

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7037577号

(P7037577)

(45)発行日 令和4年3月16日(2022.3.16)

(24)登録日 令和4年3月8日(2022.3.8)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 0 7 K 14/725 (2006.01)

C 0 7 K 14/725

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

Z N A

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

請求項の数 31 (全59頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-550622(P2019-550622)

(86)(22)出願日 平成30年3月15日(2018.3.15)

(65)公表番号 特表2020-509767(P2020-509767  
A)

(43)公表日 令和2年4月2日(2020.4.2)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/022759

(87)国際公開番号 WO2018/170338

(87)国際公開日 平成30年9月20日(2018.9.20)

審査請求日 令和3年3月12日(2021.3.12)

(31)優先権主張番号 62/471,956

(32)優先日 平成29年3月15日(2017.3.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

早期審査対象出願

(73)特許権者 506139369

フレッド ハッチンソン キャンサー リ  
サーチ センターアメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル  
フェアビュー アベニュー ノース 1 1  
0 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高親和性MAGE - A 1 特異的TCR及びその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

結合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む単離された修飾細胞であって、  
前記コードされた結合タンパク質が、

それぞれ配列番号 4 8 ~ 5 0 の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 アミノ酸配列を有する  
T細胞受容体 ( T C R ) 鎖可変 ( V ) ドメイン、ならびにそれぞれ配列番号 4 5 ~ 4  
7 の C D R 1、C D R 2 および C D R 3 アミノ酸配列を有する T C R 鎖可変 ( V ) ド  
メイン

を含み、

前記結合タンパク質が、C D 8 に非依存的に、または C D 8 の不在下で、細胞表面上の K  
V L E Y V I K V (配列番号 1 2 3) : ヒト白血球抗原 ( H L A ) - A \* 0 2 0 1 複合体  
に対し特異的に結合可能であり、

前記修飾細胞は、C D 4 + T細胞であり、C D 8 共受容体の少なくとも細胞外部分をコー  
ドする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、

前記単離された修飾細胞。

## 【請求項 2】

前記コードされた結合タンパク質が、K V L E Y V I K V (配列番号 1 2 3) : H L A -  
A \* 2 0 1 複合体に対し、 $10^{-8}$  M以下の  $K_d$  にて特異的に結合可能である、請求項 1  
に記載の単離された修飾細胞。

## 【請求項 3】

前記コードされた結合タンパク質の前記V ドメインが、T R B V 3 0 アレル、T R B V 2 9 アレル、またはT R B V 9 アレルから誘導される、請求項1または2に記載の単離された修飾細胞。

【請求項4】

前記コードされた結合タンパク質の前記V ドメインが、T R A V 3 8 - 1 アレル、T R A V 3 4 アレル、T R A V 1 6 アレル、またはT R A V 5 アレルから誘導される、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離された修飾細胞。

【請求項5】

結合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む単離された修飾細胞であって、前記コードされた結合タンパク質が、

10

それぞれ配列番号48～50のCDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列を有するTCRV ドメイン、ならびにそれぞれ配列番号45～47のCDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列を有するTCRV ドメイン

を含み、

前記結合タンパク質が、CD8に非依存的に、またはCD8の不在下で、細胞表面上のK V L E Y V I K V (配列番号123) : ヒト白血球抗原 (HLA) - A \* 0201 複合体に対し特異的に結合可能であり、

(i) 前記コードされたV ドメインが、配列番号19のアミノ酸配列に対し少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、

(ii) 前記コードされたV ドメインが、配列番号17のアミノ酸配列に対し少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、

20

前記修飾細胞は、CD4+T細胞であり、CD8共受容体の少なくとも細胞外部分をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、

単離された修飾細胞。

【請求項6】

前記コードされた結合タンパク質が、プレ結合タンパク質であり、前記コードされたV ドメインが、配列番号19のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、請求項1～5のいずれか一項に記載の単離された修飾細胞。

【請求項7】

前記コードされた結合タンパク質が、プレ結合タンパク質であり、前記コードされたV ドメインが、配列番号17のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、請求項1～6のいずれか一項に記載の単離された修飾細胞。

30

【請求項8】

配列番号20のアミノ酸配列に対し少なくとも90%の配列同一性を有するTCR 鎖定常(C )ドメインをコードする異種ポリヌクレオチド、および/または配列番号18のアミノ酸配列に対し少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むTCR 鎖定常(C )ドメインをコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の単離された修飾細胞。

【請求項9】

前記コードされた結合タンパク質が、プレ結合タンパク質であり、前記修飾細胞が、

40

(1)(a) 配列番号19を含むまたはそれからなるV ドメイン、および(1)(b) 配列番号20を含むまたはそれからなるC ドメインを含む(1)TCR 鎖プレタンパク質をコードするポリヌクレオチド、ならびに(2)(a) 配列番号17を含むまたはそれからなるV ドメインおよび(2)(b) 配列番号18を含むまたはそれからなるC ドメインを含む(2)TCR 鎖プレタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の単離された修飾細胞。

【請求項10】

結合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む単離された修飾細胞であって、前記コードされた結合タンパク質が、

(i) それぞれ配列番号48～50のCDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列を

50

含むＴ細胞受容体（ＴＣＲ）鎖可変（Ｖ）ドメイン、ならびに  
 （ｉｉ）それぞれ配列番号４５～４７のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３アミノ酸配列  
 を含むＴＣＲ鎖可変（Ｖ）ドメイン  
 を含み、  
 前記コードされた結合タンパク質が、ＣＤ８に非依存的に、またはＣＤ８の不在下で、細胞表面上のＫＶＬＥＹＶＩＫＶ（配列番号１２３）：ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）－Ａ＊０２０１複合体に対し特異的に結合可能であり、  
 前記修飾細胞が、ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞であり、ＣＤ８共受容体の少なくとも細胞外部分をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、  
 前記単離された修飾細胞。

10

【請求項１１】

（ａ）前記Ｖドメインが、配列番号１９のアミノ酸配列を含むまたはそれからなり、前記Ｖドメインが、配列番号２０のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣドメインをさらに含むＴＣＲ鎖プレタンパク質に含まれ、  
 （ｂ）前記Ｖドメインが、配列番号１７のアミノ酸配列を含むまたはそれからなり、前記Ｖドメインが、配列番号１８のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるＣドメインをさらに含むＴＣＲ鎖プレタンパク質に含まれる、  
 請求項１０に記載の単離された修飾細胞。

【請求項１２】

ＣＤ８共受容体の前記コードされる少なくとも細胞外部分が、全長のＣＤ８共受容体鎖および全長のＣＤ８共受容体鎖を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の単離された修飾細胞。

20

【請求項１３】

ＣＤ８共受容体の前記コードされる少なくとも細胞外部分が、  
 （ｉ）配列番号１４３のＣＤ８共受容体鎖アミノ酸配列、および  
 （ｉｉ）配列番号１４４～１４５のいずれか１つのＣＤ８共受容体鎖アミノ酸配列を含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の単離された修飾細胞。

【請求項１４】

ＣＤ８共受容体の前記コードされる少なくとも細胞外部分が、  
 （ｉ）配列番号１４３のＣＤ８共受容体鎖アミノ酸配列、および  
 （ｉｉ）配列番号１４４のＣＤ８共受容体鎖アミノ酸配列を含む、請求項１３に記載の単離された修飾細胞。

30

【請求項１５】

請求項１～１４のいずれか一項に記載の修飾細胞、および薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む、組成物。

【請求項１６】

結合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む修飾ＣＤ８＋Ｔ細胞をさらに含む、請求項１５に記載の組成物であって、前記コードされた結合タンパク質が、  
それぞれ配列番号４８～５０のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３アミノ酸配列を有するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）鎖可変（Ｖ）ドメイン、ならびにそれぞれ配列番号４５～  
４７のＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３アミノ酸配列を有するＴＣＲ鎖可変（Ｖ）  
ドメインを含み、前記結合タンパク質が、ＣＤ８に非依存的に、またはＣＤ８の不在下で、細胞表面上のＫＶＬＥＹＶＩＫＶ（配列番号１２３）：ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）－Ａ＊０２０１複合体に対し特異的に結合可能である、組成物。

40

【請求項１７】

ヒト対象においてＭＡＧＥ－Ａ１発現に関連する過剰増殖障害を処置するための、請求項１～１４のいずれか一項に記載の修飾細胞を含む、組成物。

【請求項１８】

前記ヒト対象が、抗ＰＤ－１抗体または抗ＰＤ－Ｌ１抗体をさらに受けている、請求項１～１７に記載の組成物。

50

## 【請求項 19】

前記抗 P D - L 1 抗体が、アテゾリズマブを含む、請求項 18 に記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記過剰増殖障害が、血液悪性腫瘍または固形がんである、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 21】

前記血液悪性腫瘍が、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄球性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、慢性好酸球性白血病 (CEL)、骨髄異形成症候群 (MDS)、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、または多発性骨髄腫 (MM) から選択される、請求項 20 に記載の組成物。

10

## 【請求項 22】

前記固形がんが、非小細胞肺癌 (NSCLC)、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC)、卵巣癌、悪性メラノーマ、結腸癌、結腸直腸腺癌、結腸直腸癌、胆道癌、膀胱癌、骨軟部癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、類腱腫、胚性癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、胃腺癌、多形性神経芽細胞腫、婦人科腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、肝癌、肺癌、中皮腫、骨肉腫、膵臓癌、膵管腺癌、原発性星状細胞腫瘍、原発性甲状腺癌、前立腺癌、腎癌、腎細胞癌、横紋筋肉腫、皮膚癌、軟部肉腫、精巣胚細胞腫瘍、尿路上皮癌、子宮肉腫、または子宮癌から選択される、請求項 20 に記載の組成物。

## 【請求項 23】

前記修飾細胞が、前記対象に対して同種の対象から取得された細胞、前記対象に対して同系の対象から取得された細胞または前記対象由来の自己細胞から修飾された細胞である、請求項 17 ~ 22 のいずれか一項に記載の組成物。

20

## 【請求項 24】

(1) TCR V ドメインおよび TCR V ドメインを有する結合タンパク質であって、  
(i) コードされた前記 V ドメインは、それぞれ配列番号 48 ~ 50 の CDR1、CDR2 および CDR3 アミノ酸配列を含み、コードされた前記 V ドメインは、それぞれ配列番号 45 ~ 47 の CDR1、CDR2 および CDR3 アミノ酸配列を含み、  
(ii) コードされた前記結合タンパク質は、CD8 に非依存的に、または CD8 の不在下で、細胞表面上の K V L E Y V I K V (配列番号 123) : ヒト白血球抗原 (HLA) - A \* 0201 複合体に対し特異的に結合可能である、結合タンパク質；および  
(2) CD8 共受容体の少なくとも細胞外部分をコードする単離されたポリヌクレオチド。

30

## 【請求項 25】

前記コードされる V ドメインが配列番号 19 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなり、前記コードされる V ドメインが配列番号 17 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、請求項 24 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 26】

前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 90 に対し少なくとも 90% の同一性を有するヌクレオチド配列を含むまたはそれからなり、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 88 に対し少なくとも 90% の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項 24 または 25 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

40

## 【請求項 27】

前記コードされる結合タンパク質が、TCR 鎖定常 (C ) ドメイン、TCR 鎖定常 (C ) ドメイン、または両方をさらに含む、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 28】

CD8 共受容体の前記コードされる少なくとも細胞外部分が、  
(i) 配列番号 143 の CD8 共受容体 鎖アミノ酸配列、および  
(ii) 配列番号 144 の CD8 共受容体 鎖アミノ酸配列を含む、請求項 24 ~ 27 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

50

## 【請求項 29】

発現調節配列と作用可能に結合された請求項 24 ~ 28 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む、単離された発現ベクター。

## 【請求項 30】

ウイルスベクターである、請求項 29 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 31】

レンチウイルスベクターまたは レトロウイルスベクターである、請求項 30 に記載の発現ベクター。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

配列表に関する記述

本発明に付随する配列表は、紙の複写の代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組み入れられる。配列表を含むテキストファイルの名称は、360056\_\_446WO\_\_SEQUENCE\_\_LISTING.txt である。このテキストファイルは、86.3KB であり、2018 年 3 月 14 日に作成され、EFS-Web を介して電子的に提出されている。

## 【背景技術】

## 【0002】

腫瘍特異的 T 細胞の養子移入は、既存腫瘍を除去するための魅力的な戦略であり、既存腫瘍を除去し再発を防止するためには *in vivo* で抗原特異的 T 細胞のロバストな集団を確立することを必要とする (Stromnes et al., Immunol. Rev. 257:145, 2014)。腫瘍特異的な CD8<sup>+</sup> 細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の移入は安全であり、選択患者における直接の抗腫瘍活性を媒介することができる (Chapuis et al., Cancer Res. 72:LB-136, 2012; Chapuis et al., Sci. Transl. Med. 5:174ra127, 2013; Chapuis et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 109:4592, 2012) 2-4、各患者またはドナーから単離された CTL の結合活性における可変性は、臨床試験における抗腫瘍有効性を制約する (Chapuis et al., 2013)。TCR 親和性は、CTL 結合活性の重要な決定因子である (Zoete et al., Frontiers Immunol. 4:268, 2013) ため、腫瘍特異的抗原に対し特異的な、十分に特徴づけられた T 細胞クローンから単離された高親和性 TCR / 遺伝子を用いて、ドナーまたは患者 T 細胞の抗原特異性をリダイレクトするように戦略が開発されている (Stromnes et al., Immunol. Rev. 257:145, 2014; Robbins et al., J. Clin. Oncol. 29:917, 2011)。自己 / 腫瘍反応性 TCR を発現する T 細胞は中枢性及び末梢性 (免疫) 寛容に供される (Stone and Kranz, Frontiers Immunol. 4:244, 2013) ため、このような高親和性の自己 / 腫瘍反応性 T 細胞は希少であり、相対的 TCR 親和性はドナー間で幅広く変動する。そのため、TCR / 遺伝子療法コンストラクトを生成することができる十分に高親和性の腫瘍特異的 T 細胞クローンを同定するには、多数の一致したドナーをスクリーニングしなければならない。例えば、単一の HLA アレルに対し高い機能的結合活性を有する自然誘発ウィルス腫瘍抗体 1 (WT1) 特異的 TCR の単離は、75 名を超える正常なドナーの末梢レパトリーからの数千の個別の T 細胞クローンを提示する数百の野生型特異的 T 細胞株のスクリーニングを必要とし、多大な時間及び労力を要するプロセスであった (Chapuis et al., 2013; Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009; Ho et al., J. Immunol. Methods 310:40, 2006)。

20

30

40

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

50

## 【 0 0 0 3 】

【文献】Stromnes et al., Immunol. Rev. 257:145, 2014

Chapuis et al., Cancer Res. 72:LB-136, 2012

Chapuis et al., Sci. Transl. Med. 5:174ra127, 2013

Chapuis et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 109:4592, 2012

Zoete et al., Frontiers Immunol. 4:268, 2013

Stromnes et al., Immunol. Rev. 257:145, 2014

Robbins et al., J. Clin. Oncol. 29:917, 2011

Stone and Kranz, Frontiers Immunol. 4:244, 2013

Chapuis et al., 2013; Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009

Ho et al., J. Immunol. Methods 310:40, 2006

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 4 】

白血病及び腫瘍のような様々ながんに向けられた代替の抗原特異的TCR免疫療法が必要とされている。本開示の実施形態は、このような必要性に対処し、他の関連する利点をもたらす。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

## (項目1)

結合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む修飾細胞であって、前記コードされた結合タンパク質が、

(a) 配列番号26、32、38、44、50、もしくは51のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するT細胞受容体(TCR)鎖可変(V)ドメイン、及びTCR鎖可変(V)ドメイン；

(b) 配列番号23、29、35、41、もしくは47のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメイン、及びVドメイン；または

(c) 配列番号26、32、38、44、50、もしくは51のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメイン、及び配列番号23、29、35、41、もしくは47のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメイン

を含み、

前記結合タンパク質が、CD8に非依存的に、またはCD8の不在下で、細胞表面上のMAGE-A1ペプチド：HLA複合体に対し特異的に結合可能である、前記修飾細胞。(項目2)

## (項目2)

前記コードされた結合タンパク質が、KVLEYVIKV(配列番号123)：ヒト白血球抗原(HLA)複合体に対し、約 $10^{-8}$ M以下の $K_d$ にて特異的に結合可能である、項目1に記載の修飾細胞。

## (項目3)

(a)の前記Vドメインが、TRBV30アレル、TRBV29アレル、またはTRBV9アレルから誘導される、項目1または2に記載の修飾細胞。

## (項目4)

(b)の前記Vドメインが、TRAV38-1アレル、TRAV34アレル、TRAV16アレル、またはTRAV5アレルから誘導される、項目1または2に記載の修飾細胞。

## (項目5)

前記コードされたVドメインが、配列番号3、7、11、15、及び19のいずれか1つに記載のアミノ酸配列に対し少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含み、前記

10

20

30

40

50

コードされた V ドメインが、配列番号 1、5、9、13、17 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列に対し少なくとも約 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、ただし、(a) 前記 CDR のうちの少なくとも 3 つまたは 4 つが配列の変化を有さず、配列の変化を有する前記 CDR が、最大 2 つのアミノ酸置換、最大 5 つ連続するアミノ酸欠失、またはこれらの組合せを有するにとどまり、(b) 前記コードされた結合タンパク質が、CD8 に非依存的に、または CD8 の不在下で、MAGE-A1 ペプチド：HLA 細胞表面複合体に対し、依然として特異的に結合可能であることを条件とする、項目 1～4 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 6)

(a) 前記コードされた V ドメインが、(i) 配列番号 24、30、36、42、及び 48 のいずれか 1 つに記載の CDR1 アミノ酸配列、及び/または (ii) 配列番号 25、31、37、43、及び 49 のいずれか 1 つに記載の CDR2 アミノ酸配列を含み、及び/または

10

(b) 前記コードされた V ドメインが、(iii) 配列番号 21、27、33、39、及び 45 のいずれか 1 つに記載の CDR1 アミノ酸配列、及び/または (iv) 配列番号 22、28、34、40、及び 46 のいずれか 1 つに記載の CDR2 アミノ酸配列を含む、項目 1～5 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 7)

前記コードされた結合タンパク質が、

(a) 配列番号 24～26 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 21～23 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列；

20

(b) 配列番号 30～32 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 27～29 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列；

(c) 配列番号 36～38 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 33～35 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列；

(d) 配列番号 42～44 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 39～41 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列；または

30

(e) 配列番号 48～50 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 45～47 にそれぞれ記載の V CDR1、CDR2、及び CDR3 アミノ酸配列

を含む、項目 1～6 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 8)

前記コードされた結合タンパク質が、K V L E Y V I K V (配列番号 123)：HLA-A\*201 複合体に対し特異的に結合する、項目 1～7 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 9)

前記コードされた V ドメインが、配列番号 3、7、11、15、または 19 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、項目 1～8 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。(項目 10)

40

前記コードされた V ドメインが、配列番号 1、5、9、13、または 17 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、項目 1～9 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 11)

配列番号 4、8、12、16、または 20 に記載のアミノ酸配列に対し少なくとも 90% の配列同一性を有する TCR 鎖定常 (C) ドメインをコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、項目 1～10 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 12)

配列番号 2、6、10、14、または 18 に記載のアミノ酸配列に対し少なくとも 90%

50

の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む T C R 鎖定常 ( C ) ドメインをコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、項目 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。(項目 1 3 )

前記コードされた結合タンパク質が、配列番号 3 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 1 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 4 を含むまたはそれからなる C ドメインと、配列番号 2 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 1 4 )

前記コードされた結合タンパク質が、配列番号 7 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 5 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 8 を含むまたはそれからなる C ドメインと、配列番号 6 を含むまたはそれからなる C とを含む、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

10

(項目 1 5 )

前記コードされた結合タンパク質が、配列番号 1 1 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 9 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 1 2 を含むまたはそれからなる C ドメインと、配列番号 1 0 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む、項目 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 1 6 )

前記コードされた結合タンパク質が、配列番号 1 5 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 1 3 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 1 6 を含むまたはそれからなる C と、配列番号 1 4 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

20

(項目 1 7 )

前記コードされた結合タンパク質が、配列番号 1 9 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 1 7 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 2 0 を含むまたはそれからなる C ドメインと、配列番号 1 8 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 1 8 )

前記結合タンパク質が、T 細胞受容体 ( T C R )、T C R の抗原結合断片、またはキメラ抗原受容体である、項目 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

30

(項目 1 9 )

前記 T C R、前記キメラ抗原受容体、または前記 T C R の前記抗原結合断片が、キメラ型、ヒト化型、またはヒト型である、項目 1 8 に記載の修飾細胞。

(項目 2 0 )

前記 T C R の前記抗原結合断片が、1 本鎖 T C R ( s c T C R ) を含む、項目 1 8 または 1 9 に記載の修飾細胞。

(項目 2 1 )

前記結合タンパク質が、キメラ型抗原受容体であり、任意選択により T C R - C A R である、項目 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 2 2 )

40

前記結合タンパク質が、T C R である、項目 1 8 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 2 3 )

前記修飾細胞が、ヒト免疫細胞である、項目 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

(項目 2 4 )

前記免疫細胞が、T 細胞、N K 細胞、または N K - T 細胞である、項目 2 3 に記載の修飾細胞。

(項目 2 5 )

前記免疫細胞が、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、または両方である、項目 2 4 に記載の修飾細胞。

(項目 2 6 )

50



前記修飾細胞が、P D - 1 遺伝子、L A G 3 遺伝子、T I M 3 遺伝子、C T L A 4 遺伝子、H L A 構成要素遺伝子、T C R 構成要素遺伝子、またはこれらの任意の組合せの染色体遺伝子ノックアウトを含む、項目 2 3 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

( 項目 2 7 )

前記染色体遺伝子ノックアウトが、1 マクログロブリン遺伝子、2 マクログロブリン遺伝子、3 マクログロブリン遺伝子、1 ミクログロブリン遺伝子、または 2 ミクログロブリン遺伝子から選択される H L A 構成要素遺伝子のノックアウトを含む、項目 2 6 に記載の修飾細胞。

( 項目 2 8 )

前記染色体遺伝子ノックアウトが、T C R 可変領域遺伝子、T C R 可変領域遺伝子、T C R 定常領域遺伝子、またはこれらの組合せから選択される T C R 構成要素遺伝子のノックアウトを含む、項目 2 6 に記載の修飾細胞。

10

( 項目 2 9 )

前記修飾細胞が、C D 4 + T 細胞であり、C D 8 共受容体の少なくとも細胞外部分をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞。

( 項目 3 0 )

前記結合タンパク質をコードする前記ポリヌクレオチド及び/または C D 8 共受容体の少なくとも細胞外部分をコードする前記ポリヌクレオチドが、前記修飾細胞による発現のためにコドン最適化されている、項目 2 9 に記載の修飾細胞。

20

( 項目 3 1 )

項目 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞と、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤とを含む、組成物。

( 項目 3 2 )

有効量の、( i ) 項目 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞、または ( i i ) 項目 3 1 に記載の組成物を含む、単位用量。

( 項目 3 3 )

少なくとも約 3 0 % の修飾 C D 4 + T 細胞と、( i i ) 少なくとも約 3 0 % の修飾 C D 8 + T 細胞を含む組成物との組合せを約 1 : 1 の比で含む、項目 3 2 に記載の単位用量。

( 項目 3 4 )

30

前記単位用量が、ナイーブ T 細胞を実質的に含有しない、項目 3 3 に記載の単位用量。( 項目 3 5 )

