

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和4年11月7日(2022.11.7)

【国際公開番号】WO2020/089343

【公表番号】特表2022-512872(P2022-512872A)

【公表日】令和4年2月7日(2022.2.7)

【年通号数】公開公報(特許)2022-022

【出願番号】特願2021-523658(P2021-523658)

【国際特許分類】

10

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 1/02(2006.01)

C 1 2 N 15/13(2006.01)

C 1 2 N 15/62(2006.01)

C 0 7 K 16/28(2006.01)

C 0 7 K 16/46(2006.01)

C 0 7 K 19/00(2006.01)

C 1 2 N 11/06(2006.01)

C 1 2 N 11/08(2020.01)

20

C 1 2 N 11/10(2006.01)

C 1 2 N 11/12(2006.01)

C 1 2 N 11/14(2006.01)

C 1 2 M 1/00(2006.01)

C 1 2 N 15/867(2006.01)

C 1 2 N 15/86(2006.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 K 35/17(2015.01)

A 6 1 P 35/04(2006.01)

A 6 1 P 37/06(2006.01)

30

A 6 1 P 29/00(2006.01)

A 6 1 P 31/04(2006.01)

A 6 1 P 31/12(2006.01)

C 1 2 P 21/08(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0783 Z N A

C 1 2 N 1/02

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/62 Z

40

C 0 7 K 16/28

C 0 7 K 16/46

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 11/06

C 1 2 N 11/08

C 1 2 N 11/10

C 1 2 N 11/12

C 1 2 N 11/14

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 15/867 Z

50

C 1 2 N 15 / 86 Z
 A 6 1 P 35 / 00
 A 6 1 K 35 / 17 Z
 A 6 1 P 35 / 04
 A 6 1 P 37 / 06
 A 6 1 P 29 / 00
 A 6 1 P 31 / 04
 A 6 1 P 31 / 12
 C 1 2 P 21 / 08

10

【手続補正書】

【提出日】令和4年10月27日(2022.10.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

20

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

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

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

30

工程;および

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

【請求項2】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

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

40

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

【請求項3】

インキュベートすることに先立って、1つまたは複数の刺激物質のうちの少なくとも1つを含むオリゴマー刺激試薬を固定相に加える工程を含む、請求項2記載の方法。

【請求項4】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

50

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

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

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

10

【請求項5】

刺激試薬とのインキュベーションの開始が、複数のT細胞を含む試料を固定相に加えた後、10分以内もしくは約10分以内、20分以内もしくは約20分以内、30分以内もしくは約30分以内、45分以内もしくは約45分以内、60分以内もしくは約60分以内、90分以内もしくは約90分以内または120分以内もしくは約120分以内に実行される、請求項4記載の方法。

【請求項6】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法：

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

20

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

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

30

【請求項7】

オリゴマー刺激試薬が、複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子を含み、該オリゴマー粒子試薬のサイズが、少なくとも100個のストレプトアビジン四量体またはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、請求項1および3~6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法：

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

40

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

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

50

を含む、

工程；ならびに

(b) インキュベーション開始から24時間以内に、複数のT細胞のうちの一つまたは複数を重力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程。

【請求項9】

ストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子が、ビオチン、ビオチン類似体もしくはストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合し、任意でストレプトアビジン結合ペプチドが、

Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO: 7), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18), および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

からなる群より選択され、

ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷またはVal⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含み、任意でストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO: 3～6、27～28、および104～105のいずれかに示すアミノ酸配列を含む、

請求項7または8記載の方法。

【請求項10】

一つまたは複数の刺激物質のうち少なくとも一つが、刺激シグナルを送達する能力を有し、該刺激シグナルが、T細胞中のTCR/CD3複合体、T細胞中のCD3含有複合体および/またはT細胞中のITAM含有分子を介した刺激シグナルである、請求項2～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

少なくとも一つの刺激物質が第1刺激物質であり、刺激試薬、任意でオリゴマー刺激試薬が、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質のうちの一つまたは複数をさらに含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】

