(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-502235
(P2024-502235A)
(43)公表日　令和6年1月18日(2024.1.18)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/867 (2006.01)		C12N	15/867	Z	4B065
C12N 15/24 (2006.01)		C12N	15/24	ZNA	4C085
C12N 15/12 (2006.01)		C12N	15/12		4C087
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15		
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19		

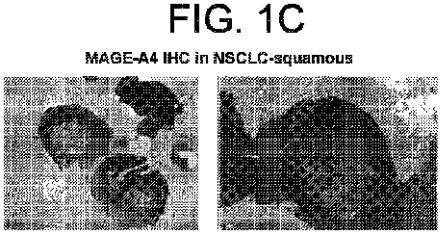
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全77頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-537297(P2023-537297)
(86)(22)出願日　令和3年12月21日(2021.12.21)
(85)翻訳文提出日　令和5年8月17日(2023.8.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/064504
(87)国際公開番号　WO2022/140321
(87)国際公開日　令和4年6月30日(2022.6.30)
(31)優先権主張番号　63/129,447
(32)優先日　令和2年12月22日(2020.12.22)
(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,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,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９１３２０，サウザンド オークス，ワン アムジエン センター ドライブ
(74)代理人　110001173
弁理士法人川口國際特許事務所
(72)発明者　キム，ソンウン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０－１７９９、サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ・エム／エス・２８－５－エイ、ロー・デパートメント－パテント・オペレーションズ、アムジェン・インコーポレーテッド気付
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＭＡＧＥ－Ｂ２特異的Ｔ細胞受容体

(57)【要約】
Ｔ細胞表面に組換えで発現された場合に、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１により提示された場合のＭＡＧＥ－Ｂ２由来ペプチドＧＶＹＤＧＥＥＨＳＶ（配列番号１）を、組換えＴ細胞を活性化するのに十分に認識することができるＴ細胞受容体（ＴＣＲ）が本明細書において提供される。本明細書において提供される特定のＴＣＲも、組換えＴ細胞を活性化するために十分にＭＡＧＥ－Ａ４由来ペプチドＧＶＹＤＧＲＥＨＴＶ（配列番号２）を認識することができる。重要なことには、正常細胞又は組織によって提示され得る類似のペプチドとの交差反応の欠如、及びアロ反応性について、本明細書に提供される例示的なＴＣＲが徹底的にスクリーニングされた。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α鎖及びＴＣＲβ鎖をコードする核酸配列を含む発現ベクターであって、前記ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖が、
ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；並びに
ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
からなる群から選択される、発現ベクター。
【請求項２】
インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）をコードする核酸、又はその機能性変異体をさらに含む、請求項１に記載の発現ベクター。
【請求項３】
ウイルスベクターである、請求項１又は２に記載の発現ベクター。
【請求項４】
レトロウイルスベクターである、請求項３に記載の発現ベクター。
【請求項５】
レンチウイルスベクターである、請求項４に記載の発現ベクター。
【請求項６】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項７】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項６に記載の発現ベクター。
【請求項８】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号５７に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号６８に記載のアミノ酸配列を含む、請求項７に記載の発現ベクター。
【請求項９】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。

【請求項１０】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含む、請求項９に記載の発現ベクター。
【請求項１１】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号５８に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号６９に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１０に記載の発現ベクター。
【請求項１２】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項１３】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載の発現ベクター。
【請求項１４】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号５９に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７０に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の発現ベクター。
【請求項１５】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項１６】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の発現ベクター。
【請求項１７】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６０に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１６に記載の発現ベクター。
【請求項１８】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項１９】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１８に記載の発現ベクター。
【請求項２０】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６１に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７２に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１９に記載の発現ベクター。
【請求項２１】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項２２】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５１に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の発現ベクター。
【請求項２３】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６２に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７３に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の発現ベクター。
【請求項２４】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。

【請求項２５】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２４に記載の発現ベクター。
【請求項２６】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６３に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７４に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２５に記載の発現ベクター。
【請求項２７】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項２８】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２７に記載の発現ベクター。
【請求項２９】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６４に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７５に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２８に記載の発現ベクター。
【請求項３０】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３１】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３０に記載の発現ベクター。
【請求項３２】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６５に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３１に記載の発現ベクター。
【請求項３３】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３４】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３３に記載の発現ベクター。
【請求項３５】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６６に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７７に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３４に記載の発現ベクター。
【請求項３６】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３７】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３６に記載の発現ベクター。
【請求項３８】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７８に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３７に記載の発現ベクター。
【請求項３９】
組換えＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現する細胞であって、前記ＴＣＲが：
ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；又は
ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
を含む、細胞。

【請求項４０】

前記ＴＣＲが：
ａ．配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；又は
ｋ．配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
を含む、請求項３９に記載の細胞。

【請求項４１】

組換えＩＬ－１２又はその機能性変異体をさらに発現する、請求項３９又は４０に記載の細胞。

【請求項４２】

請求項１から３８のいずれかに記載の発現ベクターを含む、細胞。
【請求項４３】
Ｔ細胞である、請求項３９～４２のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項４４】
前記ＴＣＲが、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１の状況において、配列番号１又は配列番号２のペプチドに結合し、前記結合によって、前記細胞によるＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－１２、又はグランザイムＢ産生の活性化が生じる、請求項４３に記載の細胞。
【請求項４５】
請求項３９～４４のいずれか一項に記載の細胞を治療有効量で含む、医薬組成物。
【請求項４６】
ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖をコードする核酸配列を含む発現ベクターを、細胞に導入することを含む、請求項３９～４４のいずれか一項に記載の細胞又は請求項４５に記載の医薬組成物を製造する方法であって、
前記ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖が：
ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；又は
ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
からなる群から選択される、方法。
【請求項４７】
前記ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖が：
ａ．配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５１に記載の

アミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；並びに
ｋ．配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
からなる群から選択される、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記発現ベクターが、ＩＬ－１２をコードする核酸配列又はその機能性変異体をさらに含む、請求項４６又は４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記細胞がＴ細胞である、請求項４６～４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０】
前記細胞が初代Ｔ細胞である、請求項４９に記載の方法。
【請求項５１】
前記初代Ｔ細胞が、癌患者から単離される、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４発現性の癌を治療する方法であって、請求項３９～４４のいずれか一項に記載の細胞、請求項４５に記載の医薬組成物、又は請求項４６～５１のいずれか一項に記載の方法によって製造された細胞を、治療有効量で癌患者に投与することを含む、方法。
【請求項５３】
前記患者が、ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４を発現する癌の存在を決定するために投与前に試験される、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４をコードする核酸が検出される、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
ＭＡＧＥ－Ｂ２若しくはＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質、又はＭＡＧＥ－Ｂ２由来若しくはＭＡＧＥ－Ａ４由来ペプチドが検出される、請求項５３に記載の方法。
【請求項５６】
前記患者が、前記ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１対立遺伝子を保有することが同定される、請求項５２～５５のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、その全体が、本明細書に完全に記載されているが如くすべての目的のために、参照により本明細書に組み込まれる、２０２０年１２月２２日出願の米国仮特許出願第６３／１２９，４４７号の利益を主張する。
【０００２】
本発明は、Ｔ細胞の表面に組換えで発現された場合に、組換えＴ細胞を活性化するのに十分にペプチドを認識することができるＴ細胞受容体に関する。
【０００３】
配列表
本出願は、開示内容の別個の部分として、コンピューターで読み取り可能な形式（２０

２１年１１月２日に作成され、１１３ＫＢのサイズである、ファイル名：Ａ－２６６８－ＷＯ－ＰＣＴ＿ＳＴ２５．ｔｘｔ）であり、その全体が参照により組み込まれる、配列表を含有する。

【背景技術】

【０００４】

養子Ｔ細胞療法は、癌を治療する途方もなく大きな機会を提供する。キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）－Ｔ細胞療法は、血液悪性腫瘍に対する承認された養子Ｔ細胞療法であるが、ゲノムの約２５％を占める細胞表面抗原のみに対してそれが認識するために、標的の範囲が限られる。ＣＡＲ－Ｔ細胞と異なり、腫瘍抗原に対して特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現するように操作されたＴＣＲ－Ｔ細胞は、ゲノムの約７５％を占める細胞内タンパク質から誘導されるペプチド－ＭＨＣ複合体（ｐＭＨＣ）を認識し得ることから、複数の癌適応症に対する、より広い範囲の標的を利用し得る。細胞内タンパク質は、ｐＭＨＣ複合体として主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）によって処理され、提示される。

【０００５】

癌－精巣抗原（ＣＴＡ）は、生殖細胞におけるその制限された発現及び種々の癌における異常な再活性化、及びその免疫原性のために、ＴＣＲ－Ｔ細胞療法などの癌免疫療法の魅力的な標的である。精巣（免疫特権部位）などの生殖細胞は通常、ＨＬＡクラスＩ／ＩＩ分子を発現せず、免疫システムからの攻撃を回避することが可能となる。ＭＡＧＥ－Ｂ２及びＭＡＧＥ－Ａ４は、黒色腫抗原（ＭＡＧＥ）遺伝子ファミリーのメンバーであり、その大部分は、ＭＡＧＥ－Ｂ２及びＭＡＧＥ－Ａ４などの細胞内癌－精巣抗原として分類される。最近の研究から、Ｅ３　ＲＩＮＧユビキチンリガーゼとのＭＡＧＥアセンブルが、ユビキチン結合の制御因子として働き、細胞増殖及び発癌活性において役割を果たし、細胞ストレス応答を調節することが示唆されている。しかしながら、ＭＡＧＥ－Ｂ２及びＭＡＧＥ－Ａ４などの、大部分のＭＡＧＥ遺伝子の機能は完全には理解されていない。

【０００６】

ＴＣＲ－Ｔ細胞が、腫瘍特異的ペプチド－ＭＨＣ標的に対して非常に強力であり、感受性のある様式であることが分かっていると同時に、ＴＣＲは複数のペプチドを認識することができる。ＴＣＲ形成に必要なＤＮＡ再構成は、自己抗原を認識する一定数のＴ細胞を産生する。初期のＴ細胞発生時に、自己反応性Ｔ細胞は、胸腺髄質上皮細胞における広範囲の自己抗原の無差別の発現を介して、胸腺の髄質においてネガティブに選択され、排除される。胸腺におけるこのネガティブセレクションは、中枢性免疫寛容の主要なメカニズムとして機能し、Ｔ細胞レパートリーを形づくり、自己免疫を回避する。特定のｐＭＨＣに対するその親和性を高めるため、又は複数のｐＭＨＣに交差反応性を導入するために操作されたＴＣＲは、胸腺で起こるネガティブセレクションの利点を持たない。親和性増強ＭＡＧＥ－Ａ３　ＴＣＲ－Ｔ細胞は、心筋において発現されるタイチンに対する交差反応性のために、致死の毒性を引き起こすことは注目に値する（Ｃａｍｅｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．２０１３　５（１９７））。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｃａｍｅｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｔｒａｎｓｌ　Ｍｅｄ．２０１３　５（１９７）

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

腫瘍特異的抗原を認識するＴＣＲ配列の同定は、特に、患者の血液中での腫瘍特異的Ｔ細胞の希少さ、生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）でごく少数の腫瘍特異的Ｔ細胞クローンを拡大する難しさ、及び腫瘍浸潤性リンパ球（ＴＩＬ）における腫瘍特異的Ｔ細胞の潜在的な消耗又は抑制のために、当技術分野において非常に挑戦的であることが分かっている。これらの難題にも関わらず、健康なドナーの血液及び生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）刺激方法を用

いて同定されたＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド－ＭＨＣ（ＧＶＹＤＧＥＥＨＳＶ／ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１）及びＭＡＧＥ－Ａ４ペプチド－ＭＨＣ（ＧＶＹＤＧＲＥＨＴＶ／ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１）に対して特異的なＴＣＲ配列が本明細書において提供される。本明細書で実施例に実証されるように、腫瘍特異的ＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣを認識する、及び一部の実施形態においてはＭＡＧＥ－Ａ４、ｐＭＨＣを認識する例示的なＴＣＲ－Ｔ細胞は、細胞障害性を発揮し、且つサイトカインを産生することによって、ＭＡＧＥ－Ｂ２＋／ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４＋／ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋腫瘍の治療に対する非常に強力な治療物質（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）であり得る。これらのＴＣＲ－Ｔ細胞療法は、多種多様な癌適応症の重要な治療選択肢であるだろう。

【０００９】

ＴＣＲ－Ｔ細胞は、ｐＭＨＣ標的に対する生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）で最も強力な、及び感受性の様式である。本明細書で提供されるＴＣＲ－Ｔ細胞は、非常に低い標的発現性細胞に対してさえ、高い効力を示す。ＴＣＲ－Ｔ細胞のこの高い効力は、形質導入ＴＣＲと内因性ＣＤ３サブユニットの複合体から生じる。さらに、生体内（ｉｎ　ｖｉｖｏ）有効性を高めるために、例示的ＴＣＲ－Ｔ細胞は、ＴＣＲ－Ｔ構築物に組み込まれる、活性化－依存性ＩＬ１２ペイロードを含み、ＩＬ１２発現は、最小ＩＬ－２プロモーターに連結された６つのＮＦＡＴ（活性化Ｔ細胞の核因子）応答エレメントを含有する複合プロモーター下でのＴＣＲ活性化によって制御される。したがって、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞が腫瘍抗原に遭遇した場合に、ＩＬ１２が産生される。実施例に提供されるマウスの研究で示されるように、ＩＬ１２ペイロードは、生体内での養子Ｔ細胞療法の有効性を高め、したがって、潜在的な臨床用量を低減し得る（１０～１００倍）。

【００１０】

第１の態様において、本発明は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α鎖及びＴＣＲβ鎖をコードする核酸配列を含む発現ベクターであり、ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖は、

ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；並びに

ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖

からなる群から選択される。

【００１１】

第１の態様のいずれかの発現ベクターはさらに、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）をコードする核酸又はその機能性変異体を含み得て、レトロウイルス又はレンチウイル

スベクターなどのウイルスベクターであり得る。

【００１２】

第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号１３に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号２４に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号５７に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号６８に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。

【００１３】

第１の態様の特定の実施形態において、配列番号１４に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配を含むＴＣＲα鎖及び配列番号２５に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号５８に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号６９に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。

【００１４】

第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号１５に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号２６に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号５９に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７０に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。

【００１５】

第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号１６に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号２７に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号６０に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。

【００１６】

第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号１７に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号２８に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号６１に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７２に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。

【００１７】

第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号１８に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号２９に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号５１に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号６２に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７３に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。

【００１８】

第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号１９に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号３０に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号６３に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７４に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。

【００１９】
第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号２０に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号３１に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号６４に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７５に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。
【００２０】
第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号２１に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号３２に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号６５に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７６に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。
【００２１】
第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号２２に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号３３に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号６６に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７７に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。
【００２２】
第１の態様の特定の実施形態において、発現ベクターは、配列番号２３に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲα鎖及び配列番号３４に記載のＣＤＲ３領域アミノ酸配列を有するＴＣＲβ鎖をコードする。好ましい実施形態において、成熟ＴＣＲα鎖は、配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含み、成熟ＴＣＲβ鎖は配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含む。発現ベクターは、配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲα鎖及び配列番号７８に記載のアミノ酸配列を含む完全長ＴＣＲβ鎖をコードし得る。
【００２３】
第２の態様は、組換えＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現する細胞であり、前記ＴＣＲは：
ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；又は

ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖ＣＤＲ３領域、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖ＣＤＲ３領域；
を含む。
【００２４】
第２の態様の好ましい実施形態において、細胞は、
ａ．配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；又は
ｋ．配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
を含むＴＣＲを組換え発現する。
【００２５】
第２の態様の細胞は、組換えＩＬ－１２又はその機能性変異体をさらに発現し得る。
【００２６】
第２の態様の特定の実施形態において、細胞は、第１の態様の１種又は複数種の発現ベクターを含む。
【００２７】
細胞はＴ細胞であり得て、ＴＣＲは、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１の状況において配列番号１又は配列番号２のペプチドに結合し、その結合は、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－１２の活性化、又は細胞によるグランザイムＢの産生を導く。
【００２８】
本発明の第３の態様において、医薬組成物は、治療有効量の第２の態様の細胞又は第１の態様の発現ベクターを含む。
【００２９】
第４の態様において、本発明は、ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖をコードする核酸配列を含む発現ベクターを細胞に導入することを含む、第２の態様の細胞又は第３の態様の医薬組成物を製造する方法であって、ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖が：
ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；

ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；又は
ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３領域を含むＴＣＲβ鎖；
からなる群から選択される、方法を提供する。

【００３０】

第４の態様の好ましい実施形態において、ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖は、
ａ．配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；並びに
ｋ．配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
からなる群から選択される。

【００３１】

第４の態様の特定の実施形態において、ＩＬ－１２又はその機能性変異体をコードする核酸配列も細胞に導入され、α鎖及び／又はβ鎖をコードする発現ベクター上にあり得て、或いは別々のベクター上でコードされ得る。

【００３２】

第４の態様の方法によって製造される細胞は、癌患者から単離された初代Ｔ細胞であり得る。

【００３３】

第５の態様において、本発明は、ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４発現性癌を治療する方法を提供し、前記方法は、第２の態様の細胞、第３の態様の医薬組成物、又は第４の態様の方法によって製造された細胞を癌患者に治療有効量で投与することを含む。第５の態様の特定の実施形態において、ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４を発現する癌の存在を決定するために、投与前に患者を試験する。試験では、ＭＡＧＥ－Ｂ２－又はＭＡＧＥ－Ａ４コード核酸、ＭＡＧＥ－Ｂ２若しくはＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質、又はＭＡＧＥ－Ｂ２由来若しくはＭＡＧＥ－Ａ４由来ペプチドが検出され得る。好ましい実施形態において、患者は、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１対立遺伝子を保有すると同定される。

【図面の簡単な説明】

【００３４】

【図１Ａ－１】（Ａ）様々な癌におけるＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（ＴＣＧＡ及び内部ＲＮＡ－ｓｅｑデータ）。（Ｂ）ヒトの正常組織におけるＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（Ａｍｇｅｎ　Ｂｏｄｙ　ｍａｐ　ＲＮＡ－ｓｅｑデータ）。（Ｃ）ＯＴＩ１Ｆ９モノクローナルＡｂによるＭＡＧＥ－Ａ４免疫組織染色（ＩＨＣ）から、扁平上皮非小細胞肺癌の腫瘍内に、ＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質が腫瘍細胞の大部分に発現されることが示される。扁平上皮非小細胞肺癌の腫瘍の代表的なＩＨＣ株は、１００％ＭＡＧＥ－Ａ４ポジティブ腫瘍細胞及び強度３＋の染色を示す。

【図１Ａ－２】（Ａ）様々な癌におけるＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（ＴＣＧＡ及び内部ＲＮＡ－ｓｅｑデータ）。（Ｂ）ヒトの正常組織におけるＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（Ａｍｇｅｎ　Ｂｏｄｙ　ｍａｐ　ＲＮＡ－ｓｅｑデータ）。（Ｃ）ＯＴＩ１Ｆ９モノクローナルＡｂによるＭＡＧＥ－Ａ４免疫組織染色（ＩＨＣ）から、扁平上皮非小細胞肺癌の腫瘍内に、ＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質が腫瘍細胞の大部分に発現されることが示される。扁平上皮非小細胞肺癌の腫瘍の代表的なＩＨＣ株は、１００％ＭＡＧＥ－Ａ４ポジティブ腫瘍細胞及び強度３＋の染色を示す。

【図１Ｂ】（Ａ）様々な癌におけるＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（ＴＣＧＡ及び内部ＲＮＡ－ｓｅｑデータ）。（Ｂ）ヒトの正常組織におけるＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（Ａｍｇｅｎ　Ｂｏｄｙ　ｍａｐ　ＲＮＡ－ｓｅｑデータ）。（Ｃ）ＯＴＩ１Ｆ９モノクローナルＡｂによるＭＡＧＥ－Ａ４免疫組織染色（ＩＨＣ）から、扁平上皮非小細胞肺癌の腫瘍内に、ＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質が腫瘍細胞の大部分に発現されることが示される。扁平上皮非小細胞肺癌の腫瘍の代表的なＩＨＣ株は、１００％ＭＡＧＥ－Ａ４ポジティブ腫瘍細胞及び強度３＋の染色を示す。

【図１Ｃ】（Ａ）様々な癌におけるＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（ＴＣＧＡ及び内部ＲＮＡ－ｓｅｑデータ）。（Ｂ）ヒトの正常組織におけるＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（Ａｍｇｅｎ　Ｂｏｄｙ　ｍａｐ　ＲＮＡ－ｓｅｑデータ）。（Ｃ）ＯＴＩ１Ｆ９モノクローナルＡｂによるＭＡＧＥ－Ａ４免疫組織染色（ＩＨＣ）から、扁平上皮非小細胞肺癌の腫瘍内に、ＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質が腫瘍細胞の大部分に発現されることが示される。扁平上皮非小細胞肺癌の腫瘍の代表的なＩＨＣ株は、１００％ＭＡＧＥ－Ａ４ポジティブ腫瘍細胞及び強度３＋の染色を示す。

【図２Ａ】（Ａ）質量分析（ＭＳ）データ（Ｉｍｍａｔｉｃｓ）から、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド－ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１が腫瘍において発現され、正常な組織では発現されないことが実証される。（Ｂ）ＭＳによって測定される代表的な腫瘍におけるＭＡＧＥ－Ｂ２ｐＭＨＣ頻度を表に示す。

【図２Ｂ】（Ａ）質量分析（ＭＳ）データ（Ｉｍｍａｔｉｃｓ）から、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド－ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１が腫瘍において発現され、正常な組織では発現されないことが実証される。（Ｂ）ＭＳによって測定される代表的な腫瘍におけるＭＡＧＥ－Ｂ２ｐＭＨＣ頻度を表に示す。

【図３】指定の癌適応症における患者母集団は、米国の母集団における１年当たりの新たな事例（新たな患者数）を掛けたｐＭＨＣ標的頻度に基づいて推定された。各癌適応症におけるｐＭＨＣ標的頻度は、米国の母集団におけるＨＬＡ－Ａ＊０２：０１キャリア頻度を掛けたＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４　ｍＲＮＡ発現頻度（ＴＣＧＡ）によ

って計算された（０．４１）。ＭＡＧＥ－Ｂ２／Ａ４は、ＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４ポジティブな癌患者を示す。
【図４Ａ】健康なヒトＰＢＭＣからのＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲの同定。（Ａ）概略図は、健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナーＰＢＭＣから単離された希少なＴ細胞クローンからのＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲを同定する手順を例示する。（Ｂ）ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド負荷自己抗原提示細胞での刺激によるエンリッチメントの複数ラウンドに続く、２種類の蛍光色素（ＰＥ及びＡＰＣ）で標識化されたｐＭＨＣデキストラマー（ｄｅｘｔｒａｍｅｒ）（Ｄｅｘ）によるＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞のフローサイトメトリーによる同定。代表的なスクリーン結果から、ポジティブなドナーＡが、複数回の生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）刺激後にエンリッチされたＭＡＧＥ－Ｂ２ｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞を示したのに対して、ネガティブドナーＢはＤｅｘ＋Ｔ細胞を持たなかった。（Ｃ）ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド又はネガティブコントロールとしての無関係のＡＦＰペプチドでパルスされたＴ２細胞で刺激した選別ＣＤ８＋Ｄｅｘ＋Ｔ細胞のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ解析。
【図４Ｂ】健康なヒトＰＢＭＣからのＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲの同定。（Ａ）概略図は、健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナーＰＢＭＣから単離された希少なＴ細胞クローンからのＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲを同定する手順を例示する。（Ｂ）ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド負荷自己抗原提示細胞での刺激によるエンリッチメントの複数ラウンドに続く、２種類の蛍光色素（ＰＥ及びＡＰＣ）で標識化されたｐＭＨＣデキストラマー（ｄｅｘｔｒａｍｅｒ）（Ｄｅｘ）によるＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞のフローサイトメトリーによる同定。代表的なスクリーン結果から、ポジティブなドナーＡが、複数回の生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）刺激後にエンリッチされたＭＡＧＥ－Ｂ２ｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞を示したのに対して、ネガティブドナーＢはＤｅｘ＋Ｔ細胞を持たなかった。（Ｃ）ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド又はネガティブコントロールとしての無関係のＡＦＰペプチドでパルスされたＴ２細胞で刺激した選別ＣＤ８＋Ｄｅｘ＋Ｔ細胞のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ解析。
【図４Ｃ】健康なヒトＰＢＭＣからのＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲの同定。（Ａ）概略図は、健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナーＰＢＭＣから単離された希少なＴ細胞クローンからのＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲを同定する手順を例示する。（Ｂ）ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド負荷自己抗原提示細胞での刺激によるエンリッチメントの複数ラウンドに続く、２種類の蛍光色素（ＰＥ及びＡＰＣ）で標識化されたｐＭＨＣデキストラマー（ｄｅｘｔｒａｍｅｒ）（Ｄｅｘ）によるＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞のフローサイトメトリーによる同定。代表的なスクリーン結果から、ポジティブなドナーＡが、複数回の生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）刺激後にエンリッチされたＭＡＧＥ－Ｂ２ｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞を示したのに対して、ネガティブドナーＢはＤｅｘ＋Ｔ細胞を持たなかった。（Ｃ）ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド又はネガティブコントロールとしての無関係のＡＦＰペプチドでパルスされたＴ２細胞で刺激した選別ＣＤ８＋Ｄｅｘ＋Ｔ細胞のＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴ解析。
【図５】ジャーカット（Ｊｕｒｋａｔ）－ルシフェラーゼ活性化アッセイを用いたＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲスクリーン。個々のＴＣＲの活性は、賦形剤のみを有するＴ２細胞と比較して、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドが負荷されＴ２細胞の存在下にて、ルシフェラーゼ活性（発光）の平均倍率変化として表された。エラーバーは標準誤差を表す。
【図６Ａ】種々の機能アッセイによって上位４つのＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの選択。（Ａ）ペプチド滴定及びＥ：Ｔ滴定研究などのＴ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド細胞障害性アッセイにおけるＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの細胞障害性概要（ドナー３名からのペプチド濃度（Ｍ）のＥＣ９０平均又はＥ：Ｔ）。（Ｂ）Ｅ：Ｔ＝１：１にてＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度でＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究。（Ｃ）Ｅ：Ｔ滴定と共にＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究がＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度１０$^{-8}$Ｍにて行われた。（Ｂ及びＣに関して：ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ３▲、ＴＣＲ４▼、ＴＣＲ６◆、ＴＣＲ７☆、ＴＣＲ８□、ＴＣＲ１１◇、ＴＣＲ１２小さな●）。（