T C R V ドメイン及び T C R V ドメインを有する結合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記コードされた結合タンパク質が、C D 8 に非依存的に、または C D 8 の不在下で、細胞表面上の M A G E - A 1 ペプチド : H L A 複合体に対し、特異的に結合可能であり、前記単離されたポリヌクレオチドが、

( a ) 配列番号 9 7、1 0 3、1 0 9、1 1 5、もしくは 1 2 1 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、及び V コードポリヌクレオチド ;

( b ) 配列番号 9 4、1 0 0、1 0 6、1 1 2、もしくは 1 1 8 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、及び V コードポリヌクレオチド ; または

40

( c ) 配列番号 9 7、1 0 3、1 0 9、1 1 5、もしくは 1 2 1 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 9 4、1 0 0、1 0 6、1 1 2、もしくは 1 1 8 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド

を含む、前記単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 3 6 )

( a ) の前記 V コードポリヌクレオチドが、T R B V 3 0 アレル、T R B V 2 9 アレル、または T R B V 9 アレルから誘導される、項目 3 5 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 3 7 )

( b ) の前記 V コードポリヌクレオチドが、T R A V 3 8 - 1 アレル、T R A V 3 4 ア

50

レル、T R A V 1 6 アレル、またはT R A V 5 アレルから誘導される、項目 3 5 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 3 8 )

( a ) 配列番号 9 7 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 9 4 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；

( b ) 配列番号 1 0 3 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 0 0 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；

( c ) 配列番号 1 0 9 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 0 6 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；

( d ) 配列番号 1 1 5 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 1 2 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；または

( e ) 配列番号 1 2 1 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 1 8 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド

を含む、項目 3 5 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 3 9 )

( a ) 配列番号 9 5、1 0 1、1 0 7、1 1 3、もしくは 1 1 9 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド；

( b ) 配列番号 9 6、1 0 2、1 0 8、1 1 4、もしくは 1 2 0 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド；

( c ) 配列番号 9 2、9 8、1 0 4、1 1 0、もしくは 1 1 6 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド；及び / または

( d ) 配列番号 9 3、9 9、1 0 5、1 1 1、もしくは 1 1 7 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド

をさらに含む、項目 3 5 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

( 項目 4 0 )

( a ) 配列番号 9 5 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 6 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 7 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 2 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 3 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 9 4 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；

( b ) 配列番号 1 0 1 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 2 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 3 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 8 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 9 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 0 0 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；

( c ) 配列番号 1 0 7 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 8 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 9 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 4 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 5 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 0 6 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；

( d ) 配列番号 1 1 3 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 4 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 5 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 0 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 1 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 1 2 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；または

( e ) 配列番号 1 1 9 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 2 0 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 2 1 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 6 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 7 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 1 8 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

を含む、項目 3 5 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 4 1)

前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 5 8、6 6、7 4、8 2、または 9 0 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 5 6、6 4、7 2、8 0、または 8 8 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、項目 3 5 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 4 2)

(a) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 5 8 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 5 6 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；

10

(b) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 6 6 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 6 4 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；

(c) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 7 4 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 7 2 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；

(d) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 8 2 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 8 0 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；または

20

(e) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 9 0 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 8 8 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、

項目 3 5 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 4 3)

(a) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 5 8 に記載のヌクレオチド配列を含みまたはそれからなり、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 5 6 に記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる；

(b) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 6 6 に記載のヌクレオチド配列を含みまたはそれからなり、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 6 4 に記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる；

30

(c) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 7 4 に記載のヌクレオチド配列を含みまたはそれからなり、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 7 2 に記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる；

(d) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 8 2 に記載のヌクレオチド配列を含みまたはそれからなり、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 8 0 に記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる；または

(e) 前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 9 0 に記載のヌクレオチド配列を含みまたはそれからなり、前記 V コードポリヌクレオチドが、配列番号 8 8 に記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる、

40

項目 4 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 4 4)

(a) 配列番号 5 9、6 7、7 5、8 3、もしくは 9 1 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有する C ドメインコードポリヌクレオチド；及び / または

(b) 配列番号 5 7、6 5、7 3、8 1、もしくは 8 9 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有する C ドメインコードポリヌクレオチド

をさらに含む、項目 3 5 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 4 5)

前記 C ドメインコードポリヌクレオチドが、配列番号 5 9、6 7、7 5、8 3、または 9 1 に記載のヌクレオチド配列を含みまたはそれからなり、前記 C ドメインコードポリ

50

ヌクレオチドが、配列番号 57、65、73、81、または 89 に記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる、項目 44 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 46)

(a) 配列番号 58 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 56 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 59 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 57 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 66 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 64 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 67 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 65 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 74 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 72 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 75 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 73 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 82 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 80 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 83 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 81 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド；または

(e) 配列番号 90 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 88 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 91 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 89 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド

を含む、項目 45 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 47)

T C R 鎖コードポリヌクレオチドと T C R 鎖コードポリヌクレオチドとの間に配置される自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、項目 44 ~ 46 のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 48)

自己切断ペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、配列番号 128 ~ 132 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる、項目 47 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 49)

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 124 ~ 127 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる自己切断ペプチドをコードする、項目 47 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

(項目 50)

発現調節配列に対し作用可能に結合した項目 35 ~ 49 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

(項目 51)

前記ベクターが、宿主細胞に前記ポリヌクレオチドを送達可能である、項目 50 に記載の発現ベクター。

(項目 52)

前記宿主細胞が、造血前駆細胞またはヒト免疫系細胞である、項目 51 に記載の発現ベクター。

(項目 53)

前記ヒト免疫系細胞が、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 4 - C D 8 - ダブルネガティブ T 細胞、T 細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、またはこれらの任意の組合せである、項目 52 に記載の発現ベクター。

(項目 54)

前記 T 細胞が、ナイーブ T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞、またはこれらの任意の組合せである、項目 53 に記載の発現ベクター。

(項目 55)

前記ベクターがウイルスベクターである、項目 50 ~ 54 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

10

20

30

40

50

( 項目 5 6 )

前記ウイルスベクターが、レンチウイルスベクターまたは レトロウイルスベクターである、項目 5 5 に記載の発現ベクター。

( 項目 5 7 )

M A G E - A 1 発現に関連する過剰増殖障害を処置するための方法であって、前記処置を必要とするヒト対象に、項目 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞、項目 3 1 に記載の組成物、または項目 3 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の単位用量を投与することを含む、前記方法。

( 項目 5 8 )

前記過剰増殖障害が、血液悪性腫瘍または固形がんである、項目 5 7 に記載の方法。

10

( 項目 5 9 )

前記血液悪性腫瘍が、急性リンパ芽球性白血病 ( A L L )、急性骨髄球性白血病 ( A M L )、慢性骨髄性白血病 ( C M L )、慢性好酸球性白血病 ( C E L )、骨髄異形成症候群 ( M D S )、非ホジキンリンパ腫 ( N H L )、または多発性骨髄腫 ( M M ) から選択される、項目 6 0 に記載の方法。

( 項目 6 0 )

前記固形がんが、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、トリプルネガティブ乳癌 ( T N B C )、卵巣癌、悪性メラノーマ、結腸癌、結腸直腸腺癌、結腸直腸癌、胆道癌、膀胱癌、骨軟部癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、類腱腫、胚性癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、胃腺癌、多形性神経芽細胞腫、婦人科腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、肝癌、肺癌、中皮腫、骨肉腫、膵臓癌、膵管腺癌、原発性星状細胞腫瘍、原発性甲状腺癌、前立腺癌、腎癌、腎細胞癌、横紋筋肉腫、皮膚癌、軟部肉腫、精巣胚細胞腫瘍、尿路上皮癌、子宮肉腫、または子宮癌から選択される、項目 5 8 に記載の方法。

20

( 項目 6 1 )

前記修飾細胞が、クラス I H L A 制限様式において、M A G E - A 1 に対する抗原特異的 T 細胞応答を促進可能である、項目 5 7 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 6 2 )

前記クラス I H L A 制限応答が、抗原ペプチド輸送体 ( T A P ) 非依存的である、項目 6 1 に記載の方法。

( 項目 6 3 )

前記抗原特異的 T 細胞応答が、C D 4 + ヘルパー T リンパ球 ( T h ) 応答及び C D 8 + 細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) 応答のうちの少なくとも 1 つを含む、項目 6 1 または 6 2 に記載の方法。

30

( 項目 6 4 )

前記 C T L 応答が、異常な M A G E - A 1 発現を有する細胞に対し向けられる、項目 6 3 に記載の方法。

( 項目 6 5 )

前記修飾細胞が e x v i v o で修飾される、項目 5 7 ~ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 6 6 )

前記修飾細胞が、同種細胞、同系細胞、または自己細胞である、項目 6 5 に記載の方法。

40

( 項目 6 7 )

前記修飾細胞が修飾ヒト免疫細胞であり、前記免疫細胞が、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、C D 4 - C D 8 - ダブルネガティブ T 細胞、 T 細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 5 7 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 6 8 )

前記 T 細胞が、ナイーブ T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞、またはこれらの任意の組合せである、項目 6 7 に記載の方法。

( 項目 6 9 )

50

前記 T 細胞が C D 4 + T 細胞である、項目 6 7 または 6 8 に記載の方法。

( 項目 7 0 )

前記 C D 4 + T 細胞が、C D 8 共受容体の少なくとも細胞外部分をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、項目 6 9 に記載の方法。

( 項目 7 1 )

前記対象に、細胞表面上の M A G E - A 1 ペプチド：H L A 複合体に対し特異的に結合可能な C D 8 + T 細胞を投与することをさらに含む、項目 6 9 または 7 0 に記載の方法。( 項目 7 2 )

前記 C D 8 + T 細胞が、項目 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の修飾細胞を含む、項目 7 1 に記載の方法。

10

( 項目 7 3 )

前記修飾細胞が非経口的に投与される、項目 5 7 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 7 4 )

前記方法が、前記対象に、複数回用量の前記修飾細胞を投与することを含む、項目 5 7 ~ 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 7 5 )

前記複数回用量が、約 2 週間 ~ 約 4 週間の投与間の間隔にて投与される、項目 7 4 に記載の方法。

( 項目 7 6 )

前記修飾細胞が、前記対象に、約  $10^7$  細胞 /  $m^2$  ~ 約  $10^{11}$  細胞 /  $m^2$  の用量にて投与される、項目 5 7 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

( 項目 7 7 )

前記方法が、サイトカインを投与することをさらに含む、項目 5 7 ~ 7 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 7 8 )

前記サイトカインが、I L - 2、I L - 1 5、I L - 2 1、またはこれらの任意の組合せである、項目 7 7 に記載の方法。

( 項目 7 9 )

前記サイトカインが、I L - 2 であり、かつ前記修飾細胞と同時または順次に投与される、項目 7 8 に記載の方法。

30

( 項目 8 0 )

前記対象がサイトカイン投与前に前記修飾細胞を少なくとも 3 回または 4 回投与されたことを条件に、前記サイトカインが順次に投与される、項目 7 9 に記載の方法。

( 項目 8 1 )

前記サイトカインが、I L - 2 であり、かつ皮下投与される、項目 7 8 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 8 2 )

前記対象がさらに、免疫抑制療法を受けている、項目 5 7 ~ 8 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 8 3 )

前記免疫抑制療法が、カルシニューリン阻害物質、コルチコステロイド、微小管阻害物質、低用量のミコフェノール酸プロドラッグ、免疫チェックポイント阻害物質、またはこれらの任意の組合せから選択される、項目 8 2 に記載の方法。

40

( 項目 8 4 )

前記対象がさらに、有効量の刺激性免疫チェックポイント分子を投与される、項目 5 7 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 8 5 )

前記対象が、非骨髓破壊的または骨髓破壊的な造血細胞移植を受けたことがある、項目 5 7 ~ 8 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

( 項目 8 6 )

50

前記対象が、前記非骨髓破壊的造血細胞移植から少なくとも３ヵ月後に前記修飾細胞を投与される、項目８５に記載の方法。

(項目８７)

前記対象が、前記骨髓破壊的造血細胞移植から少なくとも２ヵ月後に前記修飾細胞を投与される、項目８６に記載の方法。

(項目８８)

前記対象が、ＤＮＡ低メチル化剤及びＨＤＡＣ阻害物質のうちの１つ以上を投与されたことがある、項目５７～８７のいずれか１項に記載の方法。

(項目８９)

ペプチド抗原に対し特異的に結合可能であるＣＤ８＋Ｔ細胞からのＴＣＲをコードする異種ポリヌクレオチドを含む、修飾ＣＤ４＋Ｔ細胞。

10

(項目９０)

前記ＴＣＲが高親和性ＴＣＲである、項目８９に記載の修飾ＣＤ４＋Ｔ細胞。

(項目９１)

前記ＴＣＲが、ＣＤ８に非依存的に、またはＣＤ８の不在下で、細胞表面上のペプチド：抗原ＨＬＡ複合体に対し特異的に結合可能である、項目８９または９０に記載の修飾ＣＤ４＋Ｔ細胞。

(項目９２)

ＣＤ８共受容体分子の少なくとも細胞外部分をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、項目８９～９１のいずれか１項に記載の修飾ＣＤ４＋Ｔ細胞。

20

(項目９３)

前記異種ポリヌクレオチドが、前記ＣＤ８＋Ｔ細胞からのＣＤ８及びＣＤ８をコードする、項目９２に記載のＣＤ４＋Ｔ細胞。

(項目９４)

前記修飾ＣＤ４＋Ｔ細胞が、前記ペプチド：抗原ＨＬＡ複合体に結合したときに、ＣＴＬ応答を誘発可能である、項目９２または９３に記載の修飾ＣＤ４＋Ｔ細胞。

(項目９５)

前記ペプチド抗原が、ＭＡＧＥ－Ａ１からのものである、項目８９～９４のいずれか１項に記載の修飾ＣＤ４＋Ｔ細胞。

(項目９６)

30

修飾ＣＤ４＋Ｔ細胞を作製するための方法であって、ペプチド抗原に対し特異的に結合可能なＣＤ８＋Ｔ細胞からのＴＣＲをコードする異種ポリヌクレオチドを用いて、ＣＤ４＋Ｔ細胞に形質導入することを含む、前記方法。

(項目９７)

前記ＴＣＲが天然存在のＴＣＲである、項目９６に記載の方法。

(項目９８)

ＣＤ８共受容体の少なくとも細胞外部分をコードする異種ポリヌクレオチドを用いて、前記ＣＤ４＋Ｔ細胞に形質導入することをさらに含む、項目９６または項目９７に記載の方法。

(項目９９)

40

前記ＣＤ８共受容体が、前記ＣＤ８＋Ｔ細胞からのＣＤ８及びＣＤ８を含む、項目９８に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【０００５】

【図１】ウイルス抗体に対する高親和性Ｔ細胞が、自己抗原に対する高親和性Ｔ細胞よりも高い頻度で見いだされ（Ａ）、自己抗原に対する高親和性Ｔ細胞が非常に低い頻度で見いだされる（Ｂ）ことを説明する、代表的なデータを示している。

【図２Ａ】本開示の発明者らにより実施されたＴ細胞濃縮アッセイの概略図を示している。

【図２Ｂ】抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の濃縮に使用された一連の選別実験からのフローサイトメトリーデータを示している。

50

【図3】MAGE-A1：HLA四量体を用いた本開示のTCR CDR3濃縮スキームからの例示的なデータを示している。

【図4】図4A及び4Bは、それぞれ、(A)本開示の方法を用いて同定されたTCRによるMAGE-A1：HLA四量体の特異的結合、及び(B)MAGE-A1特異的TCRの濃縮を示している。

【図5A】MAGE-A1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞がMAGE-A1：HLA四量体に結合していることを示すフローサイトメトリーのデータを示している。

【図5B】抗原発現U266骨髄腫細胞の不在下(左)または存在下(右)におけるMAGE-A1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞によるサイトカイン産生を示している。

【図5C】本開示の高親和性MAGE-A1 TCR形質導入CD8<sup>+</sup>T細胞が、抗原：MHC四量体に結合し、MAGE-A1：MHC(A\*0201)提示細胞を殺滅することを示す、特異的溶解データを示している。図5Cにおけるデータは、CD8<sup>+</sup>T細胞を、U266細胞単体の場合、外来のインターフェロン-ガンマ(IFN $\gamma$ )を伴う場合、または外来のMAGE-A1ペプチドを伴う場合に共培養した標準的なCr51放出アッセイから得たものである。

10

【図6A】CD4<sup>+</sup>T細胞が、TCR及びCD8共受容体(いずれもペプチド抗原に対し特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞からのもの)を発現するように形質導入される、本開示に従った免疫療法アプローチを図示している。形質導入CD4<sup>+</sup>T細胞の活性化は、CD8<sup>+</sup>T細胞の抗原応答(例えば、免疫療法設定における注入されたCTL)を増強または改善し得る。

20

【図6B】本開示の発明者が実施した、CD4<sup>+</sup>T細胞がCD8共受容体ではなくCD8非依存的MHCクラスI制限TCRを発現するように形質導入した実験のデザインを示している。

【図7-1】Aは、高親和性CD8抗MAGE-A1 TCRを発現するT細胞(CD8<sup>+</sup>及びCD4<sup>+</sup>)におけるMAGE-A1：MHC四量体に対する結合をアッセイした実験からのフローサイトメトリーのデータを示している。Bは、MAGE-A1特異的T細胞とMAGE-A1：MHC四量体との特異的結合を示している。Cは、本開示のMAGE-A1特異的TCRを発現するCD8<sup>+</sup>T細胞による標的細胞溶解(Cr51放出)と、同等のCD4<sup>+</sup>T細胞による殺滅の欠如とを示している。

【図7-2】Aは、高親和性CD8抗MAGE-A1 TCRを発現するT細胞(CD8<sup>+</sup>及びCD4<sup>+</sup>)におけるMAGE-A1：MHC四量体に対する結合をアッセイした実験からのフローサイトメトリーのデータを示している。Bは、MAGE-A1特異的T細胞とMAGE-A1：MHC四量体との特異的結合を示している。Cは、本開示のMAGE-A1特異的TCRを発現するCD8<sup>+</sup>T細胞による標的細胞溶解(Cr51放出)と、同等のCD4<sup>+</sup>T細胞による殺滅の欠如とを示している。

30

【図8-1】Aは、本開示の発明者らが行った、高親和性MAGE-A1クラスI TCR及びCD8共受容体を発現するようにCD4<sup>+</sup>T細胞に形質導入し、ペプチド：MHCを発現する細胞の存在下における機能性について調べた実験を説明する概略図を示している。Bは、MAGE-A1 TCR及びCD8共受容体の両方を形質導入したCD4<sup>+</sup>T細胞が、MAGE-A1 TCR単体を発現するCD4<sup>+</sup>T細胞と比較して、より高い割合でサイトカインを産生したことを示している。Cは、示されているT細胞による、抗原提示MEL526メラノーマ標的細胞の特異的溶解を示している。Dは、抗原で刺激した後の形質導入CD4<sup>+</sup>T細胞の2つの群の拡大を示している。

40

【図8-2】Aは、本開示の発明者らが行った、高親和性MAGE-A1クラスI TCR及びCD8共受容体を発現するようにCD4<sup>+</sup>T細胞に形質導入し、ペプチド：MHCを発現する細胞の存在下における機能性について調べた実験を説明する概略図を示している。Bは、MAGE-A1 TCR及びCD8共受容体の両方を形質導入したCD4<sup>+</sup>T細胞が、MAGE-A1 TCR単体を発現するCD4<sup>+</sup>T細胞と比較して、より高い割合でサイトカインを産生したことを示している。Cは、示されているT細胞による、抗原提示MEL526メラノーマ標的細胞の特異的溶解を示している。Dは、抗原で刺激し

50



た後の形質導入CD4<sup>+</sup>T細胞の2つの群の拡大を示している。

【図8-3】Aは、本開示の発明者らが行った、高親和性MAGE-A1クラスI TCR及びCD8共受容体を発現するようにCD4<sup>+</sup>T細胞に形質導入し、ペプチド:MHCを発現する細胞の存在下における機能性について調べた実験を説明する概略図を示している。Bは、MAGE-A1 TCR及びCD8共受容体の両方を形質導入したCD4<sup>+</sup>T細胞が、MAGE-A1 TCR単体を発現するCD4<sup>+</sup>T細胞と比較して、より高い割合でサイトカインを産生したことを示している。Cは、示されているT細胞による、抗原提示MEL526メラノーマ標的細胞の特異的溶解を示している。Dは、抗原で刺激した後の形質導入CD4<sup>+</sup>T細胞の2つの群の拡大を示している。

【発明を実施するための形態】

【0006】

ある特定の態様において、本開示は、主要組織適合複合体(MHC)(例えば、ヒト白血球抗原、HLA)に関連するMAGE-A1ペプチド抗原に対し特異的な結合タンパク質を含む組成物を提供する。当該組成物は、例えば、MAGE-A1発現に関連する疾患もしくは障害(例えば、がん)の処置で、またはがん処置のための養子免疫療法で使用され得る。ある特定の実施形態において、本開示は、このようなMAGE-A1特異的結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、及びMAGE-A1特異的結合タンパク質(例えば、TCR)を発現するように修飾された宿主細胞を提供する。

【0007】

他の態様において、本開示は、ペプチド抗原(例えば、MAGE-A1)に対し特異的に結合可能なCD8<sup>+</sup>T細胞からのTCRをコードする異種ポリヌクレオチドを含み、任意選択により、CD8共受容体分子の少なくとも細胞外部分をコードする異種ポリヌクレオチドを含む、修飾CD4<sup>+</sup>T細胞を提供する。

【0008】

背景として、腫瘍はかつて正常だった組織から生じることから、T細胞ベースの免疫療法にとってのほとんどの腫瘍標的は、自己抗原である。例えば、このような腫瘍関連抗原(TAA)は、がん細胞内では高レベルで発現し得るが、その他の細胞内では、発現しないまたは最小限に発現する可能性がある。胸腺内でT細胞が発達する間、自己抗原に弱く結合するT細胞は、胸腺内での生存を許され、さらなる発達及び成熟を経ることができるが、自己抗原に強力に結合するT細胞は、望ましくない自己免疫応答を開始すると考えられるため、免疫系により除去される。そのため、T細胞は、抗原に結合する相対的能力により選別されて、外部の侵入者に対し応答し(すなわち、非自己抗原の認識)、同時に自己免疫応答(すなわち、自己抗原の認識)を防止する免疫系を準備する。この寛容機構は、高い親和性を有する腫瘍(自己)抗原を認識することができる天然存在のT細胞を制約するため、腫瘍細胞を効果的に排除するであろうT細胞を除去する。その結果、腫瘍抗原に対し特異的な高親和性TCRを有するT細胞の単離は、ほとんどのこのような細胞が免疫系により実質的に除去されるため、困難である。

【0009】

本開示は、MAGE-A1(別名MAGE-1、MAGEファミリーメンバーA1、CT1.1、及びメラノーマ抗原遺伝子1)ペプチドに対し特異的なTCR、例えば、MAGE-A1ペプチドに対し特異的な高親和性TCRであって、このようなTCRを発現する細胞が、CD8に非依存的に、MAGE-A1:HLA複合体に対し結合可能である、TCRを提供する。加えて、このようなTCRは、任意選択により、内在的TCRに比べてより効率的にCD3タンパク質と会合可能であり得る。

