

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-508223

(P2024-508223A)

(43)公表日 令和6年2月26日(2024.2.26)

(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	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全53頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-544092(P2023-544092)
 (86)(22)出願日 令和4年1月28日(2022.1.28)
 (85)翻訳文提出日 令和5年7月20日(2023.7.20)
 (86)国際出願番号 PCT/US2022/014247
 (87)国際公開番号 WO2022/165133
 (87)国際公開日 令和4年8月4日(2022.8.4)
 (31)優先権主張番号 63/142,730
 (32)優先日 令和3年1月28日(2021.1.28)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 63/302,225
 (32)優先日 令和4年1月24日(2022.1.24)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
 最終頁に続く

(71)出願人 519089657
 アロジーン セラピューティクス, イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
 0 8 0 サウス サンフランシスコ イー
 スト グランド アベニュー 2 1 0
 (74)代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74)代理人 100103610
 弁理士 吉 田 和彦
 (74)代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74)代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
 (74)代理人 100123777
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫細胞を形質導入する方法

(57)【要約】

本明細書において、キメラ抗原受容体(CAR)などの外因性遺伝子産物を発現するレトロウイルスベクターを用いて、T細胞などの免疫細胞を形質導入するための改善された方法が提供される。本明細書において、形質導入効率を増加させ、それによって外因性遺伝子産物を発現する集団における免疫細胞の割合を増加させる方法が提供される。関連する細胞、細胞集団、組成物、および使用方法も提供される。

【選択図】図1

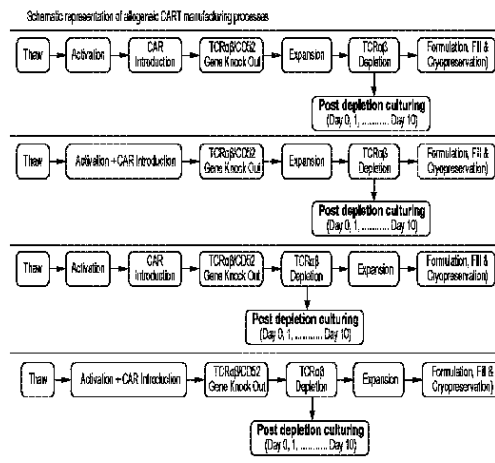


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レトロウイルスベクターを用いて細胞集団を形質導入する方法であって、前記ベクターが前記細胞に対して外因性である核酸を含み、前記方法が、

a) 前記細胞集団を選択することであって、選択された細胞集団が、Tリンパ球、ヘルパーT細胞、腫瘍細胞、メモリーT細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、末梢血リンパ球、末梢血単核細胞、樹状細胞、またはナチュラルキラー細胞もしくはそれらの混合物を含む、選択すること、および、

b) 前記選択された細胞集団を前記レトロウイルスベクターと共に、7.0~7.9の開始pH範囲内の開始pHで細胞培養培地中で培養することと、前記開始pH範囲内の前記開始pHを、形質導入培養工程の少なくとも最初の一時間維持して、前記外因性核酸によってコードされる遺伝子産物を発現する細胞を含む形質導入細胞集団をもたらすことと、を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記開始pHが、少なくとも約1、約2、約4、約6、約8、約10、約12、約14、約16、約18、約20、約22、約24、約36、約48、約72、または約96時間~約168時間を超えない時間の間、前記開始pH範囲内に維持される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記開始pHが、前記形質導入培養工程の終わりまでずっと、約7.0を超えて維持される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記形質導入培養工程が、少なくとも約1、約2、約4、約6、約8、約12、約14、約16、約18、約20、約22、約24、約36、約48、約72、または約96時間実施される、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞培養培地が、共同在化剤を含まない、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記細胞培養培地が、フィブロネクチンまたはフィブロネクチン誘導体を含まない、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記選択された細胞集団を、約.25、約.5、約1、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、または約50~約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約125、約150、約175、約200、約225、または約250のMOIで培養する、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記外因性核酸が、キメラ抗原受容体をコードする、請求項1~7のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記選択された細胞集団が、容器中で培養され、前記容器が、細胞培養プレート、細胞培養ディープウェルプレート、細胞スタック、制御されたバイオリアクター、振とうフラスコ、またはガス透過性バッグである、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項1~9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記形質導入培養工程が、前記選択された細胞集団および前記レトロウイルスベクターを、約0.5リットルの体積~約10リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含

50

む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記形質導入細胞集団の少なくとも約 35% ~ 約 95%、約 40% ~ 約 95%、約 50% ~ 約 95%、約 60% ~ 約 95%、または約 70% ~ 約 95% が、前記形質導入培養工程の開始から約 3 ~ 約 18 日後に前記外因性核酸遺伝子産物を発現する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記形質導入細胞集団の少なくとも約 35% ~ 約 95%、約 40% ~ 約 95%、約 50% ~ 約 95%、約 60% ~ 約 95%、または約 70% ~ 約 95% が、前記形質導入培養工程の開始から約 7 ~ 約 18 日後に前記外因性核酸遺伝子産物を発現する、請求項 1 ~ 12

10

【請求項 14】

前記開始 pH 範囲が受動的に維持される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記開始 pH 範囲が能動的に維持される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記選択された細胞集団が、同種細胞集団である、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 17】

前記選択された細胞集団が、自己細胞集団である、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

第一および第二の細胞集団を形質導入する方法であって、前記第一および第二の細胞集団が、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の同じ方法によって形質導入され、それにより、前記第一および第二の形質導入細胞集団において前記外因性核酸遺伝子産物を発現する前記形質導入細胞集団の割合が、約 2% ~ 約 5%、約 5% ~ 約 10%、約 10% ~ 約 20%、または約 20% ~ 約 30% を超えて異なる、方法。

【請求項 19】

ポリカチオンが前記細胞培養培地に添加されない、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 20】

ポリブレン、硫酸プロタミン、DEAE-デキストランが、前記培養培地に添加されない、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

レトロウイルスベクターを用いて細胞傷害性 T 細胞集団を形質導入する方法であって、前記ベクターが、前記細胞障害性 T 細胞に外因性である核酸を含み、前記方法が、前記細胞傷害性 T 細胞集団を前記レトロウイルスベクターと共に、7.0 ~ 7.9 の開始 pH 範囲内の開始 pH で細胞培養培地で培養することと、形質導入培養工程の少なくとも最初の

40

一時間、前記開始 pH 範囲内の前記開始 pH を維持して、前記外因性核酸によってコードされる前記遺伝子産物を発現する細胞を含む形質導入細胞傷害性 T 細胞集団をもたらすことと、を含み、ここで前記細胞培養培地が共局在化剤を含まない、方法。

【請求項 22】

前記開始 pH が、少なくとも約 1、約 2、約 6、約 8、約 10、約 12、約 14、約 16、約 18、約 20、約 22、約 24、約 36、約 48、約 72、または約 96 時間 ~ 約 168 時間を超えない時間の間、7.0 ~ 7.9 の開始 pH 範囲内に維持される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記開始 pH が、前記形質導入培養工程の終わりまでずっと、前記開始 pH 範囲内に維

50

持される、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記形質導入培養工程が、少なくとも約 1、約 2、約 4、約 6、約 8、約 1 2、約 1 4、約 1 6、約 1 8、約 2 0、約 2 2、約 2 4、約 3 6、約 4 8、約 7 2、または約 9 6 時間実施される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記共局在化剤がフィブロネクチンまたはフィブロネクチン誘導体である、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記細胞傷害性 T 細胞集団を、約 . 2 5、約 . 5、約 1、約 5、約 1 0、約 1 5、約 2 0、約 2 5、約 3 0、約 3 5、約 4 0、約 4 5、または約 5 0 ~ 約 5 5、約 6 0、約 6 5、約 7 0、約 7 5、約 8 0、約 8 5、約 9 0、約 9 5、約 1 0 0、約 1 2 5、約 1 5 0、約 1 7 5、約 2 0 0、約 2 2 5、または約 2 5 0 の M O I で培養する、請求項 2 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記外因性核酸が、キメラ抗原受容体をコードする、請求項 2 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記細胞傷害性 T 細胞集団が、容器中で培養され、前記容器が、細胞培養プレート、細胞培養ディープウェルプレート、細胞スタック、制御されたバイオリアクター、振とうフラスコ、またはガス透過性バッグである、請求項 2 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 2 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記形質導入培養工程が、前記細胞傷害性 T 細胞集団および前記レトロウイルスベクターを、約 0 . 5 リットルの体積 ~ 約 1 0 リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含む、請求項 2 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記形質導入細胞傷害性 T 細胞集団の 3 5 % ~ 約 9 5 %、約 4 0 % ~ 約 9 5 %、約 5 0 % ~ 約 9 5 %、約 6 0 % ~ 約 9 5 %、または約 7 0 % ~ 約 9 5 % が、前記形質導入培養工程の開始から 3 ~ 1 8 日後に前記外因性核酸遺伝子産物を発現する、請求項 2 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記形質導入細胞傷害性 T 細胞集団の 3 5 % ~ 約 9 5 %、約 4 0 % ~ 約 9 5 %、約 5 0 % ~ 約 9 5 %、約 6 0 % ~ 約 9 5 %、または約 7 0 % ~ 約 9 5 % が、前記形質導入培養工程の開始から 7 ~ 1 8 日後に前記外因性核酸遺伝子産物を発現する、請求項 2 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記開始 p H 範囲が受動的に維持される、請求項 2 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記開始 p H 範囲が能動的に維持される、請求項 2 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記細胞傷害性 T 細胞集団が、同種細胞傷害性 T 細胞集団である、請求項 2 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6】

前記細胞傷害性 T 細胞集団が、自己細胞傷害性 T 細胞集団である、請求項 2 1 ~ 3 4 の

いずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

第一および第二の細胞傷害性 T 細胞集団を形質導入する方法であって、前記第一および第二の細胞傷害性 T 細胞集団が、請求項 21 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法によって形質導入され、それにより、前記第一および第二の形質導入細胞傷害性 T 細胞集団において前記外因性核酸遺伝子産物を発現する前記形質導入細胞傷害性 T 細胞集団の割合が、約 2 % ~ 約 5 %、約 5 % ~ 約 10 %、約 10 % ~ 約 20 %、または約 20 % ~ 約 30 % を超えて異なる、方法。

【請求項 38】

ポリカチオンが前記細胞培養培地に添加されない、請求項 21 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 39】

ポリブレン、硫酸プロタミン、DEAE-デキストランが、前記培養培地に添加されない、請求項 21 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

レトロウイルスベクターを用いて、末梢血単核細胞の集団を形質導入する方法であって、前記ベクターが、前記末梢血単核細胞に外因性である核酸を含み、前記方法が、前記末梢血単核細胞集団を前記レトロウイルスベクターと共に、7.0 ~ 7.9 の開始 pH 範囲内の開始 pH で細胞培養培地で培養することと、形質導入培養工程の少なくとも最初の 1 時間、前記開始 pH 範囲内に前記開始 pH を維持して、前記外因性核酸によってコードされる前記遺伝子産物を発現する細胞を含む形質導入末梢血単核細胞集団をもたらすことと、を含み、ここで前記細胞培養培地が共同在化剤を含まない、方法。 20

【請求項 41】

前記開始 pH が、少なくとも約 1、約 2、約 4、約 6、約 8、約 10、約 12、約 14、約 16、約 18、約 20、約 22、約 24、約 36、約 48、約 72、または約 96 時間 ~ 約 168 時間を超えない時間の間、7.0 ~ 7.9 の開始 pH 範囲内に維持される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記開始 pH が、前記形質導入培養工程の終わりまでずっと、前記開始 pH 範囲内に維持される、請求項 40 に記載の方法。 30

【請求項 43】

前記形質導入培養工程が、少なくとも約 1、約 2、約 4、約 6、約 8、約 12、約 14、約 16、約 18、約 20、約 22、約 24、約 36、約 48、約 72、または約 96 時間実施される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記共同在化剤がフィブロネクチンまたはフィブロネクチン誘導体である、請求項 40 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記末梢血単核細胞集団を、約 .25、約 .5、約 1、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、または約 50 ~ 約 55、約 60、約 65、約 70、約 75、約 80、約 85、約 90、約 95、約 100、約 125、約 150、約 175、約 200、約 225、または約 250 の MOI で培養する、請求項 40 ~ 44 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 46】

前記外因性核酸が、キメラ抗原受容体をコードする、請求項 40 ~ 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記末梢血単核細胞集団が、容器中で培養され、前記容器が、細胞培養プレート、細胞培養ディープウェルプレート、細胞スタック、制御されたバイオリアクター、振とうフラスコ、またはガス透過性バッグである、請求項 40 ~ 46 のいずれか一項に記載の方法。 50

【請求項 48】

前記レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 40～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記形質導入培養工程が、前記末梢血単核細胞集団および前記レトロウイルスベクターを、約 0.5 リットルの体積～約 10 リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含む、請求項 40～48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記形質導入末梢血単核細胞集団の少なくとも約 35%～約 95%、約 40%～約 95%、約 50%～約 95%、約 60%～約 95%、約 70%～約 95%が、前記形質導入培養工程の開始から 3～18 日後に前記外因性核酸遺伝子産物を発現する、請求項 40～49のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 51】

前記形質導入末梢血単核細胞集団の少なくとも約 35%～約 95%、約 40%～約 95%、約 50%～約 95%、約 60%～約 95%、約 70%～約 95%が、前記形質導入培養工程の開始から 7～18 日後に前記外因性核酸遺伝子産物を発現する、請求項 40～50のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記開始 pH 範囲が受動的に維持される、請求項 40～51のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 53】

前記開始 pH 範囲が能動的に維持される、請求項 40～52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

前記末梢血単核細胞集団が同種末梢血単核細胞集団である、請求項 40～53のいずれかに記載の方法。

【請求項 55】

前記末梢血単核細胞集団が自己末梢血単核細胞集団である、請求項 40～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

第一および第二の末梢血単核細胞集団を形質導入する方法であって、前記第一および第二の末梢血単核細胞集団が、請求項 40～55のいずれか一項に記載の同じ方法によって形質導入され、それにより、前記第一および第二の形質導入末梢血単核細胞集団において前記外因性核酸遺伝子産物を発現する前記形質導入末梢血単核細胞集団の割合が、約 2%～約 5%、約 5%～約 10%、約 10%～約 20%、または約 20%～約 30%を超えて異なる、方法。

30

【請求項 57】

ポリカチオンが前記細胞培養培地に添加されない、請求項 40～56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

ポリブレン、硫酸プロタミン、DEAE-デキストランが、前記培養培地に添加されない、請求項 40～57のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 59】

レトロウイルスベクターを用いて、人工多能性幹細胞から誘導された T 細胞の集団を形質導入する方法であって、前記ベクターが、誘導 T 細胞 (derived T cell) に外因性である核酸を含み、前記方法が、前記誘導 T 細胞集団を前記レトロウイルスベクターと共に、7.0～7.9 の開始 pH 範囲内の開始 pH で細胞培養培地で培養することと、形質導入培養工程の少なくとも最初の一時間、前記開始 pH 範囲に前記開始 pH を維持して、前記外因性核酸によってコードされる前記遺伝子産物を発現する細胞を含む形質導入された誘導 T 細胞集団をもたらすことと、を含み、ここで前記細胞培養培地が共局

50

在化剤を含まない、方法。

【請求項 6 0】

前記開始 pH が、少なくとも約 1、約 2、約 6、約 8、約 10、約 12、約 14、約 16、約 18、約 20、約 22、約 24、約 36、約 48、約 72、または約 96 時間～約 168 時間を超えない時間の間、7.0～7.9 の開始 pH 範囲内に維持される、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記開始 pH が、前記形質導入培養工程の終わりまでずっと、前記開始 pH 範囲内に維持される、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記形質導入培養工程が、少なくとも約 1、約 2、約 4、約 6、約 8、約 12、約 14、約 16、約 18、約 20、約 22、約 24、約 36、約 48、約 72、または約 96 時間実施される、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記共局在化剤がフィブロネクチンまたはフィブロネクチン誘導体である、請求項 59～62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記誘導 T 細胞集団を、約 .25、約 .5、約 1、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、または約 50～約 55、約 60、約 65、約 70、約 75、約 80、約 85、約 90、約 95、約 100、約 125、約 150、約 175、約 200、約 225、または約 250 の MOI で培養する、請求項 59～63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記外因性核酸が、キメラ抗原受容体をコードする、請求項 59～64 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記誘導 T 細胞集団が、容器中で培養され、前記容器が、細胞培養プレート、細胞培養ディープウェルプレート、細胞スタック、制御されたバイオリアクター、振とうフラスコ、またはガス透過性バッグである、請求項 59～65 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記レトロウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 59～66 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記形質導入培養工程が、前記誘導 T 細胞集団および前記レトロウイルスベクターを、約 0.5 リットルの体積～約 10 リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含む、請求項 59～67 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記形質導入された誘導 T 細胞集団の少なくとも約 35%～約 95%、約 40%～約 95%、約 50%～約 95%、約 60%～約 95%、約 70%～約 95% が、前記形質導入培養工程の開始から 3～18 日後に前記外因性核酸遺伝子産物を発現する、請求項 59～68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記形質導入された誘導 T 細胞集団の少なくとも約 35%～約 95%、約 40%～約 95%、約 50%～約 95%、約 60%～約 95%、約 70%～約 95% が、前記形質導入培養工程の開始から 7～18 日後に前記外因性核酸遺伝子産物を発現する、請求項 59～69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記開始 pH 範囲が受動的に維持される、請求項 59～70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

10

20

30

40

50

前記開始 pH 範囲が能動的に維持される、請求項 59 ~ 70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 73】

前記誘導 T 細胞集団が、同種誘導 T 細胞集団である、請求項 59 ~ 72 のいずれかに記載の方法。

【請求項 74】

前記誘導 T 細胞集団が、自己誘導 T 細胞集団である、請求項 59 ~ 72 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

第一および第二の誘導 T 細胞集団を形質導入する方法であって、前記第一および第二の誘導 T 細胞集団が、請求項 59 ~ 74 のいずれか一項に記載の同じ方法によって形質導入され、それにより、前記第一および第二の形質導入された誘導 T 細胞集団において前記外因性核酸遺伝子産物を発現する前記形質導入された誘導 T 細胞集団の割合が、2% ~ 5%、5% ~ 10%、10% ~ 20%、または 20% ~ 30% を超えて異なる、方法。

10

【請求項 76】

ポリカチオンが前記細胞培養培地に添加されない、請求項 59 ~ 75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

ポリブレン、硫酸プロタミン、DEAE-デキストランが、前記培養培地に添加されない、請求項 59 ~ 76 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 78】

