(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2018-531593
(P2018-531593A)
(43)公表日　平成30年11月1日(2018.11.1)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	ZNA	4B063
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705		4B065
C12N 15/12	(2006.01)	C12N	15/12		4H045
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/09	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 79 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-512912 (P2018-512912)
(86)(22)出願日　平成28年9月9日 (2016.9.9)
(85)翻訳文提出日　平成30年4月26日 (2018.4.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2016/050850
(87)国際公開番号　WO2017/044672
(87)国際公開日　平成29年3月16日 (2017.3.16)
(31)優先権主張番号　62/217,677
(32)優先日　平成27年9月11日 (2015.9.11)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　515124598
アジェナス　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　マサチューセッツ　０２４２１，　レキシントン，　フォーブスロード　３
(74)代理人　100108453
弁理士　村山　靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広　信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部　達彦
(72)発明者　マルク・ファン・ダイク
オランダ国３７２２ゼットエイチ　ビルトホーフェン．ガーイラーン１６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】操作された宿主細胞及びそれらの使用方法

(57)【要約】
機能的Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）の発現に適した操作された宿主細胞、及び所望のペプチドーー主要組織適合複合体（ＭＨＣ）複合体に特異的に結合するTCRを同定するためのこれらの細胞の使用方法が、本明細書において提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
リンパ球由来の単離された細胞であって、該細胞は、組み換え共受容体又はその第一鎖をコードする第一のポリヌクレオチドを含み、ここで、該細胞はＣＤ３を発現するが、細胞表面上で内在性Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を発現しない、上記細胞。
【請求項２】
ＣＤ３が内在性ＣＤ３である、請求項１に記載の細胞。
【請求項３】
ＣＤ３が組み換えＣＤ３である、請求項１に記載の細胞。
【請求項４】
リンパ球由来の単離された細胞であって、該細胞は、組み換え共受容体又はその第一鎖をコードする第一のポリヌクレオチドを含み、ここで、リンパ球はインバリアントＮＫＴ（ｉＮＫＴ）細胞又は多様ＮＫＴ（ｄＮＫＴ）細胞である、上記細胞。
【請求項５】
細胞表面上で、組み換え共受容体又はその第一鎖を発現する、請求項１～４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項６】
組み換え共受容体又はその第一鎖をコードする第一のポリヌクレオチドを含む、リンパ球由来の単離された細胞であって、ここで該細胞は、細胞表面上で組み換え共受容体又はその第一鎖を、制御可能な様式で発現することができる、上記細胞。
【請求項７】
組み換え共受容体又はその第一鎖を、細胞表面上で制御可能な様式で発現する、請求項１～６のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項８】
細胞表面上で内在性共受容体を発現しない、請求項１～７のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項９】
内在性共受容体がＣＤ８又はＣＤ４である、請求項８に記載の細胞。
【請求項１０】
組み換え共受容体又はその第一鎖は、細胞外領域、膜貫通領域、及び細胞質内領域を含み、ここで細胞外領域は膜貫通領域に連結されており、そして膜貫通領域は細胞質内領域に連結されている、請求項１～９のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１１】
組み換え共受容体又はその第一鎖の細胞質内領域のアミノ酸配列が、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一であり、場合により、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００％同一である、請求項１０に記載の細胞。
【請求項１２】
組み換え共受容体又はその第一鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖の対応する膜貫通領域及び細胞質内領域全体のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一であり、場合により、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００％同一である、請求項１０に記載の細胞。
【請求項１３】
組み換え共受容体又はその第一鎖の細胞外領域のアミノ酸配列が、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖の対応する細胞外領域のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一であり、場合により、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００％同一である、請求項１０～１２のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１４】

リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖がヒトである、請求項１３に記載の細胞。
【請求項１５】
組み換え共受容体がＣＤ８又はＣＤ４である、請求項１～１４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１６】
組み換え共受容体の第二鎖をコードする第二のポリヌクレオチドをさらに含み、ここで第二鎖は、細胞外領域、膜貫通領域、及び細胞質内領域を含み、そしてここで第二鎖の細胞外領域は第二鎖の膜貫通領域に連結されており、そして第二鎖の膜貫通領域は第二鎖の細胞質内領域に連結されている、請求項１～１５のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項１７】
第二鎖の細胞質内領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一であり、場合により、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００％同一である、請求項１６に記載の細胞。
【請求項１８】
第二鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体鎖の対応する膜貫通領域及び細胞質内領域の全体のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一であり、場合により、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００％同一である、請求項１６に記載の細胞。
【請求項１９】
第二鎖の細胞外領域のアミノ酸配列は、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体鎖の対応する細胞外領域のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一であり、場合により、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００％同一である、請求項１６～１８のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２０】
リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体鎖がヒトである、請求項１９に記載の細胞。
【請求項２１】
組み換え共受容体がＣＤ８である、請求項１６～２０のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２２】
組み換え共受容体の第一鎖の細胞質内領域は、配列番号１の残基１８３～２１２のアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の細胞。
【請求項２３】
組み換え共受容体の第一鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域が全体で、配列番号１の残基１６２～２１２のアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の細胞。
【請求項２４】
組み換え共受容体の第一鎖の細胞外領域は、配列番号１の残基１～１６１のアミノ酸配列を含む、請求項２１～２３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２５】
組み換え共受容体の第二鎖の細胞質内領域は、配列番号２の残基１７１～１８７のアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の細胞。
【請求項２６】
組み換え共受容体の第二鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域が全体で、配列番号２の残基１５０～１８７のアミノ酸配列を含む、請求項２１に記載の細胞。
【請求項２７】
組み換え共受容体の第二鎖の細胞外領域は、配列番号２の残基１～１４９のアミノ酸配列を含む、請求項２１、２５、及び２６のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項２８】
組み換え共受容体が：

ａ）　ヒトＣＤ８αの細胞外領域、及びマウスＣＤ８αの膜貫通領域及び細胞質内領域を含むキメラＣＤ８α鎖、並びに
ｂ）　ヒトＣＤ８βの細胞外領域、及びマウスＣＤ８βの膜貫通領域及び細胞質内領域を含むキメラＣＤ８β鎖
を含むキメラＣＤ８である、請求項２１に記載の細胞。
【請求項２９】
マウスリンパ球由来の単離された細胞であって、該細胞は：
ａ）　ヒトＣＤ８αの細胞外領域、及びマウスＣＤ８αの膜貫通領域及び細胞質内領域を含むキメラＣＤ８α鎖をコードする第一のポリヌクレオチド、並びに
ｂ）　ヒトＣＤ８βの細胞外領域、及びマウスＣＤ８βの膜貫領域及び細胞質内領域を含むキメラＣＤ８β鎖をコードする第二のポリヌクレオチド、
を含み、
ここで該細胞はＣＤ３を発現するが、細胞表面上で内在性ＴＣＲを発現しない、上記細胞。
【請求項３０】
キメラＣＤ８α鎖は配列番号１のアミノ酸配列を含み、そしてキメラＣＤ８β鎖は配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項２８又は２９に記載の細胞。
【請求項３１】
キメラＣＤ８α鎖のアミノ酸配列は配列番号１のアミノ酸配列からなり、そしてキメラＣＤ８β鎖のアミノ酸配列は配列番号２のアミノ酸配列からなる、請求項３０に記載の細胞。
【請求項３２】
組み換え共受容体又はその鎖の表面発現が制御可能である、請求項１～３１のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３３】
第一のポリヌクレオチドが、適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対と隣接している、請求項３２に記載の細胞。
【請求項３４】
第二のポリヌクレオチドは、適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対と隣接している、請求項３２に記載の細胞。
【請求項３５】
第一のポリヌクレオチドの膜貫通領域及び細胞質内領域を一緒にコードする部分は、適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対と隣接している、請求項３２に記載の細胞。
【請求項３６】
第二のポリヌクレオチドの膜貫通領域及び細胞質内領域を一緒にコードする部分は、適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対と隣接している、請求項３２に記載の細胞。
【請求項３７】
適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対は、適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対と交差反応しない、請求項３３～３６のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３８】
組み換え共受容体又はその鎖の表面発現は、第一のポリヌクレオチドの適合性の部位徳的組み換え配列の第一の対及び／又は第二のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対を認識する同族部位特異的リコンビナーゼと、第一のポリヌクレオチド及び／又は第二のポリヌクレオチドを接触させることにより減衰され得る、請求項３３～３７のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項３９】
組み換え共受容体又はその鎖の表面発現は、第一のポリヌクレオチドの適合性の部位徳的組み換え配列の第一の対及び／又は第二のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対を認識する同族部位特異的リコンビナーゼと、第一のポリヌクレオチド及び／又は第二のポリヌクレオチドを接触させることにより抑制され得る、請求項３３

～３７のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項４０】
適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対及び／又は第二の対を認識する同族部位特異的リコンビナーゼをコードする第三のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項３３～３９のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項４１】
第三のポリヌクレオチドの転写は、誘導性プロモーターにより制御される、請求項４０に記載の細胞。
【請求項４２】
部位特異的組み換え配列の第一の対及び第二の対は、ｌｏｘ部位の適合性の対であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼはＣｒｅリコンビナーゼである、請求項３８～４１のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項４３】
ｌｏｘ部位の適合性の対はｌｏｘＰ部位である、請求項４２に記載の細胞。
【請求項４４】
組み換え共受容体はＣＤ８である、請求項３２～４３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項４５】
第一のポリヌクレオチドは、配列番号３の残基１～６７５のポリヌクレオチド配列を含む、請求項４４に記載の細胞。
【請求項４６】
第一のポリヌクレオチドは、配列番号３のポリヌクレオチド配列を含む、請求項４４に記載の細胞。
【請求項４７】
第二のポリヌクレオチドは、配列番号４の残基１～６００のポリヌクレオチド配列を含む、請求項４４に記載の細胞。
【請求項４８】
第二のポリヌクレオチドは、配列番号４のポリヌクレオチド配列を含む、請求項４４に記載の細胞。
【請求項４９】
組み換え共受容体の第一鎖は、配列番号２５のアミノ酸配列を含む、請求項４４に記載の細胞。
【請求項５０】
組み換え共受容体の第一鎖は、配列番号５のアミノ酸配列を含む、請求項４９に記載の細胞。
【請求項５１】
組み換え共受容体の第二鎖は、配列番号２６のアミノ酸配列を含む、請求項４４に記載の細胞。
【請求項５２】
組み換え共受容体の第二鎖は、配列番号６のアミノ酸配列を含む、請求項５１に記載の細胞。
【請求項５３】
第一のポリヌクレオチドの転写は、誘導性プロモーターにより制御される、請求項３２に記載の細胞。
【請求項５４】
第二のポリヌクレオチドの転写は、誘導性プロモーターにより制御される、請求項３２又は５３に記載の細胞。
【請求項５５】
１つ又はそれ以上のレポーター系をさらに含む、請求項１～５４のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項５６】

１つ又はそれ以上のレポーター系は、活性化Ｔ細胞の核因子（ＮＦＡＴ）シグナル伝達、ＩＬ－２シグナル伝達、アクチベータータンパク質－１（ＡＰ１）シグナル伝達、ＮＦκＢ／Ｒｅｌシグナル伝達、及びカルシウム流動からなる群より選択される細胞の１つ又はそれ以上の活性の指標を生じる、請求項５５に記載の細胞。

【請求項５７】

１つ又はそれ以上のレポーター系は、検出可能なマーカーをコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター領域を含むポリヌクレオチドを含む、請求項５５又は５６に記載の細胞。

【請求項５８】

プロモーター領域は、活性化Ｔ細胞の核因子（ＮＦＡＴ）応答エレメント、アクチベータータンパク質（ＡＰ１）応答エレメント、及びＮＦκＢ／Ｒｅｌ応答エレメントからなる群より選択される１つ又はそれ以上の転写応答エレメントを含む、請求項５７に記載の細胞。

【請求項５９】

検出可能なマーカーが、蛍光タンパク質、細胞表面マーカー、及び抗生物質選択マーカーからなる群より選択される、請求項５７又は５８に記載の細胞。

【請求項６０】

プロモーター領域がＩＬ－２プロモーターである、請求項５７に記載の細胞。

【請求項６１】

ＩＬ－２プロモーターがミニマルＩＬ－２プロモーターである、請求項６０に記載の細胞。

【請求項６２】

ＩＬ－２プロモーターが１つ又はそれ以上のＮＦＡＴ結合部位を含む、請求項６０に記載の細胞。

【請求項６３】

ＩＬ－２プロモーターが３つのＮＦＡＴ結合部位を含む、請求項６２に記載の細胞。

【請求項６４】

検出可能なマーカーが、高感度緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）である、請求項６０～６３のいずれか１項に記載の細胞。

【請求項６５】

細胞は単細胞由来であり、そしてここで細胞が少なくとも10^5の複数の細胞まで増殖され、そしてＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖をコードする別々のポリヌクレオチドベクターで形質導入又はトランスフェクトされ、形質導入又はトランスフェクションの効率を最大にする条件下でＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖を含む組み換えＴＣＲを発現する場合に、複数の細胞の少なくとも２０％は、細胞表面上で組み換えＴＣＲを発現する、請求項１～６２のいずれか１項に記載の細胞。

【請求項６６】

細胞は、１回又はそれ以上の形質導入又はトランスフェクションを以前に受けている、請求項６５に記載の細胞。

【請求項６７】

リンパ球が、Ｔ細胞、Ｂ細胞、又はＮＫ細胞である、請求項１～６６のいずれか１項に記載の細胞。

【請求項６８】

リンパ球が、$CD8^+$細胞傷害性Ｔ細胞、$CD8^+$制御性Ｔ細胞、$CD4^+$細胞傷害性Ｔ細胞、$CD4^+$ヘルパーＴ細胞、及び$CD4^+$制御性Ｔ細胞からなる群より選択されるＴ細胞である、請求項６７に記載の細胞。

【請求項６９】

リンパ球が哺乳動物リンパ球である、請求項１～６８のいずれか１項に記載の細胞。

【請求項７０】

リンパ球がネズミ科動物リンパ球である、請求項６９に記載の細胞。

【請求項７１】
リンパ球が、ＲＡＧ１又はＲＡＧ２ノックアウトマウス細胞、未成熟マウスＴ細胞、マウスＤＯ－１１．１０．７　５８　α－　β－　（５８－／－）細胞、及びマウスＢｗ５１４７細胞からなる群より選択される、請求項７０に記載の細胞。
【請求項７２】
リンパ球がマウスリンパ球である、請求項７０又は７１に記載の細胞。
【請求項７３】
細胞は細胞表面上に組み換えＴＣＲをさらに発現し、組み換えＴＣＲはＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖を含み、ここでＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖は、可変領域及び非可変領域をそれぞれ含み、各非可変領域は、定常領域、膜貫通領域、及び細胞質内領域を含み、ここで各鎖について、可変領域は定常領域に連結されており、定常領域は膜貫通領域に連結されており、そして膜貫通領域は細胞質内領域に連結されている、請求項１～７２のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項７４】
ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖のそれぞれについて、細胞質内領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するＴＣＲ鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも６０％同一であり、場合により７０、８０、９０、又は１００％同一である、請求項７３に記載の細胞。
【請求項７５】
ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖のそれぞれについて、膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するＴＣＲ鎖の対応する領域のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一であり、場合により、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００％同一である、請求項７３に記載の細胞。
【請求項７６】
ＴＣＲα鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、配列番号１４のアミノ酸配列を含む、請求項７５に記載の細胞。
【請求項７７】
ＴＣＲβ鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列が全体で、配列番号１６、１８、及び２０からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項７５又は７６に記載の細胞。
【請求項７８】
ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖の各々について、非可変領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するＴＣＲ鎖の対応する非可変領域のアミノ酸配列と、少なくとも９０％同一であり、場合により、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、又は１００％同一である、請求項７３～７５のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項７９】
ＴＣＲα鎖の非可変領域は、配列番号１３のアミノ酸配列を含む、請求項７８に記載の細胞。
【請求項８０】
ＴＣＲβ鎖の非可変領域は、配列番号１５、１７、及び１９からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項７８又は７９に記載の細胞。
【請求項８１】
各可変領域のアミノ酸配列は、リンパ球と異なる種由来のＴＣＲ鎖の対応する可変領域から誘導されたものである、請求項７３～８０のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項８２】
ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖の各々について、可変領域及び定量領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と異なる種由来のＴＣＲ鎖の対応する領域から誘導されたものである、請求項７３～７５のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項８３】
リンパ球と異なる種由来のＴＣＲがヒトである、請求項８１又は８２に記載の細胞。

【請求項８４】
組み換えＴＣＲは、同時刺激シグナル伝達領域を含む融合分子である、請求項７３～８３のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項８５】
同時刺激シグナル伝達領域が、ＴＣＲα鎖の細胞質内領域又はＴＣＲβ鎖の細胞質内領域に融合される、請求項８４に記載の細胞。
【請求項８６】
同時刺激シグナル伝達領域は、ＣＤ２７、ＣＤ２８、４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＩＣＯＳ、リンパ球機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｄ、Ｂ７－Ｈ３、及びＣＤ８３に特異的に結合するリガンドからなる群より選択される同時刺激分子のシグナル伝達領域を含む、請求項８４又は８５に記載の細胞。
【請求項８７】
同時刺激シグナル伝達領域は、ＣＤ２８のシグナル伝達領域、４－１ＢＢのシグナル伝達領域、又はそれらの組み合わせを含む、請求項８６に記載の細胞。
【請求項８８】
融合分子はＣＤ３ζシグナル伝達領域をさらに含む、請求項８４～８７のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項８９】
組み換えＴＣＲの発現は、
（１）少なくとも１つの抗生物質選択マーカー；
（２）少なくとも１つのスクリーニングマーカー；又は
（３）それらの組み合わせ
の発現と連結される、請求項７３～８８のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項９０】
少なくとも１つのスクリーニングマーカーが、蛍光タンパク質又は細胞表面マーカーである、請求項８９に記載の細胞。
【請求項９１】
組み換えＴＣＲは、胎仔胸腺、臍帯血、癌患者、ワクチン接種した被験体、目的の抗原に自然に曝露された被験体、健常被験体、及び合成ライブラリーから単離された腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）からなる群より選択された供給源から誘導されたものである、請求項７３～９０のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項９２】
ワクチン接種した被験体が、ＨＰＶワクチン、ＥＢＶワクチン、又は癌ワクチンを受けたヒトである、請求項９１に記載の細胞。
【請求項９３】
ワクチン接種した被験体が、目的の抗原を用いて免疫されたヒト主要組織適合複合体（ＭＨＣ）を発現するトランスジェニックマウスである、請求項９１に記載の細胞。
【請求項９４】
ワクチン接種した被験体が、目的の抗原を用いて免疫されたＨＬＡ－Ａ２を発現するトランスジェニックマウスである、請求項９３に記載の細胞。
【請求項９５】
細胞は、（１）組み換えＴＣＲα鎖及び組み換えＴＣＲβ鎖、（２）組み換えＴＣＲα鎖及び複数の異なる組み換えＴＣＲβ鎖、（３）組み換えＴＣＲβ鎖及び複数の異なる組み換えＴＣＲα鎖、又は（４）複数の異なる組み換えＴＣＲα鎖及び複数の異なる組み換えＴＣＲβ鎖を発現する、請求項７３～７９のいずれか１項に記載の細胞。
【請求項９６】
請求項７３～９５のいずれか１項に記載の細胞を複数含む、細胞ライブラリー。
【請求項９７】
少なくとも10^7、10^8、又は10^9のＴＣＲ多様性を有する、請求項９６に記載の

細胞ライブラリー。
【請求項９８】
所望の特徴を有するＴＣＲの単離及び同定のための方法であって、該方法は、請求項７３～９５のいずれか１項に記載の複数の細胞又は請求項９６若しくは９７に記載の細胞ライブラリーを選択プロセスにかけることを含み、該選択プロセスは、所望のペプチド－ＭＨＣ複合体の存在下で所望の特徴について選択すること、ＴＣＲを発現する細胞を単離すること、及び単離された細胞のＴＣＲが所望の特徴を有していることを決定することを含む、上記方法。
【請求項９９】
所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの同定のための方法であって、該方法は：
（ａ） 請求項１～７２のいずれか１項に記載の複数の細胞を提供すること、
（ｂ） 複数のＴＣＲをコードする複数の発現構築物を用いて細胞を形質導入又はトランスフェクトすること、
（ｃ） 細胞の表面上でＴＣＲを発現させること、
（ｄ） 所望のペプチド－ＭＨＣ複合体の存在下で所望の特徴についてＴＣＲを発現する細胞を選択すること、
（ｅ） 選択された細胞から、所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを単離すること、及び
（ｆ） 工程（ｅ）において単離された所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを同定すること
を含む、上記方法。
【請求項１００】
所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの同定のための方法であって、該方法は：
（ａ） 請求項１～７２のいずれか１項に記載の複数の細胞を提供すること；
（ｂ） 複数のＴＣＲをコードする複数の発現構築物を用いて細胞を形質導入又はトランスフェクトすること、
（ｃ） 細胞の表面上でＴＣＲを発現させること。
（ｄ） 所望のペプチド－ＭＨＣ複合体の存在下で所望の特徴についてＴＣＲを発現する細胞を選択すること、
（ｅ） 工程（ｄ）において選択された細胞において組み換え共受容体又はその鎖の活性を調節すること、
（ｆ） 所望のペプチド－ＭＨＣ複合体の存在下で所望の特徴について工程（ｅ）により得られたＴＣＲを発現する細胞をさらに選択すること、
（ｇ） 工程（ｆ）において選択された細胞から、所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを単離すること、及び
（ｈ） 工程（ｇ）において単離された所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを同定すること
を含む、上記方法。
【請求項１０１】
工程（ｄ）は、組み換え共受容体又はその鎖の表面発現の存在下で行われ、そして工程（ｅ）は、組み換え共受容体又はその鎖の細胞表面発現の抑止を含む、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
工程（ａ）の複数の細胞は、請求項３３～４０のいずれか１項に記載の細胞を含み、そして工程（ｅ）において、組み換え共受容体又はその鎖の細胞表面発現は、第一及び／又は第二のポリヌクレオチドにおける部位特異的組み換え配列を、同族部位特異的リコンビナーゼと接触させることにより抑止される、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０３】

同族部位特異的リコンビナーゼは、誘導性プロモーターの制御下で細胞において発現される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
同族部位特異的リコンビナーゼは、工程（ｅ）の前に工程（ｄ）において選択された細胞に導入される、請求項１０２に記載の方法。
【請求項１０５】
同族部位特異的リコンビナーゼは、工程（ｄ）において選択された細胞を、部位特異的リコンビナーゼをコードする発現構築物を用いてトランスフェクト又は形質導入することにより導入される、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
同族部位特異的リコンビナーゼはタンパク質として導入される、請求項１０４に記載の方法。
【請求項１０７】
部位特異的組み換え配列はｌｏｘ部位であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼはＣｒｅリコンビナーゼである、請求項１０２～１０６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０８】
部位特異的組み換え配列はｌｏｘ部位であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼは、タンパク質形質導入ドメインを含むＣｒｅリコンビナーゼ融合タンパク質である、請求項１０７に記載の方法。
【請求項１０９】
タンパク質形質導入ドメインはＨＩＶ　Ｔａｔ由来である、請求項１０８に記載の方法。
【請求項１１０】
所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの同定のための方法であって、該方法は：
（ａ）　請求項１～７２のいずれか１項に記載の複数の細胞を提供すること；
（ｂ）　複数のＴＣＲをコードする複数の発現構築物を用いて細胞を形質導入又はトランスフェクトすること、
（ｃ）　細胞の表面上でＴＣＲを発現させること、
（ｄ）　目的のペプチドと複合体化したＭＨＣ分子の存在下で所望の特徴についてＴＣＲを発現する細胞を選択すること、［ここで、ＭＨＣ分子は野生型ＭＨＣ分子の変異体であり、ここで変異ＭＨＣ分子は、野生型ＭＨＣ分子の共受容体に対する親和性と比較して減少した親和性で共受容体に結合する］、
（ｅ）　工程（ｄ）において選択された細胞から、所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを単離すること、及び
（ｆ）　工程（ｅ）において単離された所望の特徴を有するＴＣＲをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを同定すること
を含む、上記方法。
【請求項１１１】
共受容体がＣＤ８であり、そして変異ＭＨＣ分子は、野生型ＭＨＣクラスＩ　α鎖の変異体であるα鎖を含む変異ＭＨＣクラスＩ分子である、請求項１１０に記載の方法。
【請求項１１２】
共受容体がヒトＣＤ８であり、そして変異ＭＨＣクラスＩ分子が、野生型ＨＬＡ－Ａ２α鎖の変異体であるα鎖を含む変異ＨＬＡ－Ａ２である、請求項１１１に記載の方法。
【請求項１１３】
変異ＨＬＡ－Ａ２　α鎖は、成熟タンパク質配列に従って番号付けされたＡ２４５Ｖ変異又はＤ２２７Ｋ／Ｔ２２８Ａ変異を含む、請求項１１２に記載の方法。
【請求項１１４】
所望の特徴が、所望のペプチド－ＭＨＣ複合体に対する高い選択性、所望のペプチド－ＭＨＣ複合体に対する高い親和性、及び所望のペプチド－ＭＨＣ複合体の存在下でのポジ

ティブな機能的読み出しの提示からなる群より選択される、請求項９８～１１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１５】
機能的読み出しが、活性化マーカーの発現、シグナル伝達経路の誘発、サイトカインの産生、カルシウム流動、増殖及びレポーター系の活性化からなる群より選択される、請求項１１４に記載の方法。
【請求項１１６】
活性化マーカーがＣＤ６９又はＣＤ１３７である、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
複数の細胞が請求項５５～６４のいずれか１項に記載の細胞を含み、そして機能的読み出しが１つ又はそれ以上のレポーター系の活性化である、請求項１１５又は１１６に記載の方法。
【請求項１１８】
複数の発現構築物が、（ｉ）ＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖、（ｉｉ）ＴＣＲα鎖及び複数の異なるＴＣＲβ鎖、（ｉｉｉ）ＴＣＲβ鎖及び複数の異なるＴＣＲα鎖、又は（ｉｖ）複数の異なるＴＣＲα鎖及び複数の異なるＴＣＲβ鎖をコードする、請求項９９～１１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１９】
所望のペプチド－ＭＨＣ複合体がＭＨＣクラスＩ又はＭＨＣクラスＩＩ分子を含む、請求項９８～１１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２０】
所望のペプチド－ＭＨＣ複合体がセルフリーペプチド－ＭＨＣ複合体である、請求項９８～１１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２１】
所望のペプチド－ＭＨＣ複合体が、ＭＨＣ分子の二量体、四量体、又は多量体である、請求項１２０に記載の方法。
【請求項１２２】
所望のペプチド－ＭＨＣ複合体が細胞の表面上に提示される、請求項９８～１１９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２３】
細胞が哺乳動物細胞、酵母細胞、又は昆虫細胞である、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１２４】
細胞がＴ２細胞又は抗原提示細胞である、請求項１２２に記載の方法。
【請求項１２５】
ペプチドがリンペプチド又はリンペプチド模倣物である、請求項９８～１２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２６】
工程（ｂ）において、複数のＴＣＲをコードする複数の発現構築物は、ＰＶＣ－２１１マウス白血病ウイルスの外皮を含むレトロウイルスベクター粒子を使用して細胞に形質導入される、請求項９９～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２７】
各ＴＣＲがＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖を含み、ここでＴＣＲα鎖及びＴＣＲβ鎖は、別々の発現構築物によりコードされる、請求項９９～１２５のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、米国仮出願第62/217,677号（2015年9月11日出願）（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）の利益を主張する。
【０００２】

発明の分野

本開示は、機能性T細胞受容体(TCR)の発現に適した操作された宿主細胞、及び所望のペプチド-主要組織適合複合体(MHC)複合体に特異的に結合するTCRを同定するためにこれらの細胞を使用する方法を提供する。

【背景技術】

【０００３】

背景

哺乳動物において、後天的な免疫系は、２つの主要な成分を含む：抗体を含む体液性免疫応答、及びT細胞を含む細胞性免疫応答。T細胞は、適応細胞性免疫の主要なメディエーターであり、そして主要組織適合複合体(MHC)分子に結合したペプチドエピトープのTCR媒介認識によりそれらの作用を及ぼす。免疫系は、広範囲のペプチド-MHC特異性を包含する多数のT細胞を含有する。しかし、胸腺におけるネガティブ及びポジティブの選択プロセスは、T細胞多様性に対する制限を生じ、インビボT細胞反応性の範囲を限定する。例えば、ネガティブ選択は、自己抗原に対して特異的な高親和性T細胞レパートリーの除去をもたらし、そしてこれは、腫瘍組織上で発現された自己抗原に対するような所望の特異性を有するT細胞を含む。

【０００４】

癌免疫療法、癌性細胞に対する患者の免疫応答の増強は、大いに期待できる。能動免疫療法は、腫瘍保有患者の内在性免疫系の刺激により行われる。受動的、又は養子免疫療法は、免疫適格細胞の患者への移植を含む。養子療法の１つのアプローチは、公知の癌特異的ペプチド-MHC複合体に特異的なTCRを癌患者のT細胞に導入する遺伝子治療技術の使用である。しかし、このアプローチは、適切な親和性で癌特異的ペプチド-MHC複合体に特異的に結合するTCRに依存する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

従って、所望のペプチド-MHC複合体(例えば、癌特異的ペプチド抗原を含むペプチド-MHC複合体)に特異的に結合する新規なTCR、及びこのようなTCRを発見するための技術が当該分野で必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

発明の簡単な要旨

機能的TCRの発現に適した操作された細胞、及び所望のペプチド-MHC複合体に特異的に結合するTCRを同定するためのこれらの細胞の使用方法が本明細書において提供される。

【０００７】

一局面において、本開示は、組み換え共受容体、又はその第一鎖をコードする第一のポリヌクレオチドを含む、リンパ球由来の細胞（例えば、単離された細胞）を提供し、ここで細胞はCD3を発現するが、細胞表面上で内在性TCRを発現しない。特定の実施態様において、CD3は内在性CD3である。特定の実施態様において、CD3は組み換えCD3である。特定の実施態様において、細胞は、組み換え共受容体、若しくはその第一鎖を細胞表面上で発現し、かつ／又は細胞は、組み換え共受容体、若しくはその第一鎖を、細胞表面上で制御可能な様式で発現し、かつ／又は細胞は、細胞表面上で内在性共受容体を発現せず、かつ／又は内在性共受容体はCD8又はCD4である。

【０００８】

別の局面において、本開示はまた、組み換え共受容体又はその第一鎖をコードする第一のポリヌクレオチドを含む、リンパ球由来の細胞（例えば、単離された細胞）を提供し、ここでリンパ球はインバリアントNKT(iNKT)細胞又は多様（diverse）NKT (dNKT)細胞である。特定の実施態様において、細胞は、細胞表面上で組み換え共受容体又はその第一鎖を発現する。特定の実施態様において、細胞は、細胞表面上で内在性共受容体を発現せず、かつ／又は内在性共受容体はCD8若しくはCD4である。