【0010】

HLAが一致したドナーの大きなコホートから、短期間(約6~8週間)で、T細胞クローン型のスクリーニング及びランク付けを(親和性に基づいて)迅速かつ同時に行う方法が開発された。ある特定の実施形態において、本開示は、対象の免疫細胞(例えば、PBMNC)の存在下で、限定的な濃度の抗原特異的pMHC多量体を使用することにより、高親和性TCRを有する細胞を濃縮するための方法を提供する。TCRレパトリー及び

10

20

30

40

50

頻度解析をバイオインフォマティックスと合わせて使用して、T C R 鎖及び 鎖の対を正確に同定した。このような方法の利点は、個別のT C Rのクローニングとは対照的に、複数のドナーからの数千のクローンのT C R親和性を迅速に比較することが可能になることである。

#### 【 0 0 1 1 】

本明細書で説明される組成物及び方法は、ある特定の実施形態において、M A G E - A 1 発現に関連する疾患及び状態の処置に対する治療有用性を有する。このような疾患としては、様々な形態の過剰増殖障害、例えば、血液悪性腫瘍及び固形がんが挙げられる。これら及び関連する使用における非限定的な例が本明細書で説明されており、このような例としては、例えば、M A G E - A 1 ペプチドに対し特異的な強化されたまたは高い親和性T C Rを発現する組換えT細胞の使用による、M A G E - A 1 抗原特異的T細胞応答の*i n v i t r o*、*e x v i v o*、及び*i n v i v o*刺激が挙げられる。

10

#### 【 0 0 1 2 】

本開示をより詳細に記載する前に、本明細書で使用されるある特定の用語の定義を示すことが本開示の理解に役立つ可能性がある。追加的な定義は、本開示全体にわたって記載される。

#### 【 0 0 1 3 】

本明細書において、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲、または整数範囲は、別段の指示がない限り、記載範囲内の任意の整数の値、及び適切な場合はその端数（例えば、ある整数の10分の1及び100分の1）を含むように理解されたい。また、本明細書に記載されている任意の物理的特色に関する任意の数字範囲、例えば、ポリマーサブユニット、サイズ、または厚さは、別段の指示がない限り、記載範囲内の任意の整数を含むように理解されたい。本明細書で使用する「約」という用語は、別段の指示がない限り、示されている範囲、値、または構造の±20%を意味する。本明細書で使用する「a」及び「an」という用語は、挙げられている構成要素における「1つ以上」を指すものと理解されたい。選択肢（例えば、「または」）の使用は、選択肢のうちの1つ、両方、またはその任意の組合せのいずれかを意味するものと理解されたい。本明細書で使用する「含む（*i n c l u d e*）」、「有する（*h a v e*）」、及び「含む（*c o m p r i s e*）」という用語は同義語として使用され、これらの用語及びその変形形態は、非限定的と解釈されるように意図されている。

20

#### 【 0 0 1 4 】

加えて、本明細書に記載されている構造及び置換基の様々な組合せから誘導される、個別の化合物、または化合物群は、各化合物または化合物群が個別に記載されている場合と同じ程度に本出願によって開示されているものと理解されたい。したがって、特定の構造または特定の置換基の選択は、本開示の範囲内にある。

#### 【 0 0 1 5 】

「～から本質的になる（*c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f*）」という用語は、「含む（*c o m p r i s i n g*）」と等価ではなく、請求項における指定された材料もしくはステップ、または特許請求されている主題の基本的特徴に実質的な影響を及ぼさない材料もしくはステップを指す。例えば、あるタンパク質ドメイン、領域、もしくはモジュール（例えば、結合ドメイン、ヒンジ領域、リンカーモジュール）、またはタンパク質（1つ以上のドメイン、領域、もしくはモジュールを有し得る）が特定のアミノ酸配列「から本質的になる」のは、ドメイン、領域、モジュール、またはタンパク質におけるこの特定のアミノ酸配列が、合わせて、ドメイン、領域、モジュール、またはタンパク質の長さのうちの多くても20%（例えば、多くても15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%）に寄与しドメイン（複数可）、領域（複数可）、モジュール（複数可）、またはタンパク質の活性（例えば、結合タンパク質の標的結合親和性）に実質的に影響を及ぼさない（すなわち、活性を50%を超えて低減しない、例えば、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、または1%以下）伸長、欠失、変異、またはこれらの組合せを（例えば、アミノもしくはカルボキシ末端、またはドメ

40

50

イン間にて)含む場合である。

#### 【0016】

本明細書で使用する「免疫系細胞」とは、骨髓内の造血幹細胞から生じる免疫系の任意の細胞を意味し、造血幹細胞は、2つの主な系列、骨髓前駆細胞(単球、マクロファージ、樹状細胞、巨核球、及び顆粒球のような骨髓細胞をもたらす)、ならびにリンパ球様前駆細胞(T細胞、B細胞、及びナチュラルキラー(NK)細胞のようなリンパ球様細胞をもたらす)をもたらす。例示的な免疫系細胞としては、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4-CD8-ダブルネガティブT細胞、T細胞、制御性T細胞、ナチュラルキラー細胞、及び樹状細胞が挙げられる。マクロファージ及び樹状細胞は、「抗原提示細胞」または「APC」と呼ばれることがあり、ペプチドと複合体化したAPCの表面上にある主要組織適合複合体(MHC)受容体がT細胞の表面上にあるTCRと相互作用したときに、T細胞を活性化することができる特化型細胞である。

10

#### 【0017】

「主要組織適合複合体」(MHC)とは、細胞表面にペプチド抗原を送達する糖タンパク質を指す。MHCクラスI分子は、(3つのドメインを有する)鎖にまたがる膜と、非共有結合的に会合した2ミクログロブリンとを有するヘテロ二量体である。MHCクラスII分子は、2つの膜貫通糖タンパク質、及びから構成され、これらの両方が膜にまたがっている。各鎖は2つのドメインを有する。MHCクラスI分子は、サイトゾル内で生じたペプチドを細胞表面に送達し、細胞表面で、ペプチド:MHC複合体はCD8+T細胞に認識される。MHCクラスII分子は、小胞系内で生じたペプチドを細胞表面に送達し、細胞表面で、これらはCD4+T細胞に認識される。ヒトMHCは、ヒト白血球抗原(HLA)と呼ばれる。

20

#### 【0018】

「T細胞」は、胸腺内で成熟し、T細胞受容体(TCR)を産生する免疫系細胞である。T細胞は、ナイーブ(抗原に曝露されず、TCMとの比較におけるCD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127、及びCD45RAの発現増大、ならびにCD45ROの発現低下)と、メモリーT細胞(TM)(抗原経験、長寿命)と、エフェクター細胞(抗原経験、細胞傷害性)とであり得る。TMは、さらに、セントラルメモリーT細胞(TCM、ナイーブT細胞との比較におけるCD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO、及びCD95の発現増大、ならびにCD54RAの発現低下)と、エフェクターメモリーT細胞(TEM、ナイーブT細胞またはTCMとの比較におけるCD62L、CCR7、CD28、CD45RAの発現低下、及びCD127の発現増大)とのサブセットに分類することができる。エフェクターT細胞(TE)とは、TCMとの比較においてCD62L、CCR7、CD28の発現低下を有し、グランザイム及びパーフォリンが陽性である、抗原経験CD8+細胞傷害性Tリンパ球を指す。その他の例示的なT細胞としては、制御性T細胞、例えば、CD4+CD25+(Foxp3+)制御性T細胞及びTreg17細胞、ならびにTr1、Th3、CD8+CD28-、及びQa-1制限T細胞が挙げられる。

30

#### 【0019】

「T細胞受容体」(TCR)とは、MHC受容体に結合している抗原ペプチドに特異的に結合可能な免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー(可変結合ドメイン、定常ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞質側末端を有する;例えば、Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997を参照)を指す。TCRは、細胞の表面上で、または可溶形態で見いだすことができ、概して、鎖及び鎖を有するヘテロ二量体(それぞれTCR及びTCRとしても知られている)、または鎖及び鎖を有するヘテロ二量体(それぞれTCR及びTCRとしても知られている)から構成される。免疫グロブリンのように、TCR鎖の細胞外部分(例えば、鎖、鎖)は、2つの免疫グロブリンドメイン、すなわちN末端における可変ドメイン(例えば、鎖可変ドメイン

40

50

またはV<sub>H</sub>、ベータ鎖可変ドメインまたはV<sub>L</sub>；典型的にはKabatナンバリング(Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)に基づくアミノ酸1~116)と、細胞膜に隣接する1つの定常ドメイン(例えば、鎖定常ドメインまたはC<sub>H1</sub>(典型的には、Kabatに基づくアミノ酸117~259)、鎖定常ドメインまたはC<sub>L</sub>(典型的には、Kabatに基づくアミノ酸117~296))とを含有する。これもまた免疫グロブリンのように、可変ドメインは、フレームワーク領域(FR)によって分離された相補性決定領域(CDR)を含有する(例えば、Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988を参照; また、Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003も参照)。ネイティブTCRのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>は、概して同様の構造を有し、各可変ドメインは、4つの保存FR及び3つのCDRを含む。V<sub>H</sub>ドメインは、2つの別々のDNAセグメント、可変遺伝子セグメント及び連結遺伝子セグメント(V-J)によってコードされ、V<sub>L</sub>ドメインは、3つの別々のDNAセグメント、可変遺伝子セグメント、多様性遺伝子セグメント、及び連結遺伝子セグメント(V-D-J)によってコードされる。単一のV<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>ドメインは、抗原結合特異性を与えるのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合するTCRは、当該抗原に結合するTCRからのV<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>ドメインを用いて、それぞれ、相補的なV<sub>H</sub>ドメインまたはV<sub>L</sub>ドメインのライブラリーをスクリーニングすることで、単離することができる。ある特定の実施形態において、TCRは、T細胞(またはTリンパ球)の表面上に見いだされ、CD3複合体と会合する。本開示で使用するTCRの供給源は、様々な動物種、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、またはその他の動物からのものであり得る。

#### 【0020】

本明細書で使用する「CD8共受容体」または「CD8」という用語は、アルファ-アルファホモ二量体またはアルファ-ベータヘテロ二量体のいずれかとしての、細胞表面糖タンパク質CD8を意味する。CD8共受容体は、細胞傷害性T細胞(CD8<sup>+</sup>)の機能を支援し、その細胞質チロシンリン酸化経路を介したシグナリングを通じて機能する(Gao and Jakobsen, Immunol. Today 21:630-636, 2000; Cole and Gao, Cell. Mol. Immunol. 1:81-88, 2004)。5つの異なるCD8ベータ鎖(UniProtKB識別子P10966を参照)と、単一のCD8アルファ鎖(UniProtKB識別子P01732を参照)とが存在する。概して、CD8は、pMHCクラスI複合体に結合する。

#### 【0021】

「CD4共受容体」または「CD4」とは、TCRの抗原提示細胞との連絡を支援する免疫グロブリン共受容体糖タンパク質を指す(Campbell & Reece, Biology 909(Benjamin Cummings, Sixth Ed., 2002)を参照)。CD4は、免疫細胞、例えば、ヘルパーT細胞、単球、マクロファージ、及び樹状細胞の表面上に見いだされ、細胞表面で発現する4つの免疫グロブリンドメイン(D1~D4)を含む。抗原提示の間、CD4はTCR複合体と共に動員されて、MHC II分子の異なる領域に結合する(CD4はMHC II 2に結合し、一方TCR複合体はMHC II 1/1に結合する)。理論に拘泥することは望まないが、TCR複合体に近接していることで、CD関連キナーゼ分子が、CD3の細胞質ドメイン上に存在する免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)をリン酸化することが可能になると考えられている。この活性は、様々なタイプのヘルパーT細胞を産生するために活性化TCRによって生成されたシグナルを増幅すると考えられる。概して、CD4は、pMHCクラスII複合体に結合する。

#### 【0022】

10

20

30

40

50

「CD3」は、6つの鎖のマルチタンパク質複合体である (Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., p172及び178, 1999を参照)。哺乳類において、この複合体は、CD3 鎖、CD3 鎖、2つのCD3 鎖、及びCD3 鎖のホモ二量体を含む。CD3 鎖、CD3 鎖及びCD3 鎖は、単一の免疫グロブリンドメインを含有する、免疫グロブリンスーパーファミリーにおける高関連性の細胞表面タンパク質である。CD3 鎖、CD3 鎖、及びCD3 鎖の膜貫通領域は負に帯電しており、この特徴が、これらの鎖と正に帯電したT細胞受容体鎖との会合を可能にする。CD3 鎖、CD3 鎖、及びCD3 鎖の細胞内尾部は、それぞれ、免疫受容体チロシン活性化モチーフまたはITAMとして知られている単一の保存モチーフを含有し、一方各CD3 鎖は3つずつ有する。理論に拘泥することは望まないが、ITAMはTCR複合体のシグナリング能力にとって重要であると考えられている。本開示で使用するCD3は、ヒト、マウス、ラット、またはその他の動物を含めた様々な動物種からのものであり得る。

10

#### 【0023】

本明細書で使用する「TCR複合体」とは、CD3とTCRとの会合により形成される複合体を指す。例えば、TCR複合体は、CD3 鎖、CD3 鎖、2つのCD3 鎖、CD3 鎖のホモ二量体、TCR 鎖、及びTCR 鎖から構成され得る。代替的に、TCR複合体は、CD3 鎖、CD3 鎖、2つのCD3 鎖、CD3 鎖のホモ二量体、TCR 鎖、及びTCR 鎖から構成され得る。

#### 【0024】

本明細書で使用する「TCR複合体の構成要素」とは、TCR鎖(すなわち、TCR 鎖、TCR 鎖、TCR 鎖、もしくはTCR 鎖)、CD3鎖(すなわち、CD3 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖)、または2つ以上のTCR鎖もしくはCD3鎖によって形成された複合体(例えば、TCR 鎖及びTCR 鎖の複合体、TCR 鎖及びTCR 鎖の複合体、CD3 鎖及びCD3 鎖の複合体、CD3 鎖及びCD3 鎖の複合体、もしくはTCR 鎖、TCR 鎖、CD3 鎖、CD3 鎖、及び2つのCD3 鎖のサブTCR複合体)を指す。

20

#### 【0025】

本明細書で使用する「結合ドメイン」(「結合領域」または「結合部分」とも呼ばれる)とは、標的(例えば、MAGE-A1、MAGE-A1ペプチド:MHC複合体)と特異的かつ非共有結合的に会合、合体、または化合する能力を有する分子またはその一部分(例えば、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質)を指す。結合ドメインには、生物学的分子、分子複合体(すなわち、2つ以上の生物学的分子を含む複合体)、またはその他の目的標的に対する任意の天然存在、合成、半合成、または組換え産生された結合パートナーが含まれる。例示的な結合ドメインとしては、1本鎖免疫グロブリン可変領域(例えば、scTCR、scFv)、受容体外部ドメイン、リガンド(例えば、サイトカイン、ケモカイン)、または生物学的分子、分子複合体、もしくはその他の目的標的に結合する特定の能力について選択された合成ポリペプチドが挙げられる。

30

#### 【0026】

本明細書で使用する「特異的に結合する」または「~に対し特異的」とは、親和性または $K_a$ (すなわち、 $1/M$ の単位を用いた特定の結合相互作用の平衡会合定数)が $10^5 M^{-1}$ (この会合反応におけるオン速度 $[k_{on}]$ のオフ速度 $[k_{off}]$ に対する比率に等しい)以上である、結合タンパク質(例えば、TCR受容体)または結合ドメイン(もしくはその融合タンパク質)と標的分子との会合または合併であって、他の任意の分子または構成要素と有意に会合または合併しない、会合または合併を指す。結合タンパク質または結合ドメイン(もしくはその融合タンパク質)は、「高親和性」の結合タンパク質または結合ドメイン(もしくはその融合タンパク質)としても「低親和性」の結合タンパク質または結合ドメイン(もしくはその融合タンパク質)としても分類され得る。「高親和性」の結合タンパク質または結合ドメインとは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、少なくとも $10^9 M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11} M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12} M^{-1}$ 、または少なくとも $10^{13} M^{-1}$ の $K_a$ を有する結合タンパク質または結合ドメインを指す。「低親和性」結合タンパク質または結合ドメイ

40

50

ンとは、最大  $10^7 \text{ M}^{-1}$ 、最大  $10^6 \text{ M}^{-1}$ 、最大  $10^5 \text{ M}^{-1}$  の  $K_a$  を有する結合タンパク質または結合ドメインを指す。代替的に、親和性は、M の単位を用いた特定の結合相互作用の平衡解離定数 ( $K_d$ ) (例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ) として定義され得る。

#### 【0027】

ある特定の実施形態において、受容体または結合ドメインは「強化された親和性」を有し得、これは、標的抗原に対する結合が野生型（または親）結合ドメインよりも強力な、選択または操作された受容体または結合ドメインを指す。例えば、強化された親和性は、標的抗原に対する  $K_a$ （平衡会合定数）が野生型の結合ドメインよりも高いことに起因することもある。ある特定の実施形態において、強化された親和性の TCR は、特定の宿主細胞、例えば、T 細胞における発現を強化するように、コドン最適化され得る (Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135, 2006)。

10

#### 【0028】

特定の標的に特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するための、及び結合ドメインまたは融合タンパク質の親和性を定量するためのアッセイは様々なものが知られており、例えば、ウェスタンブロット法、ELISA、解析用超遠心分離法、分光法、表面プラズモン共鳴 (Biacore (登録商標)) 解析法がある (例えば、Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff et al., Cancer Res. 53:2560, 1993; 及び米国特許第 5,283,173 号、第 5,468,614 号、または等価物を参照)。

20

#### 【0029】

「MAGE-A1 特異的結合タンパク質」という用語は、MAGE-A1 またはそのペプチドもしくは断片に特異的に結合するタンパク質またはポリペプチドを指す。一部の実施形態において、MAGE-A1 特異的結合タンパク質またはポリペプチドは、MAGE-A1 またはそのペプチド、例えば、MHC または HLA 分子と複合体化した MAGE-A1 ペプチドに、例えば、細胞表面上で、少なくとも特定の親和性で、または少なくともおよそ特定の親和性で結合する。ある特定の実施形態において、MAGE-A1 特異的結合タンパク質は、MAGE-A1 由来ペプチド:HLA 複合体（または MAGE-A1 由来ペプチド:MHC 複合体）に、約  $10^{-8} \text{ M}$  未満、約  $10^{-9} \text{ M}$  未満、約  $10^{-10} \text{ M}$  未満、約  $10^{-11} \text{ M}$  未満、約  $10^{-12} \text{ M}$  未満、もしくは約  $10^{-13} \text{ M}$  未満の  $K_d$  で、または、例えば、本明細書で提供される MAGE-A1 特異的 TCR のいずれかのような、本明細書で提供される例示的な MAGE-A1 特異的結合タンパク質により、同じアッセイによる測定で示される親和性とおよそ同じ、少なくともおよそ同じ、もしくはそれより大きいおおよそそれくらいの親和性で、結合する。ある特定の実施形態において、MAGE-A1 特異的結合タンパク質は、MAGE-A1 特異的免疫グロブリンスーパーファミリー結合タンパク質またはその結合部分を含む。

30

40

#### 【0030】

親和性、または見かけ上の親和性、または相対的親和性を評価するためのアッセイとしては、例えば、様々な濃度の四量体への結合を、例えば標識四量体を用いたフローサイトメトリーによって評価することによる、TCR に対する（または TCR から誘導される結合ドメインを含む結合タンパク質に対する）見かけ上の親和性の測定が挙げられる。一部の例において、TCR の見かけ上の  $K_D$  は、様々な濃度の標識四量体の 2 倍希釈物を用いて測定され、その後非線形回帰によって結合曲線が決定され、見かけ上の  $K_D$  は、最大半量の結合をもたらすリガンドの濃度として決定される。

#### 【0031】

「MAGE-A1 結合ドメイン」または「MAGE-A1 結合断片」という用語は、特異

50

的 M A G E - A 1 結合を担う M A G E - A 1 特異的結合タンパク質のドメインまたは一部分を指す。M A G E - A 1 特異的結合ドメイン単体（すなわち、M A G E - A 1 特異的結合タンパク質の他のいかなる部分も伴わない）は可溶性であり得、M A G E - A 1 に、約 1 0 - 8 M 未満、約 1 0 - 9 M 未満、約 1 0 - 1 0 M 未満、約 1 0 - 1 1 M 未満、約 1 0 - 1 2 M 未満、または約 1 0 - 1 3 M 未満の  $K_D$  で結合することができる。例示的な M A G E - A 1 特異的結合ドメインとしては、M A G E - A 1 特異的 s c T C R（例えば、1 本鎖 T C R タンパク質、例えば、V - L - V、V - L - V、V - C - L - V、または V - L - V - C（V 及び V は、それぞれ T C R 及び 可変ドメインであり、C 及び C は、それぞれ T C R 及び 定常ドメインであり、L はリンカーである））、ならびに本明細書に記載の s c F v 断片が挙げられ、これらは、抗 M A G E - A 1 T C R または抗体から誘導され得る。

10

#### 【0032】

抗原提示細胞（A P C）（例えば、樹状細胞、マクロファージ、リンパ球、またはその他の細胞タイプ）による抗原処理の原理、及び A P C による T 細胞への抗原提示（免疫適合性（例えば、抗原提示に関係する M H C 遺伝子の少なくとも 1 つのアレル形態を共有する）A P C と T 細胞との間の主要組織適合複合体（M H C）制限提示を含む）の原理は、十分に確立されている（例えば、Murphy, Janeway's Immunobiology (8<sup>th</sup> Ed.) 2011 Garland Science, NY; chapters 6, 9 and 16 を参照）。例えば、サイトゾル内で生じる処理済み抗原ペプチド（例えば、腫瘍抗原、細胞内病原体）は、概して約 7 アミノ酸～約 1 1 アミノ酸長であり、クラス I M H C 分子と会合するが、一方小胞系で処理されたペプチド（例えば、細菌、ウイルス）は、約 1 0 アミノ酸～約 2 5 アミノ酸と長さが様々であり、クラス II M H C 分子と会合する。

20

#### 【0033】

「M A G E - A 1 抗原」または「M A G E - A 1 ペプチド抗原」とは、長さが約 7 アミノ酸～約 1 5 アミノ酸の範囲の天然または合成により産生された M A G E - A 1 タンパク質の一部分を指し、これは M H C（例えば、H L A）分子との複合体を形成することができ、このような複合体は、M A G E - A 1 ペプチド：M H C（例えば、H L A）複合体に対し特異的な T C R と結合することができる。

#### 【0034】

「リンカー」とは、2 つのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ドメイン、領域、またはモチーフを接続するアミノ酸配列を指し、リンカーは、2 つのサブ結合ドメインの相互作用に適合性のスペーサー機能を提供して、得られるポリペプチドが、標的分子に対する特異的結合親和性を保持する（例えば、s c T C R）、またはシグナリング活性を保持する（例えば、T C R 複合体）ようにすることができる。ある特定の実施形態において、リンカーは、約 2 ～約 3 5 アミノ酸から構成され、例えば、または約 4 ～約 2 0 アミノ酸、または約 8 ～約 1 5 アミノ酸、または約 1 5 ～約 2 5 アミノ酸から構成される。

30

#### 【0035】

「接合部アミノ酸（junction amino acid）」または「接合部アミノ酸残基」とは、ポリペプチドにおける 2 つの隣接するモチーフ間、領域間、またはドメイン間の、例えば、結合ドメインと隣接する定常ドメインとの間、または T C R 鎖と隣接する自己切断ペプチドとの間の 1 つ以上（例えば、約 2 ～1 0）のアミノ酸残基を指す。接合部アミノ酸は、融合タンパク質のコンストラクト設計からもたらされ得る（例えば、融合タンパク質をコードする核酸分子の構築中に制限酵素部位を使用することから得られるアミノ酸残基）。