請求項 1 ~ 77 のいずれか一項に記載の方法によって産生された遺伝子改変細胞。

【請求項 79】

請求項 1 ~ 78 のいずれか一項に記載の方法によって産生された遺伝子改変細胞の集団。

【請求項 80】

請求項 78 または 79 に記載の細胞または細胞集団を含む治療用組成物。

【請求項 81】

対象において疾患を治療する方法であって、それを必要とする前記対象に、請求項 1 ~ 77 のいずれか一項に記載の方法によって産生される細胞の治療有効量を投与することを含む、方法。

30

【請求項 82】

対象において疾患を治療する方法であって、それを必要とする前記対象に、請求項 80 に記載の治療用組成物の治療有効量を投与することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年1月28日に出願された米国仮特許出願第63/142,730号および2022年1月24日に出願された米国仮特許出願第63/302,225号の優先の利益を主張するものであり、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

本開示は、キメラ抗原受容体(CAR)遺伝子産物などの遺伝子産物を発現するレトロウイルスベクターを用いて、T細胞などの免疫細胞を形質導入する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

養子細胞療法では、自己および同種免疫細胞を遺伝子改変して、細胞が新しい治療機能を実行できるようにする合成タンパク質を発現させることができる。免疫細胞は、抗原認識部分およびT細胞活性化ドメインから構成される融合タンパク質であるキメラ抗原受容

50

体（「CAR」）を、発現するように遺伝子操作され得る。CAR、例えば、CAR-T細胞（「CAR-T」）を含有する操作された免疫細胞は、抗原特異性を有し、癌細胞などの標的細胞を認識および殺傷する能力が保持または強化される。免疫細胞は、CARをコードする核酸がウイルスベクターを介して免疫細胞に導入される形質導入によって操作され得る。CAR-T免疫療法のための免疫細胞を形質導入する以前の方法、特に製造スケールで同種免疫細胞を形質導入する方法は、非効率であり、一貫性のない結果を生じ、一般的に処理コストおよび複雑さを増大させる試薬を使用することがある。

【0004】

したがって、免疫細胞形質導入効率が堅牢かつ一貫しており、かつ現在の方法よりも簡単で安価である、CAR-T細胞を生成する方法に対するニーズが依然としてある。

10

【発明の概要】

【0005】

本明細書には、外因性遺伝子産物を発現する細胞の割合が高い免疫細胞の遺伝子改変された集団、外因性遺伝子産物陽性細胞の割合が高い細胞集団を提供する、ウイルスベクターを用いて免疫細胞を形質導入するための改善された方法、および本開示の方法を使用して調製された細胞集団を用いる治療方法が記載されている。さらに、記載される方法は、生産のランツォランで、外因性遺伝子産物を発現する細胞をより一貫した割合で有する遺伝子改変細胞集団、および/またはより安価でより単純な形質導入方法を提供する。例えば、本明細書において、キメラ抗原受容体を使用する同種細胞療法（例えば、同種CAR-T細胞療法）に有用な細胞の製造に使用され得る、T細胞レトロウイルスベクター形質導入に特に好適な方法が記載される。

20

【0006】

一態様では、ベクターが細胞にとって外因性である核酸を含むレトロウイルスベクターを用いて、細胞集団を形質導入する方法であって、a)細胞集団を選択することであって、ここで選択された細胞集団が、Tリンパ球、ヘルパーT細胞、腫瘍細胞、メモリーT細胞、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、末梢血リンパ球、末梢血単核細胞、樹状細胞、またはナチュラルキラー細胞、またはその混合物を含む、選択すること、およびb)選択された細胞集団を、7.0~7.9の開始pH範囲内の開始pHの細胞培養培地でレトロウイルスベクターと共に培養し、形質導入培養工程の少なくとも最初の一時間、開始pH範囲内に開始pHを維持して、外因性核酸によってコードされる遺伝子産物を発現する細胞を含む形質導入細胞集団をもたらすこと、を含む、方法が提供される。

30

【0007】

一実施形態では、形質導入方法の開始pHは、少なくとも1、2、4、6、8、10、12、16、18、20、22、または24時間の間、7.0~7.9の開始pH範囲で維持される。一部の実施形態では、開始pHは、少なくとも約1、約2、約4、約6、約8、約10、約12、約14、約16、約18、約20、約22、約24、約36、約48、約72、または約96時間~約168時間を超えない時間の間、開始pH範囲に維持される。

【0008】

一部の実施形態では、開始pHは、形質導入培養工程の終わりまでずっと開始pH範囲に維持される。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、少なくとも1、2、4、6、8、12、14、16、18、20、22、24、36、48、72、または96時間の間、実施される。一部の実施形態では、pHは受動的に制御される。一部の実施形態では、pHは、バイオリアクターで能動的に制御される。

40

【0009】

一部の実施形態では、本開示の形質導入方法は、選択された細胞集団を、約.25、約.5、約1、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45、または約50~約55、約60、約65、約70、約75、約80、約85、約90、約95、約100、約125、約150、約175、約200、約225、または約250のMOIで培養することを含む。一部の実施形態では、MOIは、形質導入手順にお

50

る標的細胞の総数に対する機能性ウイルス粒子の比率である。一部の実施形態では、形質導入手順に加えられる機能性ウイルス粒子の力価は、qPCRによって決定される。

【0010】

本開示の一部の実施形態では、外因性核酸は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする。一部の実施形態では、外因性核酸は、モノクローナル抗体、自殺ポリペプチド、誘導性「オン」もしくは「促進剤」スイッチ、または制御スイッチ、例えば、二量体形成ドメインに特異的なエピトープをコードする。

【0011】

一部の実施形態では、選択された細胞集団は、容器中で培養され、容器は、細胞培養プレート、細胞培養ディープウェルプレート、細胞スタック、制御されたバイオリアクター、振とうフラスコ、またはガス透過性バッグである。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、選択された細胞集団およびレトロウイルスベクターを、約.75リットルの体積~約250リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含む。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、選択された細胞集団およびレトロウイルスベクターを、約.5リットルの体積~約10リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含む。

10

【0012】

一部の実施形態では、本開示の方法で使用される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。

【0013】

一部の実施形態では、形質導入細胞集団の少なくとも35%~95%、40%~95%、50%~95%、60%~95%、70%~95%は、形質導入培養工程の開始から3~18日後に外因性核酸遺伝子産物を発現する。一部の実施形態では、形質導入細胞集団の少なくとも35%~95%、40%~95%、50%~95%、60%~95%、70%~95%は、形質導入培養工程の開始から7~18日後に外因性核酸遺伝子産物を発現する。

20

【0014】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、任意選択的に、形質導入培養工程中に、フィブロネクチン、フィブロネクチン誘導体、ポリブレンまたはRetroNectin(登録商標)試薬などの、形質導入培養工程中の共同在化剤を含む。

【0015】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、形質導入培養工程中に、フィブロネクチン、またはフィブロネクチン誘導体、例えば、RetroNectin(登録商標)試薬などの、共同在化剤を含まない。

30

【0016】

一部の実施形態では、細胞培養培地は、形質導入培養工程中に共同在化剤を含まない。

【0017】

一部の実施形態では、ポリブレン、硫酸プロタミン、またはDEAE-デキストランなどのポリカチオンは、形質導入前または形質導入中に細胞培養培地に添加されない。

【0018】

一部の実施形態では、選択された細胞集団は、同種細胞集団である。一部の実施形態では、選択された細胞集団は、自己細胞集団である。

40

【0019】

一態様では、第一および第二の細胞集団を形質導入する方法であって、第一および第二の細胞集団が、本開示の同じ方法によって形質導入され、それにより、第一および第二の形質導入細胞集団において外因性核酸遺伝子産物を発現する形質導入細胞集団の割合が、2%~5%、5%~10%、10%~20%、または20%~30%を超えて異なる方法、が提供される。

【0020】

一部の実施形態では、本開示の方法は、形質導入細胞集団を提供するものであり、ここで形質導入細胞集団の細胞は、本開示の同じ方法によって形質導入される細胞と比較して

50

減少しているベクターコピー数を含み、ここで同方法の形質導入培養工程の開始 pH は 7 . 0 未満である。

【 0 0 2 1 】

本開示の態様では、レトロウイルスベクターを用いて細胞傷害性 T 細胞集団を形質導入する方法であって、ベクターが細胞障害性 T 細胞に外因性である核酸を含み、方法が、細胞傷害性 T 細胞集団を、7 . 0 ~ 7 . 9 の開始 pH 範囲内の開始 pH の細胞培養培地でレトロウイルスベクターと共に培養することと、形質導入培養工程の少なくとも最初の一時分間、開始 pH 範囲内に開始 pH を維持して、外因性核酸によってコードされる遺伝子産物を発現する細胞を含む形質導入細胞傷害性 T 細胞集団をもたらすことと、を含み、ここで細胞培養培地が共同在化剤を含まない、方法が提供される。

10

【 0 0 2 2 】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、開始 pH は、少なくとも 1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、または 24 時間の間、7 . 0 ~ 7 . 9 の開始 pH 範囲で維持される。一部の実施形態では、細胞傷害性 T 細胞培養培地の開始 pH は、少なくとも約 1、約 2、約 4、約 6、約 8、約 10、約 12、約 14、約 16、約 18、約 20、約 22、約 24、約 36、約 48、約 72、または約 96 時間 ~ 約 168 時間を超えない時間の間、開始 pH 範囲に維持される。

【 0 0 2 3 】

この態様の一部の実施形態では、細胞傷害性 T 細胞培養培地の開始 pH は、形質導入培養工程の終わりまでずっと開始 pH 範囲に維持される。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、少なくとも 1、2、4、6、8、12、14、16、18、20、22、24、36、48、72、または 96 時間の間、実施される。

20

【 0 0 2 4 】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、pH は受動的に制御される。一部の実施形態では、pH は能動的に制御される。

【 0 0 2 5 】

一部の実施形態では、細胞傷害性 T 細胞培養培地は、形質導入培養工程中に、フィブロネクチン、またはフィブロネクチン誘導体、例えば、R e t r o N e c t i n (登録商標)などの、共同在化剤を含まない。

【 0 0 2 6 】

一部の実施形態では、ポリブレン、硫酸プロタミン、または D E A E - デキストランなどのポリカチオンは、形質導入前または形質導入中に細胞傷害性 T 細胞培養培地に添加されない。

30

【 0 0 2 7 】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、細胞傷害性 T 細胞集団を、約 . 25、約 . 5、約 1、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、または約 50 ~ 約 55、約 60、約 65、約 70、約 75、約 80、約 85、約 90、約 95、約 100、約 125、約 150、約 175、約 200、約 225、または約 250 の M O I で培養する。一部の実施形態では、M O I は、形質導入手順における細胞傷害性 T 細胞の総数に対する機能性ウイルス粒子の比率である。

40

【 0 0 2 8 】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、外因性核酸は、キメラ抗原受容体をコードする。一部の実施形態では、外因性核酸は、モノクローナル抗体、自殺ポリペプチド、誘導性「オン」もしくは「促進剤」スイッチ、または制御スイッチ、例えば、二量体形成ドメインに特異的なエピトープをコードする。

【 0 0 2 9 】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、細胞傷害性 T 細胞集団は、容器中で培養され、容器は、細胞培養プレート、細胞培養ディープウェルプレート、細胞スタック、制御されたバイオリアクター、振とうフラスコ、またはガス透過性バッグである。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、細胞傷害性 T 細胞集団およびレトロウイルスベクターを、

50

約、75リットルの体積～約250リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含む。

【0030】

一部の実施形態では、本開示の方法における使用のため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。

【0031】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、形質導入細胞傷害性T細胞集団の少なくとも40%～95%、50%～95%、60%～95%、70%～95%は、形質導入培養工程の開始から3～18日後に外因性核酸遺伝子産物を発現する。一部の実施形態では、形質導入細胞傷害性T細胞集団の少なくとも40%～95%、50%～95%、60%～95%、70%～95%は、形質導入培養工程の開始から7～18日後に外因性核酸遺伝子産物を発現する。

10

【0032】

一部の実施形態では、形質導入される細胞傷害性T細胞集団は、同種細胞傷害性T細胞集団である。一部の実施形態では、形質導入される細胞傷害性T細胞集団は、自己細胞傷害性T細胞集団である。

【0033】

本開示の態様では、第一および第二の細胞傷害性T細胞集団を形質導入する方法であって、第一および第二の細胞傷害性T細胞集団が、本開示の同じ方法によって形質導入され、それにより、第一および第二の形質導入細胞傷害性T細胞集団において外因性核酸遺伝子産物を発現する形質導入細胞傷害性T細胞集団の割合が、2%～5%、5%～10%、10%～20%、または20%～30%を超えて異なる方法、が提供される。

20

【0034】

本開示の態様では、レトロウイルスベクターを用いて、末梢血単核細胞の集団を形質導入する方法であって、ベクターが末梢血単核細胞に外因性である核酸を含み、方法が、末梢血単核細胞集団を、7.0～7.9の開始pH範囲内の開始pHの細胞培養培地でレトロウイルスベクターと共に培養することと、形質導入培養工程の少なくとも最初の一時間、開始pH範囲内に開始pHを維持して、外因性核酸によってコードされる遺伝子産物を発現する細胞を含む形質導入末梢血単核細胞集団をもたらすことと、を含み、ここで細胞培養培地が共同在化剤を含まない、方法が提供される。

30

【0035】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、開始pHは、少なくとも1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、または24時間の間、7.0～7.9の開始pH範囲で維持される。一部の実施形態では、開始pHは、少なくとも約1、約2、約4、約6、約8、約10、約12、約14、約16、約18、約20、約22、約24、約36、約48、約72、または約96時間～約168時間を超えない時間の間、開始pH範囲に維持される。

【0036】

この態様の一部の実施形態では、開始pHは、形質導入培養工程の終わりまでずっと開始pH範囲に維持される。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、少なくとも1、2、4、6、8、12、14、16、18、20、22、24、36、48、72、または96時間の間、実施される。

40

【0037】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、pHは受動的に制御される。一部の実施形態では、pHは能動的に制御される。

【0038】

一部の実施形態では、末梢血単核細胞培養培地は、形質導入培養工程中に、フィブロネクチン、またはフィブロネクチン誘導体、例えば、Retronectin（登録商標）などの、共同在化剤を含まない。

【0039】

50

一部の実施形態では、ポリブレン、硫酸プロタミン、またはD E A E - デキストランなどのポリカチオンは、形質導入前または形質導入中に末梢血単核細胞培養培地に添加されない。

【0040】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、末梢血単核細胞集団を、約 . 2 5、約 . 5、約 1、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、または約 50 ~ 約 55、約 60、約 65、約 70、約 75、約 80、約 85、約 90、約 95、約 100、約 125、約 150、約 175、約 200、約 225、または約 250 の M O I で培養する。一部の実施形態では、M O I は、形質導入手順における末梢血単核細胞の総数に対する機能性ウイルス粒子の比率である。

10

【0041】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、外因性核酸は、キメラ抗原受容体をコードする。一部の実施形態では、外因性核酸は、モノクローナル抗体、自殺ポリペプチド、誘導性「オン」もしくは「促進剤」スイッチ、または制御スイッチ、例えば、二量体形成ドメインに特異的なエピトープをコードする。

【0042】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、末梢血単核細胞集団は、容器中で培養され、容器は、細胞培養プレート、細胞培養ディープウェルプレート、細胞スタック、制御されたバイオリアクター、振とうフラスコ、またはガス透過性バッグである。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、末梢血単核細胞集団およびレトロウイルスベクターを、約 . 7 5 リットルの体積 ~ 約 2 5 0 リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含む。

20

【0043】

一部の実施形態では、本開示のこの態様の方法における使用のため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。

【0044】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、形質導入末梢血単核細胞集団の少なくとも 40 % ~ 9 5 %、50 % ~ 9 5 %、60 % ~ 9 5 %、70 % ~ 9 5 % は、形質導入培養工程の開始から 3 ~ 1 8 日後に外因性核酸遺伝子産物を発現する。一部の実施形態では、形質導入末梢血単核細胞集団の少なくとも 40 % ~ 9 5 %、50 % ~ 9 5 %、60 % ~ 9 5 %、70 % ~ 9 5 % は、形質導入培養工程の開始から 7 ~ 1 8 日後に外因性核酸遺伝子産物を発現する。

30

【0045】

一部の実施形態では、形質導入される末梢血単核細胞集団は、同種末梢血単核細胞集団である。一部の実施形態では、形質導入される末梢血単核細胞集団は、自己末梢血単核細胞集団である。

【0046】

本開示の態様では、第一および第二の末梢血単核細胞集団を形質導入する方法であって、第一および第二の末梢血単核細胞集団が、本開示の同じ方法によって形質導入され、それにより、第一および第二の形質導入末梢血単核細胞集団において外因性核酸遺伝子産物を発現する形質導入末梢血単核細胞集団の割合が、2 % ~ 5 %、5 % ~ 1 0 %、1 0 % ~ 2 0 %、または 2 0 % ~ 3 0 % を超えて異なる方法、が提供される。

40

【0047】

本開示の態様では、レトロウイルスベクターを用いて、人工多能性幹細胞から誘導された T 細胞の集団を形質導入する方法であって、ベクターが誘導 T 細胞 (d e r i v e d T c e l l) に外因性である核酸を含み、方法が、誘導 T 細胞集団を、7 . 0 ~ 7 . 9 の開始 pH 範囲内の開始 pH の細胞培養培地でレトロウイルスベクターと共に培養すること、形質導入培養工程の少なくとも最初の一時間、開始 pH 範囲内に開始 pH を維持して、外因性核酸によってコードされる遺伝子産物を発現する細胞を含む形質導入された誘導 T 細胞集団をもたらすこと、を含み、ここで細胞培養培地が共局在化剤を含まない、方法が提供される。

50

【0048】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、開始 pH は、少なくとも 1、2、4、6、8、10、12、16、18、20、22、または 24 時間の間、7.0 ~ 7.9 の開始 pH 範囲で維持される。一部の実施形態では、人工多能性幹細胞から誘導された T 細胞集団のための培養培地の開始 pH は、少なくとも約 1、約 2、約 4、約 6、約 8、約 10、約 12、約 14、約 16、約 18、約 20、約 22、約 24、約 36、約 48、約 72、または約 96 時間 ~ 約 168 時間を超えない時間の間、開始 pH 範囲に維持される。

【0049】

この態様の一部の実施形態では、誘導 T 細胞培養培地の開始 pH は、形質導入培養工程の終わりまでずっと開始 pH 範囲に維持される。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、少なくとも 1、2、4、6、8、12、14、16、18、20、22、24、36、48、72、または 96 時間の間、実施される。

10

【0050】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、誘導 T 細胞培養培地の pH は、受動的に制御される。一部の実施形態では、pH は能動的に制御される。

【0051】

本発明のこの態様の一部の実施形態では、誘導 T 細胞培養培地は、形質導入培養工程中に、フィブロネクチン、またはフィブロネクチン誘導体、例えば、R e t r o N e c t i n (登録商標)などの、共同在化剤を含まない。

