

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-529015

(P2024-529015A)

(43)公表日 令和6年8月1日(2024.8.1)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全44頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-506857(P2024-506857)	(71)出願人	519391608
(86)(22)出願日	令和4年8月3日(2022.8.3)		ガンマデルタ セラピューティクス リミ
(85)翻訳文提出日	令和6年2月2日(2024.2.2)		ティッド
(86)国際出願番号	PCT/GB2022/052039		GAMMADELTA THERAPE
(87)国際公開番号	WO2023/012475		UTICS LTD
(87)国際公開日	令和5年2月9日(2023.2.9)		イギリス国、ダブリュ2 6ビーディー
(31)優先権主張番号	63/228,972		ロンドン、キングダム ストリート 1
(32)優先日	令和3年8月3日(2021.8.3)		1 Kingdom Street, W2
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		6 BD London, United
			Kingdom
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100200849 弁理士 芦田 文人
		(74)代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宜
		(74)代理人	100080791 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ガンマデルタ T細胞及びその組成物の操作

(57)【要約】

本発明は、ウイルスベクター（例えば、ベータレトロウイルス偽型及びレトロウイルス科ウイルスベクター骨格を有するウイルスベクター）を用いた形質導入によって T細胞（例えば、v 1 T細胞及びv 2 T細胞）を操作する方法を提供する。操作された T細胞の組成物及び同組成物を使用する方法がさらに提供される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

操作された T 細胞の集団を産生する方法であって、ベータレトロウイルス偽型及びレトロウイルス科ウイルスベクター骨格を含むウイルスベクターで T 細胞の集団を形質導入することを含む、方法。

【請求項 2】

前記ベータレトロウイルス偽型が、ヒヒ内因性ウイルス (B a E V) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ベータレトロウイルス偽型が、 R D 1 1 4 である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記レトロウイルス科ウイルスベクター骨格が、レトロウイルスベクター骨格である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記レトロウイルスベクター骨格が、レンチウイルス骨格である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記レトロウイルスベクター骨格が、ガンマレトロウイルス骨格である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記レトロウイルスベクター骨格が、アルファレトロウイルス骨格である、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記操作された T 細胞が、 V 1 T 細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記操作された T 細胞が、 V 2 T 細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記操作された T 細胞が、非 V 1 / V 2 T 細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記ウイルスベクターが、導入遺伝子を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記導入遺伝子が、細胞表面受容体をコードする、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞表面受容体が、キメラ抗原受容体 (C A R) である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 C A R が、 C D 1 9、 C D 2 0、 R O R 1、 C D 2 2、がん胎児性抗原、アルファフェトタンパク質、 C A - 1 2 5、 5 T 4、 M U C - 1、上皮腫瘍抗原、前立腺特異的抗原、黒色腫関連抗原、変異 p 5 3、変異 r a s、 H E R 2 / N e u、葉酸結合タンパク質、 H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 1 2 0、 H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 4 1、 G D 2、 C D 1 2 3、 C D 3 3、 C D 1 3 8、 C D 2 3、 C D 3 0、 C D 5 6、 c - M e t、メソテリン、 G D 3、 H E R V - K、 I L - 1 1 R アルファ、カップ鎖、ラムダ鎖、 C S P G 4、 E R B B 2、 E G F R v I I I、 V E G F R 2、組み合わせでの H E R 2 - H E R 3、組み合わせでの H E R 1 - H E R 2、 N Y - E S O - 1、滑膜肉腫 X 切断点 2 (S S X 2)、黒色腫抗原 (M A G E)、 T 細胞によって認識される黒色腫抗原 1 (M A R T - 1)、 g p 1 0 0、前立腺特異的抗原 (P S A)、前立腺特異的膜抗

40

50

原 (P S M A)、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、g 9 d 2、またはそれらの組み合わせを標的とする、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記導入遺伝子が、サイトカインをコードする、請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記サイトカインが、分泌型である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記サイトカインが、膜結合型である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記サイトカインが、I L - 1 5 である、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 9】

操作された T 細胞の集団を産生する方法であって、

(i) T 細胞の出発集団を提供することと、

(i i) ウイルスベクターの非存在下で第 1 の培養期間にわたって前記 T 細胞の出発集団を培養して、プライミングされた T 細胞の集団を産生することと、

(i i i) 前記プライミングされた T 細胞の少なくとも 3 % を形質導入するために有効な量でベータレトロウイルス偽型を含むウイルスベクターの存在下で第 2 の培養期間にわたって前記プライミングされた T 細胞の集団を培養し、それによって、前記操作された T 細胞の集団を産生することと、を含む、方法。

20

【請求項 2 0】

前記第 1 の培養期間が、1 日間以上である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記第 1 の培養期間が、2 日間以上である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 2 の培養期間が、2 日間以上である、請求項 1 9 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記第 2 の培養期間が、3 日間以上である、請求項 2 2 に記載の方法。

30

【請求項 2 4】

前記プライミングされた T 細胞の集団が、A S C T - 1 及び / または A S C T - 2 を発現する、請求項 1 9 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記プライミングされた T 細胞の集団が、V S V - G 侵入受容体の機能的発現を欠く、請求項 1 9 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記ウイルスベクターが、前記プライミングされた T 細胞の少なくとも 2 0 % を形質導入するために有効な量である、請求項 1 9 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ウイルスベクターが、1 0 以下の感染の多重度 (M O I) において前記プライミングされた T 細胞と培養される、請求項 1 9 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 2 8】

前記 M O I が、5 以下である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 M O I が、1 ~ 5 である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

操作された T 細胞の集団を産生する方法であって、

(i) T 細胞の出発集団を提供することと、

(i i) I L - 1 5、及び前記 T 細胞の出発集団の少なくとも 3 % を形質導入

50

するために有効な量でベータレトロウイルス偽型を含むウイルスベクターの存在下で、前記 T細胞の出発集団を培養し、それによって、前記操作された T細胞の集団を産生することと、を含む、方法。

【請求項 3 1】

前記 T細胞の出発集団が、A S C T - 1またはA S C T - 2の発現を欠く、請求項 3 0に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 T細胞の出発集団が、A S C T - 1及びA S C T - 2の発現を欠く、請求項 3 1に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記 T細胞の出発集団が、A S C T - 1及び/またはA S C T - 2を発現する、請求項 3 0～3 2のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 T細胞の出発集団が、V S V - G侵入受容体の発現を欠く、請求項 3 0～3 3のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 V S V - G侵入受容体が、L D L受容体である、請求項 3 4に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記ウイルスベクターが、1 0以下のM O Iにおいて前記 T細胞の出発集団と培養される、請求項 3 0～3 5のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記M O Iが、1～1 0である、請求項 3 6に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記M O Iが、5以下である、請求項 3 5～3 7のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記M O Iが、1～5である、請求項 3 8に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記ベータレトロウイルス偽型が、B a E Vである、請求項 1 9～3 9のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記ベータレトロウイルス偽型が、R D 1 1 4である、請求項 1 9～3 9のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記ウイルスベクターが、レトロウイルス科ウイルスベクター骨格を含む、請求項 1 9～4 1のいずれか 1項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記レトロウイルス科ウイルスベクター骨格が、レトロウイルスベクター骨格である、請求項 4 2に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記レトロウイルスベクター骨格が、レンチウイルス骨格である、請求項 4 3に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記レトロウイルスベクター骨格が、ガンマレトロウイルス骨格である、請求項 4 3に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記レトロウイルスベクター骨格が、アルファレトロウイルス骨格である、請求項 4 3に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記操作された T細胞が、V 1 T細胞である、請求項 1 9～4 6のいずれか 1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 48】

前記操作された T 細胞が、V 2 T 細胞である、請求項 19 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 49】

前記操作された T 細胞が、非 V 1 / V 2 T 細胞である、請求項 19 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 50】

前記ウイルスベクターが、導入遺伝子を含む、請求項 19 ~ 49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

前記導入遺伝子が、細胞表面受容体をコードする、請求項 50 に記載の方法。

10

【請求項 52】

前記細胞表面受容体が、CAR である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記 CAR が、CD 19、CD 20、ROR 1、CD 22、がん胎児性抗原、アルファフェトタンパク質、CA - 125、5T4、MUC - 1、上皮腫瘍抗原、前立腺特異的抗原、黒色腫関連抗原、変異 p53、変異 ras、HER 2 / Neu、葉酸結合タンパク質、HIV - 1 エンベロープ糖タンパク質 gp120、HIV - 1 エンベロープ糖タンパク質 gp41、GD2、CD 123、CD 33、CD 138、CD 23、CD 30、CD 56、c - Met、メソテリン、GD3、HERV - K、IL - 11R アルファ、カップ鎖、ラムダ鎖、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII、VEGFR2、組み合わせでの HER 2 - HER 3、組み合わせでの HER 1 - HER 2、NY - ESO - 1、SSX 2、MAGE、MART - 1、gp100、PSA、PSMA、PSCA、g9d2、またはそれらの組み合わせを標的とする、請求項 52 に記載の方法。

20

【請求項 54】

前記導入遺伝子が、サイトカインをコードする、請求項 50 ~ 53 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 55】

前記サイトカインが、分泌型である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記サイトカインが、膜結合型である、請求項 55 に記載の方法。

30

【請求項 57】

前記サイトカインが、IL - 15 である、請求項 54 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 58】

CAR を発現する T 細胞の集団を産生する方法であって、

(i) 前記 CAR をコードする導入遺伝子と、

(ii) ベータレトロウイルス偽型と、

(iii) レトロウイルス科ウイルスベクター骨格と、を含む、ウイルスベクターで T 細胞の集団を形質導入することを含む、方法。

40

【請求項 59】

CAR 及びアーマータンパク質を発現する T 細胞の集団を産生する方法であって、

(i) 前記 CAR をコードする第 1 の導入遺伝子と、

(ii) 前記アーマータンパク質をコードする第 2 の導入遺伝子と、

(iii) ベータレトロウイルス偽型と、

(iv) レトロウイルス科ウイルスベクター骨格と、を含む、ウイルスベクターで T 細胞の集団を形質導入することを含む、方法。

【請求項 60】

前記アーマータンパク質が、サイトカインである、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

50

前記サイトカインが、分泌型である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記サイトカインが、膜結合型である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記サイトカインが、IL - 15 である、請求項 6 0 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記ベータレトロウイルス偽型が、BaEV である、請求項 5 8 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記ベータレトロウイルス偽型が、RD114 である、請求項 5 8 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記レトロウイルス科ウイルスベクター骨格が、レトロウイルスベクター骨格である、請求項 5 8 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記レトロウイルスベクター骨格が、レンチウイルス骨格である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記レトロウイルスベクター骨格が、ガンマレトロウイルス骨格である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記レトロウイルスベクター骨格が、アルファレトロウイルス骨格である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記 T 細胞が、V 1 T 細胞である、請求項 5 8 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記 T 細胞が、V 2 T 細胞である、請求項 5 8 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記 T 細胞が、非 V 1 / V 2 T 細胞である、請求項 5 8 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

CAR を発現する T 細胞の集団を産生する方法であって、

(i) T 細胞の出発集団を提供することと、

(i i) ウイルスベクターの非存在下で第 1 の培養期間にわたって前記 T 細胞の出発集団を培養して、プライミングされた T 細胞の集団を産生することと、

(i i i) ベータレトロウイルス偽型、及び前記 CAR をコードする導入遺伝子を含むウイルスベクターの存在下で、第 2 の培養期間にわたって前記プライミングされた T 細胞の集団を培養し、前記ウイルスベクターが、前記プライミングされた T 細胞

の少なくとも 3 % を形質導入するために有効な量であり、それによって、前記 CAR を発現する T 細胞の集団を産生する、方法。

【請求項 7 4】

CAR 及びアーマータンパク質を発現する T 細胞の集団を産生する方法であって、

(i) T 細胞の出発集団を提供することと、

(i i) ウイルスベクターの非存在下で第 1 の培養期間にわたって前記 T 細胞の出発集団を培養して、プライミングされた T 細胞の集団を産生することと、

(i i i) ベータレトロウイルス偽型、前記 CAR をコードする第 1 の導入遺伝子、及び前記アーマータンパク質をコードする第 2 の導入遺伝子を含むウイルスベクターの存

10

20

30

40

50

在下で、第 2 の培養期間にわたって前記プライミングされた T 細胞の集団を培養し、前記ウイルスベクターが、前記プライミングされた T 細胞の少なくとも 3 % を形質導入するために有効な量であり、それによって、前記 C A R 及び前記アーマータンパク質を発現する T 細胞の集団を産生する、方法。

【請求項 7 5】

前記アーマータンパク質が、サイトカインである、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記サイトカインが、分泌型である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記サイトカインが、膜結合型である、請求項 7 5 に記載の方法。

10

【請求項 7 8】

前記サイトカインが、I L - 1 5 である、請求項 7 4 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記第 1 の培養期間が、7 日間以上である、請求項 7 3 ~ 7 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記第 1 の培養期間が、1 0 日間以上である、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記第 2 の培養期間が、7 日間以上である、請求項 7 3 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 8 2】

前記第 2 の培養期間が、1 4 日間以上である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記プライミングされた T 細胞の集団が、A S C T - 1 及び / または A S C T - 2 を発現する、請求項 7 3 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記プライミングされた T 細胞の集団が、V S V - G 侵入受容体の機能的発現を欠く、請求項 7 8 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記ウイルスベクターが、前記プライミングされた T 細胞の少なくとも 2 0 % を形質導入するために有効な量である、請求項 7 3 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 8 6】

前記ウイルスベクターが、1 0 以下の M O I において前記プライミングされた T 細胞と培養される、請求項 7 3 ~ 8 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記 M O I が、5 以下である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記 M O I が、1 ~ 5 である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

C A R を発現する T 細胞の集団を産生する方法であって、
 (i) T 細胞の出発集団を提供することと、
 (i i) I L - 1 5、ならびにベータレトロウイルス偽型及び前記 C A R をコードする導入遺伝子を含むウイルスベクターの存在下で、前記 T 細胞の出発集団を培養し、前記ウイルスベクターが、前記 T 細胞の出発集団の少なくとも 3 % を形質導入するために有効な量であり、それによって、前記 C A R を発現する操作された T 細胞の集団を産生することと、を含む、方法。

40

【請求項 9 0】

C A R 及びアーマータンパク質を発現する T 細胞の集団を産生する方法であって、

(i) T 細胞の出発集団を提供することと、

50

(i i) I L - 1 5、ならびにベータレトロウイルス偽型、前記 C A R をコードする第 1 の導入遺伝子、及び前記アーマータンパク質をコードする第 2 の導入遺伝子を含むウイルスベクターの存在下で、前記 T 細胞の出発集団を培養し、前記ウイルスベクターが、前記 T 細胞の出発集団の少なくとも 3 % を形質導入するために有効な量であり、それによって、前記 C A R を発現する操作された T 細胞の集団を産生すること、を含む、方法。

【請求項 9 1】

前記アーマータンパク質が、サイトカインである、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記サイトカインが、分泌型である、請求項 9 1 に記載の方法。

10

【請求項 9 3】

前記サイトカインが、膜結合型である、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記サイトカインが、I L - 1 5 である、請求項 9 1 ~ 9 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記 T 細胞の出発集団が、A S C T - 1 または A S C T - 2 の発現を欠く、請求項 8 9 ~ 9 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記 T 細胞の出発集団が、A S C T - 1 または A S C T - 2 の発現を欠く、請求項 9 5 に記載の方法。

20

【請求項 9 7】

前記操作された T 細胞集団が、A S C T - 1 及び / または A S C T - 2 を発現する、請求項 8 9 ~ 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記 T 細胞の出発集団が、V S V - G 侵入受容体の機能的発現を欠く、請求項 8 9 ~ 9 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記 V S V - G 侵入受容体が、L D L 受容体である、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記ウイルスベクターが、1 0 以下の M O I において前記 T 細胞の出発集団と培養される、請求項 8 9 ~ 9 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 0 1】

前記 M O I が、5 以下である、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記 M O I が、1 ~ 5 である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記ベータレトロウイルス偽型が、B a E V である、請求項 7 3 ~ 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記ベータレトロウイルス偽型が、R D 1 1 4 である、請求項 7 3 ~ 1 0 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 0 5】