40

#### 【0036】

「改変ドメイン」または「改変タンパク質」とは、野生型のモチーフ、領域、ドメイン、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質（例えば、野生型の T C R 鎖、T C R 鎖、T C R 定常ドメイン、T C R 定常ドメイン）に対し、少なくとも 8 5 % の同一でない配列同一性（例えば、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9

50

3 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.1 %、99.2 %、99.3 %、99.4 %、99.5 %、99.6 %、99.7 %、99.8 %、99.9 %)を有するモチーフ、領域、ドメイン、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を指す。

#### 【0037】

本明細書で使用する「核酸」または「核酸分子」または「ポリヌクレオチド」とは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、オリゴヌクレオチド、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または*in vitro*翻訳によって生成された断片、及びライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、またはエキソヌクレアーゼ作用のうちのいずれかによって生成された断片、のうちのいずれかを指す。ある特定の実施形態において、本開示の核酸は、PCRによって産生される。核酸は、天然存在のヌクレオチド(例えば、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチド)、天然存在のヌクレオチドのアナログ(例えば、天然存在のヌクレオチドのエナンチオマー形態)、または両方の組合せである単量体から構成され得る。修飾ヌクレオチドは、糖部分、またはピリミジンもしくはプリン塩基部分内に修飾を有するか、またはこれらの置換えを有し得る。核酸単量体は、ホスホジエステル結合またはこのような結合のアナログにより結合され得る。ホスホジエステル結合のアナログとしては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホセレノエート(phosphoroselenoate)、ホスホロジセレノエート(phosphorodiselenoate)、ホスホロアニロチオエート(phosphoroanilothioate)、ホスホロアニリデート(phosphoranilidate)、ホスホロアミデートなどが挙げられる。核酸分子は、1本鎖であっても2本鎖であってもよい。

#### 【0038】

「単離された」という用語は、材料が、材料の元の環境(例えば、材料が天然に存在する場合は自然環境)から取り出されることを意味する。例えば、生きている動物内に存在する天然存在の核酸またはポリペプチドは単離されていないが、自然系内に共存する材料の一部または全てから分離した同じ核酸またはポリペプチドは単離されている。このような核酸はベクターの一部になり得、及び/またはこのような核酸またはポリペプチドは組成物(例えば、細胞可溶化物)の一部になり得るが、このようなベクターまたは組成物が核酸またはポリペプチドにとっての自然環境の一部ではないという点において、このような核酸は依然として単離されている。「遺伝子」という用語は、ポリペプチド鎖の産生に参与するDNAのセグメントを意味し、遺伝子は、コード領域の前及び後に「リーダー及びトレーラー」領域を含み、さらに個別のコードセグメント(エクソン)間に介在配列(イントロン)を含む。

#### 【0039】

本明細書で使用する「修飾された」、「操作された」、または「組換え」という用語は、人の介入により遺伝子的に操作された、すなわち、外来もしくは異種の核酸分子の導入により修飾された、細胞、微生物、核酸分子、もしくはベクターを指し、または、内在の核酸分子もしくは遺伝子の発現が調節されている、制御解除されている、または構成的であるように改変された細胞もしくは微生物を指す。ヒトにより生成される遺伝子改変としては、例えば、1つ以上のタンパク質もしくは酵素をコードする核酸分子(これには、プロモーターのような発現調節エレメントが含まれ得る)を導入する修飾、またはその他の核酸分子の付加、欠失、置換、または細胞の遺伝子材料に対するその他の機能的な破壊もしくは追加が挙げられ得る。例示的な修飾としては、参照分子または親分子からの異種または相同のポリペプチドのコード領域またはその機能的断片における修飾が挙げられる。

#### 【0040】

本明細書で使用する「変異」とは、参照または野生型の核酸分子またはポリペプチド分子と比較しての、それぞれ核酸分子またはポリペプチド分子の配列の変化を指す。変異は、ヌクレオチド(複数可)またはアミノ酸(複数可)の置換、挿入、または欠失を含めた、配列におけるいくつかの異なるタイプの変化をもたらし得る。ある特定の実施形態におい

10

20

30

40

50



て、変異は、1つもしくは3つのコドンもしくはアミノ酸の置換、1つ～約5つのコドンもしくはアミノ酸の欠失、またはこれらの組合せである。

【0041】

「保存的置換」とは、当技術分野では、あるアミノ酸の、同様の特性を有する別のアミノ酸に対する置換として認識されている。例示的な保存的置換は、例えば、WO 97/09433の10ページ；Lehninger, Biochemistry, 2nd Edition；Worth Publishers, Inc. NY, NY, pp. 71-77, 1975；及びLewin, Genes IV, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA, p. 8, 1990で説明されている。アミノ酸の保存的置換は、天然に生じる場合もあれば、結合タンパク質またはTCRが組換えにより産生されたときに導入される場合もある。アミノ酸の置換、欠失、及び付加は、当技術分野で公知の変異誘発法を用いてタンパク質に導入することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001を参照）。オリゴヌクレオチド指向の部位特異的（またはセグメント特異的）変異誘発手順を用いて、所望の置換、欠失、または挿入に応じて改変された特定のコドンを有する改変ポリヌクレオチドをもたらすことができる。代替的に、ランダムまたは飽和の変異誘発技法、例えば、アラニンスキャニング変異誘発、エラープロンポリメラーゼ連鎖反応変異誘発、及びオリゴヌクレオチド指向変異誘発を使用して、免疫原ポリペプチドバリエーションを調製することができる（例えば、Sambrook et al.（上記）を参照）。

【0042】

「コンストラクト」という用語は、組換え核酸分子を含有する任意のポリヌクレオチドを指す。コンストラクトは、ベクター（例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター）内に存在する場合もあれば、ゲノム内に組み込まれる場合もある。

【0043】

「ベクター」とは、別の核酸分子を輸送可能な核酸分子である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス、RNAベクター、または直鎖状もしくは環状のDNAもしくはRNA分子（染色体性、非染色体性、半合成、もしくは半合成の核酸分子が含まれ得る）であり得る。例示的なベクターは、自己複製可能なもの、または自らが結合している核酸分子を発現可能なもの（発現ベクター）である。

【0044】

「作用可能に結合した」または「作用的に結合した」という用語は、2つ以上の核酸分子が、単一の核酸分子または断片上で、一方の機能が他方の機能の影響を受けるように会合することを指す。例えば、プロモーターは、コード配列の発現に影響を及ぼすことが可能である（すなわち、コード配列がプロモーターの転写調節下にある）とき、そのコード配列と作用可能に結合している。「非結合」とは、会合している遺伝子エレメントが、互いに密接に関連しておらず、一方の機能が他方に影響を及ぼさないことを意味する。

【0045】

本明細書で使用する「発現ベクター」とは、好適な宿主内で核酸分子の発現に影響を及ぼすことが可能な好適な調節配列に作用可能に結合した核酸分子を含有する、DNAコンストラクトを指す。このような調節配列としては、転写に影響を及ぼすプロモーター、このような転写を調節する任意選択のオペレーター配列、好適なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写及び翻訳の終結を調節する配列が挙げられる。ベクターは、プラスミド、ファージ粒子、ウイルス、または単に潜在的なゲノム挿入物であり得る。ベクターは、ひとたび好適な宿主に形質転換されると、宿主ゲノムに非依存的に複製及び機能する場合もあれば、一部の場合には、ゲノム自体に組み込まれる場合もある。本明細書において、「プラスミド」、「発現プラスミド」、「ウイルス」、及び「ベクター」は、しばしば互換的に使用される。

【0046】

本明細書で使用する「発現」という用語は、遺伝子のような核酸分子のコード配列に基づいて、ポリペプチドが産生されるプロセスを指す。当該プロセスとしては、転写、転写後調節、転写後修飾、翻訳、翻訳後調節、翻訳後修飾、またはこれらの任意の組合せが挙げられ得る。

【0047】

核酸分子を細胞内に挿入する文脈における「導入される」という用語は、「トランスフェクション」、または「形質転換」、または「形質導入」を意味し、核酸分子が真核または原核細胞内に組み込まれることへの言及を含み、核酸分子は、細胞のゲノム（例えば、染色体、プラスミド、プラスチド、またはミトコンドリアDNA）内に組み込まれる場合もあれば、自律レプリコンに変換される場合もあれば、一過性に発現する（例えば、トランスフェクションmRNA）場合もある。

10

【0048】

本明細書で使用する「異種」または「外来」の核酸分子、コンストラクト、または配列とは、宿主細胞に対しネイティブではないが、宿主細胞からのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一部に対し相同であり得る、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一部を指す。異種または外来のポリヌクレオチド、コンストラクト、または配列の供給源は、異なる属または種からのものであり得る。ある特定の実施形態において、異種または外来の（すなわち、内在またはネイティブでない）ポリヌクレオチドは、例えば、結合体化、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーションなどにより、宿主細胞または宿主ゲノムに加えられ、加えられた分子は、宿主ゲノム内に組み込まれるか、または染色体外遺伝子材料として（例えば、プラスミドまたはその他の自己複製ベクター形態として）存在し得、複数の複製物内に存在し得る。加えて、「異種」とは、宿主細胞が相同なタンパク質または活性をコードする場合であっても、宿主細胞内に導入された外来のポリヌクレオチドによってコードされる、ネイティブでない酵素、タンパク質、またはその他の活性を指す。

20

【0049】

本明細書で説明されているように、2つ以上の異種または外来の核酸分子は、別々のポリヌクレオチドとして、複数の個別に調節された遺伝子として、ポリシストロニックなポリヌクレオチドとして、融合タンパク質をコードする単一の核酸分子として、またはこれらの任意の組合せで、宿主細胞内に導入することができる。例えば、本明細書で開示されているように、宿主細胞は、MAGE-A1抗原ペプチドに対し特異的な所望のTCR（例えば、TCR 及びTCR ）をコードする2つ以上の異種または外来のポリヌクレオチドを発現するように修飾され得る。2つ以上の外来の核酸分子が宿主細胞内に導入されたとき、2つ以上の外来の核酸分子は、単一のポリヌクレオチドとして（例えば、単一のベクター上で）、別々のベクター上で、単一の部位もしくは複数の部位にて宿主染色体内に組み込まれて、またはこれらの任意の組合せで導入され得ると理解されている。言及される異種の核酸分子またはタンパク質活性の数は、コードする核酸分子の数またはタンパク質活性の数を指し、宿主細胞内に導入された別々のポリヌクレオチドの数を指すわけではない。

30

【0050】

本明細書で使用する「内在」または「ネイティブ」という用語は、宿主細胞内に通常存在する遺伝子、タンパク質、または活性を指す。さらに、親の遺伝子、タンパク質、または活性との比較における変異、過剰発現、シャッフル、重複、または他の方法による改変が行われた遺伝子、タンパク質、または活性は、その特定の宿主細胞に対し、依然内在的またはネイティブであるとみなされる。例えば、第1の遺伝子（例えば、プロモーター、翻訳減衰配列）からの内在的調節配列は、第2のネイティブな遺伝子または核酸分子の発現を改変または制御するのに使用することができ、この第2のネイティブな遺伝子または核酸分子の発現または制御は、親細胞における通常の発現または制御とは異なる。

40

【0051】

「相同」または「ホモログ」という用語は、宿主の細胞、種、または株に見いだされるま

50

たはこれらから誘導される分子または活性を指す。例えば、異種または外来の核酸分子は、ネイティブな宿主細胞遺伝子に対し相同であり得、また任意選択により、改変された発現レベル、異なる配列、改変された活性、またはこれらの任意の組合せを有し得る。

#### 【0052】

本明細書で使用する「配列同一性」とは、配列をアラインメントしギャップを導入して、必要な場合は最大パーセント配列同一性を達成した後に、1つの配列内での、もう1つの参照ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一であるアミノ酸残基のパーセンテージを指し、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮しない。パーセンテージ配列同一性の値は、Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402により定義されたNCBI BLAST 2.0ソフトウェアを用いて生成することができ、パラメーターはデフォルト値に設定する。

10

#### 【0053】

本明細書で使用する「造血前駆細胞」とは、造血幹細胞または胎児組織から誘導することができ、成熟細胞タイプ（例えば、免疫系細胞）へのさらなる分化が可能な細胞である。例示的な造血前駆細胞としては、CD24<sup>Lo</sup> Lin<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> 表現型を有する細胞、または胸腺内に見いだされる細胞（前駆胸腺細胞と呼ばれる）が挙げられる。

#### 【0054】

本明細書で使用する「宿主」という用語は、目的ポリペプチド（例えば、高いまたは強化された親和性の抗MAGE-A1 TCR）を産生する異種または外来の核酸分子を用いた遺伝子修飾の標的となる細胞（例えば、T細胞）または微生物を指す。ある特定の実施形態において、宿主細胞は、任意選択により、異種または外来のタンパク質の生合成に関連するまたは関連しない所望の特性をもたらす他の遺伝子修飾（例えば、検出可能マーカ、欠失、改変、または切断された内在的TCR、共刺激因子発現の増大）を既に有してもよく、またはこのような遺伝子修飾を含むように修飾されてもよい。ある特定の実施形態において、宿主細胞は、MAGE-A1抗原ペプチドに対し特異的なTCR鎖をコードする異種または外来の核酸分子を形質導入した、ヒト造血前駆細胞である。

20

#### 【0055】

本明細書で使用する「過剰増殖障害」とは、正常細胞または病的でない細胞との比較における過度の成長または増殖を指す。例示的な過剰増殖障害としては、腫瘍、がん、新生物性組織、癌腫、肉腫、悪性細胞、前悪性細胞、及び非新生物性または非悪性の過剰増殖障害（例えば、腺腫、線維腫、脂肪腫、平滑筋腫、血管腫、線維症、再狭窄、及び自己免疫疾患、例えば、関節リウマチ、変形性関節症、乾癬、炎症性腸疾患など）が挙げられる。

30

#### 【0056】

MAGE-A1抗原ペプチドに対し特異的な結合タンパク質  
ある特定の態様において、本開示は、MAGE-A1またはMAGE-A1ペプチド抗原、例えば、HLA分子と複合体化したMAGE-A1ペプチドに対し特異的に結合する結合タンパク質（例えば、TCR、1本鎖TCR（scTCR）、またはCAR）をコードする異種ポリヌクレオチドを含む修飾細胞を提供する。

40

#### 【0057】

背景として、免疫療法の理想的な標的は、悪性組織における高発現及び正常組織における限定発現～無発現を伴う免疫原性タンパク質である。がん/精巢抗原（CTA）として知られている固有の一群は、様々な悪性組織で発現するが、精巢の生殖細胞を除く健康な成体組織での発現が低レベルであることから、有望な免疫療法標的として同定されている（Ademuyiwa et al. *PLoS One*, 7(6):e38783(2012); Badovinac Crnjjevic et al., *Med Oncol.*, 29(3):1586-91(2012); Curigliano, G. et al., *Ann. Oncol.*, 22(1):98-103(2011)）。さらに、CTAは、より高グレードの病変及びアグレッシブな悪性腫瘍で特に発現し、不十分な臨床成績を伴う（

50

Barrow et al., Clin Cancer Res., 12 (3 Pt 1): 764 - 71 (2006); Gure, et al. Clin Cancer Res., 11 (22): 8055 - 62 (2005); Velazquez et al., Cancer Immun., 7: 11 (2007)). MAGEファミリータンパク質は、メラノーマ、肺、卵巣、多発性骨髄腫、及びTNBCのような多くの腫瘍タイプで広く発現するCTAである。Simpson, A. J., et al., Cancer / testis antigens, gametogenesis and cancer, Nat. Rev. Cancer, 2005. 5 (8): 615 - 25; Weon, J. L. and P. R. Potts, Curr Opin Cell Biol, 2015. 37: 1 - 8; Park, T. S., et al., J Immunother, 2016. 39 (1): 1 - 7; Li, X., S. C. Hughes, and R. Wevrick, Cancer Genet, 2015. 208 (1 - 2): 25 - 34; Kerkar, S. P., et al., J Immunother, 2016. 39 (4): 181 - 7. 詳細には、MAGE - A1は、TNBC症例全体 (n = 81) の69.1%、及びグレードII I症例の85.7%で発現している。Mrklic, I., et al., Acta Histochem, 2014. 116 (5): 740 - 6. 加えて、メラノーマ細胞株からのエビデンスからは、MAGE - A1が腫瘍形成を直接駆動することが示唆される。Wang, D., et al., Biochem Biophys Res Commun, 2016. 473 (4): 959 - 65.

10

#### 【0058】

20

ある特定の実施形態において、本開示の結合タンパク質は、(a) 配列番号26、32、38、44、50、もしくは51のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するT細胞受容体(TCR) 鎖可変(V)ドメイン、及びTCR 鎖可変(V)ドメイン; (b) 配列番号23、29、35、41、または47のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメイン、及びVドメイン; または(c) 配列番号26、32、38、44、50、もしくは51のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメイン、及び配列番号23、29、35、41、または47のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメインを含む。

#### 【0059】

ペプチド-MHC複合体、例えば、MAGE - A1ペプチド:MHC複合体は、TCR V及びTCR Vドメインに認識され、かつこれらを通じて結合する。リンパ球が発生する間、Vエクソンは、異なる可変及び連結遺伝子セグメント(V-J)から組み立てられ、Vエクソンは、異なる可変、多様性、及び連結遺伝子セグメント(V-D-J)から組み立てられる。TCR染色体座位は、70~80個の可変遺伝子セグメントと、61個の連結遺伝子セグメントとを有する。TCR染色体座位は、52個の可変遺伝子セグメントと、2つの別々のクラスターであって、各々が単一の多様性遺伝子セグメントを6または7個の連結遺伝子セグメントと共に含有する、クラスターとを有する。機能的なV及びV遺伝子エクソンは、Vについては、可変遺伝子セグメントを連結遺伝子セグメントと共に組み換え、Vについては、可変遺伝子セグメントを多様性遺伝子セグメント及び連結遺伝子セグメントと共に組み換えることによって生成される。

30

40

#### 【0060】

TCR V及びVドメインはそれぞれ、ペプチド-MHC複合体に接触する3つの超可変ループ(相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる)を含む。CDR1及びCDR2は、可変遺伝子セグメント内でコードされ、一方CDR3は、Vについては可変及び連結セグメントにまたがる領域によって、Vについては可変、多様性、及び連結セグメントにまたがる領域によってコードされる。したがって、VまたはVの可変遺伝子セグメントが(例えば、既知のTRAVまたはTRVBアレルによって)既知である場合、これらの対応するCDR1及びCDR2の配列を推測することができる。さらに、本開示のMAGE - A1に対し特異的な高親和性TCR可変領域(例えば、高親和性CDR3配列を有することにより同定されるもの)のいくつかは、選択TCRアレルまたはTCRア

50

レルによってコードされる。ある特定の実施形態において、コードされた結合ドメインは、TRBV30アレル、TRBV29アレル、またはTRBV9アレルから誘導されるVドメインを含む。一部の実施形態において、コードされた結合ドメインは、TRAV38-1アレル、TRAV34アレル、TRAV16アレル、またはTRAV5アレルから誘導されるVドメインを含む。

#### 【0061】

TCR可変ドメイン配列は、ナンバリングスキーム(International Immunogenetics Information System (IMGT) 及びAho) に対しアラインメントすることができ、これにより等価の残基位置にはアノテーションを付し、異なる分子についてはAntigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI) ソフトウェアツール(2016, Bioinformatics 15:298-300)を用いて比較することができる。ナンバリングスキームは、TCR可変ドメイン内のフレームワーク領域及びCDRの標準化された描写を提供する。

#### 【0062】

ある特定の実施形態において、結合タンパク質は、本明細書で開示されている参照アミノ酸配列に比べて機能的な可変アミノ酸配列を含み、コードされた結合タンパク質は、参照アミノ酸配列を含む結合タンパク質に比べて、結合特徴を保持する。例えば、一部の実施形態において、コードされたVドメインは、配列番号3、7、11、15、及び19のいずれか1つに記載のアミノ酸配列に対し少なくとも約90%同一である(例えば、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、または100%同一である)アミノ酸配列を含み、コードされたVドメインは、配列番号1、5、9、13、17のいずれか1つに記載のアミノ酸配列に対し少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含み、ただし、(a) CDRのうちの少なくとも3つまたは4つが配列の変化を有さず、配列の変化を有するCDRが、最大2つのアミノ酸置換、最大5つ連続するアミノ酸欠失、またはこれらの組合せを有するにとどまり、(b) コードされた結合タンパク質が、CD8に非依存的に、またはCD8の不在下で、MAGE-A1ペプチド:HLA細胞表面複合体に対し、依然として特異的に結合可能であることを条件とする。

#### 【0063】

特定の実施形態において、(a) Vドメインは、(i) 配列番号24、30、36、42、及び48のいずれか1つに記載のCDR1アミノ酸配列、及び/または(ii) 配列番号25、31、37、43、及び49のいずれか1つに記載のCDR2アミノ酸配列を含み；及び/または(b) コードされたVドメインは、(iii) 配列番号21、27、33、39、及び45のいずれか1つに記載のCDR1アミノ酸配列、及び/または(iv) 配列番号22、28、34、40、及び46のいずれか1つに記載のCDR2アミノ酸配列を含む。さらなる実施形態において、コードされた結合タンパク質は、(a) 配列番号24~26にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列、ならびに配列番号21~23にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列；(b) 配列番号30~32にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列、ならびに配列番号27~29にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列；(c) 配列番号36~38にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列、ならびに配列番号33~35にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列；(d) 配列番号42~44にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列、ならびに配列番号39~41にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列；または(e) 配列番号48~50にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列、ならびに配列番号45~47にそれぞれ記載のVCDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 6 4 】

ある特定の実施形態において、V ドメインは、配列番号 3、7、11、15、または 19 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。さらなる実施形態において、コードされた V ドメインは、配列番号 1、5、9、13、または 17 に記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

## 【 0 0 6 5 】

一部の実施形態において、結合タンパク質は、TCR 鎖定常ドメイン、TCR 鎖定常ドメイン、または両方を含む。ある特定の実施形態において、TCR 鎖定常 (C) ドメインは、配列番号 4、8、12、16、または 20 のいずれか 1 つのアミノ酸配列に対し、少なくとも 90% の配列同一性を有する。さらなる実施形態において、TCR 鎖定常 (C) ドメインは、配列番号 2、6、10、14、または 18 のアミノ酸配列のいずれか 1 つに対し、少なくとも 90% の配列同一性を有する。

10

## 【 0 0 6 6 】

したがって、一部の実施形態において、本開示の結合は、V ドメイン、V ドメイン、C ドメイン、及び C ドメインを含む。さらなる実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 3 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 1 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 4 を含むまたはそれからなる C ドメインと、配列番号 2 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む。他の実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 7 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 5 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 8 を含むまたはそれからなる C ドメインと、配列番号 6 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む。さらに他の実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 11 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 9 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 12 を含むまたはそれからなる C ドメインと、配列番号 10 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む。他の実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 15 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 13 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 16 を含むまたはそれからなる C と、配列番号 14 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む。さらに他の実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 19 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 17 を含むまたはそれからなる V ドメインと、配列番号 20 を含むまたはそれからなる C ドメインと、配列番号 18 を含むまたはそれからなる C ドメインとを含む。