【0052】

一部の実施形態では、ポリブレン、硫酸プロタミン、または D E A E - デキストランなどのポリカチオンは、形質導入前または形質導入中に誘導 T 細胞培養培地に添加されない。

20

【0053】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、誘導 T 細胞集団を、約 . 25、約 . 5、約 1、約 5、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 45、または約 50 ~ 約 55、約 60、約 65、約 70、約 75、約 80、約 85、約 90、約 95、約 100、約 125、約 150、約 175、約 200、約 225、または約 250 の M O I で培養する。一部の実施形態では、M O I は、形質導入手順における、人工多能性幹細胞から誘導された T 細胞の総数に対する機能性ウイルス粒子の比率である。

30

【0054】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、外因性核酸は、キメラ抗原受容体をコードする。一部の実施形態では、外因性核酸は、モノクローナル抗体、自殺ポリペプチド、誘導性「オン」もしくは「促進剤」スイッチ、または制御スイッチ、例えば、二量体形成ドメインに特異的なエピトープをコードする。

【0055】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、誘導 T 細胞集団は、容器中で培養され、容器は、細胞培養プレート、細胞培養ディープウェルプレート、細胞スタック、制御されたバイオリアクター、振とうフラスコ、またはガス透過性バッグである。一部の実施形態では、形質導入培養工程は、誘導 T 細胞集団およびレトロウイルスベクターを、約 0.5 リットルの体積 ~ 約 10 リットルの体積の細胞培養培地で培養することを含む。

40

【0056】

一部の実施形態では、本開示の方法における使用のため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。

【0057】

本開示のこの態様の一部の実施形態では、形質導入された誘導 T 細胞集団の 35% ~ 約 95%、約 40% ~ 約 95%、約 50% ~ 約 95%、約 60% ~ 約 95%、または約 70% ~ 約 95% は、形質導入培養工程の開始から 3 ~ 18 日後に外因性核酸遺伝子産物を発現する。一部の実施形態では、形質導入された誘導 T 細胞集団の約 35% ~ 約 95%、約 40% ~ 約 95%、約 50% ~ 約 95%、約 60% ~ 約 95%、または約 70% ~ 約 95

50

%は、形質導入培養工程の開始から7～18日後に外因性核酸遺伝子産物を発現する。

【0058】

一部の実施形態では、形質導入される誘導T細胞集団は、同種誘導T細胞集団である。一部の実施形態では、形質導入される誘導T細胞集団は、自己誘導T細胞集団である。

【0059】

本開示の態様では、第一および第二の誘導T細胞集団を形質導入する方法であって、第一および第二の誘導T細胞集団が、本開示の同じ方法によって形質導入され、それにより、第一および第二の形質導入された誘導T細胞集団において外因性核酸遺伝子産物を発現する形質導入された誘導T細胞集団の割合が、2%～5%、5%～10%、10%～20%、または20%～30%を超えて異なる方法、が提供される。

10

【0060】

本発明の一部の実施形態では、本開示の方法によって産生される遺伝子改変細胞が提供される。本発明の別の実施形態では、本開示の方法によって産生される遺伝子改変細胞の集団が提供される。別の実施形態では、本発明の方法によって産生される細胞または細胞集団を含む治療用組成物が提供される。別の実施形態では、治療有効量の細胞、細胞集団、または本発明の方法によって産生される治療用組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、治療方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、PBMCを単離する、単離されたPBMCからのT細胞を、活性化する、形質導入する、トランスフェクトする、増殖させる、および採取するための例示的プロトコルを示す。

20

【0062】

【図2】図2Aおよび2Bは、ANOVA分析によって決定された、試験の11日目の、pH7.1で細胞を形質導入したときの生存CAR+T細胞の平均割合が81.28587(図2A)であり、またはpH6.6で形質導入したときは23.0387(図2B)であることを示す。

【0063】

図2Cは、生存CAR+T細胞の割合に対する、pH、%レンチウイルスベクター(v/v)(LVVとして示される)、RetroNectin(登録商標)試薬濃度(μg/mL)(RNとして示される)、および容器タイプの主効果および2方向相互作用のp値を示す。

30

【0064】

【図3】図3は、試験の7日目および14日目のCAR+T細胞の割合(縦軸)に対する、 7.2 ± 0.1 のpHで実施された1、2、4、6および8時間の形質導入時間(横軸)の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0065】

本明細書において、免疫細胞、特にT細胞を形質導入するための改善された方法が提供され、これは形質導入効率を増加させ、および/または生産稼働間の外因性核酸発現レベルの一貫性を改善する一方で、処理コストおよび複雑さを低減する。

40

【0066】

本明細書に提供される例示的方法は、典型的にはエクスピボ法であり、レトロウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターで活性化T細胞を形質導入して、遺伝子改変T細胞を産生することを含む。例示的な実施形態では、形質導入工程は、共局在化剤なしで実施することができる。さらなる例示的な実施形態では、形質導入工程は、6.9～7.8のpH、または7.0～7.9のpHで実施することができる。典型的には、こうした方法は、末梢血単核細胞(PBMC)を濃縮して、活性化工程で使用され得るT細胞を含むPBMCを単離することを含み得る。さらに、例示的な実施形態では、こうした方法は、遺伝子改変T細胞を増殖させることを含み得る。さらなる例示的な実施形態では、本明細

50

書に提供される方法は、T細胞の内因性遺伝子を破壊することをさらに含み得る。本明細書に提供される方法の例示的な実施形態では、T細胞を活性化、形質導入、かつ典型的には増殖させることができる。例示的な実施形態におけるこうしたT細胞は、CARを発現するように遺伝子改変され得る。

定義

【0067】

本開示で使用される専門用語は当技術分野では標準であるが、特許請求の範囲の意味に対する明快さと明確さを確実にするために、特定の用語の定義が本明細書に提供される。単位、接頭辞、および記号は、SIで許容される形式で表示することができる。本明細書に記載されるように、別段の示唆がない限り、任意の濃度範囲、割合範囲、比の範囲、または整数範囲は、列挙された範囲内の任意の整数の値、および適切な場合、その分数（整数の10分の1および100分の1など）を含むと理解されるべきである。本明細書で使用される節の見出しは、組織化のみを目的としており、記載される主題を限定するものとして解釈されるべきではない。

10

【0068】

本開示で使用される場合、本明細書に別途明示的に定められている場合を除き、以下の各用語は、以下に記載する意味を有するものとする。追加的な定義は、本開示全体を通して記載される。

【0069】

別段の記載がない限り、用語「a」または「an」は、「少なくとも一つ以上」の意味として解釈されるべきである。

20

【0070】

本明細書および特許請求の範囲全体を通して数値に関連して使用される用語「約」は、当業者によく知られており、かつ許容可能な精度の間隔を示す。一般に、こうした精度の間隔は、±15%である。

【0071】

用語「活性化」または「活性化された」は、検出可能な細胞増殖を誘導するために十分に刺激された免疫細胞、例えば、T細胞の状態を指す。活性化はまた、誘導されたサイトカイン産生および検出可能なエフェクター機能と関連し得る。「活性化されたT細胞」という用語は、とりわけ、細胞分裂をしているT細胞を指す。T細胞活性化は、限定されるものではないが、CD57、PD1、CD107a、CD25、CD137、CD69、および/またはCD71を含む、一つ以上のバイオマーカーのT細胞発現の増加によって特徴付けられ得る。

30

【0072】

用語「投与する」とは、当業者に公知の様々な方法および送達システムのいずれかを使用して、対象に薬剤を物理的に導入することを指す。本明細書に開示される方法によって調製されるT細胞についての例示的な投与経路は、例えば注射もしくは点滴による、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊椎、または、その他の非経口投与経路を含む。本明細書で使用される場合、「非経口投与」という語句は、通常は注射による、腸内および局所投与以外の投与様式を意味し、限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、リンパ管内、病巣内、関節包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内注射および注入、ならびにインビボエレクトロポレーションを含む。投与はまた、例えば、一回、複数回、および/または一つ以上の長期間にわたって実施することができる。

40

【0073】

用語「同種」は、後に同じ種の別の個体に導入される、ある個体に由来する任意の材料を指す、例えば同種T細胞移植または療法。

【0074】

「抗体」(Ab)という用語は、限定されないが、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンを含む。概して、抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも二つ

50

の重（H）鎖および二つの軽（L）鎖を含み得る。各H鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと省略される）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、三つまたは四つの定常ドメイン、CH1、CH2、CH3、および/またはCH4を含むことができる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと省略される）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、一つの定常ドメイン、CLを含み得る。VH領域およびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より保存された領域が散在する相補性決定領域（CDR）と呼ばれる、超可変性の領域にさらに細分され得る。各VHおよびVLは、三つのCDRおよび四つのFRを含み、アミノ末端からカルボキシ末端へ以下の順序で配置される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。用語「抗体」は、例として、天然および非天然両方のAb、モノクローナルおよびポリクローナルのAb、二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、キメラおよびヒト化Ab、ヒトまたは非ヒトAb、完全合成Ab（時には「抗体模倣体」とも呼ぶ）、ラクダ科動物抗体、抗体融合物（時には「抗体コンジュゲート」とも呼ぶ）、および単鎖Abを含む。非ヒトAbは、ヒトにおけるその免疫原性を減少させるための組換え方法によってヒト化することができる。

10

【0075】

本明細書で使用される「免疫グロブリン」は、IgA、分泌型IgA、IgG、およびIgMを含むがこれに限定されない、一般的に知られているアイソタイプのいずれかに由来することができる。IgGサブクラスもまた、当該技術分野で公知であり、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含むがこれに限定されない。「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされるAbクラスまたはサブクラス（例えば、IgMまたはIgG1）を指す。

20

【0076】

用語「自己」は、後で再導入されるのと同じ個体に由来する任意の材料を指す。例えば、操作された自己細胞療法（eACT（商標））は、ドナー、例えば患者からのリンパ球の収集を伴い、次いで、それらは、例えばCAR構築物を発現するように操作され、その後、同じドナー、例えば患者へ再び投与される。

【0077】

本明細書で使用される場合、用語「共局在化剤」は、ウイルスベクターまたは粒子、例えばレトロウイルスまたはレンチウイルス粒子の、標的細胞、例えばT細胞などの免疫細胞との共局在を促進する試薬を指し、例えば、フィブロネクチンまたはフィブロネクチン誘導体、Retronectin（登録商標）試薬など、を含み得る。

30

【0078】

本明細書で使用される場合、「製造スケール形質導入量」という用語は、500mL～最大5リットルまでの体積を指す。

【0079】

用語「感染多重度」（以下、「MOI」）は、例えば形質導入手順などの手順の媒体における、ウイルス粒子などの感染因子と、例えば細胞などの感染標的との比を指す。一部の実施形態では、MOIは、形質導入手順の間に標的細胞の総数に加えられる機能性ウイルス粒子の数に等しくてもよい。一部の実施形態では、形質導入手順に加えられる機能性ウイルス粒子の数は、機能性ウイルス粒子の力価を確認することによって決定される。一部の実施形態では、機能性ウイルス粒子の力価は、qPCRを使用して、当該技術分野で公知の技術を使用して、安定的に形質導入された標準細胞株として細胞当たり統合された核酸ウイルスコピーの数を決定することによって決定される。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPaugh, B.S., et al. Sci Rep 11, 389 (2021)を参照のこと。一部の実施形態では、ウイルス粒子は、レトロウイルス粒子である。一部の実施形態では、ウイルス粒子は、レンチウイルス粒子である。

40

【0080】

本明細書で使用される場合、pH制御は、例えば、細胞培養pHが、pHフィードバック制御または受動を有するバイオリクターで連続的に制御される場合、例えば、細胞培

50

養 pH が、組織培養インキュベーター内の緩衝細胞培養培地および % CO₂ を調整して所定の pH を達成することにより培養開始時に制御され、さらに制御されない場合、活性であり得る。

【 0 0 8 1 】

用語「選択的」または「特異的」および関連する派生語は、本明細書では互換的に使用される。抗原結合ドメインなどの分子は、第二の標的に結合するよりも、一つの標的により強く結合する場合に、選択的、または特異的であると言われる。

【 0 0 8 2 】

本明細書において使用される場合、ベクターコピー数（「VCN」）という用語は、細胞当たりのベクターコピー数、例えばウイルスベクターコピーの数を指す。

10

【 0 0 8 3 】

本明細書において互換的に使用される場合、用語「ウイルスベクター」および「レトロウイルスベクター」は、レトロウイルスに由来し、形質導入を介して遺伝物質を細胞へと移すために使用される任意の形態の核酸を示す。この用語は、DNA および RNA などのウイルスベクター核酸、これらの核酸のカプセル化形態、およびウイルスベクター核酸がパッケージングされてあるウイルス粒子を包含する。

【 0 0 8 4 】

免疫細胞

本明細書に記載される免疫細胞のインビトロ操作または遺伝子改変の前に、細胞は対象から取得することができる。免疫細胞は、同種または自己起源の対象から（すなわち、健康なドナーまたは患者から）取得することができる。

20

【 0 0 8 5 】

免疫細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の非限定的な供給源から得られ得る。一部の実施形態では、当分野の当業者に利用可能かつ公知の任意の数の T 細胞株を使用することができる。一部の実施形態では、細胞は、健康なドナー、癌と診断された患者、または感染症と診断された患者に由来することができる。一部の実施形態では、細胞は、異なる表現型特徴を示す細胞の混合集団の一部であってもよい。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態では、免疫細胞は、T 細胞を含む。T 細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の供給源から取得することができる。ある特定の実施形態では、T 細胞は、FICOLL（商標）分離などの当業者に公知の任意の数の技術を使用して、対象から採取された血液から取得することができる。

30

【 0 0 8 7 】

一部の実施形態では、免疫細胞は、前駆細胞、骨髄幹細胞、人工多能性幹細胞、iPSC、造血幹細胞、および間葉系幹細胞などの幹細胞に由来し得る。iPSC 細胞およびその他の種類の幹細胞は、不死細胞株を培養するか、または患者から直接単離することができる。一部の実施形態では、免疫細胞は、人工多能性幹細胞から誘導された T 細胞である。幹細胞を単離、発現、および / または培養するための様々な方法が当技術分野で公知であり、本開示の実践に使用することができる。

40

【 0 0 8 8 】

一部の実施形態では、免疫細胞は、再プログラムされた T 細胞に由来する人工多能性幹細胞（iPSC）である。一部の実施形態では、原料物質は、T 細胞または非 T 細胞に由来する人工多能性幹細胞（iPSC）であってもよい。原料物質は、あるいは、B 細胞であってもよく、または末梢血単核細胞単離物、造血前駆細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、脂肪幹細胞、もしくは任意の他の体細胞型からの任意の他の細胞であってもよい。

【 0 0 8 9 】

採血

一部の実施形態では、操作される T 細胞は、PBMC から取得される。一部の実施形態

50

では、P B M Cは、当技術分野で公知の任意の好適な方法によって、対象から収集または取得することができる。例えば、一部の実施形態では、血液は、静脈穿刺、または血液および/もしくはP B M Cの試料を収集する任意の他の採血方法によって収集され得る。

【0090】

一部の実施形態では、P B M Cは、アフエレーシスによって個体の循環血液から取得することができる。アフエレーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含むリンパ球を含有する。ある特定の実施形態では、アフエレーシス、特に白血球除去療法 (leukopheresis) によって収集される細胞は、血漿分画を除去するために洗浄されてもよく、その後の処理のために適切な緩衝液または培地中に置かれてもよい。

10

【0091】

T細胞濃縮

ある特定の実施形態では、T細胞は、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって、例えば、PERCOLL (商標) 勾配を通した遠心分離を使用して、P B M Cから単離される。T細胞 (例えば、CD28+、CD4+、CD45RA-、CD45RO+、CD45RO+、CD62-、CD95-、CD95+、IL2R+、IL2R-、CCR7+、CCR7-、CDL-、CD62L+、およびその組み合わせ) の特定の亜集団は、当技術分野で公知のポジティブまたはネガティブ選択技術によってさらに単離され得る。一例では、T細胞の亜集団は、CD45RA+、CD95-、IL-2R-、CCR7+、CD62L+である。一例では、T細胞の亜集団は、CD45RA+、CD95+、IL-2R+、CCR7+、CD62L+である。一例では、T細胞の亜集団は、CD45RO+、CD95+、IL-2R+、CCR7+、CD62L+である。一例では、T細胞の亜集団は、CD45RO+、CD95+、IL-2R+、CCR7-、CD62L-である。一例では、T細胞の亜集団は、CD45RA+、CD95+、IL-2R+、CCR7-、CD62L-である。例えば、ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択細胞に特有の表面マーカーに向けられた抗体の組み合わせを用いて達成することができる。本明細書で使用するための一つの方法は、ネガティブに選択された細胞に存在する細胞表面マーカーに向けられたモノクローナル抗体のカクテルを使用する、負磁気免疫付着 (immunoadherence) またはフローサイトメトリーを介した細胞ソーティングおよび/または選択である。例えば、ネガティブ選択によってCD4+細胞について濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA DR、およびCD8に対する抗体を含む。フローサイトメトリーおよび細胞ソーティングを使用して、本開示の方法および実施形態で使用するための対象となる細胞集団を単離することもできる。

20

30

【0092】

P B M Cは、本明細書に記載される方法を使用して、遺伝子改変、例えば、CARの導入に直接使用することができる。P B M Cは、NK細胞またはNK T細胞などの他の細胞傷害性リンパ球をさらに含み得ることが理解されよう。本明細書に開示されるキメラ抗原受容体のコード配列を担持する発現ベクターは、ヒトドナーT細胞、NK細胞、またはNK T細胞の集団に導入され得る。発現ベクターを担持する形質導入に成功したT細胞は、フローサイトメトリーを使用してソートされてCD3陽性T細胞を単離し、次いでさらに増殖されて、抗CD3抗体およびIL-2または本明細書の別に記載される当技術分野で既知の他の方法を使用した細胞活性化に加えて、これらのCAR発現T細胞の数を増加させることができる。

40

【0093】

ある特定の実施形態では、P B M Cを単離した後、Tリンパ球をさらに単離することができ、細胞傷害性およびヘルパーTリンパ球の両方を、遺伝子改変および/または増殖の前または後のいずれかで、ナイーブ、メモリー、およびエフェクターT細胞亜集団にソートすることができる。

【0094】

50

一部の実施形態では、CD8+細胞は、これらのタイプのCD8+細胞のそれぞれに関連する特徴的な細胞表面抗原を特定することによって、ナイーブ、幹細胞メモリー、中央メモリー、およびエフェクター細胞へとさらにソートされる。一部の実施形態では、中央メモリーT細胞の表現型マーカーの発現は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、およびCD127を含み、グランザイムBに対して陰性である。一部の実施形態では、幹細胞メモリーT細胞は、CD45RO-、CD62L+、CD8+T細胞である。一部の実施形態では、中央メモリーT細胞は、CD45RO+、CD62L+、CD8+T細胞である。一部の実施形態では、エフェクターT細胞は、CD62L、CCR7、CD28、およびCD127に対して陰性であり、グランザイムBおよびパーフォリンに対して陽性である。