前記ウイルスベクターが、レトロウイルス科ウイルスベクター骨格を含む、請求項 7 3 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記レトロウイルス科ウイルスベクター骨格が、レトロウイルスベクター骨格である、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記レトロウイルスベクター骨格が、レンチウイルス骨格である、請求項 1 0 6 に記載

50

の方法。

【請求項 108】

前記レトロウイルスベクター骨格が、ガンマレトロウイルス骨格である、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 109】

前記レトロウイルスベクター骨格が、アルファレトロウイルス骨格である、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 110】

前記操作された T 細胞が、V₁ T 細胞である、請求項 73 ~ 109 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 111】

前記操作された T 細胞が、V₂ T 細胞である、請求項 73 ~ 109 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 112】

前記操作された T 細胞が、非 V₁ / V₂ T 細胞である、請求項 73 ~ 109 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 113】

前記 CAR が、CD19、CD20、ROR1、CD22、がん胎児性抗原、アルファフェトタンパク質、CA-125、5T4、MUC-1、上皮腫瘍抗原、前立腺特異的抗原、黒色腫関連抗原、変異 p53、変異 ras、HER2/Neu、葉酸結合タンパク質、HIV-1 エンベロープ糖タンパク質 gp120、HIV-1 エンベロープ糖タンパク質 gp41、GD2、CD123、CD33、CD138、CD23、CD30、CD56、c-Met、メソテリン、GD3、HERV-K、IL-11R アルファ、カップ鎖、ラムダ鎖、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII、VEGFR2、組み合わせでの HER2-HER3、組み合わせでの HER1-HER2、NY-ESO-1、SSX2、MAGE、MART-1、gp100、PSA、PSMA、PSCA、gp9d2、またはそれらの組み合わせを標的とする、請求項 58 ~ 112 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 114】

請求項 1 ~ 57 のいずれか 1 項に記載の方法によって產生される、操作された T 細胞の集団。

30

【請求項 115】

前記集団の少なくとも 10% が、CAR を発現する、請求項 114 に記載の操作された T 細胞の集団。

【請求項 116】

前記集団の少なくとも 10% が、CAR 及びアーマータンパク質を発現する、請求項 115 に記載の操作された T 細胞の集団。

【請求項 117】

前記集団の少なくとも 50% が、前記 CAR を発現する、請求項 115 または 116 に記載の操作された T 細胞の集団。

40

【請求項 118】

前記集団の少なくとも 50% が、前記 CAR 及び前記アーマータンパク質を発現する、請求項 115 ~ 117 のいずれか 1 項に記載の操作された T 細胞の集団。

【請求項 119】

請求項 58 ~ 113 のいずれか 1 項に記載の方法によって產生される、CAR を発現する T 細胞の集団。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

がんに対する T 細胞免疫療法への関心の高まりは、治療部分としての操作された T 細胞

50

の明らかな能力に焦点を当てている。ガンマデルタT細胞（ $\gamma\delta$ T細胞）は、その表面上で明確に異なる決定的なT細胞受容体（TCR）を発現するT細胞のサブセットを表す。このTCRは、1つのガンマ（ γ ）鎖及び1つのデルタ（ δ ）鎖から構成される。ヒト $\gamma\delta$ T細胞は、1つまたは2つのタイプ、すなわち、末梢血常在 $\gamma\delta$ T細胞及び非造血組織常在 $\gamma\delta$ T細胞として広く分類することができる。ほとんどの血液常在 $\gamma\delta$ T細胞がV δ 2TCRを発現する一方で、これは、より頻繁にV δ 1及び/または他のV鎖を使用する組織常在 $\gamma\delta$ T細胞の間ではあまり一般的ではない。

【0002】

T細胞に対して、所望の導入遺伝子を発現するためのT細胞の効率的な形質導入のための方法が欠如している。したがって、T細胞を形質導入し、治療法として、例えば、養子T細胞療法として使用するために十分な質及び量のT細胞の集団を産生するための改善された方法が、当技術分野で必要とされている。

10

【発明の概要】

【0003】

一態様では、本発明は、ベータレトロウイルス偽型及びレトロウイルス科ウイルスベクター骨格を有するウイルスベクターでT細胞の集団を形質導入することによって、操作されたT細胞の集団を産生する方法を特徴とする。ベータレトロウイルス偽型は、ヒビ内因性ウイルス（BaEV）であり得る。ベータレトロウイルス偽型は、RD114であり得る。

【0004】

いくつかの実施形態では、レトロウイルス科ウイルスベクター骨格は、レトロウイルスベクター骨格（例えば、レンチウイルス骨格、ガンマレトロウイルス骨格、またはアルファレトロウイルス骨格）である。

20

【0005】

操作されたT細胞は、V δ 1T細胞であり得る。操作されたT細胞は、V δ 2T細胞であり得る。操作されたT細胞は、非V δ 1/V δ 2T細胞であり得る。

【0006】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、導入遺伝子を含む。導入遺伝子は、細胞表面受容体（例えば、キメラ抗原受容体（CAR））及び/またはサイトカイン（例えば、分泌型サイトカインもしくは膜結合型サイトカイン）をコードし得る。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、IL-15（例えば、分泌型IL-15または膜結合型IL-15）をコードする。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、第1の導入遺伝子及び第2の導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、第1の導入遺伝子は、CARをコードし、第2の導入遺伝子は、アーマータンパク質（例えば、サイトカイン、例えば、IL-15、例えば、分泌型IL-15または膜結合型IL-15）をコードする。

30

【0007】

いくつかの実施形態では、CARは、CD19、CD20、ROR1、CD22、がん胎児性抗原、アルファフェトタンパク質、CA-125、5T4、MUC-1、上皮腫瘍抗原、前立腺特異的抗原、黒色腫関連抗原、変異p53、変異ras、HER2/Neu、葉酸結合タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41、GD2、CD123、CD33、CD138、CD23、CD30、CD56、c-Met、メソテリン、GD3、HERV-K、IL-11Rアルファ、カップ鎖、ラムダ鎖、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII、VEGFR2、組み合わせでのHER2-HER3、組み合わせでのHER1-HER2、NY-ESO-1、滑膜肉腫X切断点2（SSX2）、黒色腫抗原（MAGE）、T細胞によって認識される黒色腫抗原1（MART-1）、gp100、前立腺特異的抗原（PSA）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、gp9d2、またはそれらの組み合わせを標的とする。

40

【0008】

50

別の態様では、本発明は、操作された T 細胞の集団を産生する方法を特徴とする。本方法は、 T 細胞の出発集団を提供することと、ウイルスベクターの非存在下で第 1 の培養期間にわたって T 細胞の出発集団を培養して、プライミングされた T 細胞の集団を産生することと、を含む。本方法は、プライミングされた T 細胞の少なくとも 3 % (例えば、少なくとも 4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、99 %、または実質的に全て) を形質導入するために有効な量でベータレトロウイルス偽型を有するウイルスベクターの存在下で、第 2 の培養期間にわたってプライミングされた T 細胞の集団を培養し、それによって、操作された T 細胞の集団を産生することをさらに含み得る。 10

【0009】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、プライミングされた T 細胞の少なくとも 20 % を形質導入するために有効な量である。

【0010】

いくつかの実施形態では、第 1 の培養期間は、1 日間以上 (例えば、1 日間、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、10 日間以上、例えば、1 ~ 3 日間、3 ~ 5 日間、5 ~ 7 日間、7 ~ 10 日間以上) である。いくつかの実施形態では、第 1 の培養期間は、2 日間以上 (例えば、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、10 日間以上、例えば、1 ~ 3 日間、3 ~ 5 日間、5 ~ 7 日間、7 ~ 10 日間以上) である。いくつかの実施形態では、第 1 の培養期間は、5 日間以上 (例えば、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、10 日間以上、例えば、5 ~ 7 日間、7 ~ 10 日間以上) である。いくつかの実施形態では、第 1 の培養期間は、7 日間以上 (例えば、7 日間、8 日間、9 日間、10 日間以上、例えば、7 ~ 10 日間以上) である。 20

【0011】

いくつかの実施形態では、第 2 の培養期間は、2 日間以上 (例えば、2 日間、3 日間、4 日間、5 日間、6 日間、7 日間、8 日間、9 日間、10 日間、11 日間、12 日間、13 日間、14 日間以上、例えば、2 ~ 4 日間、4 ~ 7 日間、7 ~ 10 日間、10 ~ 14 日間以上) である。いくつかの実施形態では、第 2 の培養期間は、7 日間以上 (例えば、8 日間、9 日間、10 日間、11 日間、12 日間、13 日間、14 日間以上、例えば、7 ~ 10 日間、10 ~ 14 日間以上) である。 30

【0012】

いくつかの実施形態では、プライミングされた T 細胞の集団は、A S C T - 1 及び/または A S C T - 2 を発現する。いくつかの実施形態では、プライミングされた T 細胞の集団は、V S V - G 侵入受容体 (例えば、L D L 受容体) の機能的発現を欠く。

【0013】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、10 以下 (例えば、5 以下、例えば、約 1 ~ 約 5) の感染の多重度 (M O I) においてプライミングされた T 細胞と培養される。 40

【0014】

別の態様では、本発明は、 T 細胞の出発集団を提供することと、I L - 15、及び T 細胞の出発集団の少なくとも 3 % (例えば、少なくとも 4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、99 %、または実質的に全て) を形質導入するために有効な量でベータレトロウイルス偽型を有するウイルスベクターの存在下で、 T の出発集団を培養し、それによって、操作された T 細胞の出発集団を産生することによって、操作された T 細胞の集団を産生する方法を特徴とする。 50

【0015】

いくつかの実施形態では、T細胞の出発集団は、A S C T - 1 及び / または A S C T - 2 の発現を欠く。いくつかの実施形態では、操作された T細胞の集団は、A S C T - 1 及び / または A S C T - 2 を発現する。T細胞の出発集団は、V S V - G 侵入受容体 (例えば、L D L 受容体) の機能的発現を欠き得る。

【0016】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、10 以下 (例えば、5 以下、例えば、約 1 ~ 約 5) の M O I において T細胞の出発集団と培養される。

【0017】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、B a E V または R D 1 1 4 のベータレトロウイルス偽型を有する。 10

【0018】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルス科ウイルスベクター骨格を含む。レトロウイルス科ウイルスベクター骨格は、レトロウイルスベクター骨格 (例えば、レンチウイルス骨格、ガンマレトロウイルス骨格、またはアルファレトロウイルス骨格) であり得る。

【0019】

操作された T細胞は、V₁ T細胞であり得る。操作された T細胞は、V₂ T細胞であり得る。操作された T細胞は、非 V₁ / V₂ T細胞であり得る。 20

【0020】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、導入遺伝子を含む。導入遺伝子は、細胞表面受容体、例えば、キメラ抗原受容体 (C A R) 及び / または サイトカイン (例えば、分泌型 サイトカイン もしくは 膜結合型 サイトカイン) をコードし得る。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、I L - 1 5 (例えば、分泌型 I L - 1 5 または 膜結合型 I L - 1 5) をコードする。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、第 1 の導入遺伝子及び第 2 の導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の導入遺伝子は、C A R をコードし、第 2 の導入遺伝子は、アーマータンパク質 (例えば、サイトカイン、例えば、I L - 1 5、例えば、分泌型 I L - 1 5 または 膜結合型 I L - 1 5) をコードする。

【0021】

いくつかの実施形態では、C A R は、C D 1 9、C D 2 0、R O R 1、C D 2 2、がん胎児性抗原、アルファフェトタンパク質、C A - 1 2 5、5 T 4、M U C - 1、上皮腫瘍抗原、前立腺特異的抗原、黒色腫関連抗原、変異 p 5 3、変異 r a s、H E R 2 / N e u、葉酸結合タンパク質、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 1 2 0、H I V - 1 エンベロープ糖タンパク質 g p 4 1、G D 2、C D 1 2 3、C D 3 3、C D 1 3 8、C D 2 3、C D 3 0、C D 5 6、c - M e t、メソテリン、G D 3、H E R V - K、I L - 1 1 R アルファ、カッパ鎖、ラムダ鎖、C S P G 4、E R B B 2、E G F R v I I I、V E G F R 2、組み合わせでの H E R 2 - H E R 3、組み合わせでの H E R 1 - H E R 2、N Y - E S O - 1、S S X 2、M A G E、M A R T - 1、g p 1 0 0、P S A、P S M A、P S C A、g 9 d 2、またはそれらの組み合わせを標的とする。 30 40

【0022】

別の態様では、本発明は、C A R をコードする導入遺伝子、ベータレトロウイルス偽型、及びレトロウイルス科ウイルスベクター骨格を含む、ウイルスベクターで T細胞の集団を形質導入することによって、C A R を発現する T細胞の集団を産生する方法を特徴とする。

【0023】

別の態様では、本発明は、C A R コードする第 1 の導入遺伝子、アーマータンパク質をコードする第 2 の導入遺伝子、ベータレトロウイルス偽型、及びレトロウイルス科ウイルスベクター骨格を含む、ウイルスベクターで T細胞の集団を形質導入することによって、C A R 及びアーマータンパク質を発現する T細胞の集団を産生する方法を特 50

徴とする。いくつかの実施形態では、アーマータンパク質は、サイトカイン（例えば、膜結合型サイトカインまたは分泌型サイトカイン（例えば、膜結合型 I L - 1 5 または分泌型 I L - 1 5 ）である。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、ベータレトロウイルス偽型は、B a E V である。他の実施形態では、ベータレトロウイルス偽型は、R D 1 1 4 である。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルス科ウイルスベクター骨格を含む。レトロウイルス科ウイルスベクター骨格は、レトロウイルスベクター骨格（例えば、レンチウイルス骨格、ガンマレトロウイルス骨格、またはアルファレトロウイルス骨格）であり得る。

10

【 0 0 2 6 】

T 細胞は、V 1 T 細胞であり得る。 T 細胞は、V 2 T 細胞であり得る。 T 細胞は、非 V 1 / V 2 T 細胞であり得る。

【 0 0 2 7 】

別の態様では、本発明は、 T 細胞の出発集団を提供し、ウイルスベクターの非存在下で第 1 の培養期間にわたって T 細胞の出発集団を培養して、プライミングされた T 細胞の集団を産生することによって、C A R を発現する T 細胞の集団を産生する方法を特徴とする。本方法は、ベータレトロウイルス偽型、及び C A R をコードする導入遺伝子を有するウイルスベクターの存在下で、第 2 の培養期間にわたってプライミングされた T 細胞の集団を培養し、ウイルスベクターが、プライミングされた

20

T 細胞の少なくとも 3 %（例えば、少なくとも 4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 % m 1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 9 %、または実質的に全て）を形質導入するために有効な量であり、それによって、C A R を発現する T 細胞の集団を産生することをさらに含み得る。

【 0 0 2 8 】

別の態様では、本発明は、 T 細胞の出発集団を提供し、ウイルスベクターの非存在下で第 1 の培養期間にわたって T 細胞の出発集団を培養して、プライミングされた T 細胞の集団を産生することによって、C A R 及びアーマータンパク質を発現する T 細胞の集団を産生する方法を特徴とする。本方法は、ベータレトロウイルス偽型、C A R をコードする第 1 の導入遺伝子、及びアーマータンパク質をコードする第 2 の導入遺伝子を有するウイルスベクターの存在下で、第 2 の培養期間にわたってプライミングされた T 細胞の集団を培養し、ウイルスベクターが、プライミングされた

30

T 細胞の少なくとも 3 %（例えば、少なくとも 4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 % m 1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 9 %、または実質的に全て）を形質導入するために有効な量であり、それによって、C A R 及びアーマータンパク質を発現する T 細胞の集団を産生することをさらに含み得る。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、I L - 1 5（例えば、分泌型 I L - 1 5 または膜結合型 I L - 1 5）をコードする。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、第 1 の導入遺伝子及び第 2 の導入遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、第 1 の導入遺伝子は、C A R をコードし、第 2 の導入遺伝子は、アーマータンパク質（例えば、サイトカイン、例えば、I L - 1 5、例えば、分泌型 I L - 1 5 または膜結合型 I L - 1 5）をコードする。

40

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、プライミングされた T 細胞の少なくとも 2 0 % を形質導入するために有効な量である。

【 0 0 3 0 】

50

いくつかの実施形態では、第1の培養期間は、1日間以上（例えば、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間以上、例えば、1～3日間、3～5日間、5～7日間、7～10日間以上）である。いくつかの実施形態では、第1の培養期間は、2日間以上（例えば、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間以上、例えば、1～3日間、3～5日間、5～7日間、7～10日間以上）である。いくつかの実施形態では、第1の培養期間は、5日間以上（例えば、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間以上、例えば、5～7日間、7～10日間以上）である。いくつかの実施形態では、第1の培養期間は、7日間以上（例えば、7日間、8日間、9日間、10日間以上、例えば、7～10日間以上）である。

10

【0031】

いくつかの実施形態では、第2の培養期間は、2日間以上（例えば、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間以上、例えば、2～4日間、4～7日間、7～10日間、10～14日間以上）である。いくつかの実施形態では、第2の培養期間は、7日間以上（例えば、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間以上、例えば、7～10日間、10～14日間以上）である。

【0032】

いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞の集団は、A S C T - 1 及び/または A S C T - 2 を発現する。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞の集団は、V S V - G 侵入受容体（例えば、L D L 受容体）の機能的発現を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の95%超は、（例えば、B l a M - V p r ベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G 侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G 侵入受容体発現（例えば、L D L 受容体）を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の96%超は、（例えば、B l a M - V p r ベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G 侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G 侵入受容体発現（例えば、L D L 受容体）を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の97%超は、（例えば、B l a M - V p r ベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G 侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G 侵入受容体発現（例えば、L D L 受容体）を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の98%超は、（例えば、B l a M - V p r ベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G 侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G 侵入受容体発現（例えば、L D L 受容体）を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の99%超は、（例えば、B l a M - V p r ベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G 侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G 侵入受容体発現（例えば、L D L 受容体）を欠く。

20

30

【0033】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、10以下（例えば、5以下、例えば、約1～約5）の M O I においてプライミングされた T細胞と培養される。

40

【0034】

別の態様では、本発明は、 T細胞の出発集団を提供することと、I L - 1 5、ならびにベータレトロウイルス偽型及び C A R をコードする導入遺伝子を有するベクターの存在下で、 T細胞の出発集団を培養し、ウイルスベクターが、 T細胞の出発集団の少なくとも3%（例えば、少なくとも4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）を形質導入するために有効な量であり、それによって、C A R を発現する、操作された T細胞の出発集団を産生することとによって、C A R を発現する T細胞の集団

50

を産生する方法を特徴とする。

【0035】

別の態様では、本発明は、 T細胞の出発集団を提供することと、 I L - 1 5、ならびにベータレトロウイルス偽型、 C A Rをコードする第1の導入遺伝子、及びアーマータンパク質をコードする第2の導入遺伝子を有するウイルスベクターの存在下で、 T細胞の出発集団を培養し、ウイルスベクターが、 T細胞の出発集団の少なくとも3%（例えば、少なくとも4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）を形質変換するために有効な量であり、それによって、 C A R及びアーマータンパク質を発現する、操作された T細胞の集団を産生することによって、 C A R及びアーマータンパク質を発現する T細胞の集団を産生する方法を特徴とする。いくつかの実施形態では、アーマータンパク質は、サイトカイン、例えば、 I L - 1 5、例えば、分泌型 I L - 1 5または膜結合型 I L - 1 5である。

10

【0036】

いくつかの実施形態では、 T細胞の出発集団は、 A S C T - 1及び/または A S C T - 2の発現を欠く。操作された T細胞の集団は、 A S C T - 1及び/または A S C T - 2を発現し得る。 T細胞の出発集団は、 V S V - G侵入受容体（例えば、 L D L受容体）の機能的発現を欠き得る。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の95%超は、（例えば、 B l a M - V p rベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G侵入受容体発現（例えば、 L D L受容体）を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の96%超は、（例えば、 B l a M - V p rベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G侵入受容体発現（例えば、 L D L受容体）を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の97%超は、（例えば、 B l a M - V p rベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G侵入受容体発現（例えば、 L D L受容体）を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の98%超は、（例えば、 B l a M - V p rベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G侵入受容体発現（例えば、 L D L受容体）を欠く。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞集団の99%超は、（例えば、 B l a M - V p rベースのアッセイによって測定される）検出可能な V S V - G侵入を媒介するために十分なレベルの V S V - G侵入受容体発現（例えば、 L D L受容体）を欠く。

20

30

【0037】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、10以下（例えば、5以下、例えば、約1～約5）の M O Iにおいて T細胞の出発集団と培養される。

【0038】

いくつかの実施形態では、ベータレトロウイルス偽型は、 B a E Vまたは R D 1 1 4である。

40

【0039】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルス科ウイルスベクター骨格を含む。レトロウイルス科ウイルスベクター骨格は、レトロウイルスベクター骨格（例えば、レンチウイルス骨格、ガンマレトロウイルス骨格、またはアルファレトロウイルス骨格）であり得る。

【0040】

操作された T細胞は、 V 1 T細胞であり得る。操作された T細胞は、 V 2 T細胞であり得る。操作された T細胞は、非 V 1 / V 2 T細胞であり得る。

50

【0041】

いくつかの実施形態では、CARは、CD19、CD20、ROR1、CD22、がん胎児性抗原、アルファフェトタンパク質、CA-125、5T4、MUC-1、上皮腫瘍抗原、前立腺特異的抗原、黒色腫関連抗原、変異p53、変異ras、HER2/Neu、葉酸結合タンパク質、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp120、HIV-1エンベロープ糖タンパク質gp41、GD2、CD123、CD33、CD138、CD23、CD30、CD56、c-Met、メソテリン、GD3、HERV-K、IL-11Rアルファ、カッパ鎖、ラムダ鎖、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII、VEGFR2、組み合わせでのHER2-HER3、組み合わせでのHER1-HER2、NY-ESO-1、SSX2、MAGE、MART-1、gp100、PSA、PSMA、PSCA、gd2、またはそれらの組み合わせを標的とする。

10

【0042】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される方法によって産生される、操作されたT細胞の集団を特徴とする。

【0043】

いくつかの実施形態では、集団の少なくとも10%（例えば、少なくとも11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）は、CARを発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞の集団の少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）は、CARを発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞の集団の少なくとも10%（例えば、少なくとも11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）は、アーマータンパク質、例えば、サイトカイン（例えば、分泌型サイトカインまたは膜結合型サイトカイン（例えば、IL-15、例えば、分泌型IL-15または膜結合型IL-15））を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞の集団の少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）は、アーマータンパク質、例えば、サイトカイン（例えば、分泌型サイトカインまたは膜結合型サイトカイン（例えば、IL-15、例えば、分泌型IL-15または膜結合型IL-15））を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞の集団の少なくとも10%（例えば、少なくとも11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）は、CAR及びアーマータンパク質、例えば、サイトカイン（例えば、分泌型サイトカインまたは膜結合型サイトカイン（例えば、IL-15、例えば、分泌型IL-15または膜結合型IL-15））を発現する。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞の集団の少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）は、CAR及びアーマータンパク質、例えば、サイトカイン（例えば、分泌型サイトカインまたは膜結合型サイトカイン（例えば、IL-15、例えば、分泌型IL-15または膜結合型IL-15））を発現する。

20

30

40

【0044】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される方法によって産生される、CARを発現するT細胞の集団を特徴とする。

【0045】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される方法によって産生される、CAR及び

50

アーマータンパク質を発現する T細胞の集団を特徴とする。いくつかの実施形態では、アーマータンパク質は、サイトカイン（例えば、分泌型サイトカインまたは膜結合型サイトカイン（例えば、IL-15、例えば、分泌型IL-15または膜結合型IL-15）である。

【0046】

本明細書に記載の本発明の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことが理解される。本明細書で使用する場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、別途指示されない限り、複数の対象を含む。

【0047】

本明細書で使用される場合の「約」という用語は、当業者に容易に公知となるそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書での「約」の値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（かつ説明する）。いくつかの場合では、「約」は、そのような変動が開示される方法を実施するために適切であるため、指定値から+20%、いくつかの事例では+10%、いくつかの事例では+5%、いくつかの事例では+1%、またはいくつかの事例では+0.1%の変動を包含する。

【0048】

本明細書で使用される場合、「操作された T細胞」という用語は、導入遺伝子（すなわち、操作された T細胞またはその親細胞に形質導入された遺伝子）を発現する T細胞を指す。

【0049】

本明細書で使用される場合、「プライミングされた T細胞」という用語は、培養条件によって影響を受けた出発集団（例えば、T細胞の内因性集団）を指す。いくつかの事例では、プライミングされた T細胞は、培養条件を経験する前のそのプライミングされていない対応物に対して異なる機能的ウイルス侵入受容体プロファイルを有する。いくつかの実施形態では、プライミングされた T細胞の集団は、T細胞の増殖した集団である。

【0050】

本明細書で使用される場合、「細胞の増殖した集団」とは、細胞の増殖、すなわち、細胞数の増加を誘導した条件及び持続時間で培養された T細胞を含む、造血細胞の集団を指す。同様に、本明細書で使用される場合の「V1 T細胞の増殖した集団」とは、V1 T細胞の増殖、すなわち、V1細胞数の増加を誘導した条件及び持続時間で培養されたV1 T細胞を含む、造血細胞の集団を指す。同様に、本明細書で使用される場合の「V2 T細胞の増殖した集団」とは、V2 T細胞の増殖、すなわち、V2細胞数の増加を誘導した条件及び持続時間で培養されたV2 T細胞を含む、造血細胞の集団を指す。

【0051】

本明細書で使用される場合、T細胞の「集団」とは、3つ以上の T細胞（例えば、少なくとも 10^1 、少なくとも 10^2 、少なくとも 10^3 、少なくとも 10^4 、少なくとも 10^5 、少なくとも 10^6 、少なくとも 10^7 、少なくとも 10^8 、少なくとも 10^9 、少なくとも 10^{10} 、少なくとも 10^{11} 、少なくとも 10^{12} 、または少なくとも 10^{13} 個の） T細胞（例えば、操作された T細胞）の群を指す。特定の細胞型の集団（例えば、内因性 T細胞の集団、プライミングされた T細胞の集団、または操作された T細胞の集団）は、その型の細胞を指し、より広範な集団内の異なる型の細胞を指さない。例えば、 10^8 個のT細胞の出発集団の細胞の10%が T細胞である場合、 T細胞の出発集団は、 10^7 個である。

【0052】

本明細書で使用される場合、「アーマータンパク質」とは、 T細胞（例えば、CARを発現する T細胞）によって発現されると、例えば、パラクリンシグナル伝達（例えば、サイトカインシグナル伝達）を通して、標的細胞に向けた T細胞の持続

10

20

30

40

50

性免疫原性または増加した免疫原性を増加させて、例えば、細胞持続性、細胞生存性、活性化、及び他の所望の特性を改善する、導入遺伝子によってコードされるタンパク質を指す。アーマータンパク質は、膜結合型タンパク質または可溶性タンパク質であり得る。例えば、アーマータンパク質は、膜結合型受容体（例えば、TCR、天然細胞傷害性受容体（例えば、NKp30、NKp44、またはNKp46）、サイトカイン受容体（例えば、IL-12受容体）、及び/またはケモカイン受容体（例えば、CCR2受容体）などの膜結合型タンパク質、及び/または膜結合型リガンドもしくはサイトカイン（例えば、膜結合型IL-15、膜結合型IL-7、膜結合型CD40L、膜結合型4-1BB、膜結合型4-1BBL、膜結合型CCL19）を含む。加えて、または代替的に、アーマータンパク質は、可溶性リガンドまたはサイトカイン（例えば、可溶性IL-15、可溶性IL-7、可溶性IL-12、可溶性CD40L、可溶性4-1BBL、及び/または可溶性CCL19）などの可溶性タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、アーマータンパク質は、抗原特異的ではない。

10

【0053】

本明細書で使用される場合、「IL-15」とは、1つ以上のIL-15受容体（IL-15R）サブユニット（例えば、その変異体、ムテイン、類似体、サブユニット、受容体複合体、断片、アイソフォーム、及びペプチド模倣体）のアゴニストとして作用する、天然もしくは組換えIL-15またはそのバリエーションを指す。IL-15は、IL-2のように、IL-2依存性細胞株、CTLL-2の増殖を支援することができる既知のT細胞増殖因子である。IL-15は、最初にGrabstein et al. (Science 264.5161:965-969, 1994)によって114アミノ酸成熟タンパク質として報告された。本明細書で使用される場合の「IL-15」という用語は、天然もしくは組換えIL-15、及びそのムテイン、類似体、サブユニット、またはその複合体（例えば、受容体複合体、例えば、PCT公開第WO2007/046006号に記載されるsushiペプチド）であり、その各々は、CTLL-2細胞の増殖を刺激することができる。CTLL-2増殖アッセイでは、組換えによって発現された前駆体でトランスフェクトされた細胞の上清及びIL-15の成熟型のフレーム内融合が、CTLL-2細胞増殖を誘導することができる。

20

【0054】

ヒトIL-15は、Grabstein et al. (Science 264.5161:965-969, 1994)によって記載される手順に従って、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの従来の手順によって、取得することができる。ヒトIL-15 cDNAの供託が、1993年2月19日にATCC(登録商標)で行われ、アクセッション番号69245を割り当てられた。

30

【0055】

ヒトIL-15のアミノ酸配列(遺伝子ID 3600)は、Genbankにおいて、アクセッションロケータNP000576.1 GI:10835153(アイソフォーム1)及びNP_751915.1 GI:26787986(アイソフォーム2)の下で見出される。マウス(ハツカネズミ)IL-15アミノ酸配列(遺伝子ID 16168)は、Genbankにおいて、アクセッションロケータNP_001241676.1 GI:363000984の下で見出される。

40

【0056】

IL-15はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、及びマウスを含む、様々な哺乳類種に由来するIL-15も指し得る。本明細書で言及される場合のIL-15「ムテイン」または「バリエーション」は、天然哺乳類IL-15の配列と実質的に相同であるが、アミノ酸欠失、挿入、または置換により、天然哺乳類IL-15ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を有する、ポリペプチドである。バリエーションは、所与のアミノ酸残基が、類似生理化学的特性を有する残基によって置き換えられることを意味する、保存的に置換された配列を含み得る。保存的置換の例としては、互いに対するIle、Val、Leu、もしくはAlaなどの1つの脂肪族残基の別の脂肪族残基に対する置換、またはLy

50

sとArgとの間、GluとAspとの間、もしくはGlnとAsnとの間などの1つの極性残基の別の極性残基に対する置換が挙げられる。他のそのような保存的置換、例えば、類似疎水性特性を有する領域全体の置換が、周知である。天然に存在するIL-15バリエーションもまた、本発明によって包含される。そのようなバリエーションの例は、交互のmRNAスプライシング事象から、またはIL-15結合特性が保持される、IL-15タンパク質のタンパク質分解切断から生じるタンパク質である。mRNAの交互のスプライシングは、切断型であるが生物学的に活性なIL-15タンパク質を生じさせ得る。タンパク質分解に起因するバリエーションとしては、例えば、IL-15タンパク質からの(一般的に、1~10個のアミノ酸からの)1つ以上の末端アミノ酸のタンパク質分解除去に起因する、異なるタイプの宿主細胞における発現時のN末端またはC末端の差異が挙げられる。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端は、例えば、ポリエチレングリコールなどの化学基を用いて、その物理的特性を改変するように修飾することができる(Yanget al. Cancer 76:687-694, 1995)。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端または内部は、追加のアミノ酸で修飾することができる(Clark-Lewis et al. PNAS 90:3574-3577, 1993)。

10

【0057】

本明細書で使用される場合、「非造血細胞」は、間質細胞及び上皮細胞を含む。間質細胞は、任意の臓器の非造血結合組織細胞であり、その臓器の実質細胞の機能を支援する。間質細胞の例としては、線維芽細胞、周皮細胞、間葉細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、及び非血液系腫瘍細胞が挙げられる。上皮細胞は、身体の全体を通した血管及び臓器の空洞及び表面を覆う非造血細胞である。それらは通常、形状がうろこ状、柱状、または立方体であり、細胞の単層として、または2つ以上の細胞の層として配置され得る。