第2刺激物質が、一つまたは複数のT細胞上の共刺激分子に特異的に結合する能力を有し、任意で共刺激分子がCD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40およびHVEMの中から選択される、請求項11記載の方法。

【請求項13】

第1刺激物質がCD3に特異的に結合し、第2刺激物質がCD28に特異的に結合する、請求項11または12記載の方法。

【請求項14】

一つまたは複数の刺激物質および/または選択物質が、独立して、抗体、抗体フラグメント、免疫グロブリン様機能を持つタンパク質性結合分子、Igドメインを含有する分子、サイトカイン、ケモカイン、アプタマー、MHC分子、MHC-ペプチド複合体、受容体リガンド、および前記のうちいずれかの結合性フラグメントからなる群より選択される物質を含む、

請求項2～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

10

20

30

40

50

1つまたは複数の刺激物質および/または選択物質が、独立して、一価抗体フラグメントを含み、任意で、一価抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fvフラグメントおよび一本鎖Fvフラグメント(scFv)からなる群より選択される、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

1つまたは複数の刺激物質が、抗CD3 Fabである第1刺激物質および抗CD28 Fabである第2刺激物質を含む、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

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

10

【請求項18】

T細胞が、全血試料、パフィーコート試料、末梢血単核球(PBMC)試料、未分画T細胞試料、リンパ球試料、白血球試料、アフエーシス産物、または白血球アフエーシス産物に由来し、任意で、T細胞が、以前にクライオ凍結(cryofrozen)されたアフエーシス産物または白血球アフエーシス産物に由来する、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項19】

1つまたは複数の刺激物質および/または選択物質が、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO: 7)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

30

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、またはオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、請求項1~18のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項20】

- 選択マーカーがT細胞補助受容体であり;
- 選択マーカーがT細胞抗原受容体複合体のメンバーであり;
- 選択マーカーがCD3鎖であり;
- 選択マーカーがCD3ゼータ鎖であり;
- 選択マーカーがCD8であり;
- 選択マーカーがCD4であり;
- 選択マーカーがCD45RAであり;
- 選択マーカーがCD27であり;
- 選択マーカーがCD28であり; および/または

50

選択マーカーがCCR7であり、

任意で選択マーカーが、CD3、CD4およびCD8からなる群より選択される、
請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

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

【請求項22】

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

10

【請求項23】

オリゴマー刺激試薬が可溶性であり、

オリゴマー刺激試薬が、固形支持体に結合しておらず、かつ/またはオリゴマー刺激試薬が、フレキシブルであり、金属コアも磁気コアも含有せず、完全にもしくは主として有機多量体で構成され、かつ/もしくは剛直ではない、請求項1および3～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

オリゴマー刺激試薬が、

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

20

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

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

を含む、請求項1および3～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

オリゴマー刺激試薬が、約1μg/細胞100万個～約2μg/細胞100万個の濃度で固定相に加えられ、請求項1および3～24のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項26】

選択物質が、該選択物質が可逆的に結合する選択試薬を介して間接的に固定相に結合される、任意で、選択試薬が、ストレプトアビジン;アビジン;ビオチンもしくはビオチン類似体に可逆的に結合するストレプトアビジンのμテイン;ストレプトアビジン結合ペプチドに可逆的に結合する、アビジンもしくはストレプトアビジンのμテイン;少なくとも2つのキレート基Kを含む試薬であって、該少なくとも2つのキレート基が、遷移金属イオンに結合する能力を有する、試薬;オリゴヒスチジンアフィニティータグに結合する能力を有する物質;グルタチオン-S-トランスフェラーゼに結合する能力を有する物質;カルモジュリンもしくはその類似体;カルモジュリン結合ペプチド(CBP)に結合する能力を有する物質;FLAGペプチドに結合する能力を有する物質;HAタグに結合する能力を有する物質;マルトース結合タンパク質(MBP)に結合する能力を有する物質;HSVエピトープに結合する能力を有する物質;mycエピトープに結合する能力を有する物質;またはビオチン化担体タンパク質に結合する能力を有する物質を含む、請求項1～25のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項27】