10

【0095】

ある特定の実施形態では、CD4+T細胞は、さらに亜集団へとソートされる。例えば、CD4+Tヘルパー細胞は、特徴的な細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することによって、ナイーブ、中央メモリー、およびエフェクター細胞にソートすることができる。

【0096】

細胞活性化および増殖

本開示の免疫細胞は、免疫細胞の遺伝子改変の前または後のいずれかで、活性化および増殖することができる。図1は、本開示の免疫細胞の活性化、形質導入、トランスフェクト、および増殖に使用され得る例示的なプロトコルを示す。一実施形態では、T細胞のインビトロ形質導入、トランスフェクト、培養、および/または増殖は、胎児仔ウシ血清および胎児ウシ血清などの非ヒト動物由来産物の非存在下で実施される。

20

【0097】

概して、本開示の操作された免疫細胞は、例えば、T細胞の表面でCD3TCR複合体および共刺激分子を刺激する剤と接触させて、T細胞について活性化シグナルを作製させることによって、増殖させることができる。例えば、カルシウムイオノフォアA23187、ホルボル12-ミリスチン酸13-酢酸塩(PMA)、またはフィトヘマグルチニン(PHA)などの有糸分裂性レクチンなどの化学物質を使用して、T細胞の活性化シグナルを作製することができる。

【0098】

一部の実施形態では、T細胞集団は、例えば、OKT3抗体などの抗CD3抗体、もしくはその抗原結合断片、または表面に固定化された抗CD2抗体と接触することによって、またはカルシウムイオノフォアと組み合わせたタンパク質キナーゼC活性化因子(例えば、プリオスタチン)と接触することによって、インビトロで刺激され得る。T細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激には、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞の集団は、T細胞の増殖を刺激するのに適切な条件下で、抗CD3抗体(例えばOKT3抗体)、および抗CD28抗体と接触させることができる。抗CD3抗体および抗CD28抗体は、プラスチックもしくは磁気ビーズなどのビーズ、またはプレート、または他の基材上に配置され得る。T細胞培養に適切な条件には、増殖および生存率に必要な因子を含有し得る適切な培地(例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640、またはX-vivo15、(Lonza))が含まれ、血清(例えば、ウシ胎児またはヒト血清)、インターロイキン-2(IL-2)、インスリン、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-2、IL-15、TGFβ、およびTNFまたは当業者に周知の細胞増殖のための任意のその他の添加物が挙げられる。細胞の増殖のための他の添加物としては、限定されるものではないが、界面活性剤、ブラスマネート、およびN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤が挙げられる。培地は、追加のアミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンを有するRPMI1640、AIM-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo15、およびX-Vivo20、Optimizerを含むことができ、血清を含まないか、または適切な量の血清(または血漿)もしくは定義されたホルモンのセット、および/またはT細胞(例えば、IL-7および/またはIL-15)の増殖に十分な

30

40

50

量のサイトカインが補充される。例えばペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質は、実験培養物にのみ含まれ、対象に注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、例えば、適切な温度（例えば、37）および雰囲気（例えば、空気+5%のCO₂）などの増殖を支持するために必要な条件下で維持される。様々な刺激時間に曝露されたT細胞は、異なる特徴を呈することができる。一部の実施形態では、本開示の細胞は、組織または細胞と共培養することによって増殖することができる。細胞はまた、インビボで、例えば、対象に細胞を投与した後の対象の血液中で増殖され得る。

【0099】

T細胞培養に適切な条件には、増殖および生存率に必要な因子を含有し得る適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640、またはX-vivo 15、（Lonza））が含まれ、血清（例えば、ウシ胎児またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-2、IL-15、TGF β 、およびTNFまたは当業者に周知の細胞増殖のための任意のその他の添加物が挙げられる。細胞の増殖のための他の添加物としては、限定されるものではないが、界面活性剤、プラスマネート、およびN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤が挙げられる。培地は、追加のアミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンを有するRPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizerを含むことができ、血清を含まないか、または適切な量の血清（または血漿）もしくは定義されたホルモンのセット、および/またはT細胞（例えば、IL-7および/またはIL-15）の増殖に十分な量のサイトカインが補充される。例えばペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質は、実験培養物にのみ含まれ、対象に注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、例えば、適切な温度（例えば、37）および雰囲気（例えば、空気+5%のCO₂）などの増殖を支持するために必要な条件下で維持される。様々な刺激時間に曝露されたT細胞は、異なる特徴を呈することができる。一部の実施形態では、本開示の細胞は、組織または細胞と共培養することによって増殖することができる。細胞はまた、インビボで、例えば、対象に細胞を投与した後の対象の血液中で増殖され得る。

【0100】

T細胞を活性化および増殖させる方法は当該技術分野で公知であり、例えば、米国特許第6,905,874号、米国特許第6,867,041号、米国特許第6,797,514号、およびWO2012/079000に記載され、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。概して、このような方法は、IL-2などの適切なサイトカインを有する培養培地において、プラスチックもしくは磁気ビーズまたは他の表面に一般的に付着した抗CD3抗体および抗CD28抗体などの刺激分子および共刺激性分子と、PBMcまたは単離されたT細胞を接触させることを含む。このビーズに結合された抗CD3抗体および抗CD28抗体は、「サロゲート」抗原提示細胞（APC）としての役目を果たす。一例はDynabeads（登録商標）システムであり、これは、ヒトT細胞の生理学的活性化のためのCD3/CD28アクチベーター/刺激因子システムである。他の実施形態では、米国特許第6,040,177号、米国特許第5,827,642号、およびWO2012/129514（その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して、T細胞は活性化および刺激されて、フィーダー細胞および適切な抗体およびサイトカインと増殖することができる。別の実施形態では、細胞は、Miltenyi Biotec社（カリフォルニア州オーバーン）からTransAct（商標）T細胞試薬として提供される、CD3およびCD28に結合する抗体および/またはその断片を含む抗CD3/28ナノメートルスケールマトリックスで活性化され、増殖される。（例えば、カタログ番号200-076-202 MACS GMP T Cell Transact-CRR、カタログ番号130-019-011 MACS GMP T Cell Transact for Research useを参照）。

【0101】

形質導入

本開示の方法によって産生されるP B M CおよびT細胞を含む、免疫細胞を遺伝子改変するための方法が本明細書に提供される。本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、T細胞を、複製不能レトロウイルスベクターとエクスピボで接触させ、T細胞を遺伝子改変して外因性遺伝子産物を発現させる。一部の実施形態では、外因性遺伝子産物はC A Rである。

【0102】

一部の実施形態では、外因性遺伝子産物は、モノクローナル抗体、自殺ポリペプチド、誘導性カスパーゼ-9（米国特許出願第2011/0286980号）もしくはチミジンキナーゼなどの誘導性「オン」もしくは「促進剤」スイッチ、または「オフ」スイッチに特異的な（すなわち、これらによって特異的に認識される）エピトープである。例示的なm A b特異的エピトープは、国際特許公開第W O 2 0 1 6 / 1 2 0 2 1 6号に開示されており、その全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、外因性遺伝子産物は、R Q R 8などのRエピトープである。例えば、W O 2 0 1 3 1 5 3 3 9 1 Aを参照されたく、それは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。リツキシマブは、C A R免疫細胞の表面上に発現されると、Rエピトープに結合し、C A R免疫細胞を溶解させることができる。一部の実施形態では、外因性遺伝子産物は、二量体形成ドメインなどの制御スイッチである。

【0103】

一部の実施形態では、形質導入は、媒体のいずれも除去することなく、活性化工程を実施するのと同じ容器で実施することができる。例えば、収集した血液試料から濃縮され単離されたP B M Cなどの血球は、ガス透過性バッグ中で活性化され、その後、同じガス透過性バッグ中でレトロウイルス粒子と接触させることができる。例示的な実施形態では、血球は、レトロウイルスベクターと接触する前に、好中球を含む顆粒球から離れて分離、単離、および/または精製される。さらなる例示的な実施形態では、複製不能組換えレンチウイルス粒子であり得るレトロウイルスベクターを、活性化P B M Cを含有する同じガス透過性バッグに導入して、形質導入反応混合物を形成することができる。一部の実施形態では、レトロウイルスベクターは、活性化工程中に形質導入反応混合物に添加される。一部の実施形態では、レトロウイルスベクターは、活性化工程の後に形質導入反応混合物に添加される。一部の実施形態では、形質導入工程の前または同時のいずれの場合でも、活性化工程は、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144、または156時間以内にわたって実施される。図1は、例示的なC A R T細胞産生プロトコルにおける、可能性のある形質導入時点を示す。培地は、e x v i v oでのT細胞の培養のための当該技術分野で公知のものなど、典型的には形質導入の間に存在し、塩基培地、および例えば、本明細書にさらに詳細に開示されているサイトカインを含むサプリメントを含む。例えば、上記の活性化および増殖の説明を参照されたい。

【0104】

一部の実施形態においてレトロウイルスベクターがT細胞に添加されたときに開始する形質導入反応は、23~39でインキュベートされてもよく、一部の例示的な実施形態では、37でインキュベートされてもよい。一部の実施形態では、形質導入反応は、37~39で実行され得る。一部の実施形態では、形質導入反応は、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、および10.0% C O₂でインキュベートされる。形質導入反応は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、72、または96時間インキュベートされ得る。例示的な実施形態では、形質導入反応を、1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、4~12、4~14、4

10

20

30

40

50

～ 16、4～18、4～20、4～24、4～26、4～28、4～30、4～32、4～36、4～38、4～40、4～42、4～44、4～46、4～48、または4～72時間、開始pH範囲のpHで、インキュベートされ得る。一部の実施形態では、形質導入反応pHは、例えば、培地緩衝剤（例えば、重炭酸ナトリウムおよび/またはHEPES）およびインキュベーターpCO₂を調整して、培養開始時に所望のpH（例えば、pH7.0超）を可能にし、例えば、7.0以上などの標的pHを達成することによって、受動的に制御される。一部の実施形態では、形質導入反応pHは、例えば、オンラインpH測定を有するバイオリクターを使用して、かつCO₂ガス添加を介して培養pHを連続的に（能動的に）調節することによってpHを維持するpHフィードバック制御ループを用いて、能動的に制御される。

10

【0105】

一部の実施形態では、T細胞は、感染多重度（MOI）と呼ばれる、細胞に対するレトロウイルスまたはレンチウイルス粒子の異なる比率で形質導入され得る。一部の実施形態では、T細胞は、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、50、100、150、200、250、300、350、400、450～500のMOI（プラーク形成単位/細胞）を使用して形質導入される。一部の実施形態では、T細胞は、0.25、0.50、1.0、5、10、15、20、25、または30～50、75、100、125、150、175、または200の間のMOIで形質導入される。一部の実施形態では、T細胞は、約1～10、15、20、25、30、35、40、45、または50のMOIで形質導入される。一部の実施形態では、T細胞は、1～20のMOIで形質導入される。

20

【0106】

本明細書に開示される方法および組成物の一部の実施形態では、T細胞の25%～90%が外因性遺伝子産物を発現し、一部の実施形態では、形質導入T細胞の25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、または85%～90%が外因性遺伝子産物を発現する。

【0107】

一部の実施形態では、外因性遺伝子産物を発現する形質導入T細胞の割合は、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%または90%、より具体的には少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、または80%、より具体的には少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%であり得る。一部の実施形態では、示された外因性遺伝子産物の発現レベルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20日目に、特に形質導入反応中にレトロウイルスベクターが最初に細胞と接触してから3～10日後に達成される。

30

【0108】

一部の実施形態では、形質導入反応は、0.25～250、0.25～7.5、0.375～7.5、0.5～5、または0.7～4.0リットルの体積の形質導入培養培地で発生する。一部の実施形態では、形質導入反応は、少なくとも0.25、0.50、0.75、1.0、1.5、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、10.0、50、100、150、200、または250リットルの体積の形質導入培養培地で発生する。一部の実施形態では、形質導入反応は、約0.25、約0.50、約0.60、または約0.75～約0.8、約1.0、約1.5、約2.0、約2.5、約3.0、約3.5、約4.0、約4.5、約5.0、約7.5、約8.0、または約10.0リットルの体積の形質導入培養培地で発生する。

40

【0109】

50

一部の実施形態では、細胞は、細胞にとって外因性である核酸を含むウイルスベクターによって形質導入される。一部の実施形態では、外因性核酸はCARをコードする。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルス、レンチウイルス、またはAAVベクターである。

【0110】

CARを発現するために形質導入される細胞は、同種または自己起源に由来し得る。一実施形態では、T細胞のインビトロ形質導入、培養、および/または増殖は、胎児ウシ血清および胎児ウシ血清などの非ヒト動物由来産物の非存在下で実施される。

【0111】

一部の実施形態では、形質導入反応細胞集団が、少なくとも5、10、20、30、50、100、150、または200のMOIで、開始pH範囲内のpHで、および7.8以下で、または7.9以下で、CARをコードするレトロウイルスベクターとともに、1時間から2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、24、または48時間でインキュベートされ、およびここで、T細胞の少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、または85%が、レトロウイルスベクターが形質導入反応中に最初に細胞と接触してから少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または10日後までにCARを発現する。

【0112】

遺伝子破壊

同種CAR T療法、またはAlloCARs (商標) を製造するためのプロセスは、健康なドナーから健康な、選択された、スクリーニングされた、および試験されたT細胞を採取することを含む。同種T細胞は、移植片対宿主病(GvHD)のリスクを減少させ、同種拒絶反応を予防するための遺伝子編集である。一部の実施形態では、選択されたT細胞受容体遺伝子(例えば、TCRaまたはTCRb)は、GvHDを避けるためにノックアウトされる。CD52遺伝子をノックアウトして、抗CD52抗体治療に対してCAR T産物を抵抗性にすることもできる。したがって抗CD52抗体治療は、宿主免疫系をリンパ枯渇(lymphodeplete)し、CAR T細胞が生着したままで完全な治療的効果を達成できるように使用することができる。一例では、抗CD52抗体は、アレムツズマブを含むことができる(CHEMBL 1201587, ChemIDplus: 216503-57-0; DB00087; またUS5,846,534も参照されたい、その両方ともその全体で全ての目的に対して本明細書に組み込まれる)。次に、T細胞は、血液学的腫瘍または固形腫瘍に発現される特定の細胞表面タンパク質を認識するCARを発現するように操作される。次いで、操作されたT細胞は精製工程を受け、最終的にバイアル中で凍結保存される。

【0113】

自己キメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法を製造するためのプロセスは、患者自身の細胞(例えば、T細胞を含む白血球)を収集し、T細胞を遺伝子操作して、例えば癌細胞抗原などの、細胞表面に発現された標的抗原を認識するCARを発現させることを含む。次いで、操作された細胞を凍結保存し、その後、細胞が操作のために除去されたその患者に投与する。

【0114】

一部の実施形態では、単離された免疫細胞は、内因性TCRaおよび/またはCD52の発現を低減または除去するように遺伝子改変される。一部の実施形態では、細胞は、遺伝子編集技術(例えば、CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、TALEN(登録商標)、MegaTAL、メガヌクレアーゼ)を使用して遺伝子改変され、内因性タンパク質(例えば、TCRaおよび/またはCD52)の発現を低減または排除する。一部の実施形態では、方法は、エンドヌクレアーゼを細胞内に導入して、DNA切断による標的遺伝子の不活化を可能にすることにより、一つ以上の遺伝子を破壊または不活化することを含む。一部の実施形態では、エンドヌクレアーゼは、例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、megaTALヌク

10

20

30

40

50

レアーゼ、メガヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E ヌクレアーゼ / T A L E N)、または C R I S P R (例えば、C a s 9、C a s 1 2、または C A S 1 4) エンドヌクレアーゼであってもよい。

【 0 1 1 5 】

一部の実施形態では、免疫細胞は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微粒子銃 (b i o l i s t i c s) (例えば、遺伝子銃 (G e n e G u n))、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、またはポリプレックスを使用して、核酸ベクターによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、単離された免疫細胞は、内因性 T C R α および / または C D 5 2 の発現を低減または除去するように遺伝子改変される。

10

【 0 1 1 6 】

増殖と枯渇

本明細書に開示される方法の例示的な実施形態では、形質導入 T 細胞は、上述の活性化および増殖の記述に一般的に記載されるように、採取前に増殖させることができる。一部の実施形態では、形質導入細胞は、標的的内因性遺伝子をノックアウトするためにさらにトランスフェクトされる。一部の実施形態では、形質導入細胞は、例えば、T C R を発現する細胞など、望ましくない細胞型の枯渇されたものである。図 1 に示されるように、一部の実施形態では、形質導入細胞は、枯渇前または枯渇後に増殖させることができる。

【 0 1 1 7 】

フローサイトメトリーを使用して、細胞集団内の T 細胞受容体陽性細胞などの特定の細胞型を枯渇させることができる。概して、フローサイトメトリーは、主に光学的手段によって細胞の構成要素または構造特徴を定量化するための方法である。構造特徴を定量化することによって異なる細胞型を区別することができるため、フローサイトメトリーおよび細胞ソーティングを使用して、混合物中の異なる表現型の細胞をカウントおよびソートすることができる。

20

【 0 1 1 8 】

フローサイトメトリー解析には、二つの主要な工程、1) 一つ以上の標識マーカーで選択された細胞型を標識すること、および 2) 集団内の細胞の総数に対して標識細胞の数を決定すること、を伴う。一部の実施形態では、細胞型を標識する方法は、特定の細胞型、例えば T 細胞受容体、によって発現されるマーカーに標識された抗体を結合することを含む。抗体は、蛍光化合物で直接標識されるか、または例えば、第一の抗体を認識する蛍光標識された第二の抗体で間接的に標識され得る。

30

【 0 1 1 9 】

一部の実施形態では、C A R を発現する T 細胞をソートするために使用される方法は、磁気活性化細胞ソーティング (M A C S) である。磁気活性化細胞ソーティング (M A C S) は、超常磁性ナノ粒子およびカラムを使用して、その表面抗原 (C D 分子) に応じて様々な細胞集団を分離するための方法である。M A C S を使用して、純細胞集団を取得することができる。

【 0 1 2 0 】

単一細胞懸濁液中の細胞は、マイクロビーズで磁気標識され得る。試料は、強磁性球体からなるカラムに適用され、細胞にやさしいコーティングで覆われ、細胞の迅速かつ穏やかな分離を可能にする。標識されていない細胞は通過し、一方で磁気標識された細胞はカラム内に保持される。フロースルーは、非標識細胞画分として収集され得る。洗浄工程の後、カラムは分離器から除去され、磁気標識された細胞はカラムから溶出される。