Ｄ）２７．５ＦＰＫＭのＭＡＧＥ－Ｂ２発現を有するＳＫ－Ｍｅｌ－５癌細胞系に対するＴＣＲ－Ｔの細胞溶解活性。ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ８☆。（Ｅ）相同性に基づく類似のペプチドに対する交差反応性スクリーンからの代表的なデータ（Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイ）。ＭＡＧＥ－Ｂ２●、ペプチド９■、ペプチド２５▲、ペプチド４６、△、ペプチド７５▼。

【図６Ｂ】種々の機能アッセイによって上位４つのＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの選択。（Ａ）ペプチド滴定及びＥ：Ｔ滴定研究などのＴ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド細胞障害性アッセイにおけるＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの細胞障害性概要（ドナー３名からのペプチド濃度（Ｍ）のＥＣ９０平均又はＥ：Ｔ）。（Ｂ）Ｅ：Ｔ＝１：１にてＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度でＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究。（Ｃ）Ｅ：Ｔ滴定と共にＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究がＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度10^{-8}Ｍにて行われた。（Ｂ及びＣに関して：ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ３▲、ＴＣＲ４▼、ＴＣＲ６◆、ＴＣＲ７☆、ＴＣＲ８□、ＴＣＲ１１◇、ＴＣＲ１２小さな●）。（Ｄ）２７．５ＦＰＫＭのＭＡＧＥ－Ｂ２発現を有するＳＫ－Ｍｅｌ－５癌細胞系に対するＴＣＲ－Ｔの細胞溶解活性。ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ８☆。（Ｅ）相同性に基づく類似のペプチドに対する交差反応性スクリーンからの代表的なデータ（Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイ）。ＭＡＧＥ－Ｂ２●、ペプチド９■、ペプチド２５▲、ペプチド４６、△、ペプチド７５▼。

【図６Ｃ】種々の機能アッセイによって上位４つのＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの選択。（Ａ）ペプチド滴定及びＥ：Ｔ滴定研究などのＴ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド細胞障害性アッセイにおけるＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの細胞障害性概要（ドナー３名からのペプチド濃度（Ｍ）のＥＣ９０平均又はＥ：Ｔ）。（Ｂ）Ｅ：Ｔ＝１：１にてＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度でＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究。（Ｃ）Ｅ：Ｔ滴定と共にＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究がＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度10^{-8}Ｍにて行われた。（Ｂ及びＣに関して：ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ３▲、ＴＣＲ４▼、ＴＣＲ６◆、ＴＣＲ７☆、ＴＣＲ８□、ＴＣＲ１１◇、ＴＣＲ１２小さな●）。（Ｄ）２７．５ＦＰＫＭのＭＡＧＥ－Ｂ２発現を有するＳＫ－Ｍｅｌ－５癌細胞系に対するＴＣＲ－Ｔの細胞溶解活性。ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ８☆。（Ｅ）相同性に基づく類似のペプチドに対する交差反応性スクリーンからの代表的なデータ（Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイ）。ＭＡＧＥ－Ｂ２●、ペプチド９■、ペプチド２５▲、ペプチド４６、△、ペプチド７５▼。

【図６Ｄ】種々の機能アッセイによって上位４つのＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの選択。（Ａ）ペプチド滴定及びＥ：Ｔ滴定研究などのＴ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド細胞障害性アッセイにおけるＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの細胞障害性概要（ドナー３名からのペプチド濃度（Ｍ）のＥＣ９０平均又はＥ：Ｔ）。（Ｂ）Ｅ：Ｔ＝１：１にてＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度でＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究。（Ｃ）Ｅ：Ｔ滴定と共にＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究がＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度10^{-8}Ｍにて行われた。（Ｂ及びＣに関して：ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ３▲、ＴＣＲ４▼、ＴＣＲ６◆、ＴＣＲ７☆、ＴＣＲ８□、ＴＣＲ１１◇、ＴＣＲ１２小さな●）。（Ｄ）２７．５ＦＰＫＭのＭＡＧＥ－Ｂ２発現を有するＳＫ－Ｍｅｌ－５癌細胞系に対するＴＣＲ－Ｔの細胞溶解活性。ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ８☆。（Ｅ）相同性に基づく類似のペプチドに対する交差反応性スクリーンからの代表的なデータ（Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイ）。ＭＡＧＥ－Ｂ２●、ペプチド９■、ペプチド２５▲、ペプチド４６、△、ペプチド７５▼。

【図６Ｅ】種々の機能アッセイによって上位４つのＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの選択。（Ａ）ペプチド滴定及びＥ：Ｔ滴定研究などのＴ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド細胞障害性アッセイにおけるＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの細胞障害性概要（ドナー３名からのペプチド濃度（Ｍ）のＥＣ９０平均又はＥ：Ｔ）。（Ｂ）Ｅ：Ｔ＝１：１にてＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度でＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究。（Ｃ）Ｅ：Ｔ滴定と共にＴ２／ペプチドアッセイを用いた細胞障害性研究がＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド濃度10^{-}

^{8}Ｍにて行われた。（Ｂ及びＣに関して：ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ３▲、ＴＣＲ４▼、ＴＣＲ６◆、ＴＣＲ７☆、ＴＣＲ８□、ＴＣＲ１１◇、ＴＣＲ１２小さな●）。（Ｄ）２７．５ＦＰＫＭのＭＡＧＥ－Ｂ２発現を有するＳＫ－Ｍｅｌ－５癌細胞系に対するＴＣＲ－Ｔの細胞溶解活性。ＴＣＲ１●、ＴＣＲ２■、ＴＣＲ８☆。（Ｅ）相同性に基づく類似のペプチドに対する交差反応性スクリーンからの代表的なデータ（Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイ）。ＭＡＧＥ－Ｂ２●、ペプチド９■、ペプチド２５▲、ペプチド４６、△、ペプチド７５▼。

【図７】ＥＦ１αプロモーター下のフューリン切断部位－ＳＧＳＧ－Ｔ２Ａのリンカー、及び最小ＩＬ－２プロモーターに連結された６つのＮＦＡＴ（活性化Ｔ細胞の核因子）応答エレメントを含有する複合プロモーター下のＩＬ１２ペイロードと共に、ＴＣＲα及びＴＣＲβ鎖を含有するＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２レンチウイルスの構築物の概略図。

【図８】Ｔ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド細胞障害性アッセイを用いたＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２の効力バリデーション。３名のＨＬＡ－Ａ＊０２：０１ドナーの４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２を用いたＴ２／ペプチド滴定研究からのペプチド濃度（Ｍ）のＥＣ９０を表に示す。Ｅ：Ｔ比（デキストラマー＋Ｔ細胞：Ｔ２）は１：１であった。ＴＣＲ１－ＩＬ１２●、ＴＣＲ２－ＩＬ１２■、ＴＣＲ３－ＩＬ１２△、ＴＣＲ４－ＩＬ１２▼、ＩＬ１２　ＲＦＰ◇、モック（Ｍｏｃｋ）Ｔ細胞●。

【図９】３名のドナーからのＴＣＲ４－ＩＬ１２細胞は、ペプチド滴定研究においてＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド－及びＭＡＧＥ－Ａ４ペプチド負荷Ｔ２細胞の両方に対して強力な細胞障害性を示した。ＭＡＧＥ－Ｂ２◇／破線、ＭＡＧＥ－Ａ４■。

【図１０】ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４－癌細胞系に対する４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の効力の概略。４つすべてのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２は、癌細胞系に対して強力な細胞障害性を示した。ＩＬ１２－ＲＦＰ　Ｔ細胞（遺伝子導入ＴＣＲなしの、ＮＦＡＴ．ＩＬ－１２．ＲＦＰ形質導入Ｔ細胞）及びモック（未形質導入）Ｔ細胞をネガティブコントロールとして使用した。５０％を超える最大特異的細胞死が灰色で強調される。

【図１１】ＭＡＧＥ－Ａ４＋ＭＡＧＥ－Ｂ２－癌細胞系に対するＴＣＲ４－ＩＬ１２の効力の概略。５０％を超える最大特異的細胞死が灰色で強調される。

【図１２】ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の効力の概略。ＴＣＲ４－ＩＬ１２及びＴＣＲ２－ＩＬ１２は、ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する強力な細胞障害性を示した。５０％を超える最大特異的細胞死が灰色で強調される。

【図１３】ＭＡＧＥ－Ｂ２＋及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の代表的な効力。効力のバリデーションのために、約４０の癌細胞系を、ドナー２～３名から産生された４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞で試験した。ＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４　ｍＲＮＡ発現レベル（ＦＰＫＭ、ＲＮＡｓｅｑ）を各癌細胞系に対して示した。ＴＣＲ１－ＩＬ１２●、ＴＣＲ２－ＩＬ１２■、ＴＣＲ３－ＩＬ１２△、ＴＣＲ４－ＩＬ１２▼、ＩＬ１２　ＲＦＰ◇。

【図１４Ａ】ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２のペプチド－ＭＨＣ標的特異的細胞障害性をＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ又はＢ２Ｍ　ＫＯ癌細胞系によって検証した。（Ａ）Ｅ：Ｔ滴定を用いた細胞障害性アッセイについて、ＤＡＮ－Ｇ由来癌細胞系（ＷＴ、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ、及びＢ２Ｍ　ＫＯ）をＴＣＲ２－ＩＬ１２及びＴＣＲ４－ＩＬ１２で試験した。ＤＡＮ－ＧＷＴ●、ＤＡＮ－Ｇ　ＭＡＧＥ　Ｂ２　ＫＩ（２Ｅ９）▲、ＤＡＮ－Ｇ　Ｂ２Ｍ　ＫＯ▼。（Ｂ）Ｅ：Ｔ滴定を用いた細胞障害性アッセイについて、８５０５Ｃ由来癌細胞系（ＷＴ、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ、及びＢ２Ｍ　ＫＯ）を試験した。複数のドナーから、同じ結果が確認された。ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ効率をシーケンシングによって検証した。Ｂ２ＭＫＯ効率は、フローサイトメトリーによって検証された。８５０５Ｃ　ＷＴ●、８５０５Ｃ　ｎｅｇ　ｇＲＮＡ■、８５０５Ｃ　ＭＡＧＥ　Ｂ２　ＫＯ▲、８５０５Ｃ　Ｂ２Ｍ　ＫＯ▼。

【図１４Ｂ】ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２のペプチド－ＭＨＣ標的特異的細胞障害性をＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ又はＢ２Ｍ　ＫＯ癌細胞系によって検証した。（Ａ）Ｅ：Ｔ滴定を用いた細胞障害性アッセイについて、ＤＡＮ－Ｇ由来癌細胞系（ＷＴ、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ、及

びＢ２Ｍ　ＫＯ）をＴＣＲ２－ＩＬ１２及びＴＣＲ４－ＩＬ１２で試験した。ＤＡＮ－ＧＷＴ●、ＤＡＮ－Ｇ　ＭＡＧＥ　Ｂ２　ＫＩ（２Ｅ９）▲、ＤＡＮ－Ｇ　Ｂ２Ｍ　ＫＯ▼。（Ｂ）Ｅ：Ｔ滴定を用いた細胞障害性アッセイについて、８５０５Ｃ由来癌細胞系（ＷＴ、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ、及びＢ２Ｍ　ＫＯ）を試験した。複数のドナーから、同じ結果が確認された。ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ効率をシーケンシングによって検証した。Ｂ２ＭＫＯ効率は、フローサイトメトリーによって検証された。８５０５Ｃ　ＷＴ●、８５０５Ｃ　ｎｅｇｇＲＮＡ■、８５０５Ｃ　ＭＡＧＥ　Ｂ２　ＫＯ▲、８５０５Ｃ　Ｂ２Ｍ　ＫＯ▼。

【図１５Ａ】ＩＬ１２ペイロードが、低い標的発現性の細胞に対してＴＣＲ－Ｔ細胞効力を増加し、生体内でＣＡＲ－Ｔ細胞の有効性を高めた。（Ａ）生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）でのＴＣＲ－Ｔ及びＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞効力の比較。ＴＣＲ－Ｔ又はＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞に関する最大細胞死の平均は、異なる３名のドナーから産生されたＴＣＲ－Ｔ細胞及びＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の特異的細胞死活性から導かれた。（Ｂ）生体内でのＣＡＲ－Ｔ及びＣＡＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞有効性の比較。ＩＬ１２ペイロードを含む、又は含まないｈｕＥｐＣＡＭ　ＣＡＲ－Ｔ細胞の有効性が、Ｂ１６Ｆ１０－ｈｕＥｐＣＡＭ同系マウス腫瘍モデルにおいて評価された。

【図１５Ｂ】ＩＬ１２ペイロードが、低い標的発現性の細胞に対してＴＣＲ－Ｔ細胞効力を増加し、生体内でＣＡＲ－Ｔ細胞の有効性を高めた。（Ａ）生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）でのＴＣＲ－Ｔ及びＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞効力の比較。ＴＣＲ－Ｔ又はＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞に関する最大細胞死の平均は、異なる３名のドナーから産生されたＴＣＲ－Ｔ細胞及びＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の特異的細胞死活性から導かれた。（Ｂ）生体内でのＣＡＲ－Ｔ及びＣＡＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞有効性の比較。ＩＬ１２ペイロードを含む、又は含まないｈｕＥｐＣＡＭ　ＣＡＲ－Ｔ細胞の有効性が、Ｂ１６Ｆ１０－ｈｕＥｐＣＡＭ同系マウス腫瘍モデルにおいて評価された。

【図１６】完全パネルの類似のペプチドでの交差反応性スクリーンの概略。ＳＬＣ１６Ａ１０及びＫＬＨＤＣ３は、Ｘスキャン誘導モチーフに基づいて同定され、ＮＲＸＮ１及びＭＡＧＥ－Ｂ１は、標的ペプチドに対する配列相同性に基づいて同定された。ＭＡＧＥ－Ｂ１は、非常に制限された正常組織発現（精巣においてのみ）を有する別の癌精巣抗原である。完全長タンパク質又は内因性タンパク質を過剰発現する癌細胞系での細胞障害性アッセイに基づいて、オフターゲットの問題で同定された類似のペプチドはなかった。

【図１７】ＳＬＣ１６Ａ１０推定交差反応性ペプチドがさらに、ＳＬＡ１６Ａ１０完全長タンパク質を過剰発現するＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋癌細胞系（ＮＣＩ－Ｈ４４１及びＩＧＲ－１）（Ａ）及びＳＬＣ１６Ａ１０内因性タンパク質を発現する癌細胞系（ＬＯＵＣＹ及びＭＦＥ－２８０）（Ｂ）を用いたＴＣＤＤアッセイによってリスク低減された。ＭＡＧＥ－Ｂ２完全長タンパク質過剰発現性（ＯＥ）癌細胞系をポジティブコントロール標的細胞系として使用した（Ａ）。ＩＬ１２－ＲＦＰ　Ｔ細胞をネガティブコントロールＴ細胞として使用した（Ｂ）。

【図１８】ヒト正常細胞反応性評価の概略。ＴＣＲ２－ＩＬ１２及びＴＣＲ４－ＩＬ１２細胞によるＩＦＮγ及びグランザイムＢ産生の増加は、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ヒト正常初代細胞に対して確認されなかった。ヒト気管支の上皮細胞（ｈＢＥｐＣ）、ヒト気管上皮細胞（ｈＴＥｐＣ）、ヒト皮膚微小血管内皮細胞（ＨＤＭＥＣ）、及びヒトケラチノサイト（Ｋｅｒ．）などの、４つの正常細胞タイプからの代表的なデータを示す。コントロールＩＬ１２－ＲＦＰ　Ｔ細胞と比較したＩＦＮγ及びグランザイムＢ産生の倍変化率を表に示す。同等の結果が、試験された９つすべての正常細胞タイプから、且つＩＬ－１２ｐ７０及びＴＮＦαに対して得られた。Ｂ－ＣＰＡＰ癌細胞系（ＭＡＧＥ－Ｂ２　６５．９ＦＰＫＭ）を、ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋細胞のポジティブコントロールとして使用した。同じドナーからの、モック（未形質導入）Ｔ細胞又はＩＬ１２－ＲＦＰ構築物を発現するＴ細胞（遺伝子導入ＴＣＲなし）が、ネガティブコントロール効果細胞として含まれた。さらに、Ｔ細胞なしの標的細胞（単に標的として標識化された）を、細胞障害性アッセイのネガティブコントロールとして使用した。

【図１９－１】アロ反応性評価の概略。試験された３４のＢＬＣＬに対するサイトカイン

又はグランザイムＢ応答の４倍以上の増加（ＩＬ１２－ＲＦＰコントロールＴ細胞と比較して）は、４つのＴＣＲＴ－Ｔ－ＩＬ１２細胞のいずれについても確認されなかった。一部の低いレベルの応答（ＩＬ１２－ＲＦＰコントロール細胞と比較して３倍以上であるが、４倍未満の）が、ＴＣＲ１－ＩＬ１２及びＴＣＲ２－ＩＬ１２について確認された。同等の結果が、ＩＬ－１２ｐ７０及びＴＮＦα産生に関して得られた。４つすべてのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞から、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドでパルスされたポジティブコントロールＵ２６６Ｂ１細胞（ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋）に対する強いサイトカイン及びグランザイムＢ応答が実証された。

【図１９－２】アロ反応性評価の概略。試験された３４のＢＬＣＬに対するサイトカイン又はグランザイムＢ応答の４倍以上の増加（ＩＬ１２－ＲＦＰコントロールＴ細胞と比較して）は、４つのＴＣＲＴ－Ｔ－ＩＬ１２細胞のいずれについても確認されなかった。一部の低いレベルの応答（ＩＬ１２－ＲＦＰコントロール細胞と比較して３倍以上であるが、４倍未満の）が、ＴＣＲ１－ＩＬ１２及びＴＣＲ２－ＩＬ１２について確認された。同等の結果が、ＩＬ－１２ｐ７０及びＴＮＦα産生に関して得られた。４つすべてのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞から、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドでパルスされたポジティブコントロールＵ２６６Ｂ１細胞（ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋）に対する強いサイトカイン及びグランザイムＢ応答が実証された。

【発明を実施するための形態】

【００３５】

本明細書で使用されるセクションの表題は、単に系統化する目的のためであり、記載の主題を制限するものとして解釈すべきではない。本明細書の本文内に記載のすべての参考文献は、その全体が参照により明確に組み込まれる。

【００３６】

組換えＤＮＡ、オリゴヌクレオチド合成、組織培養及び形質転換、タンパク質精製等に、標準技術が使用され得る。酵素反応及び精製技術は、製造元の仕様書に従って、又は当技術分野で一般に達成されるように、又は本明細書に記載のように実施され得る。以下の手順及び技術は一般に、当技術分野でよく知られている従来の方法に従って、且つ本明細書全体に記載及び考察される様々な一般的及びより具体的な参考文献に記載のように、実施され得る。例えば、いずれかの目的で、参照により本明細書に組み込まれる、Ｓａｍｂｒｏｏｋｅｔ ａｌ．，２００１，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕｅｌ，３ｒｄ ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．を参照のこと。具体的な定義が提供されていない限り、本明細書に記載の分析化学、有機化学、及び医薬品化学及び製薬化学と関連して用いられる命名法、並びにそれらの実験手順及び技術は、当技術分野でよく知られており、一般に使用されている。標準技術は、化学合成、化学分析、医薬調製、製剤化、及び送達及び患者の治療に使用され得る。

【００３７】

ＨＬＡクラスＩ分子、好ましくはＨＬＡ－Ａ＊０２：０１によって表される場合、ＭＡＧＥ－Ｂ２由来ペプチドＧＶＹＤＧＥＥＨＳＶ（配列番号１）に結合する、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α鎖及びβ鎖の対が本明細書において提供される。「ＴＣＲα鎖及びβ鎖の対」は、本明細書において「ＴＣＲ」、「１つのＴＣＲ」、又は「そのＴＣＲ」とも呼ばれ得る。細胞、例えばＴ細胞において組換えで発現される場合には、ＴＣＲは、細胞、例えば癌細胞上でＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド－ＨＬＡ複合体に結合し、かかる結合によって、組換え細胞が活性化される、Ｔ細胞の活性化によって、癌細胞が死ぬ、又は破壊される。Ｔ細胞活性化を決定する方法は当技術分野で公知であり、本明細書において実施例で提供される。

【００３８】

好ましい実施形態において、本発明の組換え細胞の効力又は細胞溶解性活性（細胞障害性）は、（１）Ｔ細胞依存性細胞障害性（ＴＤＣＣ）アッセイ、Ｔ２／ペプチド負荷アッセイにおいて約１００コピー（約10^{-8}Ｍ）／細胞にてペプチドが負荷されたＨＬＡ－

Ａ＊０２：０１標的細胞の８０～１００％溶解又は（２）天然のｐＭＨＣ標的ポジティブ癌細胞系の８０～１００％溶解によって定義される。

【００３９】

特定の実施形態において、ＨＬＡクラスＩ分子、好ましくはＨＬＡ－Ａ＊０２：０１によって提示される場合に、ＴＣＲはさらに、ＭＡＧＥ－Ａ４由来ペプチドＧＶＹＤＧＲＥＨＴＶに結合する。かかるＴＣＲとしては、ＴＣＲ３、ＴＣＲ４、ＴＣＲ６、ＴＣＲ７、及びＴＣＲ１１が挙げられる。

【００４０】

各ＴＣＲα鎖及びβ鎖は、可変及び定常ドメインを含む。可変ドメイン（Ｖα又はＶβ）内に、３つのＣＤＲ（相補性決定領域）：ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３がある。その種々のα鎖及びβ鎖可変ドメインは、そのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びそのＣＤＲ３配列の一部と共にそのフレームワークによって区別することができる。

【００４１】

好ましい実施形態において、ＴＣＲは、配列番号１３～２３に記載のＣＤＲ３を有するα鎖及び配列番号２４～３４に記載のＣＤＲ３を有するβ鎖を含む。ＣＤＲ３領域は、市販のソフトウェア（例えば、Ｃｅｌｌｒａｎｇｅｒ；１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）によって決定され得る。ＴＣＲα鎖は、配列番号３５～４５のいずれかに記載の配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一の配列を含み得る。ＴＣＲβ鎖は、配列番号４６～５６のいずれかに記載の配列と少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一の配列を含み得る。２つの配列間の同一性の決定方法、例えば、ＢＬＡＳＴ又はＧｅｎｅｉｏｕｓが、当技術分野でよく知られている。特定の実施形態において、配列番号３５～４５のいずれかに記載の配列のいずれか、又は配列番号４６～５６のいずれかに記載の配列のいずれかのＣ末端又はＮ末端の１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０残基は、短縮又は除去され得る。例示的ＴＣＲ、並びに相当するα鎖及びβ鎖ＣＤＲ３、並びに完全長配列番号を、表１Ａ及び表１Ｂ、配列番号１３～５６に示す。