20

30

## 【 0 0 6 7 】

本明細書で開示されているいずれの実施形態においても、結合タンパク質 (例えば、可溶性形態の、または本開示の修飾細胞の細胞表面上に発現する結合タンパク質) は、CD8 に非依存的に、または CD8 の不在下で、細胞表面上に MAGE - A1 : HLA - A \* 201 複合体 (例えば、KVLEYVIKV (配列番号 123) : HLA - A \* 201 複合体) に結合可能である。

## 【 0 0 6 8 】

ある特定の実施形態において、上述の MAGE - A1 特異的結合タンパク質のいずれも、それぞれ T 細胞受容体 (TCR)、キメラ抗原受容体、または TCR の抗原結合断片であり、これらはいずれもキメラ型、ヒト化型、またはヒト型であり得る。さらなる実施形態において、TCR の抗原結合断片は、1 本鎖 TCR (scTCR) またはキメラ抗原受容体 (CAR) を含む。ある特定の実施形態において、MAGE - A1 特異的結合タンパク質は、TCR であり、任意選択により scTCR である。操作された TCR を産生するための方法は、例えば、Bowerman et al., Mol. Immunol., 46 (15) : 3000 (2009) で説明されている (当該文献の技法は、参照により本明細書に組み入れられる)。ある特定の実施形態において、MAGE - A1 特異的結合ドメインは、MAGE - A1 特異的 TCR 結合ドメインを含む CAR である (例えば、Walseng et al., Scientific Reports 7 : 10713 (2017) を参照 (当該文献の TCR CAR コンストラクトは、その全体が参照により本明

40

50

細書に組み入れられる)。CARの作製方法は、例えば、米国特許第6,410,319号；米国特許第7,446,191号；米国特許公開第2010/065818号；米国特許第8,822,647号；PCT公開第WO2014/031687号；米国特許第7,514,537号；及びBrentjens et al., 2007, Clin. Cancer Res. 13: 5426でも説明されている（これらの文献の技法は、参照により本明細書に組み入れられる）。

#### 【0069】

組換えにより産生された可溶性TCRの単離及び精製に有用な方法は、例として、組換え可溶性TCRを培地に分泌する好適な宿主細胞／ベクター系から上清を得ることと、次に市販のフィルターを用いて培地を濃縮することが挙げられ得る。濃縮後、濃縮液は、単一の好適な精製マトリックスまたは一連の好適なマトリックス（例えば、親和性マトリックスまたはイオン交換樹脂）に適用され得る。組換えポリペプチドをさらに精製するために、1回以上の逆相HPLCステップを用いることができる。これらの精製方法は、免疫原をその天然環境から単離するときにも用いることもできる。本明細書で説明されている単離された／組換え可溶性TCRのうちの1つ以上を大規模生産するための方法としては、適切な培養要件を維持するための監視及び調節が行われるバッチ細胞培養が挙げられる。可溶性TCRの精製は、本明細書で説明され当技術分野で公知である、国内外の規制当局の法及びガイドラインに適合する方法に従って実施することができる。

#### 【0070】

ある特定の実施形態において、MAGE-A1に対し特異的な結合タンパク質または高親和性TCRをコードする核酸分子は、養子移入療法で使用するための宿主細胞（例えば、T細胞）のトランスフェクション／形質導入に使用される。TCRシーケンシングの進歩が説明されており（例えば、Robins et al., Blood 114:4099, 2009; Robins et al., Sci. Translat. Med. 2:47ra64, 2010; Robins et al., (Sept. 10) J. Imm. Meth. Epub ahead of print, 2011; Warren et al., Genome Res. 21:790, 2011）、本開示に従って実施形態を實踐する過程で用いられてもよい。同様に、所望の核酸を用いたT細胞のトランスフェクション／形質導入方法が説明されており（例えば、米国特許出願公開第US2004/0087025号）、同じように所望の抗原特異性のT細胞を用いた養子移入手順も説明されており（例えば、Schmitt et al., Hum. Gen. 20:1240, 2009; Dossett et al., Mol. Ther. 17:742, 2009; Tillet et al., Blood 112:2261, 2008; Wang et al., Hum. Gene Ther. 18:712, 2007; Kuball et al., Blood 109:2331, 2007; US2011/0243972; US2011/0189141; Leen et al., Ann. Rev. Immunol. 25:243, 2007）、そのため、これらの方法論を、本明細書の教示（HLA受容体と共に複合体化したMAGE-A1ペプチド抗原に対し特異的な高親和性TCRに向けたものを含む）に基づいて、本開示の実施形態に適用することが企図されている。

#### 【0071】

本明細書で説明されているMAGE-A1特異的な結合タンパク質またはドメインは、多数の当技術分野で容認されたT細胞活性をアッセイするための方法論（T細胞結合、活性または誘導の定量を含み、また抗原特異的なT細胞応答の定量も含む）のいずれかに従って、機能的に特徴づけることができる。例としては、T細胞増殖、T細胞サイトカイン放出、抗原特異的T細胞刺激、MHC制限T細胞刺激、CTL活性（例えば、事前充填した標的細胞からの $^{51}\text{Cr}$ 放出の検出によるもの）、T細胞表現型マーカー発現における変化、及びその他のT細胞機能の尺度の定量が挙げられる。これら及び同様のアッセイを実施するための手順は、例えば、Lefkovits (Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998)に見いだすことができる。また、Current Pro

to c o l s i n I m m u n o l o g y ; W e i r , H a n d b o o k o f E x p e r i m e n t a l I m m u n o l o g y , B l a c k w e l l S c i e n t i f i c , B o s t o n , M A ( 1 9 8 6 ) ; M i s h e l l a n d S h i g i i ( e d s . ) S e l e c t e d M e t h o d s i n C e l l u l a r I m m u n o l o g y , F r e e m a n P u b l i s h i n g , S a n F r a n c i s c o , C A ( 1 9 7 9 ) ; G r e e n a n d R e e d , S c i e n c e 2 8 1 : 1 3 0 9 ( 1 9 9 8 ) 及び文献内で引用されている参考文献も参照のこと。

【 0 0 7 2 】

「MHC - ペプチド四量体染色」とは、MHC分子の四量体を特色とする、抗原特異的T細胞の検出に使用されるアッセイを指し、各MHC分子は、少なくとも1つの抗原（例えば、MAGE - A1）と同族である（例えば、同一である、または関連する）アミノ酸配列を有する同一のペプチドを含み、この複合体は、この同族抗原に対し特異的なT細胞受容体に結合可能である。各MHC分子は、ビオチン分子でタグ付けされ得る。ビオチン化されたMHC / ペプチドは、蛍光標識することができるストレプトアビジンを添加することにより四量体化される。この四量体は、蛍光標識を介しフローサイトメトリーによって検出することができる。ある特定の実施形態において、MHC - ペプチド四量体アッセイは、本開示の強化された親和性のTCRを検出または選択するのに使用される。

10

【 0 0 7 3 】

サイトカインのレベルは、本明細書で説明され当技術分野で実践されている方法、例えば、ELISA、ELISPOT、細胞内サイトカイン染色、及びフローサイトメトリー、ならびにこれらの組合せ（例えば、細胞内サイトカイン染色及びフローサイトメトリー）に従って定量することができる。免疫応答の抗原特異的な誘発または刺激からもたらされる免疫細胞の増殖及びクローン発現は、リンパ球（例えば、末梢血細胞またはリンパ節からの細胞の試料中の循環リンパ球）を単離することと、細胞を抗原で刺激することと、サイトカイン生産、細胞増殖、及び／または細胞生存率を、例えば、トリチウム標識されたチミジンまたは非放射性アッセイ（例えば、MTTアッセイなど）を組み込むことにより測定することと、によって定量することができる。免疫原がTh1免疫応答とTh2免疫応答との間のバランスに及ぼす影響は、例えば、Th2サイトカイン（例えば、IFN - 、IL - 12、IL - 2、及びTNF - ）、ならびに2型サイトカイン（例えば、IL - 4、IL - 5、IL - 9、IL - 10、及びIL - 13）のレベルを定量することによって、調べることができる。

20

30

【 0 0 7 4 】

ポリヌクレオチド及びベクター

別の態様において、本明細書では、単離されたまたは組換えのポリヌクレオチドであって、5T4に対し特異的な本開示の結合タンパク質（例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー結合タンパク質、例えば、TCR、scTCR、またはCAR）をコードし、宿主細胞（例えば、本開示の免疫細胞）における発現にコドン最適化されている、ポリヌクレオチドが提供される。また、本開示のポリヌクレオチドを含むベクター（例えば、発現ベクター）であって、当該ポリヌクレオチドが、発現調節配列（例えば、プロモーター）に対し作用的に会合している、または作用可能に結合している、ベクターも提供される。本開示のMAGE - A1ペプチドに対し特異的な結合タンパク質を産生する発現ベクターの構築は、例えば、Sambrook et al. (1989 and 2001 editions; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 及びAusubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, 2003) で説明されているように、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製、DNAシーケンシング、またはこれらの組合せを用いて行うことができる。効率的な転写及び翻訳のため、発現コンストラクトに含まれるポリヌクレオチドは、少なくとも1つの適切な発現調節配列（制御配列とも呼ばれる）、例えば、リーダー配列、特に、本開示の結合タンパク質をコード

40

50



するヌクレオチド配列に対し作用可能に（すなわち、作用的に）結合しているプロモーターを含む。

【 0 0 7 5 】

核酸は、任意の形態の 1 本鎖または 2 本鎖の DNA、cDNA、または RNA であり得、互いに相補的な核酸のプラス鎖及びマイナス鎖（アンチセンス DNA、cDNA、及び RNA を含む）を含んでもよい。また、siRNA、マイクロRNA、RNA-DNA ハイブリッド、リボザイム、及びその他の様々な天然存在または合形成態の DNA または RNA も含まれる。

【 0 0 7 6 】

本明細書で説明されている MAGE-A1 に対し特異的な結合タンパク質（例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー結合タンパク質）または高親和性組換え T 細胞受容体（TCR）をコードする、単離されたまたは組換えの核酸分子は、分子生物学またはポリペプチド精製分野における様々な方法及び技法に従って、産生及び調製することができる。

【 0 0 7 7 】

ある特定の実施形態において、TCR V ドメイン及び TCR V ドメインを有する結合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、コードされた結合タンパク質が、CD8 に非依存的に、または CD8 の不在下で、細胞表面上の MAGE-A1 ペプチド：HLA 複合体に対し特異的に結合可能であり、単離されたポリヌクレオチドが、（a）配列番号 97、103、109、115、もしくは 121 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド、及び V コードポリヌクレオチド；（b）配列番号 94、100、106、112、もしくは 118 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド、及び V コードポリヌクレオチド；または（c）配列番号 97、103、109、115、もしくは 121 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 94、100、106、112、もしくは 118 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチドが提供される。さらなる実施形態において、V コードポリヌクレオチドは、TRBV30 アレル、TRBV29 アレル、または TRBV9 アレルから誘導される。一部の実施形態において、V コードポリヌクレオチドは、TRAV38-1 アレル、TRAV34 アレル、TRAV16 アレル、または TRAV5 アレルから誘導される。

【 0 0 7 8 】

一部の実施形態において、本開示の結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、（a）配列番号 97 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド及び配列番号 94 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド；（b）配列番号 103 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド及び配列番号 100 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド；（c）配列番号 109 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド及び配列番号 106 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド；（d）配列番号 115 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド及び配列番号 112 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド；または（e）配列番号 121 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチド及び配列番号 118 に記載の V CDR3 コードポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態において、結合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドは、さらに、（a）配列番号 95、101、107、113、もしくは 119 に記載の V CDR1 コードポリヌクレオチド；（b）配列番号 96、102、108、114、もしくは 120 に記載の V CDR2 コードポリヌクレオチド；（c）配列番号 92、98、104、110、もしくは 116 に記載の V CDR1 コードポリヌクレオチド；及び/または（d）配列番号 93、99、105、111、もしくは 117 に記載の V CDR2 コードポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 7 9 】

ある特定の実施形態において、本開示の結合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドは、（a）配列番号 95 に記載の V CDR1 コードポリヌクレオチド、配列番号 96 に記載の V CDR2 コードポリヌクレオチド、配列番号 97 に記載の V C

10

20

30

40

50

D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 2 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 3 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 9 4 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；(b) 配列番号 1 0 1 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 2 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 3 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 8 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 9 9 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 0 0 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；(c) 配列番号 1 0 7 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 8 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 9 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 4 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 0 5 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 0 6 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；(d) 配列番号 1 1 3 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 4 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 5 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 0 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 1 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 1 2 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド；または(e) 配列番号 1 1 9 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 2 0 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 2 1 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 6 に記載の V C D R 1 コードポリヌクレオチド、配列番号 1 1 7 に記載の V C D R 2 コードポリヌクレオチド、及び配列番号 1 1 8 に記載の V C D R 3 コードポリヌクレオチドを含む。

#### 【0080】

一部の実施形態において、本開示は、結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、V コードポリヌクレオチドが、配列番号 5 8、6 6、7 4、8 2、または 9 0 に対し少なくとも 8 0 % の同一性（例えば、少なくとも約 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 1 %、9 9 . 2 %、9 9 . 3 %、9 9 . 4 %、9 9 . 5 %、9 9 . 6 %、9 9 . 7 %、9 9 . 8 %、9 9 . 9 %、または 1 0 0 % の同一性）を有するヌクレオチド配列を含み、V コードポリヌクレオチドが、配列番号 5 6、6 4、7 2、8 0、または 8 8 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、ポリヌクレオチドを提供する。さらなる実施形態において、(a) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 5 8 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 5 6 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；(b) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 6 6 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 6 4 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；(c) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 7 4 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 7 2 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；(d) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 8 2 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 8 0 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む；または(e) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 9 0 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 8 8 に対し少なくとも 8 0 % の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

#### 【0081】

特定の実施形態において、(a) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 5 8 に記載のヌクレオチド配列を含みもしくはそれからなり、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 5 6 に記載のヌクレオチド配列を含みもしくはそれからなる；(b) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 6 6 に記載のヌクレオチド配列を含みもしくはそれからなり、V

コードポリヌクレオチドは、配列番号 64 に記載のヌクレオチド配列を含むもしくはそれからなる；(c) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 74 に記載のヌクレオチド配列を含みもしくはそれからなり、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 72 に記載のヌクレオチド配列を含むもしくはそれからなる；(d) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 82 に記載のヌクレオチド配列を含みもしくはそれからなり、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 80 に記載のヌクレオチド配列を含むもしくはそれからなる；または(e) V コードポリヌクレオチドは、配列番号 90 に記載のヌクレオチド配列を含みもしくはそれからなり、V コードポリヌクレオチドは、配列番号 88 に記載のヌクレオチド配列を含むもしくはそれからなる。

#### 【0082】

本開示の結合タンパク質コードポリヌクレオチドは、ある特定の実施形態において、さらに、TCR 鎖定常ドメインをコードするポリヌクレオチド、TCR 鎖定常ドメインをコードするポリヌクレオチド、または両方を含む。一部の実施形態において、本開示の結合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドは、さらに、(a) 配列番号 59、67、75、83、もしくは 91 に対し少なくとも 80% の同一性を有する C ドメインコードポリヌクレオチド；及び/または(b) 配列番号 57、65、73、81、もしくは 89 に対し少なくとも 80% の同一性を有する C ドメインコードポリヌクレオチドを含む。さらなる実施形態において、C ドメインコードポリヌクレオチドは、配列番号 59、67、75、83、または 91 に記載のヌクレオチド配列を含みまたはそれからなり、C ドメインコードポリヌクレオチドは、配列番号 57、65、73、81、または 89 に記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる。

#### 【0083】

特定の実施形態において、本開示の結合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドは、(a) 配列番号 58 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 56 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 59 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 57 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド；(b) 配列番号 66 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 64 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 67 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 65 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド；(c) 配列番号 74 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 72 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 75 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 73 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド；(d) 配列番号 82 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 80 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 83 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 81 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド；または(e) 配列番号 90 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 88 に記載の V コードポリヌクレオチド、配列番号 91 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチド、及び配列番号 89 に記載の C ドメインコードポリヌクレオチドを含む。

#### 【0084】

さらなる実施形態において、本開示の結合タンパク質の 2 つ以上の置換遺伝子産物は、諸部分が切断可能または除去可能なセグメントによって分かれている単一のペプチドとして発現する。例えば、単一のポリヌクレオチドまたはベクターによってコードされる分離可能なポリペプチドの発現に有用な自己切断ペプチドは、当技術分野において公知であり、例えば、ブタテッシュウウイルス-1 2A (P2A) ペプチド(例えば、配列番号 128 または 129 のいずれか 1 つに示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるペプチド)、Thosea asigna ウイルス 2A (T2A) ペプチド(例えば、配列番号 132 に示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるペプチド)、ウマ鼻炎 A ウイルス (ERAV) 2A (E2A) ペプチド(例えば、配列番号 131 に示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるペプチド)、ならびに口蹄疫ウイルス 2A (F2A) ペプチド(例えば、配列番号 130 に示されるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによってコー

10

20

30

40

50

ドされるペプチド)が挙げられる。

【0085】

したがって、ある特定の実施形態において、本開示の結合タンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドは、さらに、TCR鎖コードポリヌクレオチドとTCR鎖コードポリヌクレオチドとの間に配置される、TCRVドメインコードポリヌクレオチドとTCRVコードポリヌクレオチドとの間に配置される、もしくはTCR可変ドメインコードポリヌクレオチドとTCR定常ドメインコードポリヌクレオチドとの間に配置される、またはこれらの任意の組合せで、自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、自己切断ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号128～132のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列を含むまたはそれからなる。さらなる実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号124～127のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる自己切断ペプチドをコードする。

10

【0086】

また、本明細書では、本開示のポリヌクレオチドを含有するベクターも提供される。目的のMAGE-A1ペプチドに対し特異的な結合タンパク質または高親和性の操作されたTCRを組換えにより産生するために使用される発現ベクターの構築は、例えば、Sambrook et al. (1989 and 2001 editions; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY) 及び Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, 2003) で説明されているように、制限エンドヌクレアーゼ消化、ライゲーション、形質転換、プラスミド精製、及びDNAシーケンシングの使用を含めた任意の好適な分子生物学の操作技法を使用することによって、遂行することができる。効率的な転写及び翻訳を得るため、各組換え発現コンストラクト内のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの適切な発現調節配列、例えば、結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に対し作用可能に(すなわち、作用的に)結合しているプロモーターを含む。加えて、本開示の結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、結合タンパク質(プレ結合タンパク質とも呼ばれる)のアミノ末端におけるリーダー配列をコードする配列も含むことができ、このリーダー配列は、成熟結合タンパク質を産生するために細胞によって除去され得る。

20

30

【0087】

例示的なベクターは、結合している別の核酸分子を輸送可能な、または宿主生物内で複製可能な核酸分子を含むことができる。ベクターの一部の例としては、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、その他が挙げられる。導入された宿主細胞内での自己複製が可能であり得るベクター(例えば、細菌複製開始点を有する細菌ベクター、及びエピソード哺乳類ベクター)もあれば、宿主細胞のゲノム内に統合され、または宿主細胞に導入されたときにポリヌクレオチド挿入物の組込みを促進し、それにより宿主ゲノムと共に複製し得るベクター(例えば、レンチウイルスベクター)もある。加えて、作用可能に結合している遺伝子の発現を指示することが可能なベクターもある(このようなベクターは「発現ベクター」と呼ばれ得る)。関連する実施形態によれば、1つ以上の薬剤(例えば、本明細書で説明されているようなMAGE-A1に対し特異的な結合タンパク質もしくは高親和性組換えTCR、またはこれらのバリエーション)が、対象に同時投与される場合、各薬剤は、別々のベクター内に存在しても同じベクター内に存在してもよく、複数のベクター(各ベクターは異なる薬剤、同じ薬剤を含有する)が細胞または細胞集団に導入されても、対象に投与されてもよい。

40

【0088】

ある特定の実施形態において、MAGE-A1に対し特異的な結合タンパク質または高親和性組換えTCRは、ベクターのある特定のエレメントに対し作用的に結合し得る。例えば、ライゲーションしているコード配列の発現及び処理に影響を及ぼす必要のあるポリヌクレオチド配列は、作用的に結合し得る。発現調節配列としては、適切な転写開始、終結

50

、プロモーター、及びエンハンサー配列；効率的なRNAプロセッシングシグナル、例えば、スプライシング及びポリアデニル化シグナル；細胞質mRNAを安定化する配列；翻訳効率を強化する配列（すなわち、Kozakコンセンサス配列）；タンパク質安定性を強化する配列；ならびに、場合によってはタンパク質分泌を強化する配列が挙げられ得る。発現調節配列は、目的遺伝子に、及び途中でまたは離れて目的遺伝子を調節するように作用する発現調節配列に隣接している場合、作用的に結合し得る。ある特定の実施形態において、本開示の結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクター）である発現ベクターに含まれる。

#### 【0089】

ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス（例えば、アデノ随伴ウイルス）、コロナウイルス、マイナス鎖RNAウイルス、例えば、オルソミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）、ラブドウイルス（例えば、狂犬病ウイルス及び水痘性口内炎ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、麻疹及びセンダイ）、プラス鎖RNAウイルス、例えば、ピコルナウイルス及びアルファウイルス、ならびに2本鎖DNAウイルス（アデノウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス1型及び2型、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス）、ならびにポックスウイルス（例えば、ワクシニア、鶏痘、及びカナリアポックス）を含む）が挙げられる。その他のウイルスとしては、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス、及び肝炎ウイルスが挙げられる。レトロウイルスの例としては、トリ白血病肉腫、哺乳類C型、B型ウイルス、D型ウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプーマウイルスが挙げられる（Coffin, J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B. N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996）。

#### 【0090】

本明細書で使用する「レンチウイルスベクター」とは、遺伝子送達のためのHIVベースのレンチウイルスベクターを意味し、レンチウイルスベクターは、組込み型であっても非組込み型であってもよく、比較的大きなパッケージング容量を有し、様々な異なる細胞タイプを形質導入することができる。レンチウイルスベクターは、通常、3つ（パッケージング、エンベロープ、及び移入）以上のプラスミドを産生細胞内への一過性トランスフェクション後に生成される。HIVと同様に、レンチウイルスベクターは、ウイルス表面の糖タンパク質と細胞表面上の受容体との相互作用を通じて、標的細胞に進入する。進入の際、ウイルスRNAは、ウイルス逆転写酵素複合体によって媒介される逆転写を経る。逆転写の産物は、2本鎖の直鎖状ウイルスDNAであり、これは感染細胞のDNAへのウイルス組込みのための基質である。

#### 【0091】

特定の実施形態において、組換えのまたは操作された発現ベクターは、適切な細胞、例えば、T細胞または抗原提示細胞、すなわち、その細胞表面でペプチド/MHC複合体を示し（例えば、樹状細胞）、CD8が欠如している細胞に送達される（すなわち、本開示の結合タンパク質コードポリヌクレオチドを宿主細胞に送達可能である）。ある特定の実施形態において、宿主細胞は、造血前駆細胞またはヒト免疫系細胞である。例えば、免疫系細胞は、CD4+T細胞、CD8+T細胞、CD4-CD8-ダブルネガティブT細胞、T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、またはこれらの任意の組合せであり得る。ある特定の実施形態において、T細胞が宿主である場合、T細胞は、ナイーブ、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはこれらの任意の組合せであり得る。そのため、本開示の組換え発現ベクターには、例えば、リンパ組織特異的転写制御エレメント（TRE）、例えば、Bリンパ球、Tリンパ球、または樹状細胞特異的TRE