40

【 0 1 2 1 】

T 細胞などの特定の細胞集団の精製のための詳細なプロトコルは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、B a s u S e t a l . (2 0 1 0) (B a s u S , C a m p b e l l H M , D i t t e l B N , R a y A . P u r i f i c a t i o n o f s p e c i f i c c e l l p o p u l a t i o n b y f l u o r e s c e n c e a c t i v a t e d c e l l s o r t i n g (F A C S) . J V i s E

50

x p . (4 1) : 1 5 4 6) に見出すことができる。

【 0 1 2 2 】

製剤および凍結保存

一部の実施形態では、操作された免疫細胞は、まずその培養培地から細胞を採取し、次いで治療有効量での投与に適した培地および容器システム（「医薬的に許容可能な」担体）で細胞を洗浄および濃縮することによって製剤化される。適切な注入培地は、任意の等張性培地製剤、典型的には生理食塩水、Normosol（商標）R（Abbott社）またはPlasma-Lyte（商標）A（Baxter社）であるが、水中の5%デキストロスまたはリンゲル乳酸も利用することができる。注入培地は、ヒト血清アルブミンで補充され得る。

10

【 0 1 2 3 】

別の実施形態では、操作された免疫細胞、例えば、CARを発現するT細胞は、採取、洗浄、および濃縮され、次いで、適切な凍結保存媒体、例えば、Cryosstor（登録商標）CS10、Cryosstor（登録商標）CS2、またはCryosstor（登録商標）CS5（BioLife Solutions）中で所定の細胞濃度で凍結保存される。標準的な手順が、ヒト対象における使用のための保管および/または調製のために、操作された免疫細胞、例えばCARを発現するT細胞、の凍結保存に使用される。必要な場合、凍結保存された操作された免疫細胞を解凍し、成長および増殖させて、より多くのそのような細胞を産生することができる。

20

【 0 1 2 4 】

キメラ抗原受容体

本明細書で使用される場合、キメラ抗原受容体（CAR）は、標的抗原（例えば、癌細胞上の標的抗原）を特異的に認識するタンパク質である。標的抗原に結合すると、CARは免疫細胞を活性化して、その抗原を有する細胞（例えば、癌細胞）を攻撃および破壊することができる。CARはまた、共刺激ドメインまたはシグナル伝達ドメインを組み込み、それらの効力を増加させることができる。例えば、Finney et al., Journal of Immunology, 1998, 161: 2791 - 2797, Song et al., Blood 119: 696 - 706 (2012); Kalas et al., Sci. Transl. Med. 3: 95 (2011); Porter et al., N. Engl. J. Med. 365: 725 - 33 (2011)、および Gross et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56: 59 - 83 (2016); 米国特許第7,741,465号、および第6,319,494号を参照されたい。

30

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載されるキメラ抗原受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含み、細胞外ドメインは、抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、抗原特異的CARは、5'から3'の以下の要素を含む：シグナル配列、抗原結合ドメイン、ヒンジおよび膜貫通領域、ならびに一つ以上の連続シグナル伝達ドメイン。

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態では、CARは、安全スイッチおよび/またはモノクローナル抗体特異的エピトープをさらに含む。例えば、WO2016/120216を参照されたい。

40

【 0 1 2 7 】

抗原結合ドメイン

上述のように、本明細書に記載のCARは、抗原結合ドメインを含む。本明細書で使用される場合、「抗原結合ドメイン」は、特定の標的抗原に結合する任意のポリペプチドを意味する。ある特定の実施形態では、抗原結合ドメインのポリペプチド構造は、抗体に基づく。抗原結合ドメインは、免疫学的に機能的な断片である抗体結合領域を含むが、これに限定されない。抗原結合ドメインの「免疫学的に機能的な断片」（または「断片」という用語は、全長鎖に存在するアミノ酸の少なくとも一部を欠くが、標的抗原に特異的に結合することが可能な抗体の部分（その部分がどのように取得または合成されるかによら

50

ない)を含む抗原結合ドメインの種である。こうした断片は、標的抗原に結合し、所与のエピトープに結合するために、無傷の抗体を含む他の抗原結合ドメインと競合しうるといふ点で、生物学的に活性である。免疫学的に機能的な断片は、s c F v断片、F a b断片(F a b'、F (a b')²など)、一つ以上の相補性決定領域(「C D R」)、二重特異性抗体(同じ鎖上の二つのドメイン間での対形成を可能にするにはあまりに短い、短いペプチドリンカーを介して結合された、軽鎖可変ドメインと同じポリペプチド上の重鎖可変ドメイン)、ドメイン抗体、二価抗原結合ドメイン(二つの抗原結合部位を含む)、多特異性抗原結合ドメイン、および単鎖抗体を含むが、これらに限定されない。これらの断片は、ヒト、マウス、ラット、ラクダ類、またはウサギを含むがこれらに限定されない、任意の哺乳類に由来し得る。

10

【0128】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体の全長の軽鎖または重鎖中に存在する一つ以上の相補性結合領域(C D R)を含み、一部の実施形態では、単一の重鎖および/または軽鎖またはその一部分を含む。これらの断片は、組換えD N A技術によって産生されてもよく、または無傷の抗体を含む抗原結合ドメインの酵素的切断または化学的切断によって産生されてもよい。

【0129】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、その断片の抗体であり、その相補性決定領域(C D R)のうちの一つ以上を含む。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、軽鎖C D RであるC D R 1、C D R 2およびC D R 3、ならびに重鎖C D RであるC D R 1、C D R 2およびC D R 3を含む、単鎖可変断片(s c F v)である。

20

【0130】

フレームワーク、C D R、および可変ドメインのそれぞれへのアミノ酸の割り当ては、典型的には、K a b a tナンバリング(例えば、K a b a t e t a l . i n S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h E d . , N I H P u b l i c a t i o n 9 1 - 3 2 4 2 , B e t h e s d a M d . 1 9 9 1を参照)、C h o t h i aナンバリング(例えば、C h o t h i a & L e s k , (1 9 8 7) , J M o l B i o l 1 9 6 : 9 0 1 - 9 1 7 ; A l - L a z i k a n i e t a l . , (1 9 9 7) J M o l B i o l 2 7 3 : 9 2 7 - 9 4 8 ; C h o t h i a e t a l . , (1 9 9 2) J M o l B i o l 2 2 7 : 7 9 9 - 8 1 7 ; T r a m o n t a n o e t a l . , (1 9 9 0) J M o l B i o l 2 1 5 (1) : 1 7 5 - 8 2 ; および米国特許第7,709,226号を参照)、接触ナンバリング、またはA b Mスキーム(A n t i b o d y M o d e l i n g p r o g r a m , O x f o r d M o l e c u l a r)のナンバリングスキームに従う。

30

【0131】

抗原結合ドメインのバリエーション(例えば、C D R、V Hおよび/またはV Lのバリエーション)も、本開示の範囲内であり、例えば、可変軽鎖および/または可変重鎖であって、各々が抗原結合ドメイン配列のアミノ酸配列と少なくとも70~80%、80~85%、85~90%、90~95%、95~97%、97~99%、または99%を超える同一性を有することも、本開示の範囲内である。一部の例では、こうした分子は、少なくとも一つの重鎖および一つの軽鎖を含むが、他の例では、バリエーション形態は、二つの可変軽鎖および二つの可変重鎖(またはそれらのサブ部分)を含む。当業者は、周知の技術を使用して、本明細書に記載する抗原結合ドメインの好適なバリエーションを決定することができる。ある特定のいくつかの実施形態において、当業者は、活性に重要とは考えられない領域を標的化することによって、活性を破壊することなく変化させることができる、分子の好適な領域を特定することができる。

40

【0132】

一部の実施形態では、抗原結合ドメインはs c F vである。一部の実施形態では、抗原選択性C A Rは、リーダーまたはシグナルペプチドを含む。当業者によって理解されるよ

50

うに、抗原結合ドメインは、非タンパク質成分を含み得る。

【0133】

本開示の方法および組成物におけるCARでの使用に適した抗原結合ドメインは、様々な抗原結合特異性を有し得る。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的細胞によって発現される（合成される）抗原上に存在するエピトープに特異的である。一例では、標的細胞は、癌細胞関連抗原である。癌細胞関連抗原は、例えば、乳癌細胞、B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫、肺癌細胞（例えば、小細胞肺癌細胞）、非ホジキンB細胞リンパ腫（B-NHL）細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、中皮腫細胞、肺癌細胞（例えば、小細胞肺癌細胞）、黒色腫細胞、慢性リンパ性白血球細胞、急性リンパ性白血球細胞、神経芽腫細胞、神経膠腫、神経膠芽腫、髄芽腫、結腸直腸癌細胞など、に関連する抗原であり得る。癌細胞関連抗原はまた、非癌細胞によっても発現され得る。

10

【0134】

キメラ結合抗原が結合することができる抗原の非限定的な例としては、例えば、CD19、CD20、CD38、CD30、ERBB2、CA125、MUC-1、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、CD44表面接着分子、メソテリン、癌胎児性抗原（CEA）、上皮成長因子受容体（EGFR）、EGFRvIII、血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR2）、高分子量黒色腫関連抗原（HMW-MAA）、MAGE-A1、IL-13R-a2、GD2、Ax1、Ror2、BCMAが挙げられる。Claudinおよびそのアイソタイプなど。

20

【0135】

ヒンジドメイン

本開示のCARの細胞外ドメインは、「ヒンジ」ドメイン（またはヒンジ領域）を含み得る。用語は、CAR中の膜貫通ドメインを、CAR中の細胞外抗原結合ドメインに連結するように機能する任意のポリペプチドを含む。特に、ヒンジドメインを使用して、細胞外抗原結合ドメインに対してより柔軟性およびアクセス可能性を提供することができる。

【0136】

ヒンジドメインは、最大300個のアミノ酸を含むことができ、一部の実施形態では、10~100個のアミノ酸、または一部の実施形態では、25~50個のアミノ酸を含むことができる。ヒンジドメインは、天然起源分子の全てまたは一部に、例えば、CD8、CD4、CD28、4-1BB、またはIgGの細胞外領域の全てまたは一部に（特に、IgGのヒンジ領域；ヒンジ領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、IgMなどの免疫グロブリンファミリーのメンバーのいくつかもしくは全て、またはその断片を含有し得ることを理解されたい）、または抗体重鎖定常領域の全てまたは一部に、由来し得る。

30

【0137】

あるいは、ヒンジドメインは、天然起源の配列に対応する合成配列であってもよく、または完全合成配列であってもよい。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、ヒトCD8a鎖（例えば、NP_001139345.1）の一部である。別の特定の実施形態では、前述のヒンジドメインおよび膜貫通ドメインは、ヒトCD8a鎖の一部を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のCARのヒンジドメインは、CD8a、CD28、IgG1、IgG4、PD-1、またはFcγRIIIa分子のサブ配列、特にCD8a、CD28、IgG1、IgG4、PD-1、またはFcγRIIIa分子のいずれかのヒンジ領域を含む。一部の実施形態では、ヒンジドメインは、ヒトCD8aヒンジ、ヒトIgG1ヒンジ、ヒトIgG4ヒンジ、ヒトPD-1ヒンジ、またはヒトFcγRIIIaヒンジを含む。一部の実施形態では、本明細書に開示されるCARは、scFv、CD8aヒトヒンジおよび膜貫通ドメインを含む。

40

【0138】

膜貫通ドメイン

本開示のCARは、CARの細胞外ドメインに融合された膜貫通ドメインを用いて設計

50

される。これは同様に、CARの細胞内ドメインに融合され得る。いくつかの例では、膜貫通ドメインは、アミノ酸置換によって選択または改変されて、かかるドメインの、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへの結合を回避し、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化することができる。一部の実施形態では、短いリンカーは、CARの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインのいずれかまたは一部の間に結合を形成することができる。本明細書に開示されるCARの好適な膜貫通ドメインは、(a)表面に、例えば限定されないが、リンパ球細胞、例えばTヘルパー(T_H)細胞などのCD4+細胞、細胞傷害性T(T_C)細胞などのCD8+細胞、T調節性(T_{Reg})細胞、またはナチュラルキラー(NK)細胞、などの免疫細胞を発現する能力、および/または(b)標的細胞に対して免疫細胞の細胞応答を向けるために、細胞外抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインと相互作用する能力を有する。

【0139】

膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。本開示における特定の使用の膜貫通領域は、CD28、CD8、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、プログラム死-I(PD-1)、誘導性T細胞共刺激体(ICOS)、リンパ球機能関連抗原-I(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Igアルファ(CD79a)、DAP-10、Feガンマ受容体、MHCクラス1分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CDI1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CDI1a、LFA-1、ITGAM、CDI1b、ITGAX、CDI1e、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANSCENDANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELP(LG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83と特異的に結合するリガンド、またはそれらの任意の組み合わせに由来し得る(含み得るまたは対応し得る)。

【0140】

非限定的な例として、膜貫通領域は、T細胞受容体、CD3複合体を構成するポリペプチド、IL-2受容体、p55(a鎖)、p75(P鎖)、またはγ鎖、Fe受容体のサブユニット鎖、特にFeγ受容体III、またはCDタンパク質に由来してもよく、またはその一部分であってもよい。あるいは、膜貫通ドメインは合成であってもよく、主にロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含んでもよい。一部の実施形態では、前述の膜貫通ドメインは、ヒトCD8a鎖(例えば、NP_001139345.1)に由来する。

【0141】

細胞内ドメイン

本開示のCARの細胞内(細胞質)ドメインは、CAR、例えばシグナル1/活性化、および/またはシグナル2/共刺激、を含む免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも一つの活性化を提供することができる。T細胞のエフェクター機能は、例えば、サイ

トカインの分泌を含む細胞溶解活性またはヘルパー活性を指すことができる。一部の実施形態では、CARで使用するための活性化細胞内シグナル伝達ドメインは、例えば、限定されないが、抗原受容体の係合後にシグナル伝達を開始するように協働して作用するT細胞受容体および共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導體またはバリアント、ならびに同じ機能を有する任意の合成配列であってもよい。

【0142】

適切な（例えば活性化）細胞内ドメインは、限定されないが、CD3ゼータ、CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、プログラム死-I（PD-1）、誘導性T細胞共刺激体（ICOS）、リンパ球機能関連抗原-I（LFA-1、CD1-1a/CD18）、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD247、CD276（B7-H3）、LIGHT、（TNFSF14）、NKG2C、Igアルファ（CD79a）、DAP-10、Feガンマ受容体、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子（SLAMタンパク質）、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKp80（KLRFL）、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CDI1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CDI1a、LFA-1、ITGAM、CDI1b、ITGAX、CDI1e、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELP LG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83と特異的に結合するリガンド、またはそれらの任意の組み合わせに由来する（または対応する）シグナル伝達ドメインを含むことを理解されたい。

【0143】

細胞内ドメインは、上述の活性化ドメインに加えて、共刺激シグナル伝達ドメイン（本明細書では、共刺激分子として交換可能に示される）を組み込み、それらの効力を増加させることができる。共刺激ドメインは、本明細書に記載される活性化分子によって提供される一次シグナルに加えてシグナルを提供することができる。

【0144】

本開示の範囲内の適切な共刺激ドメインは、例えば、CD28、OX40、4-1BB/CD137、CD2、CD3（アルファ、ベータ、デルタ、イプシロン、ガンマ、ゼータ）、CD4、CDS、CD7、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-I（LFA-1（CDI1a/CD18）、CD247、CD276（B7-H3）、LIGHT（腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー14；TNFSF14）、NKG2C、Igアルファ（CD79a）、DAP-10、Feガンマ受容体、MHCクラスI分子、TNFR、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子、BTLA、Tollリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKp80（KLRFL）、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4

、V L A 1、C D 4 9 a、I T G A 4、I A 4、C D 4 9 D、I T G A 6、V L A - 6、C D 4 9 f、I T G A D、C D 1 - 1 d、I T G A E、C D 1 0 3、I T G A L、C D 1 - 1 a、L F A - 1、I T G A M、C D 1 - 1 b、I T G A X、C D 1 - 1 c、I T G B 1、C D 2 9、I T G B 2、C D 1 8、L F A - 1、I T G B 7、N K G 2 D、T N F R 2、T R A N C E / R A N K L、D N A M 1 (C D 2 2 6)、S L A M F 4 (C D 2 4 4、2 B 4)、C D 8 4、C D 9 6 (T a c t i l e)、C E A C A M 1、C R T A M、L y 9 (C D 2 2 9)、C D 1 6 0 (B Y 5 5)、P S G L 1、C D 1 0 0 (S E M A 4 D)、C D 6 9、S L A M F 6 (N T B - A、L y 1 0 8)、S L A M (S L A M F 1、C D 1 5 0、I P O - 3)、B L A M E (S L A M F 8)、S E L P L G (C D 1 6 2)、L T B R、L A T、G A D S、S L P - 7 6、P A G / C b p、C D 1 9 a、C D 8 3
 リガンド、またはその断片もしくは組み合わせに由来し得る（または対応し得る）ことを理解されたい。上記に列挙されていない追加の共刺激性分子またはその断片は、本開示の範囲内にあることが理解される。

【0145】

一部の実施形態では、C A Rの細胞内/細胞質ドメインは、4 - 1 B B / C D 1 3 7 ドメインをそれ自体で含むように設計されてもよく、またはC A Rの文脈で有用な任意の他の所望の細胞内ドメインと組み合わせられてもよい。4 - 1 B B / C D 1 3 7の完全な天然アミノ酸配列は、N C B I 参照配列：N P _ 0 0 1 5 5 2 . 2 に記載される。完全な天然4 - 1 B B / C D 1 3 7 核酸配列は、N C B I 参照配列：N M _ 0 0 1 5 6 1 . 5 に記載される。

【0146】

一部の実施形態では、C A Rの細胞内/細胞質ドメインは、C D 2 8 ドメインをそれ自体で含むように設計されてもよく、またはC A Rの文脈で有用な任意の他の所望の細胞内ドメインと組み合わせられてもよい。C D 2 8の完全な天然アミノ酸配列は、N C B I 参照配列：N P _ 0 0 6 1 3 0 . 1 に記載される。完全な天然C D 2 8 核酸配列は、N C B I 参照配列：N M _ 0 0 6 1 3 9 . 1 に記載される。

【0147】

一部の実施形態では、C A Rの細胞内/細胞質ドメインは、C D 3 ゼータドメインをそれ自体で含むように設計されてもよく、またはC A Rの文脈で有用な任意の他の所望の細胞内ドメインと組み合わせられてもよい。一部の実施形態では、C A Rの細胞内シグナル伝達ドメインは、C D 3 1 シグナル伝達ドメインを含有してもよい。例えば、C A Rの細胞内ドメインは、C D 3 ゼータ鎖部分および共刺激シグナル伝達分子の一部を含み得る。C A Rの細胞内シグナル伝達部分内の細胞内シグナル伝達配列は、ランダムまたは特定の順序で互いに連結することができる。