1つもしくは複数の刺激物質と共にインキュベートすることが、複数の固定化T細胞のうちの一つもしくは複数の固定相から遊離させる、かつ/または重力流によって収集することが、T細胞を固定相から溶出させるための固定相への競合剤もしくは遊離結合剤の添加なしに実施され、任意で競合剤もしくは遊離結合剤が、固定相からの1つもしくは複数のT細胞の脱離を促進し、

50

重力流によって収集することが、固定相からT細胞を溶出させるための競合剤も遊離結合剤も含まない培地を固定相に加えることを含む、かつ/または競合剤もしくは遊離結合剤が、ビオチンもしくはビオチン類似体、任意でD-ビオチンを含む、

請求項1~26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

刺激されたT細胞を含む前記組成物のT細胞に、組換えタンパク質、任意でキメラ抗原受容体をコードする組換え核酸分子を導入し、それによって、操作されたT細胞を含む組成物、任意で形質導入T細胞を含む組成物を作製する工程をさらに含む、請求項1~27のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項29】

組換え核酸の導入が、ウイルス粒子を使った形質導入によって達成される、任意で、ウイルス粒子が、レトロウイルスベクター粒子、任意でレンチウイルス粒子である、請求項28記載の方法。

【請求項30】

操作されたT細胞を含む組成物を、ウイルス組込みのための条件下、任意で37°±2 または約37°±2 の温度で、培養する工程をさらに含む、請求項28または29記載の方法。

【請求項31】

操作されたT細胞を含む組成物を培養する工程が、導入後、少なくとも18時間かつ最大96時間、最大72時間、最大48時間、または最大24時間にわたって実行される、請求項30記載の方法。

20

【請求項32】

操作されたT細胞を含む組成物を、T細胞を拡大培養するための条件下で培養する工程をさらに含む、請求項28~31のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

培養する工程が14日以下、12日以下、10日以下、8日以下、6日以下または5日以下の時間にわたって実行される、請求項32記載の方法。

【請求項34】

操作されたT細胞を採取し、それによって、操作されたT細胞のアウトプット集団を作製する工程をさらに含む、請求項28~33のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項35】

操作されたT細胞の採取が、刺激試薬、任意でオリゴマー刺激試薬への曝露を開始した後、両端の値を含む48~120時間の時点である、請求項34記載の方法。

【請求項36】

ナイーブ様細胞のパーセンテージが、採取の時点で、集団中の全T細胞、集団中の全CD4+T細胞、集団中の全CD8+T細胞、または集団中の前記のうちのいずれかの組換えタンパク質発現細胞のうちの60%超または約60%超であり、任意で、ナイーブ様T細胞がCD27+CCR7+細胞を含む、請求項34または35記載の方法。

【請求項37】

採取された細胞を、冷凍保存用および/または対象への投与用に、任意で薬学的に許容される賦形剤または凍結保護物質の存在下で、製剤化する工程をさらに含む、請求項34~36のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項38】

導入、インキュベート、および/または培養する工程が、無血清培地中で実行される、請求項28~37のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

無血清培地が、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-15または組換えヒトIL-7を含まない、請求項38記載の方法。

【請求項40】

50

操作されたT細胞、インキュベートされたT細胞、および/または培養されたT細胞を含む組成物に競合剤または遊離結合剤を加える工程をさらに含み、競合剤または遊離結合剤が、採取に先立って添加され、かつ任意で、該剤が、1つまたは複数の刺激物質を該組成物中のオリゴマー刺激試薬から解離させるための条件下で加えられる、請求項28～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項41】

競合剤もしくは遊離結合剤が、T細胞にとって有害ではない；

競合剤もしくは遊離結合剤の添加が、該競合剤も該遊離結合剤も使用しない同等もしくは同じ条件下でのT細胞のインキュベーションとの比較で、生残するT細胞のパーセンテージを90%未満、80%未満、70%未満、60%未満もしくは50%未満に低減させること

