mL、例えば125 IU/mLの濃度で）およびIL-21（例えば、50~500 IU/mL、例えば100 IU/mLの濃度で）を培養体積の50%で補充し、IL-7、IL-15、IL-21を、約48時間~96時間ごとに、例えば48時間ごとに、例えば72時間ごとに補充しながら、約6~12日間（例えば9日）培養する。

## 【0307】

一実施形態によれば、Tcm細胞を作製するための培養時間の全長は、約9、10、11、12、13、14、15、17、19、または21日（例えば12日）である。

10

## 【0308】

一実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を含む得られた細胞の集団を含む細胞培養物（すなわち、IL-21との培養後）が、グルコースレベルについてモニターされる。

## 【0309】

一実施形態によれば、グルコースは、10~500 mg/dL、例えば50~170 mg/dLを含むレベルである。

## 【0310】

一実施形態によれば、グルコースレベルが170 mg/dL~130 mg/dLの間である場合、サイトカインIL-7、IL-15、IL-21を培養物に添加する（上で詳述したように）。

20

## 【0311】

一実施形態によれば、グルコースレベルが129 mg/dL~100 mg/dLの間である場合、新鮮なT細胞増殖培地、例えば25%容量、例えば100 mL（例えば、400 mLのG-Rex（登録商標）100体積の25%）+サイトカインIL-7、IL-15、IL-21を、培養物に添加する。

## 【0312】

一実施形態によれば、グルコースレベルが99 mg/dL~50 mg/dLの間である場合、新鮮なT細胞増殖培地、例えば50%容量、例えば200 mL（例えば、400 mLのG-Rex（登録商標）100体積の50%）+サイトカインIL-7、IL-15、IL-21を、培養物に添加する。

30

## 【0313】

一実施形態によれば、培養は、少なくとも約20 mg/dL、少なくとも約30 mg/dL、少なくとも約40 mg/dL、少なくとも約50 mg/dL、少なくとも約60 mg/dL、少なくとも約70 mg/dL、少なくとも約80 mg/dL、少なくとも約90 mg/dL、少なくとも約100 mg/dLの濃度までグルコースを添加することをさらに含む。

## 【0314】

具体的な実施形態によれば、培養は、グルコースを少なくとも約50 mg/dLの濃度まで添加することをさらに含む。

40

## 【0315】

一実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を含む得られた細胞の集団を含む細胞培養物（すなわち、IL-21との培養後）が、pHレベルについてモニターされる。一実施形態によれば、pHは生理学的範囲（例えば、pH 7.2~7.6）にある。pHレベルが生理学的範囲にない場合、pHレベルは、当技術分野で公知の任意の方法を使用して調整することができる。

## 【0316】

本発明の一実施形態によれば、セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を含む非移植片対宿主病（GVHD）誘導細胞の単離された集団を作製する方法であって、細胞

50

が、寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、かつ移植後にリンパ節へホーミングすることができる方法が提供され、方法は、

(a) ドナー対象由来の第1の末梢血単核細胞(PBMC)の集団を、CD14<sup>+</sup>発現細胞を選択することができる抗体と接触させ、樹状細胞に成熟することができるCD14<sup>+</sup>発現細胞を選択すること、

(b) 樹状細胞に、4～10種類のウイルスに由来するウイルスペプチドを負荷することであって、ウイルスの少なくとも1つがBKウイルスを含む負荷すること、

(c) CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>表現型を発現するメモリーT細胞を含む細胞の集団を得るために、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>発現細胞を枯渇させることができる1つまたは複数の作用物質で第1のPBMCの集団と同じドナー対象の第2のPBMCの集団を処置すること、

(d) ウイルス反応性メモリーT細胞の富化を可能にするために、IL-21の存在下で、メモリーT細胞を含む細胞の集団を工程(b)のウイルスペプチドが負荷された樹状細胞と接触させること、および

(e) Tcm表現型を含む細胞の増殖を可能にするように、IL-21、IL-15および／またはIL-7の存在下で工程(d)から得られた細胞を培養し、それにより、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団を作製することを含む。

#### 【0317】

一実施形態によれば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を含む得られた細胞の集団(すなわち、IL-21との培養後)をIL-21、IL-15および／またはIL-7の存在下で培養することは、典型的には、抗原を含まない環境(すなわち、1つまたは複数の抗原、例えばウイルスペプチドを添加せずに)において影響を受ける。しかしながら、残存する1つまたは複数の抗原(例えばウイルスペプチド)が、IL-21とともに培養した後の細胞培養物中に存在することができ(すなわち、例えば、IL-21、IL-15およびIL-7の添加を含むTcm増殖工程において)、したがって、抗原を含まない環境は、1つまたは複数の抗原を提示する補助的な抗原提示細胞を加えない細胞培養物に関連する(例えばウイルスペプチド)ことを理解されたい。

#### 【0318】

一実施形態によれば、1つまたは複数の抗原に特異的なメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を得るために、1つまたは複数の抗原(例えば、腫瘍抗原、ウイルス抗原)をドナー対象に投与した後、そこからメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を得る(例えば、少なくとも40%のメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を含むT細胞の集団を提供する前に)。免疫原性応答(例えば、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞の生成)を誘発するために抗原に対して細胞ドナーを免疫する任意の方法を使用することができる。

#### 【0319】

抗原は、そのまま、またはアジュバント(例えば、完全フロイントアジュバント(CFA)または不完全フロイントアジュバント(IFA))を含む組成物の一部として投与され得る。一実施形態によれば、抗原は、ドナー対象に1回投与される。一実施形態によれば、ドナー対象は、抗原の少なくとも1回(例えば、2、3、4回またはそれを超える投与)のさらなる(例えば、ブースト)投与を受ける。そのようなさらなる投与は、抗原の最初の投与の1、3、5、7、10、12、14、21、30日またはそれより後に影響を受け得る。

#### 【0320】

メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を特定の抗原に対してさらに富化し、メモリーT細胞のプールからアロ反応性クローンを枯渇させるために、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞を含む細胞の集団を、本明細書の上で記載されるように、同じ1つまたは複数の抗原(例えば、細胞ドナーに投与されるのと同じ抗原)とさらに接触させることができる。

#### 【0321】

細胞サンプルおよび培養培地サンプルは、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の単離集団を作製するプロセスの間の任意の段階で得ることができることが理解されるのである

う。これらは、細胞数、細胞生存率、無菌性、免疫表現型検査、グルコースおよびpHレベルなどを評価するために使用することができる。当技術分野で公知の任意の方法を使用して、そのような処置を実施することができる。

【0322】

一実施形態によれば、セントラルメモリーTリンパ球（Tcm）表現型を有する細胞を含む非GVHD誘導細胞の単離された集団であって、本発明のいくつかの実施形態の方法に従って作製され、細胞が寛容誘導細胞であり、かつ／または抗疾患活性を付与され、移植後にリンパ節へホーミングすることができる集団が提供される。

【0323】

Tcm表現型を含む非GVHD誘導の生成後、細胞は、新鮮な細胞（例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10日以内、例えば、約3日以内）として使用され得る。

【0324】

あるいは、必要になるまで（例えば、1週間、2週間、1ヶ月、2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、1年以上）細胞を凍結保存してもよい。

【0325】

一実施形態によれば、本発明のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞は、天然に存在せず、天然の産物ではない。これらの細胞は、典型的には、エキスピボ操作（すなわち、特定のサイトカインの存在下での1つまたは複数の抗原への曝露）によって産生される。

【0326】

上記のプロトコルは、典型的には、非同系適用のために使用され、したがって、使用されるメモリーT細胞またはPBM Cを含む細胞の集団は、典型的には、レシピエント対象（例えば、同種異系ドナーからの）に関して同種異系である。同様に、異種適用が有益であり得る場合、使用されるメモリーT細胞またはPBM Cは、後述するように異種起源のものであり得る。しかしながら、同系適用が有益であり得る場合、使用されるメモリーT細胞またはPBM Cを含む細胞の集団は、レシピエント対象（例えば、対象から）に関して自己であり得る。そのような決定は、特に提供される開示を考慮して、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0327】

したがって、述べられたように、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞またはPBM Cを含む細胞の集団は、対象に関して同系または非同系であり得る。

【0328】

本明細書で使用される場合、「同系」細胞という用語は、対象または対象の本質的にすべてのリンパ球と本質的に遺伝的に同一である細胞を指す。同系細胞の例としては、対象に由来する細胞（当技術分野では「自己」とも呼ばれる）、対象のクローンに由来する細胞、または対象の一卵性双生児に由来する細胞が挙げられる。

【0329】

本明細書で使用される場合、「非同系」細胞という用語は、同種細胞または異種細胞など、対象または対象の本質的にすべてのリンパ球と本質的に遺伝的に同一ではない細胞を指す。

【0330】

本明細書で使用される場合、「同種異系」という用語は、レシピエント対象と同じ種であるがレシピエント対象と実質的に非クローン性であるドナー対象に由来する細胞を指す。典型的には、同じ種の非近交系の非接合性双生児哺乳動物は、互いに同種異系である。同種異系細胞は、レシピエント対象に対してHLA同一、部分的HLA同一またはHLA非同（すなわち、1つまたはそれを超える異種HLA決定基を示す）であり得ることが理解されるであろう。

【0331】

一実施形態によれば、ドナーはヒトである。

【0332】

本明細書で使用される場合、「異種」という用語は、対象のリンパ球のかんりの割合の種とは異なる種の抗原を実質的に発現する細胞を指す。典型的には、異なる種の非近交系哺乳動物は互いに異種である。

【0333】

本発明は、異種細胞が様々な種に由来することを想定する。したがって、一実施形態によれば、細胞は、任意の哺乳動物に由来し得る。細胞にとって適した種の起源は、主要な飼育動物または家畜動物および霊長類を含む。そのような動物には、ブタ属（例えば、ブタ）、ウシ属（例えば、牛）、ウマ属（例えば、ウマ）、ヒツジ属（例えば、ヤギ、ヒツジ）、ネコ（例えば、*Felis domestica*）、イヌ（例えば、*Canis domestica*）、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、スナネズミ、ハムスター）および霊長類（例えば、チンパンジー、アカゲザル、マカクサル、マーモセット）が含まれるが、これらに限定されない。異種起源の細胞（例えば、ブタ属起源）は、好ましくは、ブタ内因性レトロウイルスなどの人畜共通感染症を含まないことが知られている供給源から得られる。同様に、ヒト由来の細胞または組織は、好ましくは、実質的に病原体を含まない供給源から得られる。

【0334】

したがって、メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞またはPBM Cを含む細胞の集団の供給源は、細胞の意図される用途に関して決定され（本明細書で下記のさらなる詳細を参照のこと）、特に本明細書に提供される詳細な開示に照らして、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0335】

ベト細胞の使用は、移植片の拒絶を排除し、移植片対宿主病（GVHD）を克服し、および／または同種異系もしくは異種の細胞もしくは組織の移植などにおいて、ドナー特異的寛容性を誘導する必要がある状況において特に有益である。ベト細胞の使用はまた、CAR-T細胞またはTCRトランスジェニックT細胞（TCR-T）などの「既製の」同種遺伝子改変T細胞の延長にも有益であり得る。

【0336】

したがって、本発明のいくつかの実施形態のベト細胞は、本明細書の上で詳しく論じられるように、T細胞受容体シグナル伝達モジュール（すなわち、受容体が配置されているT細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に関与する受容体の細胞内部分）を含む細胞表面受容体、例えばトランスジェニックT細胞受容体（tg-TCR）またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように形質導入された遺伝子改変細胞の生着を促進するためのアジュバント療法として使用され得る。

【0337】

一実施形態によれば、本発明のいくつかの実施形態のベト細胞は、任意のCAR-T細胞またはTCR-T細胞（例えばベト細胞ドナーの細胞から作製されたCAR-TまたはTCR-T細胞）、例えば、造血癌または固形癌の処置のための種々の腫瘍抗原を標的とする腫瘍特異的CAR-T細胞またはTCR-T細胞と併せて使用することができる。標的とすることができるこれらの癌およびそれらの抗原の例には、濾胞性リンパ腫（CD20またはGD2）、神経芽腫（CD171）、非ホジキンリンパ腫（CD20）、リンパ腫（CD19）、神経膠芽腫（IL13R $\alpha$ 2）、慢性リンパ性白血病またはCLL、多発性骨髄腫（BCMA、CD138、CS1）および急性リンパ性白血病またはALL（両方ともCD19）が含まれるが、これらに限定されない。

【0338】

ベト細胞およびCAR-T/TCR-T細胞は、互いに同時にまたは続いて（例えば、互いと同じ日に、または例えば約1、2、3、4、5、6、7日以内に）使用され得ることが理解されるであろう。

【0339】

上述のように、本発明のベト細胞は、抗疾患活性（例えば、抗ウイルス活性または抗腫瘍活性、例えばGVL）をさらに授けられており、したがって、対象、例えば移植される対象が、移植前または移植後に疾患または状態（例えば、悪性、ウイルス性、細菌性、真

10

20

30

40

50

菌性、自己免疫性またはアレルギー性の疾患または状態)を有する状況において有益である(例えば、免疫再構成が確立される前)。

【0340】

一実施形態によれば、本発明のベト細胞は、ウイルス感染を予防するのに有益である。

【0341】

一実施形態によれば、本発明のベト細胞は、残留癌細胞(例えば白血病細胞)を含む癌細胞を死滅させるのに有益である。

【0342】

一実施形態によれば、本発明のベト細胞は、疾患の再発(例えば、白血病再発)を防止するために有益である。

【0343】

したがって、本発明の別の態様によれば、必要とする対象において疾患を処置する方法であって、治療有効量の本発明のいくつかの実施形態の非GVHD誘導細胞の単離された集団(すなわち、Tcm細胞)を対象に投与し、それにより、対象において疾患を処置することを含む方法が提供される。

【0344】

本発明の別の態様によれば、必要とする対象において疾患を処置するために特定される医薬品を製造するための、本発明のいくつかの実施形態のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の使用が提供される。

【0345】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、状態の進行を無効にする、実質的に阻害する、遅らせる、または逆転させる、状態の臨床的または審美的症状を実質的に改善する、または状態の臨床的または審美的症状の出現を実質的に防止することを含む。

【0346】

本明細書で使用される場合、「対象」または「必要とする対象」という用語は、細胞または組織の移植を必要とするか、または非GVHD誘導Tcm細胞で治療され得る疾患に罹患している任意の年齢の雄または雌の哺乳動物、好ましくはヒトを指す。典型的には、対象は、障害または病理学的もしくは望ましくない状態、状況もしくは症候群、または細胞もしくは組織の移植による治療に適した物理的、形態学的もしくは生理学的異常に起因して、細胞または組織の移植(本明細書ではレシピエントとも呼ばれる)を必要としている。そのような障害の例を以下にさらに提供する。

【0347】

したがって、本発明の方法は、限定されないが、悪性疾患、移植片の移植に関連する疾患(例えば、移植片拒絶、移植片対宿主病)、感染性疾患(例えば、ウイルス性疾患、真菌性疾患または細菌性疾患)、炎症性疾患、自己免疫疾患および/またはアレルギー疾患もしくは状態などの任意の疾患を治療するために適用され得る。

【0348】

一実施形態によれば、対象は悪性疾患を有する。

【0349】

本発明のいくつかの実施形態の方法によって処置することができる悪性疾患(癌とも呼ばれる)は、任意の固形もしくは非固形腫瘍および/または腫瘍転移および/または疾患の再発であり得る。

【0350】

癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病が挙げられるが、これらに限定されない。そのような癌のより具体的な例には、扁平上皮癌、軟部組織肉腫、カポジ肉腫、黒色腫、肺癌(小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、および肺扁平上皮癌を含む)、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌(胃腸癌を含む)、脾癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、カルチノイド癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、中皮腫、多発性骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害(PTLD)、および様

10

20

30

40

50

々な種類の頭頸部癌（例えば、脳腫瘍）が含まれる。本発明の治療に適した癌性状態には、転移性癌が含まれる。

【0351】

具体的な実施形態によれば、悪性疾患は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、黒色腫、肉腫、神経芽細胞腫、結腸癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、食道癌、滑膜細胞癌、肝癌および膵臓癌である。

【0352】

一実施形態によれば、悪性疾患は血液悪性腫瘍である。例示的な血液悪性腫瘍には、白血病〔例えば、急性リンパ芽球性、急性リンパ芽球性、急性リンパ芽球性プレB細胞、急性リンパ芽球性T細胞白血病、急性巨核芽球性、単球性、急性骨髄性（acute myelogenous）、急性骨髄性（acute myeloid）、好酸球増加を伴う急性骨髄性、B細胞、好塩基球性、慢性骨髄性、慢性、B細胞、好酸球性、フレンド、顆粒球性または骨髄性、有毛細胞、リンパ球性、巨核芽球性、単球性、単球性マクロファージ、骨髄芽球性、骨髄単球性、形質細胞、プレB細胞、前骨髄球性、亜急性、T細胞、リンパ系新生物、骨髄性悪性腫瘍の素因、急性非リンパ球性白血病、T細胞急性リンパ球性白血病（T-ALL）およびB細胞慢性リンパ球性白血病（B-CLL）〕およびリンパ腫〔例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、バーキット、皮膚T細胞、組織球性、リンパ芽球性、T細胞、胸腺、B細胞（低悪性度／濾胞性を含む）；小リンパ球性（SL）NHL；中間グレード／濾胞性NHL；中間グレードのびまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度の小型非切断細胞NHL；巨大病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症〕が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0353】

具体的な実施形態によれば、血液悪性腫瘍は、濾胞性リンパ腫（FL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、多発性骨髄腫（MM）、ホジキンリンパ腫（HL）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、慢性骨髄性白血病（CML）、骨髄増殖性症候群（MPD）、急性骨髄性白血病（AML）、または急性リンパ性白血病（ALL）である。

【0354】

一実施形態によれば、対象は、非悪性疾患を有する。

30

【0355】

一実施形態によれば、非悪性疾患は、臓器機能不全または臓器不全、血液学的疾患、移植片関連疾患、感染性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、遺伝性疾患または遺伝性障害、代謝障害、外傷および傷害である。

【0356】

一実施形態によれば、本発明の対象は、細胞または組織移植によって治療可能な心血管疾患、リウマチ様疾患、腺疾患、胃腸疾患、皮膚疾患、肝疾患、神経疾患、筋疾患、腎疾患、結合組織疾患、全身性疾患および／または生殖に関連する疾患のいずれかに罹患し得る。

【0357】

例示的な非悪性疾患には、重症複合免疫不全症候群（SCID）、鎌状赤血球症（例えば、鎌状赤血球貧血）、先天性好中球減少症、血小板減少症、再生不良性貧血（例えば、重度の再生不良性貧血）、骨髄異形成症候群、モノソミー7、大理石骨病、ゴーシェ病、ハーラー病、異染性白質ジストロフィー、副腎白質ジストロフィー、サラセミア、先天性または遺伝的に決定された造血異常、アデノシンデアミナーゼ（ADA）、狼瘡、自己免疫性肝炎、セリアック病、I型糖尿病、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、関節リウマチ、強皮症および乾癬が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0358】

一実施形態によれば、非悪性疾患は、ベト細胞の添加によって補助される造血前駆細胞の移植によって処置され得る。

50

## 【0359】

一実施形態によれば、非悪性疾患は、造血前駆細胞およびベト細胞の移植（例えば、ドナーキメラ現象を誘導すること）によって補助される細胞または組織の移植片の移植によって処置され得る（下で論じられるように）。

## 【0360】

## 感染性疾患

感染性疾患の例としては、慢性感染性疾患、亜急性感染性疾患、急性感染性疾患、ウイルス性疾患、細菌性疾患、原虫性疾患、寄生虫性疾患、真菌性疾患、マイコプラズマ性疾患およびプリオン病が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0361】

本発明の教示に従って処置可能な感染性疾患を引き起こすウイルス性病原体の具体的なタイプとしては、レトロウイルス、サーコウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、イリドウイルス、ポックスウイルス、ヘパドナウイルス、ピコルナウイルス、カリシウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、ブニヤウイルス、コロナウイルス、アレナウイルスおよびフィロウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0362】

本発明の教示に従って処置され得るウイルスの感染の具体例としては、限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）誘発性後天性免疫不全症候群（AIDS）、インフルエンザ、ライノウイルスの感染、ウイルス性髄膜炎、エプスタイン・バーウイルス（EBV）の感染、A型、B型またはC型肝炎ウイルスの感染、麻疹、パピローマウイルスの感染／疣贅、サイトメガロウイルス（CMV）の感染、単純ヘルペスウイルスの感染、黄熱病、エボラウイルスの感染、狂犬病、アデノウイルス（Adv）、風邪ウイルス、流感ウイルス、日本脳炎、ポリオ、呼吸器合胞体、風疹、天然痘、水痘帯状疱疹、ロタウイルス、ウエストナイルウイルスおよびジカウイルスによって引き起こされるものが挙げられる。

## 【0363】

本発明の教示に従って処置され得る細菌感染の具体例としては、限定されないが、炭疽、グラム陰性桿菌、クラミジア、ジフテリア、インフルエンザ菌、ピロリ菌、マラリア、結核菌、百日咳毒素、肺炎球菌、リケッチア、ブドウ球菌、連鎖球菌および破傷風によって引き起こされるものが挙げられる。

## 【0364】

本発明の教示に従って処置され得るスーパーバグ感染症（例えば多剤耐性細菌）の具体例としては、限定されないが、*Enterococcus faecium*、*Clostridium difficile*、*Acinetobacter baumannii*、*Pseudomonas aeruginosa*、および *Enterobacteriaceae*（大腸菌（*Escherichia coli*）、肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）、エンテロバクター属（*Enterobacter* spp.）を含む）によって引き起こされるものが挙げられる。

## 【0365】

本発明の教示に従って処置され得る真菌感染の具体例としては、限定されないが、カンジダ、コクシジオデス、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、リーシュマニア、プラスモジウム、原虫、寄生虫、住血吸虫、白癬、トキソプラズマおよびクルーズトリパノソーマによって引き起こされるものが挙げられる。

## 【0366】

## 移植片拒絶疾患

他の実施形態によれば、疾患は、移植片の移植に関連する。移植片の移植に関連する疾患の例には、移植片拒絶、慢性移植片拒絶、亜急性移植片拒絶、超急性移植片拒絶、急性移植片拒絶、同種移植片拒絶、異種移植片拒絶および移植片対宿主病（GVHD）が含ま

10

20

30

40

50

れるが、これらに限定されない。

【0367】

非悪性血液疾患

非悪性血液疾患の例には、貧血、骨髄障害、深部静脈血栓症／肺塞栓症、ダイヤモンドブラックファン貧血、ヘモクロマトーシス、血友病、免疫血液学的障害、鉄代謝障害、鎌状赤血球症（例えば、鎌状赤血球貧血）、サラセミア、血小板減少症およびフォン・ヴィレブランド病が含まれるが、これらに限定されない。

【0368】

具体的な実施形態によれば、非悪性疾患は、鎌状赤血球症または自己免疫疾患（例えば、以下に記載されるように、HCT+ベト細胞によって治療可能である）である。

10

【0369】

自己免疫疾患の非限定的な例としては、急性散在性脳脊髄炎（ADEM）、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、円形脱毛症、筋萎縮性側索硬化症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、抗シンテターゼ症候群、アトピー性アレルギー、アトピー性皮膚炎、自己免疫性再生不良性貧血、自己免疫性心筋症、自己免疫性腸症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖性症候群、自己免疫性末梢神経障害、自己免疫性膵炎、自己免疫性多内分泌症候群、自己免疫性プロゲステロン、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性ブドウ膜炎（例えば、非感染性ブドウ膜炎）、ベーチェット病、セリアック病、慢性糸球体腎炎、寒冷凝集素症、クローン病、皮膚筋炎、皮膚筋炎、1型糖尿病（1型糖尿病（T1DM））、好酸球性筋膜炎、グッドパスチャー症候群、グレイブス病、ギラン・バレー症候群（GBS）、橋本脳症、橋本甲状腺炎、特発性血小板減少性紫斑病、免疫性血小板球性紫斑病（ITP）、紅斑性狼瘡（SLE）、Miller-Fisher症候群、混合性結合組織病、多発性硬化症（MS）、重症筋無力症、ナルコレプシー、尋常性天疱瘡、悪性貧血、多発性胆汁性筋炎、乾癬、乾癬性関節炎、再発性多発性軟骨炎、リウマチ性関節炎（RA）、リウマチ熱、全身性強皮症、シェーグレン症候群、側頭動脈炎、脊髄横断炎、潰瘍性大腸炎（UC）、未分化結合組織病、血管炎、およびウェゲナー肉芽腫症が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0370】

具体的な実施形態によれば、自己免疫疾患は、紅斑性狼瘡（SLE）、多発性硬化症（MS）、および1型糖尿病（1型糖尿病（T1DM））である。

30

【0371】

具体的な実施形態によれば、非悪性疾患は、再生不良性貧血、重度の免疫不全および非悪性骨髄不全である。

【0372】

上述のように、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞の抗疾患活性を高めるために、処置される疾患に関連する1つまたは複数の抗原（例えばウイルス抗原）を選択し、処置のための抗原特異的Tcm細胞を作製することが有益である。加えて、または、代替において、上記で論じられるように、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞は、治療のために遺伝子改変され得る。