【0148】

核酸および発現ベクターの調製

本明細書では、C A Rをコードする核酸、およびC A Rをコードする核酸を含むベクターを作製する方法が提供される。

【0149】

本開示によるポリヌクレオチド、およびベクターの作製には、様々な公知の技術を利用することができる。例えば、本開示の構築物および操作された免疫細胞を作製するための特定の方法は、W O 2 0 1 5 / 1 2 0 0 9 6 の開示に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0150】

C A Rをコードするヌクレオチド配列は、発現ベクター中に存在し得る。C A Rが二つの別個のポリペプチドを含む場合、二つのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、同じベクターまたは別個のベクターでクローニングすることができる。発現ベクターは、選択可能なマーカー、複製開始点、およびベクターの複製および/または維持を提供する他の特徴を含み得る。適切な発現ベクターには、例えば、プラスミド、ウイルスベクターなどが含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 1 】

ポリヌクレオチドのクローニングのために、発現ベクターを宿主細胞（単離された宿主細胞）に導入して、ベクター自体の複製を可能にし、それによってその中に含有されるポリヌクレオチドのコピーを増幅することができる。クローニングベクターは、配列構成要素を含有することができ、限定されるものではないが、概して複製開始点、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、および選択可能なマーカーを含む。これらの要素は、当業者によって適宜選択され得る。例えば、複製開始点は、宿主細胞中のベクターの自律的複製を促進するために選択され得る。

【 0 1 5 2 】

他の実施形態では、本開示は、本明細書に記載される抗原結合ドメインのいずれか一つをコードする単離ポリヌクレオチドに関する。一部の実施形態では、本開示は、CARをコードする単離ポリヌクレオチドに関する。また、ポリヌクレオチドを含むベクター、およびポリヌクレオチドを作製する方法も本明細書において提供される。

10

【 0 1 5 3 】

ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書に提供される発現ベクターを含有する単離された宿主細胞を提供する。ベクターを含有する宿主細胞は、ベクター中に含有されるポリヌクレオチドの発現またはクローニングに有用であり得る。適切な宿主細胞には、限定されるものではないが、原核細胞、真菌細胞、酵母細胞、または哺乳類細胞、さらに具体的にはヒト細胞などのより高次の真核細胞が含まれ得る。

【 0 1 5 4 】

ベクターは、限定されるものではないが、DEAE-デキストラン媒介送達、リン酸カルシウム沈殿法、カチオン性脂質媒介送達、リポソーム媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、微粒子銃、受容体媒介遺伝子送達、ポリリジン（polylysine）、ヒストン、キトサン、およびペプチドによって媒介される送達を含む、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して宿主細胞に導入され得る。対象となるベクターの発現のための細胞のウイルストランスフェクションおよび形質転換のための標準的な方法は、当該技術分野で周知である。さらなる実施形態では、異なる発現ベクターの混合物は、免疫エフェクター細胞のドナー集団を遺伝子改変する際に使用することができ、各ベクターは、本明細書に開示される異なるCARをコードする。結果として生じる形質導入免疫エフェクター細胞は、操作された細胞の混合集団を形成し、操作された細胞の割合は、複数の異なるCARを発現する。

20

30

【 0 1 5 5 】

レトロウイルス粒子の調製

本明細書に開示される例示的な実施形態では、形質導入方法は、一つ以上の核酸を含む複製不能組換えレトロウイルス粒子を用いて、T細胞などの免疫細胞を形質導入して、操作されたT細胞などの、形質導入された操作された免疫細胞を生成する工程を含み得る。一部の実施形態では、一つ以上の核酸は、後に形質導入されたT細胞、例えばキメラ抗原受容体（CAR）で発現される、一つ以上のタンパク質をコードし得る。本明細書に提供される方法においてT細胞および/またはNK細胞を形質導入するために使用されるレトロウイルス粒子は、当技術分野で公知の方法に従って作製することができる。本明細書に開示されるように、レトロウイルス粒子は、遺伝子送達のための一般的なツールである（Miller, Nature (1992) 357: 455-460）。一部の実施形態では、複製不能組換えレトロウイルス粒子は、アルファレトロウイルス属、ベータレトロウイルス属、ガンマレトロウイルス属、デルタレトロウイルス属、イプシロンレトロウイルス属、レンチウイルス属、またはスプマウイルス属に由来し得る。本明細書に開示される方法での使用に適した多くのレトロウイルスがある。レトロウイルスの詳細なリストは、Coffinet al (“Retroviruses” 1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: J M Coffin, S M Hughes, H E Varmus pp 758-763)に見出すことができる。いくつかのレトロウイルスのゲノム構造についての詳細は、当技術分野で

40

50

見出すことができる。例として、H I Vに関する詳細は、N C B I G e n b a n k (すなわち、ゲノム登録番号A F 0 3 3 8 1 9) から見出すことができる。

【0156】

例示的な実施形態では、レトロウイルス粒子は、レンチウイルス属からの組換えレトロウイルスに由来し得、複製不能組換えレンチウイルス粒子であり得る。一部の実施形態では、組換えレトロウイルスは、H I V、S I V、またはF I Vに由来し得る。さらなる例示的な実施形態では、組換えレトロウイルスは、レンチウイルス属のヒト免疫不全ウイルス(H I V)に由来し得る。

【0157】

一部の実施形態では、複製不能組換えレトロウイルス粒子は、複製不能組換えレトロウイルス粒子製造に特異的な培地中の培養物中で増殖させることができる。複製不能組換えレトロウイルス粒子を増殖させるための任意の適切な増殖培地および/またはサプリメントを、本明細書に記載の方法に従って、複製不能組換えレトロウイルス粒子接種材料に使用することができる。一部の態様によれば、レトロウイルス粒子は、その後、形質導入工程(transduction step)の間に培地に添加され得る。

【0158】

複製不能組換えレトロウイルス粒子は、当技術分野で公知の方法に従って哺乳類細胞株を使用して産生することができる。適切な哺乳類細胞には、初代細胞および不死化細胞株が含まれる。適切な哺乳類細胞株は、ヒト細胞株を含み得る。適切な哺乳類細胞株には、限定されないが、HeLa細胞(例えば、American Type Culture Collection(ATCC)番号CCL-2)、CHO細胞(例えば、ATCC番号CRL9618、CCL61、CRL9096)、293細胞(例えば、ATCC番号CRL-1573)、Vero細胞、NIH 3T3細胞(例えば、ATCC番号CRL-1658)、Huh-7細胞、BHK細胞(例えば、ATCC番号CCL10)、PC12細胞(ATCC番号CRL1721)、COS細胞、COS-7細胞(ATCC番号CRL1651)、ヒト胎児性腎臓(HEK)細胞(ATCC番号CRL1573)、HL Hep G2細胞、Hut-78、Jurkat、HL-60、NK細胞株(例えば、NKL、NK92、およびYTS)などが含まれる。一部の例では、細胞は不死化細胞株ではなく、代わりに、個体またはエクスピボ細胞から得られた細胞(例えば、初代細胞)である。例えば、一部の実施形態では、細胞は、個体から得られた免疫細胞である。別の例として、細胞は、個体から得られた幹細胞または前駆細胞である。

【0159】

操作された免疫細胞

本開示の操作された免疫細胞は、同種または自己であり得る。

【0160】

一部の実施形態では、操作された免疫細胞は、T細胞(例えば、炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、調節性Tリンパ球(Treg)、ヘルパーTリンパ球、腫瘍浸潤リンパ球(TIL))、ナチュラルキラーT細胞(NKT)、TCR発現細胞、樹状細胞、キラー樹状細胞、マスト細胞、ナチュラルキラー細胞、またはB細胞である。一部の実施形態では、細胞は、CD4+T-リンパ球およびCD8+T-リンパ球のうちの一つまたは両方からなる群に由来し得る。一部の例示的な実施形態では、操作された免疫細胞はT細胞である。一部の例示的な実施形態では、操作された免疫細胞はガンマデルタT細胞である。一部の例示的な実施形態では、操作された免疫細胞はマクロファージである。一部の例示的な実施形態では、操作された免疫細胞はナチュラルキラー(NK)細胞である。

【0161】

上述のように、一部の実施形態では、操作された免疫細胞は、例えば限定されないが幹細胞に由来し得る。幹細胞は、成体幹細胞、非ヒト胚性幹細胞、より詳細には、非ヒト幹細胞、臍帯血幹細胞、前駆細胞、骨髄幹細胞、人工多能性幹細胞、全能性幹細胞、または造血幹細胞であり得る。一部の実施形態では、細胞は、末梢血から取得または調製される。一部の実施形態では、細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)から取得または調製される

10

20

30

40

50

。一部の実施形態では、細胞は、骨髄から取得または調製される。一部の実施形態では、細胞は、臍帯血から取得または調製される。一部の実施形態では、細胞はヒト細胞である。

【0162】

一部の実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載される方法により産生されるCARを発現するTリンパ球である。一部の実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載される方法により産生されるCARを発現する細胞傷害性Tリンパ球である。一部の実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載される方法により産生されるCARを発現する調節性Tリンパ球である。一部の実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載される方法により産生されるCARを発現するヘルパーTリンパ球である。一部の実施形態では、本開示の操作された免疫細胞は、CARの集団を含み、各CARは異なる細胞外抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、免疫細胞は、CARの集団を含み、各CARは同じ細胞外抗原結合ドメインを含む。

10

【0163】

また、上述の方法のいずれかに従って、形質転換された免疫細胞（例えば、T細胞）から得られた細胞株も本明細書に提供される。また、本明細書では、免疫抑制治療に耐性の改変細胞も提供される。一部の実施形態では、本開示による単離細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、操作された免疫細胞は、CARの集団を含み、各CARは細胞外抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態では、免疫細胞は、CARの集団を含み、各CARは同じ細胞外抗原結合ドメインを含む。

20

【0164】

一部の実施形態では、本開示による操作された免疫細胞は、一つ以上の破壊された遺伝子または不活化された遺伝子を含み得る。一部の実施形態では、本開示による操作された免疫細胞は、CD52、DLL3、GR、PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、BY55、TIGIT、B7H5、LAIR1、SIGLEC10、2B4、HLA、TCRa、およびTCRbからなる群から選択される一つの破壊された遺伝子または不活化された遺伝子を含み、ならびに/またはCAR、多鎖CAR、および/もしくはpTa導入遺伝子を発現する。一部の実施形態では、単離細胞は、多鎖CARを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、本開示による単離細胞は、以下からなる群から選択される二つの破壊された遺伝子または不活化された遺伝子を含む：CD52およびGR、CD52およびTCRa、CDR52およびTCRb、GRおよびTCRa、GRおよびTCRb、TCRaおよびTCRb、PD-1およびTCRa、PD-1およびTCRb、CTLA-4およびTCRa、CTLA-4およびTCRb、LAG3およびTCRa、LAG3およびTCRb、TIM3およびTCRa、Tim3およびTCRb、BTLAおよびTCRa、BTLAおよびTCRb、BY55およびTCRa、BY55およびTCRb、TIGITおよびTCRa、TIGITおよびTCRb、B7H5およびTCRa、B7H5およびTCRb、およびTCRb、SIGLEC10およびTCRa、SIGLEC10およびTCRb、2B4およびTCRa、2B4およびTCRb、ならびに/または本開示による単離細胞は、CAR、多鎖CAR、および/もしくはpTa導入遺伝子を発現する。

30

40

【0165】

一部の実施形態では、TCRは、TCRa遺伝子および/またはTCRP遺伝子を破壊または不活化することによって、本開示による細胞内で機能的ではない状態になる。一部の実施形態では、個体に由来する改変細胞を取得する方法が提供され、ここにおいて、細胞は、主要組織適合複合体(MHC)シグナル伝達経路とは独立して増殖することができる。本方法によって取得可能である改変細胞は、MHCシグナル伝達経路から独立して増殖することができ、本開示の範囲に包含される。

【0166】

一部の実施形態では、免疫細胞は、一つ以上の化学療法剤に耐性であるように操作される。化学療法剤は、例えば、プリンヌクレオチド類似体(PNA)であってもよく、した

50

がって、養子免疫療法と化学療法とを組み合わせた癌治療に適した免疫細胞を作る。例示的なPNAとしては、例えば、クロファラビン、フルダラビン、シクロホスファミド、およびシタラビンが単独でまたは組み合わせて含まれる。PNAは、デオキシシチジンキナーゼ(dCK)によってモノリン酸PNA、ジリン酸PNA、およびトリリン酸PNAに代謝される。それらのトリリン酸形態は、DNA合成のためにATPと競合し、アポトーシス促進剤として作用し、トリヌクレオチド生成に關与するリボヌクレオチドレダクターゼ(RNR)の強力な阻害剤である。

【0167】

一部の実施形態では、本開示の単離細胞または細胞株は、pTaまたはその機能的バリエーションを含み得る。一部の実施形態では、単離細胞または細胞株は、TCRa遺伝子を破壊または不活化することによってさらに遺伝子改変され得る。

10

【0168】

上述のように、本開示はまた、CARポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞も提供する。一部の実施形態では、CARは、プラスミドベクターを介して導入遺伝子として免疫細胞内に導入され得る。一部の実施形態では、プラスミドベクターはまた、例えば、ベクターを受容した細胞の識別および/または選択を提供する選択マーカ含有してよい。

【0169】

一部の実施形態では、細胞は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、微粒子銃(biolistics)(例えば、遺伝子銃(Gene Gun))、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、またはポリプレックスからなる群から選択される方法を使用して、本開示の核酸ベクターによってトランスフェクトされる。一部の実施形態では、細胞は、本開示のウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター、特にレンチウイルスベクターで形質導入される。

20

【0170】

治療方法

癌を含む疾患または障害を治療するための方法が提供される。一部の実施形態では、本開示は、対象におけるT細胞介在性免疫反応の生成に關し、本開示の操作された免疫細胞の有効量を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、T細胞介在性免疫反応は、標的細胞に対して向けられる。一部の実施形態では、操作された免疫細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)を含む。一部の実施形態では、標的細胞は腫瘍細胞である。いくつかの態様では、本開示は、悪性腫瘍を治療または予防するための方法を含み、前述の方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載の少なくとも一つの単離された抗原結合ドメインの有効量を投与することを含む。いくつかの態様では、本開示は、悪性腫瘍を治療または予防するための方法を含み、前述の方法は、それを必要とする対象に、少なくとも一つの免疫細胞の有効量を投与することを含む。免疫細胞は、本明細書に記載の少なくとも一つのキメラ抗原受容体、および/または単離された抗原結合ドメインを含む。

30

【0171】

一部の実施形態では、対象は、固形腫瘍、またはリンパ腫もしくは白血病などの血液悪性腫瘍を有する。一部の実施形態では、癌は、対象の骨髄中に存在する。一部の実施形態では、操作された細胞は、自己免疫細胞、例えば、自己T細胞である。一部の実施形態では、操作された細胞は、同種免疫細胞、例えば、同種T細胞である。一部の実施形態では、操作された細胞は、異種免疫細胞、例えば、異種T細胞である。一部の実施形態では、操作された細胞は、エキスピボでトランスフェクトおよび/または形質導入される。本明細書で使用される場合、用語「インビトロ細胞」は、エキスピボで培養される任意の細胞を指す。治療剤、例えば、操作されたCAR T細胞の「治療有効量」、「有効用量」、「有効量」または「治療有効用量」は、単独で、または別の治療剤と組み合わせて使用された場合、疾患の発症に対して対象を保護する、または疾患の症状の重症度の減少、疾患無症状期間の頻度および持続期間の増加、または疾患(disease affliction)による機能障害もしくは障害の予防によって証明される疾患退縮を促進する、任意

40

50

の量である。疾患退縮を促進する治療剤の能力は、例えば、臨床試験中のヒト対象において、ヒトにおける有効性を予測する動物モデル系において、またはインビトロアッセイにおける薬剤の活性をアッセイすることによって、熟練した施術者（例えば、医師または臨床医）に公知の様々な方法を用いて評価することができる。

【0172】

用語「患者」および「対象」は互換的に使用され、ヒト対象、ならびに正式に診断された障害を有するもの、正式に認識された障害を有していないもの、医学的な注意を引くもの、障害を発症するリスクを有するものなどを含む。

【0173】

用語「治療する」および「治療」は、治療的治療、予防的治療、および対象が障害または他のリスク因子を発症するリスクを減少させる開示を含む。治療は、障害の完全な治癒を必要とせず、症状または根底にあるリスク因子を減少させる実施形態を包含する。用語「予防する」は、事象の可能性の100%除去を必要としない。むしろ、化合物または方法の存在下で事象の発生の可能性が低減されたことを示す。 10

【0174】

組成物中の細胞の所望の治療総量は、少なくとも2個の細胞（例えば、少なくとも一個のCD8+T細胞および少なくとも一個のCD4+T細胞、または二個のCD8+T細胞、または二個のCD4+T細胞）であるか、またはより典型的には 10^2 個を超える細胞であり、および最大 10^6 個、その個数を含んで最大 10^8 個または 10^9 個の細胞であり、および 10^{10} または 10^{12} 個以上の細胞であり得る。細胞数は、組成物が意図される望ましい使用、およびその中に含まれる細胞のタイプに依存する。所望の細胞の密度は、典型的には、 10^6 細胞/ml超であり、概して、 10^7 細胞/ml超、概して、 10^8 細胞/ml超である。臨床的に意義のある数の免疫細胞を、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、または 10^{12} 細胞に累積的に等しいか、またはそれを超える複数の注入に分配することができる。本開示のいくつかの態様では、特に、注入された全ての細胞は特定の標的抗原に再び向けられるため、 10^6 /キログラム（患者あたり $10^6 \sim 10^{11}$ ）の範囲のより少ない細胞数を投与することができる。CAR治療は、これらの範囲内の用量で複数回投与することができる。 20

【0175】

細胞は、療法を受けている患者に対し、自己、同種、または異種であり得る。 30

【0176】

一部の実施形態では、CAR T細胞の治療有効量は約 1×10^5 細胞/kg、約 2×10^5 細胞/kg、約 3×10^5 細胞/kg、約 4×10^5 細胞/kg、約 5×10^5 細胞/kg、約 6×10^5 細胞/kg、約 7×10^5 細胞/kg、約 8×10^5 細胞/kg、約 9×10^5 細胞/kg、 2×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg、約 6×10^6 細胞/kg、約 7×10^6 細胞/kg、約 8×10^6 細胞/kg、約 9×10^6 細胞/kg、約 1×10^7 細胞/kg、約 2×10^7 細胞/kg、約 3×10^7 細胞/kg、約 4×10^7 細胞/kg、約 5×10^7 細胞/kg、約 6×10^7 細胞/kg、約 7×10^7 細胞/kg、約 8×10^7 細胞/kg、または約 9×10^7 細胞/kgである。 40