10

はない；かつ/または

前記解離が、T細胞における刺激シグナルを終結もしくは軽減させる、
請求項40記載の方法。

【請求項42】

競合試薬または遊離結合剤が、独立して、ストレプトアビジン結合分子；ビオチン、任意で1mMのD-ビオチン；ビオチン類似体、任意で、ストレプトアビジン、もしくは野生型ストレプトアビジンの位置44～47に対応する配列位置にアミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を有するストレプトアビジンムテインに特異的に結合するビオチン類似体；または金属キレート剤、任意でEDTAもしくはEGTAからなる群より選択される分子を含む、

20

請求項40または41記載の方法。

【請求項43】

T細胞を洗浄する工程をさらに含み、任意で、該洗浄工程が組成物中の刺激試薬、任意でオリゴマー刺激試薬および/または1つもしくは複数の刺激物質を低減または除去する、
請求項28～42のいずれか一項記載の方法。

【請求項44】

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

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

30

請求項1～43のいずれか一項記載の方法。

【請求項45】

前記組成物の刺激されたT細胞からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に請求項28～44のいずれか一項記載の導入が行われ、選択された該T細胞サブセットに組換え核酸分子が導入される；

操作されたT細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に請求項30～44のいずれか一項記載のインキュベーションが行われ、選択された該T細胞サブセットがウイルス組込みのための条件下でインキュベートされる；

操作されたT細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に請求項32～44のいずれか一項記載の培養工程が行われ、選択された該T細胞サブセットが、T細胞を拡大培養するための条件下で培養される；かつ/または

40

操作されたT細胞を含む組成物からT細胞サブセットを選択する工程を含み、その後に請求項34～44のいずれか一項記載の採取が行われ、選択された該T細胞サブセットが、操作されたT細胞のアウトプット集団を作製するために採取される、

任意で、選択する工程がアフィニティークロマトグラフィーによって実行される、
請求項1～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項46】

T細胞サブセットが、ナイーブ様T細胞である；ナイーブ様T細胞上に発現するマーカーについて表面陽性であるT細胞である；CCR7+CD45RA+、CD27+CCR7+、もしくはCD62L-CCR7+である；かつ/または組換えタンパク質を発現する、
請求項45記載

50

の方法。

【請求項 47】

固定相がクロマトグラフィーマトリックスを含む；
固定相が非磁性材料もしくは非磁化可能材料である；
固定相が、固定相1mLあたりT細胞約7500万～約1億2500万個、任意で細胞20億±
5億個の結合容量を有する；かつ/または
固定相が約20mLである、

請求項1～46のいずれか一項記載の方法。

【請求項 48】

クロマトグラフィーマトリックスがカラムクロマトグラフィーのためのものである、請 10
求項47記載の方法。

【請求項 49】

(a) T細胞を刺激するための、T細胞表面上の第1分子および第2分子にそれぞれ特異
的に結合する能力を有する、第1刺激物質および第2刺激物質と、
 (b) 固定相上にT細胞を固定化するための、T細胞上の選択マーカーに特異的に結合
する能力を有する選択物質を含む、固定相と
を含む、T細胞のオンカラム刺激のための製造物品。

【請求項 50】

請求項49記載の製造物品を含み、任意で閉鎖システム内または無菌システム内にある
、装置。 20

【請求項 51】

自動で実行されてもよい請求項1～48のいずれか一項記載の方法において使用するた
めの、請求項50記載の装置または請求項49記載の物品。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

自動で実行されてもよい本明細書において提供される方法（その態様を含む）のいずれ 30
かにおいて使用するための装置および/または製造物品が提供される。

[本発明1001]

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

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

該オリゴマー刺激試薬が、(i)抗CD3抗体である第1刺激物質と(ii)抗CD28抗体
である第2刺激物質とを含む1つまたは複数の刺激物質を含む、 40

工程；および

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

[本発明1002]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法：

(a)固定相上に固定化された複数のT細胞を1つまたは複数の刺激物質と共にインキュ
ベートして、該複数のT細胞のうちの1つまたは複数のT細胞において刺激シグナルを送
達する工程であって、該固定相が、該1つまたは複数のT細胞の表面上の選択マーカーに
特異的に結合する選択物質を含み、該1つまたは複数のT細胞によって発現された該選択 50