【００４２】

【表１】

表 1A

TCR	αCDR3	βCDR3	α成熟型 完全長	β成熟型 完全長
1	配列番号 13	配列番号 24	配列番号 35	配列番号 46
2	配列番号 14	配列番号 25	配列番号 36	配列番号 47
3	配列番号 15	配列番号 26	配列番号 37	配列番号 48
4	配列番号 16	配列番号 27	配列番号 38	配列番号 49
5	配列番号 17	配列番号 28	配列番号 39	配列番号 50
6	配列番号 18	配列番号 29	配列番号 40	配列番号 51
7	配列番号 19	配列番号 30	配列番号 41	配列番号 52
8	配列番号 20	配列番号 31	配列番号 42	配列番号 53
9	配列番号 21	配列番号 32	配列番号 43	配列番号 54
10	配列番号 22	配列番号 33	配列番号 44	配列番号 55
11	配列番号 23	配列番号 34	配列番号 45	配列番号 56

【００４３】

【表２】

表 1B

配列番号	内容	配列
1	MAGE-B2-由来ペプチド	GVYDGEEHSV

【００４４】

【表３】

配列番号	内容	配列
2	MAGE-A4-由来ペプチド	GVYDGREHTV
3	MAGE-A8-由来ペプチド	GLYDGREHSV
4	KEAP1-由来ペプチド	GVIDGHIYAV
5	MB-由来ペプチド	GLSDGEWQLV
6	ADF-由来ペプチド	GVMAGDIYSV
7	DPYSL4-由来ペプチド	GLYDGPVHEV
8	CNPD2-由来ペプチド	GVYGGSVHEA
9	MYOF-由来ペプチド	FVYDEPGHAV
10	COX14-由来ペプチド	TVYGGYLCSV
11	STXBP5-由来ペプチド	YTYDEAIHSV
12	SLK-由来ペプチド	FIVDGVEVSV
13	TCR1α鎖 CDR3	CAAMKTSYDKVIF
14	TCR2α鎖 CDR3	CAVNIPFSNSGGYQKVTF
15	TCR3α鎖 CDR3	CALSVLRMDSSYKLIF
16	TCR4α鎖 CDR3	CVVSLGTDKLIF
17	TCR5α鎖 CDR3	CAPGGNQFYF
18	TCR6α鎖 CDR3	CAFFNAGKSTF
19	TCR7α鎖 CDR3	CAVRRLGGYQKVTF
20	TCR8α鎖 CDR3	CAMRGPTSYGKLTF

【００４５】

【表４】

配列番号	内容	配列
21	TCR9α鎖 CDR3	CVVSSDMRF
22	TCR10α鎖 CDR3	CAVRDNARLMF
23	TCR11α鎖 CDR3	CAEKSITSYDKVIF
24	TCR1β鎖 CDR3	CASSQGQGGYGYTF
25	TCR2β鎖 CDR3	CASRHPGQYNQPQHF
26	TCR3β鎖 CDR3	CASSLQGAGQPQHF
27	TCR4β鎖 CDR3	CATSAQGNYNEQFF
28	TCR5β鎖 CDR3	CASSGSNQPQHF
29	TCR6β鎖 CDR3	CASTVGGGPYGYTF
30	TCR7β鎖 CDR3	CASSLVTGSSYNEQFF
31	TCR8β鎖 CDR3	CATSPTTDNQPQHF
32	TCR9β鎖 CDR3	CASSYGGDEQYF
33	TCR10β鎖 CDR3	CSVGPSGHTGYTF
34	TCR11β鎖 CDR3	CASTRRGTYGYTF
35	TCR1α鎖成熟型	KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGD SATYLCAAMKTSYDKVIFGPGTSLSVIPNIQNPDPAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSM DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDV KLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLW SS
36	TCR2α鎖成熟型	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSD SATYLCAVNIPFSNSGGYQKVTFGTGTKLQVIPNIQNPDPAV YQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLM TLRLWSS

【００４６】

【表５】

配列番号	内容	配列
37	TCR3α 鎖成熟型	AQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDCVYETRDTTYYLFWYKQP PSGELVFLIRRNSFDEQNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQ VVDSAVYFCALSVLRMDSSYKLIFGSGTRLLVRPDIQNPDPA VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLL MTLRLWSS
38	TCR4α 鎖成熟型	KNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTG RGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLS DSASYICVVSLGTDKLIFGTGTRLQVFPNIQNPDPAVYQLRD SKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSM DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDV KLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLW SS
39	TCR5α 鎖成熟型	KNEVEQSPQNLTAQEGEFITINCSYSVGISALHWLQQHPGGG IVSLFMLSSGKKKHGRLIATINIQEKHSSLHITASHPRDSAVY ICAPGGNQFYFGTGTSLTVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF ETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
40	TCR6α 鎖成熟型	AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSENNYYLFWYKQP PSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDS QLGDTAMYFCAFFNAGKSTFGDGTTLTVKPNIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMT LRLWSS
41	TCR7α 鎖成熟型	GQNIDQPTEMTATEGAIVQINCTYQTSGFNGLFWYQQHAGE APTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFLSRSKGYSYLLLKELQMKD SASYLCAVRRLGGYQKVTFGTGTKLQVIPNIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMR SMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC DVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLR LWSS
42	TCR8α 鎖成熟型	AQKITQTQPGMFVQEKEAVTLDCTYDTSDQSYGLFWYKQP SSGEMIFLIYQGSYDEQNATEGRYSLNFQKARKSANLVISAS QLGDSAMYFCAMRGPTSYGKLTFGQGTILTVHPNIQNPDPA VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP ESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLL MTLRLWSS

【００４７】

【表６】

配列番号	内容	配列
43	TCR9α 鎖成熟型	KNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTG RGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLS DSASYICVVSSDMRFGAGTRLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSK SSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDF KSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
44	TCR10α 鎖成熟型	AQSVAQPEDQVNVAEGNPLTVKCTYSVSGNPYLFWYVQYP NRGLQFLLKYITGDNLVKGSYGFEAEFNKSQTSFHLKKPSA LVSDSALYFCAVRDNARLMFGDGTQLVVKPNIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPES SCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMT LRLWSS
45	TCR11α 鎖成熟型	GEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGA GLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQT GDSAIYFCAEKSITSYDKVIFGPGTSLSVIPNIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMR SMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC DVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLR LWSS
46	TCR1β 鎖成熟型	GEEVAQTPKHLVRGEGQKAKLYCAPIKGHSYVFWYQQVLK NEFKFLISFQNENVFDETGMPKERFSAKCLPNSPCSLEIQATK LEDSAVYFCASSQGQGGYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPPE VAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKE VHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCG FTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK RKDF
47	TCR2β 鎖成熟型	NAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLLCAQDMNHEYMYWYRQDP GMGLRLIHYSVGEGTTAKGEVPDGYNVSRLKKQNFLLGLE SAAPSQTSVYFCASRHPGQYNQPQHFGDGTRLSILEDLNKV FPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ NPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR ADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLM AMVKRKDF

【００４８】

【表７】

配列番号	内容	配列
48	TCR3β 鎖成熟型	NAGVTQTPKFRVLKTGQSMTLLCAQDMNHEYMYWYRQDP GMGLRLIHYSVGEGTTAKGEVPDGYNVSRLKKQNFLLGLE SAAPSQTSVYFCASSLQGAGQPQHFGDGTRLSILEDLNKVFP PEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNG KEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD CGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDF
49	TCR4β 鎖成熟型	DADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG LGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIP NQTALYFCATSAQGNYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKE VHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCG FTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK RKDSRG
50	TCR5β 鎖成熟型	DAGITQSPRYKITETGRQVTLMCHQTWSHSYMFWYRQDLG HGLRLIYYSAAADITDKGEVPDGYVVSRSKTENFPLTLESAT RSQTSVYFCASSGSNQPQHFGDGTRLSILEDLNKVFPPEVAV FEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTS VSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK DF
51	TCR6β 鎖成熟型	EAGVAQSPRYKIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQ GPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPA KLEDSAVYLCASTVGGGPYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPP EVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC GFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDF
52	TCR7β 鎖成熟型	GAGVSQSPSNKVTEKGKDVELRCDPISGHTALYWYRQRLG QGLEFLIYFQGNSAPDKSGLPSDRFSAERTGESVSTLTIQRTQ QEDSAVYLCASSLVTGSSYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPP EVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNG KEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD CGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAM VKRKDSRG

【００４９】

【表８】

配列番号	内容	配列
53	TCR8β 鎖成熟型	DADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG LGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIP NQTALYFCATSPTTDNQPQHFGDGTRLSILEDLNKVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVH SGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDF
54	TCR9β 鎖成熟型	NAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCAQDMNHNYMYWYRQDP GMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLEL AAPSQTSVYFCASSYGGDEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPE VAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC GFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDSRG
55	TCR10β 鎖成熟型	SAVISQKPSRDICQRGTSLTIQCQVDSQVTMMFWYRQQPGQ SLTLIATANQGSEATYESGFVIDKFPISRPNLTFSTLTVSNMS PEDSSIYLCSVGPSGHTGYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVH SGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDF
56	TCR11β 鎖成熟型	DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDP GLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPEGYSVSREKKERFSLILESA STNQTSMYLCASTRRGTYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPPE VAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKE VHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCG FTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVK RKDF
57	シグナルペプチドを有するTCR1α 鎖	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENLVLN CSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNA SLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAAMKTSYDKVIFGPGT SLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGF RILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

【００５０】

【表９】

配列番号	内容	配列
58	シグナルペプチドを有するTCR2α鎖	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNIPFSNSGGYQK VTFGTGTKLQVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNF QNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
59	シグナルペプチドを有するTCR3α鎖	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTL DCVYETRDTTYYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDEQNEISGR YSWNFQKSTSSFNFTITASQVVDSAVYFCALSVLRMDSSYK LIFGSGTRLLVRPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNF QNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
60	シグナルペプチドを有するTCR4α鎖	MKKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCT LQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGR YTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSLGTDKLIFGT GTRLQVFPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS VIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
61	シグナルペプチドを有するTCR5α鎖	MVKIRQFLLAILWLQLSCVSAAKNEVEQSPQNLTAQEGEFIT INCSYSVGISALHWLQQHPGGGIVSLFMLSSGKKKHGRLIAT INIQEKHSSLHITASHPRDSAVYICAPGGNQFYFGTGTSLTVI PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS DVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILL LKVAGFNLLMTLRLWSS
62	シグナルペプチドを有するTCR6α鎖	MTRVSLLWAVVVSTCLESGMAQTVTQSQPEMSVQEAETVT LSCTYDTSENNYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATE NRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFFNAGKSTF GDGTTLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQN LSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

【００５１】

【表１０】

配列番号	内容	配列
63	シグナルペプチドを有するTCR7α鎖	MWGVFLLYVSMKMGGTTGQNIDQPTEMTATEGAIVQINCT YQTSGFNGLFWYQQHAGEAPTFLSYNVLDGLEEKGRFSSFL SRSKGYSYLLLKELQMKDSASYLCAVRRLGGYQKVTFGTG TKLQVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIG FRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
64	シグナルペプチドを有するTCR8α鎖	MSLSSLLKVVTASLWLGPGIAQKITQTQPGMFVQEKEAVTL DCTYDTSDQSYGLFWYKQPSSGEMIFLIYQGSYDEQNATEG RYSLNFQKARKSANLVISASQLGDSAMYFCAMRGPTSYGK LTFGQGTILTVHPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNF QNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
65	シグナルペプチドを有するTCR9α鎖	MKKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCT LQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGR YTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSSDMRFGAGTR LTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAF NNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFR ILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
66	シグナルペプチドを有するTCR10α鎖	MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSVAQPEDQVNVAEGNPLTV KCTYSVSGNPYLFWYVQYPNRGLQFLLKYITGDNLVKGSY GFEAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFCAVRDNARLMFG DGTQLVVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
67	シグナルペプチドを有するTCR11α鎖	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVI NCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQR LTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEKSITSYDKVIF GPGTSLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
68	シグナルペプチドを有するTCR1β鎖	MSPIFTCITILCLLAAGSPGEEVAQTPKHLVRGEGQKAKLYC APIKGHSYVFWYQQVLKNEFKFLISFQNENVFDETGMPKER FSAKCLPNSPCSLEIQATKLEDSAVYFCASSQGQGGYGYTFG SGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

【００５２】

【表１１】

配列番号	内容	配列
69	シグナルペプチドを有するTCR2β鎖	MSLGLLCCGAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMTL LCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTTAKGEV PDGYNVSRLKKQNFLLGLESAAPSQTSVYFCASRHPGQYNQ PQHFGDGTRLSILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
70	シグナルペプチドを有するTCR3β鎖	MSLGLLCCAAFSLLWAGPVNAGVTQTPKFRVLKTGQSMTL LCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGTTAKGEV PDGYNVSRLKKQNFLLGLESAAPSQTSVYFCASSLQGAGQP QHFGDGTRLSILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
71	シグナルペプチドを有するTCR4β鎖	MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLE CSQTKGHDRMYWYRQDPGLGLRLIYYSFDVKDINKGEISD GYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQTALYFCATSAQGNYNEQF FGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDS RYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
72	シグナルペプチドを有するTCR5β鎖	MGTRLFFYVALCLLWAGHRDAGITQSPRYKITETGRQVTL MCHQTWSHSYMFWYRQDLGHGLRLIYYSAAADITDKGEV PDGYVVSRSKTENFPLTLESATRSQTSVYFCASSGSNQPQHF GDGTRLSILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
73	シグナルペプチドを有するTCR6β鎖	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIEKRQSVAF WCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPK DRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASTVGGGPYGY TFGSGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

【００５３】

【表１２】

配列番号	内容	配列
74	シグナルペプチドを有するTCR7β鎖	MGTRLLFWVAFCLLGAYHTGAGVSQSPSNKVTEKGKDVEL RCDPISGHTALYWYRQRLGQGLEFLIYFQGNSAPDKSGLPS DRFSAERTGESVSTLTIQRTQQEDSAVYLCASSLVTGSSYNE QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
75	シグナルペプチドを有するTCR8β鎖	MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLE CSQTKGHDRMYWYRQDPGLGLRLIYYSFDVKDINKGEISD GYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQTALYFCATSPTTDNQPQHF GDGTRLSILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
76	シグナルペプチドを有するTCR9β鎖	MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQC AQDMNHNYMYWYRQDPGMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPN GYNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASSYGGDEQYFGP GTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
77	シグナルペプチドを有するTCR10β鎖	MLSLLLLLLGLGSVFSAVISQKPSRDICQRGTSLTIQCQVDSQ VTMMFWYRQQPGQSLTLIATANQGSEATYESGFVIDKFPIS RPNLTFSTLTVSNMSPEDSSIYLCSVGPSGHTGYTFGSGTRLT VVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQI VSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAMVKRKDF
78	シグナルペプチドを有するTCR11β鎖	MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLE CVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPE GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASTRRGTYGYTFG SGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

【００５４】

特定の実施形態において、ＴＣＲα鎖又はβ鎖の可変ドメインは、非ＴＣＲポリペプチドに融合され得る。例示的α鎖及びβ鎖可変ドメインを用いて、ＨＬＡ分子の状況においてＭＡＧＥ－Ｂ２（及び一部の場合にはＭＡＧＥ－Ａ４）由来ペプチドに結合することができる可溶性ＴＣＲが形成され得る。可溶性ＴＣＲは、α及びβ可変ドメインがリンカーによって連結される単鎖フォーマットであり得る。ジスルフィド結合が、α鎖とβ鎖の間に導入されて、安定性が増加され得る。可溶性ＴＣＲは、治療剤又は造影剤に融合又は連結され得る。

【００５５】

例示的ＴＣＲ及び相当するα及びβ可変領域を表２に示す。

【００５６】

【表１３】

表２

TCR	α可変ドメイン	β可変ドメイン
1	アミノ酸 1-113 配列番号 35	アミノ酸 1-114 配列番号 46
2	アミノ酸 1-117 配列番号 36	アミノ酸 1-114 配列番号 47
3	アミノ酸 1-118 配列番号 37	アミノ酸 1-113 配列番号 48
4	アミノ酸 1-112 配列番号 38	アミノ酸 1-113 配列番号 49
5	アミノ酸 1-107 配列番号 39	アミノ酸 1-111 配列番号 50
6	アミノ酸 1-113 配列番号 40	アミノ酸 1-114 配列番号 51
7	アミノ酸 1-112 配列番号 41	アミノ酸 1-116 配列番号 52
8	アミノ酸 1-116 配列番号 42	アミノ酸 1-113 配列番号 53
9	アミノ酸 1-109 配列番号 43	アミノ酸 1-111 配列番号 54
10	アミノ酸 1-112 配列番号 44	アミノ酸 1-114 配列番号 55
11	アミノ酸 1-113 配列番号 45	アミノ酸 1-112 配列番号 56

【００５７】

ＴＣＲα又はβ可変ドメインは、表２に指定される配列のいずれかと少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一の配列を含み得る。ＴＣＲβ鎖は、配列番号４６～５６のいずれかに記載の配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又は１００％同一の配列を含み得る。特定の実施形態において、表２及び表１Ｂの配列番号３５～５６に指定の配列のいずれかのＣ末端又はＮ末端の１、２、３、４、５、６、７、８、９、又は１０個の残基は、切り詰め又は除去され得る。

【００５８】

ＨＬＡの状況における標的ペプチドの認識が有効性のために必要とされるが、安全性の目的のため、一部の実施形態において、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１によって提示される場合に構造的に類似のペプチドとの、又は他のアロタイプのＨＬＡ分子との交差反応性をＴＣＲが欠くことが好ましい。本明細書に記載の例示的ＴＣＲの交差反応性及びアロ反応性は実施例で提供される。したがって、例示的ＴＣＲは、腫瘍細胞上で発現される、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１の状況におけるＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドを認識し、且つ腫瘍細胞に対してＴＣＲを組換えで発現するＴ細胞を活性化することができるだけでなく、組換えＴ細胞に、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１又は正常組織に発現される他のＨＬＡ分子の状況においてペプチドを提示した場合に、活性化できないか、又は活性化が極めてわずかとなる。

【００５９】

本発明の更なる実施形態は、本明細書に記載のＴＣＲα可変ドメイン、ＴＣＲβ可変ドメイン、又はＴＣＲα可変ドメインとＴＣＲβ可変ドメインをコードする核酸を含む。特定の実施形態において、核酸は、表２に記載のα又はβ可変ドメインの１つ又は複数をコードする。特定の実施形態において、核酸は、ＴＣＲ１、ＴＣＲ２、ＴＣＲ３、ＴＣＲ４、ＴＣＲ５、ＴＣＲ６、ＴＣＲ７、ＴＣＲ８、ＴＣＲ９、ＴＣＲ１０、又はＴＣＲ１１の、α可変ドメインとβ可変ドメインの両方をコードする。好ましい実施形態において、ＴＣＲα鎖可変ドメイン、ＴＣＲβ鎖可変ドメイン、又はＴＣＲα鎖可変ドメインとβ鎖可変ドメインをコードする核酸は、発現ベクターであり、ＴＣＲα鎖可変ドメイン、ＴＣＲβ鎖可変ドメイン、又はＴＣＲα鎖可変ドメインとβ鎖可変ドメインは、プロモーターに作動可能に連結される。

【００６０】
ＴＣＲα可変ドメイン及びβ可変ドメインは、同じプロモーターから共転写され得る。α可変ドメイン及びβ可変ドメインが融合タンパク質内に連結される実施形態に関しては、ドメインは、単一ポリペプチド内に同時翻訳され得る。αドメイン及びβドメインが別々のポリペプチド内にある実施形態において、発現ベクター内のα可変ドメインコード領域とβ可変ドメインコード領域の間に内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）を含ませることは有用である。
【００６１】
本明細書に記載のＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、又はＴＣＲα鎖とＴＣＲβ鎖をコードする核酸も、本明細書において提供される。特定の実施形態において、核酸は、表１に記載のα鎖又はβ鎖のうちの１つ又は複数をコードする。コードされるα鎖又はβ鎖は、完全長又は成熟型であり得る。成熟型である場合、つまり、そのα鎖又はβ鎖を伴う天然リーダー配列を欠く場合、シグナル又はリーダー配列をコードする核酸は、翻訳される際にリーダー配列が、小胞体に対してα鎖又はβ鎖を方向付けるように、α鎖又はβ鎖をコードする核酸に作動可能に連結されることが好ましい。
【００６２】
特定の実施形態において、核酸は、ＴＣＲ１、ＴＣＲ２、ＴＣＲ３、ＴＣＲ４、ＴＣＲ５、ＴＣＲ６、ＴＣＲ７、ＴＣＲ８、ＴＣＲ９、ＴＣＲ１０、又はＴＣＲ１１のα鎖及びβ鎖の両方をコードする。好ましい実施形態において、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、又はＴＣＲα鎖及びβ鎖をコードする核酸は、発現ベクターであり、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、又はＴＣＲα鎖及びβ鎖がプロモーターに作動可能に連結される。
【００６３】
ＴＣＲα鎖及びβ鎖は、同じプロモーターから共転写され得る。かかる実施形態において、発現ベクター内のα鎖コード領域とβ鎖コード領域の間に内部リボソーム侵入部位（ＩＲＥＳ）を含ませることは有用である。
【００６４】
本発明の発現ベクターとしては、限定されないが、レトロウイルス又はレンチウイルスベクターが挙げられる。発現ベクターはさらに、ＴＣＲα鎖及び／又はβ鎖の他に、１種又は複数種の更なるタンパク質をコードし得る。特定の実施形態において、発現ベクターは１種又は複数種のサイトカインをコードする。好ましい実施形態において、サイトカインは、その組合せと共に、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、又はＩＬ－２１などのＴ細胞成長因子である。サイトカインは全身作用を有し得て、養子細胞療法のための細胞を産生するためにサイトカインをコードする発現ベクターを使用する場合、サイトカイン発現は、誘導性プロモーターによって制御されることが好ましい。特定の実施形態において、プロモーターは、最小ＩＬ－２プロモーターに連結される６つのＮＦＡＴ（活性化Ｔ細胞の核因子）応答エレメントを含有する複合プロモーターであり、サイトカインは、ＩＬ－１２又はそのバリアントである。ＩＬ－１２を発現させるための、最小ＩＬ－２プロモーターに連結される６つのＮＦＡＴ（活性化Ｔ細胞の核因子）応答エレメントを含有する複合プロモーターの使用は、米国特許第８，５５６，８８２号明細書に記載されている。
【００６５】
本明細書に記載の例示的ＴＣＲを組換えで発現する細胞が、本明細書において提供される。前記組換え細胞は、ＴＣＲα鎖、ＴＣＲβ鎖、ＴＣＲα鎖及びβ鎖、ＴＣＲα可変ドメイン、ＴＣＲβ可変ドメイン、又はＴＣＲα及びβ可変ドメインをコードし、且つ発現する１種又は複数種の発現ベクターを含み得る。好ましい実施形態において、細胞は、ＴＣＲ１、ＴＣＲ２、ＴＣＲ３、ＴＣＲ４、ＴＣＲ５、ＴＣＲ６、ＴＣＲ７、ＴＣＲ８、ＴＣＲ９、ＴＣＲ１０、又はＴＣＲ１１を組換え発現する。特定の実施形態において、細胞はさらに、１種又は複数種の組換えサイトカインを発現する。好ましい実施形態において、サイトカインは、ＩＬ－１２又はそのバリアントであり、前記発現は、誘導性プロモーター、例えばＮＦＡＴ駆動プロモーターによって制御される。