【0177】

一部の実施形態では、CAR+/CAR-T+細胞についての標的用量は、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞/kg、例えば、約 1×10^6 細胞/kg、約 1×10^7 細胞/kg、約 1×10^8 細胞/kg、約 1×10^9 細胞/kg、または約 1×10^{10} 細胞/kgの範囲である。この範囲を超える用量および下回る用量は、特定の対象に適切であり得、必要に応じて、適切な用量レベルを医療従事者によって決定することができる。さらに、本開示に従って細胞の複数回用量を提供することができる。

【0178】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載の少なくとも一つの抗原結合ドメインと、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物を含む。一部の実施形態では、医薬組 50

成物は、追加の活性薬剤をさらに含む。

【0179】

本開示のCAR発現細胞集団は、単独で、または希釈剤と組み合わせた、および/またはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞集団などの他の構成要素と組み合わせた医薬組成物として、のいずれかで投与することができる。本開示の医薬組成物は、本明細書に記載のT細胞などのCAR発現細胞集団を、一つ以上の薬学的または生理学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて含むことができる。こうした組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝剤、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストランなどの炭水化物、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤、アジュバント（例えば水酸化アルミニウム）、および保存剤を含み得る。本開示の組成物は、静脈内投与のために製剤化されることが好ましい。

10

【0180】

医薬組成物（溶液、懸濁液など）は、以下のうちの一つ以上を含み得る：注射用水などの滅菌希釈剤、生理食塩水、好ましくは、生理食塩水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム、溶媒または懸濁媒として役立つ合成モノグリセリドまたはジグリセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤と、アスコルビン酸または亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート剤と、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤、塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張性の調整のための薬剤。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラス製もしくはプラスチック製の複数回用量バイアルに封入され得る。治療的開示のため、注射用医薬組成物は、滅菌であることが好ましい。

20

【0181】

方法は、本明細書に提供される操作された細胞を投与する前に、一つ以上の化学療法剤を患者に投与することをさらに含んでもよい。ある特定の実施形態では、化学療法剤は、リンパ球枯渇（前処理）化学療法である。例えばシクロホスファミドの特定の有益な用量（ $200\text{ mg/m}^2/\text{日} \sim 2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $100\text{ mg/m}^2/\text{日} \sim$ 約 $2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ；例えば、約 $100\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $200\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $400\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $600\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $700\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $800\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $1000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $1500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または約 $2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）および特定用量のフルダラビン（ $20\text{ mg/m}^2/\text{日} \sim 900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $10\text{ mg/m}^2/\text{日} \sim$ 約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ；例えば、約 $10\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $40\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $40\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $50\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $70\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $80\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $90\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $100\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）を患者に投与することを含むT細胞療法を必要とする患者を条件づける方法である。例示的な投与レジメンは、患者への治療有効量の操作されたT細胞の投与前に、三日間、約 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ のフルダラビンの投与と組み合わせて、またその前または後に、約 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ のシクロホスファミドを患者に毎日投与することを含む、患者を治療することを伴う。

30

40

【0182】

一部の実施形態では、特に、本明細書に提供される操作された細胞が、CD52の表面発現を排除または最小化するように遺伝子編集されていた場合には、リンパ球枯渇は、例えばアレムツズマブなどの抗CD52抗体の投与をさらに含む。一部の実施形態では、CD52抗体は、約 $1 \sim 20\text{ mg/日IV}$ 、例えば、約 13 mg/日IV の用量で、1、2、3、4、5、6、7日間、またはそれ以上投与される。

【0183】

抗体は、リンパ球枯渇レジメンの他の要素（例えば、シクロホスファミドおよび/また

50

はフルダラビン)の投与と組み合わせて、その投与の前、または後に投与され得る。

【0184】

他の実施形態では、抗原結合ドメイン、形質導入(または他の方法で操作された)細胞、および化学療法剤は、それぞれ、対象の疾患または病態を治療するために有効な量で投与される。

【0185】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示されるCAR発現免疫エフェクター細胞を含む組成物は、任意の数の化学療法剤と併せて投与することができる。化学療法剤の例としては、チオテパおよびシクロホスファミド(CYTOXAN(商標))などのアルキル化剤;アルキルスルホン酸塩、例えばブスルファン、インブrosulfanおよびピボスルファン;アジリジン、例えばベンゾドパ、カルボコン、メツレドール、およびウレドール;アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスファミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)およびトリメチルオロメラミンレジユメ(trimethylolomelamine residue)を含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン;窒素マスタード、例えばクロラムブシル、クロマファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロルエタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード;カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソウレア;抗生物質、例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリチアマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、チュベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン;代謝拮抗薬、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU);葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート;例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体;ピリミジン類似体、例えばアンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン、5-FU;アンドロゲン、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオン酸塩、エピチオスタンオール、メピチオスタン、テストステロン;抗副腎剤(anti-adrenal)、例えば、アミノグレルテチミド、ミトタン、トリロスタン;葉酸補充剤、例えば、フロリン酸;アセグラトン;アルドホスファミドグリコシド;アミノレブリン酸;アムサクリン;ベストラブシル;ピサントレン;エダトラキセート;デフォファミン;デメコルシン;ジアジコン;エルホルミチン;酢酸エリプチニウム;エトグルシド;硝酸ガリウム;ヒドロキシ尿素;レンチナン;ロニダミン;ミトグアゾン、ミトキサントロン;モピダモール;ニトラクリン;ペントスタチン;フェナメット;ピラルピシン;ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド;プロカルバジン;PSK(登録商標);ラゾキサラン;シゾフィラン;スピロゲルマニウム;テヌアゾン酸;トリアジコン;2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン;ウレタン;ペンデシン;ダカルバジン;マンノムスチン;ミトブロニトール;ミトラクトール;ピボプロマン;ガシトシン;アラビノシド(「Ara-C」);シクロホスファミド;チオテパ;タキソイド、例えば、パクリタキセル(TAXOL(商標)、Bristol-Myers Squibb)およびドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、Rhone-Poulenc Rorer);クロラムブシル;ゲムシタピン;6-チオグアニン;メルカプトプリン;メトトレキサート;プラチナ類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン;ピンブラスチン;プラチナ;エトポシド(VP-16);イホスファミド;マイトマイシンC;ミトキサントロン;ピンクリスチン;ピノレル

10

20

30

40

50

ピン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼロ
 ーダ；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RF S 2000；ジ
 フルオロメチルオミチン（DMFO）；Targretin（商標）（ベキサロテン）、
 Panretin（商標）、（アリトレチノイン）などのレチノイン酸誘導体；ONT
 AK（商標）（デニロイキンジフチトックス）；エスベラマイシン；カペシタピン；なら
 びに前述のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体が挙げられる。この定義に
 は、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4（5）-イミダゾー
 ル、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117
 018、オナプリストン、およびトレミフェン（フェアストン）などの抗エストロゲン；
 ならびにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリンなどの
 抗アンドロゲンなどの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗
 ホルモン剤；ならびに前述のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体も含まれ
 る。化学療法剤の組み合わせはまた、適切な場合に投与され、CHOP、すなわちシクロ
 ホスファミド（シトキサン（登録商標））、ドキシソルピシン（ヒドロキシドキシソルピシン
 ）、ピンクリスチン（オンコピン（登録商標））、およびブレドニゾンを含むが、これら
 に限定されない。

【0186】

一部の実施形態では、化学療法剤は、操作された細胞、ポリペプチド、または核酸の投
 与後、同時に、または一週間以内に投与される。他の実施形態では、化学療法剤は、操作
 された細胞、ポリペプチド、または核酸の投与後、約1~7日、約1~約4週間、または
 約1週間~約1か月、約1週間~約2か月、約1週間~約3か月、約1週間~約6か月、
 約1週間~約9か月、または約1週間~約12か月で投与される。他の実施形態では、化
 学療法剤は、細胞、ポリペプチド、または核酸を投与する少なくとも1か月前に投与され
 る。一部の実施形態では、方法は、二つ以上の化学療法剤を投与することをさらに含む。

【0187】

様々な追加の治療剤を、本明細書に記載される組成物と併せて使用することができる。
 例えば、潜在的に有用な追加の治療剤としては、ニボルマブ（オブジーボ（登録商標））
 、ペムブロリズマブ（キイトルーダ（登録商標））、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、
 およびアテゾリズマブなどのPD-1阻害剤が挙げられる。本開示と組み合わせた使用に
 適した追加の治療剤には、限定されるものではないが、イブルチニブ（イムブルピカ（登
 録商標））、オフアツムマブ（アーゼラ（登録商標））、リツキシマブ（リツキサン（登
 録商標））、ペバシズマブ（アバスチン（登録商標））、トラスツズマブ（ハーセプチン（
 登録商標））、トラスツズマブエムタンシン（カドサイラ（登録商標））、イマチニブ（グ
 リベック（登録商標））、セツキシマブ（アービタックス（登録商標））、パニツムマブ
 （ベクティピックス（登録商標））、カツマキソマブ、イブリツモマブ、オフアツムマブ
 、トシツモマブ、ブレンツキシマブ、アレムツズマブ、ゲムツズマブ、エルロチニブ、ゲ
 フィチニブ、バンデタニブ、アフアチニブ、ラパチニブ、ネラチニブ、アキシチニブ、マ
 シチニブ、パゾパニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、トセラニブ、レスタウルチニブ、ア
 キシチニブ、セジラニブ、レンパチニブ、ニンテダニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、
 セマキサニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、チボザニブ、トセラニブ、バンデタニブ、エ
 ントレクチニブ、カボザンチニブ、イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、ポナチニブ、
 ラドチニブ、ボスチニブ、レスタウルチニブ、ルキシソリチニブ、パクリチニブ、コビメチ
 ニブ、セルメチニブ、トラメチニブ、ピニメチニブ、アレクチニブ、セリチニブ、クリゾ
 チニブ、アフリベルセプト、アジポチド、デニロイキンジフチトックス、エベロリムスお
 よびテムシロリムスなどのmTOR阻害剤、ソニデギブおよびビスモデギブなどのヘッジ
 ホッグ阻害剤、CDK阻害剤（パルボシクリブ）などのCDK阻害剤が挙げられる。

【0188】

一部の実施形態では、CAR発現免疫細胞を含む組成物は、サイトカイン放出症候群（
 CRS）または神経毒性を予防、または低減するための治療レジメンで投与することがで
 きる。サイトカイン放出症候群（CRS）または神経毒性を予防するための治療レジメン

には、レンジルマブ、トシリズマブ、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、アナキ
ンラ、iNOS阻害剤（例えば、L-NILまたは1400W）が含まれ得る。追加の実
施形態では、CAR含有免疫細胞を含む組成物は、抗炎症剤で投与することができる。抗
炎症剤または薬剤には、以下に限定されないが、ステロイドおよびグルココルチコイド（
ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン
、ヒドロコルチゾン、エチルプレドニゾン、プレドニゾン、プレドニゾン、トリアム
シノロン）、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファ
サラジン、レフルノミド、抗TNF薬、シクロホスファミドおよびミコフェノール酸を含
む非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）が挙げられる。例示的なNSAIDとしては、
イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、Cox-2阻害剤、および
シアル酸が挙げられる。例示的な鎮痛剤としては、アセトアミノフェン、オキシコドン、
プロボルキシフェン塩酸塩のトラマドールが挙げられる。例示的なグルココルチコイドと
しては、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾン、プレ
ドニゾン、またはプレドニゾンが挙げられる。例示的な生物学的応答調節剤としては、
細胞表面マーカー（例えば、CD4、CD5など）に対する分子、サイトカイン阻害剤、
例えばTNF拮抗薬（例えば、エタネルセプト（ENBREL（登録商標））、アダリム
マブ（HUMIRA（登録商標））、およびインフリキシマブ（REMICADE（登録
商標））、ケモカイン阻害剤、および接着分子阻害剤が挙げられる。生物学的応答調節
剤は、モノクローナル抗体ならびに分子の組換え型を含む。例示的なDMARDには、ア
ザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン
、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、金（経口（オーラノフィン
）および筋肉内）およびミノサイクリンが挙げられる。

【0189】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、サイトカインと併せて投与され
る。サイトカインの例としては、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチド
ホルモンが挙げられる。サイトカインには、ヒト成長ホルモンなどの成長ホルモンが含ま
れ、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チ
ロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモ
ン（FSH）などの糖タンパク質ホルモン、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、および黄体
形成ホルモン（LH）；肝増殖因子（HGF）；線維芽細胞増殖因子（FGF）；プロラ
クチン；胎盤ラクトゲン；ミューラー阻害物質、マウスゴナドトロピン関連ペプチド；イ
ンヒピン；アクチビン；血管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）
；NGF-ベータなどの神経成長因子（NGF）；血小板成長因子；TGF-アルファお
よびTGF-ベータなどの形質転換成長因子（TGF）；インスリン様成長因子-Iおよ
び-II；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン-アルファ、ベ
ータ、および-ガンマなどのインターフェロン；マクロファージ-CSF（M-CSF）
などのコロニー刺激因子（CSF）；顆粒球-マクロファージ-CSF（GM-CSF）
；および顆粒球-CSF（G-CSF）；インターロイキン（IL）、例えばIL-1、
IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、I
L-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-21；T
NF-アルファまたはTNF-ベータなどの腫瘍壊死因子；ならびにLIFおよびキッ
トリグランド（KL）を含む他のポリペプチド因子を含む。本明細書で使用される場合、サイ
トカインという用語は、天然源または組換え細胞培養由来のタンパク質、ならびに天然配
列サイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

【0190】

キットおよび製造物品

本開示は、本明細書に提供される方法を使用してCARを発現する免疫細胞のいずれか
一つを含むキット、およびその医薬組成物を提供する。キットの実施形態では、操作され
たCAR細胞は、Cryosstor（登録商標）CS10、Cryosstor（登録商標
）CS2、またはCryosstor（登録商標）CS5（BioLife Soluti

ons社)などの適切な培地で凍結される。

【0191】

一部の例示的な実施形態では、本開示のキットは、リンパ枯渇レジメント (lymphodepletion regimen) およびCAR-Tレジメンの構成要素として対象に投与するための、同種CAR発現T細胞およびCD52抗体を含む。本開示はまた、本明細書に記載される治療用組成物またはキットのうちのいずれか一つを含む製造物品を提供する。製造物品の例としては、バイアル (例えば、CARを発現する免疫細胞を含む密封バイアル) が挙げられる。

【実施例】

【0192】

実施例1：免疫細胞形質導入効率に対するプロセス因子の効果

A. 生存CAR 1 + 免疫細胞の割合に対するMOI、増殖培地pH、RetroNectin (登録商標) 濃度および培養容器の効果

【0193】

PBMC収集

ドナー血液を収集し、アフエーシスによりその成分部分に分離した。次いで、PBMCを、GEFicoll (登録商標) - plaque (密度1.077 g/mL) 工程勾配で濃縮し、5%のDMSOを含む緩衝液中で凍結保存した。

【0194】

活性化

0日目に、Ficoll (登録商標) で単離され凍結されたヒトPBMCを解凍し、X-VIVO (商標) 15培養培地 (Lonza Biosciences社) と10%ヒト血清 (Gemini Bio Products社、カリフォルニア州サクラメント) とを含む洗浄培地で一回洗浄した。次いで、細胞を、5%ヒト血清 (Gemini Bio Products社、カリフォルニア州サクラメント) を用いてX-VIVO (商標) 15培養培地 (Lonza Biosciences社) を含む培養培地 (本明細書では増殖培地とも呼ぶ) 中で培養し、標準的な加湿組織培養インキュベーター中で37°Cおよび5%のCO₂で一晩インキュベートした。1日目に、細胞を洗浄培地で洗浄し、計数し、1mL当たり1.5 × 10⁶の細胞密度で培養培地に再懸濁し、1:10の体積希釈でT Cell TransAct (商標) ポリマーナノマトリックス (Miltenyi Biotec社) と混合した。組換えヒトIL-2 (Miltenyi Biotec社) を、最終濃度100U/mLとなるまで加えた。次いで、T細胞を、標準的な加湿組織培養インキュベーター中で、37°Cおよび5%のCO₂で4日目までインキュベートした。

【0195】

形質導入と増殖

4日目に、細胞を洗浄し、1mL当たり1 × 10⁶の細胞密度で、組換えヒトIL-2 (Miltenyi Biotec社) を含有する培養培地に再懸濁した。細胞を、CAR1 (1560ヌクレオチド) をコードするレンチウイルスベクター (LVV #1831P、Lentigen Technology社、メリーランド州ゲイザースバーグ) を用いて、以下の表1に記載される試験条件下で形質導入し、標準的な加湿組織培養インキュベーター中で、37°Cおよび5%のCO₂で6日目までインキュベートした。6日目に、形質導入細胞を培養し、細胞集団を増殖させた。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1 :

試験群	%LVV(v/v)	MOI***	増殖培地pH	RetroNectin(登録商標)試薬濃度($\mu\text{g/mL}$)	培養容器
1	.25	7.25	7.4	45.0	バッグ*
2	10	290.0	7	45.0	バッグ
3	5	145.0	7	22.5	バッグ
4	.25	7.25	6.6	22.5	バッグ
5	5	145.0	7	22.5	バッグ
6	5	145.0	7.4	0	バッグ
7	10	290.0	6.6	0	バッグ
8	.25	7.25	6.6	45.0	ウェル**
9	10	290.0	7.4	45.0	ウェル
10	10	290.0	6.6	45.0	ウェル
11	5	145.0	7	22.5	ウェル
12	10	290.0	7.4	0	ウェル
13	.25	7.25	7.4	0	ウェル
14	.25	7.25	6.6	0	ウェル

10

20

*培養バッグはMACS細胞分化バッグ-100(MiltenyiBiotec社)である

**プレートは6ウェル培養プレート(Corning, Inc.)である

30

***第二列%LVV(v/v)から計算

【0196】

形質導入効率評価

8日目および11日目に、形質導入効率および細胞生存率を、フローサイトメトリーによって確認した。形質導入前、形質導入中、または形質導入後に、ポリブレン、硫酸プロタミン、DEAE-デキストランを添加しなかった。各試験群について、細胞試料を洗浄し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水(「DPBS」)中に再懸濁した。各々が異なる抗体パネルを含む二つの抗体/染色カクテルを、市販の抗体/染色の組み合わせを使用して調製した。

【0197】

40

各試験群試料から約 1×10^6 の細胞を、抗体/染色カクテルのうちのひとつのアリコートと共にFACSチューブに添加した。次いで、FACSチューブを、25℃で暗所で 25 ± 5 分間インキュベートした。試料を二回洗浄し、1%パラホルムアルデヒド(「PFA」)中に再懸濁し、次いでLSRFortessaサイトメーター(BD Biosciences社、ニュージャージー州フランクリンレイクス)により処理し、得られたデータをFlowJoソフトウェアバージョン10(FlowJo社、オレゴン州アシュランド)を用いて分析した。