【0373】

上で論じられるように、本発明のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞は、ベト活性が授けられる。したがって、本発明のTcm細胞は、細胞または組織の移植のための補助療法として使用され得る。本発明のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞はまた、抗疾患活性を付与されるので、本発明の方法はさらに、細胞または組織の移植片の生着を同時に促進しながら、対象における疾患の処置に有利に適用され得る。

40

【0374】

一実施形態によれば、方法は、細胞または組織の移植片を対象に移植することをさらに含む。

【0375】

一実施形態によれば、医薬品は、細胞または組織の移植をさらに含む。

50

## 【0376】

一実施形態によれば、非同系の細胞または組織の移植片を必要とする対象を処置する方法であって、(a)細胞または組織の移植片を対象に移植すること、および(b)治療有効量の本発明のいくつかの実施形態の非GVHD誘導細胞の単離された集団を対象に投与し、それにより、細胞または組織の移植を必要とする対象を処置することを含む方法が提供される。

## 【0377】

一実施形態によれば、対象への非同系の細胞または組織の移植のためのアジュバント処置として特定される医薬品を製造するための、本発明のいくつかの実施形態の非GVHD誘導細胞の単離された集団の使用であって、対象が、非同系の細胞または組織の移植を必要としている使用が提供される。

10

## 【0378】

本明細書で使用される場合、「細胞または組織の移植」という語句は、身体の細胞(例えば、単一の細胞または細胞の群)または組織(例えば、完全にまたは部分的に移植され得る実質組織／器官または軟組織)を指す。本教示に従って移植され得る例示的な組織または器官には、肝臓、脾臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、皮膚、腸およびリンパ系／造血組織(例えば、リンパ節、パイエル板胸腺または骨髄)が含まれるが、これらに限定されない。本教示に従って移植され得る例示的な細胞としては、限定されないが、未成熟造血細胞、例えば、幹細胞、心臓細胞、肝細胞、脾細胞、脾細胞、肺細胞、脳細胞、腎細胞、腸細胞、卵巣細胞、皮膚細胞(例えば、これらの細胞のいずれかの単離された集団)が挙げられる。さらに、本発明は、例えば腎臓、心臓、肝臓または皮膚などの臓器全体の移植も企図する。

20

## 【0379】

用途および利用可能な供給源に応じて、本発明の細胞または組織は、出生前生物、出生後生物、成体生物または死体のドナーから得ることができる。さらに、必要な用途に応じて、細胞または組織はナイーブであっても遺伝子改変されていてもよい。そのような判定は、十分に当業者の能力の範囲内である。

## 【0380】

当技術分野で公知の任意の方法を使用して、細胞または組織(例えば移植のために)を得ることができる。

30

## 【0381】

具体的な実施形態によれば、細胞または組織の移植片は未成熟造血細胞を含む。

## 【0382】

本明細書で使用される場合、「未成熟造血細胞」という表現は、前駆造血細胞(例えば造血幹細胞)を含む造血組織調製物または造血細胞調製物を示す。そのような組織／細胞調製物は、生物学的試料、例えば、骨髄、動員末梢血(例えば、それらの濃度を高めるためのCD34<sup>+</sup>細胞の動員)、臍帯血(例えば臍帯)、胎児肝臓、卵黄嚢および／または胎盤を含むか、またはそれらに由来する。さらに、精製されたCD34<sup>+</sup>細胞またはCD131<sup>+</sup>細胞などの他の造血幹細胞は、エクスピボ増殖の有無にかかわらず、本教示に従って使用することができる。

40

## 【0383】

一実施形態によれば、未成熟造血細胞は、T細胞枯渇未成熟造血細胞を含む。

## 【0384】

本明細書で使用される場合、「T細胞枯渇未成熟造血細胞」という表現は、Tリンパ球が枯渇される前駆造血細胞の集団を示す。T細胞枯渇未成熟造血細胞には、例えば、CD34<sup>+</sup>、CD33<sup>+</sup>および／またはCD56<sup>+</sup>細胞が含まれ得る。T細胞枯渇未成熟造血細胞は、CD3<sup>+</sup>細胞、CD2<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>細胞、α／β T細胞および／またはγ／δ T細胞を枯渇させ得る。

## 【0385】

一実施形態によれば、未成熟造血細胞は、CD34<sup>+</sup>未成熟造血細胞が富化されたT細胞

50

胞枯渴動員血液細胞を含む。

【0386】

実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1kgあたり、少なくとも約 $0.1 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $0.5 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $1 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $2 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $3 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $4 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $5 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $6 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $7 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $8 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $9 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $10 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、 $15 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞または $20 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含む。

【0387】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1kgあたり少なくとも約 $2.5 \sim 20 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞（例えば $5 \sim 10 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞）を含む。

【0388】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1kgあたり少なくとも約 $5 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含む。

【0389】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1kgあたり少なくとも約 $6 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含む。

【0390】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1kgあたり少なくとも約 $8 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含む。

【0391】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1kgあたり少なくとも約 $10 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含む。

【0392】

一実施形態によれば、未成熟造血細胞は、CD3<sup>+</sup>細胞および／またはCD19<sup>+</sup>細胞が枯渴している。

【0393】

実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1kgあたり、約 $50 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $40 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $30 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $20 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $15 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $10 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $9 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $8 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $7 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $6 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $5 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $4 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $3 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $2 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $1 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、 $0.5 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞、または $0.1 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞未満を含む。

【0394】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $1 \sim 5 \times 10^5$ 未満のCD3<sup>+</sup>細胞（例えば、 $2 \sim 5 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞）を含む。

【0395】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $5 \times 10^5$ 未満のCD3<sup>+</sup>細胞を含む。

【0396】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $4 \times 10^5$ 未満のCD3<sup>+</sup>細胞を含む。

【0397】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渴未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $3 \times 10^5$ 未満のCD3<sup>+</sup>細胞を含む。

【0398】

10

20

30

40

50

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $2 \times 10^5$ 未満のCD3<sup>+</sup>細胞を含む。

【0399】

一実施形態によれば、未成熟造血細胞は、CD8<sup>+</sup>細胞が枯渇している。

【0400】

実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 未満のCD8<sup>+</sup>細胞（例えば、 $0.1 \sim 4 \times 10^5$ のCD8<sup>+</sup>細胞、例えば、 $1 \sim 3 \times 10^5$ のCD8<sup>+</sup>細胞）を含む。

【0401】

実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり約 $50 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $25 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $15 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $10 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $9 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $8 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $7 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $6 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $5 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $4 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $3 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $2 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $1 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $9 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $8 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $7 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $6 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $5 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $4 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $3 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞、 $2 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞または $1 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>細胞未満を含む。

【0402】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $5 \times 10^5$ 未満のCD8<sup>+</sup>細胞を含む。

【0403】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $4 \times 10^5$ 未満のCD8<sup>+</sup>細胞を含む。

【0404】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $3 \times 10^5$ 未満のCD8<sup>+</sup>細胞を含む。

【0405】

実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり約 $1 \times 10^6$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞、 $0.5 \times 10^6$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞、 $1 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞、 $0.5 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞、 $1 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞、 $0.5 \times 10^4$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞、 $1 \times 10^3$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞、または $0.5 \times 10^3$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞未満を含む。

【0406】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞未満を含む。

【0407】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $1 \times 10^6$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞未満を含む。

【0408】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $5 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞を含む。

【0409】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $1 \times 10^5$ CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha/\beta$ <sup>-</sup>細胞を含む。

【0410】

一実施形態によれば、未成熟造血細胞は、B細胞が枯渇している。

【0411】

実施形態によれば、未成熟造血細胞は、B細胞（CD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>B細胞）が枯渇している。

10

20

30

40

50

## 【0412】

実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり、約 $50 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $40 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $30 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $20 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $10 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $9 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $8 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $7 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $6 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $5 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $4 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $3 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、 $2 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞、または $1 \times 10^5$ のCD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞より少なく含む。

10

## 【0413】

具体的な実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $1 \sim 5 \times 10^5$  CD19<sup>+</sup>細胞および／またはCD20<sup>+</sup>細胞（例えば $3 \sim 5 \times 10^5$  CD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞）未満含む。

## 【0414】

具体的な実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $4 \times 10^5$  CD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞未満を含む。

## 【0415】

具体的な実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $3 \times 10^5$  CD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞未満を含む。

20

## 【0416】

具体的な実施形態によれば、未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $2 \times 10^5$  CD19<sup>+</sup>および／またはCD20<sup>+</sup>細胞未満を含む。

## 【0417】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、2つまたはそれを超えるバッチの細胞を含み、例えば、第1のバッチは、CD34<sup>+</sup>の選択された細胞を含み、第2のバッチは、CD3<sup>+</sup>／CD19<sup>+</sup>枯渇細胞（すなわち、同じドナーから得られる）を含む。これらは、互いに、同時にまたは続いて（例えば、以下で論じられるように、同じ日に、または例えば互いに約1、2、3、4、5、6、7日以内に）使用することができることが理解されよう。

30

## 【0418】

T細胞、例えば、CD3<sup>+</sup>、CD2<sup>+</sup>、TCR $\alpha/\beta$ <sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>および／もしくはCD8<sup>+</sup>細胞、またはB細胞、例えば、CD19<sup>+</sup>および／もしくはCD20<sup>+</sup>細胞の枯渇は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、例えば、特異的抗体を用いた根絶（例えば、死滅）によって、または例えば、磁気細胞分離技術、FACSソーターおよび／もしくは捕捉ELISA標識化の使用などによる親和性に基づく精製によって行われ得る。

## 【0419】

そのような方法は、本明細書でおよびTHE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4, (D. N. Weir, editor) およびFLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A. Radbruch, editor, Springer Verlag, 1992) に記載される。例えば、細胞は、例えば、フローサイトメトリーまたはFACSによって選別され得る。したがって、蛍光活性化細胞選別（FACS）を使用することができ、様々な程度のカラチャネル、低角度および鈍角の光散乱検出チャネル、ならびにインピーダンスチャネルを有することができる。当技術分野で公知の任意のリガンド依存性分離技術は、抗体親和性、例えば非限定的に、溶出および密度勾配遠心分離ではなく、細胞の物理的特性に依存する陽性および陰性双方の分離技術と併せて、使用することができる。

40

50

## 【0420】

細胞選別のための他の方法には、例えば、プレート、ビーズおよびカラムなどの固体支持体を使用する技術を含む親和性技術を使用したパンニングおよび分離が含まれる。したがって、生物学的試料は、固体マトリックス、例えばプレートに結合した抗体を用いた「パンニング」によって分離され得る。

## 【0421】

あるいは、細胞を磁気分離技術によって選別／分離することができ、これらの方法のいくつかは磁気ビーズを利用する。例えば、Dynal（ノルウェー）、Advanced Magnetix（ケンブリッジ、マサチューセッツ州、米国）、Immuncor（フィラデルフィア、米国）、Immunotec（マルセイユ、フランス）、Invitrogen、Stem cell Technologies（米国）、およびCellpro（米国）を含むいくつかの供給源から異なる磁気ビーズが入手可能である。あるいは、抗体をビオチン化またはジゴキシゲニンとコンジュゲート化し、アビジンまたは抗ジゴキシゲニン被覆アフィニティーカラムと組み合わせて使用することができる。

10

## 【0422】

実施形態によれば、異なる枯渇／分離方法を組み合わせることができ、例えば、分離の質を高めるために、または複数のパラメータによる選別を可能にするために、磁気細胞選別をFACSと組み合わせることができる。

## 【0423】

具体的な実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞が、動員されたPBMCをドナー対象（例えば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞を作製するために非動員PBMCを収集した同じドナー対象）から集めることを含む方法によって得られる。

20

## 【0424】

一実施形態によれば、動員はG-CSFによって影響される。

## 【0425】

一実施形態によれば、動員は、G-CSFおよびプレリキサフォルによって影響される。

## 【0426】

具体的な実施形態によれば、動員されたPBMCの集合は、単一の回収で得られる。

## 【0427】

具体的な実施形態によれば、動員されたPBMCの収集物は、2、3、4、5回またはそれを超える毎日の収集、例えば、3回の毎日の収集（例えば、続く数日または数日以内に）で得られる。

30

## 【0428】

具体的な実施形態によれば、（例えば、第1の収集物から得られる）理想体重1kgあたり少なくとも約 $0.1 \sim 5 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、例えば、 $2 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞、例えば、 $1 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含有する未改変の動員されたPBMCのバックアップ画分が除外され、凍結保存される。

## 【0429】

具体的な実施形態によれば、動員されたPBMCの収集（例えば、第1日目および第2日目の収集からの残りの）がプールされ、CD34<sup>+</sup>が選択され（下記で議論されるように）、凍結保存される。

40

## 【0430】

具体的な実施形態によれば、3日目の収集物からCD3<sup>+</sup>／CD19<sup>+</sup>細胞を枯渇させ（後述するように）、凍結保存する。

## 【0431】

一実施形態によれば、CD34<sup>+</sup>発現細胞の富化は、PBMCをCD34結合剤でインキュベートすることによって影響を受ける。

## 【0432】

具体的な実施形態によれば、CD34結合剤は抗体である。

50

## 【0433】

具体的な実施形態によれば、CD34抗体はモノクローナル抗体である。

## 【0434】

具体的な実施形態によれば、CD34モノクローナル抗体は、磁性粒子にコンジュゲートされる。

## 【0435】

具体的な実施形態によれば、CD34モノクローナル抗体は、超常磁性粒子にコンジュゲート化される。

## 【0436】

一実施形態によれば、CD34<sup>+</sup>標識細胞は、磁気分離技術によって選択される（本明細書にて上で詳しく論じられるように）。 10

## 【0437】

具体的な実施形態によれば、CD34磁気標識細胞（すなわちCD34<sup>+</sup>発現細胞）を分離カラム（すなわち、陽性選択）によって保持し、CD34<sup>-</sup>細胞を除去する。次いで、CD34<sup>+</sup>細胞をカラムから放出させ、回収する。一実施形態によれば、細胞数、生存率および／または免疫表現型検査のために、各画分からの試料を除去する。

## 【0438】

一実施形態によれば、動員されたPBMCは、例えばCOBE2991を用いて血小板が枯渇される。

## 【0439】

一実施形態によれば、一実施形態の血小板除去後PBMC調製物をIVIgで5～30分間、例えば10～15分間インキュベートする。最初のインキュベーションの後、CD3<sup>+</sup>、およびCD19<sup>+</sup>結合剤を細胞調製物に添加し、オービタルロテータにて例えば10～60分間、例えば30分間インキュベートする。 20

## 【0440】

具体的な実施形態によれば、CD3および／またはCD19結合剤は抗体である。

## 【0441】

具体的な実施形態によれば、CD3および／またはCD19抗体はモノクローナル抗体である。

## 【0442】

具体的な実施形態によれば、CD3および／またはCD19モノクローナル抗体は、磁性粒子にコンジュゲート化される。 30

## 【0443】

具体的な実施形態によれば、CD3および／またはCD19モノクローナル抗体は、超常磁性粒子にコンジュゲート化される。

## 【0444】

一実施形態によれば、インキュベーションの最後に、細胞を遠心分離によって洗浄し、細胞ペレットを緩衝液（例えば、COBE2991）に再懸濁して過剰な試薬を除去する。

## 【0445】

一実施形態によれば、CD3<sup>+</sup>／CD19<sup>+</sup>標識細胞は、磁気分離技術によって選択される（本明細書にて上で詳しく論じられるように）。 40

## 【0446】

具体的な実施形態によれば、CD3<sup>+</sup>／CD19<sup>+</sup>標識細胞は、CliniMACS（登録商標）カラムで処理される。

## 【0447】

具体的な実施形態によれば、CD3<sup>+</sup>／CD19<sup>+</sup>磁気標識細胞（すなわち、CD3<sup>+</sup>／CD19<sup>+</sup>発現細胞）を分離カラム（すなわち、陰性選択）によって保持し、CD4<sup>-</sup>／CD56<sup>-</sup>／CD45RA<sup>-</sup>細胞を回収する。一実施形態によれば、収集された細胞（CD3<sup>-</sup>／CD19<sup>-</sup>細胞）が洗浄され、収集される。一実施形態によれば、細胞数、生 50

存率および／または免疫表現型検査のために、各画分からの試料を除去する。

【0448】

具体的な実施形態によれば、第2のCD3<sup>+</sup>枯渇工程は、理想体重1kgあたり約 $1 \times 10^5$ を超えるCD3 $\sim 5 \times 10^5$ のCD3、例えば $1 \times 10^5$ のCD3 $\sim 3 \times 10^5$ のCD3、例えば $2.5 \times 10^5$ のCD3、例えば $2 \times 10^5$ のCD3が、収集された細胞画分中に存在する状況で、(上述のように)行われる。

【0449】

あるいは、 $5 \times 10^5$ を超えるCD3、例えば $3 \times 10^5$ のCD3、例えば $2 \times 10^5$ のCD3細胞/kgの理想体重の注入を回避するために、T細胞枯渇画分の一部のみの注入が利用される。

【0450】

一実施形態によれば、T細胞枯渇未成熟造血細胞(すなわち、細胞移植のため)およびTcm表現型(すなわち、ベト細胞の生成のため)を含む非GVHD誘導細胞の作製のために使用されるPBMCが、同じドナー対象から得られる。

【0451】

用途に応じて、本方法は、本明細書の上で論じられているように、レシピエント対象(例えば同種異系)と同系または非同系である細胞または組織を使用して影響され得る。

【0452】

本発明の実施形態によれば、レシピエント対象およびドナー対象の両方がヒトである。

【0453】

本発明の実施形態によれば、対象(すなわち、レシピエント対象)は、細胞または組織の移植片の移植によって処置され得る疾患に罹患している。

【0454】

本発明の実施形態によれば、対象(すなわち、レシピエント対象)は、臓器または組織の移植によって処置され得る疾患に罹患している。

【0455】

本発明の実施形態によれば、対象(すなわち、レシピエント対象)は、未成熟造血細胞移植(例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞)によって治療され得る疾患に罹患している。

【0456】

本発明の実施形態によれば、対象(すなわち、レシピエント対象)は、未成熟造血細胞と、実質臓器または組織(例えば、腎臓、肺、肝臓、脾臓、心臓など)との共移植によって処置され得る疾患に罹患している。

【0457】

本発明の実施形態によれば、対象(すなわち、レシピエント対象)は、未成熟造血細胞と、実質臓器または実質組織から得られた単離細胞(例えば、上で論じられているような腎臓、肺細胞、肝細胞、脾細胞、心臓細胞など)との共移植によって治療され得る疾患に罹患している。

【0458】

本発明の実施形態によれば、対象(すなわち、レシピエント対象)は、いくつかの器官(例えば、心臓および肺組織)の共移植によって処置され得る疾患に罹患している。

【0459】

一実施形態によれば、共移植のための細胞、器官または組織は、同じドナーから得られる。

【0460】

細胞または組織を対象に移植することは、例えば、細胞または組織の種類、レシピエントの疾患のタイプ、ステージまたは重症度(例えば、悪性疾患のタイプおよびステージ)、対象に特異的な物理的または生理学的パラメータ、および／または所望の治療の転帰などの様々なパラメータに応じて、多くの方法で影響を受ける可能性がある。

【0461】

本発明の細胞または組織の移植片を移植することは、用途に応じて、細胞または組織の

10

20

30

40

50

移植片を様々な解剖学的位置のいずれか1つに移植することによって影響され得る。細胞または組織の移植は、同所の解剖学的位置（移植のための正常な解剖学的位置）、または異所の解剖学的位置（移植のための異常な解剖学的位置）に移植され得る。用途に応じて、細胞または組織の移植は、腎被膜の下、または腎臓、精巣脂肪、皮下組織、網、門脈、肝臓、脾臓、心腔、心臓、胸腔、肺、皮膚、膵臓および／または腹腔内空間に、有利にも移植され得る。

#### 【0462】

本発明のいくつかの実施形態の未成熟造血細胞（例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞）は、細胞移植のための当技術分野で公知の任意の方法を使用して、例えば、限定されないが、細胞の注入（例えば、I.V.）または腹腔内経路を介して、対象に移植され得る。

10

#### 【0463】

本教示による対象への細胞または組織の移植片の移植後、標準的な医療実践によれば、様々な標準的な技術のいずれか1つに従って、細胞、組織または器官の成長機能性および免疫適合性をモニターすることが望ましい。例えば、未成熟造血細胞の細胞数は、標準的な血液および骨髓試験（例えば、FACS分析による）によって対象においてモニターされ得る。細胞または組織の構造的発達は、コンピュータ断層撮影または超音波撮像によって監視され得る。

#### 【0464】

移植状況に応じて、細胞または組織の移植片の生着を促進するために、本方法は、移植前に対象を亜致死的、致死的または超致死的条件下で前処置することをさらに有利に含み得る。

20

#### 【0465】

本明細書で使用される場合、「亜致死」、「致死」、および「超致死」という用語は、本発明の対象の前処置に関連する場合、それぞれ対象の代表的な集団に適用される場合、典型的には、集団の本質的にすべてのメンバーに対して非致死性である、集団のすべてではないが一部のメンバーにとって致命的である、または、無菌の通常の条件下で集団の本質的にすべてのメンバーにとって致命的である骨髓毒性および／またはリンパ球毒性治療を指す。

#### 【0466】

本発明のいくつかの実施形態によれば、亜致死的な前処置、致死的な前処置または超致死的な前処置は、全身照射（TBI）、全身リンパ節照射（TLI、すなわち、すべてのリンパ節、胸腺および脾臓の曝露）、部分的な身体照射（例えば、肺、腎臓、脳などの特異的曝露）、骨髓破壊的な前処置、および／または骨髓非破壊的な前処置を含み、例えば、共刺激遮断、化学療法剤、および／または抗体免疫療法を含むがこれらに限定されない種々の組み合わせを含む。本発明のいくつかの実施形態によれば、上記の前処置プロトコルのいずれかの組み合わせ（例えば、化学療法剤およびTBI、共刺激遮断および化学療法剤、抗体免疫療法および化学療法剤など）を含む。

30

#### 【0467】

一実施形態によれば、前処置は、骨髓破壊条件下（すなわち、骨髓細胞が破壊される強力な前処置レジメン）などの超致死的条件下で対象を前処置することによって影響される。

40

#### 【0468】

あるいは、前処置は、致死的または亜致死的な条件下で対象を前処置することによって、例えば、それぞれ骨髓縮小条件下または骨髓非破壊的な条件下で対象を前処置すること（すなわち、低侵襲的な前処置レジメンである強度軽減前処置）によって影響され得る。

#### 【0469】

具体的な実施形態によれば、前処置は、骨髓非破壊的な前処置（例えば、強度軽減前処置レジメン）を含む。

#### 【0470】

実施形態によれば、強度低下前処置は、細胞または組織の移植片の移植前の最長2週間

50

(例えば、1～10日または1～7日)にわたって影響を受ける。

【0471】

具体的な実施形態によれば、骨髓非破壊的前処置は、化学療法剤およびTBI／TLIを含む。

【0472】

一実施形態によれば、TBIは、0.5～1 Gy、0.5～1.5 Gy、0.5～2 Gy、0.5～2.5 Gy、0.5～5 Gy、0.5～7.5 Gy、0.5～10 Gy、0.5～15 Gy、1～1.5 Gy、1～2 Gy、1～2.5 Gy、1～3 Gy、1～3.5 Gy、1～4 Gy、1～4.5 Gy、1～5 Gy、1～7.5 Gy、1～10 Gy、2～3 Gy、2～4 Gy、2～5 Gy、2～6 Gy、2～7 Gy、2～8 Gy、2～9 Gy、2～10 Gy、3～4 Gy、3～5 Gy、3～6 Gy、3～7 Gy、3～8 Gy、3～9 Gy、3～10 Gy、4～5 Gy、4～6 Gy、4～7 Gy、4～8 Gy、4～9 Gy、4～10 Gy、5～6 Gy、5～7 Gy、5～8 Gy、5～9 Gy、5～10 Gy、6～7 Gy、6～8 Gy、6～9 Gy、6～10 Gy、7～8 Gy、7～9 Gy、7～10 Gy、8～9 Gy、8～10 Gy、10～12 Gy、または10～15 Gyの範囲内の単一または分割照射線量を含む。

10

【0473】

具体的な実施形態によれば、TBIは、1～7.5 Gyの範囲内の単回照射線量または分割照射線量を含む。

【0474】

具体的な実施形態によれば、TBIは、1～5 Gyの範囲内の単回照射線量または分割照射線量を含む。

20

【0475】

具体的な実施形態によれば、TBIは、3 Gyの範囲内の単回照射線量または分割照射線量を含む。

【0476】

実施形態によれば、TBI処置は、移植の1～10日前（例えば1～3日）に対象に投与される。一実施形態によれば、対象は、移植の1日前、2日前、3日前または4日前にTBIにより1回条件付けされる。