マーカーへの該選択物質の特異的結合が、該1つまたは複数のT細胞を該固定相上に固定化する、工程;および

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

[本発明1003]

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

[本発明1004]

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

[本発明1005]

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

[本発明1006]

少なくとも1つの刺激物質が第1刺激物質であり、1つまたは複数の刺激物質が、第1刺激物質の刺激シグナルを増強、減弱または改変する能力を有する第2刺激物質をさらに含む、本発明1005の方法。

[本発明1007]

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

[本発明1008]

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

[本発明1009]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

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

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

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

[本発明1010]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法:

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

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

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

10

20

30

40

50

物を生成する工程。

[本発明1011]

以下の工程を含む、T細胞のオンカラム刺激方法：

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

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

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

工程。

[本発明1012]

インキュベーション開始から24時間以内に、複数のT細胞のうちの1つまたは複数を集力流によって固定相から収集し、それによって、刺激されたT細胞を含む組成物を生成する工程をさらに含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

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

[本発明1014]

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

[本発明1015]

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

[本発明1016]

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

[本発明1017]

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

[本発明1018]

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

[本発明1019]

10

20

30

40

50

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

[本発明1020]

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

[本発明1021]

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

[本発明1022]

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

[本発明1023]

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

[本発明1024]

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

[本発明1025]

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

[本発明1026]

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

[本発明1027]

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

本発明1001~1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

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

本発明1004、1006、1007、1008または1013~1020、1022~1264のいずれかの方法。

[本発明1029]

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

[本発明1030]

10

20

30

40

50

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

[本発明1031]

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

[本発明1032]

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

10

[本発明1033]

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

[本発明1034]

以下の工程を含む、T細胞のオンコラム刺激方法:

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

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

20

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

30

工程;ならびに

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

[本発明1035]

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

40

[本発明1036]

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

[本発明1037]

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

[本発明1038]

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

50

れかの方法。

[本発明1039]

第1刺激物質および第2刺激物質と共にインキュベートすることが、複数の固定化T細胞のうちの一つまたは複数を固定相から遊離させる、本発明1001、1004、1006、1007、1008、1013~1020、1022~1026、1028、1030~1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

一つまたは複数の刺激物質が、ビオチン、ストレプトアビジンまたはアビジンに可逆的に結合するビオチン類似体、

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

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

10

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

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

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

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

からなる群より選択されるストレプトアビジン結合ペプチド、カルモジュリンに可逆的に結合するカルモジュリン結合ペプチド、FLAGペプチドに結合する抗体に可逆的に結合するFLAGペプチド、およびオリゴヒスチジンタグに結合する抗体に可逆的に結合するオリゴヒスチジンタグをさらに含む、本発明1001~1027、1029および1035~1028のいずれかの方法。

20

[本発明1041]

一つまたは複数の刺激物質が、

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

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

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

30

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

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

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

Lys (SEQ ID NO: 19)

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

[本発明1042]

40

一つまたは複数の刺激物質が、配列

SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

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

[本発明1043]

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

50

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

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

10

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

[本発明1044]

第1刺激物質および第2刺激物質のそれぞれが、

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

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

20

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

30

[本発明1045]

第1刺激物質および第2刺激物質のそれぞれが、配列

SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16)

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

[本発明1046]

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

40

[本発明1047]

選択マーカーがT細胞補助受容体であり;

選択マーカーがT細胞抗原受容体複合体のメンバーであるか、もしくはそれを含み、

選択マーカーがCD3鎖であるか、もしくはそれを含み、

選択マーカーがCD3ゼータ鎖であるか、もしくはそれを含み、

50

選択マーカーがCD8であるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD4であるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD45RAであるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD27であるか、もしくはそれを含み、
選択マーカーがCD28であるか、もしくはそれを含み、および/または
選択マーカーがCCR7であるか、もしくはそれを含む、
 本発明1001～1046のいずれかの方法。

[本発明1048]

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

[本発明1049]