【0198】

以下の表2は、試験の8日目および11日目の各試験群について、生存CAR+T細胞の割合を示す。

50

【表 2】

表 2:

試験群	8日目	11日目
1	22.6	42.9
2	46.7	73.4
3	48.0	76.4
4	10.8	32.7
5	42.6	75.8
6	56.1	66.0
7	13.4	25.7
8	12.7	21.6
9	52.7	69.6
10	26.2	43.8
11	52.0	65.6
12	53.6	65.3
13	14.8	22.7
14	10.0	18.3

10

【0199】

20

製造プロセス因子、%レンチウイルスベクター (v/v)、増殖培地 pH、RetroNectin (登録商標) 試薬濃度、および培養容器の形質導入効率への影響を図 2 に示す。主効果および相互作用の有意性は、JMP (登録商標) 14 ソフトウェア (SAS Institute, Inc., ノースカロライナ州ケリー) を使用して、確率値 (p 値) 閾値が < 0.05 に設定された分散分析 (ANOVA) によって決定された。細胞を 7.0 以上の pH で形質導入すると、より低い pH で細胞を形質導入 (これは結果として、より低いパーセンテージの生存 CAR+ 細胞をもたらした (図 2 B を参照)) するよりも、より大きなパーセンテージの生存 CAR+ 細胞をもたらされた (図 2 A を参照)。主効果および 2 方向相互作用の P 値を、図 2 C に示す。

【0200】

30

図 2 が示すように、驚くべきことに、RetroNectin (登録商標) 試薬 (タカラバイオ、米国) 濃度は、CAR 形質導入効率に有意な効果を持たない。むしろ、pH が、MOI で試験した全ての因子の形質導入効率に最も有意な効果を有し、形質導入容器もまた、形質導入効率に寄与する。

B. 生存 CAR-2 + 免疫細胞のパーセンテージに対する増殖培地 pH および RetroNectin (登録商標) 濃度の影響

PBMC を収集し、活性化し、CAR-2 (約 1500 ヌクレオチド) を、一部要因実験 (partial factorial experiment) (JMPO 14 ソフトウェア、D-最適設計を使用) において上記の実施例 1 A に記載される方法によって形質導入して、生存 CAR-2 + T 細胞の割合に対する pH および RetroNectin (登録商標) 濃度の影響を評価した。

40

【0201】

形質導入効率評価

15 日目に、上述の実施例 1 A に記載されるように、フローサイトメトリーによって形質導入効率および細胞生存率を確認した。主効果および相互作用の有意性は、JMP (登録商標) 14 ソフトウェア (SAS Institute, Inc., ノースカロライナ州ケリー) を使用して、確率値 (p 値) 閾値が < 0.05 に設定された分散分析 (ANOVA) によって決定され、モデル化された。生存 CAR+ T 細胞の割合の結果を、JMP (登録商標) 14 ANOVA ソフトウェアを使用して 48 の MOI でシミュレーションし、表 3 に示される RetroNectin (登録商標) 濃度および培地 pH レベルで

50

、生存CAR+T細胞の割合に対するRetroNectin(登録商標)および培地pHの主効果を評価した。結果は、表3の右端の列に示されている。

【表3】

表3:

増殖培地pH	RetroNectin(登録商標)試薬濃度($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	生存CAR+T細胞の割合
7.3	0	70.8
7.3	15	79.8
6.7	0	50.1
6.7	15	55.5

10

【0202】

表3は、RetroNectin(登録商標)試薬を含む場合と含まない場合の両方において、T細胞を7.3のpHで形質導入すると、RetroNectin(登録商標)試薬を含む場合と含まない場合の両方において、より低いpH6.7で細胞を形質導入するよりも、生存CAR+細胞のパーセンテージが大きかったことを示す。驚くべきことに、RetroNectin(登録商標)試薬濃度は、CAR形質導入効率に最も大きな効果を持たない。形質導入中の培地pHが、形質導入効率に最も大きな影響を与える。

20

【0203】

実施例2:ベクター組込み形質導入の経時変化

0日目に、PBMC(上記実施例1に記載されるように収集)を、2Lガス透過性バッグ(Xuri(商標)Cell bag(商標)、GELifesciences, Inc.)中で解凍した。X-VIVO(商標)15培養培地(Lonza Biosciences社)中の 1.5×10^6 細胞/mLの濃度で、5%ヒト血清(Gemini Bio Products社、カリフォルニア州サクラメント)、IL-2、およびグルタミンをさらに含む細胞は、1:10の体積希釈でTransAct(商標)ポリマーナノマトリックス(Miltenyi Biotec社)を添加することによって活性化された。細胞を、37°Cでインウェーブアクションバイオリクター中で培養した。

30

【0204】

2日目に、CAR-2(1500ヌクレオチド)をコードする1%(v/v)レンチウイルスベクター(LVV #1831P、Lentigen Technology社、メリーランド州ゲイザースバーグ)を、 7.2 ± 0.1 のpHで細胞培養物に添加した。得られた形質導入反応混合物を、37°Cで8時間培養した。形質導入中にRetroNectin(登録商標)は使用されなかった。また、形質導入前、形質導入中、または形質導入後に、ポリブレン、硫酸プロタミン、DEAE-デキストランを添加しなかった。

【0205】

細胞へのレンチウイルスベクターの導入から1、2、4、6、および8時間後に、培養培地から細胞試料を採取した。各細胞試料を、 1×10^6 細胞/mLの細胞密度で培養培地中において、遠心分離し、洗浄し、再懸濁し、G-Rex(登録商標)細胞培養系(Wilson Wolf社、ミネソタ州セントポール)中で、製造業者の指示に従って、40mLの体積で14日間培養した。

40

【0206】

CAR+細胞の割合を、上記実施例1に記載されるように、フローサイトメトリーによって7日目および14日目に決定した。

【0207】

結果を図3に示す。図に示すように、CAR+細胞の割合は、7日目と比較すると、14日目の各形質導入時点でより高い。さらに、14日目に、CAR+細胞の割合の増加は

50

、4時間の形質導入後に減速し始め、6～8時間の形質導入で横ばいになり始める。

【0208】

実施例3：製造スケール免疫細胞形質導入

CAR-1を発現するT細胞について、14の製造スケールの稼働を実施した。稼働7～14を、以下に記載されるように実施した。形質導入工程を7.2未満のpHで実施したという一つを例外として、稼働1～6を以下に示すように実施した。

【0209】

PBMC収集、活性化および形質導入

PBMC（上記実施例1に記載されるように収集）を、ヒト血清を含む培地中で、ガス透過性バッグ中で解凍し、37°Cおよび5%のCO₂で一晩インキュベートした。

10

【0210】

次いで、PBMCを洗浄し、5%ヒト血清、IL-2、グルタミン、CD3およびCD28刺激試薬を含む培地中に再懸濁し、37°Cおよび5%のCO₂でインキュベートした。

【0211】

活性化細胞を培地で洗浄して、活性化試薬を除去し、培養培地に再懸濁した。培養培地は、5%ヒト血清、IL-2、およびグルタミンから成った。細胞を培養培地中に導入する前に、CO₂を培養培地から除去し、pH7.2以上を達成した。細胞を、1mL当たり 1×10^6 細胞の細胞密度で、ガス透過性バッグ内の製造スケールボリューム（製造スケール形質導入量）の培養培地に再懸濁した。CAR-1をコードするレンチウイルスベクター（LVV #1831P、Lentigen Technology社、メリーランド州ゲイザースバーグ）を、10%LVV（V/V）で細胞懸濁液に添加した。得られた形質導入反応混合物を、37°Cおよび5%のCO₂で48時間培養した。形質導入中にRetroNectin（登録商標）は使用されなかった。また、形質導入に、ポリブレン、硫酸プロタミン、DEAE-デキストランを添加しなかった。

20

【0212】

増殖

細胞をさらにエレクトロポレーションして標的遺伝子を破壊し、その後、1リットルの総体積の培養培地中で灌流ウェーブバイオリクター内で増殖させた。T細胞の濃縮を18日目に実施し、破壊された遺伝子発現を有するT細胞について選択した。

30

【0213】

CAR発現および細胞生存率

19日目に、上記の実施例1Aに記載されるように、フローサイトメトリーによってCAR発現および細胞生存率を評価し、以下の表4に記載される。

40

50

【表 4】

表 4

培地pH<7.1		培地pH>7.1	
稼働#	生存CAR+T細胞の割合	稼働#	生存CAR+T細胞の割合
1	55.1	7	76.6
2	34.3	8	76.6
3	36.6	9	70.7
4	62.3	10	65.9
5	26	11	60.1
6	21.8	12	48.5
		13	42.8
		14	56.5
平均	39.4	平均	62.2
STD*	16.1	STD	12.5

10

* 標準偏差

【 0 2 1 4 】

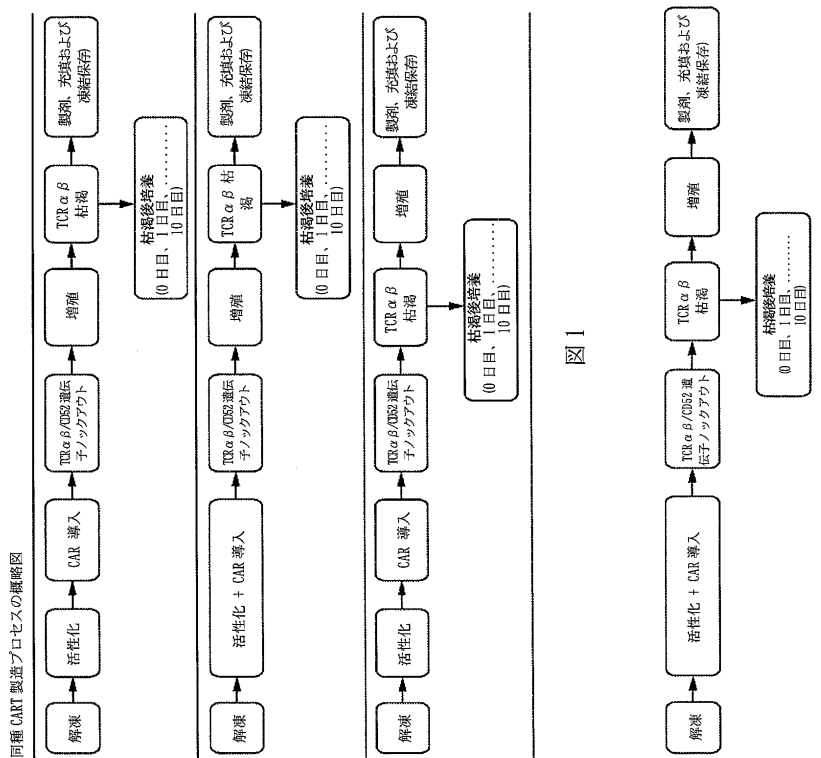
表 4 は、7.1 超の pH で形質導入された細胞が、7.1 未満の pH で形質導入された細胞と比較して、より高いパーセンテージの生存 CAR 発現細胞を有することを示す。さらに表は、7.1 超の pH で細胞を形質導入すると、7.1 未満の pH で形質導入された細胞と比較して、ランツールンで生存 CAR 発現細胞のより一貫したパーセンテージがもたらされたことを示す。

20

【 図 面 】

【 図 1 - 1 】

【 図 1 - 2 】



30

40

50

【 図 2 】

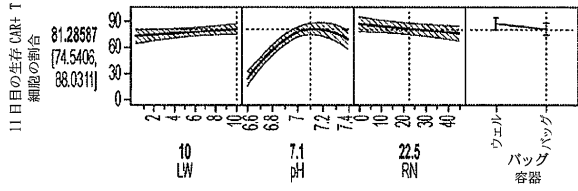


図 2A

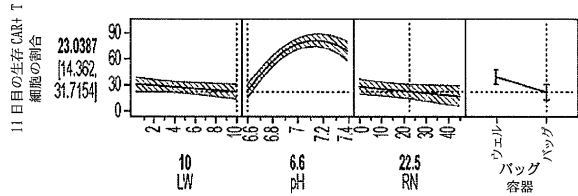


図 2B

源	対数値									P 値	
pH	3.764									0.00017	
pH(6.6,7.4)	3.256									0.00056	A
LVV(0.25,10)	2.758									0.00175	
LVV pH	2.311									0.00439	
LVV*容器	2.284									0.00520	
pH*容器	1.673									0.02123	
容器	1.458									0.03434	A
RN*容器	1.364									0.04322	
RN(0.45)	0.621									0.23940	A

図 2C

【 図 3 】

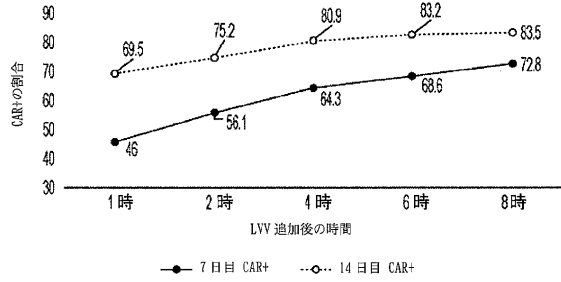


図 3

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/014247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C12N15/867 C12N5/10	C12N5/00 A61K35/17 A61P35/00
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 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DENNING WARREN ET AL: "Optimization of the Transductional Efficiency of Lentiviral Vectors: Effect of Sera and Polycations", MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 53, no. 3, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 308-314, XP055919036, New York ISSN: 1073-6085, DOI: 10.1007/s12033-012-9528-5 Retrieved from the Internet: URL:https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12033-012-9528-5.pdf> page 311, left-hand column, line 16 - right-hand column, line 14; figure 2D ----- -/--	1-18, 21-37, 40-56, 59-75
<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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
10 May 2022	12/07/2022	
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 Brenz Verca, Stefano	

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/014247

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JENSEN T.W. ET AL: "Small Increases in pH Enhance Retroviral Vector Transduction Efficiency of NIH-3T3 Cells", BIOTECHNOLOGY PROGRESS, vol. 19, no. 1, 7 February 2003 (2003-02-07), pages 216-223, XP055919035, ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1021/bp025604g see the whole document, in particular Figure 1 -----	1-18, 21-37, 40-56, 59-75
X	WO 2018/161064 A1 (F1 ONCOLOGY INC [US]) 7 September 2018 (2018-09-07) paragraph [0959]; example 12 -----	1-14, 16-52, 54-77
A	WO 2017/173410 A1 (AMGEN INC [US]) 5 October 2017 (2017-10-05) the whole document -----	1-77

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/014247

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

10

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

30

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-77

40

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-77

- 1. A method for transducing a population of cells with a retroviral vector.
- 18. A method for transducing a first and a second cell population wherein the first and second cell population are transduced by the same method of any one of the preceding claims.
- 21. A method for transducing a population of cytotoxic T cells with a retroviral vector.
- 37. A method for transducing a first and a second cytotoxic T cell population, wherein the first and second cytotoxic T cell population are transduced by the method of any one of the preceding claims 21 to 36.
- 40. A method for transducing a population of peripheral blood mononuclear cells with a retroviral vector.
- 56. A method for transducing a first and a second peripheral blood mononuclear cell population, wherein the first and second peripheral blood mononuclear cell populations are transduced by the same method of any one of the preceding claims 40 to 55.
- 59. A method for transducing a population of T cells derived from induced pluripotent stem cells with a retroviral vector
- 75. A method for transducing a first and a second derived T cell population, wherein the first and second derived T cell population are transduced by the same method of any one of the preceding claims 59 to 74.

2. claims: 78-82

- 78. A genetically modified cell produced by a method according to invention 1.
- 79. A population of genetically modified cells produced by a method according to invention 1.
- 80. A therapeutic composition comprising said cell or said cell population.
- 81. A method of treating a disease in a subject comprising administering to the subject in need thereof a therapeutically effective amount of said cell produced by the method of invention 1.
- 82. A method of treating a disease in a subject comprising administering to the subject in need thereof a therapeutically effective amount of said therapeutic composition.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/014247

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018161064 A1	07-09-2018	AU 2018226884 A1	10-10-2019
		BR 112019018288 A2	31-03-2020
		CA 3054064 A1	07-09-2018
		CN 110892070 A	17-03-2020
		CU 20190075 A7	02-04-2020
		EP 3589733 A1	08-01-2020
		KR 20200003370 A	09-01-2020
		SG 10202109571P A	28-10-2021
		SG 11201907814S A	27-09-2019
		TW 201839127 A	01-11-2018
		WO 2018161064 A1	07-09-2018
WO 2017173410 A1	05-10-2017	AR 109626 A1	09-01-2019
		AU 2017240801 A1	25-10-2018
		AU 2022200108 A1	03-02-2022
		BR 112018070187 A2	29-01-2019
		CA 3019655 A1	05-10-2017
		CL 2018002792 A1	26-04-2019
		CN 109641956 A	16-04-2019
		CO 2018011804 A2	08-02-2019
		CR 20180518 A	25-04-2019
		EA 201892193 A1	28-06-2019
		EP 3436479 A1	06-02-2019
		JP 2019516352 A	20-06-2019
		JP 2022091793 A	21-06-2022
		KR 20190021203 A	05-03-2019
		KR 20220054453 A	02-05-2022
		MA 44507 A	06-02-2019
		PE 20190201 A1	05-02-2019
		PH 12018502118 A1	08-07-2019
		SG 10201911963V A	27-02-2020
		SG 11201808622S A	30-10-2018
		TN 2018000337 A1	16-01-2020
		TW 201803897 A	01-02-2018
		US 2019183931 A1	20-06-2019
		WO 2017173410 A1	05-10-2017

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	7/01	(2006.01)	C 1 2 N	7/01	
C 0 7 K	14/725	(2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 0 7 K	14/78	(2006.01)	C 0 7 K	14/78	

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,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,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100123766

弁理士 松田 七重

(72)発明者 ルーマン トッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
ベニュー 2 1 0 アロジーン セラピューティクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 サラゴサ ホセルヒオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
ベニュー 2 1 0 アロジーン セラピューティクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ジャーマンズデルファー アブラハム

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 4 8 6 ボカラトン サウスウエスト トゥエンティセカンド ス
トリート 8 3 0

(72)発明者 ラオ スマ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
ベニュー 2 1 0 アロジーン セラピューティクス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ニ ヤジン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 7 サンディエゴ ローワー スカボロー レーン 8 4 7 9

(72)発明者 チャン チュペイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 0 サンフランシスコ ドロレス ストリート 1 6 5 2
アパートメント 8

(72)発明者 ファン トム タオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 5 5 フリーモント マシュー テラス 5 3 2 2

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AA97X AA97Y AB01 AC04 BA02 BB19 BB38 BC02

CA44

4C087 AA01 AA03 BB65 NA20

4H045 AA50 DA76 EA20 FA74