10

20

30

40

50

も含まれ得る。リンパ組織特異的 T R E は、当技術分野において公知である（例えば、Thompson et al., Mol. Cell. Biol. 12: 1043, 1992; Todd et al., J. Exp. Med. 177: 1663, 1993; Penix et al., J. Exp. Med. 178: 1483, 1993 を参照）。

#### 【0092】

ベクターに加えて、ある特定の実施形態は、本開示のベクターを含む宿主細胞に関する。当業者は、多くの好適な宿主細胞が当技術分野において入手可能であることを容易に理解する。宿主細胞としては、ベクターまたは核酸及び／またはタンパク質の組込みを受けることができる任意の個別の細胞または細胞培養物、ならびに任意の後代細胞が挙げられ得る。この用語は、遺伝子的または表現型的に同じかまたは異なるかにかかわらず、宿主細胞の後代も包含する。好適な宿主細胞は、ベクターに依存し得るものであり、哺乳類細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞、及び細菌細胞が挙げられ得る。これらの細胞は、ウイルスベクター、リン酸カルシウム沈殿法を介した形質転換、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、またはその他の方法の使用により、ベクターまたはその他の材料に組み込むように誘導することができる。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) を参照。

#### 【0093】

宿主細胞

本開示の結合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞（すなわち、修飾細胞）も提供される。ある特定の実施形態において、宿主細胞は、例えば、T細胞、NK細胞、またはNK-T細胞のようなヒト免疫細胞を含む。一部の実施形態において、宿主細胞は、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、または両方を含む。所望の核酸を用いたT細胞のトランスフェクション／形質導入方法が説明されており（例えば、米国特許出願公開第US2004/0087025号）、同じように所望の標的特異性のT細胞を用いた養子移入手順も説明されており（例えば、Schmitt et al., Hum. Gen. 20: 1240, 2009; Dossett et al., Mol. Ther. 17: 742, 2009; Till et al., Blood 112: 2261, 2008; Wang et al., Hum. Gene Ther. 18: 712, 2007; Kuball et al., Blood 109: 2331, 2007; US2011/0243972; US2011/0189141; Leen et al., Ann. Rev. Immunol. 25: 243, 2007）、そのため、これらの方法論を、本明細書の教示に基づいて、本開示の実施形態に適用することが企図されている。

#### 【0094】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、結合タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含み、コードされた結合タンパク質は、(a) 配列番号26、32、38、44、50、もしくは51のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するT細胞受容体(TCR) 鎖可変(V)ドメイン、及びTCR 鎖可変(V)ドメイン；(b) 配列番号23、29、35、41、または47のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメイン、及びVドメイン；または(c) 配列番号26、32、38、44、50、もしくは51のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメイン、及び配列番号23、29、35、41、または47のいずれか1つに記載のCDR3アミノ酸配列を有するVドメインを含み、結合タンパク質は、CD8に非依存的に、またはCD8の不在下で、細胞表面上のMAGE-A1ペプチド：HLA複合体に対し特異的に結合可能である。一部の実施形態において、コードされた結合タンパク質は、KVLEYVIVK (配列番号123)：ヒト白血球抗原(HLA)複合体に対し、約10<sup>-8</sup>M以下のK<sub>d</sub>にて特異的に結合可能である。

#### 【0095】

任意の適切な方法を使用して、細胞、例えば、T細胞をトランスフェクションまたは形質

10

20

30

40

50

導入することや、本発明の方法のポリヌクレオチドまたは組成物を投与することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞に送達するための公知の方法としては、例えば、カチオンポリマー、脂質様分子、及びある特定の市販製品、例えば、IN-VIVO-JET PEIの使用が挙げられる。その他の方法としては、ex vivo形質導入、注射、エレクトロポレーション、DEAE-デキストラン、超音波処理ローディング、リボソーム媒介のトランスフェクション、受容体媒介の形質導入、微粒子銃、トランスポゾン媒介の移入などが挙げられる。宿主細胞をトランスフェクションまたは形質導入するまたさらなる方法は、ベクターを用いるものであり、本明細書でさらに詳細に説明されている。

#### 【0096】

前述のいずれの実施形態においても、宿主細胞（例えば、免疫細胞）は、免疫シグナリングまたはその他の関連活性に關与するポリペプチドをコードする1つ以上の内在的遺伝子の発現を低減または除去するように修飾されている「ユニバーサルドナー」細胞であり得る。例示的な遺伝子ノックアウトとしては、PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、HLA分子、TCR分子などをコードするものが挙げられる。理論に拘泥することは望まないが、ある特定の内在的に発現する免疫細胞タンパク質は、宿主免疫細胞を受け取る同種宿主に異質なものと認識される可能性があり、これにより、宿主免疫細胞の除去がもたらされる（例えば、HLAアレル）こともあれば、修飾細胞の免疫活性が下方制御される（例えば、PD-1、LAG-3、CTLA4）こともあれば、本開示の異種発現した結合タンパク質の結合活性が妨害される（例えば、非MAGE-A1抗原に結合し、それによりMAGE-A1を発現する細胞に結合する修飾細胞を妨害する内在的TCR）こともある。したがって、このような内在的遺伝子またはタンパク質の発現または活性を低下または除去することで、同種宿主内における修飾細胞の活性、耐性、持続性が改善される可能性があり、また（例えば、HLAタイプにかかわらない任意のレシピエントへの）投与向けのユニバーサルな「既製」細胞が可能になる。

#### 【0097】

ある特定の実施形態において、本開示の宿主細胞（例えば、修飾免疫細胞）は、PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、HLA構成要素（例えば、1マクログロブリン、2マクログロブリン、3マクログロブリン、1ミクログロブリン、もしくは2ミクログロブリン）、またはTCR構成要素（例えば、TCR可変領域もしくはTCR定常領域をコードする遺伝子）をコードする遺伝子における1つ以上の染色体遺伝子ノックアウトを含む（例えば、Torikai et al., Nature Sci. Rep. 6:21757 (2016); Torikai et al., Blood 119(24):5697 (2012); 及びTorikai et al., Blood 122(8):1341 (2013)を参照（これらの文献の遺伝子編集技法及び組成物は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる））。本明細書で使用する「染色体遺伝子ノックアウト」という用語は、修飾細胞における遺伝子改変であって、修飾細胞による機能的活性の内在的ポリペプチド産物の産生を防止する遺伝子改変を指す。染色体遺伝子ノックアウトをもたらす改変としては、例えば、導入されたナンセンス変異（未成熟終止コドンの形成を含む）、ミスセンス変異、遺伝子欠失、及び鎖切断、ならびに修飾細胞における内在的遺伝子発現を阻害する阻害性核酸分子の異種発現が挙げられ得る。

#### 【0098】

染色体遺伝子ノックアウトは、免疫細胞の染色体編集によって導入することができる。ある特定の実施形態において、染色体遺伝子ノックアウトは、免疫細胞の染色体編集によって行われる。染色体編集は、例えば、エンドヌクレアーゼを使用して実施することができる。本明細書で使用する「エンドヌクレアーゼ」とは、ポリヌクレオチド鎖内のホスホジエステル結合の切断を触媒可能な酵素を指す。ある特定の実施形態において、エンドヌクレアーゼは、標的遺伝子を切断することにより、標的遺伝子の不活性化または「ノックアウト」が可能である。エンドヌクレアーゼは、天然存在、組換え、遺伝子修飾、または融合エンドヌクレアーゼであり得る。エンドヌクレアーゼにより引き起こされる核酸鎖切断は、一般的に、相同組換えまたは非相同末端結合（NHEJ）という独特の機構を通じて

10

20

30

40

50

修復される。相同組換えの間、ドナー核酸分子は、標的遺伝子を不活性化するための遺伝子「ノックイン」に使用され得る。NHEJは、切断部位のDNA配列にしばしば変化（例えば、少なくとも1つのヌクレオチドの置換、欠失、または付加）をもたらす、エラープローン修復プロセスである。NHEJは、標的遺伝子の「ノックアウト」に使用され得る。エンドヌクレアーゼを用いて免疫細胞における遺伝子または遺伝子発現を中断またはノックアウトする方法は、当技術分野において公知であり、例えば、PCT公開第WO2015/066262号；第WO2013/074916号；及び第WO2014/059173号で説明されている（これらの文献の各々からの方法は、参照により組み入れられる）。エンドヌクレアーゼの例としては、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、TALENヌクレアーゼ、CRISPR-Casヌクレアーゼ、及びメガヌクレアーゼが挙げられる。

10

#### 【0099】

本明細書で使用する「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」（ZFN）とは、非特異的DNA切断ドメイン（例えば、FokIエンドヌクレアーゼ）と融合しているジンクフィンガーDNA結合ドメインを含む、融合タンパク質を指す。約30アミノ酸の各ジンクフィンガーモチーフはDNAの約3塩基対に結合し、ある特定の残基におけるアミノ酸は、トリプレット配列特異性を改変するように変化し得る（例えば、Desjarlais et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 2256-2260, 1993; Wolfe et al., J. Mol. Biol. 285: 1917-1934, 1999を参照）。複数のジンクフィンガーモチーフが同時並行的に結合して、所望のDNA配列（例えば、約9～約18塩基対の範囲の長さをもつ領域）に対する結合特異性を創出することができる。背景として、ZFNは、ゲノム内の部位特異的DNA2本鎖切断（DSB）の形成を触媒することによってゲノム編集を媒介し、DSBの部位におけるゲノムに対し相同なフランキング配列を含む導入遺伝子の標的化された組込みは、相同組換え修復によって促進される。代替的に、ZFNによって生成されたDSBは、切断部位におけるヌクレオチドの挿入または欠失をもたらすエラープローン細胞修復経路である非同源末端結合（NHEJ）による修復を介して、標的遺伝子のノックアウトをもたらす。ある特定の実施形態において、遺伝子ノックアウトは、ZFN分子を用いて行われる挿入、欠失、変異、またはこれらの組合せを含む。

20

#### 【0100】

本明細書で使用する「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」（TALEN）とは、TALEN DNA結合ドメイン及びDNA切断ドメイン（例えば、FokIエンドヌクレアーゼ）を含む融合タンパク質を指す。「TALEN DNA結合ドメイン」または「TALE」は、1つ以上のTALEリピートドメイン/単位から構成されており、各ドメインは概して、12番目及び13番目のアミノ酸が多岐にわたる高度に保存された33～35アミノ酸配列を有する。TALEリピートドメインは、TALEと標的DNA配列との結合に関与する。多岐にわたるアミノ酸残基は、反復可変二残基（RVD: Repeat Variable Di-residue）と呼ばれ、特異的なヌクレオチド認識に関係する。このようなTALEのDNA認識のための天然の（カノニカル）コードは、位置12及び13におけるHD配列がシトシン（C）への結合をもたらす、NGがTに結合し、NIがAに、NNがGまたはAに結合し、NGがTに結合するように決定されており、また、ノンカノニカル（非定型）RVDも公知である（例えば、米国特許公開第US2011/0301073号を参照（この非定型RVDは、その全体が参照により本明細書に組み入れられる））。TALENは、T細胞のゲノム内の部位特異的2本鎖切断（DSB）を方向付けるのに使用することができる。非同源末端結合（NHEJ）は、アニーリングのための配列重複が少ないか全くない2本鎖切断端の両側からDNAをライゲーションし、それにより遺伝子発現をノックアウトするエラーを誘導する。代替的に、導入遺伝子内に相同なフランキング配列が存在する場合は、相同組換え修復により、DSBの部位に導入遺伝子を導入することができる。ある特定の実施形態において、遺伝子ノックアウトは、挿入、欠失、変異、またはこれらの組合せを含み、TALEN分子を用いて行われる。

30

40

#### 【0101】

50



本明細書で使用する「クラスター化された規則的間隔の短回文配列リピート (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / Cas」(CRISPR/Cas)ヌクレアーゼ系とは、CRISPR RNA (crRNA) 先導型 Cas ヌクレアーゼを用いて、塩基対相補性を介しゲノム内の標的部位 (プロトスペーサーとして知られている) を認識し、次に、短い保存されたプロトスペーサー関連モチーフ (PAM) が相補的な標的配列の 3' のすぐ後にある場合は DNA を切断する系を指す。CRISPR/Cas 系は、Cas ヌクレアーゼの配列及び構造に基づいて 3 つのタイプ (すなわち、I 型、II 型、及び III 型) に分類される。I 型及び III 型における crRNA 先導型サーベイランス複合体は、複数の Cas サブユニットを必要とする。最も研究されている II 型系は、少なくとも 3 つの構成要素: RNA 先導型 Cas9 ヌクレアーゼ、crRNA、及びトランス作用 crRNA (tracrRNA) を含む。tracrRNA は、デュプレックス形成領域を含む。crRNA 及び tracrRNA は、crRNA 上のスペーサーと PAM 上流の標的 DNA 上のプロトスペーサーとの間のワトソン・クリック塩基対合を介して、Cas9 ヌクレアーゼと相互作用すること及び Cas9/crRNA:tracrRNA 複合体を特異的な部位に先導することが可能なデュプレックスを形成する。Cas9 ヌクレアーゼは、crRNA スペーサーによって画定される領域内の 2 本鎖切断端を切断する。NHEJ による修復は、標的座位の発現を中断する挿入及び/または欠失をもたらす。代替的に、相同なフランキング配列を有する導入遺伝子は、相同組換え修復を介して DSB の部位に導入することができる。crRNA 及び tracrRNA は、操作して単一のガイド RNA (sgRNA または gRNA) にすることができる (例えば、Jinek et al., Science 337: 816-21, 2012 を参照)。さらに、標的部位に対し相補的なガイド RNA の領域は、所望の配列を標的化するように改変またはプログラムすることができる (Xie et al., PLOS One 9: e100448, 2014; 米国特許出願公開第 US 2014/0068797 号、米国特許出願公開第 US 2014/0186843 号; 米国特許第 8,697,359 号、及び PCT 公開第 WO 2015/071474 号; これらの文献の各々の技法及び組成物は、参照により組み入れられる)。ある特定の実施形態において、遺伝子ノックアウトは、挿入、欠失、変異、またはこれらの組合せを含み、CRISPR/Cas ヌクレアーゼ系を用いて行われる。

#### 【0102】

本明細書で使用する「メガヌクレアーゼ」とは、「ホーミングエンドヌクレアーゼ」とも呼ばれ、大きな認識部位 (約 12 ~ 約 40 塩基対の 2 本鎖 DNA 配列) によって特徴づけられるエンドデオキシリボヌクレアーゼを指す。メガヌクレアーゼは、配列及び構造モチーフに基づいて 5 つのファミリー: LAGLIDADG、GIY-YIG、HNH、His-Cys ボックス、及び PD-(D/E)XK に分類することができる。例示的なメガヌクレアーゼとしては、I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII、及び I-TevIII が挙げられ、これらの認識配列は公知である (例えば、米国特許第 5,420,032 号及び第 6,833,252 号; Belfort et al., Nucleic Acids Res. 25: 3379-3388, 1997; Dujon et al., Gene 82: 115-118, 1989; Perler et al., Nucleic Acids Res. 22: 1125-1127, 1994; Jasin, Trends Genet. 12: 224-228, 1996; Gimble et al., J. Mol. Biol. 263: 163-180, 1996; Argast et al., J. Mol. Biol. 280: 345-353, 1998 を参照)。

#### 【0103】

ある特定の実施形態において、天然存在のメガヌクレアーゼは、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA4、HLA コード遺伝子、または TCR 構成要素コード遺伝子から選択される標的の部位特異的ゲノム修飾を促進するのに使用され得る。他の実施形態において

、標的遺伝子に対する新規の結合特異性を有する操作されたメガヌクレアーゼは、部位特異的ゲノム修飾に使用される（例えば、Porteus et al., Nat. Biotechnol. 23: 967-73, 2005; Sussman et al., J. Mol. Biol. 342: 31-41, 2004; Epinat et al., Nucleic Acids Res. 31: 2952-62, 2003; Chevalier et al., Molec. Cell 10: 895-905, 2002; Ashworth et al., Nature 441: 656-659, 2006; Paques et al., Curr. Gene Ther. 7: 49-66, 2007; 米国特許公開第US 2007/0117128; US 2006/0206949; 第US 2006/0153826号; 第US 2006/0078552号; 及び第US 2004/0002092号を参照）。

10

#### 【0104】

ある特定の実施形態において、染色体遺伝子ノックアウトは、腫瘍関連抗原に対し特異的に結合する抗原特異的受容体をコードする異種ポリヌクレオチドを含む修飾細胞内に導入される阻害性核酸分子を含み、この阻害性核酸分子は、標的的特異的阻害物質をコードし、コードされた標的的特異的阻害物質は、修飾細胞における内在的遺伝子の発現（すなわち、PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、HLA構成要素、TCR構成要素、またはこれらの任意の組合せの発現）を阻害する。

#### 【0105】

染色体遺伝子ノックアウトは、ノックアウト手順または薬剤を使用した後の修飾細胞のDNAシーケンシングによって直接確認することができる。また、染色体遺伝子ノックアウトは、ノックアウトの後の遺伝子発現の不在（例えば、遺伝子によってコードされるmRNAまたはポリペプチド産物の不在）から推測することもできる。

20

#### 【0106】

一部の実施形態において、修飾細胞は、本開示の結合タンパク質（例えば、ペプチド抗原に対し特異的に結合可能なCD8+T細胞からのMAGE-A1特異的なTCR）をコードする異種ポリヌクレオチドを含むCD4+T細胞である。一部の実施形態において、修飾CD4+T細胞の異種的にコードされたTCRは、高親和性TCRである。特定の実施形態において、修飾CD4+T細胞の異種的にコードされたTCRは、CD8に非依存的に、またはCD8の不在下で、細胞表面上のペプチド：抗原HLA複合体に対し特異的に結合可能である。

30

#### 【0107】

さらなる実施形態において、修飾CD4+T細胞は、さらに、CD8共受容体の少なくとも細胞外部分をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。実施例に示されているように、CD4+T細胞による、本開示のMAGE-A1特異的結合タンパク質とCD8共受容体の少なくとも細胞外部分との同時発現は、CD4+T細胞に新規のまたは改善された機能性（例えば、改善されたサイトカイン放出、MAGE-A1：HLA発現標的細胞に結合したときのCTL応答）をもたらす。CD8共受容体鎖のアミノ酸配列は、配列番号143に示されている。CD8共受容体鎖の5つの異なるアイソフォームのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号144～148に示されている。一部の実施形態において、本開示の修飾CD4+T細胞は、さらに、全長のCD8共受容体鎖をコードする異種ポリヌクレオチド、全長のCD8共受容体鎖をコードする異種ポリヌクレオチド、または両方を含む。一部の実施形態において、CD8コードポリヌクレオチドは、

40

#### 【0108】

また、本明細書では、修飾CD4+T細胞を作製するための方法であって、ペプチド抗原に対し特異的に結合可能なCD8+T細胞からのTCRをコードする異種ポリヌクレオチドを用いて、CD4+T細胞に形質導入することを含む方法も提供される。ある特定の実施形態において、CD4+T細胞の修飾に使用されるTCRコードポリヌクレオチドは、天然存在のCD8+T細胞からのものである（すなわち、TCRは天然存在のTCRである）。当該方法のさらなる実施形態は、CD8共受容体の少なくとも細胞外部分をコード

50

する異種ポリヌクレオチドを用いて、CD4+T細胞に形質導入することを含んでもよく、一部の実施形態において、CD8共受容体は、CD8+T細胞からのCD8及びCD8を含んでもよい。

#### 【0109】

##### 組成物

本明細書では、本明細書で開示されている修飾細胞と、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤とを含む組成物（例えば、薬学的組成物）も提供される。好適な賦形剤としては、水、食塩水、ブドウ糖、グリセロールなど、及びこれらの組合せが挙げられる。諸実施形態において、本明細書で開示されている融合タンパク質または宿主細胞を含む組成物は、さらに、好適な注入媒体を含む。好適な注入媒体は、任意の等張媒体製剤とすることができ、典型的には、生理食塩水、Normosol R (Abbott) または Plasma-Lyte A (Baxter)、水中5%ブドウ糖、乳酸リンゲル液を利用することができる。注入媒体には、ヒト血清アルブミンまたはその他のヒト血清構成要素を追加することができる。本明細書で説明されている組成物は、単位用量または複数回用量の容器、例えば、密封されたアンプルまたはバイアルで提示され得る。このような容器は、患者への注入まで製剤の安定性を保つために凍結されてもよい。

10

#### 【0110】

組成物の「有効量」とは、薬用量において、及び必要とされる時間期間について、本明細書で記載されているような所望の臨床結果または有益な処置を達成するのに十分な量を指す。有効量は、1回以上の投与において送達され得る。投与が、疾患または疾患状態を有することが既に知られているまたは確認されている対象に対する場合、処置に関しては「治療量」という用語が使用されることがあり、また、疾患または疾患状態の発生（例えば、再発）しやすいまたは発生するリスクがある対象に対する、防止的処置としての有効量の投与を説明するために「予防有効量」が使用されることがある。

20

#### 【0111】

組成物は、医療分野の当業者により処置（または予防）される疾患または状態に適切であると判定される様式で、投与することができる。組成物における適切な用量ならびに好適な投与の期間及び頻度は、患者の健康状態、患者のサイズ（すなわち、体重、質量、または身体面積）、患者の状態のタイプ及び重症度、活性成分の特定の形態、ならびに投与方法などの因子によって決定される。概して、適切な用量及び処置のレジメンは、治療的及び/または予防的利益（例えば、臨床成績の改善を含めた本明細書で説明されているような利益、例えば、より頻繁な完全もしくは部分的な軽快、あるいはより長い無病及び/または全生存期間、あるいは症状重症度の減少）をもたらすのに十分な量の組成物（複数可）をもたらす。予防的使用については、用量は、疾患または障害に関連する疾患の予防、発症の遅延、または重症度の減少に十分であるべきである。本明細書で説明されている方法に従って投与される組成物の予防的利益は、前臨床試験（*in vitro*及び*in vivo*試験を含む）ならびに臨床試験を実施し、このような試験から得られたデータを適切な統計的、生物学的、及び臨床的な方法及び技法によって解析することにより、決定することができる。

30

#### 【0112】

治療有効用量は、処置対象のヒトまたは非ヒト哺乳類において、臨床的に望ましい結果をもたらすことが可能な、養子移入で使用される（ヒトMAGE-A1に対し特異的な結合タンパク質または高親和性組換えTCRを発現する）宿主細胞の量（すなわち、統計的に有意な様式で、MAGE-A1を過剰発現する細胞に対する特異的なT細胞免疫応答（例えば、細胞傷害性T細胞応答）を誘導または強化するのに十分な量）である。任意の一患者のための薬用量は、患者のサイズ、体重、体表面積、年齢、投与される特定の療法、性別、投与の時間及び経路、全般的健康状態、ならびに同時に投与されている他の薬物を含めた多くの因子に依存する。用量は様々となるが、本明細書で説明されている組換え発現ベクターを含む宿主細胞の好ましい投与用量は、約 $10^7$ 細胞/ $m^2$ 、約 $5 \times 10^7$ 細胞/ $m^2$ 、約 $10^8$ 細胞/ $m^2$ 、約 $5 \times 10^8$ 細胞/ $m^2$ 、約 $10^9$ 細胞/ $m^2$ 、約 $5 \times 1$

40

50

0.9細胞/m<sup>2</sup>、約1.0×10<sup>10</sup>細胞/m<sup>2</sup>、約5×10<sup>10</sup>細胞/m<sup>2</sup>、または1.0×10<sup>11</sup>細胞/m<sup>2</sup>である。ある特定の実施形態において、単位用量は、本明細書で説明されている修飾細胞を約1.0×10<sup>7</sup>細胞/m<sup>2</sup>～1.0×10<sup>11</sup>細胞/m<sup>2</sup>の用量にて含む。