【0477】

実施形態によれば、TBIは移植の－2日前に投与される。

30

【0478】

実施形態によれば、TBIは移植の－1日前に投与される。

【0479】

実施形態によれば、TBIは移植の日に、例えば0日目の朝に投与され、移植は同日に、例えば夕方に行われる。

【0480】

具体的な実施形態によれば、TBIは、－1日目（すなわち移植の1日前）における単回照射線量または分割照射線量を含む。

【0481】

具体的な実施形態によれば、TLIは、0.5～1 Gy、0.5～1.5 Gy、0.5～2.5 Gy、0.5～5 Gy、0.5～7.5 Gy、0.5～10 Gy、0.5～15 Gy、1～1.5 Gy、1～2 Gy、1～2.5 Gy、1～3 Gy、1～3.5 Gy、1～4 Gy、1～4.5 Gy、1～5 Gy、1～7.5 Gy、1～10 Gy、2～3 Gy、2～4 Gy、2～5 Gy、2～6 Gy、2～7 Gy、2～8 Gy、2～9 Gy、2～10 Gy、3～4 Gy、3～5 Gy、3～6 Gy、3～7 Gy、3～8 Gy、3～9 Gy、3～10 Gy、4～5 Gy、4～6 Gy、4～7 Gy、4～8 Gy、4～9 Gy、4～10 Gy、5～6 Gy、5～7 Gy、5～8 Gy、5～9 Gy、5～10 Gy、6～7 Gy、6～8 Gy、6～9 Gy、6～10 Gy、7～8 Gy、7～9 Gy、7～10 Gy、8～9 Gy、8～10 Gy、10～12 Gy、10～15 Gy、10～20 Gy、10～

40

50

30 Gy、10～40 Gy、10～50 Gy、0.5～20 Gy、0.5～30 Gy、0.5～40 Gy、または0.5～50 Gyの範囲内の照射線量を含む。

【0482】

具体的な実施形態によれば、TLIは、1～7.5 Gyの範囲内の単回照射線量または分割照射線量を含む。

【0483】

具体的な実施形態によれば、TLIは、1～5 Gyの範囲内の単回照射線量または分割照射線量を含む。

【0484】

具体的な実施形態によれば、TLIは、3 Gyの範囲内の単回照射線量または分割照射線量を含む。

【0485】

実施形態によれば、TLI処置は、移植の1～10日前（例えば1～3日）に対象に投与される。一実施形態によれば、対象は、移植の1日前、2日前、3日前または4日前にTLIにより1回条件付けされる。

【0486】

実施形態によれば、TLIは移植の－2日前に投与される。

【0487】

実施形態によれば、TLIは移植の－1日前に投与される。

【0488】

実施形態によれば、TLIは移植の日に、例えば0日目の朝に投与され、移植は同日に、例えば夕方に行われる。

【0489】

具体的な実施形態によれば、TLIは、－1日目（すなわち移植の1日前）における単回照射線量または分割照射線量を含む。

【0490】

一実施形態によれば、前処置は化学療法剤を含む。例示的な化学療法剤には、ブスルファン、ブスルフェックス、シクロホスファミド、フルダラビン、メルファラン、ミレラン、ラパマイシン、トリスルファンおよびチオテパが含まれるが、これらに限定されない。化学療法剤は、移植前に、単回用量または数回用量で、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える用量（例えば、毎日投与）で対象に投与され得る。

【0491】

具体的な実施形態によれば、対象には、化学療法剤（例えば、フルダラビン、例えば、約30 mg/m<sup>2</sup>/日の用量）が移植（例えば－7から－4日目、例えば－6から－3日目に）の前の3、4、5または6日間連続して（例えば連続4日間）投与される。

【0492】

フルダラビンは、例えばSanofi Genzyme、BayerおよびTevaから、例えばFludaraの商品名で市販されている。

【0493】

一実施形態によれば、移植前処置は、インビボのT細胞の減量を含む。

【0494】

いくつかの態様によれば、インビボT細胞減量は抗体によって影響される。

【0495】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗体は、抗CD8抗体、抗CD4抗体またはその両方を含む。

【0496】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗体は抗胸腺細胞グロブリン（ATG）抗体、抗CD52抗体、または抗CD3（OKT3）抗体を含む。

【0497】

一実施形態によれば、抗体は、移植前に、単回用量、または、数回の用量で、例えば、

10

20

30

40

50

2、3、4、5、6、7、8、9、10回またはそれを超える用量（例えば、毎日投与）で対象に投与される。

【0498】

具体的な実施形態によれば、対象には、抗体治療剤（例えば、ATG、例えば、理想体重1kgあたり約2mgの用量）が移植（例えば移植前の-10から-8日目に、例えば移植前の-9から-7日目に）の前の2、3、4または5日間連続して（例えば連続3日間）投与される。

【0499】

具体的な実施形態によれば、対象が、移植前にATGの3回の投与により処置される（例えば、理想体重1kgあたり約2mgの用量で、例えば移植前の-9、-8および-7日目に）。

10

【0500】

具体的な実施形態によれば、対象が、移植前にATGの2回の投与（例えば、理想体重1kgあたり約2mgの用量で、例えば移植前の-9および-8日目、または-8および-7日目に）により処置される。

【0501】

具体的な実施形態によれば、対象が、移植前のATGの単回投与（例えば、理想体重1kgあたり約2mgの用量で、例えば移植前の-9、-8、または-7日目に）により処置される。

【0502】

具体的な実施形態によれば、移植前処置はインビボT細胞減量を含まない。

20

【0503】

具体的な実施形態によれば、対象は、移植前にATGにより処置されない。

【0504】

ATGを使用しない場合、またはATGのより低い用量、例えば単回用量または2回用量（例えば、それぞれ、理想体重1kgあたり約2mgの用量）を使用する場合、骨髄非破壊的前処置プロトコル（例えば、3~5Gy、例えば3Gy、4Gyまたは5Gyの単回または分割照射線量でのTBI）の一部として、より高い放射線用量を使用することができることが理解されよう。

【0505】

抗胸腺細胞グロブリン（ATG）抗体は、例えば、Genzymeおよびファイザーから、例えば、ThymoglobulinやAtgamの商品名で市販されている。

30

【0506】

一実施形態によれば、対象がB細胞悪性腫瘍を有する場合、移植前の前処置レジメンはリツキシマブ（例えば約375mg/m<sup>2</sup>の用量、例えば移植の-12、-11、-10、-9、-8、または-7日前、例えば-10日前）を含む。

【0507】

リツキシマブは、例えばMabtheraや、Rixathon、Truxima、Rituxanの商品名で、例えばGenentechおよびRocheから市販されている。

40

【0508】

一実施形態によれば、方法は、治療有効量のシクロホスファミドの移植後投与を含む。

【0509】

一実施形態によれば、本発明はさらに、本明細書に記載されるような移植後の投与に加えて、移植前のシクロホスファミド（例えば移植前の6、5、4、または3日目、すなわちD-6から-3日目）の投与を意図する。

【0510】

例えば、細胞または組織の移植片の場合、治療有効量のシクロホスファミドは、対象の理想体重1キログラムあたり、約1~25mg、1~50mg、1~75mg、1~100mg、1~250mg、1~500mg、1~750mg、1~1000mg、5~5

50

0 mg、5～75 mg、5～100 mg、5～250 mg、5～500 mg、5～750 mg、5～1000 mg、10～50 mg、10～75 mg、10～100 mg、10～250 mg、10～500 mg、10～750 mg、10～1000 mg、25～50 mg、25～75 mg、25～100 mg、25～125 mg、25～200 mg、25～300 mg、25～400 mg、25～500 mg、25～750 mg、25～1000 mg、50～75 mg、50～100 mg、50～125 mg、50～150 mg、50～175 mg、50～200 mg、50～250 mg、50～500 mg、50～1000 mg、75～100 mg、75～125 mg、75～150 mg、75～250 mg、75～500 mg、75～1000 mg、100～125 mg、100～150 mg、100～200 mg、100～300 mg、100～400 mg、100～500 mg、100～1000 mg、125～150 mg、125～250 mg、125～500 mg、125～1000 mg、150～200 mg、150～300 mg、150～500 mg、150～1000 mg、200～300 mg、200～400 mg、200～500 mg、200～750 mg、200～1000 mg、250～500 mg、250～750 mg、250～1000 mgを含む。

10

【0511】

具体的な実施形態によれば、治療有効量のシクロホスファミドが対象の理想体重1キログラムあたり約25～200 mgである。

【0512】

一実施形態によれば、シクロホスファミドが単回用量で投与される。

20

【0513】

一実施形態によれば、シクロホスファミドが、複数回用量で、例えば、2、3、4、5、またはそれを超える用量で投与される。

【0514】

具体的な実施形態によれば、シクロホスファミドが2つの用量で投与される。

【0515】

各シクロホスファミド投与の用量は、対象の理想体重1キログラムあたり約5 mg、7.5 mg、10 mg、20 mg、30 mg、40 mg、50 mg、60 mg、70 mg、80 mg、90 mg、100 mg、110 mg、120 mg、130 mg、140 mg、150 mg、160 mg、170 mg、180 mg、190 mg、200 mg、210 mg、220 mg、230 mg、240 mg、250 mg、260 mg、270 mg、280 mg、290 mg、300 mg、350 mg、400 mg、450 mgまたは500 mgを含み得る。

30

【0516】

具体的な実施形態によれば、シクロホスファミドの各用量が対象の理想体重1キログラムあたり50 mgである。

【0517】

述べられたように、シクロホスファミドが移植後に投与される。したがって、例えば、シクロホスファミドを移植後1、2、3、4、5日（すなわち、D+1、+2、+3、+4、+5）に対象に投与することができる。

40

【0518】

具体的な実施形態によれば、シクロホスファミドが、移植後3日目および4日目に2つの用量で対象に投与される。

【0519】

シクロホスファミドは、例えば、Zydus (German Remedies)、Roxane Laboratories Inc-Boehringer Ingelheim、Bristol-Myers Squibb Co-Mead Johnson and Co、およびファイザーPharmacia & Upjohnから、Endoxan、Cytosoxan、Neosar、ProcytoxおよびRevimmuneの商品名で市販されている。

50

## 【0520】

一実施形態によれば、対象は、さらなる支持薬（例えば、化学療法補助剤）により処置される。

## 【0521】

一実施形態によれば、対象が、シクロホスファミド（例えば、シクロホスファミドの最初の投与の2時間前、1時間前、30分前、15分前）の最初の用量の直前にMesnaの用量（例えば、10mg/kg 静脈内ピギーバック（IVPB）により処置される。一実施形態によれば、Mesnaの投与は、4時間毎に合計10回繰り返される。

## 【0522】

Mesnaは、例えば、ウロミテキサンおよびMesnexの商品名でBaxterから市販されている。

## 【0523】

一実施形態によれば、対象が、シクロホスファミド（Cy）の各投与の前にオンダンセトロン（または別の制吐薬）により処置される。

## 【0524】

一実施形態によれば、対象は、免疫抑制剤（例えば、本明細書で論じられるCYおよびベト細胞とは別に）で処置されない。

## 【0525】

一実施形態によれば、対象は、免疫抑制剤で処置される。

## 【0526】

免疫抑制剤の例には、タクロリムス（FK-506またはフジマイシンとも呼ばれ、商品名：Prograf、Advagraf、Protopic）、ミコフェノール酸モフェチル、ミコフェノール酸ナトリウム、プレドニゾン、メトトレキサート、シクロホスファミド、シクロスポリン、シクロスポリンA、クロロキン、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン（スルファサラゾピリン）、金塩、D-ペニシラミン、レフルノミド、アザチオプリン、アナキンラ、インフリキシマブ（REMICADE）、エタネルセプト、TNF $\alpha$ ブロッカー、炎症性サイトカインを標的とする生物学的薬剤、および非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）が含まれるが、これらに限定されない。NSAIDの例には、アセチルサリチル酸、サリチル酸コリンマグネシウム、ジフルニサル、サリチル酸マグネシウム、サルサラート、サリチル酸ナトリウム、ジクロフェナク、エトドラク、フェンプロフェン、フルルビプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、ケトロラック、メクロフェナメート、ナブロキセン、ナブメトン、フェニルブタゾン、ピロキシカム、スリンダク、トルメチン、アセトアミノフェン、イブプロフェン、Cox-2阻害剤、トラマドール、ラパマイシン（シロリムス）およびラパマイシン類似体（CCI-779、RAD001、AP23573など）が含まれるが、これらに限定されない。これらの薬剤は、個別にまたは組み合わせて投与することができる。

## 【0527】

一実施形態によれば、コルチコステロイドはベト細胞に対する前処理として投与されない。

## 【0528】

本発明の別の態様によれば、未成熟造血細胞移植を必要とする対象を処置する方法であって、

（a）対象を骨髄非破壊的移植前前処置プロトコルのもとで前処置することであって、骨髄非破壊的前処置は全身照射（TBI）および化学療法剤を含み、TBIおよび化学療法剤は、移植前の-7~-1日目に投与される（例えば移植前の-7~-2、または-6~-1日目に）、前処置すること、

（b）T細胞枯渇未成熟造血細胞の用量を対象に移植することであって、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり $5 \times 10^5$ 個未満のCD3<sup>+</sup>T細胞を含み、かつ、T細胞枯渇未成熟造血細胞は、対象の理想体重1キログラムあたり少なくとも $5 \times 10^6$ のCD3<sup>+</sup>細胞を含む、移植すること、

10

20

30

40

50

(c) 治療有効量のシクロホスファミドを対象に投与することであって、治療有効量のシクロホスファミドが、対象の理想体重1キログラムあたり25～200mgのシクロホスファミドを含み、治療有効量のシクロホスファミドが、T細胞枯渇未成熟造血細胞の移植の3日後および4日後2回の用量で対象に投与されることになること、および

(d) 治療有効量の本発明のいくつかの実施形態の非GVHD誘導細胞の単離された集団を対象に投与することであって、非GVHD誘導細胞の単離された集団は、T細胞枯渇未成熟造血細胞の移植の後の7日目に投与され、

それによって未成熟造血細胞移植を必要とする対象を処置することを含む、方法が提供される。

【0529】

具体的な実施形態によれば、TBIが、T細胞枯渇未成熟造血細胞の移植の日に、例えば、0日目の朝に投与され、移植が同日に、例えば、夕方に行われる。

【0530】

具体的な実施形態によれば、対象は以下のように治療される：フルダラビンは、-6～-3日目（移植前）に4回の連続用量（例えば30mg/m<sup>2</sup>/日）で対象に投与され、TBIは、移植前の-1日目に単回または分割照射用量（例えば3～5Gy、例えば3Gy）で対象に投与され、0日目（すなわち移植日）に、対象は、CD34<sup>+</sup>選択細胞および/またはCD3/CD19枯渇細胞（例えば、本明細書に記載されるように、ドナーの動員後に収集され、CD3/CD19発現細胞が枯渇され、かつ/またはCD34の発現のために選択され、凍結保存され、移植の日に解凍された細胞）を含む大量投与T細胞枯渇未成熟造血細胞を注入（例えばIV）され、+3日目および+4日目に、対象は、それぞれ例えば50mg/kg理想体重/日の用量でシクロホスファミド（CY）を投与（例えばIV）され、+7日目に、対象は、本発明のいくつかの実施形態の抗ウイルス性ベト細胞を、例えば2.5～10×10<sup>6</sup>個のCD8<sup>+</sup>細胞/kg理想体重の用量で注入される。

【0531】

具体的な実施形態によれば、対象に、-9～-7日目に（移植前に）ATG（チモグロブリン）を3回の連続用量（例えば、理想体重1kgあたり2mg）で投与する。

【0532】

具体的な実施形態によれば、対象が以下のように処置される：フルダラビンが、-7～-4日目（移植前）に4回の連続用量（例えば30mg/m<sup>2</sup>/日）で対象に投与され、TBIが、移植前の-2日目に、単回照射用量または分割照射用量（例えば3～5Gy、例えば3Gy）で対象に投与され、-1日目に、対象に、CD34<sup>+</sup>選択細胞（例えば、ドナーの動員後に収集され、CD34の発現のために選択され、本明細書に記載されるような新鮮な細胞として使用される細胞）を含む最初の用量の大量投与T細胞枯渇未成熟造血細胞が注入され（例えばIV）、0日目に、対象に、CD3/CD19枯渇細胞（例えば、ドナーの動員後に収集され、CD3/CD19発現細胞が枯渇され、本明細書に記載されるような新鮮な細胞として使用される細胞）を含む2番目の用量の大量投与T細胞枯渇未成熟造血細胞が注入され（例えばIV）、+3日目および+4日目に、対象に、それぞれ例えば50mg/kg理想体重/日の用量のシクロホスファミド（CY）が投与され（例えばIV）、+7日目に、対象に、本発明のいくつかの実施形態の抗ウイルスベト細胞を、例えば、理想体重1kgあたり2.5～10×10<sup>6</sup>個のCD8<sup>+</sup>細胞の用量で注入する。

【0533】

具体的な実施形態によれば、対象に、-10～-8日目に（移植前に）ATG（チモグロブリン）を3回の連続用量（例えば、理想体重1kgあたり2mg）で投与する。

【0534】

具体的な実施形態によれば、対象が、シクロホスファミドの最初の服用量の直前にMesnaの用量（例えば、10mg/kg静脈内ピギーバック（IVPB）により処置される。一実施形態によれば、これは、4時間毎に合計10回繰り返される。

10

20

30

40

50

## 【0535】

具体的な実施形態によれば、対象が、シクロホスファミド（CY）の各用量の前にオンダンセトロン（または別の制吐薬）により処置される。

## 【0536】

具体的な実施形態によれば、ベト細胞のための前投薬はコルチコステロイドを含まない。

## 【0537】

具体的な実施形態によれば、対象がB細胞悪性腫瘍を有する場合、移植前処置レジメンはリツキシマブ（例えば約375mg/m<sup>2</sup>の用量で、例えば移植前の-10日目に）を含む。

10

## 【0538】

移植前および移植後の免疫抑制薬および／または免疫抑制照射の投与回数および治療有効量は、移植の種類およびレジメンに対する対象の応答を考慮して必要に応じて調整することができる。投与回数と治療有効量の判定は、特に本明細書で提供される詳細な開示に照らして、十分当業者の能力の範囲内である。

## 【0539】

移植のタイプにかかわらず、移植片拒絶および移植片対宿主病（GVHD）を回避するために、および／またはドナー特異的寛容性を誘導するために、本発明の方法は、（本明細書中上記で詳細に記載されるような）新規Tcm細胞を利用する。

20

## 【0540】

一実施形態によれば、本発明のいくつかの実施形態のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞（すなわちベト細胞）は、それ自体、移植片拒絶の低減のために、および／または移植された細胞、組織もしくは器官（例えば、同じドナーから移植される）のGVHDの低減のために使用される。

## 【0541】

一実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞（すなわちベト細胞）は、細胞または組織の移植片の移植と同時に、移植前に、または移植後に投与されるためのものである。

## 【0542】

一実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞（すなわちベト細胞）は、未成熟造血細胞（例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞）の移植と同時に、移植前に、または移植後に投与されるためのものである。

30

## 【0543】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞（すなわちベト細胞）は、非同系の細胞または組織の移植の後での投与のためのものである。

## 【0544】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞（すなわちベト細胞）は、未成熟造血細胞（例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞）に続いて投与されるためのものである。

## 【0545】

一実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞（すなわちベト細胞）は、非同系の細胞または組織の移植（例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞）後の3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、21日目における投与のためのものである。

40

## 【0546】

一実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞（すなわちベト細胞）は、未成熟造血細胞（例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞）の後の3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、21日目における投与のためのものである。

## 【0547】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞（すなわちベト細胞）は、非同系の細胞または組織の移植（例えば未成熟造血細胞、例えばT細胞枯渇未成熟造血細胞）の後の3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、21日目における投与のためのものである。

50

熟造血細胞)の後の6~9日目における投与のためのものである。

【0548】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞(すなわちベト細胞)は、非同系の細胞または組織の移植の後の9日目における投与のためのものである。

【0549】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞(すなわちベト細胞)は、非同系の細胞または組織の移植の後の8日目における投与のためのものである。

【0550】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞(すなわちベト細胞)は、非同系の細胞または組織の移植の後の7日目における投与のためのものである。

10

【0551】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞(すなわちベト細胞)は、非同系の細胞または組織の移植の後の6日目における投与のためのものである。

【0552】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞(すなわちベト細胞)は、未成熟造血細胞(例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞)の後の9日目における投与のためのものである。

【0553】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞(すなわちベト細胞)は、未成熟造血細胞(例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞)の後の8日目における投与のためのものである。

20

【0554】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞(すなわちベト細胞)は、未成熟造血細胞(例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞)の後の7日目における投与のためのものである。

【0555】

具体的な実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞(すなわちベト細胞)は、未成熟造血細胞(例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞)の後の6日目における投与のためのものである。

【0556】

具体的な実施形態によれば、ベト細胞が、実質器官または組織(例えば、上で論じられているような腎臓、肺細胞、肝臓細胞、脾臓細胞、心臓細胞など)から得られる細胞または組織の移植のためのアジュバント処置として使用されるとき、ベト細胞は、細胞または組織の移植片の移植と同時に、移植の前に、または移植の後で投与される場合がある。

30

【0557】

具体的な実施形態によれば、未成熟造血細胞(例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞)と、実質臓器または組織から得られた細胞または組織(例えば、上述の腎臓、肺細胞、肝臓細胞、脾臓細胞、心臓細胞など)とを共移植する場合、ベト細胞、未成熟造血細胞及び細胞または組織の投与順序は任意である(例えば、腎臓、未成熟造血細胞およびベト細胞; 未成熟造血細胞、腎臓およびベト細胞など)。

40

【0558】

具体的な実施形態によれば、未成熟造血細胞(例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞)と、実質臓器または組織から得られる細胞または組織(例えば、上述の腎臓、肺細胞、肝臓細胞、脾臓細胞、心臓細胞など)との共移植が行われる場合、ベト細胞および未成熟造血細胞が投与され、細胞または組織の移植片が、キメラ現象(例えば、未成熟造血細胞、ベト細胞、腎臓)が確立された後にのみ移植される。

【0559】

具体的な実施形態によれば、未成熟造血細胞は、例えば、CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>枯渇CD34<sup>+</sup>細胞(例えば、移植日に解凍される凍結保存細胞を使用する場合)を含む単回投与で投与される場合がある。

50

## 【0560】

具体的な実施形態によれば、未成熟造血細胞は、2回またはそれを超える投与、例えば、 $CD34^+$ 選択された細胞を含む第1の投与および $CD3^+ / CD19^+$ 枯渇細胞（例えば、新鮮な細胞を使用する場合、すなわち、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10日以内、例えば約1日以内に収集および使用される細胞）を含む第2の投与で投与される場合がある。これらは、互いに同時にまたは続いて（例えば、互いに同じ日に、または1、2、3、4、5日以内に）投与することができることが理解されよう。

## 【0561】

本発明のいくつかの実施形態のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞は、細胞移植のための当技術分野で公知の任意の方法、例えば、限定されないが、細胞注入（例えば静脈内）または腹腔内経路を介して投与され得る。

10

## 【0562】

一実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞は、新鮮な細胞として使用される。

## 【0563】

一実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞を凍結保存する。

## 【0564】

本発明のいくつかの実施形態のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞は、それ自体で、または適切な担体もしくは賦形剤と混合される医薬組成物において、生物に投与することができる。

20

## 【0565】

同様に、本発明のいくつかの実施形態の細胞または組織の移植片、例えば未成熟造血細胞（例えば、T細胞枯渇未成熟造血細胞）は、生物自体に投与する、または適切な担体もしくは賦形剤と混合される医薬組成物にあることができる。

## 【0566】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」は、生理学的に適切な担体および賦形剤などの他の化学成分を用いた、本明細書に記載の有効成分の1つまたは複数の調製物を指す。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすることである。

## 【0567】

本明細書では、「有効成分」という用語は、生物学的効果を説明できるTcm細胞を指す。

30

## 【0568】

以下、互換的に使用され得る「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」という句は、生物に重大な刺激を引き起こさず、投与された化合物の生物学的活性および特性を無効にしない担体または希釈剤を指す。これらの句にはアジュバントが含まれている。

## 【0569】

本明細書において、「賦形剤」という用語は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。賦形剤の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびデンプンの種類、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、およびポリエチレングリコールが含まれるが、これらに限定されない。

40

## 【0570】

薬物の処方および投与のための技術は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Co、ペンシルベニア州イーストン、最新版に見出すことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0571】

適切な投与経路には、例えば、経口、直腸、経粘膜、特に経鼻、腸または非経口送達を含み得、これには、筋肉内、皮下および髄内注射、ならびに髄腔内、直接脳室内、心臓内、例えば、右心室腔または左心室腔内、総頸動脈内、静脈内、腹腔内、鼻腔内、または眼

50

内への注射が含まれ得る。

【0572】

中枢神経系（CNS）への薬物送達のための従来のアプローチには、神経外科的戦略（例えば、脳内注入または脳室内注入）；BBBの内因性輸送経路の1つを利用する試みにおける薬剤（例えば、それ自体がBBBを通過することができない薬剤と組み合わせて、内皮細胞表面分子に対して親和性を有する輸送ペプチドを含むキメラ融合タンパク質の産生）の分子操作；薬剤の脂質溶解度を増加させるように設計された薬理学的戦略（例えば、水溶性薬剤と脂質またはコレステロール担体とのコンジュゲーション）；（頸動脈内へのマンニトール溶液の注入またはアンジオテンシンペプチドなどの生物学的に活性な薬剤の使用から生じる）高浸透圧破壊によるBBBの完全性の一時的な破壊が含まれる。しかしながら、これらの戦略の各々は、侵襲的外科処置に関連する固有のリスク、内因性輸送系に固有の制限によって課されるサイズの制限、CNSの外側で活性であり得るキャリアモチーフから構成されるキメラ分子の全身投与に関連する潜在的に望ましくない生物学的副作用、およびBBBが破壊される脳の領域内の脳損傷のリスクの可能性などの制限を有し、それにより準最適な送達方法になる。