20

【0058】

本明細書で使用される場合、「非造血組織常在 T細胞」、「非造血組織由来」、及び「非造血組織天然 T細胞」とは、組織が外植されるときに非造血組織に存在した T細胞を指す。非造血組織常在 T細胞は、任意の好適なヒトまたは非ヒト動物非造血組織から取得され得る。非造血組織は、血液または骨髄以外の組織である。いくつかの実施形態では、T細胞は、血液または滑液などの特定のタイプの生体液の試料から取得されない。そのような好適なヒトまたは非ヒト動物非造血組織の例としては、皮膚またはその一部(例えば、真皮または表皮)、胃腸管(例えば、胃腸上皮、結腸、小腸、胃、虫垂、盲腸、または直腸)、乳腺組織、肺(好ましくは、組織が気管支肺胞洗浄によって取得されない)、前立腺、肝臓、及び膵臓が挙げられる。いくつかの実施形態では、非造血組織常在 T細胞は、胸腺、脾臓、または扁桃腺などのリンパ組織に由来し得る。T細胞はまた、ヒトがん組織、例えば、乳房及び前立腺に常在し得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、ヒトがん組織から取得されない。非造血組織試料は、標準的技術、例えば、外植(例えば、生検)によって取得され得る。非造血組織常在 T細胞には、例えば、V₁ T細胞、二重陰性(DN) T細胞、V₂ T細胞、V₃ T細胞、及びV₅ T細胞が含まれる。

30

【0059】

本明細書で使用される場合、「有効な量で」という語句は、検出可能な結果を誘導する量(例えば、 $p < 0.05$ で、例えば、出発集団に対して統計的に有意な増加した数を有する細胞の数)を指す。

40

【0060】

本明細書で使用される場合、「細胞の増殖した集団」とは、細胞の増殖、すなわち、細胞数の増加を誘導した条件及び持続時間で培養された T細胞を含む、造血細胞の集団を指す。同様に、本明細書で使用される場合の「V₁ T細胞の増殖した集団」とは、V₁ T細胞の増殖、すなわち、V₁細胞数の増加を誘導した条件及び持続時間で培養されたV₁ T細胞を含む、造血細胞の集団を指す。同様に、本明細書で使用される場合の「V₂ T細胞の増殖した集団」とは、V₂ T細胞の増殖、すなわち、V₂細胞数の増加を誘導した条件及び持続時間で培養されたV₂ T細胞

50

を含む、造血細胞の集団を指す。

【0061】

本明細書の「マーカー」という用語は、DNA、RNA、タンパク質、炭水化物、糖脂質、または細胞ベースの分子マーカーを指し、患者の試料中のその発現または存在を、標準的方法（または本明細書に開示される方法）によって検出することができる。

【0062】

目的のマーカーを「発現する」細胞または細胞集団は、タンパク質をコードする mRNA、またはその断片を含むタンパク質自体が、細胞または集団に存在すると決定されるものである。マーカーの発現を、様々な手段によって検出することができる。例えば、いくつかの実施形態では、マーカーの発現とは、細胞上のマーカーの表面密度を指す。例えば、フローサイトメトリーの読み出しとして使用される場合の平均蛍光強度 (MFI) は、細胞集団上のマーカーの密度を表す。当業者は、MFI 値が染色パラメータ（例えば、濃度、持続時間、及び温度）ならびに蛍光色素組成物に依存することを理解するであろう。しかしながら、MFI は、適切な対照との関連で考慮されるときに定量的であり得る。例えば、細胞集団は、そのマーカーに対する抗体の MFI が、同等の条件下で染色された同じ細胞集団上の適切なアイソタイプ対照抗体の MFI よりも有意に高い場合に、マーカーを発現すると言われ得る。加えて、または代替的に、細胞集団は、従来のフローサイトメトリー分析方法に従って（例えば、アイソタイプまたは「蛍光マイナス1」（FMO）対照に従ってゲートを設定することによって）正及び負のゲートを使用して、細胞ごとにマーカーを発現すると言われ得る。このメトリックによって、集団は、マーカーに対して陽性と検出された細胞の数が（例えば、アイソタイプ対照上のゲーティングによって）バックグラウンドよりも有意に高い場合に、マーカーを「発現する」と言われ得る。

【0063】

本明細書で使用される場合、「VSV-G 侵入受容体の機能的発現」とは、ベータ-ラクタマーゼ-Vpr (Blam-VpR) ベースのアッセイによって測定される、標的細胞集団の少なくとも5%で検出可能なVSV-G 侵入を媒介するために十分なVSV-G 侵入受容体発現のレベルを指す。例えば、Cavrois et al., Nat Biotechnol. 11:1151-1154, 2002 を参照されたい。逆に、「VSV-G 侵入受容体の機能的発現を欠く」細胞集団では、細胞集団の95%超は、Blam-VpR ベースのアッセイによって測定される、検出可能なVSV-G 侵入を媒介するために十分なレベルのVSV-G 侵入受容体発現を欠く。

【0064】

本明細書で使用される場合、集団の発現が陽性細胞の割合として述べられ、その割合が参照集団の陽性細胞の対応する割合と比較されると、割合差は、各それぞれの集団の親集団の割合である。例えば、マーカーが集団Aの細胞の10%で発現され、同じマーカーが集団Bの細胞の1%で発現される場合、集団Aは、集団Bよりもマーカー陽性細胞の9%高い頻度（すなわち、 $10\% \div 1\%$ ではなく、 $10\% - 1\%$ ）を有すると言われる。頻度が親集団内の細胞の数で乗算されると、細胞の絶対数の差が計算される。上記に挙げられる例では、集団Aに100個の細胞があり、集団Bに10個の細胞がある場合、集団Aは、集団Bに対して100倍の細胞の数を有し、すなわち、 $(10\% \times 100) \div (1\% \times 10)$ である。

【0065】

マーカーの発現レベルは、核酸発現レベル（例えば、DNA発現レベルまたはRNA発現レベル、例えば、mRNA発現レベル）であり得る。核酸発現レベルを決定する任意の好適な方法が使用され得る。いくつかの実施形態では、核酸発現レベルは、qPCR、rtPCR、RNA-seq、多重qPCRもしくはRT-qPCR、マイクロアレイ分析、遺伝子発現の連続分析 (SAGE)、MASSARRAY (登録商標) 技術、インサイチュハイブリダイゼーション（例えば、FISH）、またはそれらの組み合わせを使用して決定される。

【0066】

本明細書で使用される場合、細胞の「参照集団」は、目的の細胞に対応する細胞集団を指し、これに対して目的の細胞の表現型が測定される。例えば、非造血組織由来の細胞の分離された集団上のマーカーの発現レベルは、造血組織由来の T 細胞（例えば、血液常在細胞、例えば、同じドナーまたは異なるドナーに由来する血液常在細胞）、または異なる条件下で（例えば、実質的な TCR 活性化の存在下で、外因性 TCR 活性化剤（例えば、抗 CD3）の存在下で、もしくは間質細胞（例えば、線維芽細胞）と実質的に接触して）増殖された非造血組織由来の T 細胞上の同じマーカーの発現レベルと比較され得る。集団はまた、以前の状態でのそれ自体と比較され得る。例えば、参照集団は、その増殖の前の分離された細胞集団であり得る。この場合、増殖された集団は、増殖ステップの前のそれ自体の組成物と比較され、すなわち、その過去の組成物は、この場合、参照集団である。

10

【0067】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」または代替的に「CAR」という用語は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び任意選択的に、細胞を活性化する活性化シグナル及び/または共刺激シグナルを伝播する細胞内ドメインを含む、組換えポリペプチド構築物を指す。いくつかの実施形態では、CARは、CAR融合タンパク質のN末端に任意選択的なリーダー配列を含む。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】広域トロピズム VSV-G 偽型レンチウイルスベクターが V₁ T 細胞を形質導入することができないことを示すグラフである。代表的なドットプロットは、増殖培養の7日目に様々な感染の多重度を使用して、VSV-G (A) または BaEV (B) 偽型の GFP をコードするレンチウイルスベクターで形質導入された T 細胞を示す。形質導入効率は、形質導入の72時間後に FACS 分析によって決定された。UTD、非形質導入対照；MOI、感染の多重度；NVP、ネビラピン（RT 阻害剤）。

20

【図2A】VSV-G 偽型の CAR をコードするレンチウイルスベクターを用いた V₁ T 細胞の形質導入が偽形質導入をもたらすことを示すグラフである。ネビラピンの存在または非存在下で、MOI = 1 において VSV-G 偽型の CAR をコードするレンチウイルスベクターを用いた形質導入の4日後（上段）または8日後（下段）の CAR 陽性 V₁ T 細胞の代表的なドットプロットを示す。UTD、非形質導入対照；MOI、感染の多重度；CAR、キメラ抗原受容体；NVP、ネビラピン。

30

【図2B】VSV-G 偽型の CAR をコードするレンチウイルスベクターを用いた V₁ T 細胞の形質導入が偽形質導入をもたらすことを示すグラフである。ネビラピンの存在または非存在下で、様々な MOI (MOI = 5 ~ 0.1) において VSV-G 偽型の CAR をコードするレンチウイルスベクターを用いた形質導入の4日後（黒い棒）または8日後（ドット付きの棒）の CAR 陽性 V₁ T 細胞の割合を示すグラフである。UTD、非形質導入対照；MOI、感染の多重度；CAR、キメラ抗原受容体；NVP、ネビラピン。

【図3A】サイトカインプライミングが BaEV 偽型レンチウイルスベクターによる V₁ T 細胞形質導入の主要な決定因子であることを示すグラフである。形質導入の3日後に GFP をコードする BaEV 偽型レンチウイルスベクターで MOI = 1 において形質導入された GFP 陽性 V₁ 細胞の割合を示す棒グラフである。細胞を、培養の開始時（0日目）、または増殖期の7日目、10日目、14日目、及び15日目に形質導入した。UTD、非形質導入対照；MOI、多重感染；GFP、緑色蛍光タンパク質；NVP、ネビラピン。

40

【図3B】サイトカインプライミングが BaEV 偽型レンチウイルスベクターによる V₁ T 細胞形質導入の主要な決定因子であることを示すグラフである。増殖培養の14日目に形質導入された細胞の代表的なドットプロットを示す。UTD、非形質導入対照；MOI、多重感染；GFP、緑色蛍光タンパク質；NVP、ネビラピン。

【図4A】V₁ T 細胞の形質導入効率が感染の多重度 (MOI) と相関するこ

50

とを示すグラフである。異なるMOIによるCARをコードするBaEV偽型レンチウイルスベクターを用いた形質導入の3日後のCAR陽性V₁細胞の割合を示す。細胞を増殖の10日目に形質導入した。UTD、非形質導入対照；MOI、感染の多重度；CAR、キメラ抗原受容体；NVP、ネビラピン。

【図4B】V₁ T細胞の形質導入効率が感染の多重度(MOI)と相関することを示すグラフである。MOI=5において形質導入されたCAR陽性細胞を示す代表的なドットプロットを示す。UTD、非形質導入対照；MOI、感染の多重度；CAR、キメラ抗原受容体；NVP、ネビラピン。

【図5A】BaEV偽型レンチウイルスベクターがV₁及び非V₁(V₂、V₃) T細胞の両方を形質導入することを示すグラフである。ドットプロットは、V₁及び非V₁(V₂、V₃) T細胞を発現するCAR(A)及びGFP(B)を示す。細胞をBaEV偽型ベクター(MOI=5)で形質導入し、汎T細胞上のゲーティング、続いて、V₁細胞上のゲーティングによって、形質導入効率を形質導入の3日後に決定した。

【図5B】BaEV偽型レンチウイルスベクターがV₁及び非V₁(V₂、V₃) T細胞の両方を形質導入することを示すグラフである。ドットプロットは、V₁及び非V₁(V₂、V₃) T細胞を発現するCAR(A)及びGFP(B)を示す。細胞をBaEV偽型ベクター(MOI=5)で形質導入し、汎T細胞上のゲーティング、続いて、V₁細胞上のゲーティングによって、形質導入効率を形質導入の3日後に決定した。

【図6】BaEV偽型レンチウイルスベクターを用いたV₁ T細胞の形質導入が反復形質導入によってさらに増強され得ることを示すグラフのセットである。V₁細胞を、10日目(1ヒット)または連続2日(2ヒット：10日目及び11日目)のいずれかに、BaEV偽型のCARをコードするレンチウイルスベクターでMOI=1において形質導入した。CAR陽性細胞の割合を形質導入の72時間後に決定した。

【図7】ベクトフシンの存在下での形質導入がレトロネクチンの存在下と同様に効率的であることを示すグラフである。V₁細胞を、様々なMOI及び様々な頻度(1または2ヒット)で、レトロネクチン(左)またはベクトフシン(右)の存在下で形質導入した。細胞を増殖の10日目に形質導入し、FACS分析を形質導入の3日後に行った。

【図8】V₁細胞がRD114偽型ウイルスベクターで形質導入され得ることを示すグラフのセットである。V₁細胞を、BaEV偽型のCARをコードするレンチウイルスベクターまたはRD114偽型ガンマレトロウイルスベクターでMOI=1において形質導入した。ドットプロットは、形質導入の3日後のCARを発現するV₁細胞を示す。

【発明を実施するための形態】

【0069】

本発明は、ウイルスベクター(例えば、ベータレトロウイルス偽型及びレトロウイルス科ウイルスベクター骨格を有するウイルスベクター)を用いた形質導入によってT細胞(例えば、v₁T細胞及びv₂T細胞)を操作する方法を提供する。操作されたT細胞の組成物及び同組成物を使用する方法がさらに提供される。

【0070】

本発明は、部分的に、T細胞がベータレトロウイルス偽型ウイルスベクターで高レベルまで形質導入され得るという予想外の発見に基づく。他のリンパ球型に対して、T細胞は、例えば、VSV-G偽型ウイルスベクターを使用する、レトロウイルス形質導入を許容しない。VSV-Gベクターは、T細胞に最も近い細胞型である、T細胞ならびにNK細胞を容易に形質導入する。したがって、ベータレトロウイルス偽型ウイルスベクターがT細胞を形質導入することができることは予期されなかった。さらに、本発明は、T細胞の集団をベクターで形質導入するためのウイルスベクターの存在下でのT細胞の最適な培養条件及び持続時間の発見にも基づく。本明細書に記載される形質導入の方法は、所望の導入遺伝子が発現するT細胞の操作された集団を産生するために、T細胞の効率的な形質導入を可能にする。

10

20

30

40

50

【0071】

形質導入の方法

一態様では、本発明は、 T 細胞（例えば、 V_1 T 細胞、 V_2 T 細胞、及び/または非 V_1/V_2 T 細胞）の集団を、ベータレトロウイルス偽型及びレトロウイルス科（例えば、レトロウイルス）ベクター骨格を含むウイルスベクターで形質導入することによって、操作された T 細胞の集団を産生する方法を提供する。レトロウイルスベクター骨格は、例えば、レンチウイルス骨格、ガンマレトロウイルス骨格、またはアルファレトロウイルス骨格であり得る。ベータレトロウイルス偽型は、例えば、BaEVまたはRD114であり得る。いくつかの実施形態では、ベータレトロウイルス偽型は、BaEVである。いくつかの実施形態では、ベータレトロウイルス偽型は、RD114である。

10

【0072】

別の態様では、本発明は、 T 細胞の出発集団を提供し、ウイルスベクターの非存在下で T 細胞をプライミングし、プライミングされた T 細胞の集団をウイルスベクターの存在下で、プライミングされた T 細胞の少なくとも3%（例えば、少なくとも4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て）を形質導入するために有効な量で培養することによって、操作された T 細胞の集団を産生する方法を提供する。いくつかの実施形態では、プライミングされた T 細胞の集団は、プライミングされた T 細胞の少なくとも5%を形質導入するために有効な量のウイルスベクターの存在下で培養される。いくつかの実施形態では、プライミングされた T 細胞の集団は、プライミングされた T 細胞の少なくとも20%を形質導入するために有効な量のウイルスベクターの存在下で培養される。