【０００９】
別の局面において、本開示は、組み換え共受容体又はその第一鎖をコードする第一のポリヌクレオチドを含む、リンパ球由来の細胞（例えば単離された細胞）を提供し、ここで細胞は、細胞表面上で制御可能な様式で組み換え共受容体又はその第一鎖を発現することができる。特定の実施態様において、細胞は、細胞表面上で制御可能な様式で組み換え共受容体又はその第一鎖を発現する。特定の実施態様において、細胞は、細胞表面上で内在性共受容体を発現しない。特定の実施態様において、内在性共受容体はCD8又はCD4である。

【００１０】
以下の実施態様はそれぞれ、本明細書に記載される本発明の細胞に適用される。

【００１１】
特定の実施態様において、組み換え共受容体又はその第一鎖は、細胞外領域、膜貫通領域、及び細胞質内領域を含み、ここで細胞外領域は膜貫通領域に連結されており、そして膜貫通領域は細胞質内領域に連結されている。

【００１２】
特定の実施態様において、組み換え共受容体又はその第一鎖の細胞質内領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり得、場合により、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一であり得る。

【００１３】
特定の実施態様において、組み換え共受容体又はその第一鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖の対応する膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列全体と、少なくとも90%同一であり得、場合により、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一であり得る。

【００１４】
特定の実施態様において、組み換え共受容体又はその第一鎖の細胞外領域のアミノ酸配列は、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖の対応する細胞外領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一である。特定の実施態様において、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体又はその鎖は、ヒトである。

【００１５】
特定の実施態様において、組み換え共受容体又はその第一鎖の細胞質内領域は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体若しくはその第一鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により、91、92、93、94、95、96、97、98、99、若しくは100%同一であり、かつ／又は組み換え共受容体若しくはその第一鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域全体のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖の対応する膜貫通領域及び細胞質内領域全体のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり得、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、若しくは100%同一であり得、かつ組み換え共受容体又はその第一鎖の細胞外領域のアミノ酸配列は、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体若しくはその第一鎖の対応する細胞外領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により、91、92、93、94、95、96、97、98、99、若しくは100%同一である。一実施態様において、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体又はその第一鎖はヒトである。

【００１６】
特定の実施態様において、組み換え共受容体はCD8又はCD4である。

【００１７】
特定の実施態様において、本明細書に開示される細胞は、組み換え共受容体の第二鎖をコードする第二のポリヌクレオチドをさらに含み、ここで第二鎖は、細胞外領域、膜貫通領域、及び細胞質内領域を含み、ここで第二鎖の細胞外領域は第二鎖の膜貫通領域に連結

されており、そして第二鎖の膜貫通領域は第二鎖の細胞質内領域に連結されている。特定の実施態様において、第二鎖の細胞質内領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一である。特定の実施態様において、第二鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体鎖の対応する膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列全体と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一である。特定の実施態様において、第二鎖の細胞外領域のアミノ酸配列は、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体の対応する細胞外領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一である。リンパ球と異なる種由来であり得る天然に存在する共受容体鎖は、ヒトである。

【００１８】

従って、特定の実施態様において、第二鎖の細胞質内領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、若しくは100%同一であり、かつ／又は第二鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域の全体のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在する共受容体鎖の対応する膜貫通領域及び細胞質内領域の全体のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、若しくは100%同一であり、かつ第二鎖の細胞外領域のアミノ酸配列は、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体鎖の対応する細胞外領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、若しくは100%同一である。一実施態様において、リンパ球と異なる種由来の天然に存在する共受容体鎖はヒトである。

【００１９】

特定の実施態様において、組み換え共受容体はCD8である。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第一鎖の細胞質内領域は、配列番号1の残基183～212のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第一鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域は全体で、配列番号1の残基162～212のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第一鎖の細胞外領域は、配列番号1の残基1～161のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第二鎖の細胞質内領域は、配列番号2の残基171～187のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第二鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域は全体で、配列番号2の残基150～187のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第二鎖の細胞外領域は、配列番号2の残基1～149のアミノ酸配列を含む。従って、特定の実施態様において、組み換え共受容体の第一鎖の細胞質内領域は、配列番号1の残基183～212のアミノ酸配列を含み、かつ／又は組み換え共受容体の第一鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域は全体で、配列番号1の残基162～212のアミノ酸配列を含み、例えばここで、組み換え共受容体の第一鎖の細胞外領域は、配列番号1の残基1～161のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、組み換え共受容体の第二鎖の細胞質内領域は、配列番号2の残基171～187のアミノ酸配列を含み、かつ／又は組み換え共受容体の第二鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域は全体で、配列番号2の残基150～187のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、組み換え共受容体の第二鎖の細胞外領域は、配列番号2の残基1～149のアミノ酸配列を含む。

【００２０】

特定の実施態様において、組み換え共受容体は、：a）ヒトCD8αの細胞外領域、及びマウスCD8αの膜貫通領域及び細胞質内領域を含むキメラCD8α鎖、並びにb）ヒトCD8βの細胞外領域、及びマウスCD8βの膜貫通領域及び細胞質内領域を含むキメラCD8β鎖を含むキメラCD8である。一実施態様において、キメラCD8α鎖は配列番号1のアミノ酸配列を含み、そしてキメラCD8β鎖は配列番号2のアミノ酸配列を含み、例えば、ここでキメラCD8α鎖のアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列からなり、そしてキメラCD8β鎖のアミノ

酸配列は配列番号2のアミノ酸配列からなる。

【００２１】

別の局面において、本開示は、マウスリンパ球由来の単離された細胞も提供し、該細胞は：a) ヒトCD8αの細胞外領域、及びマウスCD8αの膜貫通領域及び細胞質内領域を含むキメラCD8α鎖をコードする第一のポリヌクレオチド、並びにb) ヒトCD8βの細胞外領域、及びマウスCD8βの膜貫通領域及び細胞質内領域を含むキメラCD8β鎖をコードする第二のポリヌクレオチドを含み、ここで細胞は、細胞表面上でCD3を発現するが内在性TCRを発現しない。特定の実施態様において、キメラCD8α鎖は配列番号1のアミノ酸配列を含み、そしてキメラCD8β鎖は配列番号2のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、キメラCD8α鎖のアミノ酸配列は配列番号1のアミノ酸配列からなり、そしてキメラCD8β鎖のアミノ酸配列は配列番号2のアミノ酸配列からなる。

【００２２】

特定の実施態様において、組み換え共受容体又はその鎖の表面発現は制御可能である。

【００２３】

特定の実施態様において、第一のポリヌクレオチドは、適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対と隣接している。

【００２４】

特定の実施態様において、第二のポリヌクレオチドは、適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対と隣接している。

【００２５】

特定の実施態様において、第一のポリヌクレオチドの膜貫通領域及び／又は細胞質内領域をコードする部分は、適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対と隣接している。

【００２６】

特定の実施態様において、膜貫通領域及び／又は細胞質内領域をコードする第二のポリヌクレオチドの部分は、適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対と隣接している。

【００２７】

特定の実施態様において、適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対は、適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対と交差反応しない。

【００２８】

特定の実施態様において、組み換え共受容体又はその鎖の表面発現は、第一のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対及び／又は第二のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対を認識する同族部位特異的リコンビナーゼと、第一のポリヌクレオチド及び／又は第二のポリヌクレオチドを接触させることにより減衰され得る。

【００２９】

特定の実施態様において、組み換え共受容体又はその鎖の表面発現は、第一のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対及び／又は第二のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対を認識する同族部位特異的リコンビナーゼと、第一のポリヌクレオチド及び／又は第二のポリヌクレオチドを接触させることにより抑止され得る。

【００３０】

従って、特定の実施態様において、適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対は、適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対と交差反応せず、例えば、ここで組み換え共受容体若しくはその鎖の表面発現は、第一のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対及び／若しくは第二のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対を認識する同族部位特異的リコンビナーゼと、第一のポリヌクレオチド及び／若しくは第二のポリヌクレオチドを接触させることにより減衰され得、又はここで、組み換え共受容体若しくはその鎖の表面発現は、第一のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第一の対及び／若しくは第二のポリヌクレオチドの適合性の部位特異的組み換え配列の第二の対を認識する同族部位特異的リコンビナーゼと、第一のポリヌ

クレオチド及び／若しくは第二のポリヌクレオチドを接触させることにより抑止され得る。

【００３１】

特定の実施態様において、細胞は、適合性の部位特異的組み換え配列の第一及び／又は第二の対を認識する同族部位特異的リコンビナーゼをコードする第三のポリヌクレオチドをさらに含む。特定の実施態様において、第三のポリヌクレオチドの転写は、誘導性プロモーターにより制御される。

【００３２】

特定の実施態様において、部位特異的組み換え配列の第一及び第二の対は、lox部位の適合性の対であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼはCreリコンビナーゼである。

【００３３】

特定の実施態様において、lox部位の適合性の対はloxP部位の適合性の対である。従って、一実施態様において、部位特異的組み換え配列の第一及び第二の対は、lox部位の適合性の対であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼはCreリコンビナーゼであり、例えば、ここでlox部位の適合性の対はloxP部位の適合性の対である。

【００３４】

特定の実施態様において、組み換え共受容体はCD8である。特定の実施態様において、第一のポリヌクレオチドは、配列番号3の残基1～675のポリヌクレオチド配列を含む。特定の実施態様において、第一のポリヌクレオチドは、配列番号3のポリヌクレオチド配列を含む。特定の実施態様において、第二のポリヌクレオチドは、配列番号4の残基1～600のポリヌクレオチドを含む。特定の実施態様において、第二のポリヌクレオチドは、配列番号4のポリヌクレオチド配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第一鎖は、配列番号25のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第一鎖は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第二鎖は、配列番号26のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、組み換え共受容体の第二鎖は、配列番号6のアミノ酸配列を含む。従って、本発明の一実施態様において、組み換え共受容体はCD8であり、例えば、ここで第一のポリヌクレオチドは、配列番号3の残基1～675のポリヌクレオチド配列を含み、若しくは第一のポリヌクレオチドは、配列番号3のポリヌクレオチド配列を含み、かつ／又はここで、第二のポリヌクレオチドは、配列番号4の残基1～600のポリヌクレオチド配列を含み、若しくは第二のポリヌクレオチドは、配列番号4のポリヌクレオチド配列を含む。別の実施態様において、組み換え共受容体はCD8であり、そして組み換え共受容体の第一の鎖は、配列番号25若しくは配列番号5のアミノ酸配列を含み、かつ／又は組み換え共受容体の第二の鎖は、配列番号26若しくは配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【００３５】

特定の実施態様において、第一のポリヌクレオチドの転写は、誘導性プロモーターにより制御され、かつ／又は第二のポリヌクレオチドの転写は、誘導性プロモーターにより制御される。

【００３６】

特定の実施態様において、細胞は１つ又はそれ以上のレポーター系をさらに含む。特定の実施態様において、１つ又はそれ以上のレポーター系は、活性化T細胞の核因子(NFAT)シグナル伝達、アクチベータータンパク質-1(AP1)シグナル伝達、NFκB/Relシグナル伝達、及びカルシウム流動からなる群より選択される細胞の１つ又はそれ以上の活性の指標を生じる。特定の実施態様において、1つ又はそれ以上のレポーター系は、検出可能なマーカーをコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター領域を含むポリヌクレオチドを含む。特定の実施態様において、プロモーター領域は、活性化T細胞の核因子(NFAT)応答エレメント、アクチベータータンパク質-1(AP1)応答エレメント、及びNFκB/Rel応答エレメントからなる群より選択される１つ又はそれ以上の転写応答エレメントを含む。特定の実施態様において、検出可能なマーカーは、蛍光タンパク質、細胞表面マーカー、及び抗生物質選択マーカーからなる群より選択される。特定の実施態様に

おいて、プロモーター領域はIL-2プロモーターである。特定の実施態様において、IL-2プロモーターはミニマルIL-2プロモーターである。特定の実施態様において、IL-2プロモーターは１つ又はそれ以上のNFAT結合部位を含む。特定の実施態様において、IL-2プロモーターは３つのNFAT結合部位を含む。特定の実施態様において、検出可能なマーカーは、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)である。特定の実施態様において、プロモーター領域は、３つのNFAT結合部位を含むIL-2プロモーターであり、そして検出可能なマーカーは高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)である。

【００３７】

特定の実施態様において、細胞は単細胞由来であり、ここで細胞が少なくとも10^5の複数の細胞まで増殖され、そしてTCRα鎖及びTCRβ鎖をコードする別々のポリヌクレオチドベクターで形質導入又はトランスフェクトされ、形質導入又はトランスフェクションの効率を最大にする条件下でTCRα鎖及びTCRβ鎖を含む組み換えTCRを発現する場合に、複数の細胞の少なくとも20％は、細胞表面上で組み換えTCRを発現する。特定の実施態様において、細胞は、１回又はそれ以上の形質導入又はトランスフェクションを以前に受けている。

【００３８】

特定の実施態様において、リンパ球は、T細胞、B細胞又はNK細胞である。特定の実施態様において、リンパ球は、$CD8^+$細胞傷害性T細胞、$CD8^+$制御性T細胞、$CD4^+$細胞傷害性T細胞、$CD4^+$ヘルパーT細胞及び$CD4^+$制御性T細胞からなる群より選択されるT細胞である。特定の実施態様において、リンパ球は哺乳動物リンパ球である。特定の実施態様において、リンパ球はネズミ科動物(murine）リンパ球である。特定の実施態様において、リンパ球は、RAG1又はRAG2ノックアウトマウス細胞、未成熟マウスT細胞、マウスDO-11.10.7 58 α- β- (58-/-)細胞、及びマウスBw5147細胞からなる群より選択される。特定の実施態様において、リンパ球はマウス（mouse）リンパ球である。従って、本発明の細胞の別の実施態様において、リンパ球は、T細胞、B細胞、又はNK細胞であり、例えば、リンパ球は、$CD8^+$細胞傷害性T細胞、$CD8^+$制御性T細胞、$CD4^+$細胞傷害性T細胞、$CD4^+$ヘルパーT細胞及び$CD4^+$制御性T細胞からなる群より選択されるT細胞であり、かつ／又はここでリンパ球は、哺乳動物リンパ球、例えば、RAG1若しくはRAG2ノックアウトマウスリンパ球、未成熟マウスT細胞、マウスDO-11.10.7 58 α- β- (58-/-)細胞、及びマウスBw5147細胞からなる群より選択されるリンパ球のようなマウスリンパ球である。一実施態様において、リンパ球はマウスリンパ球である。

【００３９】

特定の実施態様において、細胞はさらに、細胞表面上で組み換えTCRを発現し、組み換えTCRはTCR α鎖及びTCR β鎖を含み、ここでTCR α鎖及びTCR β鎖はそれぞれ、可変領域及び非可変領域を含み、各非可変領域は、定常領域、膜貫通領域、及び細胞質内領域を含み、ここで各鎖について、可変領域は定常領域に連結されており、定常領域は膜貫通領域に連結されており、そして膜貫通領域は細胞質内領域に連結されている。特定の実施態様において、TCR α鎖及びTCR β鎖の各々について、細胞質内領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するTCR鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも60%同一であり、場合により70、80、90、又は100%同一である。特定の実施態様において、TCR α鎖及びTCR β鎖の各々について、膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するTCR鎖の対応する領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一である。特定の実施態様において、TCR α鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、配列番号14のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、TCR β鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、配列番号16、18及び20からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、TCR α鎖及びTCR β鎖の各々について、非可変領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するTCR鎖の対応する非可変領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一である。特定の実施態様

において、TCR α鎖の非可変領域は、配列番号13のアミノ酸配列を含む。特定の実施態様において、TCR β鎖の非可変領域は、配列番号15、17、及び19からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【００４０】

従って、特定の実施態様において、細胞は細胞表面上で組み換えTCRをさらに発現し、組み換えTCRはTCR α鎖及びTCR β鎖を含み、ここでTCR α鎖及びTCR β鎖はそれぞれ、可変領域及び非可変領域を含み、各非可変領域は、定常領域、膜貫通領域、及び細胞質内領域を含み、ここで各鎖について、可変領域は定常領域に連結されており、定常領域は膜貫通領域に連結されており、そして膜貫通領域は細胞質内領域に連結されている。一実施態様において、TCR α鎖及びTCR β鎖の各々について、細胞質内領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するTCR鎖の対応する細胞質内領域のアミノ酸配列と、少なくとも60%同一であり、場合により70、80、90、又は100%同一である。別の実施態様において、TCR α鎖及びTCR β鎖の各々について、膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するTCR鎖の対応する領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一であり、ここでTCR α鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、配列番号14のアミノ酸配列を含み、かつ／又はここでTCR β鎖の膜貫通領域及び細胞質内領域のアミノ酸配列は全体で、配列番号16、18及び20からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。別の実施態様において、TCR α鎖及びTCR β鎖の各々について、非可変領域のアミノ酸配列は、リンパ球と同じ種由来の天然に存在するTCR鎖の対応する非可変領域のアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%同一であり、例えば、ここでTCR α鎖の非可変領域は、配列番号13のアミノ酸配列を含み、かつ／又はTCR β鎖の非可変領域は、配列番号15、17、及び19からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【００４１】

特定の実施態様において、各可変領域のアミノ酸配列は、リンパ球と異なる種由来のTCR鎖の対応する可変領域から誘導される。一実施態様において、リンパ球と異なる種由来のTCRはヒトである。

【００４２】

特定の実施態様において、各可変領域のアミノ酸配列は、リンパ球と異なる種由来のTCR鎖の対応する可変領域から誘導され、例えば、ここでTCR α鎖及びTCR β鎖の各々について、可変領域及び定常領域のアミノ酸配列は全体で、リンパ球と異なる種由来のTCR鎖の対応する領域から誘導される。一実施態様において、リンパ球と異なる種由来のTCRはヒトである。

【００４３】

特定の実施態様において、組み換えTCRは、同時刺激シグナル伝達領域を含む融合分子である。特定の実施態様において、同時刺激シグナル伝達領域は、TCR α鎖の細胞質内領域又はTCR β鎖の細胞質内領域に融合される。特定の実施態様において、同時刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、B7-H3、及びCD83に特異的に結合するリガンドからなる群より選択される同時刺激分子のシグナル伝達領域を含む。特定の実施態様において、同時刺激シグナル伝達領域は、CD28のシグナル伝達領域、4-1BBのシグナル伝達領域、又はそれらの組み合わせを含む。特定の実施態様において、融合分子は、CD3ζシグナル伝達領域をさらに含む。

【００４４】

従って、特定の実施態様において、組み換えTCRは、同時刺激シグナル伝達領域を含む融合分子であり、例えば、ここで同時刺激シグナル伝達領域は、TCR α鎖の細胞質内領域若しくはTCR β鎖の細胞質内領域に融合され、かつ／又はここで、同時刺激シグナル伝達領域は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、B7-H3、及びCD83に特異的に結合するリガンドからな

る群より選択される同時刺激分子のシグナル伝達領域を含む。一実施態様において、同時刺激シグナル伝達領域は、CD28のシグナル伝達領域、4-1BBのシグナル伝達領域、若しくはそれらの組み合わせを含み、かつ／又は融合分子はCD3ζシグナル伝達領域をさらに含む。

【００４５】

特定の実施態様において、組み換えTCRの発現は、(1)少なくとも１つの抗生物質選択マーカー；(2)少なくとも１つのスクリーニングマーカー；又は(3)それらの組み合わせの発現と連結されており、例えば、ここで少なくとも１つのスクリーニングマーカーは、蛍光タンパク質又は細胞表面マーカーである。

【００４６】

特定の実施態様において、組み換えTCRは、胎仔胸腺、臍帯血、癌患者、ワクチン接種した被験体、目的の抗原に自然に曝露された被験体、健常被験体、及び合成ライブラリーから単離された腫瘍浸潤リンパ球（TIL）からなる群より選択された供給源から誘導されたものであり、例えば、ここでワクチン接種した被験体は、HPVワクチン、EBVワクチン、若しくは癌ワクチンを受けたヒトであり、又はワクチン接種した被験体は、目的の抗原で免疫された、ヒト主要組織適合複合体(MHC)を発現するトランスジェニックマウスであり、かつ／又はワクチン接種した被験体は、目的の抗原で免疫された、HLA-A2を発現するトランスジェニックマウスである。

【００４７】

上記の本発明の特定の実施態様において、細胞は、(1) 組み換えTCR α鎖及び組み換えTCR β鎖、(2) 組み換えTCR α鎖及び複数の異なる組み換えTCR β鎖、(3) 組み換えTCR β鎖及び複数の異なる組み換えTCR α鎖、又は(4) 複数の異なる組み換えTCR α鎖及び複数の異なる組み換えTCR β鎖を発現する。

【００４８】

別の局面において、本開示はまた、本明細書に開示される細胞のいずれか１つを複数含む細胞ライブラリーを提供する。特定の実施態様において、細胞ライブラリーは、少なくとも10^7、10^8、又は10^9のTCR多様性を有する。別の局面において、本発明は、本発明の細胞のいずれか１つを複数含む細胞ライブラリーに関し、ここで細胞は、細胞表面上に細胞性TCRをさらに発現する。本発明の細胞についての本明細書に開示される実施態様はまた、本発明の細胞ライブラリーにも適用される。

【００４９】

別の局面において、本開示はまた、所望の特徴を有するTCRの単離及び同定のための方法を提供し、該方法は、本明細書に開示される細胞又は細胞ライブラリーのいずれか１つの複数を選択プロセスにかけることを含み、該選択プロセスは、所望のペプチド-MHC複合体の存在下で所望の特徴について選択すること、TCRを発現する細胞を単離すること、及び単離された細胞のTCRが所望の特徴を有するということを決定することを含む。細胞が細胞表面上に細胞性TCRをさらに発現する本発明の細胞について本明細書に開示される実施態様、及び本発明の細胞ライブラリーについて本明細書に開示される実施態様は、本発明の方法にも適用される。

【００５０】

別の局面において、本開示はまた、所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの同定のための方法を提供し、該方法は：(a) 開示される細胞のいずれか１つを複数提供すること、(b) 複数のTCRをコードする複数の発現構築物を用いて細胞を形質導入又はトランスフェクトすること、(c) 細胞の表面上でTCRを発現させること、(d) 所望のペプチド-MHC複合体の存在下で所望の特徴についてTCRを発現する細胞を選択すること、(e) 所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを選択された細胞から単離すること、及び(f) 工程(e)において単離された所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを同定することを含む。本発明の細胞について本明細書に開示される実施態様は、本発明の方法にも適用される。好ましくは、方法はインビトロの方法である。

【００５１】
別の局面において、本開示はまた、所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの同定のための方法を提供し、該方法は：(a) 本明細書に開示される細胞のいずれか１つを複数提供すること; (b) 複数のTCRをコードする複数の発現構築物を用いて細胞を形質導入又はトランスフェクトすること、(c) 細胞表面上でTCRを発現させること、(d) 所望のペプチド-MHC複合体の存在下で所望の特徴についてTCRを発現する細胞を選択すること、(e) 工程(d)において選択された細胞において組み換え共受容体又はその鎖の活性を調節すること、(f) 所望のペプチド-MHC複合体の存在下で所望の特徴について工程(e)により得られたTCRを発現する細胞をさらに選択すること、(g) 工程(f)において選択された細胞から、所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを単離すること、及び(h) 工程(g)において単離された所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを同定することを含む。本発明の細胞について本明細書に開示される実施態様は、本発明の方法にも適用される。好ましくは、方法はインビトロの方法である。
【００５２】
特定の実施態様において、工程(d)は、組み換え共受容体又はその鎖の表面発現の存在下で行われ、そして工程(e)は、組み換え共受容体又はその鎖の細胞表面発現の抑止を含む。
【００５３】
特定の実施態様において、工程(a)の複数の細胞は、本明細書に開示される細胞のいずれか１つを含み、そして工程(e)において、組み換え共受容体又はその鎖の細胞表面発現は、第一及び／又は第二のポリヌクレオチドにおける部位特異的組み換え配列を同族部位特異的リコンビナーゼと接触させることにより抑止される。特定の実施態様において、同族部位特異的リコンビナーゼは、誘導性プロモーターの制御下で細胞において発現される。特定の実施態様において、同族部位特異的リコンビナーゼは、工程(e)の前に工程(d)において選択された細胞に導入される。特定の実施態様において、同族部位特異的リコンビナーゼは、工程(d)において選択された細胞を、部位特異的リコンビナーゼをコードする発現構築物を用いてトランスフェクト又は形質導入することにより道友される。特定の実施態様において、同族部位特異的リコンビナーゼは、タンパク質として導入される。特定の実施態様において、部位特異的組み換え配列はlox部位であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼはCreリコンビナーゼである。特定の実施態様において、部位特異的組み換え配列はlox部位であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼは、タンパク質形質導入ドメインを含むCreリコンビナーゼ融合タンパク質である。特定の実施態様において、タンパク質形質導入ドメインはHIV Tat由来である。従って、本発明の方法の特定の実施態様において、工程(d)は、組み換え共受容体又はその鎖の表面発現の存在下で行われ、そして工程(e)は、組み換え共受容体又はその鎖の細胞表面発現の抑止を含み、例えば、ここで工程(a)の複数の細胞は、本明細書に開示される細胞のいずれか１つを含み、そしてここで工程(e)において、組み換え共受容体又はその鎖の細胞表面発現は、第一及び／又は第二のポリヌクレオチドにおける部位特異的組み換え配列を、同族部位特異的リコンビナーゼと接触させることにより抑止され、かつ／又はここで同族部位特異的リコンビナーゼは、誘導性プロモーターの制御下で細胞において発現される。別の実施態様において、同族部位特異的リコンビナーゼは、工程(e)の前に工程(d)において選択された細胞に導入され、特に、ここで同族部位特異的リコンビナーゼは、工程(d)において選択された細胞を、部位特異的リコンビナーゼをコードする発現構築物でトランスフェクト又は形質導入することにより導入され、又はここで、同族部位特異的リコンビナーゼは、タンパク質として導入される。一実施態様において、部位特異的組み換え配列はlox部位であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼはCreリコンビナーゼであり、例えば、ここで部位特異的組み換え配列はlox部位であり、そして同族部位特異的リコンビナーゼは、タンパク質形質導入ドメインを含むCreリコンビナーゼ融合タンパク質であり、特にここで、タンパク質形質導入ドメインはHIV Tat由来である。

【００５４】
別の局面において、本開示はまた、所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの同定のための方法を提供し、該方法は：(a)本明細書に開示される細胞のいずれか１つの複数の細胞を提供すること、(b)複数のTCRをコードする複数の発現構築物を用いて細胞を形質導入又はトランスフェクトすること、(c)細胞の表面上でTCRを発現させること、(d)目的のペプチドと複合体化したMHC分子の存在下で、所望の特徴についてTCRを発現する細胞を選択すること、［ここでMHC分子は、野生型MHC分子の変異体であり、ここで変異MHC分子は、共受容体に対する野生型MHC分子の親和性と比較して減少した親和性で共受容体に結合する］、(e)所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを、工程(d)において選択された細胞から単離すること、及び(f)工程(e)において単離された所望の特徴を有するTCRをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドを同定することを含む。本発明の細胞について本明細書に開示される実施態様は、本発明の方法にも適用される。好ましくは、方法はインビトロの方法である。
【００５５】
上記の方法のいずれかの特定の実施態様において、共受容体はCD8であり、そして変異MHC分子は、野生型MHCクラスＩ α鎖の変異体であるα鎖を含む変異MHCクラスI分子であり、例えば、ここで共受容体はヒトCD8であり、そして変異MHCクラスI分子は、野生型HLA-A2 α鎖の変異体であるα鎖を含む変異HLA-A2であり、かつ／又はここで変異HLA-A2 α鎖は、成熟タンパク質配列に従って番号付けして、A245V変異又はD227K/T228A変異を含む。
【００５６】
上記の方法のいずれかの特定の実施態様において、所望の特徴は、所望のペプチド-MHC複合体に対する高選択性、所望のペプチド-MHC複合体に対する高親和性、及び所望のペプチド-MHC複合体の存在下でのポジティブな機能的読み出しの提示からなる群より選択される。特定の実施態様において、機能的読み出しは、活性化マーカーの発現、シグナル伝達経路の誘発、サイトカインの産生、カルシウム流動、増殖及びレポーター系の活性化からなる群より選択される。特定の実施態様において、活性化マーカーはCD69又はCD137である。特定の実施態様において、シグナル伝達経路はNFATシグナル伝達、IL-2シグナル伝達、アクチベータータンパク質-1シグナル伝達、又はNFκB/Relシグナル伝達である。特定の実施態様において、サイトカインはIL-2、TNF-α、又はIFN-γである。特定の実施態様において、増殖はT細胞の増殖である。特定の実施態様において、機能的読み出しは、１つ又はそれ以上のレポーター系の細胞における活性化である。特定の実施態様において、レポーター系はIL-2-EGFPレポーター系である。従って、上記の本発明の方法のいずれかの特定の実施態様において、所望の特徴は、所望のペプチド-MHC複合体に対する高選択性、所望のペプチド-MHC複合体に対する高親和性、及び所望のペプチド-MHC複合体の存在下でのポジティブな機能的読み出しの提示からなる群より選択され、例えば、ここで機能的読み出しは、活性化マーカーの発現、シグナル伝達経路の誘発、サイトカインの産生、カルシウム流動、増殖及びレポーター系、特に、本発明の細胞について上記のレポーター系の活性化からなる群より選択され、ここれ活性化マーカーはCD69又はCD137である。一実施態様において、シグナル伝達経路は、NFATシグナル伝達、IL-2シグナル伝達、アクチベータータンパク質-1シグナル伝達、又はNFκB/Relシグナル伝達である。一実施態様において、サイトカインはIL-2、TNF-α、又はIFN-γである。一実施態様において、増殖はT細胞の増殖である。一実施態様において、機能的読み出しは、細胞における１つ又はそれ以上のレポーター系の活性化である。一実施態様において、レポーター系はIL-2-EGFPレポーター系である。
【００５７】
上記の方法のいずれかの特定の実施態様において、複数の発現構築物は、(i)TCR α鎖及びTCR β鎖、(ii)TCR α鎖及び複数の異なるTCR β鎖、(iii)TCR β鎖及び複数の異なるTCR α鎖、又は(iv)複数の異なるTCR α鎖及び複数の異なるTCR β鎖をコードする。
【００５８】
上記の方法のいずれかの特定の実施態様において、所望のペプチド-MHC複合体は、MHC

クラスI又はMHCクラスII分子を含む。特定の実施態様において、所望のペプチド-MHC複合体は、セルフリーペプチド-MHC複合体である。特定の実施態様において、所望のペプチド-MHC複合体は、MHC分子の二量体、四量体、又は多量体を含む。特定の実施態様において、所望のペプチド-MHC複合体は、細胞の表面上に提示される。上記の本発明の方法のいずれかの例となる実施態様において、所望のペプチド-MHC複合体は、細胞表面上で提示され、例えば、ここで細胞は、哺乳動物細胞、酵母細胞、若しくは昆虫細胞であり、又は細胞はT2細胞若しくは抗原提示細胞である。特定の実施態様において、細胞は、哺乳動物細胞、酵母細胞、又は昆虫細胞である。特定の実施態様において、細胞はT2細胞又は抗原提示細胞である。従って、上記の本発明の方法のいずれかの一実施態様において、所望のペプチド-MHC複合体は、MHCクラスI又はMHCクラスII分子を含み、かつ／又は所望のペプチド-MHC複合体はセルフリーペプチド-MHC複合体であり、特にここで所望のペプチド-MHC複合体は、MHC分子の二量体、四量体、又は多量体を含む。

【００５９】

上記の方法のいずれかの特定の実施態様において、ペプチドはリンペプチド又はリンペプチド模倣物である。

【００６０】

上記の方法のいずれかの特定の実施態様において、工程(b)において、複数のTCRをコードする複数の発現構築物は、PVC-211マウス白血病ウイルスの外被を含むレトロウイルスベクター粒子を使用して細胞に形質導入され、ここでレトロウイルスベクター粒子は、TCR α鎖又はTCR β鎖をコードするレトロウイルス発現構築物を含む。

【００６１】

上記の方法のいずれかの特定の実施態様において、各TCRは、TCR α鎖及びTCR β鎖を含み、ここでTCR α鎖及びTCR β鎖は、別々の発現構築物によりコードされる。

【図面の簡単な説明】

【００６２】

【図１】図1は、MTCD8 mCD8α β- chiCD8α β+ chiC58α β+細胞の抗CD3及び抗CD28抗体との終夜共培養後のELISAにより測定された培養上清中の相対的IL-2レベルを示す棒グラフである。y軸は光学密度(OD)シグナルを示す。

【図２－１】図2A、2B、2C、2D、及び2E：図2Aは、AK-D10細胞、キメラDMF4を発現するAK-D10細胞(AK-D10 chiDMF4)、及びキメラDMF5を発現するAK-D10細胞(AK-D10 chiDMF5)でのPE標識HLA-A*0201 Mart-1四量体及びAPC標識抗TCR β鎖抗体の共染色を示すフローサイトメトリープロットのセットである。四量体+ TCR+細胞のパーセンテージを各プロットに示す。最も右のプロットは、AK-D10 chiDMF4細胞及びAK-D10 chiDMF5細胞のオーバーレイを示す。図2B及び2Cは、Mart-1ペプチド ELAGIGILTV (配列番号30)を負荷したDimerX(DimerX/Mart-1)又はいずれのペプチドも用いないDimerX単独(DimerX)とともに示された濃度でAK-D10 chiDMF4細胞(図2B)又はAK-D10 chiDMF5細胞(図2C)を終夜インキュベートした後にELISAにより測定された相対的IL-2産生を示す棒グラフである。y軸は光学密度(OD)シグナルを示す。図2D及び2Eは、非負荷DimerX(灰色の棒)又はMart-1ペプチドELAGIGILTV (配列番号30) (AK-D10 chiDMF4及びAK-D10 chiDMF5について)若しくはNY-ESO-1ペプチドSLLMWITQV (配列番号31) (AK-D10 chiC58について)(黒色の棒)を負荷したDimerXとともに終夜インキュベートした後の、キメラTCRを発現するAK-D10のそれぞれIL-2及びTNFαの細胞内染色からの結果を示す棒グラフである。y軸はTCR+ IL-2+ (図2D)又はTCR+ TNFα+ (図2E)細胞のパーセンテージ（％）を示す。

【図２－２】図２－１の続き。

【図３】図3は、LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+細胞の表面上のキメラCD8の発現、及びCreリコンビナーゼを用いた形質導入後の細胞表面からのキメラCD8のその後の除去を示すフローサイトメトリープロットのセットである。chiCD8α+ chiCD8β+細胞のパーセンテージを各プロットに示す。

【図４－１】図4A、4B、及び4Cは、キメラDMF4(chiDMF4)又はDMF5 (chiDMF5)を発現するBB8細胞(MTCD8 mCD8α β- chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP+)へのHLA-A*

02:01 Mart-1四量体の結合を試験するアッセイからの結果である。図4A及び4Bは、Creリコンビナーゼを発現するように形質導入された(下)か又は形質導入されていない(上)、キメラDMF4を発現するBB8細胞を示すフローサイトメトリープロットのセットである。X軸及びY軸上に示されるパラメーターの対を図に示す。図4Cは、キメラDMF4又はDMF5を発現するBB8細胞へのHLA-A*02:01 Mart-1四量体の結合を示す棒グラフである。細胞は、Creリコンビナーゼを発現するように形質導入されたか(「CD8-」と示される)又は形質導入されていなかった(「CD8+」と示される)。y軸は、フローサイトメトリーにより測定した四量体結合について検出された蛍光強度中央値(MFI)を示す。

【図４－２】図４－１の続き。

【図５】図5は、抗CD3抗体(左)又は抗CD3及び抗CD28抗体(右)のいずれかとともにインキュベートされた後のELISAにより測定された、AK-D10細胞(「chiC58-」と示される)又はレポーター構築物及びキメラTCR C58の両方を発現するAK-D10細胞(「chiC58+」と示される)により産生された培養上清中の相対的IL-2レベルを示す棒グラフである。y軸は光学密度(OD)シグナルを示す。

【図６】図6A、6B、及び6Cは、EGFP発現を示すフローサイトメトリープロットのセットである。試験した細胞は、抗CD3抗体の存在下（図6A)若しくは存在しない場合(図6B)にインキュベートされたIL-2レポーター構築物及びキメラTCR DMF4を発現するAK-D10細胞(AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiDMF4+)、又は抗CD3抗体とともにインキュベートされた(図6C)IL-2レポーター構築物のみを発現するAK-D10細胞(AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+)である。EGFPポジティブ細胞のパーセンテージを各プロットに示す。

【図７】図7A、7B、及び7Cは、IL-2レポーター構築物及びキメラTCR C259を発現するAK-D10細胞(AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiC259+)を、NY-ESO-1ペプチドSLLMWITQV（配列番号31)を瞬間適用した（pulsed）T2細胞とともにインキュベートしたか(図7A)、瞬間適用しなかったT2細胞とともにインキュベートしたか(図7B)、又はT2細胞の存在しない場合にインキュベートし(図7C)、そしてフローサイトメトリーを使用してTCR及びEGFP発現について測定したアッセイからのフローサイトメトリープロットのセットである。TCR^{high}EGFP+細胞のパーセンテージを、各プロットの右上のパネルに示す。TCR^{low}EGFP+細胞のパーセンテージを各プロットの右下のパネルに示す。

【図８】図8は、レポーター構築物IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP及びキメラTCR C58(「chiC58」と示される)又はC259(「chiC259」と示される)を発現するAK-D10細胞を、NY-ESO-1ペプチド SLLMWITQV（配列番号31)を瞬間適用したT2細胞と共培養したか又は瞬間適用していないT2細胞と共培養し、そしてTCR、EGFP、CD69、及びCD137の発現についてフローサイトメトリーを使用して分析したアッセイからの結果を示す棒グラフである。TCR+ EGFP+細胞、TCR+ CD69+細胞、又はTCR+ CD137+細胞のパーセンテージ(%)を示す。

【図９】図9A及び9Bは、レポーター構築物IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP及びキメラTCR DMF4（「chiDMF4」と示される、図9A)又はDMF5(「chiDMF5」と示される、図9B)を発現するAK-D10細胞を、様々な濃度のMart-1ペプチド ELAGIGILTV（配列番号30)を瞬間適用したT2細胞と共培養し、そしてフローサイトメトリーを使用してTCR及びEGFP発現について測定したアッセイからの結果を示すグラフである。TCR+ EGFP+細胞のパーセンテージ(%)を、Mart-1ペプチドの濃度に対してプロットする。

【図１０Ａ】図10A及び10Bは、キメラTCR DMF4又はDMF5を発現するBB8細胞を、Creリコンビナーゼを発現するように形質導入したか(図10Aにおいて「chiDMF4 Cre」及び図10Bにおいて「chiDMF5 Cre」と示される)又は形質導入しなかった(図10Aにおいて「chiDMF4」及び図10Bにおいて「chiDMF5」と示される)アッセイからの結果を示すグラフである。次いで細胞を、50 μg/ml、5 μg/ml、又は0.5 μg/mlのMart-1ペプチド ELAGIGILTV（配列番号30)を瞬間適用したT2細胞とともに共培養し、そしてTCR、CD8、及びEGFP発現についてフローサイトメトリーを使用して測定した。TCR+ EGFP+細胞のパーセンテージを活性化の長さに対してプロットした。

【図１０Ｂ】図10A及び10Bは、キメラTCR DMF4又はDMF5を発現するBB8細胞を、Creリコンビナーゼを発現するように形質導入したか(図10Aにおいて「chiDMF4 Cre」及び図10Bにお

いて「chiDMF5 Cre」と示される)又は形質導入しなかった(図10Aにおいて「chiDMF4」及び図10Bにおいて「chiDMF5」と示される)アッセイからの結果を示すグラフである。次いで細胞を、50 μg/ml、5 μg/ml、又は0.5 μg/mlのMart-1ペプチド ELAGIGILTV (配列番号30)を瞬間適用したT2細胞とともに共培養し、そしてTCR、CD8、及びEGFP発現についてフローサイトメトリーを使用して測定した。TCR+ EGFP+細胞のパーセンテージを活性化の長さに対してプロットした。

【発明を実施するための形態】

【００６３】

詳細な説明

免疫治療適用のための抗原反応性治療用TCRの迅速な同定及び単離を可能にする、高度に多様化されたT細胞受容体(TCR)細胞ライブラリーの生成及びスクリーニングのための方法が本明細書に開示される。

【００６４】

本発明の好ましい実施態様において、本発明に従う細胞はヒト胚細胞ではない。

【００６５】

本明細書に記載される「単離された細胞」の場合は、単離されていてよいが単離されている必要はない細胞としてさらに熟慮される。本明細書に記載される「単離されたポリヌクレオチド」の全ての場合は、単離されていてよいが単離される必要はないポリヌクレオチドとしてさらに熟慮される。本明細書に記載される「細胞」の全ての場合は、単離されていてよいが単離される必要はない細胞としてさらに熟慮される。本明細書に記載される「ポリヌクレオチド」の全ての場合は、単離されていてよいが単離される必要はないポリヌクレオチドとしてさらに熟慮される。

【００６６】

I. 定義

本明細書において別の定義がなければ、本明細書において使用される科学用語及び技術用語は、当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。いずれかの潜在的な曖昧性の場合、本明細書において提供される定義がいずれかの辞書又は外部の定義に優先する。文脈により別の必要がなければ、単数形は複数形も含まなければならず、そして複数形は単数形を含まなければならない。「又は」の使用は、別の記載がなければ「及び／又は」を意味する。用語「を含むこと（including）」、さらには「含む（includes）」及び「含まれる（included）」のような他の形態は限定ではない。

【００６７】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される単数形「a」、「an」、及び「the」は文脈に明確な別の指示がなければ、複数の参照も含むということに本明細書において留意のこと。

【００６８】

用語「約（about）」又は「およそ（approximately）」は、所定の値又は範囲の10%以内、そしてより好ましくは5%以内(又は1%若しくはそれ以下)であることを意味する。

【００６９】

本明細書で使用される用語「単離された細胞」は、そのインビボの位置から取り出された細胞を指す。

【００７０】

本明細書で使用される用語「T細胞受容体」及び「TCR」は、交換可能に使用され、そして全長ヘテロ二量体αβ又はγδ TCR、TCRの抗原結合フラグメント、及びTCR CDR又は可変領域を含む分子を指す。TCRの例としては、限定されないが、全長TCR、TCRの抗原結合フラグメント、膜貫通領域及び細胞質内領域を欠失した可溶性TCR、可動性リンカーにより結合されたTCRの可変領域を含有する単鎖TCR、操作されたジスルフィド結合により連結されたTCR鎖、単一特異性TCR、多選択性TCR(二重特異性TCRを含む)、TCR融合物、ヒトTCR、ヒト化TCR、キメラTCR、組み換え産生されたTCR、並びに合成TCRが挙げられる。この用語は、野生型TCR及び遺伝子操作されたTCR(例えば、第一の種のTCRからの第一の部分及び

第二の種のTCRからの第二の部分を含むキメラTCR鎖を含むキメラTCR)を包含する。

【００７１】

本明細書で使用される用語「TCR可変領域」は、TCR α鎖についてTRAC遺伝子及びTCR β鎖についてTRBC1又はTRBC2遺伝子のいずれかによりコードされる、非可変領域内に含まれない所定のTCRのアミノ酸を包含すると理解される。いくつかの実施態様において、TCR可変領域は、TCR α鎖についてTRAV遺伝子若しくはTRAJ遺伝子又はTCR β鎖についてTRBV遺伝子、TRBD遺伝子若しくはTRBJ遺伝子によりコードする所定TCRのアミノ酸を包含する(例えば、T cell receptor Factsbook、(2001) LeFranc and LeFranc、Academic Press、ISBN 0-12-441352-8、（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと)。

【００７２】

本明細書で使用されるTCRに関する用語「定常領域」は、TCR α鎖についてTRAC遺伝子及びTCR β鎖についてTRBC1若しくはTRBC2遺伝子によりコードされるTCRの細胞外部分を指す。用語定常領域は、TCR α鎖についてTRAV遺伝子若しくはTRAJ遺伝子又はTCR β鎖についてTRBV遺伝子、TRBD遺伝子、若しくはTRBJ遺伝子によりコードされるTCR可変領域を含まない(例えば、T cell receptor Factsbook、(2001) LeFranc and LeFranc、Academic Press、ISBN 0-12-441352-8（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと)。

【００７３】

本明細書で使用される用語「組み換え」分子は、それが発現される細胞に天然では存在しない分子を指す。特定の実施態様において、組み換え分子、例えば共受容体又はその鎖は、それが発現された細胞と異なる種由来である。

【００７４】

本明細書で使用される用語「内在性」分子は、それが発現された細胞に天然で存在する分子を指す。

【００７５】

本明細書で使用される用語「同時刺激シグナル伝達領域」は、細胞内シグナル伝達事象の媒介に関与する同時刺激分子の細胞内部分を指す。

【００７６】

組み換えタンパク質に関して本明細書で使用される用語「細胞外」は、細胞の外側に位置する膜貫通タンパク質の部分を指す。

【００７７】

組み換えタンパク質関して本明細書で使用される用語「膜貫通」は、細胞の細胞膜に包埋される組み換え膜貫通タンパク質の部分を指す。

【００７８】

組み換えタンパク質に関して本明細書で使用される用語「細胞質内」は、細胞の細胞質に位置する組み換えタンパク質の部分を指す。

【００７９】

本明細書で使用される用語「キメラ」タンパク質は、第一の組み換えタンパク質の第一の領域が、場合によりペプチドリンカーを用いて、第二の組み換えタンパク質の第二の領域とインフレームで融合されている組み換えタンパク質を指す。一実施態様において、第一及び第二の組み換えタンパク質は同じ種由来であり、かつ第一の領域は第二の領域と異なる。別の実施態様において、第一及び第二の組み換えタンパク質は異なる種由来である。

【００８０】

本明細書で使用される用語「CD3」は、「表面抗原分類3」、又はその機能的部分を指す。CD3の例としては、限定されないが、３つの二量体を形成する６つのポリペプチドを含む複合体が挙げられる：CD3ε/CD3γ、CD3ε/CD3δ、及びCD3ζ/CD3ζ。

【００８１】

本明細書で使用される用語「CD8」は、「表面抗原分類8」、TCRに対する共受容体、又

はその機能的部分を指す。CD8の例としては、限定されないが、CD8α/CD8βヘテロ二量体、CD8α/CD8αホモ二量体、及びCD8β/CD8βホモ二量体が挙げられる。この用語は、野生型CD8及び遺伝子操作されたCD8(例えば、第一の種のCD8由来の第一の部分及び第二の種のCD8由来の第二の部分を含むキメラCD8鎖を含むキメラCD8)を包含する。

【００８２】

本明細書で使用される用語「CD4」は、「表面抗原分類4」、TCRに対する共受容体、又はその機能的部分を指す。この用語は、野生型CD4及び遺伝子操作されたCD4(例えば、第一の種のCD4由来の第一の部分及び第二の種のCD4由来の第二の部分を含むキメラCD4)を包含する。

【００８３】

本明細書で使用される用語「共受容体」は、TCRと一緒にペプチド-MHC複合体に結合してT細胞活性化を増強する細胞表面分子を指す。共受容体の例としては、限定することなく、CD4及びCD8が挙げられる。

【００８４】

本明細書で使用される用語「配列内リボソーム進入部位(IRES)エレメント」は、リボソームが結合することができ、mRNAの５’末端にある必要はない構造を指す。したがって、これは、mRNA内の第二の開始コドンにおいて翻訳を開始するようにリボソームを誘導することができ、1つより多くのポリペプチドが単一のmRNAから産生されることを可能にする。例となるIRESエレメントとしては、限定されないが、ポリオウイルスライノウイルス、脳心筋炎ウイルス、口蹄疫ウイルス、A型肝炎及びC型肝炎ウイルスから単離されたIRESエレメントが挙げられる(例えば、Mokrejs et al. (2006) Nucleic Acids Res. 34 (Database issue)：D125-30（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと）。

【００８５】

本明細書で使用される用語「TCR会合」は、TCRのそのリガンドへの結合を指す。特定の実施態様において、リガンドはペプチド-MHC複合体である。

【００８６】

本明細書で使用される用語「主要組織適合複合体」及び「MHC」は、交換可能に使用され、そしてMHCクラスI分子及び／又はMHCクラスII分子を指す。

【００８７】

本明細書で使用される用語「MHCクラスI」は、MHCクラスI α鎖及びβ2-ミクログロブリン鎖の二量体を指し、そして用語「MHCクラスII」は、MHCクラスII α鎖及びMHCクラスII β鎖の二量体を指す。

【００８８】

本明細書で使用される用語「可溶性MHC」は、膜貫通領域及び細胞質内領域を欠失したMHC分子を指す。

【００８９】

本明細書で使用される用語「ペプチド-MHC複合体」は、当該分野で認められたMHCのペプチド結合ポケットにペプチドが結合したMHC分子(MHCクラスI又はMHCクラスII)を指す。

【００９０】

本明細書で使用される用語「DO-11.10.7 58 α- β-細胞」及び「58-/-細胞：は、交換可能に使用され、そしてLetourneur and Malissen Eur J Immunol. 1989; 19(12):2269-74（参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載されるような、マウスT細胞ハイブリドーマ細胞株を指す。

【００９１】

本明細書で使用される用語「T2細胞」は、Salter RD、et al. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. Immunogenetics 21：235-246、1985（参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載されるような、ヒトリンパ芽球細胞株を指す。

【００９２】

本明細書で使用される用語「Bw5147細胞」は、Ralph P. Retention of lymphocyte characteristics by myelomas and theta^{+}-lymphomas：sensitivity to cortisol and phytohemagglutinin. J. Immunol. 110：1470-1475、1973（参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載されるような、マウスTリンパ球細胞株を指す。

【００９３】

本明細書で使用される用語「部位特異的組み換え」は、単一核酸分子上の２つの適合性配列特異的組み換え部位の間で同族部位特異的リコンビナーゼに達成される組み換え事象を指す。部位特異的組み換え部位の対は、対のメンバーが、同族部位特異的リコンビナーゼによる部位特異的組み換え部位間の組み換えを誘導し得る場合に「適合性」であると言われる。一実施態様において、組み換え事象は、部位特異的組み換え部位の間の介在するヌクレオチド配列の切除を生じる。適合性部位特異的組み換え部位の対は、いずれか１対の適合性部位特異的組み換え部位が適合性部位特異的組み換え部位のいずれかの他の対と組み換えすることができない場合に、「非交差反応性」であると言われる。

【００９４】

本明細書で使用される用語「部位特異的リコンビナーゼ」は、部位特異的組み換えを媒介する酵素を指す。部位特異的リコンビナーゼの例としては、限定することなく、Creリコンビナーゼ及びFLPリコンビナーゼが挙げられる。「同族」部位特異的リコンビナーゼは、適合性の配列特異的組み換え部位間の組み換えを認識し、そして達成することができるリコンビナーゼを指す。例えば、バクテリオファージP1 Creリコンビナーゼは、lox組み換え部位を認識するが、一方で酵母FLPリコンビナーゼはFRT組み換え部位を認識する。

【００９５】

本明細書で使用される用語「Creリコンビナーゼ」は、バクテリオファージP1のCreタンパク質の部位特異的リコンビナーゼ活性を媒介することができるタンパク質を指す(Hamilton、D. L.、et al.、J. Mol. Biol. 178:481-486 (1984)（これは参照によりその全体として本明細書に加入される））。バクテリオファージP1のCreタンパク質は、「loxP」配列として知られる特殊化（specialized）組み換え配列間で部位特異的組み換えを媒介する。例えば、Hoess et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:3398-3402 (1982)及びSauer、B. L.、米国特許第4,959,317号（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）を参照のこと。この用語は、２つの適合性lox部位間の組み換えを達成する能力を保持している天然に存在するCreリコンビナーゼのいずれの派生物も包含する。

【００９６】

組み換え産物は、lox部位の位置及び相対的配向に依存する。同一の配向を有する２つのlox配列が同じDNA分子内に存在する場合、２つのlox配列が隣接するDNA配列は、Creリコンビナーゼにより切除されて環状分子を形成する(切除反応)。反対に、２つのlox配列が異なるDNA分子に存在する場合、それらのうちの１つは環状DNAであり、環状DNAはlox配列を介して他のDNA分子に挿入される（挿入反応)。別の実施態様において、Creリコンビナーゼは、最適化されたCreリコンビナーゼであってもよい。例えば、国際特許出願公開第WO 2014158593号（これは、参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと。一実施態様において、Tat-Creリコンビナーゼは核局在化シグナルを含む。

【００９７】

本明細書で使用される用語「FLPリコンビナーゼ」は、酵母FLP（出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）)の部位特異的リコンビナーゼ活性を有するタンパク質を指す。酵母2μ DNAによりコードされるFLPタンパク質は、一対の適合性FRT組み換え部位の間の部位特異的組み換えを媒介する。例えば、Babineau et al.、J. Biol. Chem.、260、12313-12319 (1985)（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと。この用語は、２つの適合性FRT部位間の組み換えを達成する能力を保持する天然に存在するFLPリコンビナーゼのいずれの派生物も包含する。組み換え産物は、FRT部位の位置及び相対的配向に依存する。同一の配向を有する２つのFRT配列は、同じDNA分子内に存在する場合、２つのFRT配列に隣接するDNA配列は、FLPリコンビナーゼにより切除されて環状分子を形成する(切除反応)。反対に、２つのFRT配列が異なるDNA分子に存在する場合、それらの

うちの１つは環状DNAであり、環状DNAはFRT配列を介して他のDNA分子に挿入される(挿入反応)。一実施態様において、FLPリコンビナーゼは、最適化されたFLPリコンビナーゼであり得る。例えば、米国特許出願公開第2010/0050279号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）。

【００９８】

一実施態様において、用語「部位特異的リコンビナーゼ」は、適合性FRT又はlox組み換え部位の対を組み換えることができるCre:FLP融合タンパク質を指す。例えば、Djukanovic et al. Plant Biotechnol J. 2008 Oct;6(8):770-81（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと。

【００９９】

本明細書で使用される用語「タンパク質形質導入ドメインを含むリコンビナーゼ融合タンパク質」は、部位特異的DNAリコンビナーゼドメイン(例えばCre又はFLP)、タンパク質形質導入ドメイン(例えば、TAT、VP22、FGF又はAntpから誘導される)及び核局在化ドメインを含む融合タンパク質を指す。例えば、国際特許出願公開第WO 2003076561号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと。一実施態様において、リコンビナーゼ融合タンパク質は、HIV Tatタンパク質の基本（basic）膜移行ペプチド、又はその膜透過性フラグメントに融合されたCre DNAリコンビナーゼドメインを含む「TAT-Cre」融合タンパク質である。組み換えTAT-Creタンパク質は、例えばExcellgen（カタログ番号：EG-1001)又はEMD-Millipore（カタログ番号：SCR508)から市販されている。

【０１００】

本明細書で使用される用語「lox部位」は、いずれかの当該分野で認識されたlox組み換え部位、又はその変異体を指し、これはバクテリオファージP1における34塩基対のloxP部位、さらには多数の変異lox部位を含み、これらとしては、限定されないが、Lox 511、Lox 5171、Lox 2272、M2、M3、M7、M11、Lox71及びLox66が挙げられる(Missirlis et al. BMC Genomics 7：73. 1471-2164（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）)。変異lox部位の非交差反応性適合性対の例は、米国特許第7,696,335号;同第7,060,499号及び同第7,696,335号（これらは参照によりその全体として本明細書に加入される）に開示される。

【０１０１】

本明細書で使用される用語「FRT部位」は、いずれかの当該分野で認識された酵母FRT組み換え部位、又はその変異体を指し、これは34塩基対のFRT部位を含み、ここで8塩基対のスペーサー領域は、２つの13塩基対の逆方向反復と隣接している。例えば、Jayaram et al.、Proc. Natl. Acad. Sci. 82、5875-5879 (1985); Umlauf S. W. et al.、EMBO Journal、7、1845-1852 (1988); Lee J. et al.、EMBO Journal、18、784-791、1999（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）を参照のこと。変異FRT部位の非交差反応性適合性対の例は、例えば米国特許第7,476,539号及び同第7,736,897号（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）に開示される。

【０１０２】

本明細書で使用される用語「形質導入」又は「形質導入された」は、レトロウイルスを使用して宿主細胞ゲノムにポリヌクレオチドを導入することを指す。

【０１０３】

本明細書で使用される用語「安定に発現する」は、宿主細胞ゲノムに導入されたポリヌクレオチドからの遺伝子の発現を指す。

【０１０４】

本明細書で使用される用語「プロモーター」は、ヌクレオチド配列、例えばタンパク質をコードする配列と作動可能に連結したDNAの制御領域を指す。プロモーターは、転写因子として知られるタンパク質により認識される特定のDNA配列及び応答エレメントを含有する。これらの因子は、RNAポリメラーゼIIに結合してそれらをプロモーターに補充し、それにより下流ヌクレオチド配列の転写を促進する。次いで、タンパク質をコードする配列を含む転写されたmRNAは、翻訳されて発現されたタンパク質を生じる。

【０１０５】
本明細書で使用される用語「作動可能な連結」は、宿主細胞におけるタンパク質コード配列の転写を可能にする、プロモーター配列とタンパク質コード領域との間の構成を指す。
【０１０６】
本明細書で使用される用語「制御可能」は、タンパク質コード領域の転写が、ネガティブな様式で活性化され得るか、若しくは「下方調節され」得;又はポジティブな様式で活性化され得るか、若しくは「上方調節され」得るということを意味する。一実施態様において、タンパク質コード配列の発現は、誘導性プロモーターにより制御される。別の実施態様において、タンパク質コード配列の表面発現は、タンパク質コード配列の少なくとも一部の切除後に、部位特異的組み換えにより下方調節され得る。
【０１０７】
本明細書で使用される用語「変異誘発条件」は、細胞におけるポリヌクレオチド（例えば、TCRをコードするポリヌクレオチド）の遺伝子変更を生じる条件を指す。非限定的な変異誘発条件は、活性化誘導(シチジン)デアミナーゼ(AID)遺伝子を発現するように操作された細胞を含む。
【０１０８】
本明細書で使用される用語「に特異的に結合する」は、当業者に理解されるような結合として、抗原（例えば、ペプチド-MHC複合体）に結合するTCRの能力を指す。例えば、抗原に特異的に結合するTCRは、例えば、イムノアッセイ、BIAcore（Ｒ）、又は当該分野で公知の他のアッセイにより決定して、一般的にはより低い親和性で他の抗原に結合し得る（例えば、Savage et al.、Immunity. 1999、10(4):485-92（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと)。特定の実施態様において、抗原に特異的に結合するTCRは、TCRが別の抗原に結合する場合の結合定数（K_a）よりも少なくとも2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1,000倍、5,000倍、又は10,000倍高いK_aで抗原に結合する。
【０１０９】
本明細書で使用される用語「高親和性」は、少なくとも10^4 M^{-1}、例えば、少なくとも10^5M^{-1}、少なくとも10^6 M^{-1}、少なくとも10^7 M^{-1}、少なくとも10^8M^{-1}、少なくとも10^9 M^{-1}、少なくとも10^{10} M^{-1}、少なくとも$10^{11}M^{-1}$、又は少なくとも10^{12} M^{-1}の結合定数(K_a)で抗原（例えば、ペプチド-MHC複合体）に結合するTCRの能力を指す。
【０１１０】
本明細書で使用される用語「高選択性」は、TCRが別の抗原(例えば、ペプチド-MHC複合体)に結合する場合の結合定数(Ka)よりも、少なくとも5倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1,000倍、5,000倍、又は10,000倍高いKaで所望の抗原(例えば、所望のペプチド-MHC複合体)に特異的に結合するTCRを指す。
【０１１１】
本明細書で使用される用語、用語「模倣物」は、他の分子の作用又は活性を生物学的に模倣する分子を指す。模倣物分子の例はリン酸化模倣（phosphomimetic）分子であり、これはリン酸化された分子の作用又は活性を模倣する;従って、リンペプチド模倣物は、例えば、リン酸化ペプチドにおけるリン酸化アミノ酸残基をリン酸化模倣残基で置き換えることにより、リン酸化ペプチドの作用又は活性を模倣するペプチドである。リン酸化模倣基又は残基の非限定的な例としては、O-ボラノホスホ、ボロノ、O-ジチオホスホ、ホスホラミド、H-ホスホネート、アルキルホスホネート、ホスホロチオラート、ホスホジチオラート及びホスホロフルオリダートが挙げられ、これらのいずれもTyr、Thr、Ser、Arg、Lys、又はHis残基上で誘導体化され得る。特定の実施態様において、Asp又はGlu残基は、リン酸化模倣物（phosphomimetic）として使用される。Asp又はGlu残基は、ペプチドにおいてホスホ-Tyr、ホスホ-Thr、ホスホ-Ser、ホスホ-Arg、ホスホ-Lys及び／又はホスホ-His残基の代わりに用いられ得る。
【０１１２】

本明細書で使用される場合、細胞における内在性TCRの発現が、当該分野で認識された方法、例えば、RT-PCR又はフローサイトメトリー分析を使用して検出可能でない場合、この細胞は、内在性TCRを「発現しない」。本明細書で使用される場合、細胞における内在性CD4又はCD8の発現レベルが、当該分野で認識された方法、例えば、RT-PCR又はフローサイトメトリー分析を使用して検出可能でない場合、この細胞は、内在性CD4又はCD8を「発現しない」。

【０１１３】

本明細書で使用される場合、細胞表面上でタンパク質を以前に発現していた細胞の85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%が、もはや細胞表面上でタンパク質を発現しない場合、かつ／又は所定の細胞上でのタンパク質の表面発現レベルが、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%減少する場合、タンパク質の表面発現は「抑止される」。

【０１１４】

本明細書で使用される用語TCR細胞ライブラリーの「TCR多様性」は、TCR α鎖アミノ酸配列及びTCR β鎖アミノ酸配列の異なる組み合わせを含む、細胞表面上で発現されたTCRの数を指す。

【０１１５】

以下において、本発明の細胞、細胞ライブラリー及び／又は方法の好ましい実施態様が提供される。

【０１１６】

II. TCRディスプレイに適した宿主細胞株の生成

１） TCR遺伝子ライブラリー発現及び細胞表面ディスプレイのための宿主細胞株の選択

本明細書に開示されるTCRディスプレイ技術は、宿主細胞表面上での機能的T細胞受容体の発現及び正確な構築のために適した環境を提供する宿主細胞株を使用する。さらに、例えば、高い形質導入効率及び迅速な倍加時間のために、選択された宿主細胞株が、細胞コンパートメントへのタンパク質輸送を着実に再現し、そこで翻訳後修飾(例えば、グリコシル化、パルミトイル化、及び／又はリン酸化)が起こり、そしてそこでシャペロンタンパク質との相互作用が新生ポリペプチドの正確な折り畳みを確実にすることが有利である。次いで、アクセサリー膜タンパク質は成膜を促進し、ここでCD3は細胞表面上に発現されたTCRの構築を安定化する。さらに、構築されたTCRタンパク質のペプチド-MHC複合体認識及びシグナル伝達活性は、共受容体、表面発現されたCD3、さらには接着及びアクセサリータンパク質、例えば、CD2及びLFA-1に依存する。

【０１１７】

一実施態様において、宿主細胞は、脊椎動物細胞、好ましくは、限定されないがマウス又はヒトを含む哺乳動物由来である。別の実施態様において、宿主細胞は、リンパ球、例えばT又はBリンパ球系統の細胞由来である。一実施態様において、宿主細胞は、T細胞前駆細胞、発生中のT細胞又は成熟Tリンパ球由来であり得る。

【０１１８】

一実施態様において、T細胞系統の宿主細胞は、胎児肝臓、胚胸腺、成体胸腺又は胸腺腫から単離される。Tリンパ球はまた、限定されないが、胚性幹細胞、誘導多能性幹(iPS)細胞、成体幹細胞又は$CD34^+$造血幹細胞を含む多能性幹細胞の分化から生じたT細胞由来であり得る。

【０１１９】

別の実施態様において、宿主細胞は、遺伝子操作された動物、例えば、制御遺伝子の破損がT細胞発達の規定された段階において遮断されるT細胞前駆細胞の蓄積をもたらすノックアウトマウスのTリンパ球が起源であり得る(Bradley et al. Mamm. Genome 2012 Oct;23(9-10):580-6（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）)。T細胞発達が停止した変異マウスの例としては、限定されないが、SCIDマウス、さらにはGATA3の無

発現変異、RAG1、RAG2、ku80、TCR β、CD3イプシロン、Lck/Fynダブルノックアウト、ZAP-70/Sykダブルノックアウト、LAT、SLP-76、GADS、VAV1/2/3トリプルノックアウト、TCR α、CD3δ、RAG1/RAG2ダブルノックアウト又はZAP-70が挙げられる(Miosge and Goodnow、Immunology and Cell Biology (2005) 83、318-335（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）)。

【０１２０】

一実施態様において、宿主細胞は、例えば、$CD8^+$細胞傷害性T細胞、$CD8^+$制御性T細胞、$CD4^+$細胞傷害性T細胞、$CD4^+$ヘルパーT(T_H1、T_H2、T_H3、T_H17、Th9、又はT_{FH}サブタイプを含む)、$CD4^+$制御性T細胞、又はインバリアントNKT(iNKT)細胞であり得る。他の実施態様において、宿主細胞はB細胞又はNK細胞であり得る。

【０１２１】

初代細胞である上に列挙された宿主細胞は、テロメラーゼ逆転写酵素を用いたレトロウイルストランスフェクション(Barsov、E.V.、Methods Mol Biol. 2009;511:143-58（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）)、さらには当該分野で周知の他の技術(例えば、公開米国特許出願第2005/0123521号、同第2010/0279401号及び国際PCT出願PCT/US1989/001526、又はRobek、M.D. and Ratner、L.、Virology、1999、73：4856-4865、（これらはそれぞれ参照によりその全体として本明細書に加入される)を参照のこと）により細胞株に不死化され得る。次いで、上で要約した必要な特性を保持する不死化宿主細胞株を、本明細書に開示されるような、倍加時間、レトロウイルス形質導入効率及びTCR活性化後のIL-2分泌又はレポーター活性の量に基いて選択する。

【０１２２】

一実施態様において、宿主細胞は、T細胞受容体を構築し発現するために必要な細胞内成分を保有するマウスプレ-B 1624-5細胞株由来であり得る(例えば、米国特許第8,748,353号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと)。

【０１２３】

別の実施態様において、宿主細胞は、DO-11.10.7マウスT細胞ハイブリドーマ、58アルファ-ベータ- (58-/-)由来であり得、これは機能的T細胞受容体アルファ/ベータ鎖を細胞表面上で発現しないが、CD3をその細胞表面上で発現する(例えば、Letourneur and Malissen Eur J Immunol. 1989;19(12):2269-74（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと)。

【０１２４】

別の実施態様において、宿主細胞は、機能的T細胞受容体アルファ／ベータ鎖を発現しないマウス胸腺腫細胞株Bw5147由来であり得る。

【０１２５】

２）　宿主細胞株における内在性遺伝子発現の遺伝子破壊

TCR細胞ライブラリースクリーニングの特定の実験設計に依存して、TCR活性及び抗原MHC認識に関与する１つ又はそれ以上の内在性宿主細胞遺伝子の発現は、形質導入されたT細胞受容体ライブラリー及び／又は共受容体(例えば、CD4及び／又はCD8)との干渉を避けるために無効にされる。

【０１２６】

宿主細胞における遺伝子サイレンシングは、当該分野で周知の多数の方法を使用して達成され得る。

【０１２７】

例えば、もはや細胞表面上で細胞表面マーカーを発現しない変異宿主細胞株は、例えば、化学的突然変異原、ガンマ線照射(例えば、Letourneur and Malissen Eur J Immunol. 1989;19(12):2269-74（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される58 α-／β-細胞株)又はトランスポゾン媒介挿入変異誘発(例えば、米国特許第8,592,211号及び同第7,767,454号（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される)を使用して、体細胞変異誘発により生成され得る。次いで得られた変異宿主細胞株を、FACS選択により細胞表面マーカーの発現における欠損についてスクリーニングする。

【０１２８】
標的化された内在性遺伝子の発現はまた、遺伝子座特異的相同組み換え(例えば、米国特許第5,530,178号(CD8ノックアウトマウス)又は米国特許第5,698,765号(CD4ノックアウトマウス)（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）を参照のこと)を介して従来のノックアウトにより無効にされ得る。
【０１２９】
さらに、いずれかの選択された内在性標的遺伝子の発現は、多数のゲノム編集技術を使用して破壊され得、これらとしては、限定されないが、デザイナー亜鉛フィンガー(例えば、米国特許第8,106,255号(一般的方法論)及び米国特許第8,956,828号(操作された亜鉛フィンガータンパク質ヌクレアーゼを使用したT細胞受容体遺伝子の標的化破壊）（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）に記載される）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN;例えば、米国特許第8,614,092号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される)、ホーミングメガヌクレアーゼ(例えば、米国特許第7,842,489号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される)又はCRISPR/casゲノム編集系(例えば、米国特許第8,697,359号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される)が挙げられる。
【０１３０】
一実施態様において、内在性宿主細胞遺伝子発現はまた、部位特異的組み換え技術を使用して無効にされ得、これらとしては、限定されないが、Creリコンビナーゼ(例えば、米国特許第4,959,317号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される)又はFLPリコンビナーゼ(例えば、米国特許第5,885,836号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される)が挙げられる。
【０１３１】
別の実施態様において、標的化遺伝子の宿主細胞発現は、RNA干渉(RNAi; 例えば、米国特許第8,329,463号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される)により発現抑制され得る。例えば、配列特異的小ヘアピンRNA(shRNAs)は、内在性TCR遺伝子及び／又は共受容体(例えば、TCR-α及びTCR-β、例えば、米国特許出願公開第2012/0321667号（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと)を阻害することが示された。これらのタンパク質の1つ又はそれ以上の発現を遮断することにより、T細胞は、TCR複合体の鍵となる成分の1つ又はそれ以上を産生することができず、それによりTCR複合体を不安定化し、そして機能的TCRの細胞表面発現を防止する。
【０１３２】
一実施態様において、上で言及した方法論のいずれか一つが、内在性TCRをその細胞表面上で発現しないTリンパ球由来宿主細胞株を生成するために実行される。
【０１３３】
一実施態様において、Tリンパ球由来宿主細胞株は、内在性TCR(すなわち、TCRα及びTCRβ)も内在性CD4もその細胞表面上で発現しない(本明細書ではTCRα$^-$/β$^-$CD4$^-$宿主細胞と呼ばれる)。
【０１３４】
別の実施態様において、マウスTリンパ球由来宿主細胞株は、マウスTCR(すなわち、mTCRα及びmTCRβ)もマウスCD4もその細胞表面上で発現しない(本明細書ではmTCRα$^-$/β$^-$mCD4$^-$宿主細胞と呼ばれる）。
【０１３５】
別の実施態様において、Tリンパ球由来宿主細胞株は、内在性TCR(すなわち、TCRα及びTCRβ)も内在性CD8(例えば、CD8α及びCD8β)もその細胞表面上で発現しない(本明細書でTCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$宿主細胞と呼ばれる)。
【０１３６】
別の実施態様において、マウスTリンパ球由来宿主細胞株は、マウスTCR(すなわち、mTCRα及びmTCRβ)もマウスCD8(例えば、mCD8α及びmCD8β)もその細胞表面上で発現しない(本明細書でmTCRα$^-$/β$^-$mCD8$^-$宿主細胞と呼ばれる)。

【０１３７】
別の実施態様において、Tリンパ球由来宿主細胞株は、内在性TCR(すなわち、TCRα及びTCRβ)も内在性MHC Iもその細胞表面上で発現しない（本明細書でTCRα⁻/β⁻ MHC I⁻宿主細胞と呼ばれる)。
【０１３８】
別の実施態様において、マウスTリンパ球由来宿主細胞株は、マウスTCR(すなわち、mTCRα及びmTCRβ)もマウスMHC Iもその細胞表面上で発現しない(本明細書でmTCRα⁻/β⁻ mMHC I⁻宿主細胞と呼ばれる)。
【０１３９】
別の実施態様において、Tリンパ球由来宿主細胞株は、内在性TCRすなわち、TCRα及びTCRβ)も内在性MHC IIもその細胞表面上で発現しない(本明細書でTCRα⁻/β⁻ MHC II⁻宿主細胞と呼ばれる)。
【０１４０】
別の実施態様において、マウスTリンパ球由来宿主細胞株は、マウスTCR(すなわち、mTCRα及びmTCRβ)もマウスMHC IIもその細胞表面上で発現しない(本明細書でmTCRα⁻/β⁻ mMHC II⁻宿主細胞と呼ばれる)。
【０１４１】
３） 組み換えT細胞共受容体を発現する宿主細胞株の生成
膜貫通糖タンパク質CD8及びCD4は、その抗原応答がそれぞれ主要組織適合複合体クラスI及びIIタンパク質(MHC、ヒトにおいてHLAとも呼ばれる)により制限されるTリンパ球の異なる集団の特徴を示す。CD4は単量体として細胞表面上に発現されるが、CD8は二量体として発現される。CD4及びCD8は、それらの同族MHCに結合し、それによりT細胞受容体のMHC結合抗原ペプチドとの会合を促進することにより、T細胞受容体の共受容体として作用する。$CD4^+$T細胞は、MHCクラスII 分子と共同して抗原に応答し、そして$CD8^+$ T細胞は、MHCクラスI分子と共同して抗原に応答する。インビトロでの研究(Laugel et al.、J. Biol. Chem. 2007;282(33):23799-810（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）)は、CD8共受容体が、結合速度及び解離速度の両方に対する効果により、最適以下のTCR/ペプチド-MHC I親和性で結合効率を実質的に増強するということを示す。TCR、ペプチド-MHC I、及びCD8の間の三分子相互作用もまた共同して作用することが示された(Jiang et al.、Immunity. 2011;34(1):13-23)。従って、共受容体依存性の程度は、TCR/ペプチド-MHC I親和性と逆相関することが見出された。
【０１４２】
TCR細胞ライブラリースクリーニングの間にペプチド-MHC複合体に対するT細胞受容体の親和性を評価するために、TCRα⁻/β⁻CD4又はCD8ネガティブ$CD3^+$宿主細胞を、組み換えCD4又はCD8共受容体を発現するように操作することができる。
【０１４３】
一実施態様において、TCRα⁻/β⁻$CD4^-$ $CD3^+$宿主細胞は、組み換えCD4（例えば、ヒトCD4：UniProtKB - P01730; マウスCD4：UniProtKB - P06332)を発現するように操作され得る。
【０１４４】
別の実施態様において、TCRα⁻/β⁻$CD4^-$ $CD3^+$宿主細胞は、組み換えキメラCD4を発現するように操作され得る。
【０１４５】
別の実施態様において、ヒトTCRα⁻/β⁻$CD4^-$ $CD3^+$宿主細胞は、組み換えマウスCD4タンパク質の細胞外領域(例えば、UniProtKB - P06332の残基27～394)を発現するように操作され得る。
【０１４６】
別の実施態様において、マウスTCRα⁻/β⁻$CD4^-$ $CD3^+$宿主細胞は、組み換えヒトCD4タンパク質の細胞外領域(例えば、UniProtKB - P01730の残基26～396)を発現するように操作され得る。

【０１４７】
別の実施態様において、ヒトTCRα$^-$/β$^-$CD4$^-$ CD3$^+$宿主細胞は、ヒトCD4膜貫通及び細胞質内領域とインフレームで融合されたマウスCD4ポリペプチドの細胞外領域を有する組み換えキメラCD4タンパク質を発現するように操作され得る。
【０１４８】
別の実施態様において、非ヒトTCRα$^-$/β$^-$CD4$^-$ CD3$^+$宿主細胞は、非ヒトCD4膜貫通及び細胞質内領域とインフレームで融合されたヒトCD4ポリペプチドの細胞外領域を有する組み換えキメラCD4タンパク質を発現するように操作され得る。
【０１４９】
別の実施態様において、マウスTCRα$^-$/β$^-$CD4$^-$ CD3$^+$宿主細胞は、マウスCD4膜貫通及び細胞質内領域とインフレームで融合されたヒトCD4ポリペプチドの細胞外領域を有する組み換えキメラCD4タンパク質を発現するように操作され得る。
【０１５０】
キメラヒト/マウスCD4のヒト細胞外領域をコードするアミノ酸配列は、野生型ヒトCD4の対応するアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり得、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%同一である。
【０１５１】
マウス膜貫通領域及びキメラヒト/マウスCD4の細胞質内領域をコードするアミノ酸配列は、野生型マウスCD4の対応するアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり得、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%同一であり得る。
【０１５２】
別の実施態様において、TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$ CD3$^+$宿主細胞は、組み換えCD8α及びCD8βを発現するように操作され得る。
【０１５３】
例となるマウスCD8α及びCD8βアミノ酸配列を以下に列挙する。
【０１５４】
マウスCD8αポリペプチドアイソフォーム1(UniProtKB：P01731-1)：
【化１】

KPQAPELRIFPKKMDAELGQKVDLVCEVLGSVSQGCSWLFQNSSSKLPQPTFVVYMASS

HNKITWDEKLNSSKLFSAMRDTNNKYVLTLNKFSKENEGYYFCSVISNSVMYFSSVVPV

LQKVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGI

CVALLLSLIITLI*CYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV*

(配列番号21)(太字：細胞外領域；標準：膜貫通；斜字体：細胞質内領域)

【０１５５】
マウスCD8βポリペプチド(UniProtKB：P10300)：
【化２】

LIQTPSSLLVQTNHTAKMSCEVKSISKLTSIYWLRERQDPKDKYFEFLASWSSSKGVLY

GESVDKKRNIILESSDSRRPFLSIMNVKPEDSDFYFCATVGSPKMVFGTGTKLTVVDVL

PTTAPTKKTTLKMKKKKQCPFPHPETQKGLTCSLTTLSLLVVCILLLLAFLGVAVYF*YC*

VRRRARIHFMKQFHK

(配列番号22)(太字：細胞外領域；標準：膜貫通；斜字体：細胞質内領域)

【０１５６】

例となるヒトCD8α及びCD8βアミノ酸配列を以下に列挙する:
ヒトCD8αポリペプチドアイソフォーム1(UniProtKB：P01732-1):
【化３】

SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKA

AEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTT

TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL

SLVIT*LYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV*

(配列番号23)（太字：細胞外領域；標準：膜貫通；斜字体：細胞質内領域）

【０１５７】
ヒトCD8βポリペプチドアイソフォーム1(UniProtKB：P10966-1):
【化４】

LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTI

HGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLP

TTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAI*HLCCRRR*

RARLRFMKQFYK

(配列番号24)（太字：細胞外領域；標準：膜貫通；斜字体：細胞質内領域）

【０１５８】
別の実施態様において、TCRα^{-}/β^{-}CD8^{-} CD3^{+}宿主細胞は、組み換えヒト/マウスキメラCD8α及びヒト/マウスキメラCD8β(chiCD8αβ^{+})を発現するように操作され得る。
【０１５９】
別の実施態様において、ヒトTCRα^{-}/β^{-}CD8^{-} CD3^{+}宿主細胞は、マウスCD8α及びマウスCD8βの細胞外領域を有する組み換えキメラCD8タンパク質を発現するように操作され得る。
【０１６０】
別の実施態様において、マウスTCRα^{-}/β^{-}CD8^{-} CD3^{+}宿主細胞は、ヒトCD8α及びヒトCD8βの細胞外領域を有する組み換えキメラCD8タンパク質を発現するように操作され得る。
【０１６１】
他の例において、組み換えキメラヒト/マウスCD8α及びヒト/マウスCD8βポリペプチドは、ヒトCD8α細胞外領域がマウスCD8α膜貫通及び細胞質内領域とインフレームで融合され、そしてヒトCD8β細胞外領域がマウスCD8β膜貫通及び細胞質内領域とインフレームで融合されるように操作され得る。
【０１６２】
キメラヒト/マウスCD8α及びヒト/マウス CD8βポリペプチドのヒト細胞外領域をコードするアミノ酸配列は、それぞれ野生型ヒトCD8α及びCD8βの対応するアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり得、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%同一であり得る。
【０１６３】
キメラヒト/マウスCD8α及びヒト/マウスCD8βポリペプチドのマウス膜貫通領域及び細胞質内領域をコードするアミノ酸配列は、それぞれ野生型マウスCD8α及びCD8βの対応するアミノ酸配列と、少なくとも90%同一であり得、場合により91、92、93、94、95、96、97、98、99又は100%同一であり得る。
【０１６４】

関連するポリペプチド同一性は、公知の方法により容易に計算することができる。このような方法としては、限定されないがComputational Molecular Biology、Lesk、A. M.、ed.、Oxford University Press、New York (1988); Biocomputing：Informatics and Genome Projects、Smith、D. W.、ed.、Academic Press、New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data、Part 1、Griffin、A. M.、and Griffin、H. G.、eds. Humana Press、New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology、von Heinje、G.、Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer、Gribskov、M. and Devereux、J.、eds.、M. Stockton Press、New York (1991);及びCarillo et al.、SIAM J. Applied Math、48:1073 (1988)（これらの内容は全て参照によりそれら全体で本明細書に加入される）に記載されるものが挙げられる。２つのポリペプチドの関連性又は同一性パーセントを決定する方法は、試験される配列間で最大のマッチを生じるように設計される。２つの配列間の同一性を決定するための好ましいコンピュータ・プログラム方法としては、限定されないが、GAP (Devereux et al.、Nucl. Acid. Res.、12:387 (1984)（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）; Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、Wis.、BLASTP、BLASTN、及びFASTA (Altschul et al.、J. Mol. Biol.、215:403-410 (1990)（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）)を含むGCGプログラムパッケージが挙げられる。BLASTXプログラムは、国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information）(NCBI)及び他の供給源(BLAST Manual、Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda、Md. 20894; Altschul et al.、上記(1990))から公開で利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた同一性を決定するために使用され得る。

【０１６５】

一実施態様において、キメラCD8α及びCD8βは、それぞれ配列番号1及び2のアミノ酸配列を含む。

【０１６６】

TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$ CD3$^+$宿主細胞における発現のために、選択されたCD8α及びCD8βコード領域は、発現カセット、例えばレトロウイルス又はレンチウイルス発現カセットにおける適切なプロモーターの下流にクローン化され得る。

【０１６７】

TCRα$^-$/β$^-$CD4$^-$ CD3$^+$ 宿主細胞における発現のために、選択されたCD4コード領域は、発現カセット、例えばレトロウイルス又はレンチウイルス発現カセットにおける適切なプロモーターの下流にクローン化され得る。

【０１６８】

プロモーターは、TCR細胞ライブラリースクリーニングに依存して構成的又は制御可能プロモーターであり得る。

【０１６９】

構成的プロモーターの例となる実施態様としては、限定されないが、ポリオーマ、アデノウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)及び サルウイルス40(SV40)由来のウイルスプロモーターが挙げられる。例となる構成において、タンパク質コード配列は、上流で(すなわち、5’)ヒトサイトメガロウイルスIEプロモーターと、そして下流で(すなわち、3’)SV40ポリ(A)シグナルと隣接している。ヒトサイトメガロウイルスIEプロモーターは、Boshart et al. (1985) Cell 41:521 530（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される。使用され得る他の広範に発現するプロモーターとしては、HSV-TKプロモーター、β-アクチンプロモーター及びEF-1αプロモーターが挙げられる。特定の実施態様において、構成的プロモーターは、T細胞特異的、例えばCD3δ T細胞特異的プロモーターであり得る。

【０１７０】

適切な制御可能発現系は、例えば、以下の特性を有するべきである：非誘導状態における低レベルの基礎発現; 多面発現性効果を促進しないインデューサー; 誘導された状態での高レベルの発現; 目的の候補核酸の発現の高度に特異的な誘導; 及び誘導された発現の

レベルの調節。このような特性を有する制御可能発現系の例としては、限定されないが：Tet誘導系(例えば、Gossen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547 5551; Gossen et al. (1995) Science 268:1766 1769（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される)を参照のこと）；FK506/ラパマイシン誘導系(例えば、Spencer et al. (1993) Science 262:1019 1024; Belshaw et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4604 4607（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）を参照のこと)；RU486/ミフェプリストン誘導系(Wang et al. Proceedings of the National Academy of Sciences (1994) 91(17):8180-4（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）)；クミン酸誘導系(Mullick et al. BMC Biotechnol. 2006 Nov 3;6:43（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）)又はエクジソン誘導系(総説については、Rossi et al. (1989) Curr. Op. Biotech. 9:451 456（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと)。多くの構成的、組織特異的かつ誘導性のプロモーターは、Origene、Promega、Invitrogen、System Biosciences及びInvivogenのような製造供給元から現在市販されている。

【０１７１】

特定の実施態様において、CD8α及びCD8βは、別々の発現ベクターにクローン化される。

【０１７２】

他の実施態様において、CD8α及びCD8βの発現は、同じレトロウイルス発現構築物上で連結され得る。これは、例えば、CD8α及びCD8β又はそのフラグメントを１つのプロモーターから発現させ、そしてCD8α及びCD8β又はそのフラグメントのコード領域をIRESエレメントにより分離することにより達成され得る。

【０１７３】

あるいは、CD8の２つの鎖の同時発現は、個々の結合タンパク質鎖の各々の発現が別々に制御されるように、２つの別々の発現カセットを単一のレトロウイルス骨格にクローン化することにより達成され得る。

【０１７４】

別の実施態様において、CD8α及びCD8β鎖は、転写活性を反対の方向に付与する二方向性プロモーターの使用により同じベクターから発現され得る。この選択肢は、ごく接近したプロモーターの発現レベルに不利に影響を及ぼし得るプロモーター干渉が起こらないという利点を有する。

【０１７５】

スクリーニング方策に依存して、共受容体発現カセットは、共受容体のコード領域又はコード領域の一部に隣接した部位特異的組み換え配列を含むように設計され得る。従って、形質導入された共受容体発現カセットのTCRネガティブ、共受容体ネガティブ宿主細胞への組み込の際に、２つの部位特異的組み換え部位間に位置するヌクレオチド配列は、宿主細胞において対応する部位特異的リコンビナーゼを発現させることにより切除され得る。

【０１７６】

別の実施態様において、共受容体発現カセットは、共受容体のコード領域の翻訳を妨害するように挿入された部位特異的組み換え配列と隣接した介在するDNA配列を含む。次いで、共受容体遺伝子翻訳は、部位特異的組み換え配列間に位置する介在するDNA配列の部位特異的リコンビナーゼ媒介切除により回復され得る。

【０１７７】

本発明において使用され得る例となる部位特異的組み換え系としては、限定されないが、CRE-LOX又はFLP/FRT系が挙げられる(Ann. Rev. Biochem. (2006) 75：567-605及びGaj et al. Biotechnol Bioeng. 2014 Jan; 111(1)：1-15.（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）において概説される)。

【０１７８】

適切な部位特異的リコンビナーゼの発現は、上記のような、構成的、T細胞特異的又は

誘導性のプロモータにより駆動され得る。

【０１７９】

他の実施態様において、部位特異的リコンビナーゼは、融合タンパク質、例えば、Tat-Cre融合タンパク質としてTCRα⁻/β⁻宿主細胞に送達され得る(Joshi et al. Genesis (2002) 33:48-54; Peitz et al.、(2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:4489-94（これらの内容は参照によりそれら全体として本明細書に加入される））。TAT-Creは、インビトロで線維芽細胞及びマウス胚性幹細胞において95%よりも高い組み換え効率を誘導することが示された。

【０１８０】

別の実施態様において、Creリコンビナーゼは、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメインに連結され得る(例えば、Feil et al.、(1996) PNAS 93:10887-10890（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと)。これは、タモキシフェンでの細胞の処理に応じたCreの核移行を可能にする。

【０１８１】

別の実施態様において、TCRα⁻/β⁻mCD8⁻ CD3⁺ 宿主細胞は、キメラヒト/マウスCD8αコード領域及びヒト/マウスCD8βコード領域の膜貫通及び細胞質内領域に隣接したlox組み換え部位を含有する共受容体発現カセット(chiCD8α β⁺/flox⁺)を用いて形質導入される。

【０１８２】

別の実施態様において、TCRα⁻/β⁻mCD4⁻ CD3⁺宿主細胞は、キメラヒト/マウスCD4コード領域のマウス膜貫通及び細胞質内領域に隣接したlox組み換え部位を含有する共受容体発現カセット(chiCD4⁺/flox⁺)を用いて形質導入される。

【０１８３】

４） 抗原-MHC特異的TCRシグナル伝達の測定のための１つ又はそれ以上のレポーター構築物を有する派生宿主細胞株の生成

T細胞受容体複合体は、それらの細胞質内領域内に免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)を含有する可変TCRα β又はTCRγ δヘテロ二量体及び非可変シグナル伝達サブユニット(例えば、CD3)を含む多サブユニット会合体である。ペプチド-MHC複合体によるTCR会合は、Lck、Src型チロシンキナーゼの、CD4又はCD8共受容体との結合及びCD3の細胞内領域の各ITAMモチーフ内の２つのTyrのリン酸化を誘発する。次いで、ZAP70、Syk型チロシンキナーゼは、Lckにより活性化されたITAMモチーフと会合する。その後、シグナルは、様々なアダプタータンパク質(例えば、LAT及びSLP-76)を介して、セリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼ(例えば、カルモジュリン－カルシニューリンを介したカルシウムシグナル伝達により)、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼ(例えば、PKC、MAPKスーパーファミリー)などに伝達される。これらの事象は、最終的に３つの鍵となる転写因子：NFκB、NFAT及びAP-1の活性化をもたらし、これらはそれぞれ、初期サイトカイン産生(例えば、インターロイキン(例えばIL-2、-4、-6、及び-17)、TNF-α、及びIFN-γ)の誘導において極めて重要な役割を果たし、これは活性化Tリンパ球のクローン増殖に必要である。

【０１８４】

ペプチド/MHC-TCR応答性レポーター構築物を宿主細胞に組み込むことにより、組み換え発現されたTCR及び／又は共受容体とペプチド-MHC複合体との相互作用並びにその後に誘導されるT細胞シグナル伝達活性化は、レポーター読み出しからリアルタイムで決定され得る。

【０１８５】

シグナル伝達活性の読み出しを生じるレポータータンパク質は当該分野で周知であり、そしてこれらとしては、限定されないが、近年Senutovitch et al. Exp. Biol. Med. (2015); 240(6)：795-808（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）により概説された、細胞表面マーカー及び生物発光(ルシフェラーゼ)又は蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)、黄色蛍光タンパク質(

YFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)及び赤色蛍光タンパク質(RFP)が挙げられる。

【０１８６】

特定の実施態様において、TCR活性化により誘導されるシグナル伝達事象は各々、適切な転写応答エレメント(TRE)、例えば、NFκB/Rel、NFAT又はAP-1を有するプロモーターを使用して個々にモニタリングされ得る。一連のシグナル伝達経路GFP又はルシフェラーゼレポーターは、現在では例えばSambio Sciences/Qiagen、Addgene及びInvitrogenから市販されている。個々のTRE、又はそれらの組み合わせは、宿主細胞で発現され得る。

【０１８７】

III. 細胞TCRディスプレイライブラリーの生成

TCR α可変領域Vα及びJα遺伝子、並びにTCR β可変領域Vβ、Jβ及びDβ遺伝子を含有するDNAの供給源を提供するために、ポリA^+RNAを、例えばヒト胎児胸腺、臍帯血、腫瘍浸潤リンパ球(患者由来)、ワクチン摂取した患者、例えばヒトパピローマウイルス(HPV)、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、若しくは癌についてワクチン接種した者、又は目的の抗原でワクチン接種されたHLA-A2トランスジェニックマウスから製造する。

【０１８８】

TCR β鎖をコードするcDNAは、例えば、完成したV β及びDJ β再配列を有するプレ-Tリンパ球から単離されたmRNAから生成され得る。これらのTリンパ球は、$CD44^{low}$ $CD25^+$DN3又はDN4 $CD44^-$ $CD25^-$ Tリンパ球であり得る。

【０１８９】

TCR α鎖をコードするcDNAは、例えば、完成したVα及びJα再配列を有する未成熟二重ポジティブTリンパ球から単離されたmRNAから生成され得る。これらのリンパ球は、$CD4^+$$CD8^+$ $CD3^{low}$ Tリンパ球であり得る。

【０１９０】

cDNAは、TCR可変領域のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)ベースの増幅のためのテンプレートとして製造され使用される。次いで、TCR α及びTCR β可変領域オープンリーディングフレーム(ORF)を含む単離されたPCR産物を、種々の可変領域遺伝子の遺伝子産物が、内在性TCRを細胞表面上で発現しない宿主細胞の細胞表面上で機能的形態で発現されることを可能にする発現系にクローン化される。

【０１９１】

別々の発現構築物によりコードされるTCRの発現のために、異なるポリペプチド鎖の発現が異なる選択マーカーと連結され、それにより対応する発現構築物の発現について別々の選択を可能にすることが好ましい。

【０１９２】

形質導入又はトランスフェクトされた細胞の選択のために有用な抗生物質に対する抵抗性を付与する選択マーカーとしては、例えば、ピューロマイシン、ネオマイシン、ハイグロマイシンB、ミコフェノール酸、ヒスチジノール、ブレオマイシン、及びフレオマイシン抵抗性のための遺伝子が挙げられる。細胞表面タンパク質及び蛍光タンパク質もまた選択マーカーとしての使用に適している。

【０１９３】

一実施態様において、ヒトTCR α又はTCR βの可変領域をコードするcDNA配列は、PCRにより増幅され、そしてキメラTCR α又はTCR β発現ベクター骨格にクローン化される。

【０１９４】

詳細には、TCR α発現カセットは、プロモーター、ヒトTCRシグナル配列、クローニング部位に続いてマウスTCR α非可変領域をコードするヌクレオチド配列を含有する。ヒトTCR α可変領域をコードするヌクレオチド配列は、TCR α cDNAライブラリーからPCRにより増幅され、そしてマウスTCR α非可変領域とインフレームになるようにTCR α発現カセットのクローニング部位にクローン化される。次いで、得られたライブラリーをE. coliに形質転換し、そしてプラスミドDNAを宿主細胞に導入して組み換えキメラヒト／マウスTCR αライブラリーを生成する。

【０１９５】

同じような方法で、TCR β発現カセットは、プロモーター、ヒトTCRシグナル配列、クローニング部位につづいて、マウスTCR β非可変領域をコードするヌクレオチド配列を含有する。ヒトTCR β可変領域をコードするヌクレオチド配列は、TCR β cDNAライブラリーからPCRにより増幅され、そしてマウスTCR β非可変領域とインフレームになるようにTCR β発現カセットのクローニング部位にクローン化される。次いで、得られたライブラリーをE. coli.に形質転換し、そしてプラスミドDNAを宿主細胞に導入して、組み換えキメラヒト／マウスTCR βライブラリーを生成する。

【０１９６】

一実施態様において、ヒトTCR α又はTCR βの細胞外領域をコードするcDNA配列をPCRにより増幅し、そしてキメラTCR α又はTCR β発現ベクター骨格にクローン化する。

【０１９７】

詳細には、TCR α発現カセットは、プロモーター、ヒトTCRシグナル配列、クローニング部位に続いて、マウスTCR α膜貫通及び細胞質内領域をコードするヌクレオチド配列を含有する。ヒトTCR α細胞外領域をコードするヌクレオチド配列を、TCR α cDNAライブラリーからPCRにより増幅し、そしてマウスTCR α膜貫通及び細胞質内領域とインフレームになるようにTCR α発現カセットのクローニング部位にクローン化する。次いで、得られたライブラリーをE. coli.に形質転換し、そしてプラスミドDNAを宿主細胞に導入して組み換えキメラヒト/マウスTCR αライブラリーを生成する。

【０１９８】

同じような方法で、TCR β発現カセットは、プロモーター、ヒトTCRシグナル配列、クローニング部位に続いて、マウスTCR β膜貫通及び細胞質内領域をコードするヌクレオチド配列を含有する。ヒトTCR β細胞外領域をコードするヌクレオチド配列を、TCR β cDNAライブラリーからPCRにより増幅し、そしてマウスTCR β膜貫通及び細胞質内領域とインフレームになるようにTCR β発現カセットのクローニング部位にクローン化する。次いで、得られたライブラリーをE. coli.に形質転換し、そしてプラスミドDNAを宿主細胞に導入して組み換えキメラヒト／マウスTCR βライブラリーを生成する。

【０１９９】

特定の実施態様において、同時刺激分子のシグナル伝達領域は、TCR α及び／又はTCR β細胞質内領域のC末端に融合される。同時刺激分子は、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、B7-H3、CD83と特異的に結合するリガンド、TCR ζ鎖又はそれらのいずれかの組み合わせからなる群より選択され得る。T

【０２００】

一実施態様において、TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$ CD3$^+$ chiCD8α β$^+$/flox$^+$ TRE-GFP宿主細胞株を、TCR α遺伝子ライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトし、続いて安定形質転換体について選択する。形質転換体におけるTCR αの発現は、RT-PCR分析により確認され得る。得られたクローンをプールし、次いでnTCR β遺伝子ライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトし、続いて安定二重形質転換体を選択する。

【０２０１】

他の実施態様において、TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$ CD3$^+$ chiCD8α β$^+$/flox$^+$ TRE-GFP宿主細胞株を、最初にTCR β遺伝子ライブラリーで、続いてTCR α遺伝子ライブラリーで形質導入又はトランスフェクトする。

【０２０２】

別の実施態様において、TCRα$^-$/β$^-$ CD4$^-$ CD3$^+$ chiCD4$^+$/flox$^+$TRE-GFP宿主細胞株を、TCR α遺伝子ライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトし、続いて安定形質転換体を選択する。形質転換体におけるTCR αの発現をRT-PCRにより確認する。得られたクローンをプールし、次いでTCR β遺伝子ライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトし、続いて安定二重形質転換体を選択する。

【０２０３】

他の実施態様において、TCRα$^-$/β$^-$ CD4$^-$ CD3$^+$ chiCD4$^+$/flox$^+$TRE-GFP宿主細胞株を最

初にTCR β遺伝子ライブラリー、続いてTCR α遺伝子ライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトする。

【０２０４】

特定の実施態様において、TCR遺伝子ライブラリーは、レトロウイルス形質導入により宿主細胞株に導入される。レトロウイルス形質導入は、レトロウイルスにより形質導入された細胞の大部分が、１つのみの組み換えレトロウイルス構築物により遺伝子改変され、少なくとも１つのTCRタンパク質のクローン発現を生じることを確実にするために制御され得る。一実施態様において、レトロウイルス形質導入は、感染多重度(MOI)を利用することにより制御される。MOIは10、1、0.5、0.1又はそれ以下であり得る。別の実施態様において、レトロウイルス形質導入は、形質導入後に、細胞の5～6%未満が、レトロウイルス発現ベクターによりコードされる組み換えタンパク質を発現することを確実にするように制御される。

【０２０５】

異なる発現ベクターからのTCR α鎖及びTCR β鎖の別々の発現は、TCR α鎖の多様なコレクションをコードする発現ベクターのコレクションは、TCR β鎖の多様なコレクションをコードする発現ベクターのコレクションと無作為に組み合わされ得るという利点を提供する。このTCR α及びTCR β鎖のシャッフリングは、TCR α及びTCR β鎖コレクションの総数が限られている場合にも、異なる結合特異性の高度の多様性を生じ得る(例えば、10^4の異なるTCR β鎖と無作為に組み合わされる10^4の異なるTCR α鎖、理論的には10^8のTCRを生じ、これらはそれぞれ異なる特異性を有し得る)。

【０２０６】

組み換え相補的TCR α及びTCR β鎖を受けたTCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$ CD3$^+$ chiCD8αβ$^+$/flox$^+$ TRE-GFP又はTCRα$^-$/β$^-$ CD4$^-$ CD3$^+$ chiCD4$^+$/flox$^+$TRE-GFPレポーター宿主細胞は、細胞表面上で機能的TCRを発現し、次いでこれは、蛍光活性化細胞選別(FACS)又は磁気活性化細胞選別(MACS)により濃縮されて、高度に多様な細胞TCRディスプレイライブラリーを生成し得る。

【０２０７】

IV. 細胞TCRディスプレイライブラリーのスクリーニング

所望の特徴を有するT細胞受容体(TCR)の単離及び同定のための方法が本明細書に開示され、該方法は、内在性TCRを発現しない宿主細胞を、異なる組み換えTCRをコードする発現構築物のライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトし、それらの細胞表面上で異なる組み換えTCRを細胞が発現する組み換えTCR細胞ライブラリーを生成すること、所望のペプチド-MHC複合体の存在下で所望の特徴について細胞ライブラリー内の細胞を選択すること、並びに所望の特徴を有する組み換えTCRをコードする発現構築物を単離及び同定することを含む。

【０２０８】

所望の特徴の例としては、限定されないが、所望のペプチド-MHC複合体に対する高選択性、所望のペプチド-MHC複合体に対する高親和性、及び所望のペプチド-MHC複合体の存在下でのポジティブな機能的読み出しの提示が挙げられる。

【０２０９】

１） 共受容体細胞表面発現の存在下又は存在しない場合の細胞TCRディスプレイライブラリーのスクリーニング

共受容体、例えばCD4又はCD8の細胞表面発現の存在下及び存在しない場合に、所望のペプチド-MHC複合体に特異的に結合するT細胞受容体（TCR)をコードする少なくとも１つの核酸の単離及び同定のための方法が本明細書に開示される。

【０２１０】

一実施態様において、組み換え共受容体を発現するマウスTCRα$^-$/β$^-$共受容体$^-$CD3$^+$宿主細胞は、本明細書に開示されるような、組み換えTCR α及びTCRβの遺伝子ライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトされる。次いで、TCRα／β表面発現を有する形質転換体が選択される。所望のペプチド-MHC複合体に所望の親和性又は選択性で結合す

る細胞表面組み換えTCRタンパク質を発現する宿主細胞(本明細書では共受容体依存性結合剤と呼ばれる)は、非結合宿主細胞集団からFACS又はMACSにより濃縮される。次いで、共受容体の存在下で所望のペプチド-MHC複合体に所望の親和性又は選択性で結合するTCRをコードするヌクレオチド配列を、PCRにより単離して配列決定し得る。

【０２１１】

特定の実施態様において、組み換え共受容体又は組み換え共受容体の一部をコードするポリヌクレオチドは、部位特異的組み換え部位と隣接する。共受容体依存性結合剤集団において高親和性TCRを発現する宿主細胞を同定するために、組み換え共受容体発現カセットを、本明細書に開示されるように同族部位特異的リコンビナーゼを使用して除去し、そしてもはや組み換え共受容体をそれらの細胞表面で発現しない細胞を濃縮する。次いで、この共受容体ネガティブ細胞集団を、所望のペプチド-MHC複合体に結合する細胞表面組み換えTCRタンパク質(本明細書では共受容体非依存性結合剤と呼ばれる)について再スクリーニングする。次いで、共受容体の存在しない場合に所望のペプチド-MHC複合体に結合するTCRをコードするヌクレオチド配列を、PCRにより単離し配列決定し得る。特定の実施態様において、共受容体非依存性結合剤は、共受容体の存在しない場合に同族リガンド（例えば、ペプチド-MHC複合体）に特異的に結合することができ、かつ／又は共受容体の存在しない場合に同族リガンド（例えば、ペプチド-MHC複合体）の存在下でシグナル伝達を媒介することができる。

【０２１２】

一実施態様において、組み換え共受容体の活性を調節することができる。一実施態様において、組み換え共受容体の細胞表面発現は、誘導性プロモーターを使用して制御され得る。別の実施態様において、組み換え共受容体の細胞表面発現は、Cre/loxP系を使用して制御され得る。次いで、TCRライブラリーを、所望のペプチド-MHC複合体に対する結合について、上記のように組み換え共受容体の減少する発現の関数としてスクリーニングし得る。

【０２１３】

MHCクラスI又はIIタンパク質に結合し得、そしてT細胞の提示されるいずれのT細胞抗原も、細胞TCRディスプレイライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。ペプチド抗原は、化学的に合成されても天然供給源から誘導されてもよい。一実施態様において、ペプチド抗原は腫瘍細胞由来である。

【０２１４】

本明細書に開示される方法及び組成物は、目的の抗原に特異的に結合するTCRの発現、スクリーニング及び同定に広く適用可能である。しかし、いずれかの天然に存在するか又は人工的に操作された改変を有するTCRのいずれの（機能的）フラグメントも使用され得る。全長TCRに関して、いずれかの種類の人工的に操作されたか設計されたTCR結合領域の改変が利用され得る、例えば、部位特異的、又は領域特異的変異誘発、異なるTCRからの天然に存在する配列の融合、CDR配列の無作為化、DNAシャッフリング、及びエラープローンPCRによるもの。

【０２１５】

ａ）　CD8依存性TCR活性化

一実施態様において、組み換えTCRを発現するTCRα^{-}/β^{-} CD8^{-} CD3^{+} chiCD8αβ^{+}/flox^{+} TRE-GFP宿主細胞ライブラリーを、直接的又は間接的に蛍光標識された、MHC四量体、二量体、又は他の多量体複合体に複合体化した特定の9～11量体ペプチドの形態の様々なMHCクラスI対立遺伝子の状況において目的のいずれかのT細胞エピトープへの結合についてアッセイする。

【０２１６】

一実施態様において、適切なTCRを保有する細胞を捕捉してFACSにより濃縮することができ、そしてα及びβ鎖を回収して特徴づけすることができる。

【０２１７】

他の実施態様において、個々のTCRの細胞表面発現によるペプチド-MHCクラスI会合は、

活性化マーカー(例えば、CD69又はCD137)の発現、シグナル伝達経路の誘発(例えば、NFATシグナル伝達、IL-2シグナル伝達、アクチベータータンパク質-1シグナル伝達、又はNFκB/Relシグナル伝達)、サイトカインの産生(例えば、IL-2、TNF-α、又はIFN-γ)、カルシウム流動、細胞増殖(例えば、T細胞の増殖)、及びレポーター系の活性化(例えば、IL-2-EGFPレポーター系)により決定することができる。

【０２１８】

共受容体として、CD8はまた、TCRと同じMHCクラスI分子のα3ドメインに結合してTCRシグナル伝達を促進し得る。変異誘発データは、ヒトMHCクラスI α鎖の残基223～229は、CD8-MHCクラスI相互作用に必須であるということを示す(Salter et al. Nature 345:41-46 1990)。

【０２１９】

所望のペプチド-MHCクラスI複合体のT細胞会合におけるCD8-α3相互作用の役割を、本明細書に開示されるTCR細胞ライブラリースクリーニングを使用して調べることができる。

【０２２０】

一実施態様において、組み換えTCRを発現するマウスTCRα$^-$/β$^-$CD8$^+$ CD3$^+$ TRE-GFP宿主細胞ライブラリーを、ヒトMHCクラスI α3ドメインの残基223～229における1つ又はそれ以上のアミノ酸変異を有する所望のペプチド-ヒト/マウスキメラMHCクラスIタンパク質と接触させることができる。TCR活性化は、レポーター読み出し、すなわち、GFP産生により評価される。次いで、GFP$^+$細胞をFACSにより単離し、そして組み換えTCRの可変領域をPCRにより増幅して配列決定する。

【０２２１】

別の実施態様において、ヒトMHCクラスI α3ドメインの残基223～229における1つ又はそれ以上のアミノ酸変異を有するペプチド-ヒト/マウスキメラMHCクラスIタンパク質を、細胞、例えば、抗原提示細胞で発現させる。

【０２２２】

ｂ） CD8非依存性TCR活性化

別の実施態様において、組み換えTCRを発現するTCRα$^-$/β$^-$ CD8$^-$ CD3$^+$ chiCD8αβ$^+$/flox$^+$ TRE-GFP宿主細胞ライブラリーを２回（two round）スクリーニングプロトコルにかける。

【０２２３】

最初の回に、TCR細胞ライブラリーを、キメラヒト/マウスCD8の細胞表面発現の存在下でペプチド-MHC I活性化についてスクリーニングする。次いで、キメラCD8共受容体の存在下で標的ペプチド-MHC I複合体を会合するポジティブTCR細胞クローンを同定する。

【０２２４】

第二の回において、同定されたポジティブTCR細胞クローンへのCreリコンビナーゼの送達は、組み換えキメラCD8共受容体の欠失及びそれに続く細胞表面からのCD8共受容体の除去を生じる。

【０２２５】

もはやキメラCD8をそれらの細胞表面上で発現しないFACS選別されたポジティブTCR細胞クローンを、ペプチド-MHC I活性化について再びスクリーニングする。次いで、CD8共受容体が存在しない場合に標的ペプチド-MHC I複合体を会合するポジティブTCR細胞クローンを、高親和性結合剤として同定する。

【０２２６】

別の実施態様において、MHC I α3ドメインの残基223～229に１つ又はそれ以上のアミノ酸変異を有する所望のペプチド-MHC I複合体に結合する高親和性TCRを単離する。

【０２２７】

一実施態様において、細胞表面上に組み換えTCRを発現するマウスTCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$ CD3$^+$ TRE-GFP宿主細胞ライブラリーを、MHC I α3ドメインの残基223～229に１つ又はそれ以上のアミノ酸変異を有するペプチド-chiMHC Iタンパク質と接触させる。TCR活性化を、レ

ポーター読み出し、すなわち、GFP産生により評価する。次いでGFP$^+$細胞をFACSにより単離し、そして組み換えTCRの可変領域をPCRにより増幅して配列決定する。

【０２２８】

別の実施態様において、MHC Ｉ α3ドメインの残基223～229において１つ又はそれ以上のアミノ酸変異を有するペプチド-chiMHC Ｉタンパク質は、細胞、例えば抗原提示細胞で発現される。

【０２２９】

ｃ） CD4依存性TCR活性化

一実施態様において、組み換えTCRを発現するTCRα$^-$/β$^-$ CD4$^-$ CD3$^+$ chiCD4$^+$/flox$^+$ TRE-GFP宿主細胞ライブラリーを、直接的又は間接的に蛍光標識された様々なMHCクラスII対立遺伝子の状況において目的のいずれかのT細胞エピトープへの結合についてアッセイする。

【０２３０】

一実施態様において、適切なTCRを保有する細胞を捕捉してFACSにより濃縮し、そしてα及びβ鎖を回収して特徴づけすることができる。

【０２３１】

他の実施態様において、個々のTCRの細胞表面発現によるペプチド-MHC II会合は、活性化マーカー(例えば、CD69又はCD137)の発現、シグナル伝達経路の誘発(例えば、NFATシグナル伝達、IL-2シグナル伝達、アクチベータータンパク質-1シグナル伝達、又はNFκB/Relシグナル伝達)、サイトカインの産生(例えば、IL-2、TNF-α、又はIFN-γ)、カルシウム流動、細胞増殖(例えば、T細胞の増殖)、及びレポーター系の活性化(例えば、IL-2-EGFPレポーター系)により決定され得る。

【０２３２】

別の実施態様において、組み換えTCRを発現するTCRα$^-$/β$^-$CD4$^+$ CD3$^+$ TRE-GFP宿主細胞ライブラリーを、ペプチド-chiMHC IIタンパク質の提示後にTCR活性化についてスクリーニングすることができ、ここでヒトβ鎖 β2ドメインは、変異MHC IIのCD4への結合を減衰させるか又は無効にする１つ又はそれ以上の変異を含む（Rolf Li-Yun KoenigHuang & Ronald N. Germain (1992) Nature 356、796 - 798（参照によりその全体として本明細書に加入される））。

【０２３３】

別の実施態様において、組み換えTCRを発現するTCRα$^-$/β$^-$CD4$^+$ CD3$^+$ TRE-GFP宿主細胞ライブラリーを、細胞の表面上に発現されたペプチド-chiMHCIIの提示後にTCR活性化についてスクリーニングすることができる。

【０２３４】

ｄ） CD4非依存性TCR活性化

別の実施態様において、組み換えTCRを発現するTCRα$^-$/β$^-$CD4$^-$ CD3$^+$ chiCD4/flox$^+$ TRE-GFP宿主細胞ライブラリーを、２回スクリーニングプロトコルにかける。

【０２３５】

最初の回に、TCR細胞ライブラリーを、キメラヒト/マウスCD4の細胞表面発現の存在下でペプチド-MHC II活性化についてスクリーニングする。次いで、キメラCD4共受容体の存在下で標的ペプチド-MHC II複合体を会合するポジティブTCR細胞クローンを同定する。

【０２３６】

第二の回において、同定されたポジティブTCR細胞クローンへのCreリコンビナーゼの送達は、組み換えキメラCD4共受容体の欠失及びそれに続く細胞表面からのCD4共受容体の除去を生じる。

【０２３７】

もはやキメラCD4をそれらの細胞表面上で発現しないFACS選別されたポジティブTCR細胞クローンを、ペプチド-MHC II活性化について再びスクリーニングする。次いで、CD4共受容体が存在しない場合に標的ペプチド-MHC II複合体を会合するポジティブTCR細胞クローンを同定する。

【０２３８】
ｅ）　TCR可変領域のインビトロ進化
定方向タンパク質進化は、特定のペプチド-MHC複合体のためのTCRを生成するために非常に強力なツールである。このプロセスは、TCRの変異体が同族ペプチド-MHC複合体(野生型TCR細胞が特異的である元の抗原)に対して異なる特徴(例えば、増加した親和性及び／又は増強されたシグナル伝達能)を示すようにTCRを操作又は改変することを含む。従って、野生型TCRは、の1つ又はそれ以上のCDRにおいて変異誘発されたライブラリーを製造するためのテンプレートとして使用され得、そして異なる特徴(例えば、より高い親和性及び／又は増強されたシグナル伝達能)を有する変異体が、同族ペプチド-MHC複合体への結合により選択され得る。
【０２３９】
一実施態様において、TCR α／βの可変領域は、シトシン塩基を脱アミノ化してウラシル（これはチミンとして認識される）を生じる酵素である活性化誘導シチジンデアミナーゼ(AID)の存在下で体細胞超変異により変異され得る。インビトロ変異誘発のためにAIDを使用する例となる方法は、例えば米国特許第8,685,897号及び同第8,603,950号（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）に開示される。AID変異誘発のインビボ方法は、例えば米国特許出願第2012/0309011号（これはその全体として本明細書に加入される）に開示される。
【０２４０】
高親和性のいくつかの例としては、約10^{-4}Mと10^{-12} Mその間並びにそれらの中の全ての個々の値及び範囲の、標的リガンドに対する平衡結合定数が挙げられる。この範囲は、野生型親和性(10^{-4}～10^{-6}M)であると報告されるもの間、及び定方向進化により単離されたもの(約10^{-12} M)の親和性を包含する。
【０２４１】
当業者は、標準的変異誘発技術により、本明細書に記載されるアッセイと併せて、変更されたTCR配列を入手し、それらを特定の結合親和性及び／又は特異性について試験することができる。当該分野で公知の有用な変異誘発技術としては、限定することなく、デノボ遺伝子合成、オリゴヌクレオチド指定突然変異、領域特異的変異誘発、リンカースキャニング変異誘発、及びPCRによる部位特異的変異誘発(例えば、Sambrookら(1989)及びAusubelら(1999)を参照のこと)が挙げられる。
【０２４２】
変異TCRコード配列を得る際に、当業者は、TCR由来タンパク質が、特定のアミノ酸置換、負荷、欠失、及び翻訳後修飾により、生物学的活性の損失も減少もなく改変され得るということを認識するだろう。特に、保存的アミノ酸置換、すなわち、１つのアミノ酸の、類似したサイズ、電荷、極性及びコンホメーションの別のアミノ酸での置換が、タンパク質機能を有意に変更するという可能性は低いということは周知である。
【０２４３】
可変領域のいずれかの領域におけるさらなる変異は、安定化タンパク質を生じ得る。一実施態様において、1つ又はそれ以上のさらなる変異は、TCR α鎖又はβ鎖のCDR1、CDR2、HV4、CDR3、FR2、及びFR3の1つ又はそれ以上にある。変異誘発に使用される領域は定方向進化により決定され得、ここで結晶構造又は分子モデルを、目的のリガンド（例えば、抗原）と相互作用するTCRの領域を生成するために使用される。他の例において、可変領域は、TCRとリガンドとの間の所望の相互作用を操作するためにアミノ酸を付加又は欠失することにより再形成され得る。
【０２４４】
２）　ペプチド－変異MHC複合体の存在下又は存在しない場合の細胞TCRディスプレイライブラリーのスクリーニング
所望の特徴を有するT細胞受容体(TCR)の単離及び同定のための方法が本明細書に開示され、該方法は、内在性TCRを発現しない宿主細胞を、異なる組み換えTCRをコードする発現構築物のライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトし、細胞がそれらの細胞表

面上で異なる組み換えTCRを発現する組み換えTCR細胞ライブラリーを生成すること、目的のペプチドと複合体化したMHC分子の存在下で所望の特徴についてTCRを発現する細胞を選択すること、［ここでMHC分子は、野生型MHC鎖の変異体であるMHC鎖を含み、そしてここで変異MHC鎖は、共受容体に対する野生型MHC鎖の親和性と比較して減少した親和性で共受容体に結合する］、並びに所望の特徴を有する組み換えTCRをコードする発現構築物を単離及び同定することを含む。

【０２４５】

所望の特徴の例としては、限定されないが、所望のペプチド－変異MHC複合体に対する高い選択性、所望のペプチド－変異MHC複合体に対する高い親和性、及び所望のペプチド－変異MHC複合体の存在下でのポジティブな機能的読み出しの提示が挙げられる。

【０２４６】

ａ）　ペプチド-変異MHC Ｉ複合体によるTCR活性化

一実施態様において、内在性TCRを発現しない宿主細胞を、異なる組み換えTCRをコードする発現構築物のライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトし、細胞がそれらの細胞表面上で異なる組み換えTCRを発現する組み換えTCR細胞ライブラリーを生成すること、所望のペプチド-変異MHC Ｉ複合体の存在下で所望の特徴について細胞ライブラリー内の細胞を選択すること、［ここでMHC Ｉ分子は、野生型MHC Ｉ α鎖の変異体であるMHC Ｉ α鎖を含み、そしてここで変異MHC Ｉ α鎖は、CD8共受容体に対する野生型MHC Ｉ α鎖の親和性と比較して減少した親和性でCD8共受容体に結合する］、並びに所望の特徴を有する組み換えTCRをコードする発現構築物を単離及び同定することを含む方法により、所望の特徴を有するT細胞受容体(TCR)が単離及び同定される。

【０２４７】

所望の特徴の例としては、限定されないが、所望のペプチド－変異MHC複合体に対する高い選択性又は高い親和性を有するT細胞受容体(TCR)が挙げられる。

【０２４８】

一実施態様において、組み換えTCRは、所望のペプチド-変異MHC Ｉ複合体の存在下で、TCR活性化の機能的読み出し、例えば1つ又はそれ以上のレポーター系の活性化を測定することにより選択される。

【０２４９】

一実施態様において、所望のペプチド-MHC Ｉ複合体は、セルフリーペプチド-MHC Ｉ複合体である。一実施態様において、所望のペプチド-MHC Ｉ複合体は、二量体、四量体、又は多量体を含む。一実施態様において、所望のペプチド-MHC Ｉ複合体は、細胞、例えば、哺乳動物細胞、酵母細胞、又は昆虫細胞の表面上に発現される。一実施態様において、哺乳動物細胞はT2細胞である。

【０２５０】

一実施態様において、変異MHC Ｉ α鎖は、HLA-A2 α鎖の変異体である。一実施態様において、変異MHC Ｉ分子は、MHC Ｉ α鎖のα 3領域内に1つ又はそれ以上の変異を含み、これはCD8共受容体に対する結合を減衰するか又は妨げる。例えば、変異MHC Ｉ分子は、成熟タンパク質配列に従って番号付けして、A245V変異又はD227K/T228A変異を有し得る。

【０２５１】

α3領域変異の例は、例えば、Pittet et al. J Immunol. 2003 171(4):1844-9 ; Dutoit et al. J Immunol. 2003 170(10):5110-7及び米国特許公開第2004/0146520号（これらは参照によりそれら全体として本明細書に加入される）に記載される。

【０２５２】

一実施態様において、所望のペプチド-変異MHC Ｉ複合体は、セルフリーペプチド-変異MHC Ｉ複合体である。一実施態様において、所望のペプチド-変異MHC Ｉ複合体は、二量体、四量体、又は多量体を含む。一実施態様において、所望のペプチド-変異MHC Ｉ複合体は、細胞、例えば、哺乳動物細胞、酵母細胞、又は昆虫細胞の表面上で発現される。

【０２５３】

ｂ）　ペプチド-変異MHC II複合体によるTCR活性化

一実施態様において、内在性TCRを発現しない宿主細胞を、異なる組み換えTCRをコードする発現構築物のライブラリーを用いて形質導入又はトランスフェクトし、細胞がそれらの細胞表面上で異なる組み換えTCRを発現する組み換えTCR細胞ライブラリーを生成すること、所望のペプチド-変異MHC II複合体の存在下で所望の特徴について細胞ライブラリー内の細胞を選択すること、［ここでMHC II分子は、野生型MHC II β鎖の変異体であるMHC II β鎖を含み、そしてここで変異MHC II β鎖は、CD4共受容体に対する野生型MHC IIのβ鎖の親和性と比較して減少した親和性でCD4共受容体に結合する］、並びに所望の特徴を有する組み換えTCRをコードする発現構築物を単離及び同定することを含む方法により、所望の特徴を有するT細胞受容体(TCR)が単離及び同定される。

【０２５４】

一実施態様において、変異MHCクラスII β-鎖は、変異MHC IIのCD4に対する結合を減衰するか又は無効にするβ２ドメインにおける１つ又は変異を含む(Rolf Li-Yun KoenigHuang & Ronald N. Germain (1992) Nature 356、796 - 798（これはその全体として本明細書に加入される）)。

【０２５５】

所望の特徴の例としては、限定されないが、所望のペプチド-変異MHC II複合体に対して高い選択性又は高い親和性を有するT細胞受容体(TCR)が挙げられる。

【０２５６】

一実施態様において、組み換えTCRは、所望のペプチド-変異MHC II複合体の存在下で、TCR活性化の機能的読み出し、例えば１つ又はそれ以上のレポーター系の活性化を測定することにより選択される。

【０２５７】

一実施態様において、所望のペプチド-変異MHC II複合体は、セルフリーペプチド-MHC II複合体である。一実施態様において、所望のペプチド-変異MHC II複合体は、二量体、四量体、又は多量体を含む。一実施態様において、所望のペプチド-変異MHC II複合体は、細胞、例えば、哺乳動物細胞、酵母細胞、又は昆虫細胞の表面上に発現される。一実施態様において、哺乳動物細胞は抗原提示細胞(APC)である。

【実施例】

【０２５８】

V. 実施例

実施例は、説明の目的のため、及び本発明の特定の実施態様を記載するために以下に示された。しかし、特許請求の範囲は、本明細書に示される実施例によりいかなるようにも限定されるべきではない。開示される実施態様に対する様々な変化及び改変は、当業者に明らかであり、そして限定することなく、本発明のパッケージングベクター、細胞株及び／又は方法に関連するものを含むこのような変化及び改変は、本発明の精神及び添付の特許請求の範囲から逸脱することなくなされ得る。

【０２５９】

本発明の実施は、別の指示がなければ、当該分野の技術内の従来の分子生物学及び免疫学的技術を使用する。このような技術は当業者に周知であり、そして文献において十分に説明されている。例えば、Bailey、J. E. and Ollis、D. F.、Biochemical Engineering Fundamentals、McGraw-Hill Book Company、NY、1986; Current Protocols in Immunology、John Wiley & Sons、Inc.、NY、N.Y. (1991-2015)（全ての補遺を含む）; Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、Inc.、NY、N.Y. (1987-2015)（全ての補遺を含む）; Sambrook、et al.、Molecular Cloning：A Laboratory Manual、2nd Edition、Cold Spring Harbor、N.Y. (1989);及びHarlow and Lane、Antibodies、a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor、N.Y. (1989)、（これらの内容は全て、参照によりそれら全体として本明細書に加入される）を参照のこと。

【０２６０】

実施例1：TCRディスプレイに適したマウスT細胞株の生成

TCRディスプレイのためのT細胞株を開発するために、マウス胸腺腫由来TCRネガティブ

マウスCD8ポジティブ細胞株(「MTCD8」)を出発点として使用した。MTCD8細胞を、2%ウシ胎児血清(FCS、Amimed)及び0.1% β-メルカプトエタノールを追加したSF-IMDM培地(Amimed)中で三角フラスコ(Multitron Standardインキュベーター、INFORS HTで80 rpm)又はフィルターキャップ細胞培養フラスコ(Cellstar)において37℃にて10% CO_2下で培養した。

【０２６１】

細胞株MTCD8を、哺乳動物TCRディスプレイのためのレシピエント細胞株を生成するために以下に記載されるように改変した。

【０２６２】

１）　ヒト-マウスキメラCD8を発現するMTCD8由来細胞株の生成

MTCD8細胞におけるヒトTCRの発現を促進するために、CD8 α及びβ鎖を、マウスCD8膜貫通及び細胞内領域に融合されたヒトCD8細胞外領域を含むキメラタンパク質としてMTCD8において発現させた。得られたキメラCD8α(chiCD8α)及びCD8β (chiCD8β)は、それぞれ配列番号１及び２のアミノ酸配列を含む。

【０２６３】

手短には、chiCD8α及びchiCD8β遺伝子をそれぞれ、複製不全レトロウイルス粒子に別々にパッケージングした。HEK 293細胞(ATCC)を、３つの異なるベクターで同時トランスフェクトした： gag-pol遺伝子をコードするpVPackベクター(pVPackベクター系、Stratagene)、PVC 211 env遺伝子をコードする第二のベクター、及びキメラCD8α又はCD8βをコードするレトロウイルスベクター。FuGENE 6トランスフェクション試薬(Roche Applied Science)を使用して製造者の指示に従ってトランスフェクションを行った。得られたレトロウイルス上清を、２又は３日後に回収し、MTCD8細胞を形質導入するためにそのまま使用した。

【０２６４】

キメラCD8α及びCD8βを発現するMTCD8細胞(MTCD8 chiCD8α β+)を、抗ヒトCD8α FITC (eBioscience、カタログ番号：11-0086)及び抗ヒトCD8β APC (BD Biosciences、カタログ番号：641058)を使用して蛍光活性化細胞選別(FACS)により濃縮した。BD FACSAria I又はIIを使用してFACSDivaソフトウェア(Becton-Dickinson)を用いてFACSを行った。各回のFACS濃縮を、較正した量のFITC-又はAPC-標識抗体を1.0 × 10^6細胞あたりに30分間4℃で使用して行った。Fc受容体遮断薬(BD Biosciences、カタログ番号：553142)を使用して、検出抗体のFc領域のMTCD8細胞への結合バックグラウンド結合を除去した。キメラCD8を発現しなかったMTCD8細胞を使用して、非特異的結合剤を検出した。標識反応間の洗浄は全て、細胞を5分間300gで4℃にて2% FCSを含むPBS(PAA)中で遠心分離することにより行った。適切な回数のバルク濃縮後に、MTCD8 chiCD8α β+細胞の集団はフローサイトメトリーにより検出可能になった。

【０２６５】

２）　MTCD8細胞又は派生物からのマウスCD8の欠乏

MTCD8細胞又は上で生成されたキメラCD8を発現するMTCD8細胞を、蛍光活性化細胞選別(FACS)により分別し、マウスCD8α又はCD8βを発現しなかった細胞を濃縮した。以下の抗体を使用した：抗マウスCD8α APC (BD Biosciences、カタログ番号：561093)、抗マウスCD8β PE (BD Biosciences、カタログ番号：550798)、抗ヒトCD8α PE (eBioscience、カタログ番号：12-0086)、及び抗ヒトCD8β APC (BD Biosciences、カタログ番号：641058)。FACSを、FACSAria I又はIIを使用してFACSDivaソフトウェア(Becton-Dickinson)を用いて行った。各回のFACS濃縮を、較正した量のPE-又はAPC-標識抗体を1.0 × 10^6細胞あたり30分間4℃で使用して行った。Fc受容体遮断薬(BD Biosciences、カタログ番号：553142)を使用して、検出抗体のFc領域のMTCD8細胞又は派生物へのバックグラウンド結合を除去した。標識反応の間の全ての洗浄は、細胞を5分間300 gで4℃にて2% FCSを含むPBS(PAA)中で遠心分離することにより行った。

【０２６６】

適切な回数のバルク濃縮後に、マウスCD8を発現しなかったMTCD8細胞の集団は、フローサイトメトリーにより検出可能になり(MTCD8 mCD8α β- chiCD8α β-及びMTCD8 mCD8α β

- chiCD8αβ+)、そして単一T細胞を96ウェルプレートで選別した。これらの単一T細胞を、約１週間でT細胞クローンに増殖させ、そしてこれらのクローンの細胞は、それらの表面でもはやマウスCD8を発現しなかった。

【０２６７】

続いて、これらの単細胞クローンをフローサイトメトリーにより分析して、マウスCD8α及びCD8βの表面発現、並びに適用可能な場合は、キメラCD8α及びCD8βのポジティブ表面発現がないことを確認した。フローサイトメトリー分析を、96ウェルプレート(Cellstar)でBD FACSCaliburにて行った。全てのフローサイトメーターデータを、FlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して分析した。

【０２６８】

３）　形質導入効率、APCバックグラウンド、及びシグナル伝達能に基づくクローンの選択

この実施例において、以下の特徴を満たした(i) MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+ 及び(ii) MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ-の適切なクローンを選択した：(i)高い形質導入効率、(ii)低いAPCバックグラウンド、及び(iii)強いTCR媒介シグナル伝達能。

【０２６９】

手短には、MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+細胞及びMTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ-細胞をレプリカプレーティングし、そして形質導入してキメラTCR C58 (MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+ chiC58αβ+及びMTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ- chiC58αβ+)のα及びβ鎖を発現させた。米国特許第8,367,804号(参照によりその全体として本明細書に加入される)においてc58c61と呼ばれるC58は、HLA-A*0201の状況においてNY-ESO-1由来のペプチドに対してTCR特異的である。C58は、マウスCD3との正確な会合及び相互作用並びにマウスシグナル伝達経路の正確な誘発を確実にするために、ヒト可変領域がマウス非可変領域に融合されたキメラTCRとして発現された。キメラC58のα及びβ鎖は、それぞれ配列番号7及び8のアミノ酸配列を含む。形質導入された細胞を、較正された量の抗マウスTCR PE (BD Biosciences、カタログ番号：553172)を1.0 × 10^6細胞あたりに30分間4℃にて使用して染色した。Fc受容体遮断薬(BD Biosciences、カタログ番号：553142)を使用して、MTCD8細胞派生物に対する検出抗体のFc領域のバックグラウンド結合を除去した。非特異的結合剤を検出するために、TCRネガティブMTCD8細胞を使用した。洗浄は全て、細胞を5分間300 gで4℃にて2% FCSを含むPBS(PAA)中で遠心分離することにより行った。フローサイトメトリーを、FACSCalibur (Becton Dickinson)を使用して行い、そしてデータをFlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して分析した。大部分のクローンは、形質導入後にTCR発現について0～30%陽性を示した。高い形質導入効率(TCR発現について20～30%陽性)及び低いAPCバックグラウンド染色を有するクローンを選択した(データは示していない)。

【０２７０】

上で生成されたMTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+ chiC58αβ+及びMTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ- chiC58αβ+細胞を、活性化し、そしてIL-2発現について試験して、強いTCR媒介シグナル伝達能を有するクローンを同定した。手短には、細胞を、プレート結合抗CD3抗体(eBioscience、カタログ番号:16-0032)及び可溶性抗CD28抗体(eBioscience、カタログ番号：16-0281)を用いて活性化した。上清を回収し、そしてマウスIL-2 ELISAキット(eBioscience、カタログ番号：88-7024)を使用してIL-2発現について試験した。図1は、１つの試験からの個々のクローンの例となるIL-2産生データを示す。強いIL-2産生を示したクローンのみを選択した。

【０２７１】

選択されたMTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+クローンをAK-D10と命名し、そして選択されたMTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ-クローンをLOT-D08と命名した。

【０２７２】

４）　AK-D10細胞におけるキメラDMF4及びDMF5の発現

次に、キメラDMF4及びDMF5（これらは両方ともHLA-A*0201の状況においてMART-1反応性TCRである）を、上で生成されたAK-D10細胞(MTCD8 mCD8αβ- chiCD8αβ+)において発現

させた。DMF4及びDMF5 TCRは両方とも、米国特許第8,088,379号(参照によりその全体として本明細書に加入される）に記載される。マウスCD3との適切な相互作用及びマウスシグナル伝達経路の適切な誘発を確実にするために、DMF4及びDMF5の両方を、ヒト可変領域がマウス非可変領域に融合されているキメラTCRとして発現させた。キメラDMF4のα及びβ鎖は、それぞれ配列番号9及び10のアミノ酸配列を含む。キメラDMF5のα鎖及びβ鎖は、それぞれ配列番号11及び12のアミノ酸配列を含む。キメラDMF4又はDMF5 TCR α及びβ鎖遺伝子を、それぞれ別々に複製不全レトロウイルス粒子にパッケージングした。HEK 293細胞(ATCC)を、３つの異なるベクターと同時トランスフェクトした：gag-pol遺伝子をコードするpVPackベクター(pVPackベクター系、Stratagene)、PVC 211 env遺伝子をコードする第二のベクター、及びキメラTCR α又はβ鎖をコードするレトロウイルスベクター。トランスフェクションを、FuGENE 6トランスフェクション試薬(Roche Applied Science)を使用して製造者の指示に従って行った。得られたレトロウイルス上清を3日後に回収し、そしてAK-D10細胞を形質導入するためにそのまま使用した。

【０２７３】

キメラDMF4又はDMF5を発現するAK-D10細胞(AK-D10 chiTCRαβ+)を、HLA-A*0201 Mart-1 (ELAGIGILTV) (配列番号30)四量体PE (MBL、カタログ番号：T01008)及びハムスター抗マウスTCR β鎖抗体APC (BD Biosciences、カタログ番号：553174)を使用して、FACSDivaソフトウェア(Becton-Dickinson)とともにBD FACSAria I又はIIを使用する蛍光活性化細胞選別(FACS)により濃縮した、各回のFACS濃縮を、較正した量のPE標識抗原又はAPC標識抗体を1.0 × 10^6細胞あたり30分間4℃で使用して行った。Fc受容体遮断薬(BD Biosciences、カタログ番号：553142)を使用して、検出抗体のFc領域のAK-D10細胞へのバックグラウンド結合を除去した。TCRネガティブAK-D10細胞を使用して、非特異的結合剤を検出した。標識反応間の全ての洗浄は、細胞を5分間300 gで4℃にて2% FCSを含むPBS(PAA)中で遠心分離することにより行った。

【０２７４】

適切な回数のバルク濃縮工程の後に、キメラDMF4又はDMF5を発現するAK-D10細胞は、フローサイトメトリーにより検出可能になった。図2Aは、PE標識HLA-A*0201 Mart-1 (ELAGIGILTV (配列番号30))四量体及びAPC標識抗TCR β鎖抗体の共染色を示す。DMF5がDMF4よりも高い親和性を有するという事実と一致して、同様のTCR発現レベル下で、キメラDMF5を発現する細胞は、キメラDMF4を発現する細胞よりも、ペプチド-MHC四量体への強い結合を示した。

【０２７５】

５） TCR/ペプチド-MH相互作用とTCR媒介シグナル伝達強度との相関

この実施例において、上で生成されたキメラDMF4又はDMF5を発現するAK-D10細胞を、ペプチド-MHC複合体を使用して活性化し、次いでIL-2産生について試験した。DimerX (BD Biosciences、カタログ番号：551263)は、マウスIgG_1のVH領域に融合された３つの細胞外主要組織適合複合体(MHC)クラスI HLA-A2ドメインからなるHLA-A2:Ig融合タンパク質である。DimerXは、HLA-A2に制限されたいずれかのペプチドとともに負荷され得る。ペプチド負荷を、DimerX及び目的のペプチドを終夜37℃でインキュベートすることにより行った。

【０２７６】

表面上でDMF4又はDMF5を発現するキメラAK-D10細胞を、Mart-1ペプチドELAGIGILTV (配列番号30)を負荷したDimerXを異なる濃度で(2 μg/ml、1 μg/ml、及び0.5 μg/ml)使用して活性化した。手短には、96ウェルプレートを、DimerX/ペプチド複合体でコーティングし、そして3時間37℃でインキュベートし、続いてPBSで洗浄した。その後、キメラDMF4又はDMF5を発現する1 x 10^5 AK-D10細胞を、SF-IMDM 150 μlに再懸濁し、そして96ウェルプレートに加えた。終夜インキュベートした後、マウスIL-2 ELISAキット(eBioscience、カタログ番号：88-7024)を使用して上清をIL-2発現について試験した。DimerX/ペプチド複合体は、キメラDMF4(図2B)又はキメラDMF5(図2C)を発現するAK-D10細胞において用量依存性IL-2産生を誘導した。いずれのペプチドも用いないDimerX単独をネガティブ対照として使用した。

【０２７７】

キメラDMF4、DMF5、又はC58を発現するAK-D10細胞を、上記のアッセイと同様のアッセイにおいてDimerX/ペプチド複合体を使用して活性化し、そして細胞内サイトカイン染色(ICS)を使用してIL-2及びTNFα産生について試験した。手短には、染色の5時間前に、細胞をモネンシン(eBioscience、カタログ番号：00-4505)で処理した。次いで、細胞を固定化し、そして細胞内染色のためにCytofix-Cytoperm (BD Biosciences、カタログ番号：554714)を用いて製造者の指示に従って透過処理した。フローサイトメトリー染色を、較正した量の抗マウスIL-2 PE (eBioscience、カタログ番号：12-7021)又は抗マウスTNFα PE (eBioscience、カタログ番号：12-7321)を1.0 × 10^6細胞あたりに30分間4℃で使用して行った。Fc受容体遮断薬(BD Biosciences、カタログ番号：553142)を使用して、検出抗体のFc領域のAK-D10細胞へのバックグラウンド結合を除去した。DimerX/ペプチド活性化をせずにキメラTCRを発現するAK-D10細胞をネガティブ対照として使用した。標識反応の間の全ての洗浄は、細胞を5分間300 gで4℃にて2% FCSを含むPBS(PAA)中で遠心分離することにより行われた。次いで細胞をフローサイトメトリー分析にかけた。TCRポジティブ細胞をゲーティングし、TCR+ IL-2+及びTCR+ TNFα+細胞のパーセンテージを、FlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して決定した。ELISAにより検出されたIL-2産生と一致して、キメラTCRを発現する細胞は、DimerX/ペプチド複合体を使用した活性化の後にポジティブなIL-2(図2D)及びTNFα(図2E)細胞内染色を示した。

【０２７８】

実施例2：細胞TCRディスプレイライブラリーの生成

本実施例に記載されるスクリーニング系は、哺乳動物細胞、例えば、MTCD8細胞又はその派生物における全長TCRのレトロウイルス媒介発現に基づく。TCR α及びβ鎖ライブラリーは、連続形質導入により別々のベクターから発現される。レトロウイルス形質導入は、哺乳動物細胞の安定な遺伝子改変のための有効な方法である。細胞あたりの形質導入されたα又はβ鎖の数は、各細胞が平均で、例えば、１つのα及び／又はβ鎖のみ、１つのα鎖及び複数のβ鎖、１つのβ鎖及び複数のα鎖、又は複数のα鎖及びβ鎖を産生するように、ウイルス力価の感染多重度(MOI)を改変することにより制御され得る。配列内リボソーム進入部位(IRES)を介して目的の遺伝子(TCR α又はβ鎖)の発現をレポーター遺伝子と転写的にカップリングするTCR α又はβ鎖のための別々のレトロウイルス発現ベクターが生成される。例となるレポーター遺伝子としては、限定されないが、ヒトCD6及びCD7のような表面タンパク質、並びにピューロマイシン抵抗性遺伝子のような抗生物質抵抗性遺伝子が挙げられる。

【０２７９】

１）　高い多様性のヒトTCR遺伝子ライブラリーの生成

MACS (Miltenyi Biotec)又は同様の方法によりヒトドナー由来の白血球除去物質から分離された$CD4^+$又は$CD8^+$ T細胞を使用して、TCR α又はβ遺伝子ライブラリーを生成した。細胞の供給源は、健常成人ドナー及び臍帯血を含んでいた。さらなる供給源としては、胎仔胸腺、癌患者から単離された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、及びワクチン接種された患者由来のPBMCが挙げられ得る。

【０２８０】

総mRNAを、単離されたT細胞から調製し、そしてcDNAをSMARTer（Ｒ）RACE 5’/3’ cDNA合成キット(Clontech Laboratories、カタログ番号：634860)を使用して合成した。ライブラリー構築を、少なくとも1.0 × 10^9コロニー形成単位の所望の高い複雑性を達成するために、α鎖又はβ鎖ファミリーごとに別々に行った。TCR α又はβファミリーの可変領域を、ファミリー特異的プライマーを用いてPCR増幅し、制限酵素を用いて消化し、そしてTCR α又はβレトロウイルス発現ベクターに連結した。空のレトロウイルスTCR α及びβ鎖発現構築物は、ヒト又は合成起源のクローン化された可変TCRα及びβ鎖コード領域で置き換えることができる非可変領域の上流に、α又はβ鎖非可変領域のいずれか及び制限酵素に隣接した非コードスタッファー配列についてのコード情報を含有していた。マウス宿主細胞がヒトTCRを提示するために使用された場合には、マウスCD3の適切な会合及び

相互作用並びにマウスシグナル伝達経路の適切な誘発を確実にするために、マウスTCR非可変領域に融合されたヒトTCR可変領域を含むようにTCR発現ベクターを構築した。選択されたTCRからの単一のTCR α及びβコード領域をクローン化して、細胞表面上の特定の組み換えTCRを発現する細胞を生成した。さらに、この方法は、TCR α及びβ鎖特異的プライマーを使用してヒトT細胞源からRT-PCRにより単離されたか、又は遺伝子合成により生成されたTCR α及びβ鎖の多様なレパートリーを提示する細胞を生成した。

【０２８１】

E.coli DH10Bを、連結したTCR α又はβ鎖ライブラリーを用いて形質転換し、そしてLB(Amp)寒天プレートにプレーティングした。細菌コロニーを採取し、そしてプラスミドDNAを精製した。全てのTCR α又はβファミリーのDNA調製物をプールした。得られたTCR α又はβ鎖ライブラリーは、次世代配列決定(NGS)を行うことにより品質制御された。NGS分析において、精製されたPCR産物1～3 μgを、IlluminaからのMiSeqを使用する配列決定反応のために多重化された実行で使用した。得られた配列データを、完全TRAV-、TRAJ-、TRBV-、TRBD-、及びTRBJ-読み出しのためにフィルタリングし、そしてクラスター解析を、アプリケーションのCD-HITセット(www.cd-hit.org)を使用して行った。配列決定された遺伝子全体のパーセンテージとしてのTCR α又はβファミリーの相対的表現を分析した。

【０２８２】

２） 高い多様性のヒトTCR細胞ライブラリーの生成

マウス胸腺腫由来TCRネガティブ細胞株MTCD8及びその派生物(例えば、上で生成されたLOT-D08及びAK-D10細胞)を、エコトロピックなMLV-被覆レトロウイルス粒子を用いた形質導入のために高い寛容性に一部基いて、ヒトTCR細胞ライブラリーのための宿主細胞として選択した。MTCD8細胞は、内在性マウスTCR発現を欠損しており、そしてヒトTCRの発現、対合、折り畳み、シグナル伝達、及び表面ディスプレイのために必要な全ての細胞成分を含有する。さらに、これらの細胞は、懸濁液で増殖し、そして約10～12時間という非常に短い倍加時間有し、従って迅速な増殖を可能にする。

【０２８３】

２つの段階でのTCR細胞ライブラリーの生成が以下の実施例において説明される：TCR β鎖は段階１で導入され、そしてTCR α鎖は段階２で導入された。

【０２８４】

３） レトロウイルス粒子製造

TCR α及びβ鎖遺伝子ライブラリーを、それぞれ別々に複製不全レトロウイルス粒子にパッケージングした。HEK 293細胞(ATCC)を、３つの異なるベクターを用いて同時トランスフェクトした：gag-pol遺伝子をコードするpVPackベクター(pVPackベクター系、Stratagene)、PVC 211 env遺伝子をコードするベクター、及びレトロウイルスTCRα-IRES-ヒトCD7又はTCRβ-IRES-ヒトCD6発現ベクター。トランスフェクションを、FuGENE 6トランスフェクション試薬(Roche Applied Science)を使用して製造者の指示に従って行った。得られたレトロウイルス上清を３日後に回収し、そしてそのまま使用するか、又は-80℃で凍結して維持した。TCR α又はβ鎖のいずれかのレトロウイルス粒子ストックのレトロウイルス粒子力価を、MTCD8細胞の試験形質導入を行い、そしてMTCD8細胞の形質導入された集団上のヒトCD7又はヒトCD6表面発現を測定することにより、実験的に決定した。力価結果に基いて、形質導入された細胞あたりのTCR α及びβ鎖の所望の平均コピー数を生じた希釈を計算した。おおまかに、5%又はそれ以下の形質導入率は、α又はβ鎖のいずれかの＞90%単一コピー組み込みを生じる。続いて、MTCD8細胞又は派生物を、レトロウイルス上清を用いて３時間３０℃でスピン形質導入した。TCR α及びβ鎖遺伝子ライブラリーを別々に連続して形質導入した。形質導入を、6ウェルプレート(Cellstar)でプレートあたり1.5×10^8細胞を用いてEppendorf遠心機で行った。形質導入後に、細胞を1 mlあたり3.0×10^6細胞の細胞濃度で三角フラスコに移し、そして２４時間増殖させた。

【０２８５】

４） TCR β鎖の形質導入(段階1)

この実施例において：a) 生殖系列に対して100%相同であり、かつb)ヒト末梢血におけ

るそれらの通常分布に対応する比で全ての既知の機能的β遺伝子ファミリーを表すTCR β鎖を臍帯血源から選択した(3 x 10^8までの異なるβ鎖）。TCRβ-IRES-ヒトCD6レトロウイルス発現ベクターを、複製不全レトロウイルス粒子にパッケージングし、次いでこれらを使用して、MTCD8細胞又は派生物を形質導入した。成功したβ鎖遺伝子移行及びその後の発現は、細胞表面上のヒトCD6の存在により証拠付けられた。形質導入後、細胞の約6%はヒトCD6を発現し、成功した組み込み及び単一β鎖遺伝子の発現を示した。TCR β鎖を発現する細胞を、蛍光活性化細胞選別(FACS)を使用してCD6ポジティブ細胞を濃縮することにより単離した。選別後に、TCR β鎖を発現する細胞を回収し、そして２日間増殖させた。増殖したTCR β鎖細胞ライブラリーを使用準備のできた（ready-to-use）アリコートで凍結した。CD6以外の選択マーカーも使用することができる。

【０２８６】

５） TCR α鎖の形質導入(段階2)

TCR α鎖遺伝子ライブラリーを、段階2で導入した。TCR β鎖構築物と同様に、TCR α遺伝子を配列内リボソーム進入部位(IRES)連結ヒトCD7マーカー遺伝子と同時発現させた。ヒトCD7マーカーは、形質導入された細胞の5%未満がTCR α鎖を発現するように、空のMTCD8細胞で生成されたレトロウイルス粒子含有上清の滴定を可能にする。これらの条件下で、細胞の約90%は単一の組み込まれたTCR α遺伝子コピーを含有する。

【０２８７】

TCR α鎖ライブラリーの形質導入後に、細胞をTCR発現について抗マウスTCRβ-PE抗体(BD Biosciences、カタログ番号：553172)を使用して染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析した。次いでTCRを発現する細胞を磁気活性化細胞選別(MACS)により抗ビオチンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec、カタログ番号：130-090-485)を使用して単離した。約3.0～5.0 x 10^9の生存細胞を、各TCR α鎖形質導入からFACS又はMACS後に回収した。これらの細胞の85%より多くは表面TCRを発現した。次いで細胞を回収して２日間増殖させた。

【０２８８】

６） 細胞ライブラリーの品質管理

最後に、増殖段階の終わりに、全ての細胞をプールし、そして-80℃でクライオバッグにて凍結し、各バッグは約1.0×10^9生存細胞を含んでいた。

【０２８９】

細胞あたり組み込まれた１つのTCR α又は１つのTCR β遺伝子コピーを有する細胞のパーセンテージを、組み込まれたTCR α又はβ遺伝子及びその隣接するベクター領域を、形質導入あたり１０の単一細胞クローンからゲノムDNAから増幅することにより増幅し、そしてPCR産物を直接配列決定することにより分析した。PCR産物が１つの単一の明確に読み取り可能なTCR α又はβ遺伝子配列を生じた場合、１つの遺伝子コピーのみが元の細胞中に存在すると結論付けられた。少なくとも２つの異なるTCR α又はβ遺伝子配列のオーバーラップが共増幅された共通のベクター領域の後に現れた場合、少なくとも２つのTCR α又はTCR βコピーがその細胞中に存在すると結論付けられた。この分析から、宿主細胞中に組み込まれた１つのTCR α及び１つのTCR β遺伝子コピーのみを含有するTCR細胞ライブラリー中の細胞のパーセンテージを決定することが可能であった。

【０２９０】

７） 高い多様性のマウスTCR遺伝子ライブラリーの生成

あるいは、TCR α及びβ遺伝子ライブラリーは、動物(例えば、目的の標的で免疫されたHLA-A2トランスジェニックマウス)から単離されたTCRに基いて生成され得る。マウスTCR遺伝子ライブラリーは、ヒトTCR遺伝子ライブラリーについて上で記載されたように同様にして構築され得る。続いて、同様のプロコトルに従って、マウスTCRを細胞表面上に内因的に提示しない細胞を含有する
細胞ライブラリーを生成し得る。

【０２９１】

実施例3：ペプチド-MHC複合体を使用したTCR細胞ライブラリーのスクリーニング

１）　スクリーニングプロトコル

組み換えペプチド-MHC複合体を、購入するか又は合成し、そして使用前に機能について品質チェックした。上で生成されたTCR細胞ライブラリーを、標識された(例えば、蛍光標識)ペプチド-MHC複合体(例えば、MHC四量体、MHCデキストラマー、又はペプチドを負荷したDimerX)を使用して蛍光活性化細胞選別(FACS)によりBD FACSAria I又はIIをFACSDivaソフトウェア(Becton-Dickinson)とともに使用してスクリーニングした。蛍光標識抗TCR抗体を使用して、TCR発現レベルを可視化した。Fc受容体遮断薬(BD Biosciences、カタログ番号：553142)を使用して、バックグラウンド結合を除去した。TCR細胞ライブラリーを、最初に較正された量の蛍光標識MHC四量体又はDimerX/ペプチド複合体を1.0 × 10^6細胞あたり30分間4℃で使用してスクリーニングした。非特異的結合剤を枯渇させるために、最初のスクリーニングからのポジティブヒットを、較正した量のMHC四量体とともに、ネガティブ対照ペプチド又はペプチドを用いないDimerXを1.0 × 10^6細胞あたり15分間4℃で用いてさらにインキュベートした。ネガティブ対照ペプチド又はペプチドを用いないDimerXを用いてMHC四量体に結合した細胞をゲートアウトした。標識反応間の全ての洗浄を、細胞を10分間300 rpmで4℃にて2% FCSを含むPBS(PAA)中で遠心分離することにより行った。

【０２９２】

適切な回数のバルク濃縮工程後に、明確にかつ特異的に目的の抗原を認識したTCRを発現するMTCD8細胞又は派生物は、フローサイトメトリー分析において見えるようになり、そして単一T細胞を96ウェルプレートに選別した。これらの単一T細胞は、約１週間でT細胞クローンに増殖した。

【０２９３】

続いて、これらの単一細胞クローンを、フローサイトメトリーにより分析して、それらが目的の抗原に結合し、そして非特異的バックグラウンド結合を示さないということを検証した。さらに、これらの単一細胞クローンの表面上で発現されたTCRを、シグナル伝達及び他のペプチド-MHC複合体に対する交差反応性のような他の特性について分析した。

【０２９４】

TCRを発現する細胞を、目的のペプチド-MHC複合体へのそれらの結合に基いてスクリーニングすることに加えて、TCRを発現する細胞はまた、目的のペプチド-MHC複合体の存在下で、機能的読み出し(例えば、活性化マーカーの発現、シグナル伝達経路の誘発、サイトカインの産生、カルシウム流動、細胞増殖、及びレポーターアッセイの活性化)に基いてスクリーニングされ得る。結合スクリーニングからのヒットを機能的スクリーニングからのヒットと比較して、目的のペプチド-MHC複合体に特異的に結合して関連するシグナル伝達経路を開始するTCRを同定することができる。

【０２９５】

部分的に多数の未成熟T細胞の存在のために、臍帯血又は胎仔胸腺からのT細胞から誘導されたTCRライブラリーにおいて自己抗原に特異的なTCRを同定することが可能かもしれない。これらの細胞は、種々の自己抗原に対してTCRを発現し、そして免疫系成熟の部分としてのT細胞寛容チェックポイントにおいてまだ除去されていない。目的のペプチド-MHC複合体への結合、次いでペプチドを用いないか又はネガティブ対照ペプチドを用いるMHC分子に対するカウンタースクリーニングに基づく２段のスクリーニングアプローチを用いて、非多反応性（non-poly-reactive）TCRが濃縮される。

【０２９６】

自己反応性TCRの天然での存在に加えて、第二の機構がTCRライブラリーからの自己反応性TCRの単離の可能性に寄与し得る。上記のように、TCRライブラリーが生成される場合、ヒトドナーからのT細胞に存在する元の同族TCR α及びβ対が分離され、そして各α又はβ鎖は、それぞれ多数の非オリジナル相補性β鎖又はα鎖と再対合される。この方策は、自己抗原に対する異なる親和性又は特異性のような変更された特性を示す可能性のある新規なTCRの発現をもたらす。

【０２９７】

ストリンジェントな抗原特異的スクリーニング方法と組み合わされた高度に多様なTCRライブラリーは、TCR標的化ヒト自己抗原又は自己抗原と高い類似性を共有する抗原の単離及び同定を可能にする。

【０２９８】

２）　TCR α及びβ鎖遺伝子回収

TCR α及びβ遺伝子を、個々のT細胞クローンからプレートベースのPCR増幅により回収した：T細胞を溶解し、そしてTCR α及びβ鎖可変領域についてPCRを別々に細胞溶解物に対して直接、ゲノムDNAの事前の単離なしで行った。次いで、TCR α又はβ鎖のいずれかをコードする増幅されたPCR産物を、IIS型制限酵素を使用する単一の制限／連結工程で、プールとして適切な発現ベクターにクローン化した。並行して、PCR産物を配列決定した：T細胞クローンがα及びβ鎖の単一のコピーを含有していた場合、信頼できる配列情報をこの段階で得ることができた。T細胞クローンが２つ又はそれ以上の組み込まれたTCR α及び／又はβ鎖を含有していた場合、個々の鎖を標準的なベクターにクローン化し、そして別々に配列決定した。得られた連結されたプラスミドプールをE. coliに形質転換し、そしてDNAを形質転換された細胞プール（事前のプレーティングなし）からバルクミニプレップにより回収した。この工程において同定されたTCRを、結合親和性、特異性、シグナル伝達能、及び／又は他の特徴について分析した。

【０２９９】

３）　代替の細胞ライブラリー組成

本明細書に記載されるMTCD8派生物のレトロウイルス形質導入による高い効率のTCR遺伝子移入は、特定の用途にカスタマイズされた様々な異なる種類の細胞ライブラリーの生成を可能にする。

【０３００】

４）　デノボスクリーニングのための多コピーTCR α及び／又はβ鎖ライブラリー

感染多重度を変化させることにより、レシピエントMTCD8細胞又は派生物のゲノムに組み込まれるTCR α及びβ鎖遺伝子の平均数を制御することができる。この方策を以下の変形で使用した。

【０３０１】

最大レベルのTCR多様性を包含する細胞ライブラリーを生成するために、細胞あたり複数の異なるTCR α鎖及び複数の異なるTCR β鎖を発現するライブラリーを構築した。所定の細胞中のTCR α及びβ鎖の全てが生産的に対合するわけではなく、従って多くは表面上に提示されないだろう。なお、細胞あたり多数の選択肢を提供することにより、非常により多くのパーセンテージの形質導入された細胞が少なくとも１つの機能的TCRを発現することが確実にされた。この多コピーライブラリー設計は、２つの利益を提供する：第一に、ライブラリー生成プロセスは、非常により効率的(より少ないドロップアウト)であり、そして第二に、得られたライブラリーにおけるTCR多様性は、単一コピーライブラリーと比較して実質的により高くなり得る。潜在的なさらなる利点は、T細胞表面上で多くの同一なTCRを発現することによる結合活性効果がかなり減少され、これは理論上、より高い親和性TCRの同定をもたらし得る。

【０３０２】

多コピーライブラリーを使用することは、所定のT細胞クローンからどのTCRα鎖がどのβ鎖と対合するかを同定する第二の工程を必要とする。プロセスはα及びβ鎖の回収への例となるアプローチとして確立された：標的特異的結合を示した単一T細胞を選別し、ポジティブT細胞クローンを一緒にプールし、これらのプールされた標的特異的T細胞からの全てのTCR α及びβ鎖を、上記の回収手順を使用して回収し(通常は約100～200のT細胞クローン)、そして第二の細胞ライブラリーを、今やかなりより小さいセットの回収されたTCRα及びβ鎖を単一コピー形式で合わせることにより構築した。次いで、TCRスクリーニングをこのかなりより小さくより集中的な細胞ライブラリーを用いて繰り返し、そして目的のTCRを上記の工程に従って回収した。これら２つの工程は、組み合わせて、最初から単一コピーライブラリーを使用することと比較してかなりより大きなTCR多様性の範囲を

可能にするだろう。

【０３０３】

５）　誘導選択

誘導選択は、所望の特徴を有する既存のTCR(例えば、マウスTCR、ヒト患者から単離されたTCR、又はデノボスクリーニングにおいて単離されたTCR)から開始して、個々の鎖を連続して置き換えるスクリーニングプロセスである。例となる研究において、元のTCR α鎖をTCR βライブラリーと組み合わせてスクリーニングすることにより元のTCR β鎖を置き換えて、次いで選択されたTCR β鎖を、多様TCR αライブラリーと一緒にスクリーニングして、相補的な新しいヒトTCR α鎖を見出した(又は逆もまた同様)。TCR α及びβ鎖遺伝子が別々の発現ライブラリー中にあるという事実と組み合わせたレトロウイルス形質導入プロセスの高い効率は、いずれかのTCR組成物を含む新しいライブラリーの迅速な生成を可能にする。

【０３０４】

実施例4：CD8依存性及び非依存性スクリーニング

CD8は、CD8鎖の対からなる二量体を形成する。CD8の最も一般的な形態は、CD8 α鎖及びCD8 β鎖から構成される。CD8 α鎖の細胞外IgV様領域は、MHCクラスI分子のα3部分と相互作用する。この相互作用は、細胞傷害性T細胞のTCR及び標的細胞のペプチド-MHC複合体を抗原特異的活性化の間、近傍に一緒に結合して維持する。T細胞活性化の特異性は、ペプチド-MHC複合体及びTCRの相互作用に依存する。CD4及びCD8のような共受容体を介した他のシグナル又はCD28及びCD80/CD86のような同時刺激相互作用は、TCRシグナルの大きさ及び／又は持続期間を増加させる増幅器として作用し、そして独立して作用しないようである。異なるTCRは、結合及びシグナル伝達についてCD8に対する異なるレベルの依存性を示し得る。一般的に言えば、CD8非依存性であるTCRは、ペプチド-MHC複合体に対してより高い親和性を有する傾向がある。既存のTCRの親和性を増強することにより、このTCRにより媒介されるT細胞活性化をCD8依存性からCD8非依存性に変化させることが可能かもしれない。さらに、CD8非依存性は、治療剤として可溶性TCRを開発するために望ましい特徴である。従って、ライブラリースクリーニング及びクローン特徴づけの間にディスプレイライブラリー／細胞クローンでのCD8の発現を調節するか又は無効にすることにより、TCR又はTCRのライブラリーのCD依存性のレベルを調べることができることは大いに興味が持たれる。これは、結合強度及び特異性、並びにTCRとMHC-ペプチド複合体との間の相互作用により生じた細胞内シグナル伝達事象に対するCD8の相対的影響の、同じ細胞又は細胞集団における直接的評価を可能にする。

【０３０５】

このようなスクリーニング系は、Cre/loxP系を使用することにより達成され得る。Creリコンビナーゼは、P1バクテリオファージ由来のチロシンリコンビナーゼ酵素である。この酵素は、トポイソメラーゼI様機構を使用して、２つのDNA認識部位(loxP部位)の間の部位特異的組み換え事象を触媒する。34塩基対(bp) loxP認識部位は、２つの13 bpパリンドローム配列からなり、これは8 bpのスペーサー領域に隣接する。同じ方向に配向した２つのloxP部位間のDNAは、DNAの環状ループとして切除される。

【０３０６】

この実施例において、膜貫通及び細胞質内領域に隣接したloxP部位を含むキメラCD8α及びCD8βをLOT-D08細胞において発現させた。Cre媒介組み換えの際に、キメラCD8α及びCD8βの膜貫通及び細胞質内領域を切除し、そしてその結果として、宿主T細胞は膜結合キメラCD8を発現しない。

【０３０７】

１）　loxPに隣接したキメラCD8を発現するLOT-D08細胞の生成

マウスCD8膜貫通及び細胞質内領域に融合されたヒトCD8細胞外領域を含むキメラCD8α及びCD8βを、マウス膜貫通及び細胞質内領域に隣接した２つのloxP部位を含むようにさらに改変した(chiCD8α^{flox}及びchiCD8β^{flox})。

【０３０８】

chiCD8α^{flox}及びchiCD8β^{flox}遺伝子を、複製不全レトロウイルス粒子にそれぞれ別々にパッケージングした。HEK 293細胞(ATCC)を、３つの異なるベクターで同時トランスフェクトした：gag-pol遺伝子をコードするpVPackベクター(pVPackベクター系、Stratagene)、PVC 211 env遺伝子をコードするベクター、及びchiCD8α^{flox}又はchiCD8β^{flox}をコードするレトロウイルス発現ベクター。トランスフェクションを、FuGENE 6トランスフェクション試薬(Roche Applied Science)を製造者の指示に従って使用して行った。得られたレトロウイルス上清を3日後に回収し、そしてLOT-D08細胞を形質導入するためにそのまま使用した。

【０３０９】

chiCD8α^{flox}及びchiCD8β^{flox}を発現するLOT-D08細胞(LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+)を、抗ヒトCD8α FITC (eBioscience、カタログ番号：11-0086)及び抗ヒトCD8β APC (BD Biosciences、カタログ番号：641058)を使用して蛍光活性化細胞選別(FACS)を使用して濃縮した。BD FACSAria I又はIIをFACSDivaソフトウェア(Becton-Dickinson)とともに使用してFACSを行った。各回のFACS濃縮を、較正した量のFITC-又はAPC-標識抗体を1.0×10^{6}細胞あたりに30分間4℃で使用して行った。Fc受容体遮断薬(BD Biosciences、カタログ番号：553142)を使用して、検出抗体のFc領域のLOT-D08細胞へのバックグラウンド結合を除去した。非特異的結合剤の検出のために、LOT-D08細胞を使用した。標識反応の間の全ての洗浄を、5分間300 gで4℃にて2% FCSを含むPBS(PAA)中で細胞を遠心分離することにより行なった。

【０３１０】

その後、生成されたLOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+細胞を、フローサイトメトリーにより分析して、chiCD8α^{flox}及びchiCD8β^{flox}の表面発現を確認した。フローサイトメトリー分析は、BD FACSAria I又はIIをFACSDivaソフトウェア(Becton-Dickinson)とともに使用して行った。全てのフローサイトメーターデータを、FlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して分析した。

【０３１１】

２）　LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+細胞におけるCreの発現

上で生成されたLOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+細胞を、Creリコンビナーゼをコードする発現ベクターを用いて形質導入した。Creの発現後に、細胞クローンをフローサイトメトリーにより分析して、キメラCD8の表面発現が無いことを確認した。

【０３１２】

Creリコンビナーゼ遺伝子を、複製不全レトロウイルス粒子にパッケージングした。HEK 293細胞(ATCC)を、３つの異なるベクターを用いて同時トランスフェクトした：gag-pol遺伝子をコードするpVPackベクター(pVPackベクター系、Stratagene)、PVC 211 env遺伝子をコードするベクター、及びCre-IRES-ピューロマイシン抵抗性遺伝子をコードするレトロウイルスベクター。トランスフェクションを、FuGENE 6トランスフェクション試薬(Roche Applied Science)を製造者の指示に従って使用して行った。得られたレトロウイルス上清を3日後に回収し、そしてそのまま使用するか、又は-80℃で凍結して維持した。Creレトロウイルス粒子ストックからのレトロウイルス粒子力価を、LOT-D08細胞の試験形質導入を行い、そしてLOT-D08細胞の形質導入された集団のピューロマイシン抵抗性を測定することにより実験的に決定した。Creリコンビナーゼを、1.5 mlエッペンドルフチューブ(Eppendorf)においてチューブあたり5×10^{5}細胞を用いて形質導入した。形質導入後に、細胞を、フィルターキャップ細胞培養フラスコ(Cellstar)に、1mlあたり1×10^{5}細胞の細胞濃度で移し、そして24時間37℃で10% CO_2下で増殖させた後、ピューロマイシンを加えて選択を開始した。

【０３１３】

Creを発現するLOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+細胞(LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ Cre+)を、フローサイトメトリーにより抗ヒトCD8α及び抗ヒトCD8β抗体を使用して分析して、これらの細胞がキメラCD8を細胞表面上で発現しなかったことを確認した。Fc受容体遮断薬(BD Biosciences、カタログ番号：553142)を使用して、検出抗体のFc

領域のMTCD8派生物へのバックグラウンド結合を除去した。標識反応の間の全ての洗浄は、5分間300 gで4℃にて2% FCSを含むPBS(PAA)中で細胞を遠心分離することにより行った。フローサイトメーターデータを、FlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して分析した。図３に示されるように、Creリコンビナーゼの形質導入は、キメラCD8の細胞表面上での発現を効率的に除去した。

【０３１４】

３）　ペプチド-MHC複合体へのTCR結合のCD8依存性

次に、TCR/ペプチド-MHC相互作用に対するCreリコンビナーゼ媒介CD8欠乏の影響を調べた。本実施例において使用したディスプレイ細胞は、EGFPをコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結されたIL-2プロモーター及び３つのNFAT結合部位を含むレポーター構築物で形質導入されたLOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+細胞であった。これらの細胞をBB8細胞と名付けた。レポーター構築物に関するさらなる詳細は実施例5を参照のこと。キメラTCR DMF4又はDMF5を発現するBB8細胞を形質導入して、上記のようにCreリコンビナーゼを発現させた。Cre発現を有するか又はCre発現のない細胞を、0.2 μg/mlのiTAg四量体/PE-HLA-A*02:01 Mart-1 (ELAGIGILTV) (配列番号30) (MBL、カタログ番号：T01008)を使用して染色した。TCR発現を、抗マウスTCRβ抗体(BD Biosciences、カタログ番号：553174)を使用して調べた。表面CD8発現の存在又は存在しないことを、抗ヒトCD8α-PE (eBioscience、カタログ番号：12-0086)を使用して確認した。染色後に、細胞を洗浄し、そしてFACSCalibur (BD Biosciences)を使用して分析した。

【０３１５】

Cre発現は表面TCRレベルに影響を及ぼさなかったが(図4A及び4B)、キメラDMF4のMart-1/HLA-A*0201四量体への結合は、CD8発現をCreリコンビナーゼにより無効にした場合は30%減少した(図4C)。対照的に、高親和性キメラTCR DMF5は、CD8の存在下又は存在しない場合に四量体に対して同様の結合を示した(図4C)。この研究は、loxP-隣接CD8を発現するディスプレイ細胞を使用して、TCRのCD8依存性を調べることができるということを実証する。この研究で使用された四量体は、MHC重鎖α3ドメインにA245V変異を含有し、これはMHCのCD8に対する全体の結合強度を減少させることが示された(例えば、Bodinier et al.、Nat Med. 2000 Jun;6(6):707-10（これは参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと）。CD8に対してより強力な結合を有する野生型四量体は、感受性を増加させてCD8の存在下又は存在しない場合のTCR/四量体結合の間のより小さな差異の検出でも可能にすることができるかもしれない。

【０３１６】

４）　Cre/loxP系を使用するD8依存性及び非依存性スクリーニング

レポーター構築物を用いて又は用いずに、LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+細胞を使用して、上記のように多様なヒトTCR細胞ライブラリーを生成する。より詳細には、以前に生成されたTCR α及びβ鎖遺伝子ライブラリーは、複製不全レトロウイルス粒子にそれぞれ別々にパッケージングされ、そしてLOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+細胞に連続して形質導入される。得られた細胞ライブラリーを品質チェックし、次いで上記の目的のペプチド-MHC複合体を使用してスクリーニングした。

【０３１７】

さらに、CD8非依存性TCRを同定するために、上記のスクリーニングでペプチド-MHC複合体に結合する細胞を、Cre-IRES-ピューロマイシン抵抗性遺伝子構築物を用いて以前に記載されたように形質導入した。Creリコンビナーゼが発現すると、chiCD8α及びchiCD8βの膜貫通及び細胞質内領域は除去され、そしてキメラCD8はもはや細胞表面上に発現されない。

【０３１８】

ピューロマイシン選択後に、TCRを発現するLOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ Cre+細胞を、較正した量目的ののMHC-ペプチド複合体を使用して再びスクリーニングし、続いてTCR α及びβ鎖遺伝子を上述の方法を使用して回収した。

【０３１９】

CD8ポジティブ系とCD8ネガティブ系との間をスクリーニングキャンペーン内で切り替える能力で、ディスプレイ細胞株LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+は、CD8依存性の低から中程度の親和性のTCR、さらにはCD8非依存性高親和性TCRを同定するために容易に使用され得る多用途系を提供する。

【０３２０】

５）　変異MHC分子を使用したCD8依存性及び非依存性スクリーニング

あるいは、構成的にCD8を発現する細胞を使用する場合、CD8依存性及び非依存性スクリーニングは、野生型MHCクラスI分子又はCD8/MHCクラスI相互作用に影響を及ぼすMHCクラスI変異を使用して達成され得る。多数のこのようなMHCクラスI変異体が同定されており、これらとしては、HLA-A2 A245V（これは完全に無効にすることなく、HLA-A2のCD8への結合を減少させる）及びHLA-A2 D227K/T228A、（これはペプチド-MHC/TCR相互作用に影響を及ぼすことなくCD8結合を無効にする）が挙げられる。TCR細胞ライブラリーは、目的のペプチドを負荷されたHLA-A2 A245V変異体又はHLA-A2 D227K/T228A変異体を含有する四量体に対して直接スクリーニングされ得る。あるいは、2段階スクリーニングアプローチが使用される。このアプローチにおいて、細胞表面上にCD8及びTCRを発現するTCR細胞ライブラリーは、目的のペプチドを負荷された野生型HLA-A2を含有する四量体を使用して最初にスクリーニングされる。次いで、この最初の工程で同定されたポジティブヒットを、目的のペプチドを負荷したHLA-A2 A245V変異体又はHLA-A2 D227K/T228A変異体を含有する四量体に対してスクリーニングする。CD8非依存性高親和性TCRを単離し同定することができる。

【０３２１】

実施例5：レポーターアッセイを使用したTCR細胞ライブラリーのスクリーニング

TCR細胞ライブラリーはまた、ペプチド-MHC複合体との相互作用の機能的結果に基いてスクリーニングされ得る。可能な読み出しとしては、活性化マーカーの発現(例えば、CD69又はCD137)、シグナル伝達経路の誘発(例えば、NFATシグナル伝達、IL-2シグナル伝達、アクチベータータンパク質-1シグナル伝達、又はNFκB/Relシグナル伝達)、カルシウム流動、細胞増殖(例えば、T細胞の増殖)、さらにはサイトカインの産生(例えば、IL-2、TNF-α、又はIFN-γ)が挙げられる。

【０３２２】

あるいは、派生ディスプレイ細胞株は、1つ又はそれ以上のレポーター構築物を発現するように生成され得る。一般的に使用されるレポーター構築物は、選択可能なマーカー(例えば、蛍光又は発光タンパク質、表面発現されたタンパク質、又は抗生物質抵抗性マーカー)を標的プロモーター(例えば、NFAT結合部位を含むIL-2プロモーター、NFκB転写応答エレメントを含むNFκBプロモーター、又はTPA誘導転写応答エレメントを含むアクチベータータンパク質-1プロモーター)の制御下でコードする。

【０３２３】

この実施例では、IL-2-EGFPレポーター構築物を含む派生ディスプレイ細胞株を生成した。T細胞の活性化及びその後のIL-2シグナル伝達カスケードの活性化の後、IL-2プロモーターは活性化され、EGFPの合成をもたらす。読み出し、例えば、この場合はEGFP発現を使用して、例えば、フローサイトメトリー分析を使用してIL-2シグナル伝達の強度を定性的又は定量的に測定することができる。レポーター構築物を、上で生成されたディスプレイ細胞株AK-D10にレトロウイルスで形質導入した。

【０３２４】

同様のレポーター構築物もまた、上で生成されたLOT-D08細胞並びにchiCD8α^{flox}及びchiCD8β^{flox}を発現するLOT-D08細胞のような他のディスプレイ細胞に導入された。

【０３２５】

１）　IL-2レポーター構築物を含むAK-D10細胞の生成

T細胞活性化の機能的読み出しとしてのIL-2産生を使用する実行可能性を調べるために最初に研究を行った。手短には、AK-D10細胞又はキメラTCR C58を発現するAK-D10細胞を、抗CD3抗体又は抗CD3/抗CD28抗体カクテルを使用して刺激し、次いでIL-2産生を測定す

ることにより活性化について調べた。抗CD3抗体(eBioscience、カタログ番号:16-0032)又は抗CD3及び抗CD28(eBioscience、カタログ番号：16-0281)抗体を、5 μg/mlの濃度で96ウェルプレート上にコーティングし、そして3時間37℃でインキュベートした。続いて、SF-IMDM 200 μlに再懸濁した1 x 10^5細胞を各ウェルに加え、そして24時間37℃及び10% CO_2にてインキュベートした。C58発現を伴うか又は伴わない活性化AK-D10細胞の培養上清におけるIL-2産生を、マウスIL-2 ELISAキット(eBioscience、カタログ番号：88-7024)を使用して試験した。

【０３２６】

抗CD3又は抗CD3/抗CD28抗体刺激下で、キメラTCR C58を発現するAK-D10細胞のみがIL-2を分泌したが、TCR発現のないAK-D10細胞は分泌しなかった(図5)。

【０３２７】

IL-2産生がT細胞活性化の有用な機能的読み出しとして役立ち得るということを確立した後、AK-D10細胞を形質導入してIL-2-EGFPレポーター構築物を発現させ、これはIL-2産生の代理読み出しを生じた。３つのレポーター構築物を生成し、ここでミニマルIL-2プロモーター、３つのNFAT結合部位を含むIL-2プロモーター、又は６つのNFAT結合部位を含むIL-2プロモーターを、EGFPをコードするヌクレオチド配列(それぞれmIL-2-EGFP、IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP、及びIL-2-$(NFAT)_6$-EGFP）に作動可能に連結した。レポーター構築物は、選択マーカーとしてハイグロマイシンB抵抗性遺伝子を含んでいた。レポーター構築物遺伝子を、複製不全レトロウイルス粒子にそれぞれ別々にパッケージングした。HEK 293細胞(ATCC)を、３つの異なるベクターで同時トランスフェクトした：gag-pol遺伝子をコードするpVPackベクター(pVPackベクター系、Stratagene)、PVC 211 env遺伝子をコードするベクター、３つのレポーター構築物のうちの１つをコードするレトロウイルスベクター。FuGENE 6トランスフェクション試薬(Roche Applied Science)を製造者の指示に従って使用してトランスフェクションを行った。得られたレトロウイルス上清を3日後に回収し、そして上で生成されたAK-D10細胞を形質導入するためにそのまま使用した。レポーター構築物を発現するAK-D10細胞を、ハイグロマイシンB抗生物質を作用濃度800 μg/mlで使用して選択した。4日の選択時間後、ハイグロマイシン抵抗性AK-D10細胞の集団からの単一T細胞を96ウェルプレートで選別した。これらの単一T細胞を約1週間でT細胞クローンへと増殖させた。続いて、これらの単一細胞クローンを、同族ペプチド-MHC複合体又は抗CD3抗体を用いて活性化されたTCRで形質導入し、そしてフローサイトメトリーにより分析して、レポーター遺伝子がEGFP発現により証拠付けられるように活性化されたということを確認した。

【０３２８】

２）　抗CD3抗体を使用したIL-2レポーター構築物を含むAK-D10細胞の活性化

この実施例において、IL-2-$(NFAT)_3$-EGFPレポーター構築物及びキメラTCR DMF4 (AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiDMF4+)を発現するAK-D10細胞を、上記のようにプレート結合抗CD3抗体の存在下又は存在しない場合に活性化し、次いでEGFP発現をフローサイトメトリーを使用して調べた。全てのフローサイトメトリーデータは、FlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して分析された。IL-2レポーター構築物のみを発現するが組み換えTCRを発現しないAK-D10細胞をネガティブ対照として使用した。

【０３２９】

EGFP発現により証拠付けられるIL-2レポーター構築物の活性化は、抗CD3抗体と共培養されたDMF4を発現する細胞においてのみ観察された(図6A)。抗CD3抗体の存在しない場合に(図6B)、又はTCR発現の存在しない場合(図6C)、最少のレポーター活性化が検出された。

【０３３０】

３）　ペプチドを瞬間適用したT2細胞を使用したIL-2レポーター構築物を含むAK-D10細胞又はBB8細胞の活性化

次に、 ペプチドを瞬間適用したT2細胞による、IL-2レポーター構築物及び組み換えTCRを発現するAK-D10細胞又はBB8細胞の活性化を調べるために、一連の研究を行った。

【０３３１】
第一の研究において、２つのNY-ESO-1特異的TCRを試験した：C58、（これは上に記載されている）、及びC259、（これはHLA-A*0201の状況においてNY-ESO-1から誘導されたペプチドに対して特異的なTCRである）。例えば、Rapoport et al.、Nat Med. 2015、21(8)：914-921; Robbins et al.、J Clin Oncol. 2011、29(7)：917-924; Robbins et al.、J Immunol. 2008、180(9)：6116-6131; 及び米国特許第8,008,438号（これらはそれぞれ参照によりその全体として本明細書に加入される）を参照のこと。C259を、マウス非可変領域に融合されたヒト可変領域を有するキメラTCRとして発現させて、マウスCD3との適切な会合及び相互作用並びにマウスシグナル伝達経路の適切な誘発を確実にした。キメラC259のα及びβ鎖は、それぞれ配列番号35及び36のアミノ酸配列を含む。

【０３３２】
T2細胞(200 μl PBS中1.0 x 10^6細胞)に、50 μg/ml NY-ESO-1抗原ペプチドSLLMWITQV(配列番号31) (IBA Lifesciences、カタログ番号：6-7013-901)を3時間37℃で瞬間適用した。次に、IL-2レポーター構築物及びキメラTCR C58 (AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiC58+)又はキメラTCR C259 (AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiC259+)を発現するように形質導入された5.0 x 10^4AK-D10細胞を、5.0 x 10^4の瞬間適用されたT2細胞とともに200 μl SF-IMDM培地中16時間37℃及び10% CO_2で共インキュベートした。対照として、AK-D10派生物もまた非瞬間適用T2細胞とともにインキュベートするか、T2細胞の存在しない場合にインキュベートした。インキュベート後に、細胞をTCR発現について、抗マウスTCRβ抗体(BD Biosciences、カタログ番号：553174)を使用して染色した。T細胞活性化マーカーCD69及びCD137の発現を評価するために、抗マウスCD69-BV421(Biolegend、カタログ番号：104528)及び抗マウスCD137-APC (eBioscience、カタログ番号：17-1371)を使用して細胞を染色した。次いで、細胞をフローサイトメトリー分析にかけた。TCRポジティブ細胞をゲーティングし、そしてTCR+ EGFP+、TCR+ CD69+、及びTCR+ CD137+細胞のパーセンテージを、FlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して決定した。

【０３３３】
同族ペプチドを瞬間適用したT2細胞との共インキュベーションは、EGFP発現により証拠付けられるように、IL-2レポーター構築物の活性化を増強した(図7A～7C及び図8)。一貫して、瞬間適用したT2細胞との共培養もまた、T細胞活性化マーカーCD69及びCD137の発現を上方調節した(図8)。特に、表面TCR発現は、活性化すると下方調節され(図7A～7C)、ここで開発されたIL-2レポーターアッセイが、優れたシグナル伝達能を有するTCRを同定する際に特に有用であり得るということを強調する。例えば、MHC四量体を使用する結合ベースのスクリーニングは、増強された四量体結合が、下方調節された表面TCR発現によりオフセットよりも大きい場合は得られる情報がより少ないかもしれない。

【０３３４】
第二の研究において、IL-2-EGFPレポーター構築物の感受性を、同族ペプチドの用量漸増を用いて瞬間適用したT2細胞を使用して調べた。手短には、22.0 x 10^6 T2細胞を、0.125 μMから256 μMの範囲に及ぶMart-1抗原ペプチド ELAGIGILTV (配列番号30) (P&E、カタログ番号：EP04197)を用いて3時間37℃で瞬間適用した。ペプチド瞬間適用のために、ネガティブ対照ペプチド ILLWQPIPV (配列番号34) (Genscript、特別注文)を加えて、512 μMの一定総ペプチド濃度を維持した。続いて、IL-2レポーター構築物及びキメラTCR DMF4(AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiDMF4+)又はキメラTCR DMF5 (AK-D10 IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+ chiDMF5+)を発現するように形質導入された5.0 x 10^4 AK-D10細胞を、5.0 x 10^4の瞬間適用されたT2細胞とともに200 μl SF-IMDM培地中で12時間37℃及び10% CO_2にて共インキュベートした。抗ヒトTCRα/β-APC (BD Biosciences、カタログ番号：563826)を使用してTCR発現について細胞を染色し、そしてフローサイトメトリーで分析した。TCRポジティブ細胞をゲーティングし、そしてTCR+ EGFP+細胞のパーセンテージを、FlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して決定した。

【０３３５】
図9A及び9Bに示されるように、同族ペプチドを瞬間適用されたT2細胞は、用量依存性様

式でIL-2-EGFPレポーター構築物を活性化した。

【０３３６】

第三の研究は、IL-2-EGFPレポーター構築部の活性化が、T2細胞を瞬間適用するために使用されるペプチド濃度、活性化の長さ、及びCD8の存在又は不在のような因子によりどのように影響されるかを調べた。T2細胞(200 μl PBS中5.0 x 10^5細胞)を、50 μg/ml、5 μg/ml、又は0.5 μg/mlのMart-1抗原ペプチド ELAGIGILTV (配列番号30) (P&E、カタログ番号：EP04197)で3時間37℃にて瞬間適用した。キメラTCR DMF4又はDMF5を発現するBB8細胞(MTCD8 mCD8αβ- chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+)を、Creリコンビナーゼを発現するように形質導入するか又は形質導入しなかった。次に、5.0 x 10^4 BB8派生物を、5.0 x 10^4の瞬間適用したT2細胞とともに200 μl SF-IMDM培地中で37℃及び10% CO_2にて0～25時間の時間経過にわたって共インキュベートした。次いで、細胞をTCR及びCD8について抗マウスTCRβ-APC (BD Biosciences、カタログ番号：553174)及び抗ヒトCD8-PE (BD Biosciences、カタログ番号：555635)を使用して染色し、そしてフローサイトメトリーにより分析した。TCRポジティブ細胞をゲーティングし、TCR+ EGFP+細胞のパーセンテージをFlowJoソフトウェア(Treestar)を使用して決定した。

【０３３７】

図10A及び10Bに示されるように、IL-2-EGFPレポーター構築物の活性化は、測定された期間内で時間の関数である。活性化の程度は、T2細胞を瞬間適用する同族ペプチドの濃度の増加につれて増加した。CD8染色により、Creリコンビナーゼの形質導入が首尾よく表面CD8発現を枯渇させ(データは示していない)、これはペプチド瞬間適用T２細胞により誘導されるIl-2シグナル伝達活性化を減少させたということを確認した。

【０３３８】

実施例6：ヒトドナーからのTCRの単離

この実施例において、ヒト被験体からのT細胞を、目的の標的に対して特異的なTCRについてスクリーニングする。より詳細には、HPV E6又はE7由来ペプチドに特異的なTCRをヒトドナーから単離した。E6又はE7に対してワクチン接種されたヒト由来のT細胞もまた、E6又はE7由来ペプチドに対して特異的なTCRを単離するために使用することができる。

【０３３９】

１） インビトロ刺激されたヒトT細胞からのTCRの単離

ヒトT細胞を、標準的な方法を使用してPBMCから単離した。HPV E6又はE7由来ペプチドに特異的なTCRを同定するために、単離されたT細胞を、(i) JPT peptidesからのペプチドプールPepMix^{TM}HPV 16(タンパク質E6又はE7)を負荷した自己樹状細胞、(ii) HPV E6若しくはE7由来のHLA-A2制限ペプチドを負荷したT2細胞、又は(iii) ペプチド-MHC複合体(E6又はE7由来ペプチドを負荷したDimerX)を用いて活性化した。後者の２つの場合において、E6由来ペプチド KLPQLCTEL (配列番号31)及びE7由来ペプチドGTLGIVCPI (配列番号32)を使用して、T2細胞及びDimerXに負荷した。あるいは、単離されたT細胞は、目的の抗原をコードするインビトロ転写(IVT)RNAでトランスフェクトされた抗原提示細胞を使用しても活性化され得る。

【０３４０】

続いて、活性化された細胞を回収し、蛍光結合抗IFNγ抗体(Secretion Assay Kit、Miltenyi Biotec)、さらにはT細胞特異的抗体(抗CD8又は抗CD4抗体)を用いて染色し、そしてIFNγ/CD8又はIFNγ/CD4について二重ポジティブであった細胞についてバルク選別するか又は単一細胞選別した。BD FACSAriaフローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して選別を行った。あるいは、活性化された細胞はまた、抗IL-2抗体を抗CD8又は抗CD4抗体と一緒に使用して染色し、次いでIL-2/CD8又はIL-2/CD4二重ポジティブ細胞について選別することができる。

【０３４１】

バルク又は単一細胞選別された活性化T細胞を、例えば、組み換えIL-2、抗CD3/抗CD28抗体、又は同族ペプチド-MHC複合体を使用して増殖させる。TCR α及びβ鎖を、単一細胞選別又はバルク選別された抗原特異的CD8+又はCD4+ Tリンパ球から直接クローン化した。

クローン化したTCRを、機能的アッセイにおいて直接試験するか、又はライブラリー生成に使用する。

【０３４２】

２）　目的のペプチド-MHC複合体を使用して選別されたT細胞からのTCRの単離

ヒトT細胞を、PBMCから標準的な方法を使用して単離した。単離されたT細胞を、E6由来ペプチド KLPQLCTEL (配列番号31)又はE7由来ペプチドGTLGIVCPI (配列番号32)を負荷したDimerXを使用して染色し、そしてBD FACSAriaフローサイトメーター(BD Biosciences)を使用してバルク又は単一細胞選別した。T細胞の活性化は行われなかった。

【０３４３】

バルク又は単一細胞選別されたT細胞を、例えば、組み換えIL-2、抗CD3/抗CD28抗体、又は選別において使用された特定のペプチド-MHC複合体を使用して増殖させた。TCR α及びβ鎖を、単一細胞選別又はバルク選別された抗原特異的CD8+又はCD4+ Tリンパ球から直接クローン化した。クローン化されたTCRを、機能的活性で直接試験するか、又はライブラリー生成のために使用する。

【０３４４】

【表１】

表１ 例となる共受容体、TCR、MHC及びペプチド抗原のアミノ酸配列

配列番号：	説明（別の指示がなければタンパク質配列）	配列
1	キメラCD8α	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPR GAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLT LSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSRKRVCKCPRPLVR QEGKPRPSEKIV
2	キメラCD8β	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAP SSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFIL NLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTT AQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPLSLLVVCILLL LAFLGVAVYFYCVRRRARIHFMKQFHK
3	loxp部位を有するキメラCD8α（ヌクレオチド配列）	AGCCAGTTCAGAGTGTCCCCCCTGGACAGAACCTGGAACC TGGGCGAGACAGTGGAACTGAAGTGCCAGGTGCTGCTGAG CAACCCCACCAGCGGCTGTAGCTGGCTGTTCCAGCCTAGA GGCGCCGCTGCCAGCCCTACCTTTCTGCTGTACCTGAGCC AGAACAAGCCCAAGGCCGCCGAGGGCCTGGACACCCAGAG ATTCAGCGGCAAGAGACTGGGCGACACCTTCGTGCTGACC CTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACGAGGGCTACTACTTCT GCAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTT CGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCT GCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCC AGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTGTAGACCAGCTGC TGGCGGAGCCGTGCACACAAGAGGCCTGGACTTCGCCTGC GACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTA TCTGGGCTCCACTGGCCGGCATTTGTGTGGCACTGCTGCT GTCCCTGATCATCACCCTGATCTGCTACCACAGATCCCGG AAGCGCGTGTGCAAGTGCCCTAGACCACTCGTGCGGCAGG AAGGCAAGCCCAGACCCAGCGAGAAGATTGTCTGAATAAC TTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT

【０３４５】

【表２】

配列番号：	説明（別の指示がなければタンパク質配列）	配列
4	loxp 部位を有するキメラCD8β（ヌクレオチド配列）	CTGCAGCAGACCCCCGCCTACATCAAGGTGCAGACCAACA AGATGGTCATGCTGAGCTGCGAGGCCAAGATCAGCCTGAG CAACATGAGAATCTACTGGCTGAGACAGAGACAGGCCCCC AGCAGCGACAGCCACCACGAGTTTCTGGCCCTGTGGGACA GCGCCAAGGGCACCATCCATGGCGAGGAAGTGGAACAGGA AAAGATCGCCGTGTTCAGGGACGCCAGCAGATTCATCCTG AACCTGACCAGCGTGAAGCCCGAGGACAGCGGAATCTACT TCTGCATGATCGTGGGCAGCCCCGAGCTGACCTTCGGCAA GGGAACACAGCTGAGCGTGGTGGACTTCCTGCCTACCACC GCCCAGCCCACCAAGAAGTCTACCCTGAAGAAAAGAGTGT GCAGACTGCCCAGACCCGAGACACAGAAAGGCCCTCTGTG CAGCCCTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTA TCTCTGAGCCTGCTGGTCGTGTGCATCCTCCTGCTGCTGG CTTTTCTGGGCGTGGCCGTGTACTTCTACTGCGTGCGGAG AAGGGCCAGGATCCACTTTATGAAGCAGTTCCACAAATGA ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT
5	loxp 部位を有するキメラCD8α（アミノ酸配列）	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPR GAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLT LSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DITSYSIHYTKLSIWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSR KRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV
6	loxp 部位を有するキメラCD8β（アミノ酸配列）	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAP SSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFIL NLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTT AQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITSYSIHYTKL SLSLLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRARIHFMKQFHK
7	キメラC58 α鎖	KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDP GKGLTSLLLITPWQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAAS QPGDSATYLCAVRPLLDGTYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPE PAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITD KTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPS SDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGF NLLMTLRLWSS
8	キメラC58 β鎖	NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPG MGLRLIHYSVAIQTTDQGEVPNGYNVSRSTIEDFPLRLLS AAPSQTSVYFCASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLEDLRNVT PPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPR NHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADC GITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGLVLMAM VKKKNS

【０３４６】

【表３】

配列番号：	説明（別の指示がなければタンパク質配列）	配列
9	キメラ DMF4 α 鎖	GQQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNTWLWYKQDPG EGPVLLIALYKAGELTSNGRLTAQFGITRKDSFLNISASI PSDVGIYFCAGGTGNQFYFGTGTSLTVIPYIQNPEPAVYQ LKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLD MKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPC DATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMT LRLWSS
10	キメラ DMF4 β 鎖	DAGITQSPRHKVTETGTPVTLRCHQTENHRYMYWYRQDPG HGLRLIHYSYGVKDTDKGEVSDGYSVSRSKTEDFLLTLES ATSSQTSVYFCAISEVGVGQPQHFGDGTRLSILEDLRNVT PPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPR NHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADC GITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAM VKRKNS
11	キメラ DMF5 α 鎖	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYS GKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQ PSDSATYLCAVNFGGGKLIFGQGTELSVKPYIQNPEPAVY QLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVL DMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP CDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLM TLRLWSS
12	キメラ DMF5 β 鎖	IAGITQAPTSQILAAGRRMTLRCTQDMRHNAMYWYRQDLG LGLRLIHYSNTAGTTGKGEVPDGYSVSRANTDDFPLTLAS AVPSQTSVYFCASSLSFGTEAFFGQGTRLTVVEDLRNVTP PKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVN GKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRN HFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCG ITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMV KRKNS
13	マウス TCR α 鎖非可変領域 (A0A075B662)	XIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES GTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKET NATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILL LKVAGFNLLMTLRLWSS X はいずれのアミノ酸でもよい
14	マウス TCR α 鎖膜貫通及び細胞質内領域	SVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

【０３４７】

【表４】

配列番号：	説明（別の指示がなければタンパク質配列）	配列
15	マウス TCR β 鎖非可変領域 (Trbc1) (A0A0A6YWV4)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSA TFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAE AWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS TLVVMAMVKRKNS X はいずれのアミノ酸でもよい
16	マウス TCR β 鎖(Trbc1) 膜貫通及び細胞質内領域 s	EILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS
17	マウス TCR β 鎖非可変領域 (Trbc1) (A0A075B5J3)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSA TFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAE AWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS TLVVMAMVRNR X はいずれのアミノ酸でもよい
18	マウス TCR β 鎖(Trbc1) 膜貫通及び細胞質内領域	EILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVRNR
19	マウス TCR β 鎖非可変領域 (Trbc2) (A0A075B5J4)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSA TFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAE AWGRADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS GLVLMAMVKKKNS X はいずれのアミノ酸でもよい
20	マウス TCR β 鎖(Trbc2) 膜貫通及び細胞質内領	EILLGKATLYAVLVSGLVLMAMVKKKNS
21	マウス CD8α アイソフォーム 1	KPQAPELRIFPKKMDAELGQKVDLVCEVLGSVSQGCSWLF QNSSSKLPQPTFVVYMASSHNKITWDEKLNSSKLFSAMRD TNNKYVLTLNKFSKENEGYYFCSVISNSVMYFSSVVPVLQ KVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGT GLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSRKRVC KCPRPLVRQEGKPRPSEKIV
22	マウス CD8β	LIQTPSSLLVQTNHTAKMSCEVKSISKLTSIYWLRERQDP KDKYFEFLASWSSSKGVLYGESVDKKRNIILESSDSRRPF LSIMNVKPEDSDFYFCATVGSPKMVFGTGTKLTVVDVLPT TAPTKKTTLKMKKKKQCPFPHPETQKGLTCSLTTLSLLVV CILLLLAFLGVAVYFYCVRRRARIHFMKQFHK

【０３４８】

【表５】

配列番号：	説明（別の指示がなければタンパク質配列）	配列
23	ヒトCD8α アイソフォーム1	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPR GAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLT LSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPV VKSGDKPSLSARYV
24	ヒトCD8β アイソフォーム1	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAP SSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFIL NLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTT AQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVL VLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQFYK
25	loxp 部位を有するキメラCD8α（アミノ酸配列）	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPR GAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLT LSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DITSYSIHYTKLXIWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSR KRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV XはS、F、L、Y、C、又はWである
26	loxp 部位を有するキメラCD8β（アミノ酸配列）	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAP SSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFIL NLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTT AQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITSYSIHYTKL XLSLLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRARIHFMKQFHK XはS、F、L、Y、C、又はWである
27	HLA-A2 α鎖	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDA ASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGT LRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDG KDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYL EGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEAT LRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGT FQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSSQP TIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVVAAVMWRRKSSDRKGGSY SQAASSDSAQGSDVSLTACKV

【０３４９】

【表６】

配列番号：	説明（別の指示がなければタンパク質配列）	配列
28	HLA-A2 α鎖 A245V	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDA ASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGT LRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDG KDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYL EGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEAT LRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGT FQKWVAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSSQP TIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVVAAVMWRRKSSDRKGGSY SQAASSDSAQGSDVSLTACKV
29	HLA-A2 α鎖D227K/T228A	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDA ASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGT LRGYYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDG KDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYL EGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEAT LRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQKAELVETRPAGDGT FQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPSSQP TIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVVAAVMWRRKSSDRKGGSY SQAASSDSAQGSDVSLTACKV
30	Mart-1ペプチド	ELAGIGILTV
31	E6ペプチド	KLPQLCTEL
32	E7ペプチド	GTLGIVCPI
33	NY-ESO-1ペプチド	SLLMWITQV
34	ペプチド	ILLWQPIPV
35	キメラC259 α鎖	QEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIPFWQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQ PGDSATYLCAVRPLYGGSYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPEP AVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDK TVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSS DVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFN LLMTLRLWSS
36	キメラC259 β鎖	AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGM GLRLIHYSVSVGMTDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSA APSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLRNVTP PKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVN GKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRN HFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCG ITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMV KRKNS

【０３５０】

本発明は、本明細書に記載される特定の実施態様による範囲に限定されるべきではない。実際、記載されるものに加えて本発明の様々な改変が、前述の記載及び添付の図面から当業者に明らかとなるだろう。このような改変は添付の特許請求の範囲内であることが意図される。

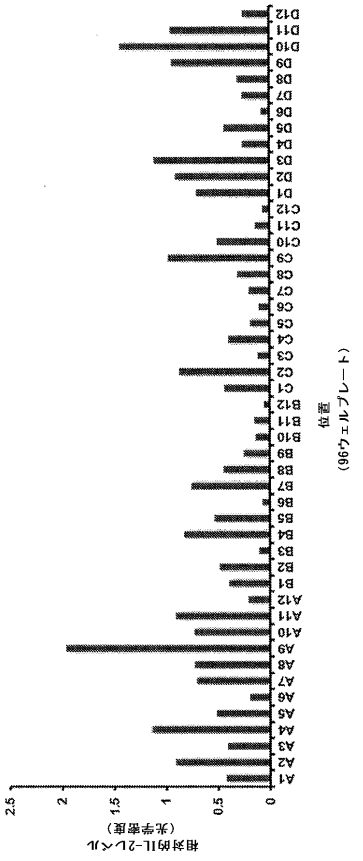
【０３５１】

明細書において特定されるいずれの特許、特許出願、刊行物、又は他の開示材料も、参照によりその全体として、そして全ての目的のために、それぞれの上記個々の参考文献(例えば、特許、特許出願、刊行物、または他の開示材料)が、全ての目的のために参照によりその全体として加入されると具体的かつ個別に示されると同じ程度まで、本明細書に加入される。参照により本明細書に加入されると述べられるが、既存の定義、記載、又は本明細書で示される他の開示材料と食い違ういずれの材料、又はその部分も、参照により組み込まれた材料と本開示材料との間に矛盾が生じない程度までのもののみ参照により加入される。

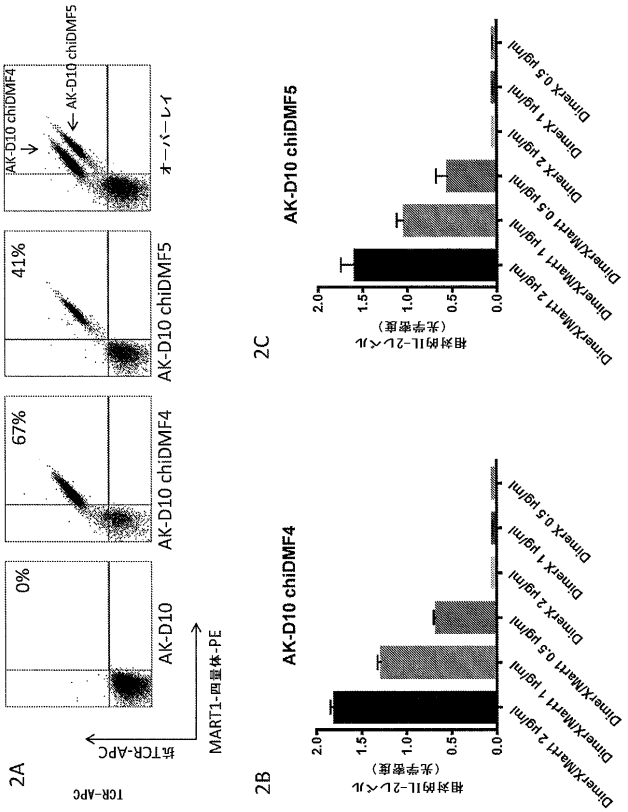
【０３５２】

他の実施態様は以下の特許請求の範囲内である。

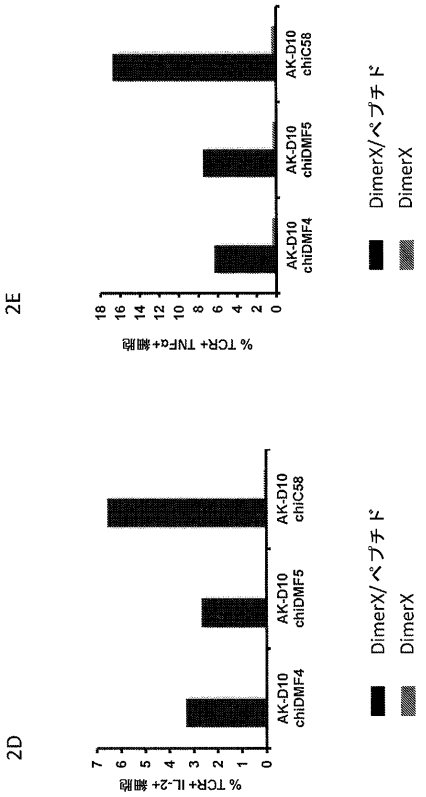
【図１】



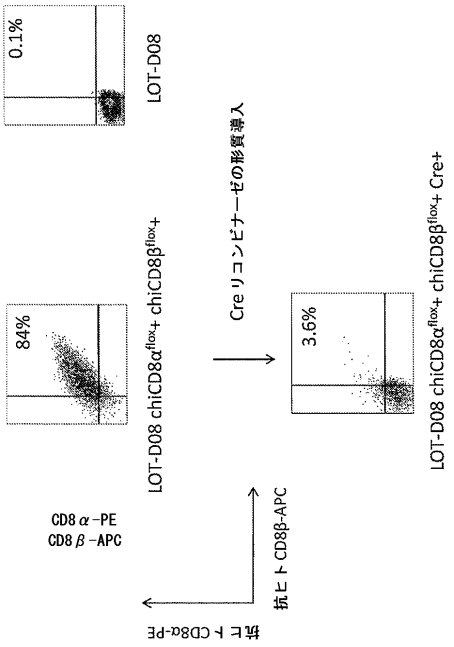
【図２－１】



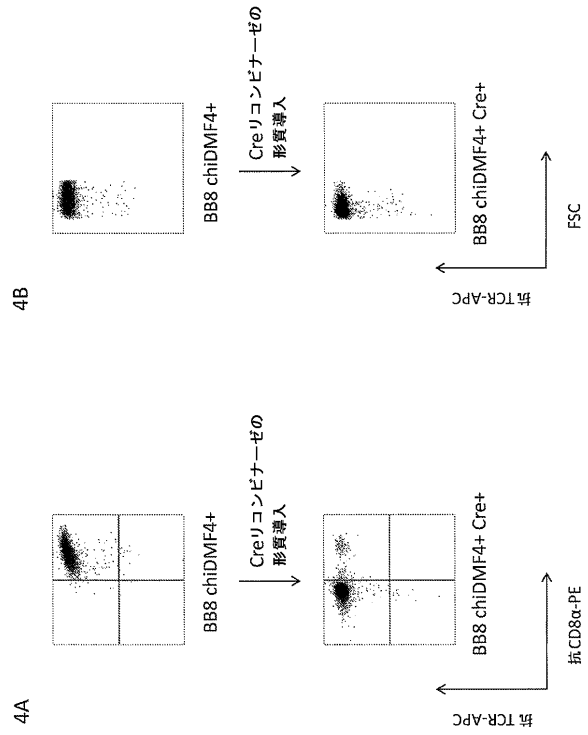
【図２－２】



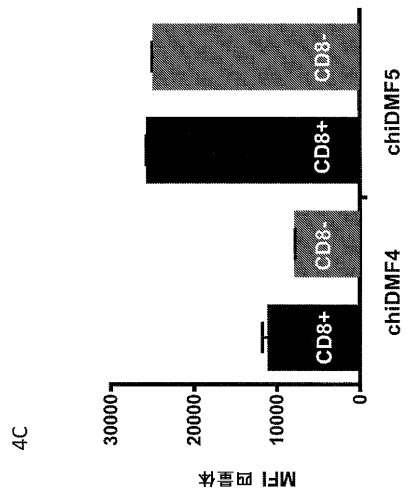
【図３】



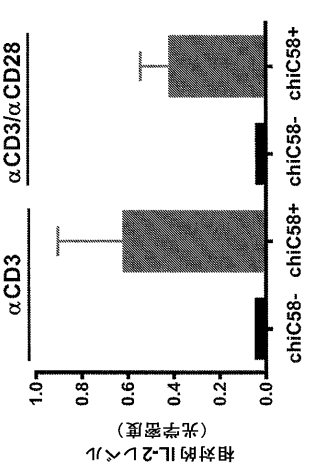
【図４－１】



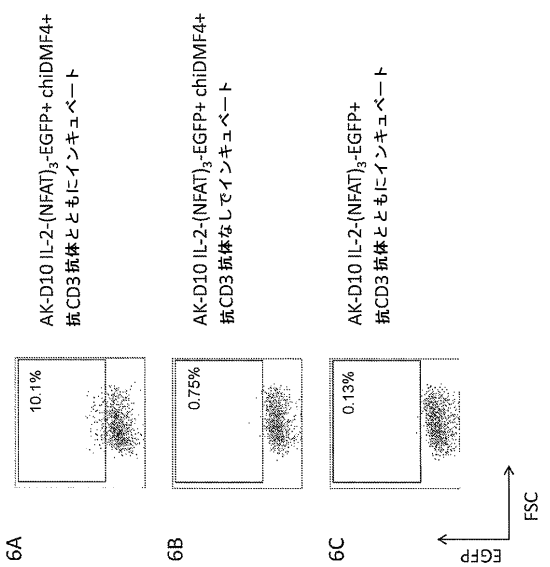
【図４－２】



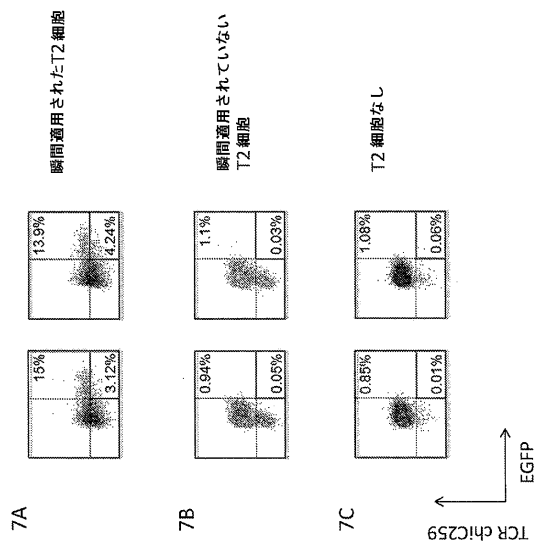
【図５】


αCD3
αCD3/αCD28
chiC58- chiC58+ chiC58- chiC58+
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
相対的 IL-2 レベル
（光学密度）

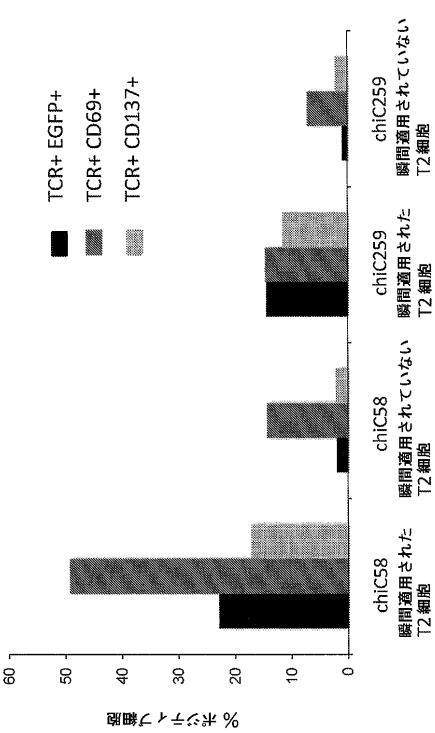
【図６】


AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+ chiDMF4+
抗 CD3 抗体とともにインキュベート
10.1%
6A
AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+ chiDMF4+
抗 CD3 抗体なしでインキュベート
0.75%
6B
AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+
抗 CD3 抗体とともにインキュベート
0.13%
6C
EGFP
FSC

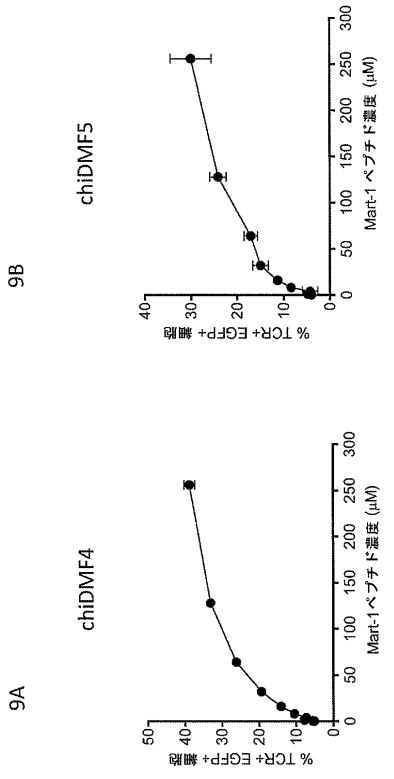
【図７】


7A
瞬間適用された T2 細胞
15%
3.12%
13.9%
4.24%
7B
瞬間適用されていない
T2 細胞
0.94%
0.05%
1.1%
0.03%
7C
T2 細胞なし
0.85%
0.01%
1.08%
0.06%
TCR chiC259
EGFP

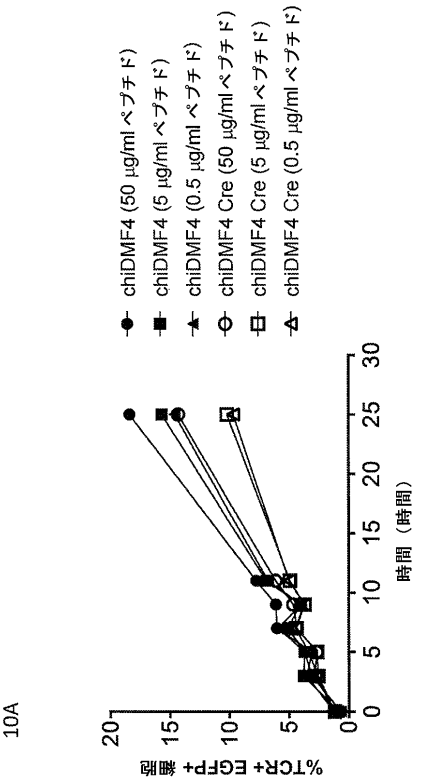
【図８】


TCR+ EGFP+
TCR+ CD69+
TCR+ CD137+
60
50
40
30
20
10
0
% 末梢 T 細胞
chiC58
瞬間適用された
T2 細胞
chiC58
瞬間適用されていない
T2 細胞
chiC259
瞬間適用された
T2 細胞
chiC259
瞬間適用されていない
T2 細胞

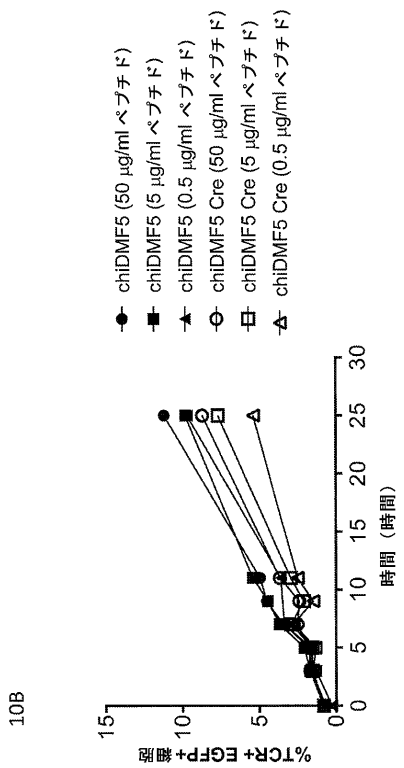
【図９】


9A
chiDMF4
% TCR+ EGFP+ 細胞
Mart-1ペプチド濃度 (μM)
9B
chiDMF5
% TCR+ EGFP+ 細胞
Mart-1ペプチド濃度 (μM)

【図１０Ａ】


10A
chiDMF4 (50 μg/ml ペプチド)
chiDMF4 (5 μg/ml ペプチド)
chiDMF4 (0.5 μg/ml ペプチド)
chiDMF4 Cre (50 μg/ml ペプチド)
chiDMF4 Cre (5 μg/ml ペプチド)
chiDMF4 Cre (0.5 μg/ml ペプチド)
%TCR+ EGFP+ 細胞
時間（時間）

【図１０Ｂ】


10B
chiDMF5 (50 μg/ml ペプチド)
chiDMF5 (5 μg/ml ペプチド)
chiDMF5 (0.5 μg/ml ペプチド)
chiDMF5 Cre (50 μg/ml ペプチド)
chiDMF5 Cre (5 μg/ml ペプチド)
chiDMF5 Cre (0.5 μg/ml ペプチド)
%TCR+ EGFP+ 細胞
時間（時間）

【配列表】
2018531593000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/050850

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783 A61K35/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/245466 A1 (MACDONALD LYNN [US] ET AL) 28 August 2014 (2014-08-28) paragraphs [0038], [0116]; claims 1-9,23-27; example 2.3	1-127
Y	EP 1 188 825 A1 (UNIV LEIDEN [NL]) 20 March 2002 (2002-03-20) paragraphs [0019], [0020], [0025], [0026], [0034]; claims 6, 10,16,18	1-127
Y	WO 2012/031744 A1 (CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSINSTITUT [DE]; SCHOENFELD KURT [DE]; KN) 15 March 2012 (2012-03-15) examples 1,2	1-127

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 November 2016	18/11/2016

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

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/050850

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FIGUEROA JOSE A ET AL: "Chimeric antigen receptor engineering: a right step in the evolution of adoptive cellular immunotherapy.", INTERNATIONAL REVIEWS OF IMMUNOLOGY MAR 2015, vol. 34, no. 2, March 2015 (2015-03), pages 154-187, XP9189941, ISSN: 1563-5244 page 170 -----	1-127

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/050850

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2016/050850

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014245466 A1	28-08-2014	AU 2014218897 A1	10-09-2015
		CA 2900832 A1	28-08-2014
		CN 105164153 A	16-12-2015
		EP 2958938 A1	30-12-2015
		HK 1213908 A1	15-07-2016
		JP 2016506761 A	07-03-2016
		KR 20150119409 A	23-10-2015
		US 2014245466 A1	28-08-2014
		WO 2014130671 A1	28-08-2014
EP 1188825 A1	20-03-2002	AU 1106102 A	26-03-2002
		CA 2422597 A1	21-03-2002
		EP 1188825 A1	20-03-2002
		EP 1320581 A1	25-06-2003
		US 2003219463 A1	27-11-2003
		WO 0222790 A1	21-03-2002
WO 2012031744 A1	15-03-2012	EP 2614077 A1	17-07-2013
		EP 3012268 A1	27-04-2016
		US 2013280285 A1	24-10-2013
		US 2016046729 A1	18-02-2016
		WO 2012031744 A1	15-03-2012

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	*14/725*	*(2006.01)*	C07K	14/725		
C40B	*40/02*	*(2006.01)*	C40B	40/02		
C12Q	*1/04*	*(2006.01)*	C12Q	1/04		
C12Q	*1/6897*	*(2018.01)*	C12Q	1/6897	Z	
C12N	*15/867*	*(2006.01)*	C12N	15/867	Z	
C12Q	*1/68*	*(2018.01)*	C12Q	1/68	Z	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG

(72)発明者 ザイバート・フォルカー
ドイツ連邦共和国７９５３９レラハ．トゥムリンガーシュトラーセ２６１ツェー
(72)発明者 ベンジャミン・ロバート・スタイン
アメリカ合衆国ニューヨーク州１１２３５．ブルックリン．オセアーナ・ドライヴ・イースト１５５．アパートメント４アイ

Ｆターム(参考) 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ13 QQ42 QR32 QR35 QR72 QR77 QR80 QS38 QX01
4B065 AA90X AA90Y AA92X AA92Y AA94X AA94Y AB01 AC14 AC20 BA01 CA24 CA46
4H045 AA10 AA30 AA50 BA10 BA41 CA40 DA50 EA50 FA74