10

【0573】

あるいは、例えば、患者の組織領域に直接医薬組成物を注射することにより、全身的ではなく局所的な方法で、医薬組成物を投与することができる。

【0574】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物は、当技術分野で周知のプロセスによって、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠製造、浮揚、乳化、カプセル化、捕捉または凍結乾燥のプロセスによって製造することができる。

20

【0575】

したがって、本発明のいくつかの実施形態に従って使用するための医薬組成物は、有効成分を薬学的に使用できる調製物に加工することを容易にする、賦形剤および助剤を含む、1つまたは複数の生理学的に許容される担体を使用して、従来の方法で処方することができる。適切な処方法は、選択した投与経路によって異なる。

【0576】

注射の場合、医薬組成物の有効成分は、水溶液、好ましくはハanks液、リンゲル液、または生理食塩水緩衝液などの生理学的に適合性のある緩衝液に処方することができる。経粘膜投与の場合、浸透するバリアに適した浸透剤が処方において使用される。そのような浸透剤は、当技術分野で一般的に知られている。

30

【0577】

経口投与の場合、医薬組成物は、活性化合物を当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に処方することができる。そのような担体は、患者による経口摂取のために、医薬組成物を錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方することを可能にする。経口使用のための薬理学的調製物は、固体賦形剤を使用して作製でき、任意選択で得られた混合物を粉碎し、顆粒の混合物を処理して、適切な助剤を添加した後、所望するのであれば、錠剤または糖衣錠のコアを得る。適切な賦形剤は、特に、糖、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、馬鈴薯デンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボメチルセルロースナトリウム、および／または生理学的に許容されるポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン（PVP）などの充填剤である。所望であれば、崩壊剤、例えば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸、またはそれらの塩、例えばアルギン酸ナトリウムを添加することができる。

40

【0578】

糖衣錠コアには適切なコーティングが施されている。この目的のために、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化

50

チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物を任意選択で含み得る強化糖溶液を使用することができる。染料または顔料は、識別のために、または活性化合物の用量の異なる組み合わせを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに添加され得る。

#### 【0579】

経口にて使用できる医薬組成物には、ゼラチンで作られたプッシュフィットカプセル、ならびにゼラチンおよびグリセロールまたはソルビトールなどの可塑剤で作られた柔らかく密封されたカプセルが含まれる。プッシュフィットカプセルは、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および任意選択で安定剤と混合した有効成分を含み得る。ソフトカプセルでは、有効成分は、脂肪油、流動パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの適切な液体に溶解または懸濁され得る。さらに、安定剤を加えることができる。経口投与用のすべての処方

10

#### 【0580】

頬側投与の場合、組成物は、従来の方法で処方された錠剤またはロゼンジの形態をとることができる。

#### 【0581】

経鼻吸入による投与の場合、本発明のいくつかの実施形態による使用のための有効成分は、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素を使用して、加圧パックまたはネブライザからエアゾールスプレーの呈示の形で、便利にも送達される。加圧エアロゾルの場合、投与ユニットは、計量された量を送達するためのバルブを設けることによって、判定することができる。ディスペンサーで使用するための例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物と適切な粉末ベース、例えばラクトースまたはデンプンの粉末混合物を含むように処方することができる。

20

#### 【0582】

本明細書に記載の医薬組成物は、例えば、ボラス注射または持続注入による非経口投与用に処方することができる。注射用処方は、単位剤形で、例えば、アンプルで、または任意選択で防腐剤を添加した複数回投与容器で提示することができる。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液または乳濁液であり得、懸濁剤、安定剤および／または分散剤などの配合剤を含み得る。

30

#### 【0583】

非経口投与用の医薬組成物には、水溶性形態の活性製剤の水溶液が含まれる。さらに、有効成分の懸濁液は、適切な油性または水ベースの注射懸濁液として調製することができる。適切な親油性溶媒またはビヒクルには、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチル、トリグリセリドまたはリポソームなどの合成脂肪酸エステルが含まれる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの懸濁液の粘度を増加させる物質を含み得る。任意選択で、懸濁液はまた、高い濃度の溶液の調製を可能にするために、有効成分の溶解度を増加させる適切な安定剤または薬剤を含み得る。

40

#### 【0584】

あるいは、有効成分は、使用前に、適切なビヒクル、例えば、無菌のピロジェンフリーの水ベースの溶液と構成するための粉末形態であり得る。

#### 【0585】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物はまた、例えば、カカオバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を使用して、坐剤または停留浣腸などの直腸組成物に処方され得る。

#### 【0586】

一実施形態によれば、Tcm表現型を含む非GVHD誘導細胞は、新鮮な細胞として投与するために製剤化される。

50

## 【0587】

一実施形態によれば、T c m表現型を含む非G V H D誘導細胞は、冷凍保存された細胞として投与するために製剤化される。

## 【0588】

本発明のいくつかの実施形態の文脈での使用に適した医薬組成物には、有効成分が意図された目的を達成するのに有効な量で含まれている組成物が含まれる。より具体的には、治療有効量は、寛容化（すなわち、拒否効果）、抗疾患効果、抗腫瘍効果および／またはG V H Dを誘導しない免疫再構成に有効な有効成分（非G V H D誘導T c m細胞）の量を意味する。本発明のT c m細胞は、移植後にリンパ節にホーミングするので、細胞の有益な効果（例えば、寛容化、抗疾患、抗腫瘍効果および／または免疫再構成）を達成するために、より少ない量の細胞（以前に使用された細胞の用量と比較して、例えば国際公開第2001/049243号パンフレットを参照のこと）が必要とされ得る。本発明のT c m細胞と併せて、より低レベルの免疫抑制薬（上述）が必要とされ得ることが理解されるであろう。同様に、本発明のT c m細胞（例えば、移植前の前処置プロトコルからのA T Gの排除）と併せて、より低レベルの骨髄非破壊的薬物（上記で論じられる）が必要とされ得る。

10

## 【0589】

治療有効量の判定は、特に本明細書で提供される詳細な開示に照らして、十分当業者の能力の範囲内である。

## 【0590】

本発明の方法で使用される任意の調製物について、治療有効量または用量は、最初に、インビトロおよび細胞培養アッセイから推定することができる。例えば、所望の濃度または力価を達成するために、動物モデルにおいて用量を処方することができる。このような情報は、ヒトの有用な用量をより正確に判断するために使用できる。

20

## 【0591】

例えば、細胞の移植（例えば、本明細書にて下で論じられるような大量投与T細胞枯渇未成熟造血細胞の移植）の場合、対象に注入されるT c m細胞の数は、理想体重1 k gあたり $1 \times 10^6$ 細胞より多くなるべきである。対象に注入されるT c m細胞の数は、典型的には、理想体重1 k gあたり $0.01 \times 10^6$ から $20 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $0.01 \times 10^6$ から $0.5 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $0.01 \times 10^6$ から $1 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $0.01 \times 10^6$ から $5 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $0.1 \times 10^6$ から $0.5 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $0.1 \times 10^6$ から $1 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $0.1 \times 10^6$ から $5 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $0.5 \times 10^6$ から $1 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $0.5 \times 10^6$ から $5 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $1 \times 10^6$ から $5 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $1 \times 10^6$ から $20 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $5 \times 10^6$ から $20 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $10 \times 10^6$ から $15 \times 10^6$ 細胞、理想体重1 k gあたり $10 \times 10^6$ から $20 \times 10^6$ 細胞、または理想体重1 k gあたり $15 \times 10^6$ から $20 \times 10^6$ 細胞の範囲にあるべきである。

30

40

## 【0592】

具体的な実施形態によれば、対象に注入されるT c m細胞の用量は、理想体重1 k gあたり約 $2.5 \times 10^6$ のC D 8<sup>+</sup>細胞である。

## 【0593】

具体的な実施形態によれば、対象に注入されるT c m細胞の用量は、理想体重1 k gあたり約 $5 \times 10^6$ のC D 8<sup>+</sup>細胞である。

## 【0594】

具体的な実施形態によれば、対象に注入されるT c m細胞の用量は、理想体重1 k gあたり約 $10 \times 10^6$ のC D 8<sup>+</sup>細胞である。

## 【0595】

50

本明細書で使用される「理想体重」という用語は、薬物投与を調整し、腎機能および薬物動態の推定（肥満患者などの）を助けるために臨床的に使用される測定値を指す。

【0596】

理想体重（kg）を推定する式は以下の通りである。

男性： $IBW = 50\text{ kg} + 5\text{ フィートを超える1インチごとに}2.3\text{ kg}$ 。

女性： $IBW = 45.5\text{ kg} + 5\text{ フィートを超える1インチごとに}2.3\text{ kg}$ 。

【0597】

理想体重は、参照により本明細書に組み込まれる Petersonら [Am J Clin Nutr 2016; 103: 1197-203] に詳細に記載されている。

【0598】

本明細書に記載の有効成分の毒性および治療効果は、細胞の培養または実験動物において、インビトロでの標準的な製薬の処置によって判断することができる。これらの *in vitro* および細胞培養アッセイおよび動物実験から得られたデータは、ヒトで使用するのための一連の投与量を処方する際に使用することができる。投与量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて変化し得る。正確な処方、投与経路、および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師が選択することができる。（例えば、Fingl, et al. の1975年、'The Pharmacological Basis of Therapeutics', Ch. 1 p. 1を参照）。

【0599】

投与量と間隔は、生物学的効果（最小有効濃度、MEC）を誘発または抑制するのに十分である有効成分の十分なレベルが提供されるように個別に調整することができる。MECは製剤ごとに異なるが、*in vitro* のデータから推定できる。MECを達成するために必要な投与量は、個々の特性と投与経路によって異なる。検出アッセイは、血漿濃度を判定するために使用することができる。

【0600】

治療される状態の重症度および応答性に応じて、投薬は、単回または複数回の投与であり得、治療の過程は、数日から数週間、または治癒がもたらされるか、または病状の減少が達成されるまで続く。

【0601】

治療される状態の重症度および応答性に応じて、投薬は、単回または複数回の投与であり得、治療の過程は、数日から数週間、または治癒がもたらされるか、または病状の減少が達成されるまで続く。

【0602】

もちろん、投与される組成物の量は、治療される対象、苦痛の重症度、投与方法、処方する医師の判断などに依存する。

【0603】

本発明のいくつかの実施形態の組成物は、必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得る、FDA承認キットなどのパックまたはディスペンサーデバイスで提示され得る。パックは、例えば、プリスターパックなどの金属またはプラスチック箔を含み得る。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与の説明書が添付されている場合がある。パックまたはディスペンサーは、医薬品の製造、使用、または販売を規制する政府機関によって規定された形式の容器に関連する通知に適合され得る。この通知は、組成物の形態またはヒトまたは獣医の投与の機関による承認を反映している。このような通知は、例えば、処方薬について米国食品医薬品局によって承認されたラベル、または承認された製品挿入物に関するものである可能性がある。適合性のある医薬担体に処方された本発明の調製物を含む組成物はまた、調製され、適切な容器に入れられ、上でさらに詳述されるように、示された状態の治療のために標識され得る。

【0604】

一実施形態によれば、本発明のいくつかの実施形態のTcm表現型を含む非GVHD誘導細胞は、治療用の「既製」製品（例えば、上述の治療に使用するためのベト細胞として

10

20

30

40

50

）のために製造することができる。

【0605】

一実施形態によれば、対象は、移植後にGVHD予防によって（例えば、コルチコステロイドおよび／または免疫抑制剤を用いて）長期的に（例えば長期間、例えば8、9、10、12、14、21、25、30、45、60、または90日間を超えて、例えば10～21日間、例えば10、または14日間）処置されない。

【0606】

一実施形態によれば、造血幹細胞移植後の再発の場合、対象は、ドナーリンパ球注入（DLI）によってさらに処置される場合がある。例えば、対象には、参照により本明細書に完全に組み込まれるDazzira [Dazzi, Szydlowski et al., Blood, (2000) 96:2712-6] によって以前に記載されたように、段階的用量のT細胞が投与され得る。

【0607】

本明細書で使用される「約」という用語は、±10%を指す。

【0608】

用語「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (having)」およびそれらの結合は、「含むが限定されない」ことを意味する。

【0609】

「からなる」という用語は、「含んで限定される」ことを意味する。

【0610】

「から本質的になる」という用語は、組成物、方法または構造が追加の成分、工程および／または部品を含むことができるが、追加の成分、工程および／または部品がクレームされる組成物、方法、または構造の基本的および新規の特性を実質的に変更しない場合のみを含み得ることを意味する。

【0611】

本明細書で使用される単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈からそうでないことが明確に示されない限り、複数の言及を含む。例えば、用語「化合物」または「少なくとも1つの化合物」は、それらの混合物を含む複数の化合物を含み得る。

【0612】

本出願を通して、本発明の様々な実施形態は、範囲形式で提示され得る。範囲形式での説明は単に便宜上および簡潔にするためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の説明は、すべての可能な部分範囲およびその範囲内の個々の数値を具体的に開示したと見なされるべきである。例えば、1～6などの範囲の説明は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの副次的な範囲およびその範囲内の個々の番号、例えば1、2、3、4、5、6を具体的に開示しているとは見なされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0613】

本明細書で数値範囲が示されるときはいつでも、それは、示された範囲内の任意の引用された数字（分数または整数）を含むことを意味する。第1の表示番号と第2の表示番号との「範囲／間の範囲」、また第1の表示番号から第2の表示番号「の範囲／までの範囲」という句は、本明細書では互換的に使用され、第1および第2の表示番号およびそれらの間のすべての分数と整数を含むことを意味する。

【0614】

本明細書で使用される「方法」という用語は、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の実務家により公知であるか、公知の様式、方法、手段、技術および処置から容易に開発される様式、手段、技術、および手順を含むがこれらに限定されない、所与のタスクを達成するための様式、手段、技術、および手順を指す。

【0615】

10

20

30

40

50

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴は単一の実施形態に組み合わせて提供することもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするために単一の実施形態の文脈で説明される本発明の様々な特徴は、別個に、または任意の適切なサブコンビネーションで、または本発明の他の説明された実施形態で適切に提供されてもよい。様々な実施形態の文脈で説明される特定の特徴は、実施形態がそれらの要素なしで動作不能でない限り、それらの実施形態の本質的な特徴と見なされるべきではない。

【0616】

本明細書の上にて詳述され、以下の特許請求の範囲で請求される本発明の様々な実施形態および態様は、以下の実施例で実験的裏付けを見出す。

【実施例】

【0617】

ここで、以下の実施例を参照するが、これらの実施例は、上記の説明と共に、本発明を非限定的な方法で説明するものである。

【0618】

一般に、本明細書で使用される命名法および本発明で利用される実験室手順には、分子、生化学、微生物学および組換えDNA技術が含まれる。そのような技術は文献で徹底的に説明されている。例えば、‘ ‘Molecular Cloning: A Laboratory Manual’ ’ Sambrook et al., (1989); ‘ ‘Current Protocols in Molecular Biology’ ’ Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., ‘ ‘Current Protocols in Molecular Biology’ ’, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, ‘ ‘A Practical Guide to Molecular Cloning’ ’, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., ‘ ‘Recombinant DNA’ ’, Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) ‘ ‘Genome Analysis: A Laboratory Manual Series’ ’, Vols. 1~4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 米国特許第4,666,828号明細書;第4,683,202号明細書;第4,801,531号明細書;第5,192,659号明細書および第5,272,057号明細書; ‘ ‘Cell Biology: A Laboratory Handbook’ ’, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); ‘ ‘Current Protocols in Immunology’ ’ Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), ‘ ‘Basic and Clinical Immunology’ ’ 8th Edition, Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), ‘ ‘Selected Methods in Cellular Immunology’ ’, W. H. Freeman and Co., New York (1980) にて記載されている方法論を参照されたい; 米国特許第3,791,932号明細書;第3,839,153号明細書;第3,850,752号明細書;第3,850,578号明細書;第3,853,987号明細書;第3,867,517号明細書;第3,879,262号明細書;第3,901,654号明細書;第3,935,074号明細書;第3,984,533号明細書;第3,996,345号明細書;第4,034,074号明細書;第4,098,876号明細書;第4,879,219号明細書;第5,011,771号明細書、および第5,281,521号明細書; ‘ ‘Oligonucleotide Synthesis’ ’ Gait, M. J., ed. (1984); ‘ ‘Nucleic Acid Hybridization’ ’ Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); ‘ ‘Transcription and Translation’ ’ Hames, B. D.

10

20

30

40

50

, and Higgins S. J., Eds. (1984); 'Animal Cell Culture' Freshney, R. I., ed. (1986); 'Immobilized Cells and Enzymes' IRL Press, (1986); 'A Practical Guide to Molecular Cloning' Perbal, B., (1984) and 'Methods in Enzymology' Vol. 1~317, Academic Press; 'PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications', Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., 'Strategies for Protein Purification and Characterization—A Laboratory Course Manual' CSHL Press (1996) などの特許および科学文献に利用可能なイムノアッセイが広範囲に記載されており、参照されたい；これらはすべて、本明細書に完全に記載されているかのように、参照により組み込まれている。他の一般的な参考文献は、この文書全体で提示されている。その中の手順は、当技術分野で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。ここに含まれるすべての情報は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 実施例 1

#### 【0619】

##### 臨床プロトコル

##### 組み入れ基準：

- ・ 12～70歳
- ・ 濾胞性リンパ腫（FL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、多発性骨髄腫（MM）、ホジキンリンパ腫（HL）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、慢性骨髄性白血病（CML）、骨髄増殖性症候群（MPD）、急性骨髄性白血病（AML）、または急性リンパ性白血病（ALL）の血液悪性腫瘍診断の患者。
- ・ 再生不良性貧血および重度の免疫不全または非悪性骨髄不全の状態を有する患者。
- ・ 血液悪性腫瘍を有する患者は、最初の化学療法にもかかわらず持続性または進行性の疾患を有していなく、直近の化学療法に対して安定した疾患または部分的もしくは完全な応答を達成している者でなければならない。
- ・ 細胞ドナーの入手可能性
- ・ カルノフスキーパフォーマンスステータス $\geq 70\%$
- ・ 以下によって実証されるような適切な主要臓器系機能：
  - 少なくとも $40\%$ の左室駆出率
  - ヘモグロビン濃度の予測値の少なくとも $50\%$ の調整拡散能を実証する肺機能検査（PFT）
  - 血清クレアチニン $\leq 1.5\text{ mg/dl}$ 。
  - SGPT $\leq 200\text{ IU/ml}$
  - ビリルビン $< 1.5\text{ mg/dl}$ （ギルバート症候群でない限り）。
  - 妊娠の可能性のある女性における妊娠検査陰性。

#### 【0620】

##### 除外基準

- ・ HIV血清陽性。
- ・ プロトコル治療に対する寛容を制限するであろう無制御の感染または重篤な医学的もしくは精神医学的状态。
- ・ 活動性CNS悪性腫瘍。

#### 【0621】

##### 治療計画

ドナーからの2つの収集物、すなわちベト細胞を調製するための1つの「プライミングされていない」単核細胞（MNC）、および大量投与T細胞枯渇幹細胞移植を調製するための動員された末梢血前駆細胞（PBPC）の第2の収集物が存在する。両方の収集は標

準的なケア手順（SOC）に従い、ドナーは提供のためにSOC同意に署名する。

【0622】

抗ウイルス性セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベトT細胞の産生のためのプライミングされていない（すなわち、非可動化）末梢血単核細胞の収集は、いつでも行われ得るが、一般に、計画された移植日（すなわち0日目、すなわちD0）の約7日前に行われる。ベト細胞は、その製造の最後に新鮮な状態で使用され、D+7に注入されるか、またはその製造の最後に凍結保存される。

【0623】

G-CSFおよびプレリキサフォルを使用した動員されたPBPCの回収は、臨床的に必要であれば、大量投与移植のために、抗ウイルス性セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベト細胞の産生のためのPBMCの回収の7日以上前に完了することができる。あるいは、新鮮なCD34<sup>+</sup>幹細胞を使用することができ、動員された幹細胞の収集を連続した3日（-2日目、-1日目および0日目）で行うことができ、一方、ベト細胞のためのPBMCの収集を-8日目に開始することができる。理想体重1kgあたり $\geq 10 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞という最適なPBMC細胞用量という目標が達成される；理想体重1kgあたり少なくとも $5 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞が必要であり、これは、理想体重1kgあたり約 $1 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含有するPBPCの未分画アリコートを含み、移植後のベト細胞産生または移植片不全の場合のバックアップとして凍結保存されるか、または移植片不全の治療に利用可能である。ドナーが処置に寛容ではない場合、または十分な細胞用量を収集することができない場合、利用可能であれば代替ドナーを使用することができる。

【0624】

動員されたPBPCは、一般に3日間で収集される。最初の2日間の収集物をプールし、CliniMac sデバイス（Miltenyi）を使用してCD34<sup>+</sup>細胞を選択し、細胞を新鮮な状態で（第3の収集物の細胞と共に）使用することができ、または凍結保存することができる。3日目の収集物からCD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>細胞を除去し、細胞を新鮮な状態で（前の2日間の収集物の細胞と共に）使用することができ、または凍結保存することができる。T細胞枯渇幹細胞移植全体における最大のT細胞用量は、 $2 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞/kg理想的レシピエント体重である。未操作のPBPCのバックアップ画分は、CD34<sup>+</sup>細胞選択処置が残りのPBPC産物に対して行われる前に、1日目の収集物から除去される。

【0625】

新鮮なCD34<sup>+</sup>選択幹細胞およびCD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>枯渇幹細胞を使用する場合、これらは、典型的には、それぞれ-1および0日目に投与される。あるいは、凍結保存されたCD34<sup>+</sup>選択およびCD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>枯渇幹細胞を使用する場合、それらは、典型的には、解凍され、0日目に注入される。

【0626】

抗ウイルスセントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベトT細胞（ベト細胞）の作製

ベト細胞の産生のための詳細なプロトコルは、以下の実施例2に提供される。このセクションは、本発明のいくつかの実施形態の簡単な説明を提供する。

【0627】

プロトコルは、以下の3つの工程を含む：

【0628】

工程1：刺激薬の調製（-8日目～-5日目）：

PBMC中の単球からのドナーDCの調製

-8日目：およそ $1 \times 10^{10}$ 個の単核細胞を白血球アフェレーシスによって回収し、一晚維持する。

-7日目：細胞をFicol分離によって処理し、その後、単核細胞の半分をCD14磁気ビーズ（Miltenyi磁気ビーズ選別システム）による単球の単離に使用する。その後、CD14<sup>+</sup>単球は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）およ

びインターロイキン 4 (IL-4) を用いて未成熟 DC に分化される。

【0629】

並行して、CD14<sup>-</sup> (すなわち、CD14<sup>neg</sup>) 細胞を、フィコール単離後に得られた最初の単核細胞の半分と合わせ、IL-7 の存在下、37℃、5% O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> 中で一晩保存する。これらの細胞は、翌日の CD8<sup>+</sup> メモリー T 細胞の富化に使用される。

－6 日目：16 時間のインキュベーションのためのリポ多糖 (LPS)、インターフェロンガンマ (IFN $\gamma$ )、GM-CSF および IL-4 を含むサイトカインカクテルの添加による DC 成熟。

－5 日目：成熟 DC (mDC) を採取し、ウイルスペプチドカクテルを負荷し、照射する。

10

【0630】

工程 2：レスポンダーの調製およびウイルス負荷 mDC との共培養 (－6 日目～－5 日目)：

(A) メモリー T 細胞 (CD4<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>) 精製 (ドナー PBMC－レスポンダー由来)

－6 日目：IL-7 と共に一晩インキュベートした単核細胞の半分と組み合わせたドナー CD14<sup>-</sup> 細胞を、磁気ビーズによって CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup> および CD45RA<sup>+</sup> 細胞を枯渇させ、IL-7 の存在下、37℃、5% O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub> 中でさらに一晩保存する。

【0631】

B) レスポンダー (ドナー) 刺激因子 (ドナーウイルスペプチド負荷 DC) の共培養確立。

20

－5 日目：精製メモリーレスポンダー T 細胞 (CD4<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) を、IL-21 の存在下で、ウイルスペプチドを負荷した mDC で 3 日間インキュベートする。

【0632】

工程 3：抗ウイルスベクトル Tcm の分化および増殖 (－5 日目～＋7 日目)：

(A) 抗ウイルスセントラルメモリー CD8<sup>+</sup> ベクトル T 細胞 (Tcm) の増殖

－5 から－2 日目：IL-21 のみによる Tcm 表現型の開始。

－2 ～＋7 日目：グルコースレベルの消費に従って分割することによる Tcm 培養物の増殖、および培養物中で観察された増殖に応じた以下のサイトカイン：IL-7、IL-15 および IL-21 を補充した培地の添加。