【0113】

ある特定の実施形態において、単位用量は、(i)少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の操作されたCD4<sup>+</sup>T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%の操作されたCD8<sup>+</sup>T細胞を含む組成物との組合せを、約1:1の比率で含む。さらなる実施形態において、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含有するか、またはナイーブT細胞を実質的に含有しない(すなわち、同等数のPBMCを有する患者試料との比較において、単位用量中に存在するナイーブT細胞集団の約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満、または約1%未満を有する)。

10

【0114】

一部の実施形態において、単位用量は、(i)少なくとも約50%の操作されたCD4<sup>+</sup>T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約50%の操作されたCD8<sup>+</sup>T細胞を含む組成物との組合せを、約1:1の比率で含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含有するか、またはナイーブT細胞を実質的に含有しない。さらなる実施形態において、単位用量は、(i)少なくとも約60%の修飾CD4<sup>+</sup>T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約60%の修飾CD8<sup>+</sup>T細胞を含む組成物との組合せを、約1:1の比率で含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含有するか、または実質的にナイーブT細胞を含有しない。またさらなる実施形態において、単位用量は、(i)少なくとも約70%の修飾CD4<sup>+</sup>T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約70%の修飾CD8<sup>+</sup>T細胞を含む組成物との組合せを、約1:1の比率で含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含有するか、または実質的にナイーブT細胞を含有しない。一部の実施形態において、単位用量は、(i)少なくとも約80%の修飾CD4<sup>+</sup>T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約80%の修飾CD8<sup>+</sup>T細胞を含む組成物との組合せを、約1:1の比率で含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含有するか、またはナイーブT細胞を実質的に含有しない。一部の実施形態において、単位用量は、(i)少なくとも約85%の修飾CD4<sup>+</sup>T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約85%の修飾CD8<sup>+</sup>T細胞を含む組成物との組合せを、約1:1の比率で含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含有するか、またはナイーブT細胞を実質的に含有しない。一部の実施形態において、単位用量は、(i)少なくとも約90%の修飾CD4<sup>+</sup>T細胞を含む組成物と、(ii)少なくとも約90%の修飾CD8<sup>+</sup>T細胞を含む組成物との組合せを、約1:1の比率で含み、単位用量は、低減された量のナイーブT細胞を含有するか、またはナイーブT細胞を実質的に含有しない。

20

30

【0115】

本明細書で説明されているいずれの実施形態においても、単位用量は、等しいまたはほぼ等しい修飾CD45RA<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>及び修飾CD45RA<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T<sub>H</sub>1細胞を含む。

40

【0116】

様々な処置レジメン(例えば、非経口または静脈内の投与または製剤を含む)において、本明細書で説明されている特定の組成物を使用するための、好適な投薬及び処置レジメンの開発。主題組成物が非経口的に投与される場合、当該組成物は、無菌の水性または油性の溶液または懸濁液も含むことができる。好適な無毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒としては、水、リンゲル液、等張塩溶液、1,3-ブタンジオール、エタノール、プロピレングリコール、または水との混合液中のポリエチレングリコールが挙げられる。水性の溶液または懸濁液は、さらに、1つ以上の緩衝剤、例えば、酢酸ナトリウム、ク

50

エン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、または酒石酸ナトリウムを含んでもよい。当然ながら、任意の投薬単位製剤の調製で使用する任意の材料は、医薬的に純粋であり、かつ用いる量において実質的に無毒であるべきである。加えて、活性化合物が徐放性の調製物及び製剤に組み込まれてもよい。本明細書で使用する薬用量単位形態とは、処置される対象の単位薬用量に適した物理的に別々の単位を指し、各単位は、所望の効果をもたらすように算出された所定の量の修飾細胞または活性化合物を適切な薬学的担体と共に含有することができる。

#### 【0117】

本明細書で使用する組成物の投与とは、送達の経路または方式にかかわらず、対象に組成物を送達することを指す。投与は、持続的または間欠的に、そして非経口的にもたらされ得る。投与は、認識された状態、疾患、または疾患状態を有すると既に確認されている対象を処置するためのものであっても、このような状態、疾患、または疾患状態を発生しやすいまたは発生するリスクがある対象を処置するためのものであってもよい。補助的療法との同時投与には、任意の投薬スケジュールにおける任意の順序での、複数の薬剤の同時及び／または順次の送達が含まれ得る（例えば、1つ以上のサイトカインを伴う修飾細胞；免疫抑制療法、例えば、カルシニューリン阻害物質、コルチコステロイド、微小管阻害物質、低用量のミコフェノール酸プロドラッグ、HDAC阻害物質、DNA低メチル化剤、またはこれらの任意の組合せ）。

10

#### 【0118】

ある特定の実施形態において、複数回用量の、本明細書で説明されている修飾細胞が対象に投与され、複数回用量は約2～約4週間の投与間の間隔にて投与され得る。

20

#### 【0119】

##### 処置方法

ある特定の実施形態において、本開示は、過剰増殖障害またはMAGE-A1発現（例えば、異常なMAGE-A1発現）によって特徴づけられる状態を処置するための方法に向けられており、当該方法は、このような処置を必要としているヒト対象に、本明細書で開示されている修飾細胞、組成物、または単位用量（またはこれらの任意の組合せ）を投与することによるものである。

#### 【0120】

MAGE-A1発現に関連する状態としては、MAGE-A1の細胞または分子事象の活性低下、活性過剰、または不適当な活性が存在する任意の障害または状態が挙げられ、このような状態は、異常に高い（統計的有意性を伴う）レベルのMAGE-A1発現、または正常細胞との対比での罹患細胞（例えば、骨髄腫細胞）における不適切な（すなわち、所与の細胞タイプの健康な細胞には生じない）発現の結果であり得る。このような障害または状態を有する対象は、本明細書で説明されている実施形態の組成物または方法を用いた処置から恩恵を受けるであろう。したがって、異常なMAGE-A1発現に関連する一部の状態には、急性に加えて慢性の障害及び疾患、例えば、対象を特定の障害に罹患させやすくする病的状態が含まれ得る。

30

#### 【0121】

MAGE-A1発現に関連する状態の一部の例としては、増殖障害または過剰増殖障害が挙げられ、このような状態は、腫瘍、新生物、がん、悪性腫瘍などを含めた、対象における活性化及び／または増殖細胞（転写的に活性過剰でもあり得る）の状態を指す。活性化または増殖細胞に加えて、過剰増殖障害には、壊死またはアポトーシスのいずれかにかかわらず、細胞死プロセスの異常または調節不全も含まれ得る。このような細胞死プロセスの異常は、がん（原発性、続発性悪性腫瘍及び転移を含む）、またはその他の状態を含めた様々な状態に関連し得る。

40

#### 【0122】

対象における過剰増殖障害または悪性状態の存在とは、対象における異形成細胞、がん性細胞、及び／または形質転換細胞の存在を指し、このような細胞としては、例えば、新生物、腫瘍、非接触性の阻害性細胞または腫瘍形成的に形質転換された細胞など（例えば、

50

固形がん、リンパ腫及び白血病（例えば、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病など）を含めた血液がん）が挙げられ、これらは当技術分野において公知であり、これらに対する診断及び分類の判断基準は確立されている（例えば、Hanahan and Weinberg, Cell 144:646, 2011; Hanahan and Weinberg, Cell 100:57, 2000; Cavallo et al., Canc. Immunol. Immunother. 60:319, 2011; Kyrigideis et al., J. Carcinog. 9:3, 2010）。ある特定の実施形態において、このようながん細胞は、急性骨髄性白血病、B細胞リンパ芽球性白血病、T細胞リンパ芽球性白血病、または骨髄腫の細胞であり得、これらのがんタイプのいずれかを開始し連続的に移植することが可能ながん幹細胞を含む（例えば、Park et al., Molec. Therap. 17:219, 2009を参照）。

10

#### 【0123】

ある特定の実施形態において、血液悪性腫瘍または固形がんのような過剰増殖障害を処置するための方法であって、当該処置を必要とするヒト対象に、本開示の修飾細胞、組成物、または単位用量を投与することを含む方法が提供される。例示的な血液悪性腫瘍としては、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄球性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性好酸球性白血病（CEL）、骨髄異形成症候群（MDS）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、または多発性骨髄腫（MM）が挙げられる。

#### 【0124】

さらなる実施形態において、過剰増殖障害、例えば、非小細胞肺癌（NSCLC）、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）、卵巣癌、悪性メラノーマ、結腸癌、結腸直腸腺癌、結腸直腸癌、胆道癌、膀胱癌、骨軟部癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、類腱腫、胚性癌、子宮内膜癌、食道癌、胃癌、胃腺癌、多形性神経膠芽細胞腫、婦人科腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、肝癌、肺癌、中皮腫、骨肉腫、膵臓癌、膵管腺癌、原発性星状細胞腫瘍、原発性甲状腺癌、前立腺癌、腎癌、腎細胞癌、横紋筋肉腫、皮膚癌、軟部肉腫、精巣胚細胞腫瘍、尿路上皮癌、子宮肉腫、または子宮癌から選択される固形がんを処置するための方法が提供される。

20

#### 【0125】

医療分野の当業者が理解するように、「処置する」及び「処置」という用語は、対象（すなわち、患者、宿主（ヒトであっても非ヒト動物であってもよい））の疾患、障害、または状態の医療的管理を指す（例えば、Stedman's Medical Dictionaryを参照）。概して、適切な用量及び処置レジメンは、治療的利益または予防的利益をもたらすのに十分な量の、ヒトMAGE-A1またはヒトMAGE-A1を発現する宿主細胞に対し特異的な結合タンパク質または高親和性組換えTCRのうちの1つ以上、及び任意選択により補助的療法（例えばサイトカイン、例えばIL-2、IL-15、IL-21、またはこれらの任意の組合せ）を提供する。治療的処置または予防的もしくは防止的方法から得られる治療的または予防的利益としては、例えば、臨床成績の改善が挙げられ、ここでの目的は、所望でない生理的变化もしくは障害を防止する、もしくは遅らせる、もしくは別の方法で低減する（例えば、未処置対照との対比において統計的に有意な様式で低下させる）こと、またはこのような疾患もしくは障害の拡大もしくは重症度を防止する、遅らせる、もしくは別の方法で低減することである。対象を処置することからの有益なまたは所望の臨床結果としては、処置される疾患もしくは障害からもたらされるまたはこれに関連する症状の軽減、減少、緩和；症状の発生率の低下；クオリティーオブライフの改善；より長い無病状態（すなわち、対象が、疾患の診断がなされる基礎となる症状を提示する見込みまたは傾向を低下させること）；疾患の程度の減弱；疾患状態の安定化（すなわち、悪化していない）；疾患進行の遅延または緩徐化；疾患状態の回復または一時的緩和；及び（検出可能か検出不可能かにかかわらず）（部分的か全体的かにかかわらず）軽快；あるいは全生存期間が挙げられる。

30

40

#### 【0126】

「処置」は、対象が処置を受けない場合に予想される生存期間と比較したときの生存期間

50

の延長も意味することがある。本明細書で説明されている方法及び組成物を必要とする対象には、既に疾患または障害を有する対象に加えて、疾患または障害を有する傾向があるまたは発生するリスクがある対象も含まれる。予防的処置を必要とする対象には、疾患、状態、または障害が防止される（すなわち、疾患または障害の発生率または再発率の見込みを低下させる）べきである対象が含まれる。本明細書で説明されている組成物（及び組成物を含む調製物）ならびに方法によってもたらされる臨床的利益は、実施例で説明されているように、組成物の投与が利益をもたらすことが意図されている対象における *in vitro* アッセイ、前臨床試験、及び臨床試験を設計及び実行することによって評価することができる。

#### 【0127】

本開示の方法のある特定の実施形態において、修飾細胞は、クラスⅡ HLA制限様式において、MAGE-A1に対する抗原特異的T細胞応答を促進可能である。一部の実施形態において、クラスⅡ HLA制限応答は、抗原ペプチド輸送体（TAP）非依存的である。一部の実施形態において、本開示の方法に従って投与される修飾細胞によって促進される抗原特異的T細胞応答は、CD4+ヘルパーTリンパ球（Th）応答及びCD8+細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答のうちの少なくとも1つを含む。特定の実施形態において、本開示の方法に従って誘発されるCTL応答は、異常なMAGE-A1発現を有する細胞（例えば、MAGE-A1+腫瘍細胞）に対し向けられる。CTL免疫応答のレベルは、本明細書で説明され当技術分野で通例的に実践されている多数の免疫学的方法のうちのいずれか1つによって定量され得る。CTL免疫応答のレベルは、例えば、T細胞によって発現する、本明細書で説明されているMAGE-A1特異的結合タンパク質のうちのいずれか1つを投与する前及び後に定量され得る。CTL活性を定量するための細胞傷害性アッセイは、当技術分野で通例的に実践されているいくつかの技法及び方法のうちのいずれか1つを用いて実施され得る（Henkart et al., "Cytotoxic T-Lymphocytes" (Fundamental Immunology, Paul (ed.)) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), pages 1127-50、及び文献内で引用されている参考文献を参照）。

#### 【0128】

抗原特異的T細胞応答は、典型的には、観察されるT細胞応答を、本明細書で説明されているT細胞機能パラメーター（例えば、増殖、サイトカイン放出、CTL活性、改変された細胞表面のマーカー表現型など）のうちのいずれかによって比較することによって定量され、この比較は、適切な文脈における同族抗原（例えば、免疫適合性の抗原提示細胞によって提示されるときに、T細胞のプライミングまたは活性化に使用される抗原）に曝露されているT細胞と、同族ではなく構造的に別個または無関係の対照抗原に曝露されている同じ供給元集団からのT細胞との間でなされ得る。同族抗原に対する応答が、統計的有意性を伴って対照抗原に対する応答よりも大きければ、抗原特異性を意味する。

#### 【0129】

本明細書で説明されているMAGE-A1由来抗原ペプチドに対する免疫応答の存在及びレベルを定量するための生物学的試料は、対象から得られ得る。本明細書で使用する「生物学的試料」は、血液試料（血清もしくは血漿はこの血液試料から調製され得る）、生検標本、体液（例えば、肺洗浄液、腹水、粘膜洗浄液、滑膜液）、骨髓、リンパ節、組織外植片、臓器培養物、または対象もしくは生物源からの任意の他の組織もしくは細胞調製物であり得る。また、生物学的試料は、任意の免疫原性組成物を投与する前の対象から得ることもでき、このような生物学的試料は、ベースライン（すなわち、免疫処置前）データを確立するための対照として有用である。

#### 【0130】

ある特定の実施形態において、本開示の修飾細胞は、養子細胞療法において有用である。例えば、一部の実施形態において、修飾細胞は、*ex vivo*で修飾され（例えば、本開示の組換え発現ベクターまたはポリヌクレオチドを形質導入し）、次に修飾細胞を必要

10

20

30

40

50

とする対照に投与される。ある特定の実施形態において、修飾細胞は、同種細胞、同系細胞、または自己細胞（すなわち、修飾細胞を投与される対象に対して）である。本開示のいずれの方法においても、修飾細胞は、CD4 + T細胞、CD8 + T細胞、CD4 - CD8 - ダブルネガティブT細胞、T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、またはこれらの任意の組合せから選択される修飾ヒト免疫細胞を含む。ある特定の実施形態において、修飾細胞は、T細胞であり、例えば、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはこれらの任意の組合せである。

#### 【0131】

ある特定の実施形態において、本開示の方法で使用される修飾細胞は、CD4 + T細胞である。一部のこのような実施形態において、修飾CD4 + T細胞は、さらに、CD8 共受容体の少なくとも細胞外部分をコードし、任意選択により完全なCD8 鎖、完全なCD8 鎖、または両方をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態において、このような方法は、さらに、対象に、細胞表面上のMAGE - A1ペプチド：HLA複合体に対し特異的に結合可能であるCD8 + T細胞（例えば、本開示に記載のCD8 + 修飾T細胞）を投与することを含む。

10

#### 【0132】

本開示の処置または防止の方法は、修飾細胞を投与もしくは投薬する任意の適切な方法、または併用療法を含むことができる。例えば、ある特定の実施形態において、複数回用量の、本明細書で説明されている修飾細胞が対象に投与され、複数回用量は約2 ~ 約4週間の投与間の間隔にて投与され得る。加えて、本開示の処置または防止の方法は、本開示の単位用量、細胞、または組成物を投与する前または後に追加的な処置を含み得る処置クールまたはレジメンの一部として、対象に投与され得る。さらなる実施形態において、サイトカインは、対象が、サイトカイン投与前に組織換え宿主細胞を少なくとも3回または4回投与されたことを条件に、順次に投与される。ある特定の実施形態において、サイトカインは皮下投与される（例えば、IL - 2、IL - 15、IL - 21）。またさらなる実施形態において、処置されている対象は、さらに、免疫抑制療法、例えば、カルシニューリン阻害物質、コルチコステロイド、微小管阻害物質、低用量のミコフェノール酸プロドラッグ、またはこれらの任意の組合せの投与を受けている。なおさらなる実施形態において、処置されている対象は、非骨髄破壊的または骨髄破壊的な造血細胞移植を受けたことがあり、当該処置は、非骨髄破壊的造血細胞移植から少なくとも2ヵ月 ~ 少なくとも3ヵ月後に投与され得る。一部の実施形態において、対象は、DNA低メチル化剤及びHDAC阻害物質のうちの1つ以上を投与されており、これらの一方または両方がMAGE - A1発現を強化する（Weon, J. L. and P. R. Potts, Curr Opin Cell Biol, 2015, 37: p. 1 - 8を参照）ことにより、MAGE - A1を標的とする養子細胞療法を強化する可能性がある。

20

30

#### 【0133】

ある特定の実施形態において、本開示に記載の方法は、さらに、併用療法において疾患または障害を処置するための1つ以上の追加的薬剤を投与することを含む。例えば、ある特定の実施形態において、併用療法は、修飾細胞を免疫チェックポイント阻害物質と共に（同時発生的に、同時に、または順次に）投与することを含む。一部の実施形態において、併用療法は、修飾細胞を免疫チェックポイント剤のアゴニストと共に投与することを含む。さらなる実施形態において、併用療法は、修飾細胞を、二次療法、例えば、化学療法剤、放射線療法、手術、抗体、またはこれらの任意の組合せと共に投与することを含む。

40

#### 【0134】

本明細書で使用する「免疫抑制剤（immune suppression agent）」または「免疫抑制剤（immunosuppression agent）」という用語は、免疫応答の調節または抑制を支援する阻害性シグナルをもたらす、1つ以上の細胞、タンパク質、分子、化合物、または複合体を指す。例えば、免疫抑制剤としては、免疫刺激を部分的もしくは全体的にブロックする分子；免疫活性化を低下させる、防止する、もしくは遅延させる分子；または免疫抑制を増大、活性化、もしくは上方制御する分子が

50



挙げられる。(例えば、免疫チェックポイント阻害物質を用いて)標的となる例示的な免疫抑制剤としては、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CTLA4、B7-H3、B7-H4、CD244/2B4、HVEM、BTLA、CD160、TIM3、GAL9、KIR、PVR1G(CD112R)、PVR1L2、アデノシン、A2aR、免疫抑制性サイトカイン(例えば、IL-10、IL-4、IL-1RA、IL-35)、IDO、アルギナーゼ、VISTA、TIGIT、LAIR1、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、Treg細胞、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。

#### 【0135】

免疫抑制剤阻害物質(免疫チェックポイント阻害物質とも呼ばれる)は、化合物、抗体、抗体断片もしくは融合ポリペプチド(例えば、CTLA4-FcまたはLAG3-FcなどのFc融合)、アンチセンス分子、リボザイムもしくはRNAi分子、または低分子量の有機分子であり得る。本明細書で開示されているいずれの実施形態においても、方法は、修飾細胞を、単独または組合せでの、以下の免疫抑制構成要素のうちのいずれか1つに対する1つ以上の阻害物質と共に含み得る。

#### 【0136】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、PD-1阻害物質と組み合わせて、例えば、PD-1特異的抗体またはその結合断片、例えば、ピディリズマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、MED10680(旧称AMP-514)、AMP-224、BMS-936558、またはこれらの任意の組合せと組み合わせて、使用される。さらなる実施形態において、本開示の修飾細胞は、PD-L1特異的抗体またはその結合断片、例えば、BMS-936559、デュルバルマブ(MEDI4736)、アテゾリズマブ(RG7446)、アベルマブ(MSB0010718C)、MPDL3280A、またはこれらの任意の組合せと組み合わせて使用される。

#### 【0137】

さらなる実施形態において、本開示の修飾細胞は、LAG3阻害物質、例えば、LAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016、またはこれらの任意の組合せと組み合わせて使用される。

#### 【0138】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、CTLA4の阻害物質と組み合わせて使用される。特定の実施形態において、修飾細胞は、CTLA4特異的抗体またはその結合断片、例えば、イビリムマブ、トレメリムマブ、CTLA4-Ig融合タンパク質(例えば、アバタセプト、ベラタセプト)、またはこれらの任意の組合せと組み合わせて使用される。

#### 【0139】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、B7-H3特異的抗体またはその結合断片、例えば、エノブリツズマブ(MGA271)、376.96、または両方と組み合わせて使用される。B7-H4抗体結合断片は、例えば、Dangaj et al., Cancer Res. 73:4820, 2013、加えて米国特許第9,574,000号ならびにPCT特許公開第WO2016/40724A1号及びWO2013/025779A1号で説明されているように、scFvまたはその融合タンパク質であり得る。

#### 【0140】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、CD244の阻害物質と組み合わせて使用される。

#### 【0141】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、BTLA、HVEM、CD160、またはこれらの任意の組合せの阻害物質と組み合わせて使用される。抗CD-160抗体は、例えば、PCT公開第WO2010/084158号で説明されている。

#### 【0142】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、TIM3の阻害物質と組み合わせて使用される。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 3 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、G a l 9 の阻害物質と組み合わせて使用される。

## 【 0 1 4 4 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、アデノシンシグナリングの阻害物質、例えば、デコイアデノシン受容体と組み合わせて使用される。

## 【 0 1 4 5 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、A 2 a R の阻害物質と組み合わせて使用される。

## 【 0 1 4 6 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、K I R の阻害物質、例えば、リリルマブ ( B M S - 9 8 6 0 1 5 ) と組み合わせて使用される。

## 【 0 1 4 7 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、阻害性サイトカイン ( 典型的には、T G F 以外のサイトカイン ) または T r e g の発生もしくは活性の阻害物質と組み合わせて使用される。

## 【 0 1 4 8 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、I D O 阻害物質、例えば、l e v o - 1 - メチルトリプトファン、エパカドスタット ( I N C B 0 2 4 3 6 0 ; L i u e t a l . , B l o o d 1 1 5 : 3 5 2 0 - 3 0 , 2 0 1 0 ) 、エブセレン ( T e r e n t i s e t a l . , B i o c h e m . 4 9 : 5 9 1 - 6 0 0 , 2 0 1 0 ) 、インドキシモド、N L G 9 1 9 ( M a u t i n o e t a l . , A m e r i c a n A s s o c i a t i o n f o r C a n c e r R e s e a r c h 1 0 4 t h A n n u a l M e e t i n g 2 0 1 3 ; A p r 6 - 1 0 , 2 0 1 3 ) 、1 - メチル - トリプトファン ( 1 - M T ) - チラ - パザミン、またはこれらの任意の組合せと組み合わせて使用される。