選択マーカーがCD3である、本発明1001～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

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

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

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

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

[本発明1051]

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

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

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

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

[本発明1052]

選択物質が、配列

SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)

10

20

30

40

50

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

[本発明1053]

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

[本発明1054]

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

[本発明1055]

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

[本発明1056]

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

[本発明1057]

刺激試薬が、複数のストレプトアビジン分子またはストレプトアビジンムテイン分子を含むオリゴマー刺激試薬であり、該オリゴマー粒子試薬のサイズが、(i) 50nm超の半径、(ii) 少なくとも 5×10^6 g/molの分子量および/または(iii) オリゴマー刺激試薬あたり少なくとも100個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四量体を含む、本発明1004～1010、1013～1033および1035～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

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

[本発明1059]

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

[本発明1060]

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

[本発明1061]

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

[本発明1062]

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

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

本発明1011～1061のいずれかの方法。

[本発明1063]

ストレプトアビジン結合ペプチドが、

10

20

30

40

50

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

10

からなる群より選択される、本発明1061または1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

オリゴマー刺激試薬が、
60nm超、70nm超、80nm超または90nm超の半径
を含む、本発明1001および1011~1063のいずれかの方法。

[本発明1065]

オリゴマー刺激試薬が、
両端の値を含む50nm~150nm、75nm~125nm、80nm~115nmもしくは90nm
~110nmの半径、または
90nm±15nmもしくは95nm±20~25nmの半径
を含む、本発明1001および1011~1064のいずれかの方法。

20

[本発明1066]

前記半径が流体力学的半径である、本発明1164のいずれかの方法。

[本発明1067]

オリゴマー刺激試薬が、
少なくとも 5×10^7 g/molもしくは少なくとも 1×10^8 g/mol、および/または
 5×10^7 g/mol~ 5×10^8 g/mol、 1×10^8 g/mol~ 5×10^8 g/mol、もしくは 1×10^8
g/mol~ 2×10^8 g/mol
の分子量を含む、本発明1001および1011~1066のいずれかの方法。

30

[本発明1068]

オリゴマー刺激試薬が、
少なくとも500個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン四
量体、少なくとも1,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンム
テイン四量体、少なくとも1,500個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトア
ビジンムテイン四量体、または少なくとも2,000個のストレプトアビジン四量体もしく
はストレプトアビジンムテイン四量体、および/または
1,000~20,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジンムテイン
四量体、1,000~10,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレプトアビジン
ムテイン四量体、または2,000~5,000個のストレプトアビジン四量体もしくはストレ
プトアビジンムテイン四量体
を含む、本発明1001および1011~1067のいずれかの方法。

40

[本発明1069]

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

[本発明1070]

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

[本発明1071]

選択物質が、該選択物質が可逆的に結合する選択試薬を介して間接的に固定相に結合さ

50

れる、本発明1001～1070のいずれかの方法。

[本発明1072]

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

10

[本発明1073]

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

20

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

[本発明1074]

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

[本発明1075]

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

30

ストレプトアビジンムテインが、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸の配列におけるストレプトアビジン中の位置を基準として位置44～47に対応する配列位置に、アミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を含む、
本発明1072～1074のいずれかの方法。

[本発明1076]

ストレプトアビジン結合ペプチドが、
Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15), SAWSHQPFEKGGGSGGGSSGSAWSPQFEK (SEQ ID NO:16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) および Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19)

40

からなる群より選択される、本発明1072～1075のいずれかの方法。

[本発明1077]

50

ストレプトアビジン結合ペプチドが、配列
SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)

を有する、本発明1072～1076のいずれかの方法。

[本発明1078]

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

[本発明1079]

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

10

[本発明1080]

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

[本発明1081]

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

[本発明1082]

20

組換えタンパク質が抗原受容体である、本発明1081の方法。

[本発明1083]

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

[本発明1084]

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

[本発明1085]

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

[本発明1086]

30

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

[本発明1087]

膜貫通ドメインがCD28の膜貫通部分を含む、本発明1086の方法。

[本発明1088]

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

[本発明1089]