【００６６】
特定の実施形態において、細胞は、癌患者から採取した試料から得られる。Ｔ細胞、ＮＫＴ又はＮＫ細胞などの細胞が試料から単離され、拡大される。特定の実施形態において、前駆細胞が単離され、所望の細胞タイプに成熟される。細胞は、いずれかの更なるポリペプチド、例えばＩＬ－１２又はそのバリアントと共にＴＣＲの成分をコードする、１種又は複数種のベクター、例えばレンチウイルスベクターでトランスフェクト／形質転換される。かかる細胞は、それらが由来する癌患者のための養子細胞療法に使用され得る。
【００６７】
他の実施形態において、細胞系は、可溶性ＴＣＲを組換え発現する。可溶性ＴＣＲは、ｓｃＦｖなどの抗ＣＤ３抗原結合性タンパク質との融合タンパク質であり得る。
【００６８】
疾患又は障害と関連する細胞が、ＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４を発現する、疾患又は障害を治療する方法が本明細書において提供される。好ましい実施形態において、細胞は、ＨＬＡクラスＩ分子、好ましくはＨＬＡ－Ａ２、特にＨＬＡ－Ａ＊０２：０１の状況においてＭＡＧＥ－Ｂ２由来ペプチドＧＶＹＤＧＥＥＨＳＶ及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドＧＶＹＤＧＲＥＨＴＶを提示する。本発明の可溶性ＴＣＲ又は組換え細胞で治療され得る例示的疾患又は障害としては、血液学的又は固形腫瘍が挙げられる。かかる疾患及び障害としては、限定されないが、肺癌、卵巣癌、扁平上皮細胞肺癌、黒色腫、乳癌、胃癌、精巣癌、頭頸部癌、子宮癌、食道癌、膀胱癌、及び子宮頸癌が挙げられる。好ましい疾患及び障害としては、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）、膀胱癌、食道癌、又は卵巣癌が挙げられる。
【００６９】
特定の治療では、腫瘍のバイオプシーが、ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４の発現について試験される。腫瘍は、ＭＡＧＥ－Ｂ２－又はＭＡＧＥ－Ａ４由来ペプチドを提示した場合に、本発明のＴＣＲによって認識される適切なＨＬＡ分子の発現に関しても試験され得る。その腫瘍がＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４を発現し、且つ適切なＨＬＡハプロタイプである患者は、本発明の可溶性ＴＣＲ又は組換え細胞が投与され得る。
【００７０】
本明細書における種々の実施形態は、種々の状況下にて「含む」の文言を用いて表されるが、関連する実施形態は、「からなる」又は「から本質的になる」を用いても説明され得ると理解すべきである。本開示は、その特徴「からなる」又は「から本質的になる」実施形態を包含するように、特徴を「含む」と記述される実施形態を企図する。「１つ（ａ）」又は「１つ（ａｎ）」という用語は、１つ又は複数を意味し；その用語「１つ（ａ）」（又は「１つ（ａｎ）」）、「１つ又は複数」及び「少なくとも１つ」は、本明細書において区別なく使用することができる。「又は」という用語は、特に内容で明確に必要とされない限り、代替で、又は共に、項目を包含すると理解すべきである。「及び／又は」という用語は、リストにおける各項目（個々に）、リストのアイテムの組合せ、及びリストのすべてのアイテムを合わせて、包含すると理解すべきである。本明細書において使用される「～あり得る」又は「～できる」とは、提供される主題の一部として機能的であり、利用可能な、本発明者らにより考えられた何かを表す。
【００７１】
本出願で使用される専門用語は当技術分野内で標準的であり、特定の用語の定義は、特許請求の範囲の意味に明確性及び確定性を保証するために、本明細書において提供される。単位、接頭辞、及び記号は、そのＳＩ容認形で表され得る。本明細書に記載の数値範囲は、範囲を定義する数を包含し、且つ定義される範囲内の各整数を含み、補完する。本明細書に記載の方法及び技術は一般に、当技術分野でよく知られている従来の方法に従って、且つ別段の指定がない限り、本明細書全体を通して記載及び論述される、様々な一般的及びより具体的な参考文献に記載のように実施される。限定されないが、特許、特許出願、記事、本、及び学術論文などの本出願に記載のすべての文書、又は文書の一部は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

【００７２】
本発明の更なる特徴及び変形形態は、図面及び詳細な説明を含む、本出願の全体から当業者には明らかであり、かかるすべての特徴は本発明の態様として意図される。同様に、本明細書に記載の本発明の特徴は、特徴の組合せが本発明の態様又は実施形態として指定されているか否かに関わらず、本発明の態様としても意図される更なる実施形態へと再結合することができる。たとえ特徴の組合せが、この文書の同じセンテンス、又はパラグラフ、又はセクションに共に見出されないとしても、文書全体が、統合された開示内容に関連することが意図され、本明細書に記載の特徴のすべての組合せ（別々のセクションに記載の場合でさえ）が企図されることを理解すべきである。また、本発明にとって重要であると本明細書に記載のかかる制限のみが、それ自体としてみなされるべきであり；重要であると本明細書に記載されていない限定がない本発明の変形形態は、本発明の態様として意図される。
【００７３】
本発明は、本発明の個々の態様の単一の例証として意図される、本明細書に記載の具体的な実施形態によって範囲に制限されず、機能的に等しい方法及び成分は本発明の範囲内にある。実際に、本明細書に示され、記述される形態に加えて、本発明の様々な修正形態は、上述の説明及び添付の図面から当業者には明らかとなるだろう。かかる修正形態は、添付の特許請求の範囲の範囲内にあることが意図される。
【実施例】
【００７４】
以下の実施例、実際の実施例及び予測的な実施例の両方が、本発明の具体的な実施形態又は特徴を例証する目的のために提供され、その範囲を制限することを意図するものではない。
【００７５】
実施例１－ＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２は、非常に制限された正常組織発現を有し、広範囲の固形腫瘍にわたって発現される
癌ゲノムアトラス（ＴＣＧＡ）及び出願人のデータから、ＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡが、広範囲の固形腫瘍にわたって高い有病率を有することが実証されている（図１Ａ）。重要なことには、出願人の内部ボディマップのデータによって、免疫特権部位である精巣を除いて、ＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡの非常に制限された正常組織発現を示す（図１Ｂ）。扁平上皮非小細胞肺癌（扁平上皮非小細胞肺癌又は肺扁平上皮癌）におけるＭＡＧＥ－Ａ４　ＩＨＣデータから、腫瘍内で、ＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質が、腫瘍細胞の大部分（６０～１００％）で発現され、ストローマ細胞においてはそうではないことが示される（図１Ｃ）。同様に、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＩＳＨデータから、腫瘍内でＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡがＮＳＣＬＣ腫瘍細胞の大部分（＞５０％）で発現され、ストローマ細胞ではそうではないことが分かる（データは示されていない）。
【００７６】
さらに、ｐＭＨＣ標的として、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１でのＭＡＧＥ－Ｂ２及びＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドの提示は、質量分析法（ＭＳ）によって確認された。種々の腫瘍及び正常組織（Ｉｍｍａｔｉｃｓ，Ｔｕｅｂｉｎｇｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド－ＭＨＣ（ＧＶＹＤＧＥＥＨＳＶ／ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１）発現が、腫瘍に対して非常に特異的であり、正常な健康な組織において検出されないことが実証された（図２Ａ）。ＭＳによって測定される代表的な癌タイプにおけるＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ頻度を表（図２Ｂ）に示す。ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドＧＶＹＤＧＥＥＨＳＶ（配列番号１）は、ＭＡＧＥ－Ｂ２タンパク質のアミノ酸残基２３１～２４０に相当する。さらに、院内ＭＳデータから、扁平上皮ＮＳＣＬＣ腫瘍におけるＭＡＧＥ－Ａ４　ｐＭＨＣ発現が確認される（データは示されていない）。ＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドＧＶＹＤＧＲＥＨＴＶ（配列番号２）は、ＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質のアミノ酸残基２３０～２３９に相当する。
【００７７】
ＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２は、広範囲の癌タイプにおいて発現される。ＭＡＧ

Ｅ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４　ｐＭＨＣ発現（ＭＡＧＥ－Ｂ２／Ａ４－ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１）を有する固形腫瘍の適応症としては、限定されないが、肺扁平上皮癌（扁平上皮非小細胞肺癌、ＬＵＳＣ）の１６．２～２２．７％、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）の９．２～１５．８％、食道癌腫６．２～１１．１％、膀胱癌４．７～１０．４％、及び卵巣癌２．１～７．８％（図３）が挙げられる。指定の癌適応症における癌母集団は、米国の母集団における１年当たりの新たな事例（新たな患者数）を掛けたｐＭＨＣ標的頻度（％）に基づいて推定された。ｐＭＨＣ標的頻度（％）は、米国におけるＨＬＡ－Ａ＊０２：０１キャリア頻度を掛けたＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４　ｍＲＮＡ発現頻度によって計算された（０．４１）。対象の腫瘍からのＲＮＡｓｅｑのＴＣＧＡ公的データセットを使用して、（１）ＭＡＧＥ－Ｂ２＞＝１ＦＰＫＭ及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４＞＝１０ＦＰＫＭ或いは（２）ＭＡＧＥ－Ｂ２＞＝５ＦＰＫＭ及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４＞＝５０ＦＰＫＭの閾値にて、各腫瘍適応症におけるＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４　ｍＲＮＡ発現頻度を推定した（図３）。ＭＡＧＥ－Ｂ２及びＭＡＧＥ－Ａ４標的の両方にポジティブな患者は２回カウントされなかった。ＳＥＥＲ，ＥＰＩＣ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｎｅｗ　Ｐａｔｉｅｎｔｓ又はＥｐｉｐｈａｎｙ／Ｅｐｉｃ　ｉｎ　２０２０を用いて、選択された腫瘍適応症における疾患発生数（１年当たりの新たな事例）を推定し、したがって、推定される治療可能な患者の母集団範囲を導いた（図３）。ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１は、米国において最も一般的なＭＨＣクラスＩ対立遺伝子の１つである。米国の母集団においてのＨＬＡ－Ａ＊０２：０１ハプロタイプ（キャリア）頻度推定値は０．４１である（ｗｗｗ．ａｌｌｅｌｅｆｒｅｑｕｅｎｃｉｅｓ．ｎｅｔ）。米国の患者母集団は、ＭＡＧＥ－Ａ４及びＭＡＧＥ－Ｂ２の両方がカバーされる場合に、ＭＡＧＥ－Ｂ２単独と比較して２倍になる。最大の患者母集団は、扁平上皮非小細胞肺癌、続いてＨＮＳＣＣ、膀胱癌、食道癌、及び卵巣癌における母集団である（図３）。

【００７８】

実施例２－ＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲの同定

リード臨床ＴＣＲ候補を同定及び選択するプロセスを以下に示す。最初に、生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）の刺激及びｓｃＲＮＡｓｅｑに基づくＴＣＲ発見プラットフォームを使用し、健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナー５２名を用いて、４０のドミナントＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲを同定した。ジャーカット活性化アッセイを用いて、１１のＴＣＲ候補を４０のＴＣＲから選択した。これらの１１のＴＣＲ配列に基づいて、個々のＴＣＲを保持するレンチウイルスを用いて、ドナー３名から単離された初期ｐａｎ－Ｔ細胞を形質導入することによって、ドナー１名につき１１のＴＣＲ－Ｔ細胞を産生した。それらのＴＣＲ－Ｔ細胞はさらに、標的ペプチドでパルスされたＴ２細胞系、及び複数（約２０）の癌細胞系での効力（細胞障害性）試験、類似のペプチドを用いた交差反応性スクリーン、及び初期アロ反応性スクリーンなどの、様々な機能アッセイによって評価された。機能データに基づいて、本発明者らは、１１のＴＣＲから上位４つのＴＣＲ候補に絞った。生体内有効性をさらに高め、臨床用量を低減するために、ＩＬ１２ペイロード発現が、ＮＦＡＴ応答駆動プロモーター下でのＴＣＲ活性化によって誘発されるＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２レンチウイルス構築物において、上位４つのＴＣＲを製造した。したがって、ＴＣＲ－Ｔ細胞が腫瘍におけるｐＭＨＣ標的（ＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４）に結合する場合にのみ、ＩＬ１２が産生され得る。３名のドナーから産生されたＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞はさらに、標的ペプチドでパルスされたＴ２細胞系、及び複数（約４０）の癌細胞系での効力試験、フルパネルの類似ペプチドを用いた交差反応性、正常細胞の細胞障害性スクリーン、及び完全アロ反応性スクリーンなどの、様々な機能アッセイによって評価された。これらの評価からのすべてのデータに基づいて、本発明者らは、１つのリード臨床ＴＣＲ候補を選択した。

【００７９】

ＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲは、健康なドナーＰＢＭＣから単離されたレアなＴ細胞クローンから同定され得る

腫瘍抗原特異的ＴＣＲの同定における難しさによって、ＴＣＲ仲介免疫療法の開発が阻

まれている。これらの難題にも関わらず、本発明者らは、腫瘍抗原ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲが、健康なドナーＰＢＭＣから単離されたレアなＴ細胞クローンから、それによって同定され得る、ＴＣＲ発見プラットフォームを開発することに成功した（図４Ａ）。健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナーからのＰＢＭＣにおけるＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ反応性Ｔ細胞の頻度は、非常に低く、一般に約０％デキストラマー＋Ｔ細胞であった。ＤＥＸＴＲＡＭＥＲ（登録商標）（Ｄｅｘ）は、ＴＣＲに特異的に結合し得るペプチド－ＭＨＣ複合体の多量体であり、したがって、抗原（ｐＭＨＣ）特異的Ｔ細胞を単離するために使用することができる。最初に、レアな腫瘍抗原特異的Ｔクローンを拡大するために、本発明者らは、５２の健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナーのＰＢＭＣを使用して、Ｔ細胞及び自己抗原提示細胞（ＡＰＣ）、例えば単球由来樹状細胞及び活性化Ｂ細胞を単離した。標的ペプチドでパルスされた自己ＡＰＣとＴ細胞を共培養すると、これらのＴ細胞は、生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）の刺激の複数の段階を通過し、腫瘍抗原ｐＭＨＣ特異的プライミング、再刺激、及びｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞の拡大が起こる。複数の抗原再刺激後に、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣデキストラマー＋（Ｄｅｘ＋）Ｔ細胞（ＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ反応性Ｔ細胞）の母集団が検出された。抗原再刺激の２～４ラウンド後に、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞集団がよりエンリッチされ、デキストラマー－ＰＥ株とデキストラマー－ＡＰＣ株の両方によって確認された（図４Ｂ）。次いで、Ｄｅｘ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞を単細胞ＲＮＡｓｅｑに対して選別し、ＴＣＲα及びＴＣＲβ鎖の配列を同定した。同定された代表的なＴＣＲのＴＣＲα及びＴＣＲβ配列に相当する配列番号を表１に示す。さらに、それらの選別されたＤｅｘ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞を、ペプチド負荷Ｔ２細胞を用いたＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって、ＭＡＧＥ－Ｂ２抗原特異的活性化に関してバリデートした（図４Ｃ）。このＴＣＲ発見プラットフォームによって、５２名の健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナーからの４０のドミナントＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲが同定された。重要なことには、健康なドナーの血液から同定されたＴＣＲは、ヒトの体内で（胸腺の髄質において）胸腺自然淘汰を通じて、親和性増強ＴＣＲ又は二重特異性抗体と異なり、自己反応性ＴＣＲを排除している。したがって、ＴＣＲに対するオフターゲットのリスクはかなり低いと考えられ、安全性評価アッセイによってそれが確認された（以下に記述される）。

【００８０】

上位のＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲ－Ｔ細胞の選択

５２名の健康なＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ドナーのスクリーンから同定された４０のドミナントＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲから、ジャーカット活性化アッセイによって１１のＴＣＲ候補が選択された（図５）。個々のＴＣＲを保有するレンチウイルスが、ＮＦＡＴ応答駆動プロモーター下でのＴＣＲ活性化によって制御される、構成的にＣＤ８ａ及びウミシイタケルシフェラーゼを発現する、ジャーカットＴＣＲＫＯレポーター細胞系に形質導入された。個々のＴＣＲの活性は、賦形剤のみを有するＴ２細胞と比較して、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドが負荷されたＴ２細胞の存在下でのルシフェラーゼ活性の倍率変化として測定された（図５）。

【００８１】

これら１１の選択されたＴＣＲ配列に基づいて、ドナー３名から単離されたヒト初期ｐａｎ－Ｔ細胞に個々のＴＣＲを保有するレンチウイルスを形質導入することによって、ドナー１名につき１１のＴＣＲ－Ｔ細胞系が作成された。それらのＴＣＲ－Ｔ細胞はさらに、種々の機能活性によって評価された。最初に、各ＴＣＲ－Ｔの効力が、ペプチド滴定及びＥ：Ｔ（エフェクター：標的細胞比）滴定アッセイなどのＴ２／ペプチド細胞障害性アッセイ（ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド）を用いて評価された（図６Ａ～６Ｃ）。Ｔ２は、抗原プロセッシングと関連するトランスポーター（ＴＡＰ）が欠損しており、且つＨＬＡ－Ａ＊０２を発現する細胞系であるため、ＭＨＣクラスＩ－制限内因性ペプチドはＥＲに入ることができず、Ｔ２細胞系は主に外因性ペプチドを提示する。したがって、Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイ（対象のペプチドによって付加されたＴ２細胞系を用いた、細胞溶解活性測定）を用いて、Ｔ細胞のＴＣＲによってペプチド（例えば、ＨＬＡ－Ａ＊０２：

０１－制限）の特異的認識を研究した。Ｔ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドに対する２つのＴＣＲ、ＴＣＲ２－Ｔ及びＴＣＲ４－Ｔの効力は非常に類似していた（図６Ａ～６Ｃ）。重要なことには、ＴＣＲ３－Ｔ及びＴＣＲ４－Ｔは、上述のように広範囲の固形腫瘍における高い有病率を有する癌精巣抗原でもある、ＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドに対して交差反応性でもあった。ＴＣＲ４－Ｔは、ＴＣＲ３－Ｔと比べてＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドに対してかなり高い効力を示した。さらに、複数の（約２０）ＭＡＧＥ－Ｂ２＋及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する細胞障害性が評価された。ＳＫ－ＭＥＬ－５系に対する代表的な細胞障害性を図６Ｄに示す。例示的ＴＣＲ－Ｔは、約１．４ＦＰＫＭと低いＭＡＧＥ－Ｂ２発現又は約０．２５と低いＥ：ＴＥＣ５０を有する癌細胞系に対して強力な細胞死活性を表した。

【００８２】

オフターゲット選択性を評価するために、１３１の相同性ベースの類似ペプチド及び標的ネガティブ癌系を用いて、Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイによって、ＴＣＲ－Ｔ細胞を調べた。代表的なデータを図６Ｅに示す。オフターゲット戦略及び類似のペプチドの同定の詳細を以下に記述する。

【００８３】

初期のアロ反応性について、米国母集団において、上位５つの最も高頻度の非ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１対立遺伝子を表す５のＢリンパ芽球様細胞系（ＢＬＣＬ）との共培養でＴＣＲ－Ｔを試験した（例えば、ＨＬＡ－Ａ＊０１：０１、ＨＬＡ－Ａ＊０３：０１、ＨＬＡ－Ａ＊１１：０１、ＨＬＡ－Ａ＊２４：０２、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０７）。ＩＦＮγ及びグランザイムＢの産生を、初期アロ反応性の読み取り値（ｒｅａｄｏｕｔ）として使用した。アロ反応性の詳細を以下に記述する。

【００８４】

（１）Ｔ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド、Ｔ２／ＭＡＧＥ－Ａ４ペプチド及び約２０のＭＡＧＥ－Ｂ２＋及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系を用いた、ＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４　ｐＭＨＣ標的に対する強力な細胞障害性、（２）１３１の相同性ベースの類似ペプチド及び標的ネガティブな癌細胞系に対する交差反応性を示さないオフターゲット選択性、（３）初期のアロ反応性なし、及び（４）製造性（例えば、優れたＴＣＲ形質導入効率）などの様々な機能性研究に基づいて、１１のＴＣＲから、上位４つのＴＣＲ（ＴＣＲ１、ＴＣＲ２、ＴＣＲ３、ＴＣＲ４）を選択した。

【００８５】

実施例３－ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の効力バリデーション

ＩＬ１２ペイロード発現が、ＮＦＡＴ応答駆動プロモーター下でのＴＣＲ活性化によって調節されるＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２レンチウイルス構築物において、上述の様々な機能性アッセイによって選択された上位４つのＴＣＲをさらに製造した（図７）。したがって、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞が腫瘍におけるｐＭＨＣ標的（ＭＡＧＥ－Ｂ２及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４）に結合する場合に、ＴＣＲシグナル伝達でＩＬ１２が産生される。３名のドナーを用いて産生されたＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞はさらに、様々な機能アッセイによって評価された。最初に、Ｔ２／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド細胞障害性アッセイを用いて、効力バリデーションを行った（図８）。４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２の効力順位は、親のＴＣＲ－Ｔ（ＩＬ１２なし）の効力と同じままである。ＴＣＲ２－ＩＬ１２は、最も高い効力を示し、続いてＴＣＲ４－ＩＬ１２、ＴＣＲ３－ＩＬ１２、次にＴＣＲ１－ＩＬ１２が最も低かった。４つすべてのＴＣＲ－ＩＬ１２細胞が、Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイによるＥＣ９０　10^{-8}Ｍ（ペプチド濃度）で効力基準を満たした。

【００８６】

実施例４－ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド負荷Ｔ２細胞とＭＡＧＥ－Ａ４ペプチド負荷Ｔ２細胞の両方に対するＴＣＲ４－ＩＬ１２の強力な細胞障害性

注目すべきことには、ＴＣＲ４－ＩＬ１２は、Ｔ２／ペプチド細胞障害性アッセイにおいて高い効力を有するＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドＭＨＣも認識することができる（図９）。このＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２に対するＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドとＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドと

の効力ギャップは、ＥＣ５０でわずか２．５倍であり、ＥＣ９０において約７倍であった。異なるドナー３名からの効力データから、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド及びＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドに対する効力がかなり似ていることが示された（図９のグラフ）。重要なことには、ＴＣＲ４－ＩＬ１２は、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド及びＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドの両方に関して、ＥＣ９０　10^{-8}Ｍ（ペプチド濃度）で効力基準を満たした。

【００８７】

実施例５－ＭＡＧＥ－Ｂ２＋及び／又はＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する細胞障害性

ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４－、ＭＡＧＥ－Ｂ２－ＭＡＧＥ－Ａ４＋、及びＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系などの３つの異なるカテゴリーの癌細胞系を用いて、４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２の効力（細胞障害性）をバリデートした。最初に、ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４－癌細胞系を用いて、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２の効力を評価した（図１０）。４つすべてのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２が、約１．４ＦＰＫＭと低いＭＡＧＥ－Ｂ２発現を有する癌細胞系に対して強力な細胞障害性を示した。ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４－癌細胞系に対する効力順位付けアッセイにおいて、ＴＣＲ２は最も強力なＴＣＲであり、次にＴＣＲ４、次いでＴＣＲ１及びＴＣＲ３がほぼ同じであった。ＴＣＲ２－ＩＬ１２及びＴＣＲ４－ＩＬ１２は、それぞれ約０．０７及び０．２１、と低いＥ：ＴＥＣ５０にて細胞障害性を示した。ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２は、８５０５Ｃ（約１．４ＦＰＫＭ）及びＡＵ５６５ＨＬＡ－Ａ２ｈｉ（約３．７ＦＰＫＭ）などのＭＡＧＥ－Ｂ２低癌細胞系にでさえ高い効力を示した。これらのＭＡＧＥ－Ｂ２低癌細胞系に対する標的特異的細胞死は、これらの低癌細胞系から産生されたＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ細胞系によって検証された（以下に記述される）。

【００８８】

第２に、Ｔ２／ペプチドアッセイから、ＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドに対するこのＴＣＲの交差反応性を考慮して、ＭＡＧＥ－Ａ４＋ＭＡＧＥ－Ｂ２－癌細胞系に対するＴＣＲ４－ＩＬ１２の効力が評価された（図１１）。ＴＣＲ４－ＩＬ１２は、約６．３ＦＰＫＭと低いＭＡＧＥ－Ａ４発現、又は約０．４６と低いＥ：ＴＥＣ５０を有する癌細胞系に対する細胞障害性を示した。

【００８９】

第３に、ダブルポジティブ、ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する効力が評価された（図１２）。ＴＣＲ４－ＩＬ１２及びＴＣＲ２－ＩＬ１２は、ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する強力な細胞障害性を示した。ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する効力順位付けにおいて、ＴＣＲ４が最も強力なＴＣＲであり、続いてＴＣＲ２、次いでＴＣＲ３及びＴＣＲ１はほぼ同じであった。注目すべきことには、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド及びＭＡＧＥ－Ａ４ペプチドの両方に対する高い効力のために、ＴＣＲ４－ＩＬ１２は、ダブルポジティブＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋癌細胞系に対する最も高い効力を示した。特に、ＴＣＲ２は、ＭＡＧＥ－Ａ４交差反応性なく、ＭＡＧＥ－Ｂ２特異性のみを有するため、一部のＭＡＧＥ－Ｂ２－低ＭＡＧＥ－Ａ４－高癌細胞系（例えば、Ａ３７５）は、ＴＣＲ４とＴＣＲ２の効力を区別することができる。ＴＣＲ４－ＩＬ１２から、約１．２ＦＰＫＭと低いＭＡＧＥ－Ｂ２発現又は約４４ＦＰＫＭと低いＭＡＧＥ－Ａ４発現、又は０．０４と低いＥ：ＴＥＣ５０を有するダブルポジティブ癌細胞系に対する細胞障害性が実証された。ＴＣＲ２－ＩＬ１２は、約３．５ＦＰＫＭと低いＭＡＧＥ－Ｂ２発現又は０．０１と低いＥ：ＴＥＣ５０を有する細胞系に対する細胞障害性を示した。

【００９０】

４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の代表的な癌細胞系効力データを図１３に示す。ドナー２～３名から産生された４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞で約４０の癌細胞系を試験した。ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞から、低Ｅ：Ｔ　ＥＣ５０を有する一部の癌細胞系に対する強力な細胞障害性が実証された。例えば、癌細胞系に対するＴＣＲ４－ＩＬ１２のＥ：Ｔ　ＥＣ５０は、Ｂ－ＣＰＡＰに対して０．２１、ＳＫ－ＭＥＬ－５に対して０．２５、ＴＨＰ－１に対して０．９８及びＮＣＩ－Ｈ１７５５に対して０．２５であった。

【００９１】
実施例６－ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ及びＢ２Ｍ　ＫＯ癌細胞系によるペプチド－ＭＨＣ標的特異的細胞障害性バリデーション
　ＭＡＧＥ－Ｂ２の非常に低い発現を有する、複数のＭＡＧＥ－Ｂ２＋癌系統に対するＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２の強力な細胞障害性が確認され、この細胞障害性がｐＭＨＣ標的発現に依存するか否かを決定した。したがって、本発明者らは、発現ＭＡＧＥ－Ｂ２及びＢ２Ｍそれぞれを排除するために、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ（ノックアウト）細胞系及びＢ２ＭＫＯ細胞系を作成した（図１４Ａ及び１４Ｂ）。Ｂ２Ｍ（β２ミクログロブリン）は、ＭＨＣクラスＩ分子の重要なサブユニットである。ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＫＯ及びＢ２Ｍ　ＫＯの両方によって、ＴＣＲ２－ＩＬ１２又はＴＣＲ４－ＩＬ１２のいずれかによる細胞死活性が減少する結果となった。著しくは、非常に低いＭＡＧＥ－Ｂ２　ｍＲＮＡ発現（１．４ＦＰＫＭ）を有する８５０５Ｃ癌細胞系においてＭＡＧＥ－Ｂ２をＫＯ（ノックアウト）すると、両方のＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞が細胞死能力を失い、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の細胞溶解活性がＭＡＧＥ－Ｂ２標的発現に依存し、且つＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２が、標的のかかる低い発現を真に認識することができることを表す（図１４Ｂ）。同様に、細胞障害性の減少は、Ｂ２Ｍ　ＫＯ系で見られ、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２活性がＨＬＡ発現に応答することが実証されている。
【００９２】
実施例７－ＴＣＲ－Ｔ効力に対するＩＬ１２ペイロードの作用
　Ｂ１６Ｆ１０－ｈｕＥｐＣＡＭ同系マウス腫瘍モデルにおいて、ＩＬ１２ペイロードを含む、又は含まないＨｕＥｐＣＡＭ　ＣＡＲ－Ｔ細胞を評価した。このマウスの研究から、ＩＬ１２ペイロードが生体内でＴ細胞有効性を高め、潜在的な臨床用量を低減し得ることが実証されている（図１５Ｂ）。
【００９３】
　次に、本発明者らは、複数の癌細胞系を有するヒトＴＣＲ－ＴシステムにおけるｉＬ１２ペイロードの作用を評価した。特にＭＡＧＥ－Ｂ２－低癌細胞系（波線四角内に示す）について、ＩＬ１２ペイロードは、ＩＬ１２なしの親ＴＣＲ－Ｔと比較して、ＴＣＲ－Ｔ細胞効力を増加し得る（図１５Ａ）。ＭＡＧＥ－Ｂ２－高又はＭＡＧＥ－Ａ４－高癌細胞系（波線四角外に示す）に関しては、親ＴＣＲ－Ｔによって効力が既に最大限度に到達したため、それらの癌細胞系に関してＩＬ１２の効果はあまりなかった。
【００９４】
実施例８－非臨床的安全性評価の概要
　ヒト特異的ＨＬＡ標的が動物モデルの使用を妨げるため、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞に対して広範な生体外（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）及び生体外（ｅｘ　ｖｉｖｏ）安全性評価を実施した。最初に、上述される、正常なヒト組織並びに腫瘍組織を使用して、ＲＮＡＳｅｑ、ＩＨＣ、及び質量分析などの様々なアッセイによって、標的発現を評価した。ＭＡＧＥ－Ｂ２及びＭＡＧＥ－Ａ４が癌精巣抗原であるため、非常に限定された正常組織発現（精巣でのみ発現された）が研究から示された。第２に、オフターゲット反応性が評価され、２つの異なる戦略を用いて評価された。第１の戦略は、主要な臓器に代表的な様々な正常なヒト初代細胞タイプに対する細胞障害性の評価を含んだ。第２の戦略は、各ＴＣＲに固有の推定の交差反応性ペプチドを同定するためのポジショナルスキャン（Ｘスキャン）ベースの戦略と共に、ＭＡＧＥ－Ｂ２標的ペプチドにマッチする配列相同性に基づく類似ペプチドのパネルを同定することを含んだ。類似ペプチドのこのパネルに対する潜在的な交差反応性を評価するために、Ｔ２／ペプチドＴＥＣＣアッセイが行われた。第３の安全性評価はアロ反応性であり、３８ＨＬＡ－Ａ、４０ＨＬＡ－Ｂ及び２４ＨＬＡ－Ｃ対立遺伝子を含む、米国母集団における高頻度のＨＬＡクラスＩ対立遺伝子を表す３４のＢＬＣＬを評価した。
【００９５】
相同性に基づく類似ペプチドの同定
　オフターゲット反応性を評価するために、標的ペプチド又はＸスキャン誘導モチーフに

対するいずれかの配列相同性に基づいて、２つの異なる戦略を用いて、ＭＡＧＥ－Ｂ２標的ペプチドに対する類似ペプチドのフルパネルを同定した。

【００９６】

相同性に基づく戦略は、候補ＴＣＲ－Ｔと潜在的に交差反応し得るペプチドのリストを同定するために、イン・シリコ（ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ）アプローチを用いてデザインされた。これを達成するために、タンパク質データベース（ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ，Ｊｕｎｅ　２０１９）クエリーを最初に実施し、標的ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド（ＧＶＹＤＧＥＥＨＳＶ）に対するアミノ酸同一性マッチに基づいて、すべての可能性のある十量体ペプチドのリストを作成した。このイン・シリコクエリーは、Ｐｙｔｈｏｎスクリプトを用いて実施し、標的ペプチドに対して３０％相同性（同一性）マッチに基づく１７０，０８２ペプチドが同定された。このリストをさらに正確にするために、高い相同性マッチなどの基準、及びＮｅｔＭＨＣｐａｎソフトウェアなどのソフトウェア及びＩＥＤＢ（免疫エピトープデータベース）を利用した。ＮｅｔＭＨＣｐａｎ３．０を使用して、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１に対するペプチドの予想結合親和性を検討した。実験的に特徴付けられた免疫エピトープのマニュアルで厳選されたＩＥＤＢデータベース（Ｊｕｎｅ２０１９）を使用して、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１対立遺伝子によりプロセッシングされ、提示されるペプチドの確率を検討した。ペプチド選択に使用される具体的な基準は以下の通りであった：（１）標的ペプチド（６５ペプチド）に対して６０％以上の相同性マッチ（同一性）を有するすべてのペプチド、（２）５０％以上の相同性マッチ及び５０ｎＭ以下の予測結合親和性（ＩＣ５０）を有するすべてのペプチド（３５ペプチド）、並びに（３）ＩＥＤＢにおいて報告される標的ペプチド（ＨＬＡ０Ａ＊０２：０１対立遺伝子によって提示される）（４５ペプチド）に対して４０％以上の相同性マッチを有するすべてのペプチド。結果として、ヒトプロテオームデータベースのこの相同性に基づくイン・シリコ検索から、本発明者らは、１３１のユニークなペプチドを同定した。

【００９７】

ポジショナルスキャン（Ｘスキャン）を用いたＴＣＲ結合性モチーフ、及びＸスキャン誘導モチーフに基づく類似のペプチドの同定

類似のペプチドを同定する直交アプローチとして、本発明者らは、Ｘスキャンとして知られるポジショナルスキャン法を用いた。Ｘスキャンアッセイでは、他の１９の天然アミノ酸のうちの１つにＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドの各残基を逐次、変異導入することによって作成されるペプチドライブラリーが使用され、合計で１９０ペプチドが生じる。これらの１９０ペプチドが合成され、Ｔ２／ペプチドＴＤＣＣアッセイにおいて試験されて、それぞれ個々のＴＣＲに特異的なＸスキャン誘導モチーフが同定された（表３）。簡潔には、濃度１０μＭ又は１μＭにてこれらの各ペプチドで、Ｔ２細胞をパルスし、続いてＥ：Ｔ比１：１にてＴＣＲ－Ｔ細胞を添加した。Ｔ２／ペプチドＴＤＣＣアッセイを用いて、細胞生存率を決定した。アミノ置換は、ＴＣＲの結合（ｅｎｇａｇｅｍｅｎｔ）に必須であると定義され、確認された生存率は２０％未満であった。相当する検索モチーフを作成して、どのアミノ酸がペプチド配列（表３）における各位置で許容されるかを表した。下線のアミノ酸は、ペプチドにおける相当する位置での天然残基を表す。

【００９８】

ｐｙｔｈｏｎスクリプトを用いて、スプライスバリアントでのＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔデータベースのイン・シリコ検索（Ｊｕｎｅ　２０１９）を実施して、誘導モチーフに従うすべての十量体配列を同定した。このモチーフに基づくｂｌａｓｔ検索から、特異的ＴＣＲ－Ｔのコンセンサスモチーフに従う、ユニークなヒトペプチドマッチが同定された。

【００９９】

２つのＴＣＲ（ＴＣＲ３及びＴＣＲ２）の場合において、得られるモチーフ検索ベースのペプチドの数がかなり多い場合には、更なるアンカー残基の制限（残基２及び１０での）を誘導モチーフに適用し、最終的な交差反応性ペプチド選択を制限した（表３）。具体的には、ＩＥＤＢデータベースから得られた、２５８３の十量体ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１

ポジティブなペプチドの配列を解析して、アンカー残基位置のアミノ酸頻度を算出した。モチーフの両方のアンカー残基（残基２及び残基１０）に３％アミノ酸頻度カットオフを適用し、それによって位置２はアミノ酸Ｔ、Ｍ、Ｅ、Ｉ、Ｖ、Ｌに制限され、位置１０はアミノ酸Ｙ、Ｉ、Ａ、Ｌ、Ｖに制限された。

【０１００】

【表１４】

表 3

TCR	ポジショナルスキャンにより得られたモチーフ	コンセンサスモチーフに一致するユニークペプチドマッチ
TCR1	[GACDEFHILMNPQSTVWY][VACGILMST][YFW][DCENPW][GCLMRS][EV][ECDHKLMNPQY][HFNWY][SACDEGINPQTVW][VACFILMT]	87
TCR4	[G][VIQ][YF][DCN][G][EAFHIKLMNQRSTVWY][EACDFHILMNPQRSWY][HACDEFGIKLMNPQRSVWY][SACDEFGHIKLMNPQRTVWY][VACFGHIKLMNSTWY]	13
TCR3	[G][VILMT][YF][DCN][GAS][EACFIKLMPQRSTVY][EACDFGHIKLMNPQRSTWY][HACDEFGIKLMNPQRSTVWY][SACDEFGHIKLMNPQRTVWY][VAILY]	78
TCR2	[GA][VILMT][YFW][DCNP][GP][ECDMNQSTV][EACDFHILMNQSTWY][HACDEFGIKLMNPQRSTVWY][SACDEFGHIKLMNPQRTVWY][VAIL]	63

【０１０１】

完全パネルの類似ペプチドでの交差反応性スクリーン

完全パネルの類似ペプチド（Ｘスキャンモチーフに基づくセット及び相同性に基づくセットを含む）を合成し、Ｔ２／ペプチドＴＤＣＣアッセイにおいて調べ、オフターゲット反応性の可能性を研究した。

【０１０２】

各ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２に対して潜在的交差反応性ペプチドを同定するために、類似ペプチドの完全パネルを、高いペプチド濃度（１０μＭ又は１μＭ）でＴ２／ペプチドＴＤＣＣスクリーンを用いて試験した。ドナー３名のうち少なくとも１名において生存率２５％以下を示したペプチドは、推定の交差反応性ペプチドと見なされ、更なる効力試験のために選択された。３名の異なるドナーすべてが、ペプチド応答との良好な一致を示した。

【０１０３】

次に、上記のスクリーンから同定された推定の交差反応性ペプチドに対するＴ２／ペプチド滴定ＴＤＣＣアッセイを用いて、効力スクリーン（用量依存性スクリーン）を実施した。大部分の推定の交差反応性ペプチドは、この効力スクリーンによってリスクが低減さ

れた。標的ペプチドと推定の交差反応性ペプチドとの間のＥＣ５０の１０^{3}倍未満の効力ギャップは、更なるリスク評価のためのカットオフとしてみなされた。上位４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞に対する完全パネル類似ペプチドでの交差反応性スクリーンからの結果を図１６にまとめ、標的ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドに対して１０^{3}倍未満の効力を示す、すべてのペプチドが記載される。ＴＣＲ４－ＩＬ１２細胞は、いずれの推定交差反応性ペプチドも産生しなかった（ＭＡＧＥ－Ａ４を除いて）。他の３つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞はそれぞれ、癌精巣抗原であるＭＡＧＥ－Ｂ１を除いて、この完全パネルペプチドスクリーンから同定される１つの推定交差反応性ペプチドを有した。３つすべての推定交差反応性ペプチド（タンパク質ＳＬＣ１６Ａ１０、ＫＬＨＤＣ３、及びＮＲＸＮ１から生じる）はさらに、それぞれの完全長タンパク質を過剰発現するＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋癌細胞系又は内因性タンパク質を発現する癌細胞系を用いたＴＤＣＣアッセイによってリスク低減された（図１７）。これらの推定交差反応性タンパク質又は内因性タンパク質を過剰発現する癌細胞系に対する細胞障害性は、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２のいずれか（ＴＣＲ１、ＴＣＲ２、及びＴＣＲ３）によって確認されず、これらのペプチドが天然にプロセッシングされず、タンパク質から提示されそうにないことが示唆される（図１６及び１７）。結論として、４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞のいずれによっても、配列相同性及びＸスキャン誘導ＴＣＲモチーフによって同定される類似ペプチドの完全パネルにわたる有意な交差反応性は実証されなかった。

【０１０４】

ヒト正常細胞に対する細胞障害性の評価

次に、Ｔ細胞媒介性細胞傷害アッセイにおいて、標的細胞として働く主要な臓器（ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４発現なし）に代表的な９つの正常ヒト初期若しくはｉＰＳＣ由来細胞タイプのパネルに対して、４つのＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞（ＴＣＲ１－ＩＬ１２、ＴＣＲ２－ＩＬ１２、ＴＣＲ３－ＩＬ１２、及びＴＣＲ４－ＩＬ１２）の細胞障害性を評価した。９つの正常ヒト細胞のパネルは、気管支上皮細胞（ｈＢＥｐＣ）、気管上皮細胞（ｈＴＥｐＣ）、皮膚微小血管内皮細胞（ＨＤＭＥＣ）、ケラチノサイト、肝細胞、腎近位尿細管上皮細胞（ＲＰＴＥＣ）、ｉＰＳＣ由来星状膠細胞、心筋細胞、及びＧＡＢＡ神経細胞を含んだ（図１８）。すべての正常細胞が、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１－ポジティブなドナーから得られた（ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１発現はＲＮＡＳｅｑによって確認された）。重要なことには、これらの正常細胞は、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１に対して非常に多様なペプチドを提示し得ることから、これは、広範囲のオフターゲット効果を評価する、アッセイシステムとしての役割を果たす。ＭＡＧＥ－Ｂ２及びＨＬＡ－Ａ＊０２：０１発現を有するＢ－ＣＰＡＰ癌細胞系をポジティブコントロール標的細胞として使用した。同じドナーからの、モック（未形質導入）Ｔ細胞又はＩＬ１２－ＲＦＰ構築物を発現するＴ細胞（遺伝子導入ＴＣＲなし）が、ネガティブコントロール効果細胞として含まれた。サイトカイン（ＩＦＮγ、ＩＬ－１２ｐ７０、ＴＮＦα）及びグランザイムＢの産生、並びに標的細胞の細胞障害性（カスパーゼ３／７切断によって測定される）が、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞との共培養において評価された（図１８）。ポジティブコントロールＢ－ＣＰＡＰ細胞と共培養された場合に、４つすべてのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞が、サイトカイン産生及び標的細胞の細胞障害性を誘発した（ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋）。重要なことには、ＴＣＲ２－ＩＬ１２及びＴＣＲ４－ＩＬ１２は、試験された正常なヒト初代若しくはｉＰＳＣ由来細胞のいずれかと共培養した場合に、サイトカインの産生を仲介せず、又はカスパーゼ３／７切断を増強せず、試験された正常細胞のいずれに対してもオフターゲット反応性を示さなかった。

【０１０５】

３４のＢＬＣＬ系を用いたアロ反応性の潜在性の評価

安全性の評価の一部として、３８ＨＬＡ－Ａ、４０ＨＬＡ－Ｂ、及び２４ＨＬＡ－Ｃ対立遺伝子などの主要な米国人種グループにおける高頻度（＞１１％）ＭＨＣクラスＩ対立遺伝子を表す３４のＢＬＣＬ（Ｂリンパ芽球腫細胞系）のパネルを用いて、アロ反応性の潜在性が評価された。ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞をＢＬＣＬのそれぞれと共培養した場合

に、サイトカイン（ＩＦＮγ、ＴＮＦα、及びＩＬ－１２ｐ７０）及びグランザイムＢの産生によって、アロ反応性の潜在性を評価した。試験された３４のＢＬＣＬに対するサイトカイン又はグランザイムＢ応答の有意な増加（ＩＬ１２－ＲＦＰコントロールＴ細胞と比較して、４倍以上）は、４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞のいずれにも確認されなかった（図１９）。一部の低レベルの応答（ＩＬ１２－ＲＦＰコントロール細胞と比較して、３倍以上であるが、４倍未満）が、ＴＣＲ１－ＩＬ１２及びＴＣＲ２－ＩＬ１２に関して確認された。４つすべてのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞によって、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドでパルスされたポジティブコントロールＵ２６６Ｂ１細胞（ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋）に対して強いサイトカイン及びグランザイムＢ応答が実証された。

【０１０６】

全体的に、４つの例示的ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２候補は、実施された標準的及びアロ反応性潜在性の安全性評価に基づいて著しい安全性問題を示さなかった。

【０１０７】

上記の実施例で使用された方法及び材料

健康なドナースクリーンによるＭＡＧＥ－Ｂ２　ｐＭＨＣ特異的ＴＣＲの同定

自己抗原提示細胞（ＡＰＣ）の産生

新鮮な、又は凍結されたＨＬＡ－Ａ＊０２：０１ポジティブな健康なドナー末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）が使用された。単球は、ＰＢＭＣからヒトＣＤ１４－マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，１３０－０５０－２０１）を使用することによってポジティブに選択された。成熟樹状細胞は、ＣｅｌｌＸＶｉｖｏ（商標）ヒト単球誘導樹状細胞（ＤＣ）分化キット（Ｒ＆Ｄ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，ＣＤＫ００４）を使用して得られた。抗原提示Ｂ細胞が、ＣＤ４０Ｌ及びＩＬ－４刺激法を使用して産生された。Ｂ細胞は、ＰＢＭＣからヒトＣＤ１９－マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－０５０－３０１）を使用することによってポジティブに選択された。次いで、Ｂ細胞培地中の０．１２５ｕｇ／ｍｌ組換えｈｕＣＤ４０Ｌによって、ＣＤ１９＋細胞を刺激し、２×１０^{5}細胞／ｍｌ及び１ｍｌ／ウェルにて２４－ウェルプレートにシーディングした。Ｂ細胞培地は、１０％熱不活性ヒト血清（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ　Ｈ３６６７－１００ＭＬ）、１００Ｕ／ｍｌペニシリン及び１００ｕｇ／ｍｌストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ，１５１４０－１２２）、１０μｇ／ｍｌゲンタマイシン（Ｇｉｂｃｏ，１５７５０－０６０）及び２００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－４（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，Ｒｏｃｋ　Ｈｉｌｌ，ＮＪ，２０００４１００ＵＧ）で補充された、ＩＭＤＭ、ＧｌｕｔａＭａｘ（商標）サプリメント培地（Ｇｉｂｃｏ，３１９８００３０）で構成された。４００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－４を有する新鮮なＢ細胞培地を、Ｂ細胞培養液に１ｍｌ／ウェルにて、細胞を乱すことなく、Ｂ細胞活性化後３日目に添加した。活性化Ｂ細胞は、Ｂ細胞活性化後６日目に抗原反応性Ｔ細胞刺激に即時使用可能であった。

【０１０８】

抗原特異的Ｔ細胞の生体外（Ｅｘ　ｖｉｖｏ）刺激及び拡大

ＣＤ１４＋細胞単離後７日目に、組換えヒトＴＮＦ－αと共に、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド（Ａｎａｓｐｅｃカスタムペプチド，Ｆｒｅｅｍｏｎｔ，ＣＡ）を未成熟樹状細胞に１μＭで添加した。ＣＤ１４＋細胞単離後９日目に、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドーパルス成熟樹状細胞を収集し、洗浄し、１０μＭ　ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド、１０ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－０９７－７４５）及び１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，ＡＦ２０００７１００ＵＧ）を有するヒトＴ細胞培地において比１：１０にてＣＤ１４－ＰＢＭＣと混合した。ヒトＴ細胞完全培地は、ＣＭとＡＩＭ－Ｖ（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，１２０５５０８３）の１：１混合物からなる。ＣＭは、ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）（Ｇｉｂｃｏ，６１８７０－０３６，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、１０％ヒト血清（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ，Ｈ３６６７）、２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｇｉｂｃｏ，１５６３０－０８０，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）

及び１０μｇ／ｍｌゲンタマイシン（Ｇｉｂｃｏ，１５７５０－０６０，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）が補充されたＲＰＭＩ　１６４０からなる。ＭＡＧＥ－Ｂ２特異的なＴ細胞はさらに、毎週のペプチド－パルスＢ細胞活性化の１～３ラウンド（合計４回までのＴ細胞抗原特異的刺激）によってさらに拡大された。ＨｕＣＤ４０Ｌ活性化Ｂ細胞を収集し、洗浄し、１×１０^{6}細胞／ｍｌ及び４ｍｌ／ウェルにて６ウェルプレートにシーディングし、１μＭ　ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドをＢ細胞に添加し、インキュベータ内で３７℃にて２時間インキュベートした。次いで、１０ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２及び１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－７を有するヒトＴ細胞培において１：１０の比で、ペプチド－パルスＢ細胞をＴ細胞と混合した。ＭＡＧＥ－Ｂ２デキストラマーポジティブ細胞が、フローサイトメトリーによって確認され、次いで単細胞ＲＮＡｓｅｑによってＴＣＲ同定のために選別された。