20

【0073】

プライミングされた T 細胞は、ウイルスベクターの非存在下で T 細胞の出発集団を培養することによって取得され得る。例えば、 T 細胞の出発集団は、少なくとも1時間（例えば、少なくとも2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日以上、例えば、約1時間～約14日、約6時間～約14日、約1日～約14日、約2日～約14日、約5日～約14日、約7日～約14日、約5日～約10日、約5日～約7日、または約7日～約10日）の第1の培養期間にわたって培養され得る。例えば、ウイルスベクターの非存在下で細胞を培養した後に、プライミングされた T 細胞が取得されると、プライミングされた T 細胞は、少なくとも1日（例えば、少なくとも2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日以上、例えば、約1日～約14日、約2日～約14日、約5日～約14日、約7日～約14日、約5日～約10日、約5日～約7日、または約7日～約10日）の第2の培養期間にわたってさらに培養され得る。第2の培養期間は、約1日～約14日（例えば、約3日～約14日、約3日～約12日、約4日～約1日、約5日～約10日、または約5日～約7日）であり得る。

30

40

【0074】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約10以下、例えば、約9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、または0.25以下の感染の多重度（MOI）においてプライミングされた T 細胞と培養される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約5以下の感染の多重度（MOI）においてプライミングされた T 細胞と培養される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約4以下の感染の多重度（MOI）においてプライミングされた T 細胞と培養される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約3以下の感染の多重度（MOI）においてプライミングされた T 細胞と培養される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約2以

50

下の感染の多重度 (MOI) においてプライミングされた T 細胞と培養される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約 1 以下の感染の多重度 (MOI) においてプライミングされた T 細胞と培養される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約 0.5 以下の感染の多重度 (MOI) においてプライミングされた T 細胞と培養される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約 0.25 以下の感染の多重度 (MOI) においてプライミングされた T 細胞と培養される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、約 0.25 ~ 約 10 (例えば、約 0.5 ~ 約 10、約 1 ~ 約 10、または約 1 ~ 約 5) の感染の多重度 (MOI) においてプライミングされた T 細胞と培養される。

【0075】

いくつかの実施形態では、T 細胞の形質導入は、形質導入効率を增强するための形質導入エンハンサーの使用を含む。好適な形質導入エンハンサーとしては、例えば、ベクトフシン、精子細胞、及び/またはレトロネクチンが挙げられる。本方法は、培養中に T 細胞を形質導入エンハンサーと接触させることを含み得る。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞をネビラピンと接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、T 細胞の形質導入は、ベータレトロウイルス偽型ウイルスベクターのウイルス侵入受容体である、ASC T-2 の T 細胞発現を増加させることができる、IL-15 で培地を補充することを含む。

【0076】

スピノキュレーション

本開示のいくつかの実施形態では、T 細胞は、(例えば、本明細書に記載される 1 つ以上の追加の薬剤と組み合わせて) ウイルスベクターと培養されている間に、例えば、遠心分離によってスピンされ得る。この「スピノキュレーション」プロセスは、例えば、約 200 x g ~ 約 2,000 x g の求心力で生じ得る。求心力は、例えば、約 300 x g ~ 約 1,200 x g (例えば、約 300 x g、400 x g、500 x g、600 x g、700 x g、800 x g、900 x g、1,000 x g、1,100 x g、または 1,200 x g 以上) であり得る。いくつかの実施形態では、T 細胞は、約 10 分 ~ 約 3 時間 (例えば、約 10 分、15 分、20 分、25 分、30 分、35 分、40 分、45 分、50 分、55 分、60 分、65 分、70 分、75 分、80 分、85 分、90 分、95 分、100 分、105 分、110 分、115 分、120 分、125 分、130 分、135 分、140 分、145 分、150 分、155 分、160 分、165 分、170 分、175 分、180 分以上) スピンされる。いくつかの実施形態では、T 細胞は、約 25 の温度などの室温でスピンされる。

【0077】

スピノキュレーションステップを伴う例示的な形質導入プロトコルは、例えば、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる、Millington et al., PLoS One 4:e6461, 2009、Guo et al., Journal of Virology 85:9824-9833, 2011、O'Doherty et al., Journal of Virology 74:10074-10080, 2000、及びFederico et al., Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools, Methods in Molecular Biology 1448, Chapter 4, 2016 に記載されている。

【0078】

ウイルスベクター

本明細書に記載される組成物及び方法は、T 細胞の効率的な形質導入のためのベータレトロウイルス偽型ウイルスベクターの使用を含む。ウイルスゲノムは、哺乳類細胞内への外因性遺伝子の効率的な送達に使用することができるベクターの豊富な供給源を提供する。ウイルスゲノムは、そのようなゲノム内に含まれるポリヌクレオチドが、典型的には、一般化または特殊形質導入によって哺乳類細胞の核ゲノムに組み込まれるため、遺

10

20

30

40

50

伝子送達のための特に有用なベクターである。これらのプロセスは、天然のウイルス複製サイクルの一部として生じ、遺伝子組み込みを誘導するために追加タンパク質または試薬を必要としない。ベータレトロウイルス偽型化され得るウイルスベクターの例としては、レトロウイルス（例えば、レトロウイルス科ウイルスベクター）が挙げられる。レトロウイルスの例は、トリ白血病肉腫、トリC型ウイルス、哺乳類C型、B型ウイルス、D型ウイルス、オンコレトロウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、ガンマレトロウイルス、スプマウイルス（Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, *Virology*, Third Edition (Lippincott-Raven, Philadelphia, (1996))）である。他の例は、マウス白血病ウイルス（MLV）、マウス肉腫ウイルス、マウス乳癌ウイルス、ウシ白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、ヒビ内因性ウイルス（BaEV）、テナガザル白血病ウイルス、メイソン・ファイザーサルウイルス、サル免疫不全ウイルス、サル肉腫ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、及びレンチウイルスである。本方法のためのベータレトロウイルスで偽型化され得るベクターの他の例は、例えば、その教示が参照により本明細書に組み込まれる、McVey et al. (米国特許第5,801,030号)に記載されている。

10

【0079】

レトロウイルスベクター

いくつかの事例では、本明細書に記載される方法及び組成物で使用されるウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。本明細書に記載される方法及び組成物で使用され得る1つのタイプのレトロウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。レトロウイルスのサブセットであるレンチウイルスベクター（LV）は、広範囲の分裂及び非分裂細胞型を高効率で形質導入し、導入遺伝子の安定した長期的発現をもたらす。LVをパッケージング及び形質導入するための最適化方略の概要は、Delenda, *The Journal of Gene Medicine* 6: S125, 2004で提供され、その開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0080】

レンチウイルスベースの遺伝子移入技術の使用は、目的の導入遺伝子が収容される、高度に欠失したウイルスゲノムを持つ組換えレンチウイルス粒子のインビトロ産生に依拠する。特に、組換えレンチウイルスは、(1)パッケージング構築物、すなわち、Gag-Pol前駆体をRev（代替的にトランスで発現される）とともに発現するベクター、(2)一般的に異種性質のエンベロープタンパク質を発現するベクター、及び(3)全てのオープンリーディングフレームを奪われているが、発現される配列が挿入される、複製、カプシド封入、及び発現に必要とされる配列を維持する、ウイルスcDNAからなる移入ベクターの許容細胞株におけるイントランス共発現を通して回収される。

30

【0081】

本明細書に記載される方法及び組成物で使用されるLVは、5'-長い末端反復（LTR）、HIVシグナル配列、HIV Psiシグナル5'-スプライス部位（SD）、デルタ-GAGエレメント、Rev応答エレメント（RRE）、3'-スプライス部位（SA）、伸長因子（EF）1-アルファプロモーター、及び3'-自己不活性化LTR（SIN-LTR）のうちの1つ以上を含み得る。レンチウイルスベクターは、任意選択的に、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、US6,136,597に記載される、中央ポリプリン管（cPPT）及びウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を含む。レンチウイルスベクターは、例えば、以下に提供されるものを含み得る、pHR'骨格をさらに含み得る。

40

【0082】

Lu et al., *Journal of Gene Medicine* 6: 963, 2004に記載されるLentigen LVが、DNA分子を発現し、及び/または細胞を形質導入するために使用され得る。本明細書に記載される方法及び組成物で使用

50

されるLVは、5' - 長い末端反復 (LTR)、HIVシグナル配列、HIV Psiシグナル5' - スプライス部位 (SD)、デルタ - GAGエレメント、Rev応答エレメント (RRE)、3' - スプライス部位 (SA)、伸長因子 (EF) 1 - アルファプロモーター、及び3' - 自己不活性化LTR (SIN - LTR) であり得る。任意選択的に、これらの領域のうちの一つ以上は、類似機能を実施する別の領域で置換されることが、当業者に容易に明らかになるであろう。

【0083】

エンハンサーエレメントが、修飾DNA分子の発現を増加させるか、またはレンチウイルス組み込み効率を増加させるために使用され得る。本明細書に記載される方法及び組成物で使用されるLVは、nef配列を含み得る。本明細書に記載される方法及び組成物で使用されるLVは、ベクターの組み込みを増強するcPPT配列を含み得る。cPPTは、(+)-鎖DNA合成の第2の起点として作用し、その天然HIVゲノムの中央に部分的な鎖の重複を導入する。移入ベクター骨格内のcPPT配列の導入は、核輸送及び標的細胞のDNAに組み込まれるゲノムの総量を強く増加させた。本明細書に記載される方法及び組成物で使用されるLVは、ウッドチャック転写後調節エレメント (WPRE) を含み得る。WPREは、転写産物の核輸出を促進することによって、及び/または新生転写産物のポリアデニル化の効率を増加させ、したがって、細胞内のmRNAの総量を増加させることによって、転写レベルで作用する。LVへのWPREの追加は、インビトロ及びインビボの両方で、いくつかの異なるプロモーターからの導入遺伝子発現レベルの大幅な改善をもたらす。本明細書に記載される方法及び組成物で使用されるLVは、cPPT配列及びWPRE配列の両方を含み得る。ベクターはまた、単一のプロモーターからの複数のポリペプチドの発現を可能にするIRES配列を含み得る。

【0084】

IRES配列に加えて、複数のポリペプチドの発現を可能にする他のエレメントが有用である。本明細書に記載される方法及び組成物で使用されるベクターは、1つより多くのポリペプチドの発現を可能にする複数のプロモーターを含み得る。本明細書に記載される方法及び組成物で使用されるベクターは、1つより多くのポリペプチドの発現を可能にするタンパク質切断部位を含み得る。1つより多くのポリペプチドの発現を可能にするタンパク質切断部位の例は、Klump et al., Gene Ther.; 8: 811, 2001、Osborn et al., Molecular Therapy 12: 569, 2005、Szymczak and Vignali, Expert Opin Biol Ther. 5: 627, 2005、及びSzymczak et al., Nat Biotechnol. 22: 589, 2004に記載されており、それらの開示は、1つより多くのポリペプチドの発現を可能にするタンパク質切断部位に関するため、参照により本明細書に組み込まれる。将来同定される複数のポリペプチドの発現を可能にする他のエレメントが有用であり、本明細書に記載される組成物及び方法とともに使用するために好適なベクターで利用され得ることが、当業者に容易に明らかであろう。

【0085】

本明細書に記載される組成物及び方法と併せて使用され得る他のレトロウイルスベクター (例えば、レトロウイルス骨格) には、ガンマレトロウイルスベクターが含まれる。例示的なガンマレトロウイルスベクターは、ニワトリ合胞体ウイルス、ネコ白血病ウイルス、フィンケル・ビスキス・ジンキンスマウス肉腫ウイルス、ガードナー・アーンスタインネコ肉腫ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、モルモットC型オンコウイルス、ハーディ・ザッカーマンネコ肉腫ウイルス、ハーベイマウス肉腫ウイルス、キルステンマウス肉腫ウイルス、コアラレトロウイルス、モロニーマウス肉腫ウイルス、マウス白血病ウイルス、ブタC型オンコウイルス、細網内皮症ウイルス、スナイダー・ザイレンネコ肉腫ウイルス、トレーガーアヒル脾臓壊死ウイルス、マムシレトロウイルス、及びウーリーモンキー肉腫ウイルスであるか、またはこれらに由来する。

【0086】

ある特定の実施形態では、ウイルスベクター骨格は、レンチウイルス (LV) に由来す

る。ある特定の実施形態では、ウイルスベクター骨格は、第三世代自己不活性化 (SIN) レンチウイルスベクター (LV) (例えば、HIV、SIV、またはEIAV) に由来する。ある特定の実施形態では、ウイルスベクター骨格は、自己不活性化ではないLV (例えば、) に由来する。

【0087】

本明細書に記載される組成物及び方法と併せて使用され得る他のレトロウイルスベクター (例えば、レトロウイルス骨格) には、アルファレトロウイルスベクターが含まれる。例示的なアルファレトロウイルスベクターは、トリがんミルヒルウイルス2、トリ白血病ウイルス、トリ骨髄芽腫症ウイルス、トリ骨髄腫症ウイルス29、トリ肉腫ウイルスct10、藤浪肉腫ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、及びy73肉腫ウイルスであるか、またはこれらに由来する。

【0088】

ベータレトロウイルス偽型

本明細書に記載される組成物及び方法と併せて使用されるウイルスベクターには、ベータレトロウイルス偽型エンベロープ遺伝子が含まれる。ベータレトロウイルスエンベロープ遺伝子は、正準B型またはD型ベータレトロウイルスに由来し得る。ベータレトロウイルス偽型は、任意の好適なベータレトロウイルスに由来し得る。ベータレトロウイルスには、例えば、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV)、地方病性鼻腫瘍ウイルス1型及び2型 (ENT-1及びENT-2)、サルレトロウイルス1型、2型 (SRV-1及びSRV-2)、及び3型、ヤークジークテヒツジレトロウイルス (JSRV)、リスザルレトロウイルス (SMRV)、フクロギツネ内因性D型レトロウイルス (TVERV-D)、ハツカネズミD型レトロウイルス (MusD)、サル内因性レトロウイルス (SERV)、メイソン・ファイザーサルウイルスMPMVが含まれる。いくつかの実施形態では、ベータレトロウイルスエンベロープ遺伝子は、非ベータレトロウイルスベクターに由来する。これらのウイルスは、組換え及び異種間伝播を通してベータレトロウイルス偽型を潜在的に獲得している。好適な例としては、BaEV、ネコレトロウイルスRD114、シンノンブルウイルス (SNV)、及び細網内皮症ウイルス (REV) が挙げられる。本明細書に記載される組成物及び方法と併せて使用され得るエンベロープ遺伝子には、その開示が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、Baillie et al., J. Virol. 78: 5784-5798, 2004に記載されるものが含まれる。

【0089】

T細胞

ガンマデルタT細胞 (T細胞) は、その表面上で明確に異なる決定的なT細胞受容体 (TCR) を発現するT細胞のサブセットを表す。このTCRは、1つのガンマ () 鎖及び1つのデルタ () 鎖から構成される。ヒトT細胞は、1つまたは2つのタイプ、すなわち、末梢血常在T細胞及び非造血組織常在T細胞として広く分類することができる。ほとんどの血液常在T細胞がV2TCRを発現する一方で、これは、より頻繁にV1及び/または他のV鎖を使用する組織常在T細胞の間ではあまり一般的ではない。本発明は、本明細書に記載されるように、所望の導入遺伝子をコードするウイルスベクターで形質導入されるT細胞を提供する。

【0090】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作されたT細胞の供給源として使用するための好適なT細胞には、V1細胞、V2細胞、V3細胞、V5細胞、及びV8細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、操作されたT細胞の集団は、V1細胞またはV2細胞の集団に由来する。いくつかの事例では、操作されたT細胞の集団は、非V1/V2T細胞の集団に由来する。いくつかの事例では、操作されたT細胞の集団は、V1細胞及びV2細胞の混合集団に由来する。

【0091】

本明細書に記載されるT細胞 (例えば、内因性T細胞またはプライミング

10

20

30

40

50

された T 細胞)は、水疱性口内炎ウイルス G 糖タンパク質 (VSV-G) 侵入受容体 (例えば、LDL) を欠き得る。 T 細胞 (例えば、内因性 T 細胞またはプライミングされた T 細胞) は、ASCT-1 及び/または ASCT-2 を発現し得る。 ASCT-1 及び/または ASCT-2 の発現は、ベータレトロウイルス偽型ベクター (例えば、BaEV 及び RD114) を用いた形質導入を可能にし得る。 VSV-G の発現の欠如は、VSV-G 偽型ベクターを用いた形質導入を妨げ得る。