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

40

[本発明1090]

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

[本発明1091]

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

[本発明1092]

ウイルス粒子がレトロウイルスベクター粒子である、本発明1091の方法。

[本発明1093]

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

50

の方法。

[本発明1094]

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

[本発明1095]

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

[本発明1096]

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

10

[本発明1097]

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

[本発明1098]

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

[本発明1099]

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

20

[本発明1100]

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

[本発明1101]

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

[本発明1102]

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

30

[本発明1103]

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

[本発明1104]

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

[本発明1105]

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

[本発明1106]

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

40

[本発明1107]

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

[本発明1108]

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

[本発明1109]

50

ナイーブ様T細胞がCD27 + CCR7 + 細胞を含む、本発明1108の方法。

[本発明1110]

導入が無血清培地中で実行される、本発明1081~1093のいずれかの方法。

[本発明1111]

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

[本発明1112]

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

[本発明1113]

無血清培地が、

基本培地中、0.5mM~5mMのジペプチド型L-グルタミン、

0.5mM~5mM L-グルタミン、および

任意で少なくとも1つのタンパク質

を含み、該培地が血清を含まない、本発明1110~1112のいずれかの方法。

[本発明1114]

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

[本発明1115]

無血清培地が、IL-2、IL-15およびIL-7の中から選択される組換えサイトカイン、任意で、組換えヒトIL-2、組換えヒトIL-15および/または組換えヒトIL-7を含まない、本発明1110~1114のいずれかの方法。

[本発明1116]

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

[本発明1117]

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

[本発明1118]

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

[本発明1119]

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

[本発明1120]

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

[本発明1121]

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

[本発明1122]

競合試薬および遊離結合剤が、独立して、ストレプトアビジン結合分子;ビオチン;D-ビオチン;ビオチン類似体;ストレプトアビジン、または野生型ストレプトアビジンの位置4

10

20

30

40

50

4～47に対応する配列位置にアミノ酸配列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷もしくはIle⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷を有するストレプトアビジン類似体に特異的に結合するビオチン類似体からなる群からの分子を含むか、または競合試薬および遊離結合剤が、独立して、任意でEDTAまたはEGTAである、金属キレート剤を含む、

本発明1116～1121のいずれかの方法。

[本発明1123]

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

[本発明1124]

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

[本発明1125]

洗浄する工程が採取前に実行される、本発明1124の方法。

[本発明1126]

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

[本発明1127]

T細胞がCD3+T細胞を含むか、CD4+および/またはCD8+T細胞を含む、本発明1001～1126のいずれかの方法。

[本発明1128]

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

[本発明1129]

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

[本発明1130]

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

[本発明1131]

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

[本発明1132]

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

[本発明1133]

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

[本発明1134]

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

10

20

30

40

50

の方法。

[本発明1135]

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

[本発明1136]

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

[本発明1137]

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

10

[本発明1138]

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

[本発明1139]

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

[本発明1140]

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

20

[本発明1141]

(a) 固定相が約20mLであり、および/または
(b) 固定相が細胞20億±5億個の結合容量を有する、
本発明1001～1140のいずれかの方法。

[本発明1142]

2つの固定相を含む、本発明1001～1141のいずれかの方法。

[本発明1143]

2つの固定相が並列に配置される、本発明1142の方法。

[本発明1144]

2つの固定相が逐次的に配置される、本発明1142の方法。

30

[本発明1145]

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

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

[本発明1146]

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

[本発明1147]

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

40

[本発明1148]

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

[本発明1149]

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

[本発明1150]

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

50

1145～1149のいずれかの製造物品。

[本発明1151]

2つの固定相を含む、本発明1145～1150のいずれかの製造物品。

[本発明1152]

2つの固定相が並列に配置される、本発明1151の製造物品。

[本発明1153]

2つの固定相が逐次的に配置される、本発明1151の製造物品。

[本発明1154]

本発明1145～1153のいずれかの製造物品を含む、装置。

[本発明1155]

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

[本発明1156]

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

[本発明1157]

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

10

20

30

40

50