30

＋7 日目：細胞の採取および注入。

【0633】

目的の PBMC ドナーからの Tcm 産生および DC 調製のおおよそのタイムラインを図 1 に示す。細胞を採取し、造血幹細胞移植後の＋7 日目に注入する。

【0634】

抗ウイルス性セントラルメモリー CD8<sup>+</sup> ベクトル細胞のアリコートを放出基準および機能的免疫研究について評価する (以下に考察する)。

【0635】

治療計画－前処置レジメン

40

新鮮な CD34<sup>+</sup> 細胞を含む

【0636】

図 3 に示すように、D-10 から D-2 への前処置レジメン (すなわち、移植の 10 から 2 日前) には、抗胸腺細胞グロブリン (ATG) (－10 日目から－8 日目までの 3 回の用量)、フルダラビン (Flu) (7 日目から－4 日目までの 4 回の用量)、および 3 Gy の全身照射 (TBI) (2 日目に 1 回) が含まれる。T 細胞枯渇幹細胞移植片を－1 日目および 0 日目に注入する。移植後 D+3 および +4 (すなわち移植後 3 および 4 日目) に、患者はシクロホスファミド (CY) を受け、続いて移植後 D+7 (すなわち、移植後 7 日目) に、ベクトル細胞の注入を受ける。B 細胞悪性腫瘍を有する患者は、－11 日目にリツキシマブ 375 mg / m<sup>2</sup> を投与され得る。

50

## 【0637】

日および処置：

- 11 水和／リツキサン  $375 \text{ mg} / \text{m}^2$  (B細胞悪性腫瘍の場合) を承認／静脈内 (IV) 投与する
- 10 ATG (チモグロブリン)  $2 \text{ mg} / \text{kg}$
- 9 ATG (チモグロブリン)  $2 \text{ mg} / \text{kg}$
- 8 ATG (チモグロブリン)  $2 \text{ mg} / \text{kg}$
- 7 フルダラビン  $30 \text{ mg} / \text{m}^2$
- 6 フルダラビン  $30 \text{ mg} / \text{m}^2$
- 5 フルダラビン  $30 \text{ mg} / \text{m}^2$
- 4 フルダラビン  $30 \text{ mg} / \text{m}^2$
- 3 安静 (無処置)
- 2 TBI  $3 \text{ Gy}$  を単一画分で。
- 1 大量投与T細胞枯渇PBPC (CD34<sup>+</sup>選択細胞を含有する) の注入
- 0 CD3<sup>-</sup> / CD19<sup>-</sup> 枯渇細胞の注入
- + 3 シクロホスファミド (CY)  $50 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  のIV
- + 4 シクロホスファミド (CY)  $50 \text{ mg} / \text{kg} / \text{日}$  のIV
- + 7 必要な用量での抗ウイルスベト細胞の注入。

10

## 【0638】

注目すべきことに、患者は、シクロホスファミドの最初の用量の直前に、Mesna  $10 \text{ mg} / \text{kg}$  の用量の静脈内ピギーバック (IVPB) を受ける。これを4時間毎に合計10回繰り返す。患者はまた、シクロホスファミド (CY) の各用量の前にオンダンセトロン (または他の制吐薬) を投与される。

20

## 【0639】

ベト細胞のための前投薬は、コルチコステロイドを含まない。

## 【0640】

凍結保存CD34<sup>+</sup>細胞を用いて

図4に示すように、D-9からD-1 (すなわち移植の9~1日前) まで、患者は、抗胸腺細胞グロブリン (ATG)、フルダラビン (Fu) および低用量全身照射 (TBI) を準備レジメンとして受ける。移植後D+3および+4 (すなわち移植後3~4日目) に、患者はシクロホスファミド (CY) を受け、続いて移植後7日目 (すなわち、移植後D+7) に、ベト細胞の注入を受ける。B細胞悪性腫瘍を有する患者は、-10日目にリツキシマブ  $375 \text{ mg} / \text{m}^2$  を投与され得る。

30

## 【0641】

日および処置：

- 10 水和／リツキサン  $375 \text{ mg} / \text{m}^2$  (B細胞悪性腫瘍の場合) を承認／静脈内 (IV) 投与
- 9 ATG (チモグロブリン) 理想体重  $1 \text{ kg}$  あたり  $2 \text{ mg}$
- 8 ATG (チモグロブリン) 理想体重  $1 \text{ kg}$  あたり  $2 \text{ mg}$
- 7 ATG (チモグロブリン) 理想体重  $1 \text{ kg}$  あたり  $2 \text{ mg}$
- 6 フルダラビン  $30 \text{ mg} / \text{m}^2$
- 5 フルダラビン  $30 \text{ mg} / \text{m}^2$
- 4 フルダラビン  $30 \text{ mg} / \text{m}^2$
- 3 フルダラビン  $30 \text{ mg} / \text{m}^2$
- 2 安静 (無処置)
- 1 TBI  $3 \text{ Gy}$  を単一画分で。
- 0 大量投与T細胞枯渇PBPC (CD34<sup>+</sup>選択細胞およびCD3<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> 枯渇細胞を含有する) の注入
- + 3 シクロホスファミド (CY)  $50 \text{ mg} / \text{kg}$  理想体重 / 日IV
- + 4 シクロホスファミド (CY)  $50 \text{ mg} / \text{kg}$  理想体重 / 日IV

40

50

+ 7 必要な用量での抗ウイルスベト細胞注入。

【0642】

注目すべきことに、患者は、シクロホスファミドの最初の用量の直前に、Mesna 10 mg / kg の用量の静脈内ピギーバック (IVPB) を受ける。これを4時間毎に合計10回繰り返す。患者はまた、シクロホスファミド (Cy) の各用量の前にオンダンセトロン (または他の制吐薬) を投与される。

【0643】

ベト細胞のための前投薬は、コルチコステロイドを含まない。

【0644】

抗ウイルスベト細胞用量レベル - CD8<sup>+</sup>細胞用量漸増

用量レベル1: 理想体重1 kg あたり  $2.5 \times 10^6$  の CD8<sup>+</sup>細胞

用量レベル2: 理想体重1 kg あたり  $5.0 \times 10^6$  の CD8<sup>+</sup>細胞

用量レベル3: 理想体重1 kg あたり  $10 \times 10^6$  の CD8<sup>+</sup>細胞

【0645】

追加の移植後免疫抑制療法はGVHD予防として投与されない。

【0646】

製造された細胞産物が計画された用量レベル未満である場合の考察

用量レベル1は、理想体重1 kg あたり  $2.5 \times 10^6$  個の細胞を含む。注目すべきことに、より低い用量は、典型的には許容されないと考えられる。

【0647】

用量レベル2の場合、目標用量は理想体重1 kg あたり  $5 \times 10^6$  細胞であるが、理想体重1 kg あたり  $2.6 \sim 5 \times 10^6$  細胞の用量が適切であると考えられ、用量レベル2と考えられる。

【0648】

用量レベル3の場合、目標用量は、理想体重1 kg あたり  $10 \times 10^6$  細胞であるが、理想体重1 kg あたり  $5.1$  から  $10 \times 10^6$  細胞の用量が適切であると考えられ、用量レベル3と考えられる。

【0649】

試験中の評価

事象のスケジュールおよびすべてのプロトコル要件を遵守する努力がなされる。患者の権利および安全性に影響を及ぼさない事象のスケジュールおよび他のプロトコル要件の変動は、逸脱と見なされない。そのような変動には、スケジュール外で完了した実験室評価および必要な研究サンプルを時折欠くことが含まれ得る。相関研究のための欠落したサンプルは、プロトコルの逸脱を構成しない。

【0650】

移植前の評価 (ベースライン) :

移植および疾患評価のための標準的な後処理は、診断的または日常的な移植前評価の一部として試験に参加する前に行われる。以下の試験は、標準的な移植前のケアの試験であり、プロトコル特異ではない。結果は、移植適格性を判定するために使用され、治療開始前に繰り返されない。治療が同意後30日間を超えて遅延した場合、PIまたは被指名人は、もしあれば、臨床的な必要に応じて、どの検査を繰り返す必要があるかを決定すべきである。

- CBC、鑑別および血小板

- ビリルビン、血清クレアチニンおよびクレアチニークリアランス、ALT、アルブミン、電解質、LDH、アルカリホスファターゼ

- 感染性疾患パネル (肝炎血清学 (B、C)、HIV、HTLV、I / II、CMV、TPHAスクリーニング)、トキソプラズマ血清学、ストロングロイデス血清学 (必要な場合)、結核、IRGA (必要な場合)

- PTおよびPTT

- ABOおよびRhの分類

10

20

30

40

50

- －臨床的に必要であれば、細胞遺伝学および分子研究を伴う骨髄吸引
- －キメラ現象分析ベースライン
- －妊娠可能性のある女性における妊娠試験
- －DLCOを用いた肺機能検査
- －左心室EFおよび肺動脈圧を評価するための心エコー図
- －胸部X線およびECG
- －ドナー特異的抗HLA抗体(DSA)の血清

#### 【0651】

この試験で治療される患者の有効な治療期間は、準備レジメンの開始(－9日目)から移植後+42日目までである。その後、患者は、臨床的に必要であればD+100までフォローアップを行う。その後、幹細胞移植レシピエントの標準的なフォローアップに従って、疾患の再発、感染、急性および慢性GVHDならびに生存データを収集する。1年後、患者を試験から外す。急性GVHDおよび慢性GVHDを、NIH Consensus Criteriaに従ってスコア化する。

10

#### 【0652】

標準的な事後評価

標準的な事後評価は、同種移植後のSOCによる。骨髄吸引および末梢血－処置応答、生着、キメラ現象および免疫再構成を評価するため－を3ヶ月間にわたって、臨床的に必要であれば毎月行う。

20

#### 【0653】

相関研究

免疫再構成を、フローサイトメトリー免疫表現型パネルおよび四量体分析による抗ウイルス応答によって評価する。免疫寛容試験を移植のおよそ3ヶ月後に行う。相関研究のための欠落したサンプルは、プロトコルの逸脱を構成しない。

#### 【0654】

急性GVHDの発症をNIHコンセンサス基準によって評価し、スコア化する。疾患の再発または進行は、患者の悪性腫瘍の形態学的再発によって評価される。細菌、ウイルス、真菌および寄生虫の感染に関するデータを収集する。慢性GVHDの発症は、NIH Consensus Criteria [Jagasia MH, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. Biol Blood Marrow Transplant. (2015) 21:389-401 e381]に従って記載される。

30

#### 【0655】

40

50

【表 1 A】

表 1 A : 評価の表

|                     | 前処理 (試験の登録から<br>30 日以内) | 第 1 週 (+/- 1 日) | 第 2 週 (+/- 2 日) | 第 3 週 (+/- 3 日) | 30 日目 (+/- 5 日) | 60 日目 (+/- 5 日) | 90 日目 (+/- 5 日) | 100 日目 (+/- 14 日) |
|---------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| カルノフスキーパフォーマンスステータス | X                       |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                   |
| 実験室試験 <sup>1</sup>  | X                       |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                   |
| 妊娠検査 <sup>2</sup>   | X                       |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                   |
| C B C               |                         | X               | X               | X               | X               | X               | X               | X                 |
| キメラ現象分析             | X                       | X               | X               | X               | X               | X               | X               | X                 |
| D L C O を用いた肺機能検査   | X                       |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                   |
| エコー                 | X                       |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                   |
| 胸部 X 線              | X                       |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                   |
| 骨髄吸引 <sup>3</sup>   | X                       |                 |                 |                 | X <sup>3</sup>  | X <sup>3</sup>  | X <sup>3</sup>  |                   |
| 相関研究 <sup>4</sup>   |                         |                 |                 |                 | X               | X               | X               |                   |

<sup>1</sup> ベースライン臨床検査：C B C、示差および血小板、ビリルビン、血清クレアチニンおよびクレアチニンクリアランス、A L T、アルブミン、電解質、L D H、アルカリホスファターゼ、感染性疾患のパネル（肝炎血清学（B、C）、H I V、H T L V、I / I I、C M V、T P H A スクリーン）、トキソプラズマ血清学、ストロングロイデス血清学（必要な場合）、結核 I R G A（必要な場合）、P T および P T T、A B O および R h 分類、ドナー特異的抗 H L A 抗体（D S A）の血清。

<sup>2</sup> 出産の可能性のある女性の妊娠検査（尿）。

<sup>3</sup> 臨床的に必要な場合。

<sup>4</sup> 相関研究（免疫再構築はフローサイトメトリ免疫表現型パネルによって、抗ウイルス反応は四量体分析によって評価）、免疫寛容テストは、Y a i r R e i s n e r 医師の研究室によって実行可能な限り約 3 か月間実施。相関研究のために欠落したサンプルは、プロトコルの逸脱を構成していない。

## 【0 6 5 6】

## 支持療法

・移植後成長因子なし

・移植後免疫抑制療法は G V H D 予防として投与されない。

・支持療法の他の態様は、臨床的に必要であれば投与される（例えば、生着が遅い場合の G - C S F による支持、または例えばメチルプレドニゾロン、タクロリムスもしくは他の免疫抑制薬による G V H D の処置）。試験中に患者に投与された併用薬は、患者の一次医療記録に記録されている。

## 【0 6 5 7】

## 不適切な抗ウイルスベト細胞産生に対する偶発事象

ベト細胞が放出基準を満たすが、細胞用量が標的細胞用量レベル未満である場合：用量が理想体重 1 k g あたり  $\geq 2.5 \times 10^6$  の C D 8 + 細胞（用量レベル 1）である場合、細胞は注入される。この場合、患者は治療意図の原理によって割り当てられた用量レベル

で評価される。

#### 【0658】

ベト細胞用量が理想体重1kgあたり $2.5 \times 10^6$ 個未満のCD8<sup>+</sup>細胞である場合、またはベト細胞が放出基準を満たさない場合、これらの細胞は注入されない。代わりに、予備のPBPC+T細胞枯渇PBPCを注入して「標準的なPBPC移植」を再構成し、患者は、標準的なGVHD予防としてタクロリムスおよびミコフェノール酸を用いた標準的なケア準備レジメンを受ける。

#### 【0659】

持続性または進行性疾患のためのドナーリンパ球注入(DLI)

GVHDが存在しない場合、生着を達成し、 $\geq 5\%$ の骨髓性ドナー細胞を有し、移植後の任意の時点で進行性疾患または $\geq 3$ ヶ月で持続性疾患を有する患者は、標準治療または代替療法としてドナーリンパ球注入を受けることができる。

#### 【0660】

グラフトの処置の不全

これは骨髓非破壊的レジメンである。移植片拒絶が起こった場合、自己造血回復が起こり得ると予想される。生着は、キメラ現象分析および絶対好中球数( $ANC > 0.5 \times 10^9 / L$ )の回復によるドナー細胞の検出として定義される。ドナー細胞の生着および造血回復を有さない患者(28日後に $ANC > 0.5 \times 10^9 / L$ )、または回復を達成するがその後5日間にわたって少なくとも3回連続して $ANC$ が $< 0.5 \times 10^9 / L$ に低下したという判定があり、骨髓生検での $< 10\%$ の細胞充実性があり、ドナーキメラ現象の証拠がない(可逆的感染、骨髓抑制薬治療または疾患の進行に関連しない)患者を、移植片不全と定義し、処置の失敗とみなし、試験を中止する。これらの患者は、臨床的に必要であれば再移植のために考慮され、予備の未改変PBPCを使用し得る。

#### 【0661】

移植後に生じるGVHDに対する介入

以下は、急性GVHDの管理のためのガイドラインである。これは、患者の主治医によって、臨床的に必要であれば変更される。

#### 【0662】

急性GVHD

a) グレードI-1週間投薬なし(Rx)または局所ステロイドのみを監視する。

b) グレードII~IVが発生した場合、メチルプレドニゾロン1~2mg/kg理想体重/日で治療する。

c) メチルプレドニゾロンの添加後、グレード>IIが48時間の間持続または進行する場合、タクロリムスまたは他の免疫抑制薬を、臨床的に必要であれば、または能動的GVHD治療プロトコルで追加することができる。

#### 【0663】

グレード3~4のステロイド抵抗性急性GVHDを有する患者は、処置失敗と見なされ、臨床的に必要であれば、他の免疫抑制処置を受ける場合がある。

#### 【0664】

統計的考察

1. 予備。これは、NHL、AML、CLLまたはMMを含む血液悪性腫瘍を有する患者であって、以前に再発したかまたは初期治療に対して難治性であると宣言され、その後部分寛解または完全寛解を達成した患者に投与されるドナー由来ベト細胞の最適用量を決定するための第I相-I相試験である。各患者は、まず、ハプロタイプ一致ドナーからの同種異系幹細胞移植(アロスクト)を受け、前処置レジメンは、ATG、フルダラビンおよびTBIが、アロスクト後3および4日目にGVHDの予防として与えられ、引き続いてベト細胞が、アロスクト後7日目に与えられる。各患者コホートのベト細胞用量は、第I-I相の設計を使用して適応的に選択される。

#### 【0665】

2. 用量設定設計

目標：試験の主要な科学的目標は、理想体重1キログラムあたり $2.5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、および $10^7$ のCD8<sup>+</sup>細胞の3つのレベルの中から最適なベト細胞用量を決定することであり、以後、用量1、2、3と呼ばれ、用量－転帰モデルにおいて（以下の表1Bを参照されたい）数値的にコードされる。用量設定は、先に論じたように逐次適応第I相－II相のEffToxのトレードオフベースの設計を使用して行われる [Thall PF and Cook JD. Dose-finding based on efficacy-toxicity trade-offs. Biometrics (2004) 60:684-693; Thall PF et al. Using effective sample size for prior calibration in Bayesian phase I-II dose-finding. Clinical Trials. (2014) 11:657-666]。

10

#### 【0666】

共通の主要転帰：用量設定の目的のために、（1）毒性は、ベト細胞注入の42日間内のグレード3、もしくは4のGVHD、または何らかの原因による死亡と定義される。（2）有効性は、ベト細胞注入後42日目に生存し移植されている患者として定義される。治験に登録されているが、何らかの理由でベト細胞を受けていない患者は、アロストがサンプル中で交換された後7日目にベト細胞を投与される。

#### 【0667】

用量許容性：2つのEffToxの用量許容可能性ルールの場合、毒性の確率の上限は.20で、有効性の最小確率は.80、事後確率決定カットオフは.10が使用されるか、または両方が許容性基準である。最低用量レベルが高い毒性または低い有効性のいずれかに関して許容できないことが判明した場合、試験は終了し、ベト細胞用量レベルは選択されない。

20

#### 【0668】

最大サンプルサイズおよびコホートサイズ：最大24人の患者がサイズ3の最大8つのコホートで治療され、第1のコホートは用量 $d=2$ で治療され、その後のすべてのコホートの用量は、最新の蓄積データに基づいて計算された有効性－毒性のトレードオフを最大化するように適応的に選択される。転帰適応規則を適用するために、42日間の有効性および毒性転帰の両方が以前に治療されたすべての患者について評価されることを確実にするために、必要に応じてコホート間で発生が保留される。

30

#### 【0669】

事前：モデルパラメータの事前の値は、EffToxプログラムバージョン4.0.12を使用して、表1Bに示す誘発された平均限界転帰確率から計算し、事前の有効サンプルサイズ1を得るために超分散を校正した。

#### 【0670】

#### 【表1B】

表1B：各ベト細胞用量レベルについての毒性および有効性の導出された事前の平均確率

|                      | 理想体重1kgあたり<br>$2.5 \times 10^6$ のベト細胞 | 理想体重1kgあたり<br>$5 \times 10^6$ のベト細胞 | 理想体重1kgあたり<br>$10 \times 10^6$ のベト細胞 |
|----------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
|                      | $d=1$                                 | $d=2$                               | $d=3$                                |
| P <sub>r</sub> （毒性）  | .10                                   | .20                                 | .30                                  |
| P <sub>r</sub> （有効性） | .70                                   | .80                                 | .90                                  |

40

#### 【0671】

有効性－毒性トレードオフ輪郭：トレードオフ輪郭を計算するために使用される3つの等価なトレードオフ確率対は、（30、0）、（55、30）、および（1、80）である。

#### 【0672】

#### 3. 設計動作特性

6つの仮定的用量－転帰シナリオの下での設計の動作特性（OC）を以下に要約する。

50

OCを計算するためのシミュレーションは、シミュレーションシード10502を使用して、シナリオごとに2000回の複製で、EffToxバージョン4.0.12を使用して実行された。

【0673】

【表2A】

表2A：設計の動作特性

| シナリオ |             | 用量レベル      |            |            |    |
|------|-------------|------------|------------|------------|----|
|      |             | 1          | 2          | 3          | なし |
| 1    |             |            |            |            |    |
|      | 真の p T、p E  | . 10, . 60 | . 20, . 80 | . 40, . 85 | —  |
|      | トレードオフ値     | 0. 31      | 0. 47      | 0. 30      | —  |
|      | 選択された割合 (%) | 10         | 68         | 5          | 17 |
|      | 治療した患者数     | 3. 4       | 17. 3      | 1. 6       | —  |
| 2    |             |            |            |            |    |
|      | 真の p T、p E  | . 02, . 60 | . 05, . 70 | . 10, . 80 | —  |
|      | トレードオフ値     | 0. 41      | 0. 51      | 0. 60      | —  |
|      | 選択された割合 (%) | 6          | 29         | 58         | 7  |
|      | 治療した患者数     | 1. 3       | 12. 1      | 9. 9       | —  |
| 3    |             |            |            |            |    |
|      | 真の p T、p E  | . 02, . 60 | . 05, . 70 | . 10, . 90 | —  |
|      | トレードオフ値     | 0. 41      | 0. 51      | 0. 74      | —  |
|      | 選択された割合 (%) | 2          | 29         | 67         | 2  |
|      | 治療した患者数     | 0. 6       | 12. 1      | 11. 0      | —  |
| 4    |             |            |            |            |    |
|      | 真の p T、p E  | . 15, . 80 | . 35, . 82 | . 45, . 85 | —  |
|      | トレードオフ値     | 0. 54      | 0. 32      | 0. 24      | —  |
|      | 選択された割合 (%) | 62         | 20         | 1          | 18 |
|      | 治療した患者数     | 11. 3      | 10. 3      | 0. 4       | —  |
| 5    |             |            |            |            |    |
|      | 真の p T、p E  | . 40, . 65 | . 45, . 75 | . 50, . 80 | —  |
|      | トレードオフ値     | 0. 02      | 0. 10      | 0. 10      | —  |
|      | 選択された割合 (%) | 15         | 4          | 1          | 80 |
|      | 治療した患者数     | 6. 6       | 6. 9       | 0. 5       | —  |
| 6    |             |            |            |            |    |
|      | 真の p T、p E  | . 02, . 40 | . 05, . 45 | . 10, . 50 | —  |
|      | トレードオフ値     | 0. 12      | 0. 16      | 0. 17      | —  |
|      | 選択された割合 (%) | 8          | 1          | 9          | 81 |
|      | 治療した患者数     | 3. 1       | 5. 2       | 6. 9       | —  |

10

20

30

40

【0674】

#### 4. 実装

EffTox設計は、MD Anderson Cancer Center (MDACC) Department of Biostatistics Clinical Trial Conduct、ウェブサイト [www \(dot\) biostatistics \(dot\) mdanderson \(dot\) org / ClinicalTrialConduct /](http://www.biostatistics.org/mdanderson/ClinicalTrialConduct/)

50

を使用して実施される。試験実施中に必要であれば、試験生物統計学者の Peter T Hall または Biostatistics Department の指定された統計学専門家に相談すべきである。

#### 【0675】

##### 5. 副次的転帰およびデータ分析

副次的転帰には、感染、無増悪生存期間（PFS）時間、全生存期間（OS）時間、サイトメガロウイルス、および免疫再構成が含まれ、各患者について1年間の追跡調査期間を伴う。事象までの時間の転帰の調整されていない分布を、Kaplan および Meier の方法 [Kaplan, E L and Meier, P: Nonparametric estimator from incomplete observations. J. American Statistical Association (1958) 53: 457-481] を使用して推定し、予後共変量およびベト細胞用量レベルに対するそれらの関係を、ベイズの区分的指数生存回帰 [Ibrahim JG, Chen M-H, Sinha D. Bayesian Survival Analysis. Springer, NY (2001)] によって評価する。

10

#### 【0676】

##### データおよびプロトコルの管理

##### プロトコルのコンプライアンス

患者は、最初の28日間、臨床試験の治験責任医師および／またはその代理人によって、臨床的に必要であれば、毒性および生着について毎週監視される。試験責任者は、意見の相違が存在する場合の毒性の最終的な調停者である。

20

#### 【0677】

##### 試験からの除去基準

以下のいずれかについて患者を試験から外す：

- 1) 参加する患者の同意の撤回。
- 2) 注入には不十分なベト細胞産物。
- 3) 疾患の進行。
- 4) 2回目の移植を必要とする移植片不全の発症。
- 5) 処置の1年後。
- 6) 試験責任者によって許容できないと見なされた毒性の増加または予想外のパターン。
- 7) 患者の幸福および最良の利益が損なわれたときの治験責任医師の判断。
- 8) 試験エンドポイントの評価を損なうために試験責任者が検討した不適合
- 9) 死