【0092】

一態様では、本発明は、膜結合型タンパク質 (例えば、キメラ抗原受容体 (CAR) などの膜結合型タンパク質)、 TCR、天然細胞傷害性受容体 (例えば、NKp30、NKp44、または NKp46)、サイトカイン受容体 (例えば、IL-12 受容体)、ケモカイン受容体 (例えば、CCR2 受容体)、及び/または膜結合リガンドもしくはサイトカイン (例えば、膜結合型 IL-15、膜結合型 IL-7、膜結合型 CD40L、膜結合型 4-1BB、膜結合型 4-1BBL、膜結合型 CCL19)、可溶性タンパク質 (例えば、可溶性リガンドもしくはサイトカイン、例えば、可溶性 IL-15、可溶性 IL-7、可溶性 IL-12、可溶性 CD40L、可溶性 4-1BBL、及び/または可溶性 CCL19)、選択可能マーカー (例えば、レポーター遺伝子)、または自殺遺伝子をコードし得る、1つ以上の導入遺伝子を発現するように操作された T 細胞の集団を提供する。いくつかの事例では、本発明は、CAR 及び1つ以上の追加の導入遺伝子によってコードされたタンパク質 (例えば、アーマータンパク質) を発現するように操作された T 細胞の集団を提供する。いくつかの実施形態では、1つ以上の導入遺伝子は、コドン最適化される。

【0093】

いくつかの実施形態では、 T 細胞は、導入遺伝子をコードするウイルスベクターで形質導入される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかのそのような実施形態では、細胞は、導入遺伝子を安定的に発現し得る。いくつかの実施形態では、細胞は、導入遺伝子を一過性に発現し得る。

【0094】

一態様では、本発明は、操作された T 細胞 (例えば、少なくとも 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、または 10^{13} 個の細胞) の細胞集団 (例えば、単離された細胞集団) を特徴とし、細胞集団の少なくとも 3% (例えば、少なくとも 4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て) は、導入遺伝子 (例えば、CAR 及び/または1つ以上の追加のタンパク質) を発現する操作された T 細胞の集団である。

【0095】

T 細胞を採取し、増殖させる方法

本発明の操作された T 細胞は、任意の好適な自己もしくは同種異系 T 細胞またはその集団に由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される操作された T 細胞の供給源として使用するための好適な T 細胞には、V₁ 細胞、V₂ 細胞、V₃ 細胞、V₅ 細胞、及び V₈ 細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、操作された T 細胞の集団は、V₁ 細胞または V₂ 細胞の集団に由来する。

【0096】

例えば、本明細書では、皮膚または腸などの非造血組織から V₁ 細胞を分離し、増殖させる方法が提供される。他の実施形態では、好適な T 細胞は、血液 (例えば、末梢血) に由来し得る。血液から V₁ 細胞を単離し、増殖させる方法には、例えば、各々が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、米国特許第 9,499,788 号及び国際特許公開第 WO 2016/198480 号に記載されるものが含まれる。いくつか

の実施形態では、好適な T細胞は、腫瘍組織（例えば、腫瘍浸潤性 T細胞）に由来し得る。代替的に、導入遺伝子を発現するように操作され得る好適な T細胞は、以下に記載される方法に従って、非造血組織に由来し得る。

【0097】

血液からの T細胞の単離及び増殖

いくつかの実施形態では、本発明の操作された T細胞は、対象の血液（例えば、末梢血）に由来する。例えば、操作された T細胞は、血液由来の V2細胞または血液由来の V1細胞に由来し得る。

【0098】

いくつかの実施形態では、末梢血単核細胞（PBMC）は、当技術分野で公知である任意の好適な方法に従って、対象から取得することができる。PBMCは、IL-2の存在下で1~2週間、アミノピスホスホネート（例えば、ゾレドロン酸）、合成ホスホ抗原（例えば、プロモヒドリンピロリン酸塩；BrHPP）、2M3B1PP、または2-メチル-3-ブテニル-1-ピロリン酸塩の存在下で培養されて、V2細胞の濃縮集団を生成することができる。代替的に、固定化された抗TCR（例えば、汎TCR）は、IL-2の存在下で、例えば、約14日間、PBMCの集団からのV2細胞の優先的な増殖を誘導することができる。いくつかの実施形態では、PBMCからのV2細胞の優先的な増殖は、IL-2及びIL-4の存在下での固定化された抗CD3抗体（例えば、OKT3）の培養時に達成することができる。いくつかの実施形態では、前述の培養は、可溶性抗CD3、IL-2、及びIL-4中の継代培養の前に約7日間維持される。代替的に、人工抗原提示細胞を使用して、V2細胞などの T細胞の優先的な増殖を促進することができる。例えば、照射されたaAPC、IL-2、及び/またはIL-21の存在下で培養されるPBMC由来の T細胞は、増殖して、高い割合のV2細胞、中程度の割合のV1細胞、及びいくつかの二重陰性細胞を含む、 T細胞の集団を生成することができる。前述の方法のいくつかの実施形態では、PBMCは、（例えば、TCR 特異的薬剤を用いた陽性選択またはTCR 特異的薬剤の陰性選択を通して）事前濃縮または事後濃縮することができる。V2細胞などの T細胞の増殖のためのそのような方法及び他の好適な方法は、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、Deniger et al., Frontiers in Immunology 5, 636:1-10, 2014に記載されている。

【0099】

いくつかの実施形態では、V1 T細胞は、導入遺伝子（例えば、異種標的構築物）を発現するように操作することができる。V1 T細胞の集団を取得する任意の好適な方法を使用することができる。例えば、参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、Almeida et al. (Clinical Cancer Research, 22, 23; 5795-5805, 2016)は、本明細書に記載される異種標的構築物を発現するように操作され得るV1 T細胞の集団を取得する好適な方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、PBMCは、90%を超える T細胞を生じさせ得る、磁気ビーズ選別を使用して事前濃縮される。これらの細胞は、ガス透過性バイオリアクターバッグ内で最大21日間、1つ以上の因子（例えば、TCRアゴニスト、共受容体アゴニスト、及び/またはサイトカイン、例えば、IL-4、IL-15、及び/またはIFN-）の存在下で培養することができる。本方法の変形例、及びV1 T細胞を取得する他の方法は、本発明の一部として好適である。例えば、血液由来V1 T細胞は、代替的に、例えば、各々が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、米国特許第9,499,788号及び国際特許公開第WO2016/198480号に記載される方法を使用して取得することができる。

【0100】

非造血組織からの非造血組織常在 T細胞の分離及び増殖

以下に記載されるように取得される非造血組織常在 T細胞は、良好な腫瘍浸潤及び保持能力を示すことができるため、本明細書に記載される導入遺伝子のための好適なビ

10
20
30
40
50

ヒクルであり得る。非造血組織常在 T細胞の単離及び増殖のためのより詳細な方法は、例えば、各々が参照によりその全体で本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2020/095058号、同第WO2020/095059号、同第WO2017/072367号、及び英国特許出願第2006989.4号に記載されている。

【0101】

非造血組織常在 T細胞（例えば、皮膚由来の T細胞及び/または非V2 T細胞、例えば、V1 T細胞及び/またはDN T細胞）は、本発明の方法による操作に好適な細胞を取得するために患者から摘出され得る、任意のヒトまたは非ヒト動物非造血組織から単離することができる。いくつかの実施形態では、T細胞が由来し、増殖される非造血組織は、当技術分野で公知の方法によって取得することができる皮膚（例えば、ヒト皮膚）である。いくつかの実施形態では、皮膚は、パンチ生検によって取得される。代替的に、本明細書で提供される T細胞の単離及び増殖の方法は、胃腸管（例えば、結腸）、乳腺、肺、前立腺、肝臓、脾臓、及び膵臓に適用することができる。

T細胞はまた、ヒトがん組織、例えば、乳房または前立腺の腫瘍に常在し得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、ヒトがん組織（例えば、固形腫瘍組織）に由来し得る。他の実施形態では、T細胞は、ヒトがん組織以外の非造血組織（例えば、相当数の腫瘍細胞を含まない組織）に由来し得る。例えば、T細胞は、近くのまたは隣接するがん組織から分離している皮膚の領域（例えば、健康な皮膚）に由来し得る。

【0102】

血液中で優勢である T細胞が、主にV2 T細胞である一方で、非造血組織中で優勢である T細胞は、V1 T細胞が非造血組織常在 T細胞集団の約70~80%を含むように、主にV1 T細胞である。しかしながら、いくつかのV2 T細胞は、非造血組織、例えば、腸でも見出され、それらは、T細胞の約10~20%を含むことができる。非造血組織に常在するいくつかの T細胞は、V1もV2 TCRも発現せず、それらは二重陰性（DN） T細胞と名付けられている。これらのDN T細胞は、ほとんどがV3発現であり、少数のV5発現T細胞を含む可能性が高い。したがって、通常、非造血組織に常在し、本発明の方法によって増殖される T細胞は、好ましくは、より少量のDN T細胞を含む、非V2 T細胞、例えば、V1 T細胞である。

【0103】

いくつかの実施形態では、重要なステップは、例えば、数日または数週間の培養後に、（例えば、細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、並びに2及び非2 T細胞を含み得る、例えば、混合リンパ球集団内の）非造血組織常在T細胞を、T細胞が取得された組織の非造血細胞（例えば、間質細胞、特に、線維芽細胞）から意図的に分離することである。これは、非造血組織由来のV1 T細胞及びDN T細胞の以降の数日間及び数週間にわたる優先的かつ急速な増殖を可能にする。

【0104】

一般に、非造血組織常在 T細胞は、間質細胞（例えば、皮膚線維芽細胞）との物理的接触の除去時に、自発的に増殖することが可能である。したがって、上記に記載される足場ベースの培養方法を使用して、そのような分離を誘導し、T細胞の抑制解除をもたらして、増殖を誘発することができる。したがって、いくつかの実施形態では、実質的なTCR経路活性化が増殖ステップ中に存在しない（例えば、外因性TCR経路活性化因子が培養物に含まれない）。さらに、本発明は、非造血組織常在 T細胞を増殖させる方法を提供し、本方法は、支持細胞、腫瘍細胞、及び/または抗原提示細胞との接触を伴わない。

【0105】

増殖プロトコルは、効率的な T細胞の増殖を支援するために、生物学的因子の有効なカクテルの存在下で、非造血組織常在 T細胞を培養することを伴う。一実施形態では、T細胞を増殖させる方法は、非造血組織（例えば、非造血組織由来のT細胞の分離された集団、例えば、本明細書に記載される方法に従って分離される集団）

から取得された T 細胞の集団を提供することと、IL - 2 及び IL - 15、ならびに任意選択的に、IL - 1、IL - 4、及び / または IL - 21 の存在下で T 細胞を培養することと、を含む。これらのサイトカインまたはその類似体は、T 細胞の増殖された集団を産生するために有効な量で、ある持続時間にわたって（例えば、少なくとも 5 日間、少なくとも 6 日間、少なくとも 7 日間、少なくとも 8 日間、少なくとも 9 日間、少なくとも 10 日間、少なくとも 11 日間、少なくとも 12 日間、少なくとも 13 日間、少なくとも 14 日間、少なくとも 21 日間、少なくとも 28 日間以上、例えば、5 日 ~ 40 日間、7 日 ~ 35 日間、14 日 ~ 28 日間、または約 21 日間）細胞と培養することができる。

【0106】

完全培地、OPTIMIZER（商標）、AIM - V、Iscoves 培地、ならびに RPMI - 1640（Life Technologies）及び TEXMACS（商標）（Miltenyi Biotec）などの T 細胞のプライミング及び / または増殖に使用するために好適な多数の基礎培地が、利用可能である。培地は、血清、血清タンパク質、及び抗生物質などの選択的薬剤などの他の培地因子で補充され得る。例えば、いくつかの実施形態では、培地は、2 mM のグルタミン、10% の FBS、pH 7.2 で 10 mM の HEPES、1% のペニシリン - ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム（1 mM、Life Technologies）、非必須アミノ酸（例えば、100 µM の Gly、Ala、Asn、Asp、Glu、Pro、及び Ser、1X MEM 非必須アミノ酸 Life Technologies）、及び 10 µl / L の -メルカプトエタノールを含有する、RPMI - 1640 を含む。便宜的に、細胞は、好適な培地中で、5% CO₂ を含有する加湿雰囲気中で 37 °C において培養される。

【0107】

T 細胞は、攪拌タンク発酵槽、エアリフト発酵槽、ローラーボトル、培養バッグまたは皿、及び中空繊維バイオリクターなどの他のバイオリクターを含む、任意の好適なシステム内で本明細書に記載されるように培養され得る。そのようなシステムの使用は、当技術分野で周知である。リンパ球の培養のための一般的な方法及び技術は、当技術分野で周知である。

【0108】

本明細書に記載される方法は、1 つより多くの選択ステップ、例えば、1 つより多くの枯渇ステップを含むことができる。陰性選択による T 細胞集団の濃縮は、例えば、陰性選択された細胞に固有の表面マーカーを対象とした抗体の組み合わせを用いて達成することができる。1 つの方法は、陰性選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーを対象としたモノクローナル抗体のカクテルを使用する、陰性磁気免疫接着またはフローサイトメトリーを介した細胞選別及び / または選択である。

【0109】

導入遺伝子

本発明の操作された T 細胞は、所望の導入遺伝子を発現するように操作される。導入遺伝子を発現するように操作された T 細胞は、がん治療（例えば、免疫療法）で使用するために好適である。本明細書に記載されるウイルスベクターは、導入遺伝子をコードし、これは次いで、導入された T 細胞において安定的または一過性に発現される。本明細書に記載される組成物及び方法と併せて使用され得る導入遺伝子には、キメラ抗原受容体（CAR）が含まれる。

【0110】

いくつかの実施形態では、CAR は、CD19、CD20、ROR1、CD22、がん胎児性抗原、アルファフェトタンパク質、CA - 125、5T4、MUC - 1、上皮腫瘍抗原、前立腺特異的抗原、黒色腫関連抗原、変異 p53、変異 ras、HER2 / Neu、葉酸結合タンパク質、HIV - 1 エンベロープ糖タンパク質 gp120、HIV - 1 エンベロープ糖タンパク質 gp41、GD2、CD123、CD33、CD138、CD23、CD30、CD56、c - Met、メソテリン、GD3、HERV - K、IL - 11

10

20

30

40

50

Rアルファ、カップ鎖、ラムダ鎖、CSPG4、ERBB2、EGFRvIII、VEGFR2、組み合わせでのHER2-HER3、組み合わせでのHER1-HER2、NY-ESO-1、滑膜肉腫X切断点2(SSX2)、黒色腫抗原(MAGE)、T細胞によって認識される黒色腫抗原1(MART-1)、gp100、前立腺特異的抗原(PSA)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、g9d2、またはそれらの組み合わせを標的とする。

【0111】

いくつかの事例では、本発明の操作された T細胞によって発現される導入遺伝子は、選択可能マーカー(例えば、レポーター遺伝子)または自殺遺伝子を含む。例えば、細胞内シグナル伝達ドメインを欠く切断型上皮成長因子受容体(EGFR)は、例えば、毒性の場合に、抗EGFRモノクローナル抗体を使用するインビボ枯渇のための導入遺伝子として使用することができる。同様に、CD20は、抗CD20モノクローナル抗体を使用するインビボ枯渇のための導入遺伝子として使用することができる。別の例示的な導入遺伝子は、投与される操作された T細胞の薬物媒介制御を容易にするための自殺遺伝子である。自殺遺伝子の使用を通して、有害事象の場合に、修飾細胞を患者から枯渇させることができる。一実施例では、薬物結合ドメインが、カスパーゼ9アポトーシス促進分子に融合される。いくつかの事例では、導入遺伝子は、シトシンデアミナーゼである。いくつかの事例では、導入遺伝子は、チミジンキナーゼである。

10

【0112】

加えて、または代替的に、本開示の操作された Tによる発現のための導入遺伝子は、膜結合型受容体(例えば、TCR、天然細胞傷害性受容体(例えば、NKp30、NKp44、またはNKp46)、サイトカイン受容体(例えば、IL-12受容体)、及び/またはケモカイン受容体(例えば、CCR2受容体)などの膜結合型タンパク質、及び/または膜結合型リガンドもしくはサイトカイン(例えば、膜結合型IL-15、膜結合型IL-7、膜結合型CD40L、膜結合型4-1BB、膜結合型4-1BBL、膜結合型CCL19)をコードする。膜結合型リガンド及びサイトカインには、天然膜結合型リガンド及びサイトカイン(例えば、トランス提示されたIL-15及び4-1BBL)ならびに合成膜結合型構成(例えば、膜貫通タンパク質に人工的に融合されたリガンド)が含まれる。加えて、または代替的に、本発明の操作された T細胞によって発現される導入遺伝子は、可溶性リガンドまたはサイトカイン(例えば、可溶性IL-15、可溶性IL-7、可溶性IL-12、可溶性CD40L、可溶性4-1BBL、及び/または可溶性CCL19)などの可溶性タンパク質をコードする。

20

30

【0113】

いくつかの事例では、CARをコードする導入遺伝子を有する操作された T細胞は、免疫原性に寄与する追加の導入遺伝子で防御され得る。このような防御CAR T細胞は、本明細書に記載される膜結合型または可溶性タンパク質のうちのいずれかなどのアーマータンパク質を発現する。例えば、アーマータンパク質は、膜結合型受容体(例えば、TCR、天然細胞傷害性受容体(例えば、NKp30、NKp44、またはNKp46)、サイトカイン受容体(例えば、IL-12受容体)、及び/またはケモカイン受容体(例えば、CCR2受容体)などの膜結合型タンパク質、及び/または膜結合型リガンドもしくはサイトカイン(例えば、膜結合型IL-15、膜結合型IL-7、膜結合型CD40L、膜結合型4-1BB、膜結合型4-1BBL、膜結合型CCL19)を含む。加えて、または代替的に、本発明の操作された CAR T細胞によって発現されるアーマータンパク質は、可溶性リガンドまたはサイトカイン(例えば、可溶性IL-15、可溶性IL-7、可溶性IL-12、可溶性CD40L、可溶性4-1BBL、及び/または可溶性CCL19)などの可溶性タンパク質を含む。

40

【0114】

いくつかの実施形態では、本発明の操作された T細胞は、 T細胞を防御するための1つ以上の導入遺伝子(例えば、本明細書に記載される導入遺伝子のうちのいずれかの1つ以上)を発現するように操作される(例えば、参照によりその全体で本明細書

50

に組み込まれる、Yeku and Brentjens Biochem. Soc. Trans. 2016, 15:44, 2, 412-418に記載されるように、防御CAR T細胞として)。

【0115】

いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、コドン最適化される。

【0116】

いくつかの実施形態では、T細胞(例えば、V₁またはV₂細胞)の操作された集団の少なくとも3%(例えば、少なくとも4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て)が、導入遺伝子、例えば、CARまたは他の膜結合型もしくは可溶性タンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、T細胞(例えば、V₁またはV₂細胞)の操作された集団の少なくとも10%(例えば、少なくとも10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て)が、導入遺伝子、例えば、CARまたは他の膜結合型もしくは可溶性タンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、T細胞(例えば、V₁またはV₂細胞)の操作された集団の少なくとも50%(例えば、少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または実質的に全て)が、導入遺伝子、例えば、CARまたは他の膜結合型もしくは可溶性タンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、T細胞(例えば、V₁またはV₂細胞)の操作された集団の3%~95%(例えば、5%~95%、10%~95%、20%~95%、25%~95%、または50%~95%)が、導入遺伝子、例えば、CARまたは他の膜結合型もしくは可溶性タンパク質を発現する。いくつかの実施形態では、T細胞(例えば、V₁またはV₂細胞)の操作された集団の3%~90%(例えば、5%~90%、10%~90%、20%~90%、25%~90%、または50%~90%)が、導入遺伝子、例えば、CARまたは他の膜結合型もしくは可溶性タンパク質を発現する。

【実施例】

【0117】

材料及び方法

レトロウイルスベクターの産生及び滴定

ゲノム(GFPまたは抗CD19キメラ抗原受容体)、gag/pol、逆転写酵素(reverse)、及びエンベロープ(VSV-G、BaEV)をコードするプラスミドからなる第3世代自己不活性化ベクタープラットフォームを用いたHEK293細胞の一過性のトランスフェクションによって、レンチウイルスベクターを産生した。

【0118】

マウス白血病ウイルスゲノムプラスミド(GFPまたは抗CD19キメラ抗原受容体)を用いたFLYRD18細胞の一過性のトランスフェクションによって、ガンマレトロウイルスベクターを産生した。ベクターを、トランスフェクションの48時間後に採取し、0.45µm細孔径ポリエーテルスルホン(PES)フィルターを通して濾過し、低速遠心分離(4で6,000g)を使用して濃縮した。

【0119】

ベクター力価を、ポリブレン(8ug/mL)の存在下で、濃縮ベクター材料の連続希釈を伴うヒト子宮頸癌細胞株(HeLa)の形質導入によって決定した。形質導入の3日後に、BD FACS Lyriflowフローサイトメーターを使用して、形質導入効率を決定した。以下の式を使用して、感染力価(TU/mL)を計算した: $TU/mL = ((\text{形質導入細胞の数}) \times \text{ベクター希釈} \times (\text{形質導入効率} \% / 100)) / \text{ベクターの体積 (mL)}$ 。

10

20

30

40

50

【0120】

フローサイトメトリー

BD FACS Lyricフローサイトメーターを使用して、免疫表現型検査を実施した。PerCP-Vio700抗TCR / (Miltenyi)、APC抗TCR / (Miltenyi)、及びVioBlue抗TCR V1 (Miltenyi)抗体を使用して、細胞を表面マーカーの発現について分析した。eFluor 780固定可能生存性染料を使用して、生存細胞を検出した。FITC標識ヒトCD19タンパク質 (AcroBiosystems) を使用して、CAR19発現を検出した。

【0121】

T細胞の単離及び増殖

V1 T細胞濃縮生成物 (GDX012) を、Almeida et al. Clin. Cancer Res. 22: 5795-804, 2016に基づく修正されたプロトコルを使用して産生した。簡潔に述べると、2.5%の自己血漿及びGluta max (ThermoFisher) を補充した無血清培地 (CTS Optmizer, ThermoFisher) を使用して、枯渇末梢血単核細胞を増殖させた。単離された細胞を、組換えIL-4 [rIL4] (100 ng/mL)、組換えインターフェロン [rIFN] (70 ng/mL)、組換えIL-21 [rIL21] (7 ng/mL)、組換えIL-1 [rIL1] (15 ng/mL)、及び可溶性OKT-3抗CD3モノクローナル抗体 (70 ng/mL) の存在下で増殖させた。細胞を、加湿インキュベーター内で37 °C及び5% CO₂においてインキュベートした。増殖する細胞に、組換えIL-15 [rIL15] (70 ng/mL)、IFN- γ (30 ng/mL)、及びOKT3 (1 mg/mL) を含有する新鮮な培地を定期的に供給した。

【0122】

レトロウイルス形質導入

増殖する T細胞を、定義された感染の多重度 (MOI) においてレトロウイルスベクターで形質導入した。MOIとは、形質導入中に1つの細胞当たり添加された感染性粒子の数 (フローサイトメトリーによって測定される) を指す。T細胞 (1E+06/mL) を、レトロネクチンでコーティングされた (20 μ g/mL) 非組織培養処理24ウェルプレート内で、またはベクトフシン (1 μ g/mL) の存在下での24ウェルプレート内で形質導入した。ウイルスベクターを、(上記のように) サイトカイン、OKT-3、及び2.5%の自己血漿を補充したCTS Optmizer培地中で希釈した。T細胞及びベクターストックを、37 °Cで2時間、1,000 x gにおいてスピノキュレートした。一定の間隔で形質導入後3日後にフローサイトメトリーを使用して、形質導入効率を決定した。ある特定の試験では、逆転写酵素活性を阻害するために、培地を、10 μ Mの最終濃度における非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤であるネビラピン (NVP) で補充した。

【0123】

実施例1. 広域トロピズムVSV-G偽型レンチウイルスベクターは、T細胞を形質導入することができない

GFPをコードするレンチウイルスベクターを、それぞれ、水疱性口内炎ウイルスG (VSV-G) またはヒビ内因性ウイルス (BaEV) エンベロープで偽型化した。増殖した T細胞 (V1、V2、及び非V1/V2細胞からなる) を、定義された感染の多重度 (MOI) において濃縮ウイルスベクターストックで形質導入した。形質導入の3日後にフローサイトメトリーを使用して、形質導入効率を決定した。

【0124】

フローサイトメトリー分析は、VSV-G偽型レンチウイルスベクターが、高いMOI (MOI 50以上、図1A) でさえも T細胞を形質導入することができないことを明らかにした。反対に、BaEVエンベロープレレンチウイルスベクターを用いた形質導入は、低い感染の多重度でさえも高い形質導入効率をもたらした (図1B)。逆転写酵素

10

20

30

40

50

阻害剤 N V P を用いた T 細胞の前処理は、G F P 発現を無効にし、G F P 発現が V 1 細胞における形質導入及び G F P 発現の成功の結果であることを示した。

【 0 1 2 5 】

実施例 2 . V S V - G 偽型の C A R をコードするレンチウイルスベクターを用いた V 1 T 細胞の形質導入は、偽形質導入をもたらす

C A R 発現がベクター組み込みまたは偽形質導入の結果であったかどうかを決定するために、V 1 T 細胞を、ネビラピン (N V P) の存在または非存在下で、キメラ抗原受容体をコードするレンチウイルスベクターで形質導入した。ネビラピンは、ウイルス R N A の c D N A への逆転写を阻害することによってウイルス形質導入を阻止する逆転写酵素阻害剤である。したがって、ネビラピンの存在下でのレンチウイルスベクターに曝露された細胞のインキュベーションは、導入遺伝子発現を減少させるはずである。C A R 発現は、B a E V 偽型ベクターを用いた形質導入がネビラピンの存在下で実施されたときに完全に無効化され、C A R 発現が偽形質導入から生じないことを実証した (図 4 B 及び 図 6) 。逆に、ネビラピンを用いた V 1 細胞の処理は、V S V - G 偽型レンチウイルスベクターで形質導入された細胞における C A R 発現を撤回しなかった。この結果は、V S V - G 偽型ベクターが V 1 細胞を形質導入することができず、導入遺伝子 (C A R) 発現が偽形質導入の結果であることを実証する。偽形質導入が、形質導入後 (形質導入の 4 日及び 8 日後) に長期間にわたって C A R 発現を監視することによってさらに確認された。F A C S 分析によってベクター処理細胞を監視することにより、C A R 発現が経時的に徐々に失われることが明らかになった (図 2 A) 。この現象はまた、N V P の存在または非存在下での様々な感染の多重度にわたって実証された (図 2 B) 。全体的に、結果は、V S V - G 偽型レンチウイルスベクターが T 細胞に侵入することができないことを示唆する。

【 0 1 2 6 】

実施例 3 . サイトカインプライミングは、B a E V 偽型レンチウイルスベクターによる V 1 T 細胞形質導入の主要な決定因子である

B a E V 形質導入効率が、T 細胞増殖中のサイトカインプライミングの長さに依存するかどうかを調べるために、V 1 細胞を細胞増殖プロセス中の異なる時点で形質導入した。細胞を、培養の開始時 (0 日目) 、または増殖期の 7 日目、10 日目、14 日目、及び 15 日目に M O I = 1 で形質導入した。形質導入細胞を、形質導入の 3 日後に G F P 発現についてフローサイトメトリーによって分析した。形質導入効率は、細胞増殖期中に徐々に増加し、15 日目に形質導入の最高レベルに達した (図 3 A) 。N V P を用いた細胞の処理は、G F P 発現がベクター組み込みの成功の結果であることを実証した (図 3 B) 。全体的に、結果は、初期「サイトカインプライミング」期が B a E V 偽型レンチウイルスベクターによる V 1 形質導入の成功に必要なことを示唆する。

【 0 1 2 7 】

実施例 4 . V 1 T 細胞の形質導入効率は、感染の多重度 (M O I) と相関する

B a E V 形質導入効率がウイルスベクター用量 (M O I) に依存するかどうかを調べるために、V 1 T 細胞を、増加する量の B a E V エンベロープ偽型の抗 C D 1 9 キメラ抗原受容体 (C A R) をコードするレンチウイルスベクターで形質導入した。形質導入の 3 日後に、細胞を C A R 発現についてフローサイトメトリーによって分析した。M O I を増加させることにより、形質導入 V 1 細胞の割合が有意に増加した (図 4 A) 。N V P の存在または非存在下の M O I = 5 における C A R 形質導入の代表的なドットプロットが、図 4 B に示される。

【 0 1 2 8 】

実施例 5 . B a E V 偽型レンチウイルスベクターは、V 1 及び非 V 1 (V 2 、 V 3) T 細胞の両方を形質導入する

B a E V 偽型ベクターが V 1 細胞を独占的に形質導入するか、または他の T 細胞サブタイプも形質導入することができるかどうかを試験するために、形質導入効率を汎及び V 1 細胞集団内で決定した。T 細胞を増殖させ、増殖の 10 日目に、M

MOI = 1においてGFPまたはCARをコードするBaEVエンベロープレンチウイルスベクターで形質導入した。汎及びV₁特異的抗体を使用したFACS分析は、BaEVエンベロープベクターがV₁及び非V₁(V₂、V₃、及びその他) T細胞の両方を形質導入することを明らかにした(図5)。

【0129】

実施例6．BaEV偽型レンチウイルスベクターを用いたV₁ T細胞の形質導入を、反復形質導入によってさらに増強することができる

連続的な形質導入が、増殖したV₁ T細胞におけるCAR発現をさらに増強することができるかどうかを決定するために、研究を行った。この目的のために、V₁細胞を、MOI = 1で、1回(10日目)または2回(10日目及び11日目)のいずれかで形質導入した。3日後、細胞を収集し、FACSによって分析した。フローサイトメトリー分析は、単一のベクターヒットでV₁細胞を効率的に形質導入することができ、これは、連日の二重形質導入によってさらに増強され得る効果であることを明らかにした(図6)。

【0130】

実施例7．ベクトフシンの存在下での形質導入は、レトロネクチンの存在下と同様に効率的である

形質導入エンハンサーの選択がV₁形質導入効率に何らかの影響を及ぼすかどうかを試験するために、2つの広く使用されている形質導入エンハンサー(レトロネクチン及びベクトフシン)を評価した。細胞増殖の10日目に、V₁細胞を、レトロネクチンまたはベクトフシンの存在下で、様々なMOIで形質導入し、形質導入効率を形質導入の3日後に決定した。FACS分析は、ベクトフシンがレトロネクチンと同様にレトロウイルス遺伝子移入を増加させるために効率的であることを明らかにした(図7)。

【0131】

実施例8．V₁細胞がRD114偽型ウイルスベクターで形質導入され得る

V₁ T細胞が他のベータレトロウイルスエンベロープ偽型ベクターによって形質導入され得るかどうかを試験するために、V₁ T細胞をまた、RD114エンベロープ偽型ガンマレトロウイルスベクターで形質導入した。細胞を以前のように増殖させ、増殖の10日目にMOI = 1で形質導入した。FACS分析は、BaEV偽型レンチウイルスベクターと同様に、RD114エンベロープガンマレトロウイルスベクターが、V₁ T細胞を高効率で形質導入することができることを明らかにした(図8)。

【0132】

他の実施形態

本明細書で記述される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各独立した刊行物または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示された場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0133】

本発明は、その具体的な実施形態に関連して記載されているが、さらなる修正が可能であり、本出願は、一般に、本発明の原理に従い、本発明が属する技術分野内の既知の実践または慣行内に入る本開示からのそのような逸脱を含む、本発明の任意の変形例、使用、または適応を網羅することを意図しており、本明細書で以前に記載された本質的特徴に適用され得、特許請求の範囲において以下に続くことが理解されるであろう。

【0134】

他の実施形態は、特許請求の範囲内である。

10

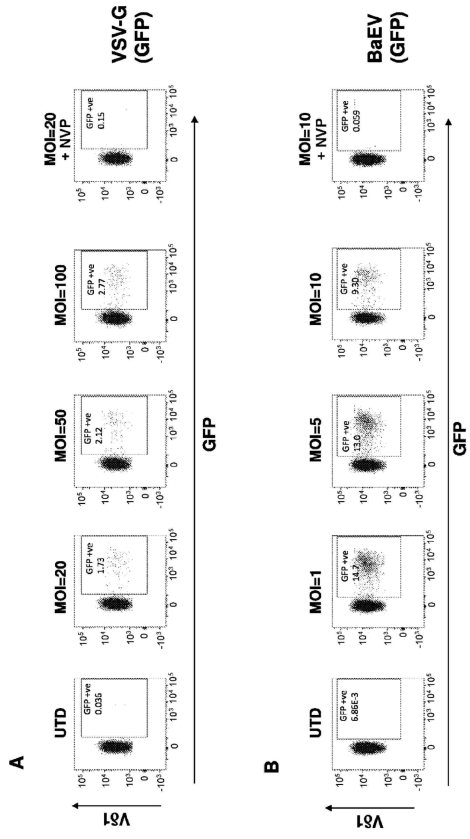
20

30

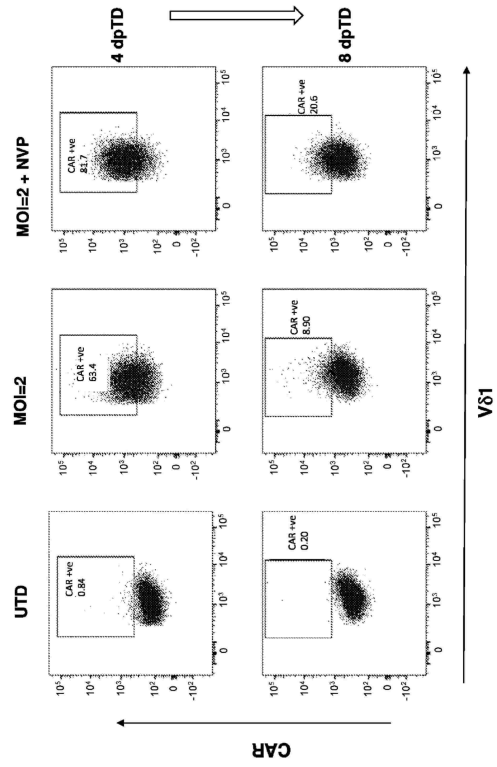
40

50

【 図 1 】



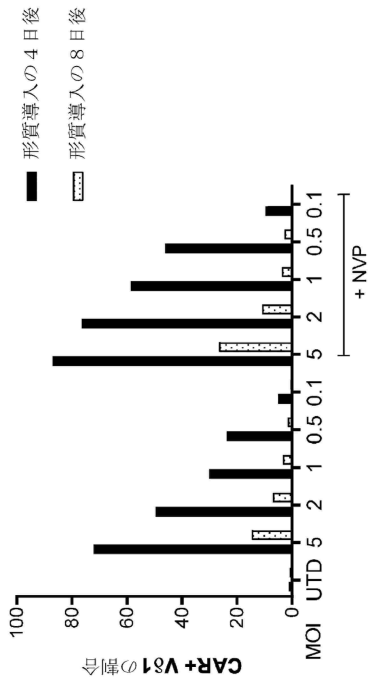
【 図 2 A 】



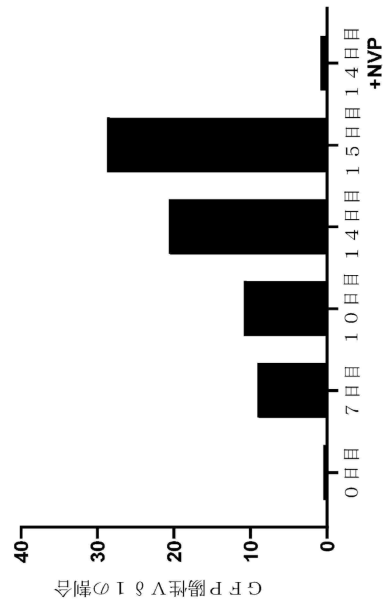
10

20

【 図 2 B 】



【 図 3 A 】

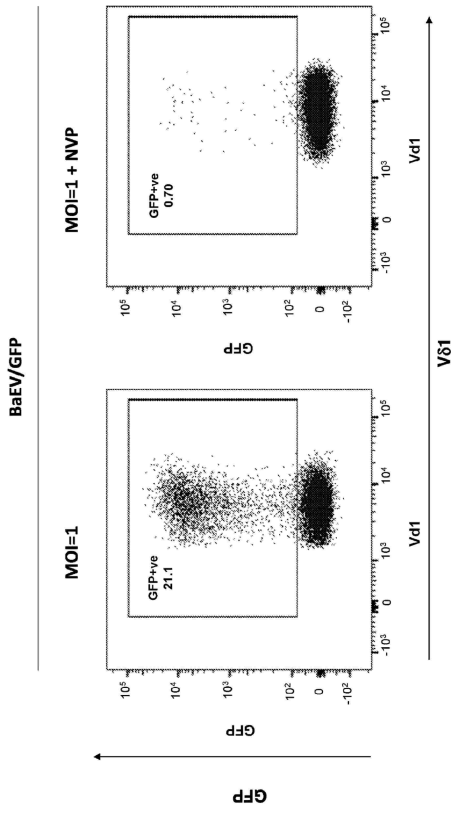


30

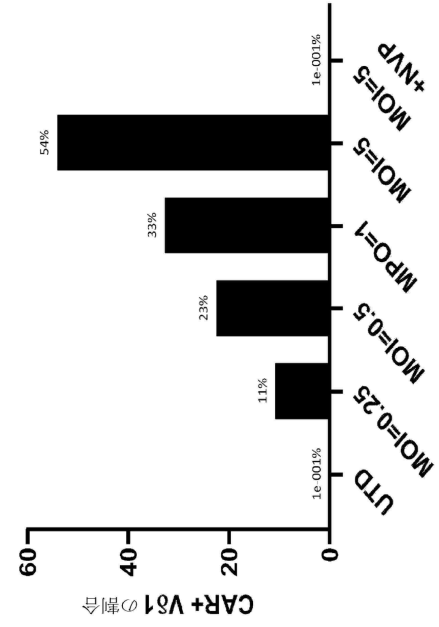
40

50

【 図 3 B 】



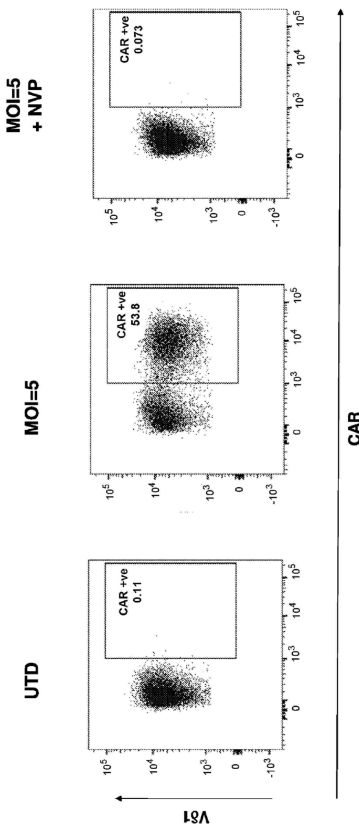
【 図 4 A 】



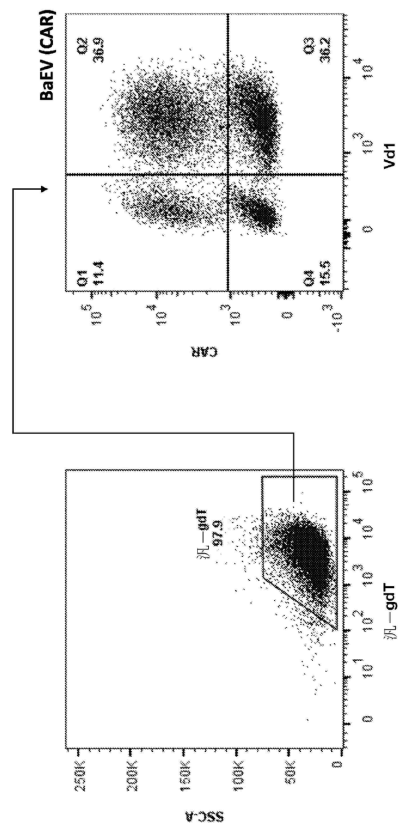
10

20

【 図 4 B 】



【 図 5 A 】

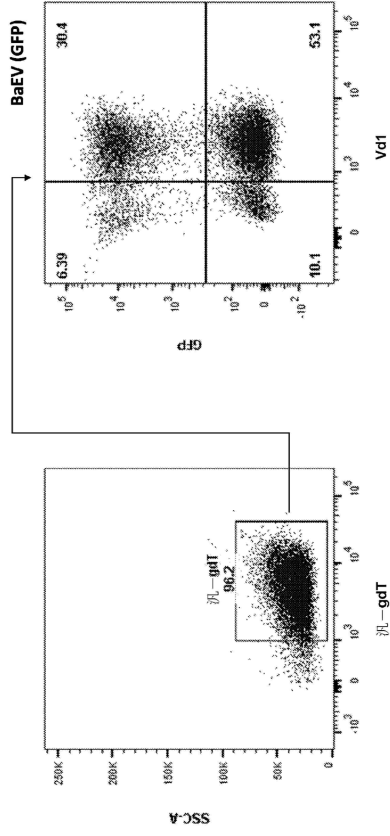


30

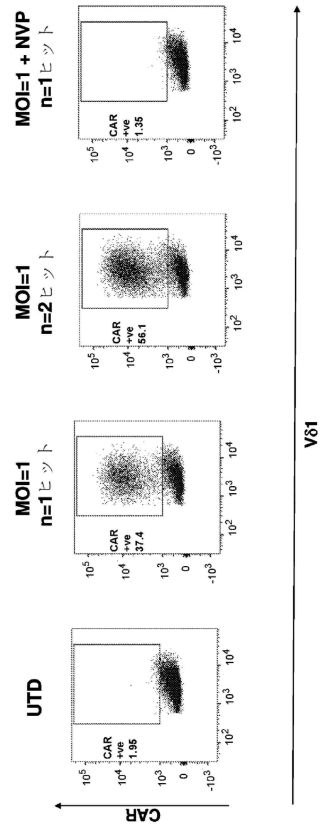
40

50

【 図 5 B 】



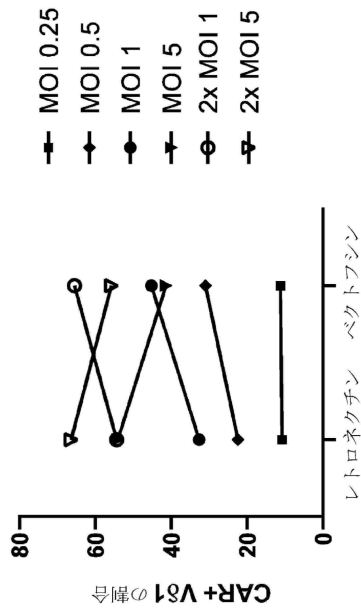
【 図 6 】



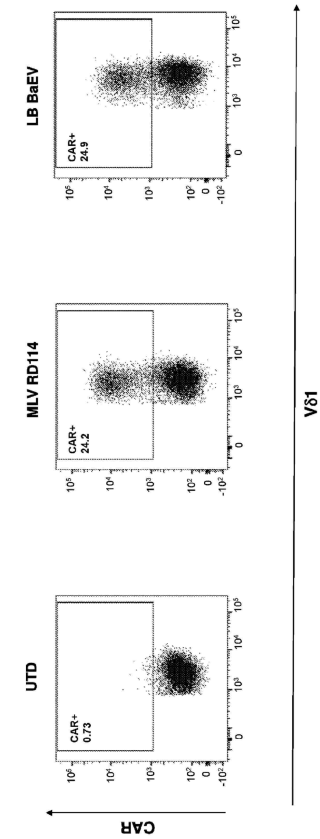
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】



30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/052039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/62 C12N5/0783 C12N15/867 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/104269 A1 (IMMATICS US INC [US]) 31 May 2019 (2019-05-31) claims 1-29; figures 8, 11; examples 1-6 -----	1-19, 21-119
X	JONATHAN FISHER ET AL: "Engineering Approaches in Human Gamma Delta T Cells for Cancer Immunotherapy", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 9, 26 June 2018 (2018-06-26), XP055564688, DOI: 10.3389/fimmu.2018.01409 page 1 - page 10 ----- -/--	1-119
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 November 2022		15/11/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Seranski, Peter

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2022/052039

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MAHBOUBEH YAZDANIFAR ET AL: "¶947;¶948; T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy", CELLS, vol. 9, no. 5, 24 May 2020 (2020-05-24), page 1305, XP055750075, DOI: 10.3390/cells9051305 page 1 - page 26</p> <p>-----</p>	1-119
X	<p>ANNA CAPSOMIDIS ET AL: "Chimeric Antigen Receptor-Engineered Human Gamma Delta T Cells: Enhanced Cytotoxicity with Retention of Cross Presentation", MOLECULAR THERAPY, vol. 26, no. 2, 1 February 2018 (2018-02-01), pages 354-365, XP055590617, US ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.12.001 page 354 - page 365</p> <p>-----</p>	1-119
A	<p>GUTIERREZ-GUERRERO ALEJANDRA ET AL: "Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for Research and Gene Therapy", VIRUSES, vol. 12, no. 9, 11 September 2020 (2020-09-11), page 1016, XP055946387, DOI: 10.3390/v12091016 the whole document</p> <p>-----</p>	1-119
A	<p>RUI¶8209;NING WANG ET AL: "Optimized protocols for ¶947;¶948; T cell expansion and lentiviral transduction", MOLECULAR MEDICINE REPORTS, 8 January 2019 (2019-01-08), XP055675198, GR ISSN: 1791-2997, DOI: 10.3892/mmr.2019.9831 the whole document</p> <p>-----</p>	1-119
A	<p>MALDINI COLBY R ET AL: "Dual CD4-based CAR T cells with distinct costimulatory domains mitigate HIV pathogenesis in vivo", NATURE MEDICINE, vol. 26, no. 11, 1 November 2020 (2020-11-01), pages 1776-1787, XP037297404, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/S41591-020-1039-5 the whole document</p> <p>-----</p>	1-119
	-----	-/--

1

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

page 2 of 3

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/052039

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BELL ANTHONY J JR ET AL: "RD114 envelope proteins provide an effective and versatile approach to pseudotype lentiviral vectors", EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, KARGER, BASEL, CH</p> <p>,</p> <p>vol. 235, no. 10</p> <p>1 October 2010 (2010-10-01), pages 1269-1276, XP009521713, ISSN: 1535-3699, DOI: 10.1258/EBM.2010.010053</p> <p>Retrieved from the Internet: URL:http://ebm.sagepub.com/cgi/reprint/235/10/1269</p> <p>[retrieved on 2010-10-01]</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-119

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2022/052039

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019104269 A1	31-05-2019	AU 2018372206 A1	18-06-2020
		CA 3083595 A1	31-05-2019
		CN 111727242 A	29-09-2020
		DE 102017127984 A1	29-05-2019
		EA 202091333 A1	25-08-2020
		EP 3717634 A1	07-10-2020
		JP 2021503959 A	15-02-2021
		KR 20200090233 A	28-07-2020
		SG 11202004910S A	29-06-2020
		TW 201925464 A	01-07-2019
		US 2019175650 A1	13-06-2019
		WO 2019104269 A1	31-05-2019

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 1 2 N 15/19 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 15/19

テーマコード (参考)

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,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 高島 一

(74)代理人

100125070

弁理士 土井 京子

(74)代理人

100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人

100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人

100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人

100152308

弁理士 中 正道

(74)代理人

100201558

弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者

コヴァックス、イストヴァン

イギリス国、ダブリュ127エフキュー ロンドン、ホワイト シティ プレイス、ウッド レーン
195、ウェストワークス、ガンマデルタ セラピューティクス リミティッド内

F ターム (参考)

4B065 AA94X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44