【０１０９】

活性化抗原特異的Ｔ細胞の選別

ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド活性化抗原特異的Ｔ細胞を、暗所で室温にてＭＡＧＥ－Ｂ２デキストラマー－ＡＰＣ及び－ＰＥで１０分間染色し、次いで、ＣＤ３－ＦＩＴＣ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，ＳａｎＤｉｅｇｏ，ＣＡ，３００４４０）及びＣＤ８－ＢＶ６０５（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ，５６４１１６）によって染色した。死細胞除去染色（Ｓｙｔｏｘ　ｂｌｕｅ）をＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓ３４８５７）から購入した。Ａｒｉａ（商標）Ｆｕｓｉｏｎ細胞選別機（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を使用して、細胞を選別した。選別後にＦｌｏｗｊｏを用いて、データを解析した。

【０１１０】

ＥＬＩＳＰＯＴ

ペプチド負荷Ｔ２細胞を用いたＢＤ（登録商標）ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ，５５１８４９）によって、抗原特異的ＩＦＮγ産生について、選別されたＣＤ３＋ＣＤ８＋Ｄｅｘ＋Ｔ細胞をバリデートした。２４ウェルプレートにおいて２×１０^{6}細胞／ｍｌ及び１ｍｌ／ウェルにてヒトＴ細胞完全培地においてＴ２細胞に１０μＭ　ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドを１～２時間負荷した。ヒトＴ細胞完全培地１５０ｕｌ及びペプチド負荷Ｔ２細胞５０μｌを、プレコートされたＥＬＩＳＰＯＴプレートにおける各ウェルに添加した。ＣＤ３＋ＣＤ８＋Ｄｅｘ＋Ｔ細胞（５００又は１０００細胞）を、ＥＬＩＳＰＯＰＴプレートにおける各ウェルに直接、選別した。３７℃のインキュベータ内で２４時間インキュベートした後に、ＥＬＩＳＰＯＴを検出した。ＥＬＩＳＰＯＴプレートをスキャンし、ＩＭＭＵＮＯＳＰＯＴ（登録商標）（Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｌｉｍｉｔｅｄ，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，ＯＨ）によってカウントした。

【０１１１】

単細胞ＲＮＡｓｅｑ

全トランスクリプトームのｃＤＮＡ増幅を省く、直接的な標的エンリッチメントのために、製造元の説明書に従って、Ｖ（Ｄ）Ｊ単細胞ヒトＴ細胞エンリッチメントキット（ＰＮ－１０００００６、ＰＮ－１０００００５、ＰＮ－１２０２３６、ＰＮ－１２０２６２）と共にＣｈｒｏｍｉｕｍ（商標）コントローラー（１０Ｘゲノミクス，Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ，ＣＡ）を使用して、試料を処理した。簡潔には、細胞及びバーコード付きのオリゴヌクレオチドを有するビーズをナノリットルドロップレットに封入し、そこで細胞は溶解され、ｍＲＮＡは、ポリ－Ｔプライマー及びバーコード付き鋳型スイッチオリゴを用いて逆転写される。次いで、ネスティッド（ｎｅｓｔｅｄ）ＰＣＲが、ヒトＴＣＲの定常領域におけるプライマー及び鋳型スイッチオリゴを用いて実施された。製造元の提案に従って、推定される細胞インプット数に応じて１３～１７サイクルを用いて、第２の標的エンリッチメントＰＣＲが実施された。最終的なシーケンシングライブラリーが、Ｉｌｌｕｍｉｎａシーケンシングアダプタにライゲートされた断片化ＰＣＲ産物から作成された。ライブラリーは、少なくとも５，０００リード／細胞にてＮｅｘｔＳｅｑ（商標）５５０又はＭｉＳｅｑ（商標）（Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）で１

５１ペアードエンドリード（１５１×８×０×１５１）にてシーケンスされた。ｃｅｌｌｒａｎｇｅｒ　ｖｄｊ（２．２．０）で、データを多重分離し、解析して、個々の細胞に割り当てられる完全長ペアＴＣＲ配列が得られた。

【０１１２】

ジャーカット細胞へのＴＣＲのクローニング及び形質導入

候補ＴＣＲを遺伝子断片として産生した。トランスフェクション又は形質導入をモニターするために、ＭＳＣＶプロモーター及びＩＲＥＳ駆動ｅＧＦＰからなるレンチウイルス発現ベクターに、各断片をクローニングした。成功した形質転換体をＳａｎｇｅｒシーケンシングによってスクリーニングし、検証されたクローンを、下流適用のためにマキシプレップした。形質導入を用いて、候補ＴＣＲをスクリーニングする場合には、レンチウイルスのベクターは、ＶＳＶ－Ｇ偽型ビリオン（Ａｌｓｔｅｍ，Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ）内にパッケージされた。ＴＣＲを運ぶレンチウイルスは、ＮＦＡＴ誘導性プロモーター下にて、構成的にＣＤ８ａ及びＲｅｎｉｌｌａルシフェラーゼを発現する、ジャーカットＴＣＲ　ＫＯレポーター細胞系に形質導入された。簡潔には、感染多重度（ＭＯＩ）が１０となるように、５０ｍＬコニカルチューブ内で５ｕｇ／ｍＬポリブレン（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅＳｉｇｍａ，ＴＲ１００３Ｇ）を含有する完全培地における１，０００，０００個～１００万個の細胞にレンチウイルス粒子２０μＬが添加された。ウイルスを添加した後、細胞を３２℃にて１２００×ｇで４５分間回転させた。回転後、培地を吸引し、十分な新たな培地と取り換えて、３７℃のインキュベータに入れる前に濃度５００，０００細胞／ｍｌに細胞を調節した。形質導入後約７２時間で、細胞をフローサイトメトリーによって解析した。細胞５０μｌを９６ウェルＵ底プレートに移し、３００×ｇで３分間遠心する前に、１５０ｕｌ　ＦＡＣＳバッファー（ＰＢＳ　ｗ／ｏ　$CaCl_2$　＆　$MgCl_2$（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ，２１－０４０－ＣＶ）＋５％ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ，１００８２－１４７））を添加した。上清を除去し、ＦＡＣＳバッファー中の１×Ｆｃブロック５０μｌに細胞を再懸濁し、それを４℃で２０分間インキュベートした。製造元の推奨濃度を使用して、ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチド－ＭＨＣ（ＧＶＹＤＧＥＥＨＳＶ／ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１，Ｉｍｍｕｄｅｘカスタマイズ，Ｆａｉｒｆａｘ，ＶＡ）に特異的な蛍光デキストラマーを暗所で室温にて１０分間、形質導入細胞と共にインキュベートした。その後、４℃で２０分間の別のインキュベーション前に、抗ＣＤ３（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を含有する２×抗体カクテルを体積５０ｕｌで添加した。３００×ｇにて３分間遠心することによって、染色後に細胞を３回洗浄し、続いて吸引し、再懸濁した。分析前に、新たな２％ホルムアルデヒド溶液１００μｌ中で４℃にて２０分間、細胞を固定した。ＥＤＴＡを含むＰＢＳ　２００μｌ中に最後に懸濁する前に、細胞を２回洗浄し、ホルムアルデヒドを除去した。固定された標識細胞を、推奨される取得設定を用いて、ＬＳＲＩＩ又はＳｙｍｐｈｏｎｙ（商標）サイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）にかけた。

【０１１３】

ジャーカット活性化アッセイ

抗原提示Ｔ２細胞（ＡＴＣＣ）に、血清不含培地中で一定範囲の濃度で２時間、ペプチド（Ａｎａｓｐｅｃカスタマイズ）又は賦形剤のみを負荷した。インキュベーション後、完全培地に再懸濁する前に、負荷されたＴ２細胞を３回洗浄し、カウントし、ハーフエリア９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）において１５，０００細胞／ウェルにてシーディングした。形質導入に成功したジャーカット細胞を、３０，０００細胞／ウェルにて総体積１００μＬに添加した。ＴＣＲ発現性ジャーカット細胞をＴ２細胞の存在下にて３７℃で２４時間共培養した。このインキュベーションの最後に、半分の体積を収集する前に、短時間でプレートを３００×ｇにて遠心し、サイトカイン分泌を特徴付けるために保管した。残りの体積に、等しい体積のＲＥＮＩＬＬＡＧＬＯ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）を添加し、発光（ＥＮＶＩＳＩＯＮ（登録商標）（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）で検出される）前に振盪しながら、プレートを室温にて２０分間インキュベートした。賦形剤のみのＴ２細胞との共培養と比較して、ペプチドが負荷されたＴ２細

胞の存在下にて、個々のＴＣＲの活性を発光の倍率変化として表した。

【０１１４】

ヒト初代Ｔ細胞を用いた、ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔ及びＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞の産生

健康なドナー３名（ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１）からのＰＢＭＣが、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ勾配遠心分離を用いて、ｌｅｕｋｏｐａｋ（Ａｌｌｃｅｌｌｓ，Ａｌａｍｅｄａ，ＣＡ）から単離され、ＣＤ３ネガティブセレクションキット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－０９６－５３５）及び関連する製造元のプロトコルを用いて、更なるＴ細胞の単離が行われた。ＴＣＲ形質導入の１日前に、凍結ｐａｎ－Ｔ細胞を解凍し、１×１０^{6}細胞／ｍｌにてヒトＴ細胞完全培地に再懸濁し、３０ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，１３０－０９７－７４５）、１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－７（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，ＡＦ２０００７１００ＵＧ）及び２５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－１５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ，ＡＦ２００１５１００ＵＧ）の存在下にて、Ｔ細胞：ビーズの比（２：１）でＣＤ３／ＣＤ２８ダイナビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ）（商標）（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，１１１３１Ｄ）によって刺激した。次いで、Ｔ細胞を２４ウェルプレートにおいて１ｍｌ／ウェルにてシーディングした。ＴＣＲ形質導入の当日に、活性化Ｔ細胞（３００，０００）を４８ウェルプレートにおいてヒトＴ細胞完全培地中でシーディングし、８μｇ／ｍｌポリブレン、１００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－７及び２５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－１５の存在下にて、レンチウイルスを形質導入した。次いで、Ｔ細胞を３２℃にて１５００×ｇで１．５時間スピン接種した。スピン接種後、８μｇ／ｍｌポリブレン、１００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－７、及び２５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－１５を有する培地３８０ｕｌを細胞に添加して、総体積を６００μｌ／ウェルにした。形質導入後１７～１８時間で、ウェルの底の細胞に触れることなく、培地約４００μｌを取り出した。４８ウェルプレートの各ウェルからの細胞を、１００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－７及び２５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－１５を含有するヒトＴ細胞完全培地３ｍｌ中でＧ－ＲＥＸ（登録商標）２４ウェルプレート（ＷｉｌｓｏｎＷｏｌｆ，Ｓｔ　Ｐａｕｌ，ＭＮ，Ｐ／Ｎ　８０１９２Ｍ）の１つのウェルに移した。形質導入後４日目に、ダイナビーズを製造元のプロトコルに従って除去した。１００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２、１０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－７、及び２５ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－１５の存在下にて、Ｇ－ＲＥＸ（登録商標）６ウェルプレート（ＷｉｌｓｏｎＷｏｌｆ，Ｐ／Ｎ　８０２４０Ｍ）に、培地３０ｍｌ中で約１０×１０^{6}細胞にてＴＣＲ－Ｔ細胞をシーディングした。形質導入後７日目に、ＴＣＲ－Ｔを収集し、凍結し、液体窒素気相中で保管した。デキストラマー結合によって、ＴＣＲ形質導入効率をバリデートした。特許出願（ＰＣＴ公開出願番号：国際公開第２０２１／２１１１０４号パンフレット）に記載のプロセスによって、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞を産生した。

【０１１５】

フローサイトメトリー

以下の抗体：ＣＤ３－ＦＩＴＣ（Ｂｉｏｌｅｎｇｅｎｄ：３００４４０）、ＣＤ８－ＢＶ６０５（ＢＤ：５６４１１６）、ＣＤ４－ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ：３１７４１０）をＴ細胞フェノタイピングに使用した。以下の抗体：ＣＤ１４－ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ：３０１８２４）、ＣＤ１１ｃ－ＰＥ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ：３３７２０６）、ＣＤ１ａ－ＡＰＣ－ｃｙ７（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ：３００１２５）、ＣＤ８６－ＡＰＣ（ＢＤ：５５５６６０）を樹状細胞フェノタイピングに使用した。以下の抗体：ＭＨＣクラスＩ（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ：３１１４１４）、ＭＨＣクラスＩＩ（Ｂｉｏｌｅｎｇｅｎｄ：３６１７０６）、ＣＤ８３－ＰＥ（ＢＤ５５６８５５）、ＣＤ８６－ＡＰＣ（ＢＤ：５５５６６０）、ＣＤ２０－ＦＩＴＣ（ＢＤ：５５６６３２）をＢ細胞フェノタイピングに使用した。デキストラマー－ＡＰＣ又は－ＰＥをＩｍｍｕｄｅｘから購入した（カスタム化デキストラマー）。５０ｎＭ　ＰＫＩダサチニブ（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ：１３９２）を使用して、ＴＣＲインターナリゼーションを防いだ。ＴＣＲ発現性Ｔ細胞を５０ｎＭ　ＰＫＩダサチニブと共に３７℃で３０分間インキュベートし、続いて氷

上で３０分間デキストラマー染色し、４℃で１５分間、細胞表面マーカー染色を行った。死細胞除去染色（Ｓｙｔｏｘ　ｂｌｕｅ，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓ３４８５７）を用いた。Ｆｌｏｗｊｏを使用して、ローサイトメトリーデータを解析した。

【０１１６】

Ｔ細胞仲介Ｔ２－ｌｕｃ／ペプチド細胞障害性アッセイ（Ｔ２／ペプチドＴＤＣＣアッセイ）

ＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔの機能性及び細胞死特異性を、Ｔ２－ｌｕｃ（ホタルルシフェラーゼを発現するＴ２細胞系）細胞死アッセイによって決定した。Ｔ２－Ｌｕｃ細胞を収集し、洗浄し、Ｔ２－Ｌｕｃ細胞死アッセイ培地（ＲＰＭＩ　１６４０－ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）、１×非必須アミノ酸溶液（Ｇｉｂｃｏ，１１１４０－０５０，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｇｉｂｃｏ，１５６３０－０８０）、５０μＭ　２－β－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ，２１９８５－０２３）、１ｍＭピルビン酸ナトリウム（Ｇｉｂｃｏ，１１３６０－０７０）、１００Ｕ／ｍｌペニシリン－ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ，１５１４０－１２２）、５％熱不活性化ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ，１００８２－１４７）中に２×１０^{6}細胞／ｍｌにて再懸濁し、次いで２４ウェルプレートにおいて１ｍｌ／ウェルにてシーディングした。３７℃にて２～４時間、指示されるペプチド濃度でＴ２－Ｌｕｃ細胞をパルスした。次いで、２－Ｌｕｃ細胞を洗浄し、１×１０^{5}細胞／ｍｌにて再懸濁し、３８４ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，３５７０）において２５μｌ／ウェルにてシーディングした。指示されるデキストラマー＋ＴＣＲ－ＴとＴ２－ｌｕｃ細胞の比で、ＴＣＲ－Ｔ細胞２５μｌと共にＴ２－Ｌｕｃ細胞を４８時間インキュベートした。Ｂｉｏ－Ｇｌｏ（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ，Ｇ７９４０）３０μｌを添加することによって、発光シグナルを測定し、続いてＢｉｏｓｔａｃｋ（商標）ネオシステム（ＢｉｏＴｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）を使用して発光シグナルを測定した。親のＴＣＲ－Ｔに関して、細胞死アッセイ前に、ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞のすべてが、モックＴ細胞の添加によって基準化されたわけではない。異なるＴＣＲ－Ｔが、モック（非形質導入）Ｔ細胞の添加によって同量のＭＡＧＥ－Ｂ２デキストラマー＋細胞（例えば１０％）に基準化された。特異的な溶解（特異的細胞死％）が、モックＴ細胞＋Ｔ２／標的ペプチド細胞死、又はＴＣＲ－Ｔ＋Ｔ２／ペプチドなしの細胞死のいずれかによって、ＴＣＲ－Ｔ＋Ｔ２／標的ペプチド細胞死の正規化によって計算された。具体的な溶解公式を以下に示す。

特異的な溶解（％）の式

ペプチド滴定（ＭＡＧＥ－Ｂ２／Ａ４ペプチド及び類似のペプチド）：

｛１－（ＴＣＲＴ＋Ｔ２－ｌｕｃ／試験ペプチドＲＬＵ）／（ＴＣＲＴ＋Ｔ２－ｌｕｃ／ペプチドなしＲＬＵ）｝×１００

Ｅ：Ｔ滴定（ＭＡＧＥ－Ｂ２／Ａ４ペプチド）：

｛１－（ＴＣＲＴ＋Ｔ２－ｌｕｃ／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドＲＬＵ）／（モックＴ＋Ｔ２－ｌｕｃ／ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドＲＬＵ）｝×１００

癌細胞系細胞死：

｛１－（ＴＣＲＴ＋癌細胞系ＲＬＵ）／（モックＴ＋癌細胞系ＲＬＵ）｝×１００。

【０１１７】

Ｔ細胞仲介癌細胞の細胞障害性アッセイ（癌細胞ＴＣＤＤアッセイ）

ＭＡＧＥ－Ｂ２ポジティブ及びネガティブ癌細胞系に対するＴＣＲ－Ｔ細胞の細胞障害性が、癌細胞死アッセイによって決定された。癌細胞を収集し、洗浄し、癌細胞死アッセイ培地（ＲＰＭＩ　１６４０－ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）、１×非必須アミノ酸溶液（Ｇｉｂｃｏ，１１１４０－０５０，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｇｉｂｃｏ，１５６３０－０８０，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、５０μＭ　２－β－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ，２１９８５－０２３，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、１ｍＭピルビン酸ナトリウム（Ｇｉｂｃｏ，１１３６０－０７０，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、１００Ｕ／ｍｌペニシリン－ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ，１５１４０－１

２２，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）、１０％熱不活性化ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ，１００８２－１４７，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中に1×10^{5}細胞／ｍｌにて再懸濁した。次いで、３８４ウェルプレートにおいて２５μｌ／ウェルにて癌細胞をシーディングし、指示されるデキストラマー＋ＴＣＲ－ＴとＴ２－Ｌｕｃ細胞の比で、ＴＣＲ－Ｔ細胞２５μｌと共に４８時間インキュベートした。インキュベーション後に、付着癌細胞に関して、懸濁液Ｔ細胞を除去し、プレートウォッシャーを使用して、$Ca^{2+}Mg^{2+}$を含むＤＰＢＳ（Ｃｏｒｎｉｎｇ，２１－０３１－ＣＭ）でウェルを洗浄した。Ｃｅｌｌｔｉｔｅｒ Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｇ７５７３）３０μｌを添加して、発光シグナルを測定した。懸濁液ルシフェラーゼ標識癌細胞に関して、Ｂｉｏ－Ｇｌｏ（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｇ７９４０）３０μｌを添加して、発光シグナルを測定した。Ｂｉｏｓｔａｃｋ（商標）ネオシステムを発光の測定に使用した。ルシフェラーゼ標識なしの懸濁液癌細胞に関して、癌細胞をＣｅｌｌｔｒａｃｅ ｆａｒ ｒｅｄ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃ３４５７２，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）によって標識した。Ｃｅｌｌｔｒａｃｅ（商標）ｆａｒ ｒｅｄ（希釈率１：４０００）を含有する血清不含ＲＰＭＩ培地に1×10^{6}細胞／ｍｌにて癌細胞を再懸濁し、３７℃で１０分間インキュベートした。細胞死アッセイ培地３０ｍｌを添加し、室温にて１０分間インキュベートすることによって、反応を停止させた。生きた癌細胞をフローサイトメトリーによって検出した。死細胞除去染色（Ｓｙｔｏｘ（商標）ｂｌｕｅ，ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｓ３４８５７）を使用した。特異的な溶解（特異的細胞死％）が、癌細胞系に対するモックＴ細胞死、又はＩＬ１２－ＲＦＰ Ｔ細胞死のいずれかによって、癌細胞系に対するＴＣＲ－Ｔ細胞死の正規化により計算された。具体的な溶解式を上記に示す。

【０１１８】

類似のペプチドスクリーン

Ｔ２－Ｌｕｃ／ペプチド指示（ｄｉｒｅｃｔｅｄ）細胞死アッセイを用いて、ＭＡＧＥ－Ｂ２ ＴＣＲ－Ｔの機能特異性を決定した。標的及び類似のペプチドを含むペプチドがＪＰＴ（Ｂｅｒｌｉｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）又はＡｎａＳｐｅｃ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）によって合成された。１．０Ｅ－０５Ｍ～６．０Ｅ－１６Ｍ（効力）又は１．０Ｅ－０５Ｍ（単一ポイント）の最終ペプチド濃度範囲にて３７℃／５％CO_2で、Ｔ２－Ｌｕｃ細胞死培地中にて反応性の類似ペプチド、標的特異的なペプチド又はＤＭＳＯコントロールと共にＴ２－Ｌｕｃ細胞を２時間インキュベートした。凍結ＭＡＧＥ－Ｂ２ ＴＣＲ－Ｔ及びモックＴ細胞を解凍し、洗浄し、アッセイセットアップ前の３時間、ヒトＴ細胞培地中で休ませた。ＭＡＧＥ－Ｂ２ ＴＣＲ－Ｔ細胞をアッセイ培地中で３回洗浄し、２．５Ｅ０６細胞／ｍＬで再懸濁した。Ｂｒａｖｏリキッドハンドリングシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ）を用いて２，０００細胞／２５μＬにて白色透明底３８４ウェルアッセイプレート（Ｃｏｓｔａｒ）に、ペプチド負荷Ｔ２－Ｌｕｃ細胞を添加した。標的：エフェクター比１０：１；２０，０００細胞／２５μＬ（最終Ｄｅｘ＋Ｔ細胞：Ｔ２－Ｌｕｃ １：１）が得られるように、ＭＡＧＥ－Ｂ２デキストラマーポジティブ細胞をモックＴ細胞で希釈することによって、ＭＡＧＥ－Ｂ２ ＴＣＲ－Ｔ細胞を調製した。Ｔ２－Ｌｕｃパルス細胞及びＴＣＲ－Ｔ細胞を３７℃／５％CO_2で４８時間インキュベートした。製造元の推奨に従って、Ｂｉｏ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｇ７９４０）を用いて、Ｔ２－Ｌｕｃ細胞生存率を決定した。発光は、ＥＮＶＩＳＩＯＮ（商標）マルチラベルプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ）を使用して検出された。生存率パーセントは、以下の式：％生存率＝（試料の未処理ＲＬＵ値／平均ＤＭＳＯコントロールＲＬＵ）×１００を用いて計算された。ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ（非線形回帰曲線フィット解析）を使用して、ＥＣ５０が決定された。

【０１１９】

正常なヒト初代細胞培養

ヒト初代正常細胞及びｉＰＳＣ由来細胞の供給元を表４にまとめる。それらの細胞の培養条件を表５にまとめる。初代細胞を解凍し、共培養の開始直前に、ＲＰＭＩ １６４０

培地に変換された、以下の心筋細胞、星状膠細胞、ＧＡＢＡ神経細胞、及びＲＰＴＥＣを除いて、供給元の説明書に従って培養した。先の最適化研究から、これらの細胞タイプに対して、ＲＰＭＩ　１６４０の忍容性及び細胞生存率の向上が実証された。アッセイ前に、すべての細胞がカウントされ、生存率に関して評価された。

【０１２０】

【表１５】

表 4. 正常なヒト初代細胞及び iPSC 由来細胞の供給元

細胞	細胞タイプ	供給元	ドナー	カタログ番号
気管支上皮細胞 (hBEpC)	初代	PromoCell, Heidelberg, Germany	424Z015.3	C-12640
腎近位尿細管上皮細胞 (RPTEC)	初代	Lonza, Basel, Switzerland	617045	CC-2553
気管上皮細胞 (hTEpC)	初代	PromoCell	446Z036.8	C-12212
ケラチノサイト	初代	PromoCell	425Z026.2	C-12003
皮膚微小血管内皮細胞 (HDMEC)	初代	PromoCell	435Z034.2	C-12212
肝細胞	初代	Lonza	HUM17299A, HUM173531	HUCPG
GABA 神経細胞	iPSC	Cellular Dynamics, Madison, WI	01434	R1013
星状膠細胞	iPSC	Cellular Dynamics	01434	R1092
心筋細胞	iPSC	Cellular Dynamics	01434	R1007
B-CPAP	甲状腺癌腫細胞系 (MAGE-B2^{+})	DSMZ, Braunschweig, Germany	N/A	N/A

【０１２１】

【表１６】

表 5. ヒト正常細胞の培養培地及び方法

細胞	アッセイ培地	サプリメント	具体的な方法	プレーティング密度 (細胞/ウェル)
気管支上皮細胞 (hBEpC)	上皮細胞培地	キットに含有される、必要なサプリメント (ヒドロコルチゾンは省かれた)	96 ウェル ViewPlate に細胞を直接プレーティングした	20,000
腎近位尿細管上皮細胞 (RPTEC)	サプリメントを有する RPMI	10%HI FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン	細胞を解凍し、REGM に細胞を維持する。96 ウェル ViewPlate に細胞を直接プレーティングした	20,000
気管上皮細胞 (hTEpC)	気管上皮細胞培地	キットに含有される、必要なサプリメント (ヒドロコルチゾンは省かれた)	96 ウェル ViewPlate に細胞を直接プレーティングした	20,000
ケラチノサイト	ケラチノサイト増殖培地	キットに含有される、必要なサプリメント(ヒドロコルチゾンは省かれた)	96 ウェル ViewPlate に細胞を直接プレーティングした	20,000
皮膚微小血管内皮細胞 (HDMEC)	内皮細胞増殖培地	キットに含有される、必要なサプリメント(ヒドロコルチゾンは省かれた)	96 ウェル ViewPlate に細胞を直接プレーティングした	20,000
肝細胞	肝細胞維持培地	キットに含有される、必要なサプリメント(ヒドロコルチゾンは省かれた)	肝細胞解凍培地中で解凍し;コラーゲン被覆 96 ウェル ViewPlate に、肝細胞プレーティングサプリメントを有するウィリアム培地 E 中でプレーティングし; 24 時間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、肝細胞維持培地中でアッセイした	30,000

【０１２２】

【表１７】

細胞	アッセイ培地	サプリメント	具体的な方法	プレーティング密度 (細胞/ウェル)
GABA 神経細胞	サプリメントを有する RPMI	10% HI FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン	3.33 ug/mL ラミニンで被覆された 96 ウェル PDL 被覆 ViewPlate に、Neural Supplement Aを有する iCell Neural Base 培地中で直接プレーティングした。24 時間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、RPMI 中でアッセイした	20,000
星状膠細胞	サプリメントを有する RPMI	10% HI FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン	N-2 サプリメント A を有する DMEM 中で、96 ウェル ViewPlate に直接プレーティングした。24 時間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、RPMI 中でアッセイした	20,000
心筋細胞	サプリメントを有する RPMI	10% HI FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン	0.1%ゼラチンで被覆された 96 ウェル ViewPlate に、iCell Cardiomyocyte Plating 培地中で直接プレーティングした。24 時間のインキュベーション後、細胞を iCell Cardiomyocyte 維持培地で洗浄した。自発的拍動が確認されるまで、一日おきに培地を取り換えた。再び細胞を維持培地中で洗浄し、RPMI 中でアッセイした。	20,000
B-CPAP	サプリメントを有する RPMI	10% HI FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン	96 ウェル ViewPlate に細胞を直接プレーティングした	20,000

【０１２３】

ヒト初代正常細胞を用いた細胞障害性アッセイ

位相差／蛍光動態イメージングアッセイを用いて、標的細胞の細胞障害性を評価した。蛍光カスパーゼ３／７切断を、ＩＮＣＵＣＹＴＥ（登録商標）ライブイメージングデバイス（Ｓａｒｔｏｒｉｕｍ，Ｇｏｔｔｉｎｇｅｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）で時間の経過に従って測定し、細胞集合を取り込んだ位相差画像上に重ね合わせた。細胞障害性アッセイを実行する前に、９６ウェルプレートにおいて著しい細胞オーバーラップなく適切なンフルエンスを達成するために、異なるプレーティング密度及び様々な培養培地に対する忍容性が評価された。各ＴＣＲ－Ｔ構築物のデキストラマー陽性を考慮に入れることによって、デキ

ストラマー正規化エフェクター：標的（Ｅ：Ｔ）比１：１にて、５０μｌのＭＡＧＥ－Ｂ２　ＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞、ＩＬ－１２　ＲＦＰ　Ｔ細胞、又はモックＴ細胞を含有する黒色の９６ウェルＶｉｅｗＰｌａｔｅに、標的細胞（１００μｌ）を表３に記載の密度で添加した。ＣｅｌｌＥｖｅｎｔ（商標）カスパーゼ３／７試薬（５０μｌ）を製造元の説明書（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ，Ｃ１０４２３）に従って添加した。ＩＮＣＵＣＹＴＥ（登録商標）Ｓ３を備えた３７℃、５％CO_2インキュベータにアッセイプレートを入れた。０時点で開始して、１０倍対物レンズでの位相差及び蛍光イメージ（視野数５）を４４又は４８時間に４時間ごとに収集し、ＩＮＣＵＣＹＴＥ（登録商標）２０１９Ｂソフトウェアを用いてカスパーゼ３／７の全積分強度について解析した。４４又は４８時間の時点で、インキュベータからプレートを取り出し、サイトカイン分析のために、ウェルから、細胞培地５０μＬを取り出した。

【０１２４】

ヒト初代正常細胞を用いたサイトカインアッセイ

４４又は４８時間で、細胞培養上清（５０μＬ）を、細胞障害性アッセイから９６ウェルプレートに採取した。プレートを密閉し、後日のサイトカイン解析のために－８０℃で保存した。製造元の説明書に従って、上清を解凍した。室温で浸透しながら１時間、ＭＳＤキットからのブロッキングバッファー（ＰＢＳ中１％ｗ／ｖ）で、ＩＦＮγ及びＩＬ－１２ｐ７０プレートをブロッキングした。ＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０でプレートを３回洗浄した後、プレートのレイアウトに応じて、標準物質及び試料（未希釈の２５μＬ）を添加した。検出抗体（２５μＬ）を添加し、振盪しながら室温にてプレートを２時間インキュベートし、続いてＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で３回洗浄した。リード（Ｒｅａｄ）バッファー（２×、１５０μＬ）を各ウェルに添加し、ＭＳＤ　ＭＥＳＯＳＥＣＴＯＲ（登録商標）Ｓ６００装置（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）でプレートを解析した。標準曲線を標準物質から作成し、それを使用して、ＭＳＤ　ＤＩＳＣＯＶＥＲＹ　ＷＯＲＫＢＥＮＣＨ（登録商標）ソフトウェア４．０を用いて試料中のサイトカインを定量した。

【０１２５】

アロ反応性スクリーン

３９ＨＬＡ－Ａ、４０ＨＬＡ－Ｂ及び２３ＨＬＡ－Ｃ対立遺伝子を表す、３４のＢＬＣＬ系（Ｂリンパ芽球腫細胞系）それぞれと共に４つのＴＣＲ－Ｔ－ＩＬ１２細胞それぞれを共培養することによって、アロ反応性潜在性が評価された。表６に示すように、フレッドハッチンソンがん研究所（Ｆｒｅｄ　Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）（Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）及びＣｅｌｌｅｒｏ（Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ）からＢＬＣＬを購入した。Ｌ－グルタミンを含有するＲＰＭＩ－１６４０、１５％（ｖ／ｖ）ＨＩ－ＦＢＳ、及び１ｍＭピルビン酸ナトリウム含有する、１５％ＦＢＳ完全ＲＰＭＩ中でＢＬＣＬを培養した。

【０１２６】

３７℃で２時間インキュベートすることによって、ＭＡＧＥ－Ｂ２＋ＭＡＧＥ－Ａ４＋ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１＋ポジティブコントロール細胞系としてのＵ２６６Ｂ１細胞（ＡＴＣＣ；培地中に10^5細胞／ｍｌ）を５０μＭ　ＭＡＧＥ－Ｂ２ペプチドでパルスした。培地の添加によって、ドナーＤ１６０７８０からのＴＣＲ－Ｔ細胞を解凍し、４℃で４００×ｇにて５分間遠心し、培地１０ｍｌに再懸濁し、カウントした。１．９２３×10^5ＴＣＲ－Ｔ細胞を、体積２００μｌで１×10^4ＢＬＣＬ又はペプチドーパルスＵ２６６Ｂ１細胞のいずれかと共培養した。４つのＴＣＲ－Ｔ細胞に対するデキストラマー正規化エフェクター：標的比は、それぞれのデキストラマー陽性に応じて、３：１～約８：１の範囲であった。９６ウェル平底組織培養プレートにおいて３７℃、５％CO_2にて、すべての共培養を４８時間行った。インキュベーション後、９６ウェルプレートを４℃で８８７×ｇにて１分間遠心し、サイトカイン解析のために、上清を９６ウェルＶ底プレートに収集した。製造元の説明書に従って、ＩＦＮγ、グランザイムＢ、ＴＮＦα及びＩＬ－１２ｐ７０の検体を含む、カスタムＭＩＬＬＩＰＬＥＸ（登録商標）ヒトサイトカイン／

ケモカインキット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＳＴ　Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＳＲＰ１８８５）を用いたＬＵＭＩＮＥＸ（登録商標）アッセイによって、サイトカイン及びグランザイムＢを評価した。各アッセイプレートで反復して、検体標準物質の段階稀釈を行った。ＬＵＭＩＮＥＸ（登録商標）プレートをＦＬＥＸＭＡＰ　３Ｄ（登録商標）装置（ＸＭＡＰ（登録商標）ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｌｕｍｉｎｅｘ）で読み取った。ＸＰＯＮＥＮＴ（登録商標）ソフトウェア（Ｌｕｍｉｎｅｘ）によって、データをエクスポートし、ＥＭＤ　ＭｉｌｌｉｐｏｒｅのＭＩＬＬＩＰＬＥＸ（登録商標）Ａｎａｌｙｓｔソフトウェア（Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）によって直接解析し、５パラメーターのロジスティック非線形回帰フィッティング曲線を用いて標準曲線を作成した。各アッセイプレートから得た適切な再現標準曲線値の平均として、検出限界（最小及び最大）をＭＩＬＬＩＰＬＥＸ（登録商標）Ａｎａｌｙｓｔソフトウェア（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）によって算出し、検体が標準からその範囲内で補間され得る範囲を示す。試料検体レベルの測定が確実にアッセイ標準曲線限界内となるように、試料を適切な希釈度にて流した。サイトカイン及びグランザイムＢのレベルをｐｇ／ｍＬで、又はＩＬ１２　Ｔ細胞（コントロール）と比較した倍率差（ｆｏｌｄ－ｄｉｆｆｅｒｅｎｃｅ）として報告し、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）でグラフにした。

【０１２７】

【表１８】

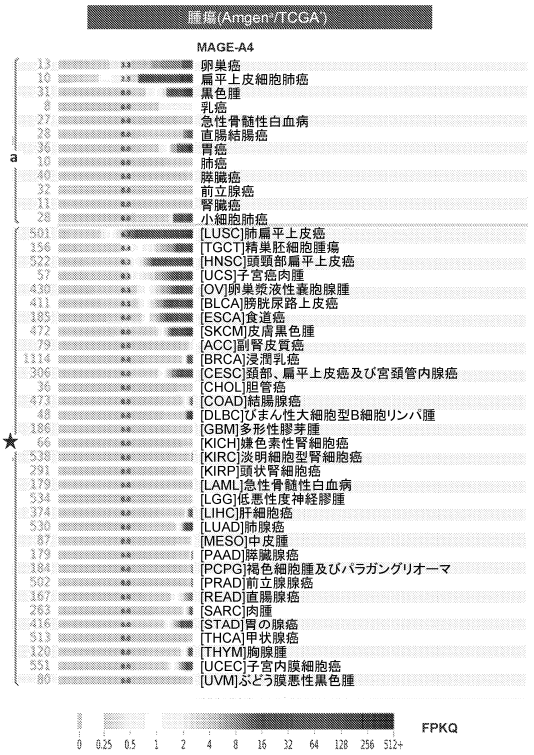
表 6. アロ反応性スクリーンのための BLCL

細胞系の名称	IHW 参照	供給業者
1346-8357	IHW01080	Fred Hutch
1347-8440	IHW01103	Fred Hutch
1347-8442	IHW01105	Fred Hutch
1416-1189	IHW01176	Fred Hutch
1416-1337	IHW01185	Fred Hutch
FH19	IHW09400	Fred Hutch
FH31	IHW09413	Fred Hutch
FH39	IHW09427	Fred Hutch
FH46	IHW09434	Fred Hutch
FH70EY	IHW09458	Fred Hutch
LCK	IHW09367	Fred Hutch
TEM	IHW09057	Fred Hutch
165	-	Cellero
FH18	IHW09398	Fred Hutch
FH21	IHW09403	Fred Hutch
FH25	IHW09407	Fred Hutch
FH3	IHW09375	Fred Hutch
FH36	IHW09423	Fred Hutch
FH43	IHW09431	Fred Hutch
FH53	IHW09441	Fred Hutch
FH6	IHW09380	Fred Hutch
FH9	IHW09383	Fred Hutch
ISH4	IHW09371	Fred Hutch
KT14	IHW09103	Fred Hutch
MYE 2003	IHW09419	Fred Hutch
MYE 2004	IHW09420	Fred Hutch
MYE 2006	IHW09422	Fred Hutch
SCL-116A	IHW09465	Fred Hutch
T7526	IHW09076	Fred Hutch
TER-259	IHW09401	Fred Hutch
TUBO	IHW09045	Fred Hutch
RSH	IHW09021	Fred Hutch
WUZH1	IHW09459	Fred Hutch
1333-8276	IHW01040	Fred Hutch

【図面】

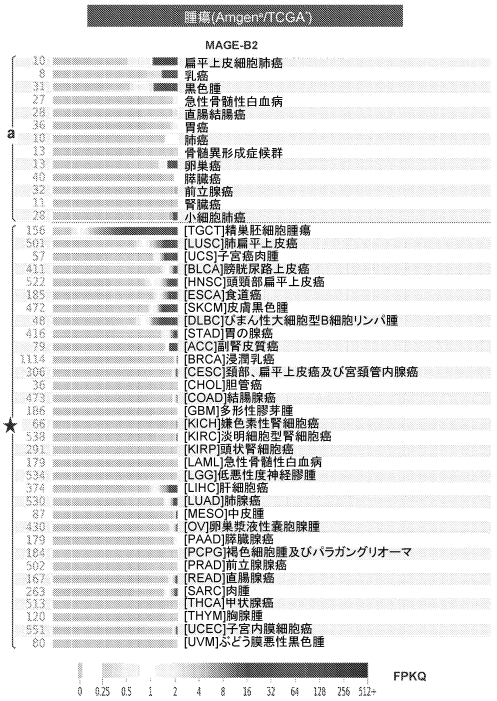
【図１Ａ－１】

図1A

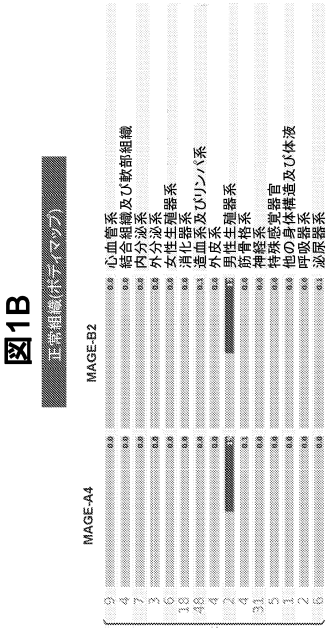


【図１Ａ－２】

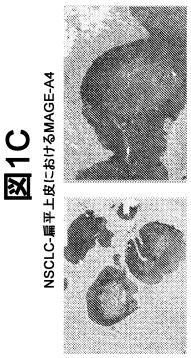
図1A続き



【図１Ｂ】

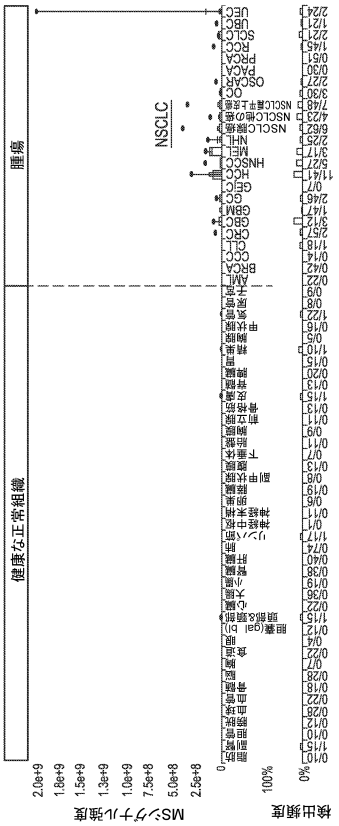


【図１Ｃ】



【図２Ａ】

図2A



【図２Ｂ】

図2B

	NSCLC扁平上皮癌	NSCLC腺癌	NSCLC他の癌	HCC	HNSCC
MSIによるMAGE-B2 pMHC頻度(%)	7/48 (14.6%)	6/62 (9.7%)	4/23 (17.4%)	11/41 (26.8%)	5/27 (18.5%)

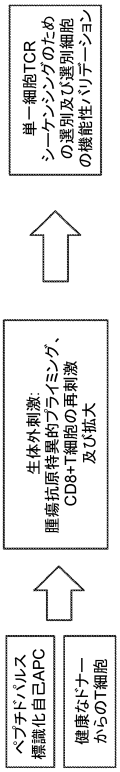
【図３】

図3

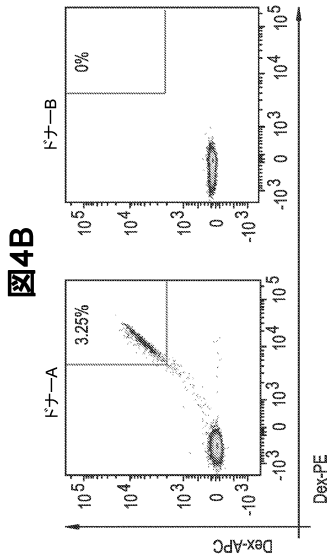
適応症	新たな症例/年	米国の推定ペプチドMHC有病率及び人口(2020)/年			
		MAGE-B2 - HLA-A*02:01 (≥5 FPKM to ≥1 FPKM) x 0.41		MAGE-B2/A4 - HLA-A*02:01 (≥5 FPKM/≥50 FPKM to ≥1 FPKM/ ≥10 FPKM) x 0.41	
		pMHC頻度(%)	人口	pMHC頻度(%)	人口
NSCLC扁平上皮癌	56,543	7.37-11.05	4,165-6,247	16.2-22.67	9,162-12,817
HNSCC	58,365	4.57-7.96	2,667-4,646	9.15-15.77	5,338-9,204
膀胱癌	80,657	1.61-3.22	1,299-2,597	4.72-10.35	3,809-8,348
食道癌	18,657	4.23-6.24	789-1,164	6.24-11.14	1,164-2,079
卵巣癌	20,611	0.78-1.65	161-340	2.13-7.75	440-1,598
合計			9,081-14,994		19,913-34,046

【図４Ａ】

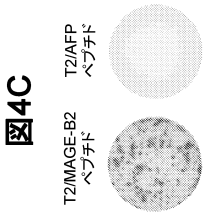
図4A



【図４Ｂ】



【図４Ｃ】



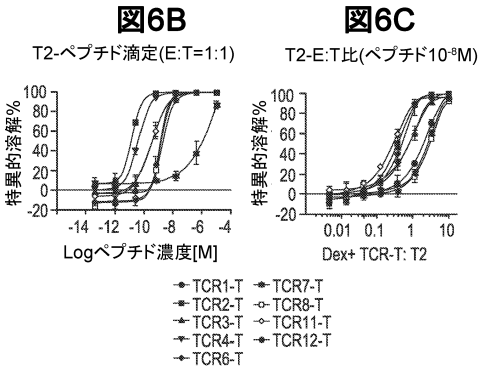
【図５】

【図６Ａ】

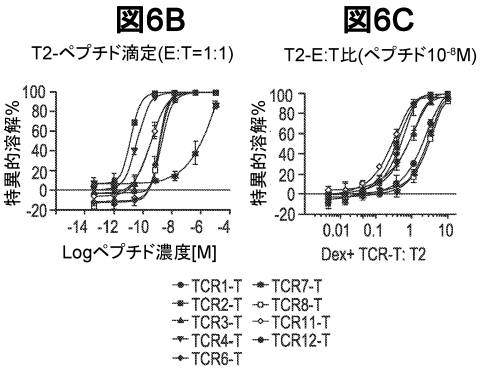
図6A

TCR-T	Dex+ (%,平均)	MAGE-B2ペプチド滴定(T2)	E:T滴定(T2)
		EC90平均(M)	EC90平均(E:T)
TCR2-T	31	1.22E-10	1.11
TCR4-T	32	3.87E-10	1.05
TCR11-T	19	3.86E-09	0.84
TCR3-T	30	5.10E-09	3.36
TCR6-T	34	5.10E-09	2.89
TCR1-T	15	5.93E-09	4.20
TCR8-T	10	9.37E-09	5.59
TCR12-T	29	1.38E-08	4.37
TCR7-T	26	9.34E-04	ND

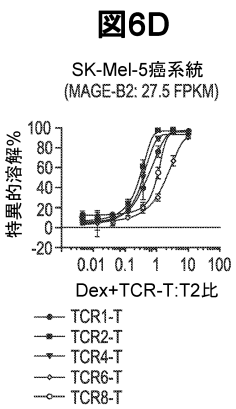
【図６Ｂ】



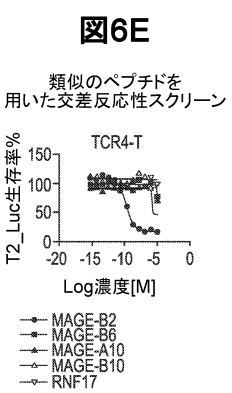
【図６Ｃ】



【図６Ｄ】



【図６Ｅ】

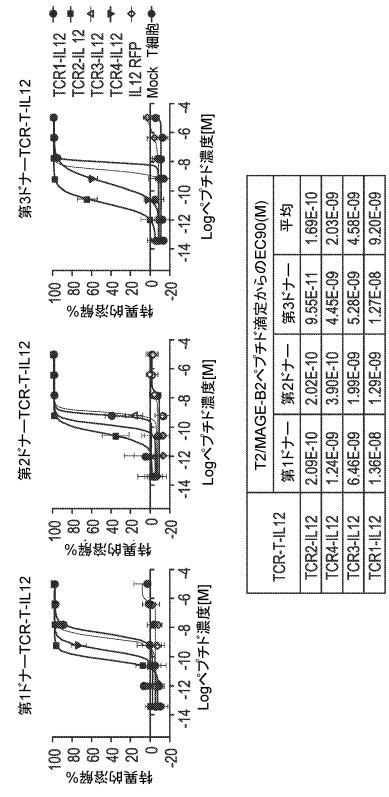


【図７】

図７

【図８】

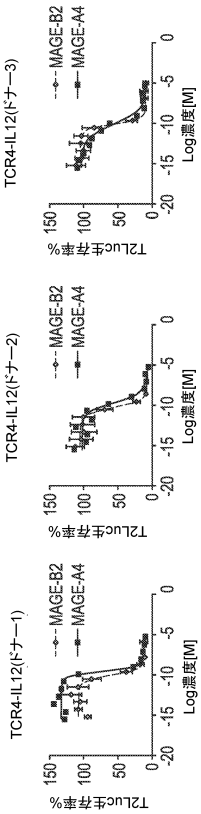
図８



TCR-IL12	T2/MAGE-B2ペプチド滴定からのEC90(M)			
	第1ドナー	第2ドナー	第3ドナー	平均
TCR2-IL12	2.09E-10	2.02E-10	9.55E-11	1.69E-10
TCR4-IL12	1.24E-09	3.90E-10	4.45E-09	2.03E-09
TCR3-IL12	6.46E-09	1.99E-09	5.28E-09	4.58E-09
TCR1-IL12	1.36E-08	1.29E-09	1.27E-08	9.20E-09

【図９】

図9



	EC50[M]					EC90[M]				
TCR4-IL-12	ドナー1	ドナー2	ドナー3	平均	MAGE-B2と比べた倍率	ドナー1	ドナー2	ドナー3	平均	MAGE-B2と比べた倍率
MAGE-B2ペプチド	9.5E-11	4.6E-11	7.9E-11	7.4E-11	1	6.7E-10	4.0E-10	4.3E-10	5.0E-10	1
MAGE-A4ペプチド	2.7E-10	2.0E-10	7.6E-11	1.8E-10	2.5	1.2E-09	4.0E-09	5.8E-09	3.7E-09	7.3

【図１０】

図10

細胞系	HLA-A (FPKM)	MAGE-B2 (FPKM)	MAGE-A4 (FPKM)	平均の最大特異的細胞死%(2~3名のドナー)				
				TCR2-IL12	TCR4-IL12	TCR3-IL12	TCR1-IL12	IL12 RFP
B-CPAP	288	65.89	0.07	97.5	96.5	97.7	95.6	17.2
DAN-G	156	33.07	0.07	98.5	98.1	97.8	83.8	5.9
SK-MEL-5.Luc	201	27.53	0.23	97.7	97.4	97.2	95.2	10.9
NCI-H1792	171	14.73	0.05	97.6	82.0	71.8	55.9	9.9
THP-1	188	13.58	0.58	99.9	97.6	84.0	80.9	28.3
L363	140	6.48	0.17	50.0	45.1	-0.1	35.6	27.2
SAOS2	484	5.40	0.55	91.3	71.9	69.9	76.0	1.2
SW620	287	5.38	0.06	60.0	43.6	30.8	49.9	11.4
AU565 WT	22	3.74	0.10	46.3	39.6	34.3	31.4	7.0
AU565 HLA-A2 hi	>22	3.74	0.10	59.3	55.1	43.7	47.6	14.1
SW1573	234	3.65	0.16	26.3	23.3	21.2	37.4	10.2
8505C	108	1.44	0.13	95.7	69.3	62.4	37.8	24.9
RPMI7951	702	0.43	0.24	56.1	36.8	24.5	50.2	12.4

【図１１】

図11

細胞系	HLA-A (FPKM)	MAGE-A4 (FPKM)	MAGE-B2 (FPKM)	最大特異的細胞死% TCR4-IL12 平均 (ドナー2名)	最大特異的細胞死% IL12 RFP ドナー2
NCI-H1703	428	284.65	0	95.3	8.1
SCaBER	604	172.01	0.02	89.6	18.4
VMRC-LCD	71	128.34	0	26.8	4.6
UMUC3	78	88	0.02	70.2	8.2
NCI-H82	46	6.33	0.66	57.9	22.8
IGR1	249	3.57	0.01	35.1	8.3

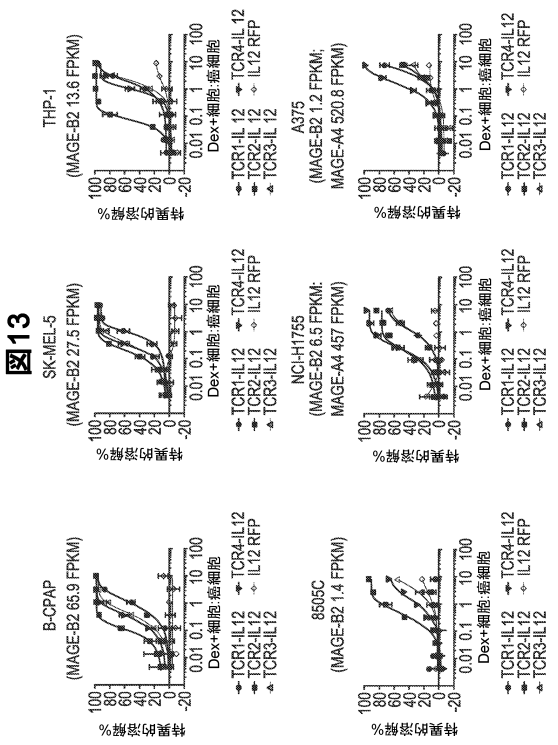
【図１２】

図12

細胞系	HLA-A (FPKM)	MAGE-B2 (FPKM)	MAGE-A4 (FPKM)	平均の最大特異的細胞死%(ドナー2名) TCR2-IL12	TCR4-IL12	TCR3-IL12	TCR1-IL12	IL12 RFP
U266B1.Luc	183	89.35	213.85	99.1	98.2	97.1	97.0	-5.1
KMM-1.Luc	167	42.69	48.87	98.5	97.3	99.1	96.3	9.6
NCI-H2023	118	11.09	144.04	96.9	98.0	45.4	58.2	6.0
NCI-H1755.Luc	271	6.51	457.30	87.0	95.9	70.8	68.1	15.7
A375	102	1.16	520.83	44.6	96.0	25.7	49.1	8.2
NCI-H1395	2185	3.52	44.5	66.0	79.1	32.9	22.6	11.0

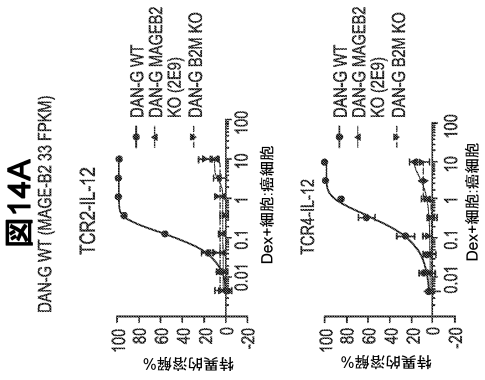
【図１３】

図13

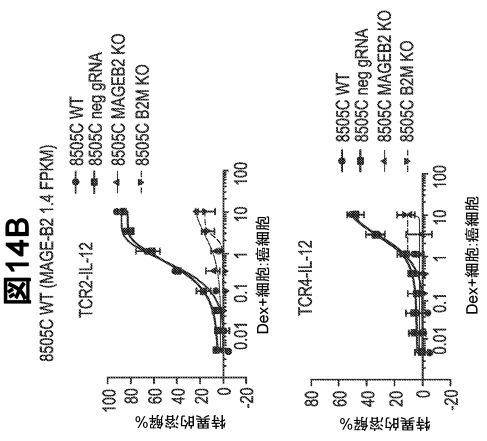


【図１４Ａ】

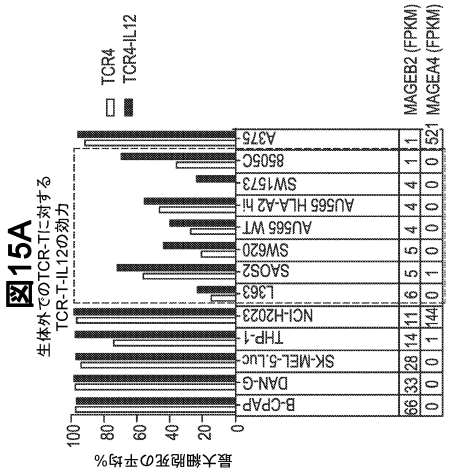
図14A



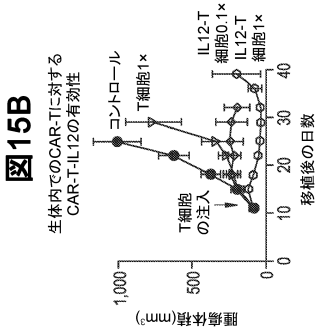
【図１４Ｂ】



【図１５Ａ】



【図１５Ｂ】

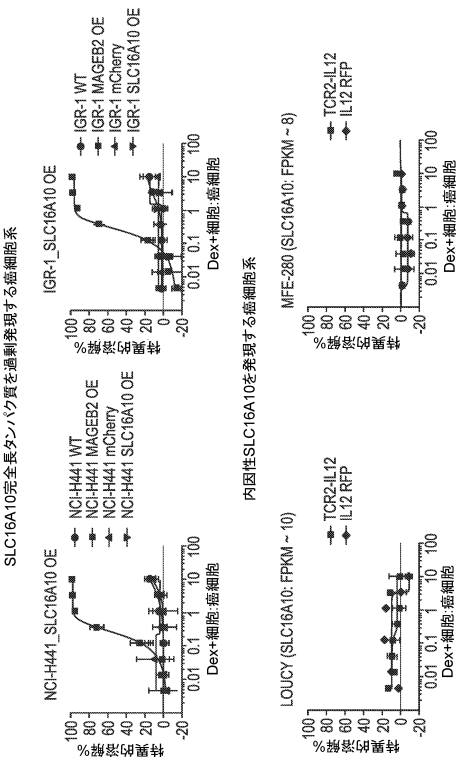


【図１６】

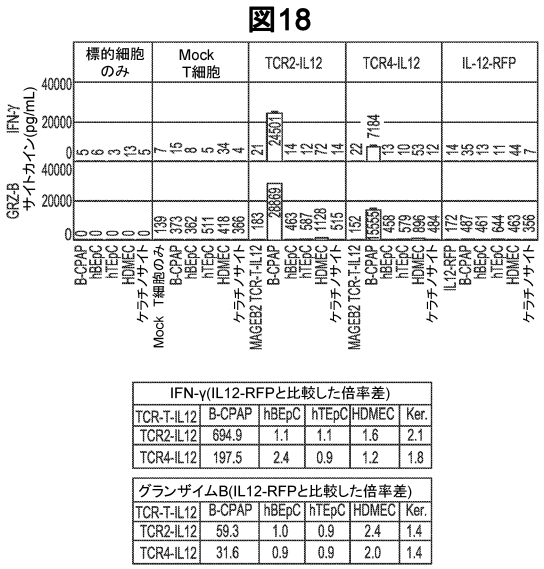
図16

TCR-T-IL12	推定上の交差反応性ペプチド	MAGE-B2ペプチド配列に対する推定上の交差反応性ペプチド配列の相同性%（同一性）	MAGE-B2ペプチドと推定上の交差反応性ペプチドとの効力ギャップ（EC50の倍率）	完全長タンパク質又は内因性タンパク質を過剰発現する癌細胞系に対する細胞障害性によってバリデートされた交差反応性
TCR4-IL12	MAGE-A4	80	2.5	交差反応性
	MAGE-B1	70	87	ND
TCR2-IL12	SLC16A10	40 (Xスキャンモチーフから誘導された)	240	交差反応性ではない
	MAGE-B1	70	0.2	ND
TCR3-IL12	MAGE-A4	80	98	交差反応性
	NRXN1	60	1515	交差反応性ではない
TCR1-IL12	KLHDC3	30 (Xスキャンモチーフから誘導された)	9	交差反応性ではない

【図１７】



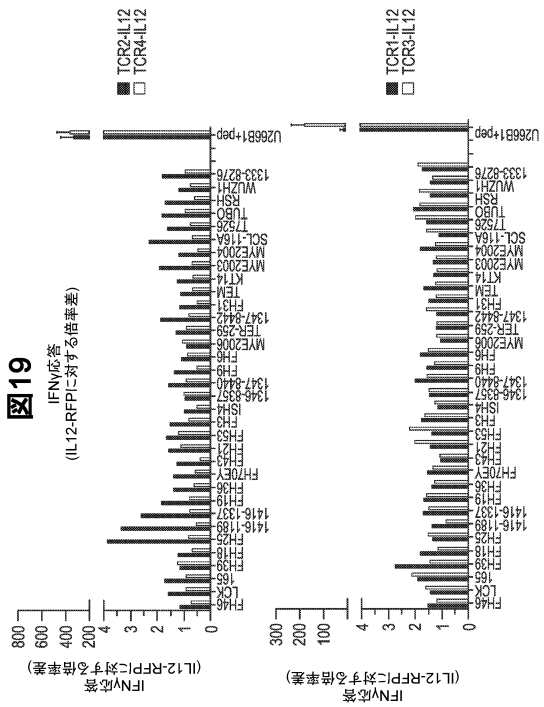
【図１８】



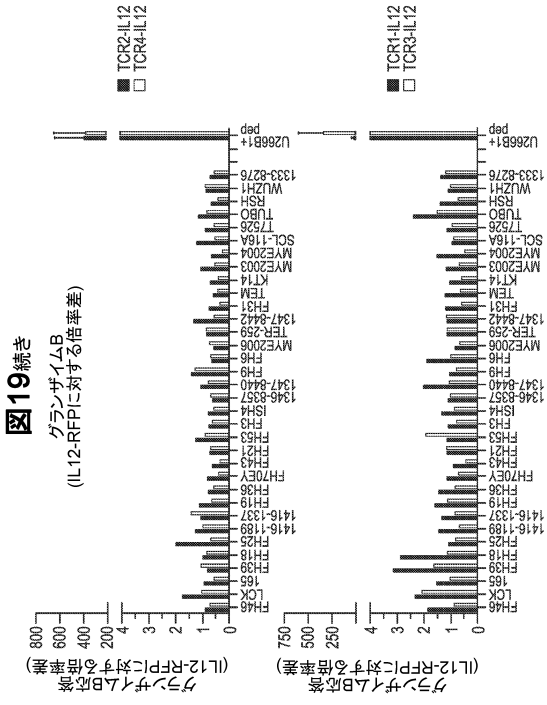
IFN-γ(IL12-RFPと比較した倍率差)					
TCR-T-IL12	B-CPAP	hBEpC	hTEpC	HDMEC	Ker.
TCR2-IL12	694.9	1.1	1.1	1.6	2.1
TCR4-IL12	197.5	2.4	0.9	1.2	1.8

グランザイムB(IL12-RFPと比較した倍率差)					
TCR-T-IL12	B-CPAP	hBEpC	hTEpC	HDMEC	Ker.
TCR2-IL12	59.3	1.0	0.9	2.4	1.4
TCR4-IL12	31.6	0.9	0.9	2.0	1.4

【図１９－１】



【図１９－２】



【配列表】
20245022350000001.app

【手続補正書】
【提出日】令和5年9月27日(2023.9.27)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α鎖及びＴＣＲβ鎖をコードする核酸配列を含む発現ベクターであって、前記ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖が、
ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；並びに
ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
からなる群から選択される、発現ベクター。
【請求項２】
インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）をコードする核酸、又はその機能性変異体をさらに含む、請求項１に記載の発現ベクター。
【請求項３】
ウイルスベクターである、請求項１又は２に記載の発現ベクター。
【請求項４】
レトロウイルスベクターである、請求項３に記載の発現ベクター。
【請求項５】
レンチウイルスベクターである、請求項４に記載の発現ベクター。
【請求項６】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項７】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項６に記載の発現ベクター。

【請求項８】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号５７に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号６８に記載のアミノ酸配列を含む、請求項７に記載の発現ベクター。
【請求項９】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項１０】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含む、請求項９に記載の発現ベクター。
【請求項１１】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号５８に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号６９に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１０に記載の発現ベクター。
【請求項１２】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項１３】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載の発現ベクター。
【請求項１４】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号５９に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７０に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の発現ベクター。
【請求項１５】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項１６】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１５に記載の発現ベクター。
【請求項１７】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６０に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７１に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１６に記載の発現ベクター。
【請求項１８】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項１９】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１８に記載の発現ベクター。
【請求項２０】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６１に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７２に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１９に記載の発現ベクター。
【請求項２１】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項２２】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５１に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の発現ベクター。

【請求項２３】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６２に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７３に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の発現ベクター。
【請求項２４】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項２５】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２４に記載の発現ベクター。
【請求項２６】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６３に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７４に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２５に記載の発現ベクター。
【請求項２７】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項２８】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２７に記載の発現ベクター。
【請求項２９】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６４に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７５に記載のアミノ酸配列を含む、請求項２８に記載の発現ベクター。
【請求項３０】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３１】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３０に記載の発現ベクター。
【請求項３２】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６５に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３１に記載の発現ベクター。
【請求項３３】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３４】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３３に記載の発現ベクター。
【請求項３５】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６６に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７７に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３４に記載の発現ベクター。
【請求項３６】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の発現ベクター。
【請求項３７】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３６に記載の発現ベクター。

【請求項３８】
前記ＴＣＲα鎖が配列番号６７に記載のアミノ酸配列を含み、且つ前記ＴＣＲβ鎖が配列番号７８に記載のアミノ酸配列を含む、請求項３７に記載の発現ベクター。
【請求項３９】
組換えＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現する細胞であって、前記ＴＣＲが：
ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；又は
ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
を含む、細胞。
【請求項４０】
前記ＴＣＲが：
ａ．配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；又は

ｋ．配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
を含む、請求項３９に記載の細胞。
【請求項４１】
組換えＩＬ－１２又はその機能性変異体をさらに発現する、請求項３９又は４０に記載の細胞。
【請求項４２】
請求項１から３８のいずれかに記載の発現ベクターを含む、細胞。
【請求項４３】
Ｔ細胞である、請求項３９～４２のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項４４】
前記ＴＣＲが、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１の状況において、配列番号１又は配列番号２のペプチドに結合し、前記結合によって、前記細胞によるＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＩＬ－１２、又はグランザイムＢ産生の活性化が生じる、請求項４３に記載の細胞。
【請求項４５】
請求項３９～４４のいずれか一項に記載の細胞を治療有効量で含む、医薬組成物。
【請求項４６】
ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖をコードする核酸配列を含む発現ベクターを、細胞に導入することを含む、請求項３９～４４のいずれか一項に記載の細胞又は請求項４５に記載の医薬組成物を製造する方法であって、
前記ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖が：
ａ．配列番号１３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号１４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｃ．配列番号１５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号１６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号１７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号１８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号２９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号１９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号２０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号２２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；又は
ｋ．配列番号２３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
からなる群から選択される、方法。
【請求項４７】
前記ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖が：
ａ．配列番号３５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｂ．配列番号３６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；

ｃ．配列番号３７に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｄ．配列番号３８に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号４９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｅ．配列番号３９に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｆ．配列番号４０に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｇ．配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｈ．配列番号４２に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｉ．配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
ｊ．配列番号４４に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；並びに
ｋ．配列番号４５に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲα鎖、及び配列番号５６に記載のアミノ酸配列を含むＴＣＲβ鎖；
からなる群から選択される、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】
前記発現ベクターが、ＩＬ－１２をコードする核酸配列又はその機能性変異体をさらに含む、請求項４６又は４７に記載の方法。

【請求項４９】
前記細胞がＴ細胞である、請求項４６～４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５０】
前記細胞が初代Ｔ細胞である、請求項４９に記載の方法。

【請求項５１】
前記初代Ｔ細胞が、癌患者から単離される、請求項５０に記載の方法。

【請求項５２】
ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４発現性の癌を治療する方法に使用するための医薬組成物であって、請求項３９～４４のいずれか一項に記載の細胞、又は請求項４６～５１のいずれか一項に記載の方法によって製造された細胞を含み、前記方法は、請求項３９～４４のいずれか一項に記載の細胞、又は請求項４６～５１のいずれか一項に記載の方法によって製造された細胞を、治療有効量で癌患者に投与することを含む、医薬組成物。

【請求項５３】
前記患者が、ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４を発現する癌の存在を決定するために投与前に試験される、請求項５２に記載の医薬組成物。

【請求項５４】
ＭＡＧＥ－Ｂ２又はＭＡＧＥ－Ａ４をコードする核酸が検出される、請求項５３に記載の医薬組成物。

【請求項５５】
ＭＡＧＥ－Ｂ２若しくはＭＡＧＥ－Ａ４タンパク質、又はＭＡＧＥ－Ｂ２由来若しくはＭＡＧＥ－Ａ４由来ペプチドが検出される、請求項５３に記載の医薬組成物。

【請求項５６】
前記患者が、前記ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１対立遺伝子を保有することが同定される、請求項５２～５５のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/064504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 C07K14/47 C12N15/867 C07K16/28 C07K14/725
C07K16/30 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)
A61K C07K C12N

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/227091 A1 (GIGAMUNE INC [US]) 12 November 2020 (2020-11-12) e.g. claims, SEQ ID NO: 477651, 452760, 440842; the whole document -----	1-6,9, 15,39-56
X	MANFREDI FRANCESCO ET AL: "TCR Redirected T Cells for Cancer Treatment: Achievements, Hurdles, and Goals", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 11, 3 September 2020 (2020-09-03), page 1689, XP055856596, DOI: 10.3389/fimmu.2020.01689 e.g. table 1, rows 6,7,9; page 8, left-hand column, last paragraph; the whole document ----- -/--	1-6,9, 15,39-56

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] 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
30 June 2022	12/07/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gruber, Andreas

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/064504

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/055785 A1 (ADAPTIMMUNE LTD [GB]) 14 April 2016 (2016-04-14) e.g. claim 1; the whole document	1-6,9, 15,39-56
X	WO 2020/041501 A1 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]) 27 February 2020 (2020-02-27) e.g. claim 2; SEQ ID NO: 2,3; the whole document	1-5,9, 39-56
X	WO 2017/174823 A1 (ADAPTIMMUNE LTD [GB]) 12 October 2017 (2017-10-12) e.g. page 6, line 30, first sequence; claim 10; the whole document	1-5,15, 39-56

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/064504

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/064504

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying 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.:

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/064504

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020227091 A1	12-11-2020	EP 3962939 A1	09-03-2022
		WO 2020227091 A1	12-11-2020
WO 2016055785 A1	14-04-2016	AU 2015329783 A1	25-05-2017
		AU 2020203201 A1	04-06-2020
		BR 112017007202 A2	06-03-2018
		CA 2963332 A1	14-04-2016
		CN 107001443 A	01-08-2017
		EP 3204409 A1	16-08-2017
		IL 251524 A	30-09-2021
		JP 6751391 B2	02-09-2020
		JP 2017533698 A	16-11-2017
		JP 2020127406 A	27-08-2020
		KR 20170092535 A	11-08-2017
		NZ 731571 A	25-02-2022
		RU 2017115932 A	12-11-2018
		SG 11201701983W A	27-04-2017
		US 2017218043 A1	03-08-2017
		WO 2016055785 A1	14-04-2016
		ZA 201701823 B	26-06-2019
WO 2020041501 A1	27-02-2020	AU 2019324162 A1	04-03-2021
		BR 112021003031 A2	11-05-2021
		CA 3109496 A1	27-02-2020
		CN 112912387 A	04-06-2021
		EP 3841113 A1	30-06-2021
		JP 2021534752 A	16-12-2021
		KR 20210049119 A	04-05-2021
		US 2021340201 A1	04-11-2021
		WO 2020041501 A1	27-02-2020
WO 2017174823 A1	12-10-2017	AU 2017248121 A1	22-11-2018
		BR 112018070637 A2	05-02-2019
		CA 3020555 A1	12-10-2017
		CN 109476724 A	15-03-2019
		EP 3440104 A1	13-02-2019
		EP 3925972 A1	22-12-2021
		ES 2788188 T3	20-10-2020
		JP 2019516356 A	20-06-2019
		KR 20190065189 A	11-06-2019
		RU 2018138837 A	12-05-2020
		SG 11201808750P A	29-11-2018
		US 2019144521 A1	16-05-2019
		US 2022025013 A1	27-01-2022
		WO 2017174823 A1	12-10-2017
		ZA 201806862 B	28-04-2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2021/064504

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 6-8(completely); 1-5, 39-56(partially)

expression vector of claim 1, cells of claims 39,42, composition of claim 45, methods of claims 46,52, all comprising a TCR alpha chain comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 13 and a TCR beta chain comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:24

2-11. claims: 9-38(completely); 1-5, 39-56(partially)

expression vector of claim 1, cells of claims 39,42, composition of claim 45, methods of claims 46,52, all comprising:
invention 2: a TCR alpha chain comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 14 and a TCR beta chain comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:25;
Invention 3: a TCR alpha chain comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 15 and a TCR beta chain comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:26;
...
invention 11: a TCR alpha chain comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:23 and a TCR beta chain comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:34;
i.e. each feature b) to k) of claim 1 being a separate invention

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ａ６１Ｋ	*39/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*37/04 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/04		

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,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,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,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

２．ＰＹＴＨＯＮ

(72)発明者　ジェン，ヤン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０－１７９９、サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ・エム／エス・２８－５－エイ、ロー・デパートメント－パテント・オペレーションズ、アムジェン・インコーポレーテッド気付

(72)発明者　バガル，ダナッシュリー・エス
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０－１７９９、サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ・エム／エス・２８－５－エイ、ロー・デパートメント－パテント・オペレーションズ、アムジェン・インコーポレーテッド気付

(72)発明者　ユエ，リリー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０－１７９９、サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ・エム／エス・２８－５－エイ、ロー・デパートメント－パテント・オペレーションズ、アムジェン・インコーポレーテッド気付

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA43 CA44
4C085　AA02 BB01 BB11 DD62 EE01 GG01
4C087　AA01 AA02 AA03 BB65 CA04 NA14 ZB02 ZB09 ZB26