30

#### 【0678】

##### 報告要件

##### 有害事象の定義

有害事象は、その事象が試験薬に関連すると考えられない場合であっても、試験薬の開始後に生じる任意の望ましくない徴候、症状または医学的状態の出現または悪化である。試験薬を開始する前に存在する医学的状態／疾患は、試験薬を開始した後に悪化する場合にのみ有害事象とみなされる。異常な臨床検査値または検査結果は、それらが臨床的徴候または症状を誘発するか、臨床的に意味があると考えられるか、または治療を必要とする場合にのみ有害事象を構成する。

40

#### 【0679】

##### 有害事象の評価

治験責任医師または医師の指名者は、すべての有害事象に関する情報源の文書を検証および提供し、治験に登録されたすべての対象について各事象の属性を割り当てる責任を負う。

#### 【0680】

有害事象およびプロトコル特異的データを Redcap に入力する。このプロトコルの

50

電子症例報告書には、Redcapが使用される。

【0681】

有害事象（AE）の重症度

抗ベト細胞注入に関連する全グレードのAEを収集する。

【0682】

一般的な格付け：

【0683】

グレード1：軽度：日常的な活動を妨害せず、予防以外の処置を必要としない不快感が存在する。

【0684】

グレード2：中程度：日常的な活動のいくつかの妨害を伴う不快感が存在し、治療を必要とする。

【0685】

グレード3：重度：通常の日常的な活動を中断する不快感であり、一次治療に反応しない。

【0686】

グレード4：生命を脅かす：死亡の即時リスクを表す不快感

【0687】

【表2B】

表2B：推奨する有害事象記録ガイドライン

| 推奨する有害事象記録ガイドライン |             |       |       |       |       |
|------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|
| 関連性              | グレード1       | グレード2 | グレード3 | グレード4 | グレード5 |
| なし               | 第I相         | 第I相   | 第I相   | 第I相   | 第I相   |
|                  |             |       | 第II相  | 第II相  | 第II相  |
|                  |             |       |       | 第III相 | 第III相 |
| おそらくなし           | 第I相         | 第I相   | 第I相   | 第I相   | 第I相   |
|                  |             |       | 第II相  | 第II相  | 第II相  |
|                  |             |       |       | 第III相 | 第III相 |
| 可能性あり            | 第I相<br>第II相 | 第I相   | 第I相   | 第I相   | 第I相   |
|                  |             | 第II相  | 第II相  | 第II相  | 第II相  |
|                  |             | 第III相 | 第III相 | 第III相 | 第III相 |
| おそらくあり           | 第I相<br>第II相 | 第I相   | 第I相   | 第I相   | 第I相   |
|                  |             | 第II相  | 第II相  | 第II相  | 第II相  |
|                  |             | 第III相 | 第III相 | 第III相 | 第III相 |
| 明らかにあり           | 第I相<br>第II相 | 第I相   | 第I相   | 第I相   | 第I相   |
|                  |             | 第II相  | 第II相  | 第II相  | 第II相  |
|                  |             | 第III相 | 第III相 | 第III相 | 第III相 |

【0688】

因果関係評価

この試験の治療計画の調査コンポーネントは、ベト細胞の注入である。

【0689】

ベト細胞の注入に関連する有害事象。注入反応が起こり得る。他の毒性は予想されない。

【0690】

したがって、ベト細胞注入によって引き起こされることが知られている事象およびその

直接的な結果は、因果関係を評価するときに明確に関連すると評価される。

【0691】

ベト細胞注入と移植前処置との間の有害事象の関係を排除することができない場合、その事象はおそらく関連するかまたは関連する可能性があるとしてスコア化される。

【0692】

化学療法として使用される薬物ならびに支持療法として使用される薬物に関連することが知られている事象は、抗ベト細胞注入とは無関係であるとしてスコア化される。

【0693】

治験責任医師は、因果関係評価を決定する際の最後の調停者である。

【0694】

重篤と考えられる有害事象

この試験の目的のために、元の疾患に関連すると考えられる異常な検査所見、ならびに電解質マグネシウムおよび代謝不均衡、尿酸変化、GPT、GOT、LDHおよびアルカリホスファターゼの上昇などの検査パラメータの孤立した変化は有害事象とはみなされず、データベースに収集されない。

【0695】

重篤な有害事象の報告（SAE）

治験責任医師または治験依頼者のいずれかの観点から、有害事象または有害反応の疑いが以下の転帰のいずれかをもたらす場合、有害事象または有害反応の疑いは「重篤」とみなされる。

・死

・生命を脅かす有害な薬物経験－最初の報告者の観点で、その経験が生じるとその有害な経験により患者を直ちに死亡の危険にさらすいずれかの有害な経験。それは、より重度の形態で発生した場合に死を引き起こしたかもしれない有害な経験を含まない。

・入院患者の入院または既存の入院の延長

・正常な生活機能を果たす能力の持続的なまたは著しい無能力化または実質的な崩壊。

・先天異常／出生時欠損。

・死に至らない、生命を脅かさない、または入院を必要としない可能性のある重要な医療事象は、適切な医学的判断に基づいて、患者または対象を危険にさらす可能性があり、この定義に列挙された転帰の1つを防ぐために医学的または外科的介入を必要とする可能性がある場合、重篤な有害薬物経験と見なされ得る。

【0696】

そのような医療事象の例には、緊急治療室または家庭での集中治療を必要とするアレルギー性気管支攣縮、入院患者の入院をもたらさない血液障害または痙攣、または薬物依存もしくは薬物乱用の発生が含まれる（21 CFR 312.32）。

・上で定義した重要な医療事象は、重篤な有害事象とも考えられ得る。任意の重要な医療事象は、治験責任医師またはINDの主催者、INDオフィスによって適切であると考えられる場合、SAEとして報告することができ、報告すべきである。

・プロトコルの実施中に発生し、SAEの定義を満たすすべての事象は、「The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center Institutional Review Board Policy for Investigators on Reporting Unanticipated Adverse Events for Drugs and Devices」に概説されている時間枠および手順に従ってIRBに報告しなければならない。治験実施計画書に別段の記載がない限り、全SAEは、帰属にかかわらず（当該事象に関する知識の5営業日以内に）、予想または予想外のすべてをINDオフィスに報告しなければならない。

・予期せずかつ試験薬に関連する全ての生命を脅かすまたは致命的な事象は、その事象に関する知識の24時間（次の稼働日）以内にINDオフィスの安全プロジェクトマネージャに報告書を提出しなければならない。

10

20

30

40

50

・特に明記しない限り、電子S A Eアプリケーション（e S A E）は、I N D O f f i c eおよびM D A C C I R Bへの安全性報告に利用される。

・重篤な有害事象は、最初のプロトコル特異的介入の時点から、参加者が同意を取り下げない限り、抗ベト細胞の注入後30日まで取得される。重篤な有害事象は、臨床的回復が完了し、実験室試験がベースラインに戻るまで、事象の進行が安定化するまで、または事象の許容可能な解消が得られるまで、追跡されなければならない。

・さらに、試験の治療に関連する30日間の期間後に発生するいずれかの重篤な有害事象は、I N D オフィスに報告しなければならない。

#### 【0697】

背景薬物情報

シクロホスファミド

安定性および保存要件：

- ・混合前：室温
- ・混合後：室温で24時間、冷蔵すると6日間安定。

#### 【0698】

通常の投薬範囲：3週間ごとに繰り返される、単回用量として最大 $2000\text{ mg} / \text{m}^2$ 。より少ない用量をより頻繁に与えることができる。最大 $1.5\text{ gm} / \text{m}^2 / \text{d} \times 4$ の用量が、骨髄または末梢血前駆細胞移植と併せて使用され得る。

#### 【0699】

既知の副作用および毒性：骨髄抑制（血小板減少症を超える白血球減少症）、出血性膀胱炎、悪心、嘔吐、脱毛症、ならびにまれな無月経および無精子症。

#### 【0700】

特別な予防策：コピウス尿排出量で毎日2～3リットルの体液で十分に水和することにより、膀胱炎を予防することができる。顕著な腎排泄のため、腎機能不全患者では用量を減少させなければならない。

#### 【0701】

作用機序：シクロホスファミドは古典的な二官能性アルキル化剤と考えられており、主なアルキル化反応はグアニンの7窒素で起こる。シクロホスファミドは、DNA分子を損傷するために肝臓ミクロソーム酵素によって活性化されなければならない。細胞周期を通して活性であるが、薬剤はS期中に最も活性である。

#### 【0702】

ヒト薬理学：シクロホスファミドは経口または静脈内投与することができるが、経口吸収は不完全である（用量の30～60%が便中で回復可能である）。最大血漿レベルは、経口投与から1時間以内に達成される。血漿T-1/2は、4～6.5時間である。静脈内投与量の約60%が24時間以内に尿中に回収され、腎機能不全の患者では投与量の調整が必要である。薬物は、肝臓ミクロソーム酵素によって活性化され、続いて不活性化される。

#### 【0703】

フルダラビン（FU）

類義語（商品名など）：フルダラ

治療分類：フッ素化ヌクレオシド類似体

各バイアルは、50 mgの凍結乾燥薬物を含有し、2 mlの滅菌水を用いて、IV投与のために $25\text{ mg} / \text{ml}$ である溶液に再構成される。

#### 【0704】

医薬データ：溶液用の静脈内粉末：50 mg

#### 【0705】

溶液の調製：各バイアルを2 mlの発熱物質を含まない滅菌水と混合して透明な溶液にし、これはIV投与のみで $25\text{ mg} / \text{ml}$ である。再構成溶液は8時間以内に使用すべきである。

- ・化学療法の取り扱いおよび廃棄に適切な手順を使用する

10

20

30

40

50

## 【0706】

作用機序：フルオロ-*ara*-ATPへのリン酸化後、薬物はDNAに組み込まれ、DNAポリメラーゼアルファ、リボヌクレオチドレダクターゼおよびDNAプライマーゼを阻害し、したがってDNA合成を阻害するようである。

## 【0707】

ヒト安全性および薬理学：活性化化合物の半減期は約10時間であるが、薬理学は完全には理解されていない。腎機能障害患者では排泄が障害される。

## 【0708】

抗胸腺細胞グロブリン（ATG）（チモグロブリン）

治療分類：免疫抑制剤

10

## 【0709】

作用機序：ATGはウサギ抗胸腺細胞グロブリンである。それは、選択的免疫抑制剤の過剰免疫血清の精製された滅菌された主として単量体IgG画分である。リンパ球の数および機能を改変することによって作用すると考えられている。

## 【0710】

薬学的データ：ATGを0.9%NaClで希釈する。ATGは、中心静脈への4時間の注入として静脈内投与される。これは、無色からわずかに乳白光のタンパク質溶液である。ATGは沈殿を引き起こす可能性があるので、デキストロースまたは低塩流体で希釈すべきではない。酸性溶液の注入は、物理的不安定を引き起こす可能性がある。さらなる不適合性または薬物相互作用は知られていないが、ATGを単独で投与することが推奨される。

20

## 【0711】

安定性および保存要件：市販。注入用溶液は1mgのATG／2mlを含む。2℃～8℃の冷蔵庫で保存する（凍結しない）べきである。希釈したATGは24時間安定である。

## 【0712】

既知の副作用：ATGは、任意の細胞株の血球減少、悪寒、発熱、または浮腫を引き起こし得る。血清病様症候群も発症し得る。発疹、掻痒症、蕁麻疹、水疱、および発赤反応、気管支痙攣出血およびアナフィラキシーショックを含む有害反応が報告されている。蘇生装置は、投与中に利用可能であるべきである。アナフィラキシー反応後、注入を再開すべきではない。

30

## 【0713】

Mesna

類似物（商品名など）：Mesnex

治療の分類：出血性膀胱炎阻害剤、抗腫瘍剤

## 【0714】

薬学的データ：100mg／ml注射用溶液、400mg経口錠剤

## 【0715】

通常の投薬範囲：

・シクロホスファミド有害反応、高用量；予防－出血性膀胱炎；予防：0、3、6、9時間およびIV液でのシクロホスファミド用量の40%IV（W／W）。

40

・シクロホスファミド有害反応、低用量；予防－出血性膀胱炎；予防：20mg／kg理想体重、経口で3～4時間毎。

・出血性膀胱炎；予防－イホスファミド有害反応；予防：ボラスIVレジメン、0、4、8時間でのイホスファミド用量（w／w）の20%のIVボラス。

・出血性膀胱炎；予防－イホスファミド有害反応；予防：経口錠剤レジメン、注入時に20%のイホスファミド用量（w／w）のIVボラス、2、6時間で40%のイホスファミド用量の錠剤。

・出血性膀胱炎；予防－イホスファミド有害反応；予防：連続IVレジメン（FDA非承認レジメン）、ボラス用量（総イホスファミド用量の20%）、次いでイホスファミ

50

ド C I V の 40 %。

【0716】

既知の副作用および毒性：一般的な有害作用：疲労、頭痛、悪心、嘔吐および下痢（より高用量（80mg/kg 理想体重）で起こる）。低血圧が起こり得る。

【0717】

特別な注意：I V の m e s n a は、イホスファミドまたはシクロホスファミドの完了後 12～24 時間継続すべきである。

【0718】

禁忌：M e s n a / 他のチオール化合物に対する過敏症。

【0719】

薬物相互作用：ワルファリン

実施例 2

【0720】

抗ウイルスセントラルメモリー C D 8 + ベット細胞の作製

細胞調製物の製造および特性評価情報

【0721】

細胞型および派生

このプロトコルは、2つの別個の幹細胞調製物の収集を必要とする。幹細胞調製物の1つのタイプは、動員されたハプロタイプ一致ドナーに由来し、その一部は、C D 3 4 + 細胞のために選択され、他の部分は、M i l t e n y i C l i n i M A C S（登録商標）デバイスを使用して C D 3 + / C D 1 9 + 細胞が枯渇され、凍結保存される。第2のタイプの調製物は、抗ウイルス性セントラルメモリー C D 8 + ベット T 細胞を産生するための同種異系の非動員末梢血単核（P B M C）細胞である。P B M C を使用して樹状細胞およびメモリーレスポンダー T 細胞（C D 4 - C D 5 6 - C D 4 5 R A -）を生成し、次いで、それらを共培養して抗ウイルスセントラルメモリー C D 8 + ベット細胞（T c m）の産生を刺激する。次いで、T c m 細胞を増殖させ、採取し、注入する。この調製物は、C D 3 4 + 富化細胞からの T 細胞枯渇大量投与ハプロタイプ一致ドナーの注入後に G V H D なしでの生着を達成するために、T c m 細胞の製造および注入において使用される。

【0722】

製造研究所

本発明のいくつかの実施形態の細胞調製物は、M D A C C の幹細胞移植細胞療法研究所（S C T C T）細胞療法研究所（C T L）で処理されている。この施設は、最小限に操作された細胞調製物のための細胞処理研究所と、最小限より多く操作された細胞調製物のための C l a s s i f i e d S u i t e s（クラス I S O 7）の両方を含む。本発明のいくつかの実施形態の細胞調製物は、主にクラス I S O 7 スイートで製造される。C T L には、臨床試験、研究および開発を支援するためのフローサイトメトリーおよび品質管理研究所も含まれる。

【0723】

関連する認定（F A C T、C A P、C L I A）

S C T C T C T L は、F D A（F E I # 0001670014）に登録されており、細胞療法認定協会（F A C T）、米国病理学者協会（C A P）によって認定されており、メディケア・メディケイド・サービスセンター（C M S）によって発行された認定のための臨床検査改善補正（C L I A）証明書を保持している。

【0724】

出発材料

P B M C：このプロトコルには2つの別個の細胞型調製物が必要である。一方の調製物は、抗ウイルスセントラルメモリー C D 8 + ベット T 細胞（T c m）を産生するための同種異系の非動員末梢血単核細胞を含むが、他方は、動員されたハプロタイプ一致末梢血調製物に由来する。両方の調製物を白血球搬出法によって収集する。

【0725】

10

20

30

40

50

T c m細胞を産生するための動員されていない（プライミングされていない）末梢血単核細胞は、移植予定日（0日目）の7日ほど前に収集される。標的白血球搬出法単核細胞収量は $1 \times 10^{10}$ である。C D 3 4<sup>+</sup>富化調製物の注入後、T c m細胞をD + 7に注入する。

#### 【0726】

動員された末梢血細胞を3日間にわたって収集する。1日目および2日目の収集物はC D 3 4<sup>+</sup>の選択をし、凍結保存する。3日目の収集物からC D 3<sup>+</sup> / C D 1 9<sup>+</sup>細胞を枯渇させ、凍結保存する。富化処置の前に複数の収集物をプールすることができる。理想体重1 k gあたり $2 \times 10^6$ のC D 3 4<sup>+</sup>細胞を含有する未改変P B M Cのバックアップ画分を1日目の収集物から採取し、凍結保存する。

10

#### 【0727】

##### プロセスの説明

M D A C Cドナーは、まず、適格性スクリーニングおよび身体検査を含む適合性について評価される。その後、ドナーは同意し、回収の予定が組まれる。標的細胞の番号はプロトコル固有であり、複数の収集が必要な場合がある。収集処置が完了した後、細胞は、温度変動および物理的損傷から細胞を保護するために、プラスチック冷却器にてC T Lのスタッフによって、収穫施設からC T L L a b o r a t o r yに輸送される。次いで、調製物をC T Lに記録する。

#### 【0728】

##### 感染症検査および交差汚染の予防

##### ドナー適格性

すべてのドナーを以下に従ってスクリーニングし、試験する。ドナーは、治療用細胞（P B M C）について7日以内に試験されなければならない。

20

#### 【0729】

##### Z I K Aウイルスドナーのスクリーニング：

ドナーは、以下のリスク因子のいずれかを有する場合、不適格とみなされる。

1. 過去6ヶ月のZ I K V感染の医学的診断。
2. 過去6ヶ月以内に活動性Z I K V感染のあった領域に滞在または移動すること。
3. 上記の項目1または2に列挙された危険因子のいずれかを有することが知られている男性との過去6ヶ月以内の性行為。

30

#### 【0730】

##### 病歴

M D A C Cドナーおよび患者の病歴は、S C T C Tクリニックにおいて、主治医またはその指名者によって決定される。

#### 【0731】

##### 試験リスト

全試験は、利用可能な場合にはF D A承認試験を使用してC L I A認定試験所によって実施される。感染性疾患の検査には、抗H I V - 1 / H I V - 2（D H I V / 1 / 2）、C型肝炎ウイルス抗体（D H C V A B）、抗H T L V I / H T L V I I（D H T L V I / I I）、B型肝炎抗原（D H B S A G）、B型肝炎コア抗体（D H B C A B）、ウエストナイルウイルス-N A T検査（核酸検査によるW N V）、梅毒の血清学的検査（ドナーT P - H AまたはR P R）、抗C M V（ドナーC M V抗体）、シャーガス病、H I V、核酸検査（N A T）によるH C V抗原検査が含まれる。注記：N A T H I V / H C V検査は併用検査である。結果が反応性である場合、識別試験が行われる。

40

#### 【0732】

##### ドナー適格性非決定

適格性が決定されていないドナーから得られた一実施形態によるすべての細胞調製物は、適格性が決定されるまで検疫に保管されなければならない。検疫における細胞調製物は、放出を防ぐために明確に標識されている。適格性判定の前に細胞調製物を放出しなければならない場合、緊急の医学的必要性を文書化しなければならない。これらの細胞調製物

50

は、「感染性物質について評価されていない」および「警告：伝染病の危険性について患者に助言」と標識されなければならない。

【0733】

不適格ドナーからの細胞調製物の放出

不適格なドナーからの1つの実施形態の細胞調製物の放出は、緊急の医学的必要性の文書化および患者の同意を必要とする。細胞調製物は、「警告：伝染病の危険性について患者に助言」を含む「バイオハザード」ラベルでラベル付けされる。スクリーニングおよび試験結果は、細胞調製物に付随し、注入する医師に提供されなければならない。

【0734】

陽性IDM結果を伴う細胞調製物の注入

陽性IDMの結果に関する一実施形態による細胞調製物の注入は、緊急の医学的必要性の文書化および患者の同意を必要とする。細胞調製物は、「警告：伝染病の危険性について患者に助言」を含む「バイオハザード」ラベルでラベル付けされる。スクリーニングおよび試験結果は、細胞調製に付随し、注入医に提供されなければならない。予防的処置およびさらなる患者モニタリングが必要な場合がある。

【0735】

細胞の処置

抗ウイルス性セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベト細胞（Tcm細胞）の作製

【0736】

処置の概要

抗ウイルス性セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベトT細胞を産生するためのプライミングされていない末梢血単核細胞の収集物を、計画された注入日（0日目）の7日前に収集する。ベト細胞を、大量投与T細胞枯渇細胞後D+7に注入する。

【0737】

図1に示すように：

1日目：MNCの単離およびDC成熟

【0738】

PBMCの単離および血栓の洗浄：

一実施形態の非動員白血球除去細胞調製物を、0.5%のヒト血清アルブミン、25%（HSA）を補充したカルシウムおよびマグネシウムを含まないダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）で1：2に希釈する。フィコール処理の前に、細胞数、トリパンブルー（TB）生存率および無菌性のサンプルを得る。MNCは、フィコール密度勾配分離によって単離される。フィコールの後、一実施形態のMNC細胞調製物を、CD14<sup>+</sup>単離の前に手動遠心分離によって2回血小板洗浄し（血栓の洗浄）、洗浄緩衝液で再懸濁する。細胞数およびTB生存率の試料をQC試験のために除去する。

【0739】

フィコール後の血栓の洗浄に続いて、細胞を2つの等しい画分に分割し、それぞれ約500mLまで希釈する。半分はCD14<sup>+</sup>選択による樹状細胞（DC）単離のために処理され、残りの半分（画分I）は翌日のCD8<sup>+</sup>メモリーT細胞富化プロセスのために一晩維持される。

【0740】

画分Iを遠心分離し、T細胞増殖培地（1：100のGlutaMaxeおよび5%ヒトAB血清を補充した高度RPMI1640を含むクリック培地）中に30×10<sup>6</sup>細胞/mLの濃度で再懸濁し、IL-7（30IU/mL）と共に無菌試験用の試料を除去する。次いで、画分Iを組織培養フラスコに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートする。

【0741】

DC単離-CD14<sup>+</sup>単球単離

DC単離画分を遠心分離し、50mLの磁気ビーズ緩衝液（0.6%ACD-Aおよび0.5%の25%HSAを補充したカルシウムおよびマグネシウムを含まないダルベッコ

10

20

30

40

50

リン酸緩衝生理食塩水（DPBS）に再懸濁する。細胞数およびTB生存率用の試料を除去する。

#### 【0742】

DC単離MNC画分をCD14試薬（超常磁性鉄デキストラン粒子にコンジュゲートさせたCD14モノクローナル抗体）でインキュベートする。次いで、細胞を磁気ビーズ緩衝液で洗浄して過剰の試薬を除去する。細胞数、TB生存率、および免疫表現型検査のための試料を除去する。洗浄後、CD14標識細胞を、確立されたSOPあたりXS分離カラムを使用してSuperMACS（商標）IIで処理する。磁気標識細胞（CD14<sup>+</sup>）をカラムによって保持し、CD14陰性細胞を除去する。次いで、CD14<sup>+</sup>細胞をカラムから放出させ、回収する。CD14<sup>+</sup>画分を洗浄し、DC培地（CellGro／1% HSA）に再懸濁し、CD14<sup>-</sup>画分を洗浄し、T細胞増殖培地に再懸濁する。細胞数、TB生存率、および免疫表現型検査のために、各画分からの試料を除去する。次いで、一実施形態のCD14<sup>+</sup>富化細胞調製物をDC成熟工程へと継続し、CD14陰性細胞濃度をIL-7（30 IU／mL）と共にT細胞増殖培地中30×10<sup>6</sup>細胞／mLで調整する。無菌試験用の試料を除去する。次いで、CD14陰性画分を組織培養フラスコに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートする。これらの細胞を翌日、CD8<sup>+</sup>メモリーT細胞富化プロセスのために画分Iと組み合わせる。

10

#### 【0743】

##### DC成熟-CD14<sup>+</sup>単球付着

一実施形態のCD14<sup>+</sup>富化細胞調製物を、IL-4（1000 IU／mL）およびGM-CSF（2000 IU／mL）を補充したDC培地（CellGro／1% HSA）に3×10<sup>6</sup>細胞／mLという細胞の濃度で再懸濁する。無菌試験用の試料を除去する。次いで、細胞懸濁液をCell Factoryプレートに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩16～24時間インキュベートする。

20

#### 【0744】

##### 2日目：メモリー細胞の単離およびDC成熟誘導

#### 【0745】

##### DC成熟誘導

CD14<sup>+</sup>富化細胞の24時間のインキュベーションの後、サイトカイン：IL-4（1000 IU／mL）、GM-CSF（2000 IU／mL）、LPS（40 ng／mL）およびIFN-γ（200 IU／mL）をCell Factoriesに添加して、DCの成熟を誘導する。次いで、細胞をサイトカインで37℃、5%CO<sub>2</sub>で16時間（+／-2時間）インキュベートする。

30

#### 【0746】

##### メモリー細胞の分離

一晩保存した後、画分IおよびCD14陰性画分中の細胞を回収し、混合する。混合したら（T細胞単離TNC画分）、細胞を遠心分離し、CliniMACS（登録商標）／0.5% HSA緩衝液に最小で1：2の比まで再懸濁する。血小板枯渇（血栓の洗浄）を、CliniMACS（登録商標）／0.5% HSAにおける細胞ペレットの遠心分離および再懸濁によって行う。細胞数およびTB生存率用の試料を除去する。

40

#### 【0747】

一実施形態の血小板除去後細胞調製物をIVIgで10～15分間インキュベートする。最初のインキュベーション後、CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>試薬（超常磁性粒子にコンジュゲートしたCD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>抗体）を細胞調製物に添加し、オービタルロテータにて30分間インキュベートする。インキュベーションの最後に、細胞を遠心分離によって洗浄し、細胞ペレットをCliniMACS（登録商標）／0.5% HSA緩衝液に再懸濁して過剰な試薬を除去する。細胞数および免疫表現型決定の試料を除去する。次いで、CD4<sup>+</sup>／CD56<sup>+</sup>／CD45RA<sup>+</sup>標識細胞を、枯渇チューブセットおよび枯渇プログラムを使用してCliniMACS（登録商標）で処理する。この場合、磁気標識細胞（CD4<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>およびCD45RA<sup>+</sup>）

50

がカラムによって保持され、CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>、およびCD45RA<sup>+</sup>陰性細胞がカラムを通過し、CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>枯渇画分（画分II）として回収される。画分IIを洗浄し、T細胞増殖培地に再懸濁する。細胞数、TB生存率、および免疫表現型検査のために、各画分からの試料を除去する。各画分の体積およびTNCが判定されると、陽性画分は破棄され、陰性画分（画分II）はさらに処理される。

#### 【0748】

画分IIの細胞濃度を、IL-7（30IU/mL）と共にT細胞増殖培地で $2 \times 10^6$ 細胞/mLにて調整する。無菌試験用の試料を除去する。画分IIをG-Rex（登録商標）100に播種し、37℃、5%、CO<sub>2</sub>で24時間（+/-2時間）インキュベートする。

#### 【0749】

制限：

1つの試薬キットおよびチューブセットで処理する最大TNCは、より多くの数が検査室長または指定者によって承認されない限り、 $200 \times 10^6$ TNC/mLである。CliniMACS（登録商標）機器の最大負荷容量は300mLである。

#### 【0750】

3日目：成熟DCの採取およびウイルスペプチドの負荷および共培養

#### 【0751】

成熟DC（mDC）の採取

16時間のインキュベーション後、上清を除去し、Cell Factoriesを温かい磁気ビーズ緩衝液で穏やかに洗浄する。洗浄緩衝液および任意の非接着細胞を除去し、mDC上清に添加する。mDC上清および洗浄緩衝液からの試料を、細胞数、TB生存率および免疫表現型検査のために除去する。

#### 【0752】

接着性mDCを剥離し、氷冷磁気ビーズ緩衝液を添加することによってCell Factoriesから回収し、凍結ゲルパック上で30分間放置する。30分後、mDCを回収し、氷冷磁気ビーズ緩衝液でCell Factoriesを1回洗浄する。全mDCが除去されたかどうかを判定するために、Cell Factoriesを顕微鏡で検査する。すべてのmDCが除去されてはいないことが認められた場合、洗浄プロセスを繰り返す。次いで、収集した（接着性の）mDC懸濁液を遠心分離し、洗浄し、磁気ビーズ緩衝液に再懸濁する。接着性mDCからの試料を細胞数TBのために除去する。mDCの体積およびTNCを決定した後、細胞の濃度をペプチド負荷のために $1 \times 10^7$ 細胞/mLに調整する。免疫表現型検査のためのインプロセス試料を除去する。各画分の体積およびTNCが決定されると、mDC上清画分が廃棄され、一実施形態のmDC細胞調製物がさらに処理される。

#### 【0753】

ウイルスペプチドの負荷

mDCを回収した後、計算したペプチベータ（AdV5ヘキソン、HCMV pp65、EBV選択およびBKV LT）を細胞に添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>で1時間インキュベートする。インキュベーション後、ウイルスペプチドを負荷したmDCを洗浄し、磁気ビーズ緩衝液で遠心分離する。次いで、ウイルスペプチドを負荷したmDCをT細胞増殖培地で再懸濁し、X線源を介して30~25Gyを照射する。

#### 【0754】

照射が完了したら、ウイルスペプチドを負荷したmDCを洗浄し、遠心分離し、T細胞増殖培地に再懸濁する。細胞数、TB生存率、免疫表現型検査および無菌性のために試料を除去する。

#### 【0755】

共培養の調製および飢餓段階

画分II（CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>）の24時間のインキュベーション後、細胞をインキュベーターから回収し、遠心分離し、T細胞増殖培地に再懸濁する。細胞数

10

20

30

40

50

、T B 生存率、免疫表現型検査および無菌性のための試料を除去する。次いで、画分 I I からの細胞 (C D 4 - C D 5 6 - C D 4 5 R A -) を洗浄し、I L - 2 1 (1 0 0 I U / m L) と、T 細胞増殖培地で、ウイルスペプチドを負荷した m D C と 5 : 1 (画分 I I 細胞 : 樹状細胞 (D C)) の比で一緒に、 $1 \times 10^6$  細胞 / m L の濃度 (1 0 0 m L / G - R e x (登録商標) 1 0 0) で、G - R e x (登録商標) 1 0 0 に播種する。共培養細胞を 3 7 °C、5 % C O <sub>2</sub> で 3 日間、飢餓期間インキュベートする。

【0 7 5 6】

6 日目：抗ウイルスベト細胞 (T c m) の分化および増殖

【0 7 5 7】

7 2 時間の飢餓段階の後、G - R e x (登録商標) 1 0 0 の上清からの試料を、細胞層を破壊することなく慎重に除去して、培養物の pH およびグルコースレベルを決定する。p H は生理学的範囲 (p H 7 . 2 ~ 7 . 6) にあり、グルコースは少なくとも 5 0 m g / d l であるべきである。I L - 7 (3 0 I U / m L)、I L - 1 5 (1 2 5 I U / m L) および I L - 2 1 (1 0 0 I U / m L) を補充した新鮮な T 細胞増殖培地を各 G - R e x (登録商標) 1 0 0 に培養体積の 5 0 % で添加する。次いで、細胞を 5 % C O <sub>2</sub> 下、3 7 °C でさらに 4 8 時間インキュベートする。このプロセスを培養終了まで 7 2 時間毎に繰り返す。

【0 7 5 8】

細胞を最大 1 2 日間培養する。サイトカインまたはサイトカインのみを含有する新鮮な培地を、p H およびグルコースレベルに応じて 4 8 時間毎に添加する。グルコースレベルが以下の間である場合：

- ・ 1 7 0 m g / d L ~ 1 3 0 m g / d L のグルコース濃度：サイトカイン I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1 のみを培養物に添加する。
- ・ 1 2 9 m g / d L ~ 1 0 0 m g / d L のグルコース濃度：1 0 0 m L (G - R e x (登録商標) 1 0 0 容量の 2 5 %) の新鮮な T 細胞増殖培地 + サイトカイン I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1 を培養物に添加する。
- ・ 9 9 m g / d L ~ 5 0 m g / d L のグルコース濃度：2 0 0 m L (G - R e x (登録商標) 1 0 0 容量の 5 0 %) の新鮮な T 細胞増殖培地 + サイトカイン I L - 7、I L - 1 5、I L - 2 1 を培養物に添加する。

【0 7 5 9】

注記：G - R e x (登録商標) 1 0 0 の最大容量レベルは 4 0 0 m L である。G - R e x (登録商標) 1 0 0 の最大容量に達した場合、培養物の容量を補充する。

【0 7 6 0】

1 2 日目：

1 2 日目に、質管理放出試験のために無菌の試料を得る。

【0 7 6 1】

1 3 日目：培養細胞数の評価

【0 7 6 2】

1 3 日目に、細胞数、T B 生存率および免疫表現型決定試料を T N C の決定のために除去する。

【0 7 6 3】

1 4 日目：

1 4 日目に、サイトカインまたはサイトカインのみを含有する新鮮な培地を、上記のように p H およびグルコースレベルに応じて添加する。培地および / またはサイトカインを添加したら、細胞培養物を 3 7 °C、5 % C O <sub>2</sub> で 2 4 時間 (+ / - 2 時間) インキュベートしてから回収する。

【0 7 6 4】

培養総時間：1 2 日間 (3 日目 ~ 1 5 日目)

【0 7 6 5】

1 5 日目：抗ウイルス C D 8 セントラルメモリー細胞 (T c m) の最終処方および注入

## 【0766】

15日目に、Tcm細胞を目視汚染について検査し、回収し、細胞懸濁培地（Plamalyte-A / 25% HSAの0.5%）で洗浄した。非放出試験：細胞数、TB生存率、無菌性および放出試験：細胞の洗浄前の内毒素およびマイコプラズマのために、試料を除去する。

## 【0767】

一実施形態の細胞調製物を洗浄し、再懸濁した後、細胞数、生存率および免疫表現型検査のための放出試験試料を除去する。細胞数およびTNCの判定の後、1つの実施形態の細胞調製物を、臨床プロトコルにおいて処方された用量に従ってTcm細胞用量になるように、およそ50~100mLの細胞懸濁培地に再懸濁する。放出試験用の試料は、非放出試験としてグラム染色および無菌性について得られる。最終的なTcm細胞調製物は、細胞調製物の放出前の放出基準を満たす。

10

## 【0768】

最終的なTcm細胞は、温度の変動および物理的損傷から細胞調製物を保護するために、プラスチック冷却器内でCTLスタッフによってCTLから患者用フロアに輸送される。CTLスタッフは、注入する人員に細胞調製物を送達および支給する。

## 【0769】

CD34<sup>+</sup>富化細胞の作製

## 【0770】

処置の概要

20

図2に例示されるように、動員された造血前駆細胞（HPC-Aとも称される）が、3日で回収される。理想体重1kgあたり $1 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞を含有する未改変PBMCのバックアップ画分を破棄し、凍結保存する。残りの第1日および第2日の収集物をプールし、CD34<sup>+</sup>を選択し、凍結保存する。3日目の収集物からCD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>細胞を枯渇させ、凍結保存する。すべての画分から回収されたT細胞枯渇幹細胞移植全体における最大T細胞用量は、理想体重1kgあたり $2 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞である。

## 【0771】

両方の手順は、Miltenyi ClinimACS（登録商標）の装置を使用してCTL Core Laboratoryで行われる。CTLは、このデバイスを使用するための十分に確立されたSOPを有しており、複数の臨床試験のための細胞調製物の製造にそれを使用してきた。単一のHPC-A調製物は、細胞数およびスケジューリングに応じて分割またはプールされ得る。一実施形態の細胞調製物は、それぞれの処置の完了時に凍結保存される。

30

## 【0772】

CD34<sup>+</sup>富化プロセス

設定

動員されたHPC-Aの最初の収集日に、0.5%ヒト血清アルブミン（HSA）を含有するClinimACS（登録商標）PBS/EDTA Bufferバッグ（1000mL）を、十分に確立された実験室SOPに従って処理する前に調製する。HPC-A調製物の重量を判定する。HPC-Aの1日目および2日目の試料を以下の試験のために除去する：細胞数、生存率、無菌性、免疫表現型検査。各緩衝液および細胞調製物バッグは、患者の名前、MDACC番号、および調製日でラベル付けされる。残りのPBPC細胞調製物に対してCD34<sup>+</sup>選択処置を実施する前に、1日目の収集物から、理想体重1kgあたり $2 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞のバックアップ画分を除去する。第1日の収集物の残りの細胞を一晩維持し、CD34<sup>+</sup>富化プロセスのための第2日の収集物と共にプールする。

40

## 【0773】

CD34<sup>+</sup>単離

一実施形態のプールされたHPC-A細胞調製物をCD34試薬（超常磁性粒子にコン

50

ジュゲートされたCD34抗体)でインキュベートする。細胞を洗浄して過剰な試薬を除去する。細胞数および免疫表現型決定の試料を除去する。次いで、CD34標識細胞を、CliniMACS(登録商標)チューブセットおよびCD34<sup>+</sup>選択プログラムを使用してCliniMACS(登録商標)上で処理する。この場合、磁気標識細胞(CD34<sup>+</sup>)はカラムに保持され、CD34陰性細胞は除去される。次いで、CD34<sup>+</sup>細胞をカラムから放出させ、回収する。細胞数、生存率、および免疫表現型検査のために、各画分からの試料を除去する。

【0774】

CD34<sup>+</sup>富化細胞調製物は、注入のために凍結保存され得(後述)、または新鮮な細胞として使用され得る(上述)。

【0775】

制限:

1つの試薬キットおよびチューブセットで処理する最大TNCは、より多くの数が検査室長または指定者によって承認されない限り、 $6 \times 10^{10}$ である。CliniMACS(登録商標)機器の最大負荷容量は300mlである。

【0776】

CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>枯渇プロセス

【0777】

設定

0.5%ヒト血清アルブミン(HSA)を含有するCliniMACS(登録商標)PBS/EDTA緩衝液バッグ(1000ml)を、十分に確立された実験室SOPに従って処理する前に調製する。HPC-A細胞調製物の重量を判定する。HPC-Aからの試料を以下の試験のために除去する:細胞数、生存率、無菌性および免疫表現型検査。各緩衝液および細胞調製物バッグは、患者の名前、医療記録番号(MRN)および調製日でラベル付けされる。

【0778】

血小板枯渇

一実施形態のHPC-A細胞調製物は、COBE 2991を使用してCD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>を枯渇させる前に血小板を枯渇させる。細胞がCOBE 2991から除去されると、細胞数のための試料が除去される。次いで、細胞調製物をCD3試薬およびCD19試薬でインキュベートする。

【0779】

CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>の枯渇

一実施形態の血小板枯渇後のHPC-A細胞調製物をIVIgで10~15分間インキュベートする。最初のインキュベーションの後、CD3<sup>+</sup>およびCD19<sup>+</sup>試薬(超常磁性粒子にコンジュゲートしたCD3およびCD19抗体)を細胞調製物に添加し、オービタルロテータ上で30分間インキュベートする。インキュベーションの最後に、細胞をCOBE 2991を使用して洗浄して過剰な試薬を除去する。細胞数および免疫表現型決定の試料を除去する。次いで、CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>標識細胞を、枯渇チューブセットおよび枯渇プログラムを使用してCliniMACS(登録商標)で処理する。この場合、磁気標識細胞(CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>)はカラムによって保持され、CD3およびCD19陰性細胞はカラムを通過し、CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>枯渇画分として回収される。細胞数、生存率、および免疫表現型検査のために、各画分からの試料を除去する。

【0780】

一実施形態のCD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>枯渇細胞調製物は、注入のために凍結保存される(下記で議論されるように)か、または新鮮な細胞として使用され得る(上で論じられているように)。

【0781】

制限事項:1つの試薬キットおよびチューブセットで処理する最大TNCは、より多くの数が検査室長または指定者によって承認されない限り、 $8 \times 10^{10}$ である。

10

20

30

40

50

## 【0782】

2 回目の CD3<sup>+</sup> 枯渇（必須の工程ではなく、必要に応じて使用）

2 × 10<sup>5</sup> CD3 / kg 理想体重を超えて存在する場合、細胞調製物中の CD3 集団をさらに減少させるために、枯渇した CD3<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> に対して CD3 枯渇の第 2 サイクルを実施し得る。細胞数および免疫表現型検査、生存率および無菌性のための試料を各画分から得る。

## 【0783】

あるいは、T 細胞枯渇画分の一部のみの注入が、2 × 10<sup>5</sup> 個を超える CD3 細胞 / kg 理想体重の注入を回避するべく利用される。

## 【0784】

CD34<sup>+</sup> 富化細胞調製物および CD3<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> 枯渇細胞調製物の最終処方化および凍結保存：

## 【0785】

細胞の選択または枯渇およびサンプリングの後、一実施形態の細胞調製物を濃縮し、CTL で検証された手順に従って凍結保存する。細胞調製物の凍結保存の前に、最終的な細胞数、生存率、免疫表現型検査、グラム染色および無菌サンプルを得る。細胞数および TNC の決定の後、一実施形態の細胞調製物を、SOP に従って凍結培地（50% Plasma-Lyte A、7.5% DMSO、35% HSA 25%）中で凍結保存する。CD34<sup>+</sup> 富化細胞または CD3<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> 枯渇細胞を含有するバッグを、制御された速度フリーザーで凍結し、液体窒素フリーザーで気相で保存する。

## 【0786】

注記：最終的な細胞調製物は、細胞の解凍がさらなる操作なしにベッドサイドで行われるので、凍結保存前の調製物である。

## 【0787】

細胞調製物の放出および注入

注入の日に、CD34<sup>+</sup> 富化細胞および / または CD3<sup>+</sup> / CD19<sup>+</sup> 枯渇細胞調製物は、CTL スタッフによって患者のフロアに送達され、注入要員に支給される。最終的な細胞調製物は、細胞調製物の放出前にロット放出基準を満たす。次いで、これらの細胞をプロトコル特異的用量に従って患者に注入する。注目すべきことに、凍結保存が使用される場合、細胞はフロアで解凍され、標準的な操作手順に従って注入人員に放出される。また、凍結保存が使用される場合、最終的な細胞調製物は、約 2 インチの液体窒素で満たされたシームレスな金属インサートを備えた承認された発泡スチロール LN2 輸送容器で、CTL スタッフによって、CTL からフロアに輸送される。

## 【0788】

すべての細胞調製試験はプロトコル特異的であり、SOP に従って実施される。

## 【0789】

試薬

10

20

30

40

50

## 【表 3】

表 3：試薬のリスト、メーカー、ステータス（ライセンス、分析証明書（C o A）、またはマスターファイル（MF））

| 試薬                                                                      | 供給者                                                  | 規制状況                  |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------|
| F i c o l l - P a q u e（商標）<br>プレミアム                                    | G E H e l t h c a r e<br>B i o - S c i e n c e s A B | 分析証明書                 |
| D e n d r i t i c C e l l<br>M e d i u m (D C) - C e l l G r o          | C e l l G e n i x                                    | 分析証明書                 |
| メルカプトエタノール、L-グルタミン<br>を含まないクリック培地（EHAA）                                 | I r v i n e<br>S c i e n t i f i c                   | 分析証明書                 |
| A d v a n c e d R P M I 1 6 4 0                                         | G i b c o / L i f e<br>T e c h n o l o g i e s       | 分析証明書                 |
| クエン酸デキストロース-処方 A<br>（A C D - A）                                         | F e n w a l l                                        | ライセンス対象製品インサート        |
| ヒト血清 A B                                                                | G e m i n i<br>B i o - P r o d u c t s               | 分析証明書                 |
| 血漿溶解物 A                                                                 | B a x t e r                                          | ライセンス対象製品インサート        |
| ヒト血清アルブミン（H S A）、2 5 %                                                  | B a x t e r                                          | ライセンス対象製品インサート        |
| ジメチルスルホキシド（D M S O）                                                     | O r i G e n<br>B i o m e d i c a l                   | 分析証明書                 |
| ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水<br>（D P B S）C a <sup>+2</sup> およびMg <sup>+2</sup> を含まない | M e d i a t e c h ,<br>I n c . / C o r n i n g       | 分析証明書                 |
| M A C S G M P ペプチド化剤 A d V 5<br>ヘキソン                                    | M i l t e n y i B i o t e c                          | 分析証明書                 |
| M A C S G M P ペプチド化剤 H C M V<br>p p 6 5                                 | M i l t e n y i B i o t e c                          | 分析証明書                 |
| M A C S G M P ペプチド化剤 B K V<br>L T                                       | M i l t e n y i B i o t e c                          | 分析証明書                 |
| M A C S G M P P e p t i v a t o r<br>E B V S e l e c t                  | M i l t e n y i B i o t e c                          | 分析証明書                 |
| C l i n i M A C S（登録商標）<br>C D 4 試薬システム                                 | M i l t e n y i B i o t e c                          | クロスリファレンスレター<br>分析証明書 |
| C l i n i M A C S（登録商標）<br>C D 5 6 試薬システム                               | M i l t e n y i B i o t e c                          | クロスリファレンスレター<br>分析証明書 |
| C l i n i M A C S（登録商標）<br>C D 4 5 R A 試薬システム                           | M i l t e n y i B i o t e c                          | クロスリファレンスレター<br>分析証明書 |
| C l i n i M A C S（登録商標）<br>C D 1 4 試薬システム                               | M i l t e n y i B i o t e c                          | クロスリファレンスレター<br>分析証明書 |
| C l i n i M A C S（登録商標）<br>C D 3 4 試薬システム                               | M i l t e n y i B i o t e c                          | クロスリファレンスレター<br>分析証明書 |
| C l i n i M A C S（登録商標）<br>C D 3 試薬システム                                 | M i l t e n y i B i o t e c                          | クロスリファレンスレター<br>分析証明書 |
| C l i n i M A C S（登録商標）<br>C D 1 9 試薬システム                               | M i l t e n y i B i o t e c                          | クロスリファレンスレター<br>分析証明書 |
| C l i n i M A C S（登録商標）<br>P B S / E D T A 緩衝液                          | M i l t e n y i B i o t e c                          | クロスリファレンスレター<br>分析証明書 |

10

20

30

40

50

| 試薬                                 | 供給者                         | 規制状況           |
|------------------------------------|-----------------------------|----------------|
| L P S V a c c i G r a d e          | I n v i v o G e n           | 分析証明書          |
| インターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ )       | C e l l G e n i x           | 分析証明書          |
| インターロイキン-4 (IL-4)                  | C e l l G e n i x           | 分析証明書          |
| インターロイキン-7 (IL-7)                  | C e l l G e n i x           | 分析証明書          |
| インターロイキン-15 (IL-15)                | C e l l G e n i x           | 分析証明書          |
| インターロイキン-21 (IL-21)                | C e l l G e n i x           | 分析証明書          |
| G M - C S F                        | C e l l G e n i x           | 分析証明書          |
| G a m m a g a r d                  | B a x t e r                 | ライセンス対象製品インサート |
| X S カラム                            | M i l t e n y i B i o t e c | 分析証明書          |
| C l i n i M A C S (登録商標) 枯渇チューブセット | M i l t e n y i B i o t e c | 分析証明書          |

表 3 (続き)

## 【0790】

試薬はプロトコル固有であり、製造業者の推奨に従って保存される。すべての試薬は、細胞調製製造の開始前に適格である。試薬の在庫管理には、受領の文書化、試薬の文書化レビュー、在庫管理者による追跡が含まれる。必要に応じて品質保証部によるレビュー・リリースを行う。すべてのFDA承認試薬の文書は、MDACC Pharmacyを通じて入手可能である。未承認の試薬に関する分析証明書および相互参照証明書は、供給者から入手しなければならない。MSDSは、Laboratory Safety Policyの一部として管理される。

## 【0791】

## 認定プログラム

試薬は、臨床製剤の製造の開始前に適格でなければならない。これは、典型的には、製造に関与する手順の検証中に達成される。試薬および供給元は、以前の臨床プロトコルの一部として以前に認定されていてもよい。

## 【0792】

## 最終細胞調製物からの試薬の除去

試薬を最終細胞調製物から除去する。これは、様々な細胞洗浄、濃縮および再懸濁手順を使用して達成される。

## 【0793】

## 細胞調製物の試験

## 微生物学的試験

## 無菌試験：

BD BACTEC:MDACC Department of Laboratory Medicineは、この自動微生物検出システムを使用してインプロセスおよび最終細胞調製試料を試験する。すべての試験を14日間または細胞調製物が陽性になるまで行う。試験結果は、細胞調製物の放出前に得られる。

## 【0794】

## 試験するサンプル：

試験の回数およびタイミングは、細胞に対して行われる操作の量、培養時間、および試験要件の要因である。試験される試料は、試験の種類に最適でなければならない。培養培地または他の緩衝液の一部が無菌アッセイを妨害しないことを保証するために、サンプル条件を製造開始前に検証する。0.5 ml / 試験の最小試料体積が必要である。

## 【0795】

## 無菌のサンプリングポイント：

抗ウイルスセントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベトT細胞 (Tcm) の増殖

1. 1日目：HPC-A-プレフィコール
2. 1日目：HPC-A-フィコール後画分I
3. 1日目：CD14<sup>+</sup>単離-陰性画分（一晚）
4. 1日目：CD14<sup>+</sup>単離-サイトカインによる陽性画分（一晚）
5. 2日目：CD4<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>枯渇-陰性画分（画分II）（一晚）
6. 3日目：ウイルス負荷DC-照射後
7. 3日目：画分II-一晚収穫
8. 3日目：共培養-画分IIおよびウイルス負荷DC
9. 12日目：共培養-12日目
10. 13日目：共培養-13日目
11. 15日目：共培養-収穫後
12. 15日目：最終Tcm細胞
- CD34<sup>+</sup>大量投与
1. HPC-A-収穫
2. CD34<sup>+</sup>富化細胞-最終細胞調製物（凍結前）または使用した新鮮な細胞
3. CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>枯渇細胞-最終細胞調製物（凍結前）または使用した新鮮な細胞

10

胞

## 【0796】

## マイコプラズマ試験

一実施形態の凍結保存Tcm細胞調製物を、マイコプラズマの存在について試験する。Tcm細胞調製物（凍結保存）を、Gel Endpoint Polymerase（PCR）ベースのアッセイによって試験する。PCRアッセイは、認可された参照検査室によって実施される。PCRに基づくアッセイに加えて、最終的なTcm細胞も、承認された生化学的マイコプラズマ迅速検出試験（MycAlert, Lonza Walkersville, Inc.）を用いて試験する。サンプルは、細胞洗浄前の採取時に採取され、細胞および培地の両方を含む。サンプル容量は最低0.5mlである。マイコプラズマPCRに基づくアッセイを実施しながら、MycAlertの結果を暫定的な試験放出基準として使用する。マイコプラズマPCRの結果は、放出基準として使用されず、陽性の臨床転帰に関連する基準を特定するのに助けるために臨床応答と共に分析される。マイコプラズマの結果は陰性でなければならない。

20

30

## 【0797】

## 製剤注入後に受けた陽性滅菌結果

細胞調製物が注入された後、培養細胞調製物に対する14日間の無菌性またはマイコプラズマの結果が陽性に戻った場合、検査室長、技術部長、医療部長、実験室品質保証部、原理研究員、主治医および治験新薬（IND）のオフィスーまたは臨床研究の施設スポンサー／VPに通知する。品質保証部は、いずれかの是正および／または予防措置を特定するための調査を行う。陽性無菌性試験のための調査および提案された補正には、微生物の同定および抗菌剤感受性試験；汚染が導入され得る工程を決定するために細胞調製物を収集および処理するための現在の処置の評価；将来の無菌性の逸脱を防止するのに役立つ処置の変更の開発；および処置に対するそのような変更が滅菌細胞調製物を生成することを確実にするための適切な試験の実施が含まれる。主治医は、患者への通知、モニタリングおよび処置を担当する。治験責任医師は、逸脱および有害事象を適切な規制機関（FDA、IRB）に通知する責任を負う。また、無菌性の不良、原因調査結果、いずれかの是正処置を報告する（適時に、例えば陽性培養試験結果の最初の受領後30暦日以内に、INDに提出される情報補正において）。

40

## 【0798】

## グラム染色

迅速な微生物検査が必要とされる状況では、グラム染色がMDACC Laboratory Medicine Departmentによって行われる。最低0.5mlのサンプルが必要である。Tcm細胞、CD34<sup>+</sup>富化細胞調製物およびCD3<sup>+</sup>CD19

50

+ 枯渇細胞調製物を試験し、結果は新鮮な注入のための放出基準の一部である。細胞調製物は、生物が認められてはならない。

#### 【0799】

##### 識別情報

すべてのCTL細胞調製物は、正確な同定を確実にし、取り違えを防止するために標識され、保存される。すべての細胞調製物には、固有の識別子番号が割り当てられる。細胞調製物の標識化および回収の間の重要な工程は、監視員による検証を必要とする。

#### 【0800】

CD34<sup>+</sup>富化細胞調製物およびCD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>枯渇細胞調製物：フローサイトメトリーはまた、患者に注入して戻される異なる細胞集団を同定するために使用される。CD34<sup>+</sup>およびCD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>の決定に加えて、以下のサブセットマーカーを評価する：CD3、CD4、CD8、CD16/CD56、CD19、CD14、CD45RO、およびCD37。

10

#### 【0801】

Tcm細胞調製物：フローサイトメトリーはまた、患者に注入して戻される異なる細胞集団を同定するために使用される。CD45、CD3、CD8、CD62LおよびCD45ROの決定に加えて、以下のサブセットマーカーが評価される：CD4、CD56、CD16、CD95、およびCD45RA。

#### 【0802】

##### 純度

フローサイトメトリーを複数の時点で使用して、細胞表現型を決定する。CD45<sup>+</sup>細胞のCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>のTcm細胞調製フローサイトメトリーマーカーは、 $\geq 30\%$ でなければならない。

20

#### 【0803】

CD34<sup>+</sup>富化調製物およびCD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>枯渇調製物の両方の合計は、理想体重1kgあたり $6 \times 10^6$ CD34<sup>+</sup>細胞を超える最小許容細胞用量を有しなければならない。他のすべての免疫表現型決定データは、放出基準として使用されず、陽性臨床転帰に関連し得る適切な効力アッセイを特定するのに助けるために臨床応答と共に分析される。

#### 【0804】

##### 効力

フローサイトメトリーによる免疫表現型検査を使用して、上記純度の節で述べたマーカーを含むいくつかの潜在的な効力のマーカーを測定する。他の免疫表現型決定データはいずれも放出基準として使用されないが、陽性臨床転帰に関連する基準を特定するのに助けるために臨床応答と共に分析される。

30

#### 【0805】

効力アッセイは、この第I相を通して開発され、第III相試験の開始前に確立される。

#### 【0806】

##### 内毒素

内毒素レベルは、カプトガニ血球抽出液(LAL)アッセイを使用してCTL品質管理研究所において決定される。この方法は、臨床使用前に試験される全ての細胞/培地の組み合わせについて検証される。最終的なTcm細胞調製物を試験し、結果は放出基準の一部である。最低0.5mLの試料が必要である。内毒素レベルは、レシピエントの理想体重の5EU/kg未満でなければならない。

40

#### 【0807】

##### 目視検査

全細胞調製物を注入前に目視検査する。細胞調製物は、汚染の証拠を有してはならない。

#### 【0808】

##### 生存率

50

生存率は、トリパンプルー（TB）アッセイまたはフローサイトメトリー（7AAD）のいずれかを使用することによってCTLによって決定することができる。最終的なTcm細胞、CD34<sup>+</sup>富化細胞調製物およびCD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>枯渇調製物は、 $\geq 70\%$ の7AAD生存率を有しなければならない。トリパンプルー生存率は、プロセス中のインプロセス試験として使用することができる。

#### 【0809】

##### 細胞の用量

CTL細胞の用量を、細胞の計数およびフローサイトメトリーによる免疫表現型決定を使用して判定する。

#### 【0810】

最終Tcm細胞調製用量は、対象が臨床試験に登録されているCD8<sup>+</sup>用量レベルによって決定される。過剰な細胞は、細胞の機能、表現型研究および凍結保存のための相関研究に使用され得る。データは、放出基準として使用されず、陽性の臨床転帰に関連する基準を特定するのを助けるために臨床応答と共に分析される。Tcm細胞調製物CD8<sup>+</sup>用量が、理想体重1kgあたり $2.5 \times 10^6$ のCD8<sup>+</sup>細胞の計画された用量レベル1（用量レベル1）未満である場合、またはCD8<sup>+</sup>細胞が放出基準を満たさない場合、これらの細胞は注入されない。代わりに、バックアップPBPC+T細胞枯渇PBPCを注入して「標準的なPBPC移植」を再構成し、患者はプロトコルごとに標準的なケア準備レジメンを受ける。Tcm細胞が放出基準を満たすが、CD8<sup>+</sup>細胞用量が、理想体重1kgあたり $5 \times 10^6$ のCD8<sup>+</sup>細胞の用量レベル2の標的細胞用量レベル未満である場合、理想体重1kgあたり $2.6 \sim 5 \times 10^6$ のCD8<sup>+</sup>細胞が適切であると考えられ、用量レベル2と考えられる。理想体重1kgあたり $10 \times 10^6$ のCD8<sup>+</sup>細胞の標的用量の用量レベル3の場合、理想体重1kgあたり $5.1 \sim 10 \times 10^6$ のCD8<sup>+</sup>細胞が適切であると考えられ、用量レベル3と考えられる。

#### 【0811】

CD34<sup>+</sup>富化調製物およびCD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>枯渇調製物の両方の合計は、理想体重1kgあたり $6 \times 10^6$ のCD34<sup>+</sup>細胞の最小許容細胞用量を有しなければならない、理想体重1kgあたり $2 \times 10^5$ のCD3<sup>+</sup>細胞として放出基準によって定義されるT細胞用量の限界を超えてはならない。最終的なCD34<sup>+</sup>富化細胞調製物用量は、陽性臨床転帰に関連する基準を特定するのを助けるために、臨床応答と共に監視および分析される。

#### 【0812】

##### アリコート保持

すべてのQCチューブを1週間保持する；しかし、これらの試料の有用性は、ほとんどのサンプルについて48時間後に急速に低下する。すべての凍結細胞調製物はまた、凍結保存時に同時に保存される参照バイアルを有する。

#### 【0813】

##### 細胞調製放出基準試験および追加試験

#### 【0814】

10

20

30

40

50

## 【表 4】

表 4 : T c m 調製ロット放出試験および詳述

| 試験                    | 詳述                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 生存率 (7AAD)            | $\geq 70\%$                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 目視検査                  | 汚染の証拠なし                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| グラム染色                 | 生物は認められない                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 無菌 (12日目)             | 当該の日まで陰性                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| マイコプラズマ (MycoAlert)   | 陰性                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 内毒素 (LAL)             | $< 5 \text{ EU/Kg}$ の理想体重                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 免疫表現型検査               | $\text{CD}45^+$ 細胞の $\geq 30\%$ の $\text{CD}3^+\text{CD}8^+\text{CD}62\text{L}^+\text{CD}45\text{RO}^+7\text{AAD}^-$                                                                                                                                                                                       |
| CD8 <sup>+</sup> 細胞用量 | 用量1 : $2.5 \times 10^6$ の $\text{CD}8^+/\text{kg}$ 理想体重<br>用量2 : $\leq 5 \times 10^6$ の $\text{CD}8^+/\text{kg}$ 理想体重、しかし $\geq 2.6 \times 10^6$ の $\text{CD}8^+/\text{kg}$ 理想体重<br>用量3 : $\leq 10 \times 10^6$ の $\text{CD}8^+/\text{kg}$ 理想体重、しかし $\geq 5.1 \times 10^6$ の $\text{CD}8^+/\text{kg}$ 理想体重 |

10

## 【0815】

20

## 【表 5】

表 5 : CD34<sup>+</sup>富化調製ロット放出試験および詳述

| 試験 :                    | 詳述 :                                                  |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|
| 無菌                      | 14日間増殖なし                                              |
| グラム染色                   | 生物は認められない                                             |
| 生存率 (最終調製)              | $\geq 70\%$                                           |
| 総CD3 <sup>+</sup> 細胞用量  | 理想体重1kgあたり $< 2 \times 10^5$ のCD3 <sup>+</sup> 細胞     |
| 総CD34 <sup>+</sup> 細胞用量 | 理想体重1kgあたり $\geq 5 \times 10^6$ のCD34 <sup>+</sup> 細胞 |

30

## 【0816】

## 【表 6】

表 6 : 追加のインプロセス試験 (非放出)

| 試験 :          | 詳述       |
|---------------|----------|
| 無菌            | 14日間増殖なし |
| 免疫表現型         | 情報のみ     |
| TNC           | 情報のみ     |
| マイコプラズマ (PCR) | 陰性       |

40

## 実施例 3

## 【0817】

## ATG非存在下での処置レジメン

## 材料および実験条件

## 宿主非反応性ドナー抗第三者細胞の調製

抗第三者Tcm細胞を以前に記載されたように調製した [Ophir E. et al., Blood. 2013, 121:1220]。簡潔には、ドナーマウスの脾細胞を、

50

サイトカイン欠乏下で、照射された第三者脾細胞に対して60時間培養した。続いて、磁気粒子(BD Pharmingen)を用いてCD8細胞を陽性選択し、Ag不含有環境下で培養した。rhIL-15(20ng/mL; R&D Systems)を2日毎に加えた。培養終了時(16日目)に精製集団を得るために、TcmsをCD62L発現について陽性選択し(磁気活性化細胞選別[MACS(登録商標)細胞分離、Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、ドイツ])、細胞をFACS分析のために回収した。

【0818】

造血幹細胞の調製

Balb/cヌードマウス(10~12週齢)から長骨を採取した。骨を粉碎して単細胞懸濁液に到達させることによって骨髓を抽出した。骨髓を計数し、正しい濃度にし、次いでマウスの尾静脈にIVで注射した。

【0819】

キメラ現象分析

キメラ現象をフローサイトメトリーによって測定した。後眼窩出血によって末梢血を採取し、細胞をFicoll-Plus(Amersham Pharmacia Biotech, AB)で分画し、各マウスの単離された単核細胞をドナーおよび宿主表面マーカーに対する直接免疫蛍光によって染色した。

【0820】

細胞内染色によって決定されるTcm細胞の抗ウイルス活性

ベト-Tcm細胞を、プレフェルジンA(eBioscience)の存在下、37℃、5%CO<sub>2</sub>で6時間、それぞれのウイルスペプチド混合物(EBV、CMV、Adeno、BKV)と共培養した。細胞を固定し、透過処理し(Invitrogen Fix & Permセット)、CD45、CD3、CD8、IFN-γおよびTNF-α(BD)について免疫染色した。陽性対照には、PMA/イオノマイシンによるTCR非依存性刺激が含まれた。細胞をCD45<sup>+</sup>/FSCリンパ球ゲートおよびCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>でゲートした。

【0821】

結果

本発明者らは以前に、ATG、3GY TBIおよびフルダラビンによるT細胞減量による骨髓非破壊的前処置の後に、T細胞枯渇大量投与ハプロ-HCTを移植後CYと組み合わせること(図5)が、GVHDの非存在下での永続的な生着を可能にし得ることを実証している(データは示さず)。

【0822】

ATGなどの抗T細胞抗体によるT細胞減量が、ウイルス感染のリスクの増強を含む顕著な毒性に関連することを考慮して、7日目に注入されたセントラルメモリーベト細胞の使用によってT細胞減量を置き換える可能性を調べた。

【0823】

図6に示されるように、T細胞減量の非存在下での亜致死的TBI(3.5GY)の後のT細胞枯渇化大量投与ハプロ-HCTをCYと移植後に組み合わせることにより、移植拒絶がもたらされ、キメラ現象の証拠が何らもたらされなかった。対照的に、7日目のセントラルメモリーCD8<sup>+</sup>ベト細胞の注入は、顕著なドナータイプのキメラ現象を可能にした。

【0824】

これらの結果は、T細胞減量の代わりに7日目のベト細胞投与を、ATGなどの薬剤で使用するための概念実証を提供する。そのようなプロトコルには、図7に示されるように、亜致死的TBI(例えば、3GY)、フルダラビン、大量投与T細胞枯渇造血幹細胞および移植後のCYが含まれる。

【0825】

さらに、ベト細胞産物は、IFN-γおよびTNF-α染色によって例示されるように

、ウイルスペプチドの混合物、すなわちEBV、CMV、Adeno、BKVに対して向けられる抗ウイルス活性を独自の示した（図8A～C）。

【0826】

本発明をその特定の実施形態に関連して説明したが、多くの代替、修正、および変形が当業者には明らかであることは明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および広い範囲内にあるそのようなすべての代替、修正、および変形を包含することが意図されている。

【0827】

本明細書で言及されるすべての出版物、特許、および特許出願は、個々の出版物、特許、または特許出願が本明細書内により組み込まれることが具体的かつ個別に示されるのと同程度に、参照により全体が本明細書に組み込まれる。さらに、本出願における任意の参考文献の引用または識別は、そのような参考文献が本発明の先行技術として利用可能であることの承認として解釈されるべきではない。セクションの見出しが使用される限り、それらは必ずしも限定するものと解釈されるべきではない。さらに、本願の任意の優先権の書類は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【図面】

【図1】

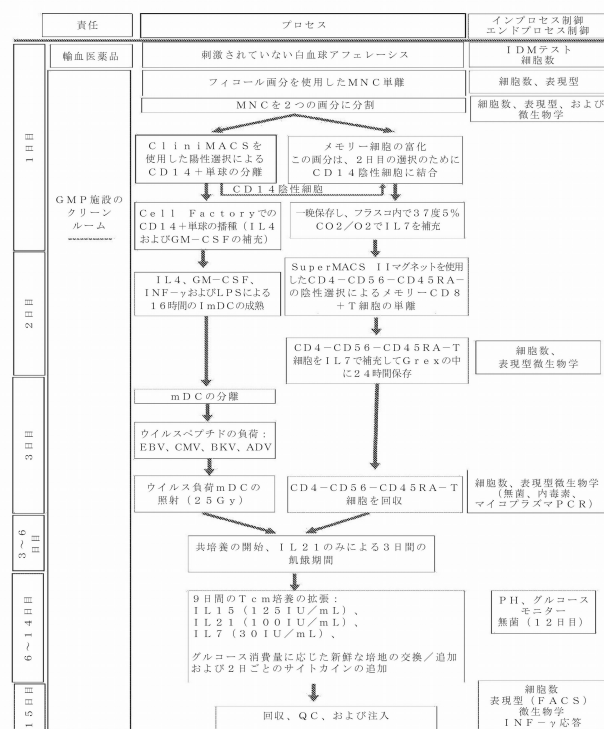


図1

【図2】

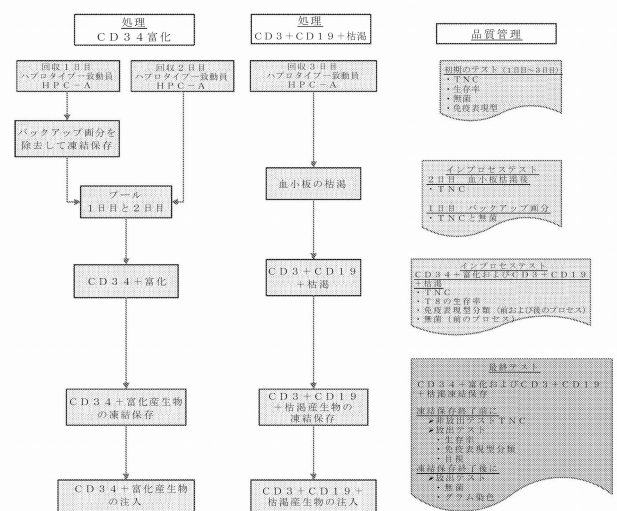


図2

10

20

30

40

50

【図 3】

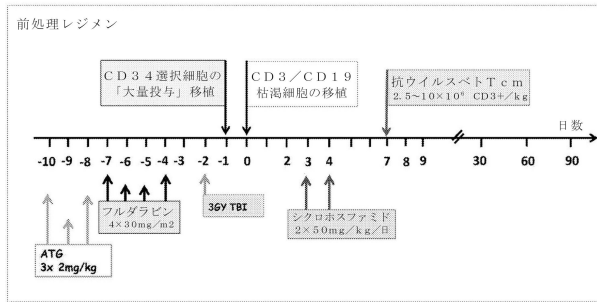


図 3

【図 4】

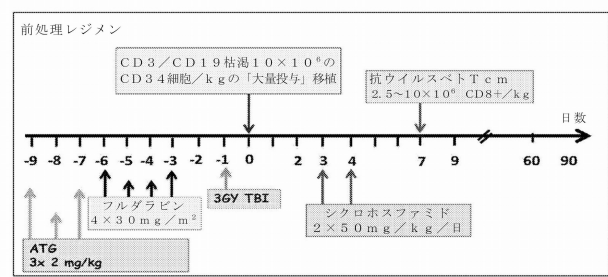


図 4

10

【図 5】

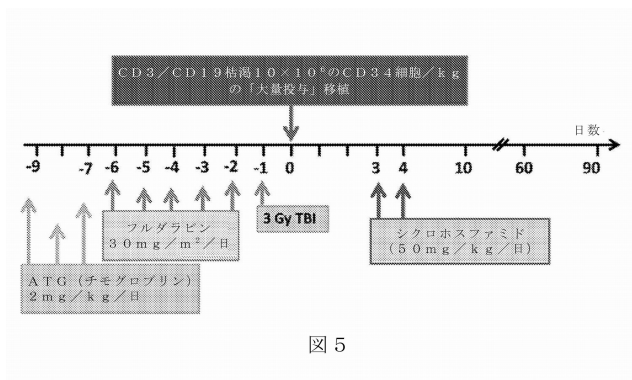


図 5

【図 6】

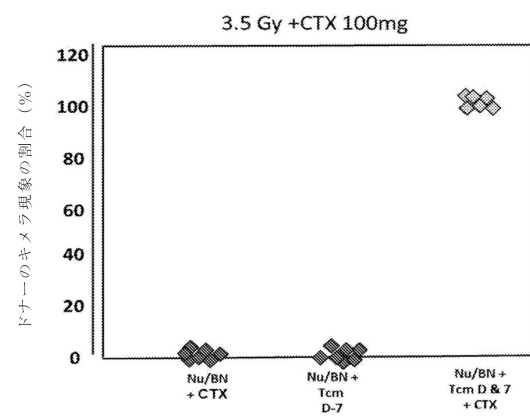


図 6

20

30

40

50

【図 7】

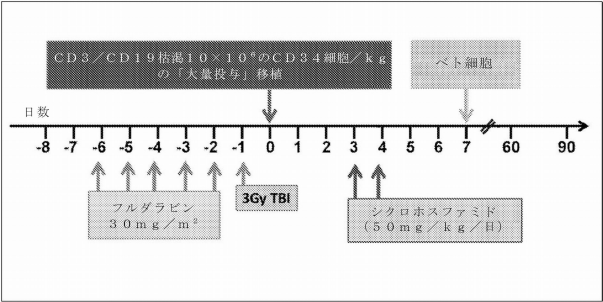
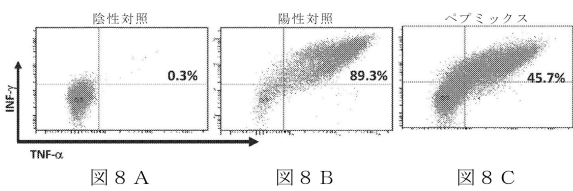


図 7

【図 8 A - 8 B - 8 C】



10

20

30

40

50

## 【国際調査報告】

PCT/IL2020/050865 04.03.2021

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL 20/50865

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 35/17, A61K 35/28 (2021.01)

CPC - C12N 5/0637, C12N 5/0636, C12N 2501/2307, C12N 2501/2315, C12N 2501/2321

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | WO 2013/035099 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD) 14 March 2013 (14.03.2013) pg 21, ln 5-8; pg 23, ln 24-25; pg 57, ln 22-29; pg 4, ln 20-21; pg 4, ln 22-25; pg 24, ln 7-8; pg 20, ln 27-30 | 1-4                   |
| Y         | US 2013/0130386 A1 (PARK et al.) 23 May 2013 (23.05.2013) para [0104]                                                                                                                                | 1, 3, 4               |
| Y         | US 2018/0207272 A1 (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD) 26 July 2018 (26.07.2018) para [0185] [0223]                                                                                              | 2-4                   |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 2021

Date of mailing of the international search report

04 MAR 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

PCT/IL2020/050865 04.03.2021

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL 20/50865

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-53  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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

**Remark on Protest**

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

## 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)

|                |                         |                |               |
|----------------|-------------------------|----------------|---------------|
| <b>A 6 1 P</b> | <b>35/04 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 P</b> | <b>35/04</b>  |
| <b>A 6 1 P</b> | <b>35/02 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 P</b> | <b>35/02</b>  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>47/68 (2017.01)</b>  | <b>A 6 1 K</b> | <b>47/68</b>  |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>31/675 (2006.01)</b> | <b>A 6 1 K</b> | <b>31/675</b> |
| <b>A 6 1 K</b> | <b>45/00 (2006.01)</b>  | <b>A 6 1 K</b> | <b>45/00</b>  |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>5/0784(2010.01)</b>  | <b>C 1 2 N</b> | <b>5/0784</b> |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>5/10 (2006.01)</b>   | <b>C 1 2 N</b> | <b>5/10</b>   |

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

ーシティ オブ テキサス システム

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM  
アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州, オースティン, ウェスト 7 番 ストリート 2 1 0  
2 1 0 West 7 th Street Austin, Texas 7 8 7 0 1 U. S. A.

(74)代理人 100133503

弁理士 関口 一哉

(72)発明者 ライズナー, イェアー

イスラエル国 6 8 0 3 7 7 5 テルアビブーヤフォ, マザルカシャト ストリート 4

(72)発明者 バハールールースティヒ, エスター

イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト, ピー. オー. ボックス 9 5, アット ザ ワイツマ  
ン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カン  
パニー リミテッド気付

(72)発明者 ラスク, アサッフ

イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト, ピー. オー. ボックス 9 5, アット ザ ワイツマ  
ン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カン  
パニー リミテッド気付

(72)発明者 オルーゲバ, ノガ

イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト, ピー. オー. ボックス 9 5, アット ザ ワイツマ  
ン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カン  
パニー リミテッド気付

(72)発明者 ギドロン ブドフスキー, ロテム

イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト, ピー. オー. ボックス 9 5, アット ザ ワイツマ  
ン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カン  
パニー リミテッド気付

(72)発明者 シドリク ムスカテル, ラケフェット

イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト, ピー. オー. ボックス 9 5, アット ザ ワイツマ  
ン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カン  
パニー リミテッド気付

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AA94X AA94Y AB01 AC14 AC20 BA01 BA25 BA30

BB15 BB19 BB40 BD39 CA24 CA44

4C076 AA95 CC27 EE59

4C084 AA19 NA05 ZB081 ZB082 ZB261 ZB262 ZB271 ZC751

4C086 AA01 AA02 DA35 MA01 MA02 MA04 NA05 ZB08 ZB26 ZB27  
ZC75

4C087 AA01 AA02 BB63 BB64 BB65 DA32 MA02 NA14 ZB08 ZB26  
ZB27 ZC75