## 【 0 1 4 9 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、アルギナーゼ阻害物質、例えば、N ( オメガ ) - ニトロ - L - アルギニンメチルエステル ( L - N A M E ) 、N - オメガ - ヒドロキシ - ノル - 1 - アルギニン ( n o r - N O H A ) 、L - N O H A 、2 ( S ) - アミノ - 6 - ボロノヘキサン酸 ( A B H ) 、S - ( 2 - ボロノエチル ) - L - システイン ( B E C ) 、またはこれらの任意の組合せと組み合わせて使用される。

## 【 0 1 5 0 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、V I S T A の阻害物質、例えば、C A - 1 7 0 ( C u r i s , L e x i n g t o n , M a s s . ) と組み合わせて使用される。

## 【 0 1 5 1 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、T I G I T の阻害物質、例えば、C O M 9 0 2 ( C o m p u g e n , T o r o n t o , O n t a r i o C a n a d a ) 、C D 1 5 5 の阻害物質、例えば、C O M 7 0 1 ( C o m p u g e n ) 、または両方と組み合わせて使用される。

## 【 0 1 5 2 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、P V R I G 、P V R L 2 、または両方の阻害物質と組み合わせて使用される。抗 P V R I G 抗体は、例えば、P C T 公開第 W O 2 0 1 6 / 1 3 4 3 3 3 号で説明されている。抗 P V R L 2 抗体は、例えば、P C T 公開第 W O 2 0 1 7 / 0 2 1 5 2 6 号で説明されている。

## 【 0 1 5 3 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、L A I R 1 阻害物質と組み合わせて使用される。

## 【 0 1 5 4 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、C E A C A M - 1 、C E A C A M - 3 、C E A C A M - 5 、またはこれらの任意の組合せの阻害物質と組み合わせて使用される。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 5 】

ある特定の実施形態において、修飾細胞は、刺激性免疫チェックポイント分子の活性を増大する薬剤（すなわち、アゴニストである）と組み合わせて使用される。例えば、修飾細胞は、CD137（4-1BB）アゴニスト（例えば、ウレルマブ）、CD134（OX-40）アゴニスト（例えば、MED16469、MED16383、またはMED10562）、レナリドミド、ボマリドミド、CD27アゴニスト（例えば、CDX-1127）、CD28アゴニスト（例えば、TGN1412、CD80、またはCD86）、CD40アゴニスト（例えば、CP-870,893、rhucd40L、またはSGN-40）、CD122アゴニスト（例えば、IL-2）、GITRのアゴニスト（例えば、PCT特許公開第WO2016/054638で説明されているヒト化モノクローナル抗体）、ICOS（CD278）のアゴニスト（例えば、GSK3359609、mAb 88.2、JTX-2011、Icos 145-1、Icos 314-8、またはこれらの任意の組合せ）と組み合わせて使用され得る。本明細書で開示されているいずれの実施形態においても、方法は、修飾細胞を、単独または組合せでの、前述のうちのいずれかを含めた刺激性免疫チェックポイント分子の1つ以上のアゴニストと共に投与することを含み得る。

10

## 【 0 1 5 6 】

ある特定の実施形態において、併用療法は、修飾細胞と、以下の1つ以上：非炎症性固形腫瘍により発現するがん抗原に対し特異的な抗体もしくはその抗原結合断片、放射線処置、手術、化学療法剤、サイトカイン、RNAi、またはこれらの任意の組合せを含む二次療法とを含む。

20

## 【 0 1 5 7 】

ある特定の実施形態において、併用療法の方法は、修飾細胞を投与することと、さらに、放射線療法または手術を投与することとを含む。放射線療法は、当技術分野において周知であり、X線療法、例えば、ガンマ照射、及び放射性医薬品療法が挙げられる。対象における所与のがんの処置に適切な手術及び外科的技法は、当業者に周知されている。

## 【 0 1 5 8 】

ある特定の実施形態において、併用療法の方法は、修飾細胞を投与することと、さらに、化学療法剤を投与することとを含む。化学療法剤としては、以下に限定されないが、クロマチン機能の阻害物質、トポイソメラーゼ阻害物質、微小管阻害薬、DNA損傷剤、代謝拮抗物質（例えば、葉酸アンタゴニスト、ピリミジンアナログ、プリンアナログ、及び糖修飾アナログ）、DNA合成阻害物質、DNA相互作用剤（例えば、挿入剤）、ならびにDNA修復阻害物質が挙げられる。例示的な化学療法剤としては、限定されないが、以下の群が挙げられる：代謝拮抗物質/抗がん剤、例えば、ピリミジンアナログ（5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタビン、ゲムシタビン、及びシタラビン）ならびにプリンアナログ、葉酸アンタゴニスト及び関連阻害物質（メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、及び2-クロロデオキシアデノシン（クラドリビン））；増殖阻害/有糸分裂阻害剤（ビンカルカロイド（ビンブラスチン、ピンクリスチン、及びビンレリピン）のような天然産物、微小管破壊剤、例えば、タキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ピンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン、及びナベルピン、エピジポドフィロトキシン（epidipodophyllotoxin）（エトポシド、テニポシド）、DNA損傷剤（アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、プレオマイシン、プスルファン、カンプトセシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン、ミトマイシン、ミトキサントロン、ニトロウレア、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテル、テモゾラミド（temozolamide）、テニポシド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びエトポシド（VP16）を含む）；抗生物質、例えば、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）、ダウノルビシン、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、イダルビシン、アントラ

30

40

50

サイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、及びミトマイシン；酵素（L - アスパラギンを全身的に代謝し、自分自身のアスパラギンを合成する能力を有しない細胞を取り除くL - アスパラギナーゼ）；抗血小板剤；増殖阻害／有糸分裂阻害アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード（メクロレタミン、シクロホスファミド及びアナログ、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミン及びメチルメラミン（ヘキサメチルメラミン及びチオテパ）、スルホン酸アルキル - ブスルファン、ニトロソウレア（カルムスチン（BCNU）及びアナログ、ストレプトゾシン）、トラゼン - ダカルバジン（DTIC）；増殖阻害／有糸分裂阻害代謝拮抗物質、例えば、葉酸アナログ（メトトレキサート）；白金配位錯体（シスプラチン、カルボプラチン）、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、ミトタン、アミノグルテチミド、ホルモン、ホルモンアナログ（エストロゲン、タモキシフェン、ゴセリリン、ピカルタミド、ニルタミド）、及びアロマターゼ阻害物質（レトロゾール、アナストロゾール）；抗凝血物質（ヘパリン、合成ヘパリン塩、及びその他のトロンビン阻害物質）；繊維素溶解剤（例えば、組織プラスミノゲン活性化物質、ストレプトキナーゼ、及びウロキナーゼ）、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；遊走阻害剤；分泌抑制剤（ブレベルジン（brevelin））；免疫抑制物質（シクロスポリン、タクロリムス（FK - 506）、シロリムス（ラパマイシン）、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル）；抗血管新生化合物（TNP 470、ゲニステイン）、及び成長因子阻害物質（血管内皮成長因子（VEGF）阻害物質、線維芽細胞成長因子（FGF）阻害物質）；アンギオテンシン受容体ブロッカー；一酸化窒素ドナー；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体（トラツズマブ、リツキシマブ）；キメラ抗体受容体；細胞周期阻害物質及び分化誘導物質（トレチノイン）；mTOR阻害物質、トポイソメラーゼ阻害物質（ドキソルビシン（アドリアマイシン）、アムサクリン、カンプトセシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニポシド、エピルビシン、エトポシド、イダルビシン、イリノテカン（CPT - 11）及びミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン）、コルチコステロイド（コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾン、及びプレドニゾン）；成長因子シグナル伝達キナーゼ阻害物質；ミトコンドリア機能不全誘導物質、毒素、例えば、コレラ毒素、リシン、Pseudomonas 外毒素、Bordetella pertussis アデニル酸シクラーゼ毒素、またはジフテリア毒素、及びカスパーゼ活性化物質；ならびにクロマチン破壊剤。

10

20

30

#### 【0159】

サイトカインは、抗がん活性に対する宿主免疫反応を操作するために使用されることが増えている。例えば、Floroso & Tarhini, Semin. Oncol. 42 (4) : 539 - 548, 2015を参照。免疫抗がんまたは抗腫瘍応答の促進に有用なサイトカインとしては、例えば、単独または本開示の修飾細胞との任意の組合せにおけるIFN - 、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 10、IL - 12、IL - 13、IL - 15、IL - 16、IL - 17、IL - 18、IL - 21、IL - 24、及びGM - CSFが挙げられる。

#### 【実施例】

#### 【0160】

40

#### 実施例 1

がんエピトープに対し特異的な高親和性TCRの生成

養子細胞療法で使用するための高親和性TCRの生成は、胸腺選択のために困難である。胸腺選択では、自己抗原に対する高親和性を伴うTCR（例えば、MART1及びMAGE - A1）が除去されるため、このような高親和性TCRは、外部抗原に対し特異的なTCRに比べて相対的に希少である（例えば、図1A及び1Bを参照）。図2A及び2Bに示されているように、MAGE - A1に対し特異的な高親和性TCRを同定するための新規のスクリーニング及び濃縮のプロセスが開発された。簡潔に述べると、健康なドナー12名の末梢血単核球（PBMC）からのCD8 + T細胞を、IL - 2、IL - 7、IL - 15、及びIL - 21の存在下で、ペプチドパルス自己DCで1回刺激し、ペプチドパル

50

ス自己PBM Cで2回刺激して、ポリクローナルMAGE - A 1特異的CD 8 + T細胞株を得た。全てのドナーからの刺激された細胞株をプールし、限定された濃度のMAGE - A 1ペプチド:MHC多量体を用いて数回選別し、これにより、濃縮された高親和性T細胞クローン集団を得た。この集団からのTCR遺伝子を、プールされた個別のpMHC選別におけるTCR頻度に対しシーケンシングした。

【0161】

図3は、MAGE - A 1抗原に対し特異的なTCR CDR 3を発現するT細胞を濃縮した一連のpMHC選別からの例示的なデータを示している。プールから同定された高親和性クローンは、MAGE - A 1:MHCに強力に結合し、より低いEC50と関連した(図4A、4B)。

10

【0162】

#### 実施例2

MAGE - A 1特異的TCRの*in vitro*機能性

実施例1の方法を用いて生成した高親和性MAGE - A 1特異的CD 8 + T細胞クローン「MA 2」(図5A)をさらなる試験のために選択した。図5Bに示されているように、MA 2 + CD 8 + T細胞は、MAGE - A 1発現HAL - A \* 201 + U 266多発性骨髄腫細胞と共培養したときに、サイトカインを選択的に産生した(10:1のエフェクター:標的(E:T)比、4時間)。標準的な4時間のCr 51放出アッセイにおいて、MA 2 + T細胞は、外来のIFN - 及びMAGE - A 1ペプチドの存在下でも不在下でも、標的細胞を殺滅可能であった(図5C)。

20

【0163】

#### 実施例3

MAGE - A 1特異的CD 8 TCRはCD 8に非依存的に四量体に結合する

CD 8 + TCRは、クラスIHLA分子によって提示された抗原を認識し、一方CD 4 + TCRは、クラスIIHLAの文脈において提示された抗原を認識する。高親和性MA 2 TCRが、CD 8に非依存的にMAGE - A 1:HLA Iに結合することができるかを試験するため、CD 4 + T細胞にMA 2 TCRを形質導入した(例えば、図6A及び6Bの概略図を参照)。図7A及び7Bに示されているように、MA 2 TCRを形質導入したCD 4 + T細胞は、MA 2 CD 8 + T細胞と同等の(Bmaxにおける約5倍の差)親和性でMAGE - A 1:HLA四量体に結合した。しかし、図7Cに示されているように、形質転換CD 4 + T細胞は、*in vitro*で標的細胞を殺滅しなかった。

30

【0164】

#### 実施例4

MAGE - A 1特異的CD 8 TCR及びCD 8共受容体を発現する操作されたCD 4 + T細胞の機能的試験

次に、CD 8 + 共受容体が高親和性CD 8 - TCR発現CD 4 + T細胞の機能を改善する能力について検討した(例えば、図6Aを参照)。図8Aの図で説明されているように、CD 4 + T細胞に、高親和性クラスI制限MAGE - A 1特異的TCR及びCD 8共受容体の両方を形質導入した。図8Bは、外来のCD 8 TCR及びCD 8共受容体の両方を形質導入したCD 4 + T細胞が、外来のCD 8 TCR単体を形質導入したCD 4 + T細胞と比較して、より高い割合で抗原に応答してサイトカインを産生したことを示している。図8Cは、二重に形質導入したCD 4 + T細胞が、驚くべきことに、同じ高親和性TCRを発現するCD 8 + T細胞と同等の比率で、MEL 526標的細胞に対する細胞溶解活性を呈したことを示している。図8Dに示されているように、二重に形質導入したCD 4 + T細胞はさらに、抗原による刺激後、CD 8を伴わないMA 1 + CD 4 + 細胞よりも口バストに増殖した。

40

【0165】

これらのデータは、本開示の高親和性MAGE - A 1特異的TCR、ならびに当該TCRを発現するCD 8 + 及びCD 4 + T細胞は、MAGE - A 1発現がん細胞の標的化及び殺滅に有用であり、MAGE - A 1発現疾患に対する細胞免疫療法における用途を有するこ

50

とを示すものである。

【 0 1 6 6 】

上記の様々な実施形態は、組み合わせてさらなる実施形態をもたらすことができる。本明細書で参照されている、及び／または（存在する場合）出願データシートに列挙されている全ての米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、及び非特許刊行物は、2017年3月15日に出願された米国仮特許出願第62/471,956号を含めて、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。実施形態の態様は、なおさらなる実施形態を提供するために様々な特許、出願、及び刊行物の概念を用いる必要がある場合、修正することができる。

【 0 1 6 7 】

これら及びその他の変更は、上記の詳細な説明に照らして、実施形態に対し行われ得る。概して、以下の請求項において、使用されている用語は、請求項を明細書及び請求項で開示されている特定の実施形態に限定するように解釈されるべきではなく、このような用語は、請求項が権利を有する全ての範囲の等価物と共に、全ての可能な実施形態を含むように解釈されるべきである。したがって、請求項は、本開示によって限定されない。

10

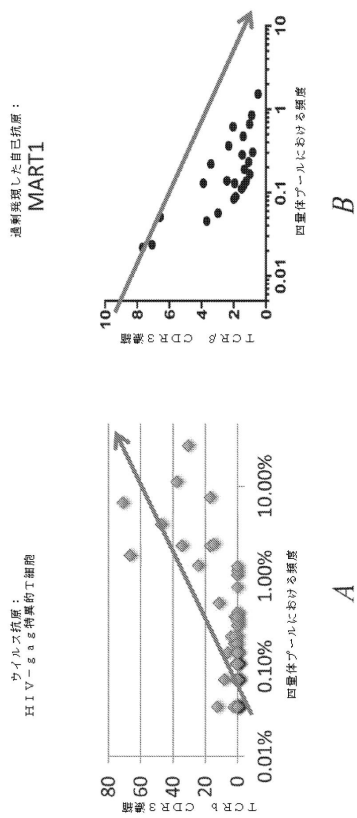
20

30

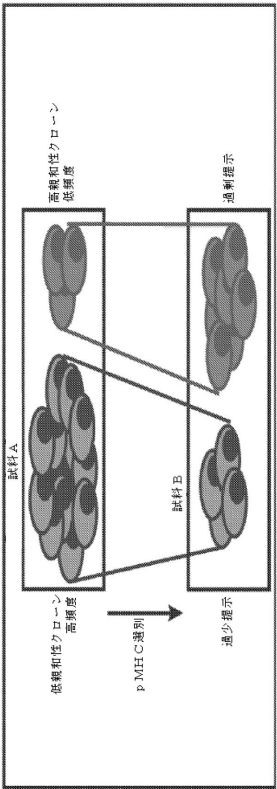
40

50

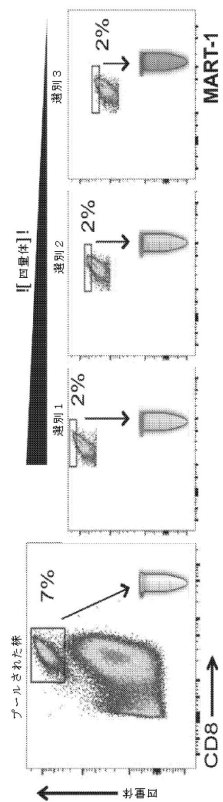
【図面】  
【図 1】  
【図 1】



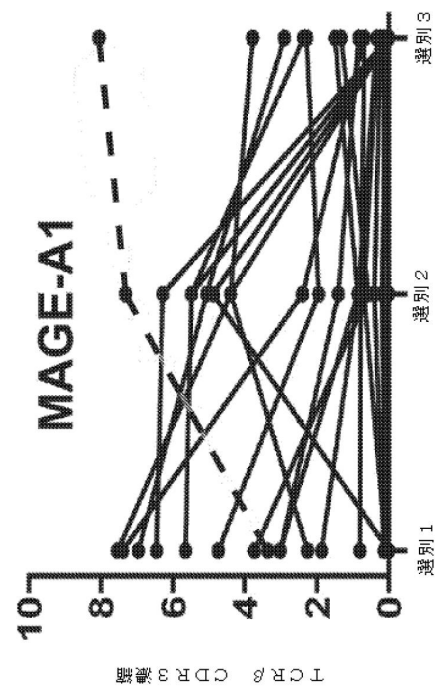
【図 2 A】  
【図 2 A】



【図 2 B】  
【図 2 B】



【図 3】  
【図 3】



10

20

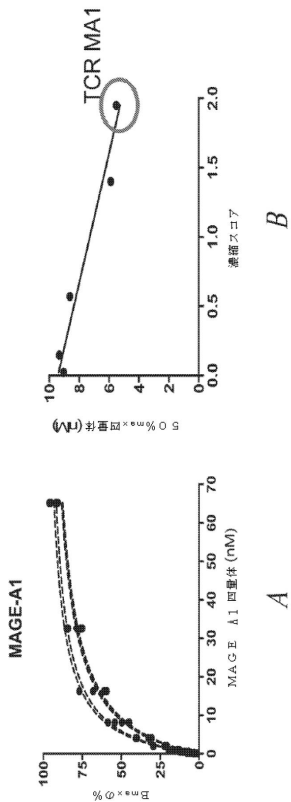
30

40

50

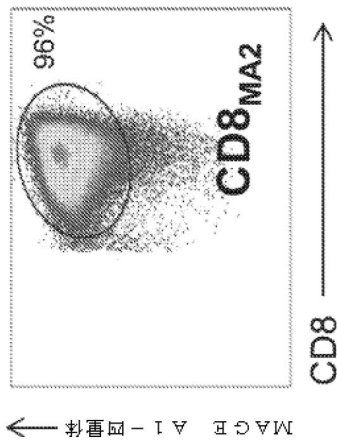
【図 4】

【図 4】



【図 5 A】

【図 5 A】



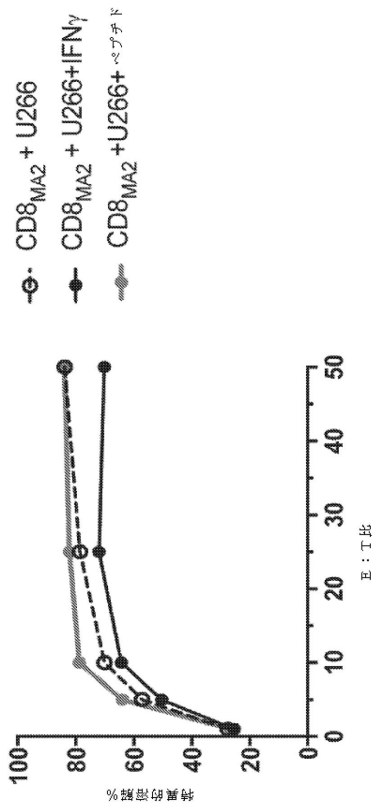
【図 5 B】

【図 5 B】



【図 5 C】

【図 5 C】



10

20

30

40

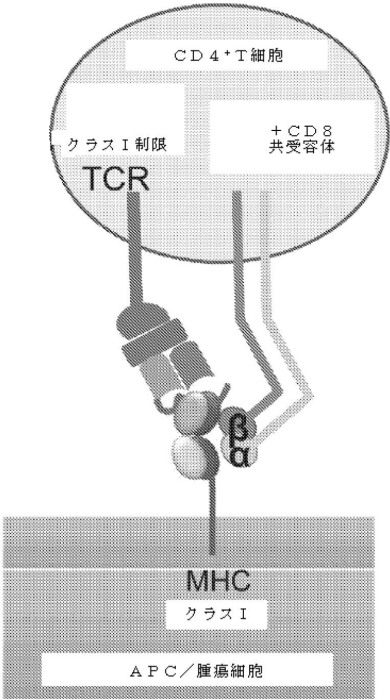
50





【図 8 - 1】

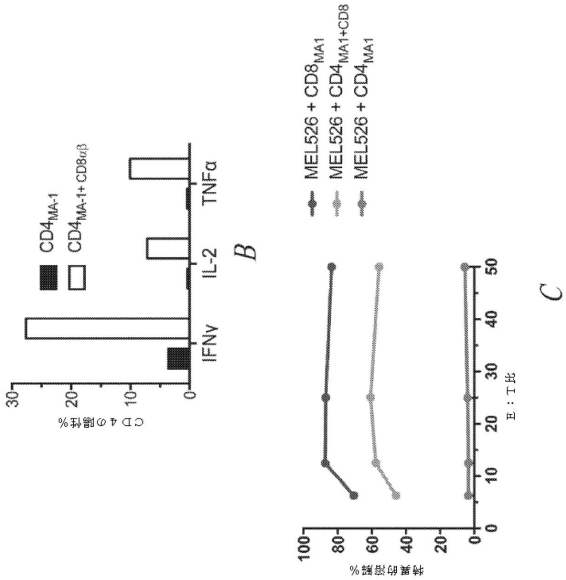
【図 8 - 1】



A

【図 8 - 2】

【図 8 - 2】



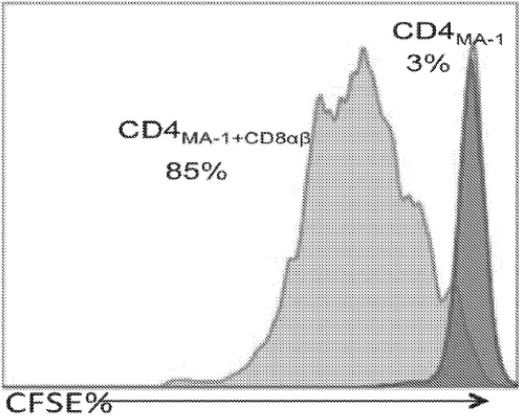
C

10

20

【図 8 - 3】

【図 8 - 3】



D

30

40

【配列表】

0007037577000001.app

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	

弁護士 山本 健策

## (72)発明者

シャピユイ, アウディ

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 7, シアトル, エヌダブリュー 9 5 ティーエイチ ストリート 3 0 2 3

## (72)発明者

シュミット, トーマス

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 1 9, シアトル, 4 ティーエイチ アベニュー ダブリュー 3 0 3 3

## (72)発明者

マカフィー, メーガン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 2, シアトル, 3 2 エヌディー アベニュー 1 1 2 3

審査官 高山 敏充

## (56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 0 5 6 3 5 ( J P , A )

Gene Therapy (2005) 12, 140-146

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )