

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7680032号
(P7680032)

(45)発行日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(24)登録日 令和7年5月12日(2025.5.12)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12 Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
請求項の数 18 (全93頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-556481(P2021-556481)	(73)特許権者	520143926 ラディック インスティテュート フォア キャンサー リサーチ リミテッド LUDWIG INSTITUTE FO R CANCER RESEARCH L T D スイス国 8 0 0 1 チューリッヒ シュ ターデルホーファーシュトラッセ 2 2
(86)(22)出願日	令和2年3月17日(2020.3.17)	(74)代理人	100139723 弁理士 樋口 洋
(65)公表番号	特表2022-525925(P2022-525925 A)	(74)代理人	100116540 弁理士 河野 香
(43)公表日	令和4年5月20日(2022.5.20)	(72)発明者	クーコス, ジョージ スイス国 1 0 6 6 ヴォー エパランジュ シュマン デ ボヴェルッス 1 5 5 ラデ 最終頁に続く
(86)国際出願番号	PCT/IB2020/000140		
(87)国際公開番号	WO2020/188348		
(87)国際公開日	令和2年9月24日(2020.9.24)		
審査請求日	令和5年3月9日(2023.3.9)		
(31)優先権主張番号	62/819,988		
(32)優先日	平成31年3月18日(2019.3.18)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			

(54)【発明の名称】 A 2 / N Y - E S O - 1 特異的T細胞受容体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

改変T細胞受容体（TCR）またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドであって、前記改変TCRは、配列番号7のアミノ酸配列を含むα鎖と、配列番号3と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むβ鎖とを含み、前記β鎖は、アミノ酸配列NHEを有する相補性決定領域（CDR）1、配列番号56のアミノ酸配列を有するCDR2、および配列番号62のアミノ酸配列を有するCDR3を含み、前記改変TCRは、がん抗原NY-ESO-1 157-165エピトープ（配列番号8）に結合する、ポリヌクレオチド。

【請求項2】

前記改変TCRの前記がん抗原への結合親和性が、WT TCRの前記がん抗原への結合親和性と比較して5倍～75倍高い、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】

前記改変TCRの前記がん抗原に対する解離定数（KD）が0.30μM～4.5μMの間である、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項4】

前記改変TCRのβ鎖が、配列番号12のヌクレオチド配列、または配列番号12に対して少なくとも90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1～3のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

改変TCRの発現のための少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結されている、請求項1～4のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

前記少なくとも1つの調節エレメントがプロモーターである、請求項5に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

(i) DNA分子である、あるいは(ii) RNA分子またはその誘導体である、請求項1～6のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクターであって、前記ポリヌクレオチドが、改変T細胞受容体(TCR)の発現のための少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結されている、組換えベクター。

10

【請求項9】

請求項1～7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドによってコードされる改変T細胞受容体(TCR)。

【請求項10】

配列番号7のアミノ酸配列を含むα鎖、および配列番号3のアミノ酸配列を含むβ鎖を含む、請求項9に記載の改変T細胞受容体(TCR)。

【請求項11】

(i) 請求項9または10に記載の改変T細胞受容体(TCR)；
(ii) 請求項1～7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド；または
(iii) 請求項8に記載のベクター；

20

を含む、単離宿主細胞。

【請求項12】

1つまたは複数の外因性分子を発現するようにさらに操作されており、前記1つまたは複数の外因性分子が、免疫シグナル伝達分子、可溶性受容体、抗原結合タンパク質、またはホスホジエステラーゼである、請求項11に記載の単離宿主細胞。

【請求項13】

前記1つまたは複数の外因性分子が、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)またはPDE4B2である、請求項12に記載の単離宿主細胞。

30

【請求項14】

請求項9または10に記載の改変T細胞受容体(TCR)、ならびにT細胞上の細胞表面タンパク質に特異的に結合する免疫エフェクターポリペプチドを含む、二機能性分子。

【請求項15】

請求項11～13のいずれか一項に記載の宿主細胞、または請求項14に記載の二機能性分子、ならびに薬学的に許容される担体および／または賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項16】

請求項1～7のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項8に記載のベクターを用いて宿主細胞を遺伝子操作することを含む、請求項11～13のいずれか一項に記載の宿主細胞を*ex vivo*で作製する方法。

40

【請求項17】

必要とする哺乳動物において免疫応答を刺激または増強するための組成物であって、請求項11～13のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項14に記載の二機能性分子、または請求項15に記載の医薬組成物を含む、組成物。

【請求項18】

必要とする対象におけるがんを治療するための組成物であって、請求項11～13のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項14に記載の二機能性分子、または請求項15に記載の医薬組成物を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

50

【0001】

この出願は、2019年3月18日に出願された米国仮出願第62／819，988号の優先権を主張し、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0002】

本発明は、がん抗原NY-ESO-1由来のエピトープに特異的な遺伝子改変T細胞受容体(TCR)に関する。本発明は、関連するポリペプチドおよびタンパク質、ならびに関連する核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、および遺伝子操作された細胞を含むがそれらに限定されない細胞の集団、および医薬組成物に関する。本発明はさらに、がん免疫療法のためのそのような改変TCRおよび関連する組成物の使用に関する。

10

【背景技術】

【0003】

がん免疫療法は、がん細胞に対する患者自身の免疫応答を利用および／または増強することにより、細胞障害性化学療法、放射線療法、および外科手術などの標準治療アプローチに対する実行可能な代替の強力な補完としての地位を確立している(非特許文献1)。その多くの側面の中で、養子T細胞療法は以前から臨床でその有効性を証明してきた(非特許文献2)。このタイプのがん治療では、腫瘍標的を自然に認識して殺すことができる*ex vivo*で拡大された自己の腫瘍浸潤リンパ球を患者に移入する(非特許文献3)。あるいは、患者の末梢血T細胞を、拡大および養子移入の前に、腫瘍特異的T細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)の異所性発現を介して腫瘍細胞を認識するように遺伝子改変することができる。NY-ESO-1 TCRベース(非特許文献4)およびCD19 CARベース(非特許文献5)のT細胞療法は、それぞれ固形および血液の悪性腫瘍において臨床で大きな期待を示しているがん免疫療法の並外れた例である。

20

【0004】

NY-ESO-1またはニューヨーク食道扁平上皮がん1は、様々な腫瘍によって発現される腫瘍抗原である(非特許文献6)。これらのがん性細胞のクラスIIヒト白血球抗原(HLA)分子は、157位～165位からの9アミノ酸断片(SLLMWITQC(配列番号8))を含む、この抗原からのペプチドを提示する。したがって、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープ-HLA-A2複合体は、例えば、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープ(SLLMWITQC(配列番号8))に特異的なT細胞受容体(TCR)をコードする核酸を形質導入された自己細胞を患者に移入する養子細胞移入療法において、TCRが標的とすることができるがんマーカーを提供する。しかしながら、その目的のために、TCRが、ペプチド-HLA複合体に対して、その複合体に特異的な天然のTCRよりもより高い親和性を有することが望ましいであろう。

30

【0005】

「自己」腫瘍抗原に対するTCRは、例えば胸腺のネガティブセレクションのせいで、ウイルスエピトープ特異的TCRよりも親和性が低い可能性があるため、より高い活性を可能にしながら特異性を維持する(すなわち、健康な組織と交差反応しない)、より親和性の高いTCRを開発する必要がある。

【0006】

40

免疫療法として非常に強力な戦略であると思われるにもかかわらず、多くの患者は養子T細胞療法による臨床的恩恵を示さないか、または長期の応答を維持できず、その結果、その適用は限られたままである。治療関連の毒性は依然として主要な懸念事項であるが(非特許文献7)、養子移入されたT細胞が有効な腫瘍制御を達成できない主な理由は、腫瘍自体の免疫抑制的微小環境にある(非特許文献8)。腫瘍は、免疫系による検出を回避するために多くの戦略を展開する。それらの中には、T細胞の化学誘引を妨げるケモカイン発現プロファイルの変更;適切なT細胞の血管外漏出を妨げる、周囲組織のコラーゲン要塞化および異常な腫瘍内血管系の促進による物理的バリアの強化;低グルコースレベルを特徴とするT細胞機能に不利な代謝微小環境の確立;制御性T細胞(T_{reg})や骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)などの免疫抑制細胞の腫瘍微小環境への化学誘引、また

50

はM2マクロファージなどの免疫抑制表現型を獲得するための他のものの分極化；および最後に、免疫チェックポイント受容体および同様の特性を有する他の膜結合型因子または可溶性因子のアップレギュレーションを介したT細胞機能の直接阻害（非特許文献10）がある。

【0007】

これら障害は、免疫抑制性腫瘍微小環境の様々な態様に取り組むことにより養子移入されたT細胞の活性を増強する組み合わせ治療戦略によって克服することができる。現在、化学療法および放射線療法と組み合わせて、免疫チェックポイント阻害抗体、サイトカイン療法、代謝酵素阻害剤、腫瘍血管系を正常化する薬剤、および抑制性免疫細胞枯渇抗体などの、無数のアプローチが前臨床および臨床レベルで試験されている（非特許文献10）。代替のよりの確で標的化されたアプローチは、T細胞活性に直接影響を与えるまたは腫瘍微小環境を標的にする分子による遺伝子改変を介した、移入されたT細胞の微調整を含む。ケモカイン受容体を用いたT細胞の操作は、腫瘍部位へのT細胞のトラフィックを促進することが示されており、VEGF受容体を標的とするCARは血管系の正常化をもたらす、共刺激リガンドの過剰発現またはCARへの統合は移入されたT細胞に更なる強みを与える。さらに、T細胞関連チェックポイントリガンドのターゲティングは、腫瘍由来のチェックポイントを介したT細胞抑制を軽減し得る（非特許文献11）。

【0008】

ほとんどの工学ベースの戦略がT細胞活性を直接改善することを狙っていることは驚くべきことはない（非特許文献12）が、他の腫瘍常在免疫細胞の潜在的に有益な活性を利用または増強し得る薬剤で養子移入T細胞を改変する取り組みは現在のところ記載されていない。腫瘍関連マクロファージおよび顆粒球は、成功した抗腫瘍応答の確立または妨害における主要なプレーヤーとして浮上しており、それらの抗腫瘍対腫瘍促進特性の刺激が非常に重要である可能性がある（非特許文献13および14）。同じ方向に向かって、異所的に発現された腫瘍由来可溶性因子による樹状細胞（DC）の免疫誘引および刺激は、活性化された内因性T細胞によって媒介される強力な抗腫瘍応答を誘起することが示されている（非特許文献15）。これらの観察結果は、前述の腫瘍常在免疫細胞系統の抗腫瘍潜在力を効果的に生かせる適切なT細胞操作候補薬剤の必要性を浮き彫りにしている。

【0009】

本明細書に開示される本発明は、この必要性および他の関連する必要性に対処する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【文献】Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Nature*, 2011. 480: p. 480

【文献】Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Nature Reviews Immunology*, 2012. 12: p. 269

【文献】Rosenberg, S.A., et al., *Clin Cancer Res*, 2011. 17(13): p. 4550-7

【文献】Robbins, P.F., et al., *J Clin Oncol*, 2011. 29(7): p. 917-24

【文献】Kochenderfer, J.N., et al., *Blood*, 2012. 119: p. 2709-2720

【文献】Chen, Y. T. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(5): p. 1914-1918

【文献】Gust, J., et al. *Cancer Discovery*, 2017. 7: p. 1404-1419

【文献】Zou, W. *Nature Reviews Cancer*, 2005. 5: p. 263

【文献】Baruch, E.N., et al., *Cancer*, 2017. 123(S11): p. 2154-2162

【文献】Zhang, H. and J. Chen, *Journal of Cancer*, 2018. 9(10): p. 1773-1781

【文献】Kunert, A. and R. Debets, *Current Opinion in Immunology*, 2018. 51: p. 133-139

【文献】Yoon, D.H., et al., *International journal of molecular sciences*, 2018. 19(2): p. 340

【文献】Noy, R. and J.W. Pollard, *Immunity*, 2014. 41(1): p. 49-61

【文献】Fridlender, Z.G. and S.M. Albelda, *Carcinogenesis*, 2012. 33(5): p. 949-55

10

20

30

40

50

【文献】Mach, N., et al., Cancer Res, 2000. 60(12): p. 3239-46

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

当技術分野では、がん抗原に対してより親和性の高いTCRを開発する必要性が大いにある。本発明は、がん抗原NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープに特異的な改変TCR、ならびにがん免疫療法（例えば、養子細胞療法）のためにそのようなTCRを使用するための関連する組成物および方法を提供することによって、このようなおよび他の必要性に取り組む。

【課題を解決するための手段】

【0012】

一態様では、本明細書で提供されるのは、改変T細胞受容体（TCR）またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドであり、改変TCRは、非置換野生型（WT）TCRのβ鎖のCDR2と比較して、改変TCRのβ鎖の相補性決定領域（CDR）2内に単一アミノ酸置換を含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、改変TCRのβ鎖配列は、改変TCRのβ鎖またはその機能的断片のCDR2領域の外側で、非置換WT TCRのβ鎖またはその機能的断片と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、改変TCRのβ鎖またはその機能的断片は、CDR2領域に単一アミノ酸置換を有する非置換WT TCRのβ鎖またはその機能的断片のアミノ酸配列を含む（すなわち、非置換WT TCRのβ鎖またはその機能的断片のアミノ酸配列においてCDR2領域に単一アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む）。

【0015】

いくつかの実施形態において、非置換WT TCRのβ鎖は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

【0016】

いくつかの実施形態において、単一アミノ酸置換は、WT TCRに対して残基50、51、53、または55に存在する。いくつかの実施形態において、単一アミノ酸置換は、WT TCRに対して残基53または55に存在する。いくつかの実施形態において、単一アミノ酸置換は、I53E、I53F、I53W、またはD55Eである。

【0017】

いくつかの実施形態において、改変TCRは、WT TCRよりも高い結合親和性でがん抗原に結合する。いくつかの実施形態において、がん抗原は、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープ（配列番号8）である。

【0018】

いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの結合親和性は、がん抗原に対するWT TCRの結合親和性と比較して、約5～約75倍高い。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの結合親和性は、がん抗原に対するWT TCRの結合親和性と比較して、約10～約75倍高い。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの結合親和性は、がん抗原に対するWT TCRの結合親和性と比較して、約25～約75倍高い。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの結合親和性は、がん抗原に対するWT TCRの結合親和性と比較して、約40～約75倍高い。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの結合親和性は、がん抗原に対するWT TCRの結合親和性と比較して、約40～約60倍高い。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの結合親和性は、がん抗原に対するWT TCRの結合親和性と比較して、約40～約50倍高い。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの結合親和性は、がん抗原に対するWT TCRの結合親和性と比較して、約50倍高い。

10

20

30

40

50

【0019】

いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約 $0.30 \sim 4.5 \mu M$ の間である。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約 $0.30 \sim 2 \mu M$ の間である。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約 $2 \mu M \sim 3 \mu M$ の間である。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約 $3 \mu M \sim 4 \mu M$ の間である。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約 $0.41 \mu M$ である。いくつかの実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約 $3.89 \mu M$ である。

【0020】

いくつかの実施形態において、改変TCRは、配列番号2～5のいずれか1つのアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号2～5のいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0021】

いくつかの実施形態において、改変TCRは、配列番号11～14のいずれか1つのヌクレオチド配列、または配列番号11～14のいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる。

【0022】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、改変TCRの発現のための少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの調節エレメントはプロモーターである。

【0023】

様々な実施形態において、ポリヌクレオチドはDNA分子である。

【0024】

様々な実施形態において、ポリヌクレオチドは、RNA分子またはその誘導体である。

【0025】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクターであり、ポリヌクレオチドは、改変T細胞受容体 (TCR) の発現のための少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結される。

【0026】

いくつかの実施形態において、ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、またはワクシニアウイルスベクターである。

【0027】

いくつかの実施形態では、ベクターは非ウイルスベクターである。

【0028】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる改変TCRのβ鎖またはその機能的断片を含む、改変T細胞受容体 (TCR) である。

【0029】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、a) 本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる改変TCRのβ鎖またはその機能的断片、およびb) α鎖またはその機能的断片を含む、改変T細胞受容体 (TCR) である。

【0030】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる改変TCRのβ鎖のCDRを含む、改変T細胞受容体 (TCR) である。

【0031】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、a) 改変TCRのβ鎖の機能的断片であっ

10

20

30

40

50

て、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされるβ鎖のCDRを含む機能的断片、およびb) α鎖の機能的断片であって、α鎖のCDRを含む機能的断片；を含む改変T細胞受容体（TCR）である。

【0032】

いくつかの実施形態において、a)の機能的断片は、TCRβ鎖の定常領域をさらに含み、および／またはb)の機能的断片は、TCRα鎖の定常領域をさらに含む。一実施形態では、定常領域のいずれかがヒト起源である。一実施形態では、定常領域のいずれかがマウス起源である。

【0033】

いくつかの実施形態では、α鎖は、WT TCRのα鎖またはその機能的断片を含む。一実施形態では、WT TCRのα鎖は、配列番号7のアミノ酸配列を含む。

10

【0034】

いくつかの実施形態において、改変TCRは、配列番号2～5のいずれか1つのアミノ酸配列、またはその断片、あるいは配列番号2～5のいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0035】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、配列番号7のアミノ酸配列を含むα鎖および配列番号2～5のいずれか1つのアミノ酸配列を含むβ鎖を含む改変T細胞受容体（TCR）である。

【0036】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の改変T細胞受容体（TCR）を含む単離された宿主細胞（単離宿主細胞）である。

20

【0037】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含む単離宿主細胞である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、宿主細胞における改変T細胞受容体（TCR）の発現を媒介することができる少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結される。

【0038】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載のベクターを含む単離宿主細胞である。

30

【0039】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞はリンパ球系細胞（lymphoid cell）である。いくつかの実施形態では、リンパ球系細胞はT細胞である。いくつかの実施形態では、リンパ球系細胞はナチュラルキラー（NK）細胞である。

【0040】

様々な実施形態において、宿主細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、腫瘍流入領域リンパ節（tumor draining lymph node）または腫瘍浸潤物（tumor infiltrate）から得られる。

【0041】

様々な実施形態において、宿主細胞は、ex vivoで活性化および／または拡大されている。

40

【0042】

様々な実施形態において、宿主細胞は同種異系細胞である。

【0043】

様々な実施形態において、宿主細胞は自己細胞である。

【0044】

様々な実施形態において、宿主細胞は、疾患を有する対象から単離される。いくつかの実施形態では、疾患はがんである。いくつかの実施形態において、がんは、その細胞の表面上にがん抗原NY-ESO-1 157-165エピトープ（配列番号8）を提示する。い

50

くつかの実施形態では、がんは、骨髄腫、メラノーマ（黒色腫）、肉腫、膀胱がん（bladder cancer）、食道がん、肝細胞がん、頭頸部がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん（urinary bladder cancer）、皮膚がん、肺がん、卵巣がん、または脳腫瘍である。

【0045】

様々な実施形態において、宿主細胞は、1つまたは複数の外因性分子を発現するようにさらに操作される。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の外因性分子は、免疫シグナル伝達分子である。

【0046】

いくつかの実施形態において、免疫シグナル伝達分子はサイトカインである。

【0047】

いくつかの実施形態では、免疫シグナル伝達分子はケモカインである。

【0048】

いくつかの実施形態では、免疫シグナル伝達分子は成長因子である。一実施形態では、成長因子は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）である。

【0049】

がん抗原に結合するT細胞受容体（TCR）またはその機能的断片を含む単離宿主細胞であって、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を発現するようにさらに操作された宿主細胞も本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、がん抗原は、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープ（配列番号8）である。いくつかの実施形態において、T細胞受容体（TCR）はWT TCRである。一実施形態では、WT TCRのβ鎖は、配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号1に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、WT TCRのα鎖は、配列番号7のアミノ酸配列を含む。

【0050】

いくつかの実施形態において、GM-CSFのアミノ酸配列は、配列番号21、34または15、あるいは配列番号21、34または15に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、GM-CSFをコードするヌクレオチド配列は、配列番号22、35または16、あるいは配列番号22、35または16に対して少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0051】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の外因性分子は可溶性受容体である。

【0052】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の外因性分子はリガンドである。

【0053】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の外因性分子は、抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、抗体または抗体フラグメントである。

【0054】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の外因性分子は、ホスホジエステラーゼである。いくつかの実施形態において、ホスホジエステラーゼはPDE4B2である。

【0055】

がん抗原に結合するT細胞受容体（TCR）またはその機能的断片を含む単離宿主細胞であって、PDE4B2を発現するようにさらに操作された宿主細胞も本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、がん抗原は、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープ（配列番号8）である。いくつかの実施形態において、T細胞受容体（TCR）は、WT TCRである。一実施形態では、WT TCRのβ鎖は、配列番号1のアミノ酸配列、または配列番号1に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、WT TCRのα鎖は、配列番号7のアミノ酸配列を含む。

【0056】

いくつかの実施形態において、PDE4B2のアミノ酸配列は、配列番号27または2

10

20

30

40

50

9、あるいは配列番号27または29に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PDE4B2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号28または30、あるいは配列番号28または30に対して少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0057】

いくつかの実施形態において、1つまたは複数の外因性分子は、細胞表面受容体である。いくつかの実施形態において、細胞表面受容体は、キメラ抗原受容体である。いくつかの実施形態において、細胞表面受容体は、がん抗原NY-ESO-1157-165エピートープ（配列番号8）に結合しないT細胞受容体である。

【0058】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の改変T細胞受容体（TCR）またはその機能的断片と、T細胞上の細胞表面タンパク質に特異的に結合する免疫エフェクターポリペプチドとを含む二機能性分子である。いくつかの実施形態において、免疫エフェクターポリペプチドは、抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態において、免疫エフェクターポリペプチドは、単鎖可変領域フラグメント（scFv）を含む。

【0059】

いくつかの実施形態において、免疫エフェクターポリペプチドは、CD3に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、免疫エフェクターポリペプチドは、OKT3、UCHT-1、BMA031、または12F6に由来する抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態において、免疫エフェクターポリペプチドは、OKT3に由来する抗体または抗体フラグメント（例えば、scFv）を含む。いくつかの実施形態において、免疫エフェクターポリペプチドは、UCHT-1に由来する抗体または抗体フラグメント（例えば、scFv）を含む。いくつかの実施形態において、免疫エフェクターポリペプチドは、BMA031に由来する抗体または抗体フラグメント（例えば、scFv）を含む。いくつかの実施形態において、免疫エフェクターポリペプチドは、12F6に由来する抗体または抗体フラグメント（例えば、scFv）を含む。

【0060】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の宿主細胞、または本明細書に記載の二機能性分子、ならびに薬学的に許容される担体および／または賦形剤を含む医薬組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は養子細胞移入療法で使用される。

【0061】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載のベクターを用いて宿主細胞を遺伝子操作することを含む、本明細書に記載の宿主細胞を作製する方法である。

【0062】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、本明細書に記載の改変T細胞受容体（TCR）またはその機能的断片を発現するように宿主細胞を遺伝子操作する方法である。いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載のベクターを用いて宿主細胞を遺伝子操作することを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子操作ステップは、ウイルス遺伝子送達を介して実施される。いくつかの実施形態において、遺伝子操作ステップは、非ウイルス性遺伝子送達を介して実施される。いくつかの実施形態では、この方法はex vivoで実施される。いくつかの実施形態において、この方法は、ex vivoでの宿主細胞の活性化および／または拡大をさらに含む。

【0063】

細胞工学的方法のいくつかの実施形態において、改変TCRは、配列番号2～5のいずれか1つのアミノ酸配列、またはその断片、あるいは配列番号2～5のいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0064】

細胞工学的方法のいくつかの実施形態において、この方法は、1つまたは複数の外因性分子をさらに発現するように宿主細胞を遺伝子操作することをさらに含む。いくつかの実施形態において、1つまたは複数の外因性分子は、免疫シグナル伝達分子である。いくつかの実施形態において、外因性分子は、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、可溶性受容体、リガンド、ホスホジエステラーゼ、抗原結合タンパク質、または細胞表面受容体である。

【0065】

細胞工学的方法のいくつかの実施形態において、成長因子は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）である。一実施形態では、GM-CSFのアミノ酸配列は、配列番号21、34または15、あるいは配列番号21、34または15に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、GM-CSFをコードするヌクレオチド配列は、配列番号22、35または16、あるいは配列番号22、35または16に対して少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

10

【0066】

細胞工学的方法のいくつかの実施形態において、ホスホジエステラーゼはPDE4B2である。一実施形態では、PDE4B2のアミノ酸配列は、配列番号27または29、あるいは配列番号27または29に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、PDE4B2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号28または30、あるいは配列番号28または30に対して少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

20

【0067】

細胞工学的方法のいくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、抗体または抗体フラグメントである。

【0068】

細胞工学的方法のいくつかの実施形態において、細胞表面受容体は、キメラ抗原受容体、またはがん抗原NY-ESO-1 157-165 エピトープ（配列番号8）に結合しないT細胞受容体である。

【0069】

細胞工学的方法の様々な実施形態において、宿主細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞はリンパ球系細胞である。いくつかの実施形態では、リンパ球系細胞はT細胞である。いくつかの実施形態では、リンパ球系細胞はナチュラルキラー（NK）細胞である。

30

【0070】

細胞工学的方法の様々な実施形態において、宿主細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）、腫瘍流入領域リンパ節または腫瘍浸潤物から得られる。

【0071】

様々な実施形態において、宿主細胞は、*ex vivo*で活性化および／または拡大されている。

40

【0072】

様々な実施形態において、宿主細胞は同種異系細胞である。

【0073】

様々な実施形態において、宿主細胞は自己細胞である。

【0074】

様々な実施形態において、宿主細胞は、疾患を有する対象から単離される。いくつかの実施形態では、疾患はがんである。いくつかの実施形態において、がんは、その細胞の表面上にがん抗原NY-ESO-1 157-165 エピトープ（配列番号8）を提示する。いくつかの実施形態では、がんは、骨髄腫、メラノーマ、肉腫、膀胱がん（bladder cancer）、食道がん、肝細胞がん、頭頸部がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん（urinary bla

50

dder cancer)、皮膚がん、肺がん、卵巣がん、または脳腫瘍である。

【0075】

別の態様では、本明細書に提供されるのは、それを必要とする哺乳動物における免疫応答を刺激または増強する方法であって、本明細書に記載の改変T細胞受容体(TCR)を含むリンパ球系細胞、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の二機能性分子、本明細書に記載の組成物、または本明細書に記載の方法によって作製される宿主細胞の有効量を、前記哺乳動物に投与することを含む方法である。

【0076】

別の態様において、本明細書に提供されるのは、それを必要とする対象におけるがんの治療方法であって、本明細書に記載の改変T細胞受容体(TCR)を含むリンパ球系細胞、本明細書に記載の宿主細胞、本明細書に記載の二機能性分子、本明細書に記載の組成物、または本明細書に記載の方法によって作製される宿主細胞の有効量を、対象に投与することを含む方法である。いくつかの実施形態において、がんの細胞は、その表面上にがん抗原NY-ESO-1 157-165エピトープ(配列番号8)を提示する。

【0077】

治療方法のいくつかの実施形態では、がんは、骨髄腫、メラノーマ、肉腫、膀胱がん(bladder cancer)、食道がん、肝細胞がん、頭頸部がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん(urinary bladder cancer)、皮膚がん、肺がん、卵巣がん、または脳腫瘍である。

【0078】

いくつかの実施形態では、治療方法は：

- a) 対象または哺乳動物のT細胞を分離すること；
 - b) 本明細書に記載のポリヌクレオチドまたは本明細書に記載のベクターを用いて *ex vivo* で前記T細胞を遺伝子改変すること；
 - c) 任意選択で、ステップb)の前、後、または最中に、前記T細胞を拡大および／または活性化すること；および
 - d) 遺伝子改変されたT細胞を対象または哺乳動物に導入すること；
- を含む。

【0079】

様々な実施形態において、対象または哺乳動物はヒトである。

【0080】

本発明のこれらおよび他の態様は、以下の説明、特許請求の範囲、および図面において当業者に明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1A】図1A～1Eは、NY-ESO TCR変異体のα鎖およびβ鎖のアミノ酸配列を示す。図1Aは、TCR BC1α鎖およびβ鎖のアミノ酸配列を示す。

【図1B】図1Bは、TCR I53Eのα鎖およびβ鎖のアミノ酸配列を示す。

【図1C】図1Cは、TCR I53Fのα鎖およびβ鎖のアミノ酸配列を示す。

【図1D】図1Dは、TCR I53Wのα鎖およびβ鎖のアミノ酸配列を示す。

【図1E】図1Eは、TCR D55Eのα鎖およびβ鎖のアミノ酸配列を示す。

【図2A】図2Aおよび2Bは、様々なNY-ESO TCR変異体で形質導入されたCD4⁺T細胞のフローサイトメトリー分析を示す。図2Aは、様々なNY-ESO TCR変異体で形質導入されたCD4⁺T細胞のフローサイトメトリーTCRVb13.1分析を示す。

【図2B】図2Bは、様々なNY-ESO TCR変異体で形質導入されたCD4⁺T細胞のフローサイトメトリーHLA-A2.1 NY-ESOテトラマー分析を示す。

【図3A】図3Aおよび3Bは、様々なNY-ESO TCR変異体で形質導入されたCD8⁺T細胞のフローサイトメトリー分析を示す。図3Aは様々なNY-ESO TCR変異体で形質導入されたCD8⁺T細胞のフローサイトメトリーTCRVb13.1分析を示す。

【図3B】図3Bは、様々なNY-ESO TCR変異体で形質導入されたCD8⁺T細胞のフローサイトメトリーHLA-A2.1 NY-ESOテトラマー分析を示す。

【図4A】図4Aおよび4Bは、NY-ESO特異的TCRトランスジェニックCD4⁺およびCD8⁺T細胞の機能的アビディティ分析 (functional avidity analysis) を示す。図4Aは、様々なNY-ESO TCR変異体で形質導入されたCD4⁺T細胞によるインターロイキン2の産生を示す。使用した標的細胞は、NY-ESO₁₅₇₋₁₆₅ペプチドの連続10倍希釈液をロードしたHLA-A2.1陽性細胞株T2であった。「NT」は、形質導入されていない細胞 (非形質導入細胞) を指す。

【図4B】図4Bは様々なNY-ESO TCR変異体で形質導入されたCD8⁺T細胞によるインターフェロンγ (IFN-γ) の産生を示す。使用した標的細胞は、NY-ESO₁₅₇₋₁₆₅ペプチドの連続10倍希釈液をロードしたHLA-A2.1陽性細胞株T2であった。「NT」は非形質導入細胞を指す。

【図5】図5は、NY-ESO TCRトランスジェニックCD4⁺細胞のIL-2産生を示す。使用した標的細胞は、Me275 (HLA/A2-NY-ESO-1を自然に発現する腫瘍細胞株)、A2008-A2 NLMおよびOVCA5 NLM (HLA-A2-NY-ESO-1を発現するように遺伝子操作された細胞)、ならびにNA8、A2008-A2およびOVCA5 (HLA/A2-NY-ESO-1を発現していない腫瘍細胞株) であった。

【図6】図6は、NY-ESO TCRトランスジェニックCD4⁺細胞のIL-2産生を示す。使用した標的細胞は、HLA-A2.1陽性、NY-ESO陰性細胞株NA8、ならびにHLA-A2.1陽性、NY-ESO陽性細胞株Me275、A375、Saos-2およびU266であった。

【図7】図7は、NY-ESO TCRトランスジェニックCD8⁺細胞のIFN-γ産生を示す。使用した標的細胞は、Me275 (HLA/A2-NY-ESO-1を自然に発現する腫瘍細胞株)、A2008-A2 NLMおよびOVCA5 NLM (HLA-A2-NY-ESO-1を発現するように遺伝子操作された細胞)、ならびにNA8、A2008-A2およびOVCA5 (HLA/A2-NY-ESO-1を発現していない腫瘍細胞株) であった。

【図8】図8は、NY-ESO TCRトランスジェニックCD8⁺細胞のIFN-γ産生を示す。使用した標的細胞は、HLA-A2.1陽性、NY-ESO陰性細胞株NA8、ならびにHLA-A2.1陽性、NY-ESO陽性細胞株Me275、A375、Saos-2およびU266であった。

【図9】図9は、ペプチドパルス標的細胞との関連でのNY-ESO TCRトランスジェニックCD4⁺細胞 (野生型BC1 TCR、I53E、およびI53Fを発現するCD4⁺細胞) のIL-2産生を示す。CD4⁺T細胞とペプチドをロードしたT2標的細胞との24時間共培養。

【図10】図10は、ペプチドパルス標的細胞との関連でのNY-ESO TCRトランスジェニックCD8⁺細胞 (野生型BC1 TCR、I53E、およびI53Fを発現するCD8⁺細胞) のIFN-γ産生を示す。CD4⁺T細胞とペプチドをロードした標的細胞との24時間共培養。

【図11】図11は、様々な腫瘍細胞株に対する、I53F、I53W、およびI64LY TCRで形質導入されたCD8⁺T細胞のIFN-γ産生を示す。使用した標的細胞は、NY-ESO陰性細胞株U87MG、OVCA3、A431、A673、SKOV3、RD-ES、SK-N-ASおよびHT-29、ならびにNY-ESO陽性細胞株A375であった。

【図12】図12は、様々な時点における、野生型BC1 TCR、I53E TCR、およびI53F TCRを発現するCD8⁺細胞による殺細胞活性 (Incucyteにより測定) を示す。「NT」は非形質導入細胞を指す。

【図13A】図13Aおよび13Bは、WINNアッセイを使用したNY-ESO TCRトランスジェニック細胞のin vivo評価を示す。図13Aは、アッセイの概略図

10

20

30

40

50

を示す。HLA-A2⁺/NY-ESO⁺腫瘍細胞株Me275をNY-ESO形質導入T細胞と混合し、NSGマウスの右側腹部に皮下注射（s.c）した。CD4⁺とCD8⁺のパーセンテージはそれぞれ30%と70%であった。腫瘍サイズを週に2回測定した。

【図13B】図13Bはアッセイの結果を示す。

【図14A】図14Aおよび14Bは、NSGマウスを使用したNY-ESO TCRトランスジェニック細胞のin vivo評価を示す。図14Aは、アッセイの概略図を示す。0日目（d0）に、 0.5×10^6 のMe275細胞をNSGマウスの脇腹に皮下注射（s.c）した。腫瘍サイズが約50~100mm³になったときに、 1.0×10^6 のNY-ESO特異的T細胞を10日目（d10）と13日目（d13）に腫瘍周囲に注射した。CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の割合はそれぞれ30%と70%であった。

10

【図14B】図14Bはアッセイの結果を示す。

【図15A】図15Aおよび15Bは、NSGマウスを使用したNY-ESO TCRトランスジェニック細胞のin vivo評価を示す。図15Aはアッセイの概略図を示す。0日目（d0）に、 5×10^6 のMe275細胞をNSGマウスの脇腹に皮下注射（s.c）した。腫瘍のサイズが約50~100mm³になったときに、 1.0×10^6 のNY-ESO特異的T細胞を10日目（d10）と13日目（d13）に静脈内注射（i.v.）した。CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の割合はそれぞれ30%と70%であった。

【図15B】図15Bはアッセイの結果を示す。

【図16A】図16Aおよび16Bは、NSGマウスを使用したNY-ESO TCRトランスジェニック細胞のin vivo評価を示す。図16Aはアッセイの概略図を示す。0日目（d0）に、 5×10^6 のMe275細胞をNSGマウスの脇腹に皮下注射（s.c）した。腫瘍のサイズが約50~100mm³になったときに、10日目（d10）と13日目（d13）に様々な数のNY-ESO特異的T細胞を静脈内注射（i.v.）した。CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞の割合はそれぞれ30%と70%であった。

20

【図16B】図16Bはアッセイの結果を示す。

【図17A】図17A~17Cは、NY-ESO-1 TCRを安定発現しかつマウスGM-CSFを分泌するように、ヒトT細胞を効率的に共操作（co-engineered）できることを示す。図17Aは、レトロウイルスマウスGM-CSF構築物およびレンチウイルスNY-ESO-1 TCR構築物の概略図を示す。

【図17B】図17Bは、ウイルス形質導入後7日目のヒトCD8⁺T細胞およびCD4⁺T細胞の代表的な等高線プロットを示す。NY-ESO-1 TCRの発現は、HLA-A2拘束性NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅テトラマーを使用して確認し、一方、マウスGM-CSFの発現は、表面のThy1.1レポータータンパク質の検出によって追跡した。「NT」は非形質導入T細胞を指す。

30

【図17C】図17Cは、分泌されたマウスGM-CSFが、形質導入されたCD8⁺T細胞培養物の上清においてELISAによって検出され得ることを示す。「NT」は非形質導入T細胞を指す。

【図18A】図18Aおよび18Bは、分泌されたマウスGM-CSFがヒトT細胞の活性に影響を及ぼさないことを示す。NY-ESO-1 TCRで操作されたT細胞によって分泌されたIFN γ の検出が、HLA-A2⁺NY-ESO-1⁺腫瘍細胞の認識に基づくことを示す。IFN γ レベルに対するマウスGM-CSFの影響はない。図18Aと図18Bは同じ実験を示す。「NT」は形質転換されていないことを指す。統計的有意性は、一元配置分散分析（one-way ANOVA）によって決定した。****p<0.0001。

40

【図18B】図18Bは、NY-ESO-1 TCRで操作されたT細胞がHLA-A2⁺NY-ESO-1⁺腫瘍細胞を容易に殺すことができ、それらの細胞傷害活性がマウスGM-CSFによる影響を受けないことを示す。「NT」は形質転換されていないことを指す。統計的有意性は、一元配置分散分析（one-way ANOVA）によって決定した。****p<0.0001。

【図19A】図19A~19Cは、腫瘍微小環境で分泌されたT細胞由来マウスGM-C

50

S Fが、NSGヒトメラノーマ異種移植マウスモデルにおいて、NY-ESO-1 特異的 T細胞による腫瘍増殖の制御を有意に増強できることを実証する。図19Aは、Winn アッセイによるマウスにおける腫瘍増殖を示す。マウスGM-CSFを分泌するように共操作されたヒトNY-ESO-1 TCR発現T細胞は、NY-ESO-1 TCRのみを発現する対照T細胞と比較して、Me275メラノーマ細胞の生着および確立を効果的に遅らせることができる。「NT」は非形質導入T細胞を指す。in vivo 応答の統計的有意性は、一元配置分散分析または個々の時点の対応のないt検定によって決定した。* ** $p < 0.001$ 。

【図19B】図19Bは、Winnアッセイによるマウスの生存率を示す。NY-ESO-1 TCR発現マウスGM-CSF分泌T細胞で処置されたマウスの40%は腫瘍がなかった。生存曲線の統計的有意性は、Mantel-Coxログランク検定によって決定した。* ** $p < 0.01$ 。

10

【図19C】図19Cは、 2×10^7 のNY-ESO-1 TCR発現マウスGM-CSF分泌T細胞の養子移入が、NY-ESO-1 TCR単独と比較して、確立されたMe275腫瘍のより良好な腫瘍制御を示したことを示す。「NT」は非形質導入T細胞を指す。in vivo 応答の統計的有意性は、一元配置分散分析または個々の時点の対応のないt検定によって決定した。*** $p < 0.001$ 。

【図20A】図20Aは、マウスGM-CSFの例示的なタンパク質およびヌクレオチド配列を提供する。

【図20B】図20Bは、ヒトGM-CSFの例示的なタンパク質およびヌクレオチド配列を提供する。

20

【図21】図21は、初代ヒトT細胞に効果的に形質導入して外因性ホスホジエステラーゼ4B2 (PDE4B2)を発現させることができ、また同時形質導入して外因性PDE4B2とNY-ESO-1 TCRバリエーションβ-I53Fを発現させることができることを示す。形質導入されていない（非形質導入）、PDE4B2を導入された、ならびにPDE4B2 & NY-ESO-1 TCRを導入されたCD4⁺およびCD8⁺T細胞について、7日目に外因性PDE4B2またはNY-ESO-1 TCRバリエーションβ-I53Fの発現をフローサイトメトリーで調べた結果が示されている。

【図22】図22は、PDE4B2の過剰発現が細胞内cAMPの蓄積を防ぐことを示す。フォルスコリン (Fsk) またはPGE₂に1時間曝露したときの、eGFP（灰色の線）またはPDE4B2（黒色の線）で形質導入された休止CD4⁺T細胞の細胞内cAMPレベルが示されている。処理後、T細胞を溶解させ、cAMPレベルをELISAで定量化した。示されている結果は、すべてのcAMP測定が三重で実行された単一の実験からのものである。エラーバーは標準偏差 (SD) を表す。

30

【図23A】図23Aおよび23Bは、PDE4B2で形質導入されたT細胞によるTh-1サイトカイン産生を示す。図23Aは、フォルスコリン (Fsk) またはPGE₂の存在下での、プレート結合αCD3および可溶性αCD28有り（実線：刺激）または無し（点線：非刺激）での刺激の7時間後の細胞内サイトカイン染色 (ICS) によって決定された、eGFPまたはPDE4B2を形質導入された休止CD4⁺T細胞によるIFNγまたはTNF-αの産生を示す。生きているCD45⁺eGFP⁺リンパ球（灰色線）または生きているCD45⁺外因性PDE4B2⁺リンパ球（黒線）の内のIFNγ⁺またはTNF-α⁺細胞のパーセンテージ、ならびに代表的なプロットが示されている。示されている結果は、すべての条件について二重で実施された単一の実験からのものである。エラーバーはSDを表す。

40

【図23B】図23Bは、ELISAによって測定された、PGE₂またはフォルスコリンの存在下でのNY-ESO-1提示メラノーマ細胞A375との48時間の共培養に反応した、eGFP、PDE4B2、eGFP & NY-ESO-1 TCR、またはPDE4B2 & NY-ESO-1 TCRを形質導入された休止CD8⁺T細胞によるIFNγの分泌を示す。共培養上清のIFNγ濃度が示されている。エラーバーはSDを表す。

【図24】図24は、PDE4B2の過剰発現が、細胞内cAMP蓄積を誘導する条件下

50

で増殖を促進することを示す。eGFP（灰色）またはPDE4B2（黒色）を形質導入されたCD4⁺T細胞の増殖能力は、BrDU取り込みアッセイによって決定した。T細胞を、プレート結合αCD3有り（実線：刺激）または無し（点線：非刺激）で、PGE₂またはフォルスコリン（Fsk）の存在下で48時間再刺激した。生きているCD45⁺リンパ球の内のBrDU⁺細胞のパーセンテージ（左側のグラフ）、これらの集団のBrDUMFI（中央のグラフ）、ならびに代表的なプロットが示されている。示されている結果は、すべての条件について二重で実施された単一の実験からのものである。エラーバーはSDを表す。

【図25】図25は、PDE4B2の過剰発現が、PGE₂の存在下で細胞傷害性を促進することを示す。eGFP（白三角）、PDE4B2（白丸）、eGFP&NY-ESO-1TCR（黒三角）、またはPDE4B2&NY-ESO-1TCR（黒丸）を形質導入された休止CD4（左グラフ）またはCD8（左グラフ）T細胞が、PGE₂の存在下（黒線）または不在下（灰色線）でNY-ESO-1提示メラノーマ細胞A375の拡大を抑制する能力をIncucyteによって評価した。ウェルあたりのA375細胞の核が占めるmm²に対応する赤色オブジェクト面積（red object area）の値が表されている。示されている結果は、すべての条件が3重で実施された単一の実験からのものである。ウェルごとに4つの異なる平面が分析に組み込まれた。エラーバーはSDを表す。

【図26】図26は、ヒトおよびマウスのPDE4B2の例示的なタンパク質配列を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0082】

本発明は、一般に、がん抗原NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープへの結合親和性が改善された改変T細胞受容体（TCR）を提供する。

【0083】

本発明はまた、関連するポリペプチドおよびタンパク質、ならびに関連する核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、および遺伝子操作された細胞を含むがこれらに限定されない細胞集団を提供する。さらに、本発明は、改変TCRを含む遺伝子操作された細胞を提供する。本発明によってさらに提供されるのは、本発明の改変TCRおよび細胞に関連する医薬組成物である。

【0084】

さらに、本発明は、改変TCRを発現するリンパ球系細胞の遺伝子操作の方法を提供する。本発明によってさらに提供されるのは、改変TCR、ならびに追加の受容体（キメラ抗原受容体、またはがん抗原NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープに対してではない受容体が含まれるが、これらに限定されない）または可溶性タンパク質（サイトカイン、ケモカイン、成長因子、可溶性受容体、リガンド、抗体フラグメント、および抗原結合ドメインが含まれるがこれらに限定されない）を発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。養子細胞移入療法においてそのような遺伝子操作されたリンパ球系細胞を使用する方法も本明細書に提供される。

【0085】

また、本発明によって提供されるのは、対象におけるがんを治療する方法である。この方法は、そのようながんを患っている対象に、本発明の改変TCRを提示するリンパ球系細胞の有効量を投与することを含む。また、本発明によって提供されるのは、哺乳動物における免疫応答を刺激または増強する方法であって、本発明の遺伝子操作されたリンパ球系細胞の有効量を哺乳動物に投与することを含む。

【0086】

一態様では、本明細書で提供されるのは、改変TCRとコロニー刺激因子サイトカイン／ケモカインファミリーからのサイトカインおよび／またはケモカインとを発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。コロニー刺激因子サイトカイン／ケモカインファミリーのメンバーは、これらの骨髄細胞のほとんどに作用し、それらの活性を調節することが知られている（Ushach, I. and A. Zlotnik, Journal of Leukocyte Biology, 201

10

20

30

40

50

6. 100: p. 481-489)。具体的には、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、単球、マクロファージ、顆粒球、および樹状細胞 (DC) の生物学において免疫刺激の役割を果たすことが知られている。GM-CSF は、当初造血成長因子として説明されてたが、自己免疫疾患やがんなど、多くの病的状態における重要な免疫調節因子として浮上している。GM-CSF は、造血系 (すなわち、マクロファージ、ナチュラルキラー (NK) 細胞、活性化 T 細胞)、および非造血系 (内皮細胞や線維芽細胞など) 起源の両方の細胞により分泌される。健康な個体の血清では検出できないが、GM-CSF レベルは炎症中に急速に増加する (Becher, B., S. Tugues, and M. Greter, *Immunity*, 2016. 45: p. 963-973)。GM-CSF は、そのコグネイト受容体 (cognate receptor)、すなわち GM-CSF 受容体 (GM-CSF-R) を介してその多面的効果を発揮し、主に単球/マクロファージおよび顆粒球系統の細胞、ならびに DC に見られる。リガンドが結合すると、GM-CSF 受容体は、細胞の生存、増殖、分化、および活性化に関連するシグナルを伝達する (Hercus, T.R., et al., *Blood*, 2009. 114: p. 1289-1298)。そのような専門の抗原提示細胞 (APC) の運命を制御することによって、GM-CSF は、T 細胞の活性を間接的に調節でき、したがって適応免疫と自然免疫の間の架け橋として機能する (Shi, Y., et al., *Cell Res.* 2006. 16(2):126-33)。

【0087】

がん治療において、GM-CSF は、化学療法および/または幹細胞移植レジメン後の免疫系の骨髄コンパートメントの回復を加速および強化するだけでなく、がん患者の支持療法において中心的な役割を果たしてきた (Arellano, M. and S. Lonial, *Biologics*, 2008. 2(1):13-27)。さらに、DC の発生および分化におけるその極めて重要な役割により、GM-CSF は、DC を活性化する GM-CSF 分泌がんワクチン (Gupta, R. and L.A. Emens, *Discovery medicine*, 2010. 10(50): p. 52-60) または一次免疫療法としての GM-CSF により活性化された/偏向された DC (GM-CSF-activated/skewed DC) の養子移入 (Mookerjee, A., M. Graciotti, and L. Kandalaft, *BiolImpacts: BI*, 2018. 8(3): p. 211-221) のいずれかの形態で、DC ベースの免疫療法の中核を担っている。DC は、GM-CSF を強制的に過剰発現する腫瘍を使用した前臨床試験 (Shi, F.S., et al., *Cancer Gene Ther*, 1999. 6(1): p. 81-8) における、またはがん患者での可溶性 GM-CSF の投与後 (Nasi, M.L., et al., *Cytokines Cell Mol Ther*, 1999. 5(3): p. 139-44) における、堅牢な抗腫瘍応答の主要なメディエーターとしても浮上している。有望な結果にもかかわらず、臨床での単一補助療法 (single adjuvant therapy) としての GM-CSF の使用は、かなり不十分であることが証明されており (Lawson, D. H., et al., *J Clin Oncol*, 2015. 33(34): p. 4066-76)、また用量関連毒性の出現により制限されている (Antman, K.S., et al., *N Engl J Med*, 1988. 319(10): p. 593-8)。興味深いことに、別の一連の研究は、腫瘍由来の GM-CSF が、腫瘍微小環境において CD11b⁺Gr-1⁺ 骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の免疫誘引を担い、それが次に腫瘍の免疫回避 (tumor evasion) を促進するという、抗腫瘍応答の GM-CSF 駆動免疫抑制メカニズムを明らかにしている (Pylayeva-Gupta, Y., et al., *Cancer Cell*, 2012. 21: p. 836-847)。

【0088】

養子 T 細胞移入戦略の恩恵を最大化し、GM-CSF の免疫調節性抗がん特性を活用するとともに、望ましくない副作用や標的外毒性を回避するために、高親和性 NY-ESO-1 特異的 TCR および GM-CSF を異所的に発現させるように T 細胞を遺伝子的に共操作 (genetically co-engineered) する組み合わせアプローチが開発された。NY-ESO-1 特異的 TCR および GM-CSF を発現する T 細胞の一実施形態は、以下の実施例 6 に例示されている。ヒト T 細胞は、増殖能や抗腫瘍活性に影響を与えることなく、完全に機能的な可溶性 GM-CSF を効率的に分泌し、*in vivo* でヒト NY-ESO-1⁺メラノーマ腫瘍に対して強力な抗腫瘍応答を誘発することが示された。

【0089】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、改変 TCR およびホスホジエステラーゼを

10

20

30

40

50

発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。いくつかの実施形態では、ホスホジエステラーゼは、ホスホジエステラーゼ 4 B 2 (P D E 4 B 2) である。細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリックAMP (cAMP) は、T細胞において強力な免疫抑制シグナル伝達分子として機能し、プロスタグランジンE₂ (P G E₂)、アデノシン、および制御性T細胞の機能などの多様な腫瘍関連抑制因子によってアップレギュレートされる。ホスホジエステラーゼの過剰発現は、cAMPシグナル伝達を低下させ、P G E₂などの抑制因子の阻害に対する抗腫瘍T細胞の耐性を高めることができる。米国特許第9,976,121号およびSchmetterer, KG., Front. Immunol., 30 July 2019を参照されたい(これらはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0090】

定義

別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【0091】

本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、抗体に特異的に結合することができるまたはT細胞受容体によって認識されるペプチド断片を生成することができる、および/または免疫応答を誘導することができる分子および/または物質である。抗原は、1つまたは複数の「エピトープ」を含み得る。特定の実施形態では、抗原はいくつかのエピトープを有する。エピトープは、MHC分子との関連で抗体またはリンパ球によって認識される。様々な実施形態において、抗原はNY-ESO-1である。様々な実施形態において、エピトープは、NY-ESO-1 157-165である。

【0092】

本明細書で使用される場合、交換可能に使用される「腫瘍抗原」または「がん抗原」という用語は、腫瘍もしくはがん細胞によって特異的に発現されるまたは腫瘍に関連する抗原として広く定義され、例えば、過剰発現または異常発現された抗原、発がん性ウイルス (oncogenic virus) によって産生される抗原、がん胎児性抗原、改変細胞表面糖脂質および糖タンパク質抗原、細胞型特異的分化抗原などである。がん細胞の表面に存在する腫瘍抗原は、個体の正常な体細胞の表面に存在しない抗原であり、すなわち、その抗原は、がん細胞において免疫系に曝露されるが、正常な体細胞では曝露されない。抗原は、腫瘍細胞の細胞表面に発現される場合があり、そこで抗原はBリンパ球 (B細胞) などの体液性免疫系の構成要素によって認識される。細胞内腫瘍抗原は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子と複合体を形成する短いペプチド断片にプロセッシングされ、がん細胞の細胞表面に提示され、そこでTリンパ球 (T細胞) またはナチュラルキラー細胞のT細胞受容体 (TCR) によって認識される。好ましくは、腫瘍抗原は、正常細胞によって発現されないか、または少なくとも腫瘍細胞と同レベルまでは発現されないものである。

【0093】

本明細書で使用される「機能的断片」という用語は、全長ポリペプチドまたはタンパク質の少なくとも1つの機能を保持するポリペプチドもしくはタンパク質の断片、またはポリペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを指す。機能的断片は、全長ポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列の、少なくとも5個の連続アミノ酸残基、少なくとも6個の連続アミノ酸残基、少なくとも7個の連続アミノ酸残基、少なくとも8個の連続アミノ酸残基、少なくとも9個の連続アミノ酸残基、少なくとも10個の連続アミノ酸残基、少なくとも11個の連続アミノ酸残基、少なくとも12個の連続アミノ酸残基、少なくとも13個の連続アミノ酸残基、少なくとも14個の連続アミノ酸残基、少なくとも15個の連続アミノ酸残基、少なくとも20個の連続アミノ酸残基、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、少なくとも40個の連続アミノ酸残基、少なくとも50個の連続アミノ酸残基、少なくとも60個の連続アミノ酸残基、少なくとも70個の連続アミノ酸残基、少なくとも80個の連続アミノ酸残基、少なくとも90個の連続アミノ酸残基、少なくとも100個の連続アミノ酸残基、少なくとも125個の連続アミノ酸残基、少なくとも150個の連続アミノ酸残基、少なくとも175個の連続アミノ酸残基、少なく

10

20

30

40

50

とも200個の連続アミノ酸残基、または少なくとも250個の連続アミノ酸残基のアミノ酸配列を含み得る。ポリペプチドまたはタンパク質の機能的断片は、全長タンパク質またはポリペプチドの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、またはそれ以上の機能を保持し得る。例えば、特定の抗原（またはエピトープ）に免疫特異的に結合するTCRの機能的断片は、その抗原（またはエピトープ）に免疫特異的に結合する能力を保持し得る。いくつかの実施形態において、TCRの機能的断片は、TCRの α 鎖および／または β 鎖の1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を含む。いくつかの実施形態において、TCRの機能的断片は、TCRの α 鎖および／または β 鎖を含む。

【0094】

本明細書で使用される「バリエーション」という用語は、野生型ポリペプチド、タンパク質、またはポリヌクレオチドと実質的なまたは有意な配列同一性または類似性を有する改変ポリペプチド、タンパク質、またはポリヌクレオチドを指す。バリエーションは、そのバリエーションの野生型ポリペプチド、タンパク質、またはポリヌクレオチドと比較して、同じ生物学的活性を保持し得るか、あるいは変更された（例えば、改善された、低減された、または撤廃された）生物学的活性を有し得る。バリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸残基またはヌクレオチドの挿入、欠失、置換を含み得る。

【0095】

「抗原結合タンパク質」という用語は、目的の抗原またはポリペプチドあるいはその断片に結合する任意のタンパク質を指す。タンパク質は、天然由来または合成のいずれかであり得る。抗原結合タンパク質の例には、抗体；抗体に由来するポリペプチドまたはフラグメント、例えば、単鎖可変領域フラグメント(s c F v)、F a b、F a b'、F (a b')₂、およびF vフラグメント；例えば、TCR可変ドメインなどのT細胞受容体に由来するポリペプチド；シグナル伝達ドメイン（例えば、「サイトカイン (cytokine)」）に人工的に融合され得る分泌因子（例えば、サイトカイン、成長因子）；および目的の抗原に結合する任意のリガンドまたは受容体断片（例えば、CD27、NKGD2D）が含まれるが、これらに限定されない。コンビナトリアルライブラリーを使用して、治療標的に高い親和性で結合するペプチドを同定することもできる。

【0096】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、および抗体フラグメント（例えば、一本鎖抗体、F a bフラグメント、F vフラグメント、単鎖F vフラグメント(s c F v)、(F a b)₂'フラグメントなどの二価抗体フラグメント、F (a b')フラグメント、ジスルフィド結合F v (s d F v)、イントラボディ (intrabody)、ミニボディ (minibody)、ジアボディ (diabody)、トリアボディ (triabody)、デカボディ (decabody)、および他のドメイン抗体（例えば、Holt, L. J., et al., Trends Bio technol. (2003), 21, 11, 484-490)）を指す。「抗体」という用語はまた、米国特許出願公開第2007/0004909号に開示されているような共有結合型ジアボディ、および米国特許出願公開第2009/0060910号に開示されているようなIg-DARTSも指す。本明細書に記載の方法において有用な抗体には、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスの免疫グロブリン分子が含まれる。

【0097】

「ベクター」、「クローニングベクター」および「発現ベクター」という用語は、宿主を遺伝子改変し、導入された配列の発現（例えば、転写および翻訳）を促進するように、DNAまたはRNA配列（例えば、外来遺伝子）を宿主細胞に導入することができるビヒクルを意味する。ベクターには、プラスミド、合成されたRNAおよびDNA分子、トランスポゾン、ファージ、ウイルスなどが含まれる。特定の実施形態において、ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、またはワクシニアベクターなどであるが、これらに限定され

10

20

30

40

50

ないウイルスベクターである。

【0098】

「調節エレメント」という用語は、核酸配列の発現のいくつかの側面を制御する任意のシス作用性遺伝子エレメントを指す。いくつかの実施形態において、「プロモーター」という用語は、本質的に、転写を開始するために必要とされる最小の配列を含む。いくつかの実施形態において、「プロモーター」という用語は、転写を開始する配列を含み、加えて、一般にそれぞれ「エンハンサーエレメント」および「リプレッサーエレメント」と呼ばれる、転写をアップレギュレートまたはダウンレギュレートすることができる配列も含む。いくつかの実施形態では、プロモーターはリンパ球特異的プロモーターである。

【0099】

本明細書で使用される「作動可能に連結され」という用語は、ヌクレオチド配列が別のヌクレオチド配列と機能的関係に置かれることを意味する。例えば、コード配列がプロモーター配列に作動可能に連結されている場合、これは一般に、プロモーターがコード配列の転写を促進し得ることを意味する。作動可能に連結されているとは、連結されているDNA配列が通常は隣接しており、2つのタンパク質コード領域を結合するために必要な場合は、隣接しておりかつリーディングフレーム内にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーはプロモーターから数キロベース離れているときに機能する場合があります、またイントロン配列は可変長であり得るため、一部のヌクレオチド配列は作動可能に連結されているが隣接していない場合もある。

【0100】

「T細胞」および「Tリンパ球」という用語は交換可能であり、本明細書では同義語として使用される。本明細書で使用される場合、T細胞には、胸腺細胞(thymocyte)、ナイーブTリンパ球、未成熟Tリンパ球、成熟Tリンパ球、休止Tリンパ球、または活性化Tリンパ球が含まれる。T細胞は、Tヘルパー(T_h)細胞、例えば、Tヘルパー1(T_h1)またはTヘルパー2(T_h2)細胞であり得る。T細胞はヘルパーT細胞(HTL; CD4⁺T細胞)CD4⁺T細胞、細胞傷害性T細胞(CTL; CD8⁺T細胞)、腫瘍浸潤性細胞傷害性T細胞(TIL; CD8⁺T細胞)、CD4⁺CD8⁺T細胞、またはT細胞のその他のサブセットであってよい。特定の実施形態での使用に適したT細胞の他の例示的な集団には、ナイーブT細胞およびメモリーT細胞が含まれる。「NK T細胞」も含まれ、それは、セミインバリエント(semi-invariant)αβ T細胞受容体を発現するが、NK1.1などのNK細胞に通常関連する様々な分子マーカーも発現する特殊なT細胞集団を指す。NK T細胞には、NK1.1⁺およびNK1.1⁻、ならびにCD4⁺、CD4⁻、CD8⁺、およびCD8⁻細胞が含まれる。NK T細胞上のTCRは、MHC I様分子CDIdによって提示される糖脂質抗原を認識するという点で独特である。NK T細胞は、炎症または免疫寛容のいずれかを促進するサイトカインを産生する能力により、保護効果または有害効果のいずれかを有することができる。また、「ガンマデルタT細胞(γδ T細胞)」も含まれ、これは、その表面上に別のTCRを有するT細胞の小さなサブセットである特殊な集団を指し、TCRがα-TCR鎖およびβ-TCR鎖と呼ばれる2つの糖タンパク質鎖で構成される大多数のT細胞とは異なり、γδ T細胞のTCRはγ鎖とδ鎖で構成される。γδ T細胞は、免疫監視および免疫調節において役割を果たすことができ、IL-17の重要な供給源であり、堅牢なCD8⁺細胞傷害性T細胞応答を誘導することがわかっている。また、「制御性T細胞」または「Treg」も含まれ、これは、異常または過剰な免疫応答を抑制し、免疫寛容において役割を果たすT細胞を指す。Treg細胞は典型的には転写因子Foxp3陽性CD4⁺T細胞であり、IL-10産生CD4⁺T細胞である転写因子Foxp3陰性制御性T細胞も含むことができる。

【0101】

「ナチュラルキラー細胞」および「NK細胞」という用語は、交換可能に使用され、本明細書では同義語として使用される。本明細書で使用される場合、NK細胞は、CD16⁺CD56⁺および／またはCD57⁺TCR⁻表現型を有する分化したリンパ球を指す。NKは、特定の細胞溶解性酵素の活性化によって「自己」MHC／HLA抗原を発現しな

10

20

30

40

50

い細胞に結合して殺す能力、NK活性化受容体のリガンドを発現する腫瘍細胞または他の罹患細胞に結合して殺す能力、および免疫応答を刺激または阻害するサイトカインと呼ばれるタンパク質分子を放出する能力を特徴とする。

【0102】

本明細書で使用される場合、「外因性」は、自然界に見られる特定の細胞に由来しない任意の分子を指す。外因性分子は、人工的または自然的手段によって宿主細胞に導入された核酸分子から発現され得る。

【0103】

状況、障害または状態を「治療する (treat)」または「治療 (treatment)」という用語には：1) その状況、障害または状態を患っているまたはその素因を有している可能性があるが、その状況、障害または状態の臨床的または無症候性症状をまだ経験または表示していない対象において、その状況、障害または状態の少なくとも1つの臨床症状または無症候性症状の出現の発生および／または可能性を予防、遅延または低減させること；または(2) その状況、障害または状態を阻害する、すなわち、疾患またはその再発、あるいはそれらの少なくとも1つの臨床症状または無症候性症状の発生を停止、軽減または遅延させること；または(3) 疾患を軽減する、すなわち、状況、障害または状態あるいはそれらの臨床症状または無症候性症状の少なくとも1つの後退を生じさせること；が含まれる。治療される対象に対する利益は、統計的に有意であるか、あるいは少なくとも患者または医師に知覚可能であるかのいずれかである。

【0104】

用量または量に適用される「有効」という用語は、それを必要とする対象に投与した際に所望の活性をもたらすのに十分な化合物または医薬組成物の量を指す。有効成分の組み合わせを投与する場合、組み合わせの有効量は、個別に投与された場合に有効であったであろう各成分の量を含む場合も含まない場合もあることに留意されたい。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢、および一般的な状態、治療される状態の重症度、使用される特定の薬物、投与方法などに応じて、対象ごとに異なる。

【0105】

本明細書に記載の組成物に関連して使用される「薬学的に許容される」という句は、生理学的に許容可能であり、かつ哺乳動物（例えば、ヒト）に投与した場合に通常は望ましくない反応を生じない、そのような組成物の分子種および他の成分を指す。好ましくは、「薬学的に許容される」という用語は、米国連邦政府または州政府の規制当局によって承認されているか、または哺乳動物、より具体的にはヒトで使用するために米国薬局方または他の一般に認められた薬局方に掲載されていることを意味する。

【0106】

「患者」、「個体」、「対象」、および「動物」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、ヒトおよび獣医動物（例えば、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタなど）、ならびに実験動物モデルを含むがそれらに限定されない哺乳動物を指す。好ましい実施形態では、対象はヒトである。

【0107】

「担体」という用語は、化合物とともに投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような医薬担体は、水および油などの無菌液体であってよく、それら油には、ピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの、石油、動物、植物または合成起源のものが含まれる。水または水溶液、生理食塩水、ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液が、特に注射用溶液のための担体として好ましく使用される。あるいは、担体は、結合剤（圧縮錠剤用）、流動化剤 (glidant)、封入剤、香味剤、および着色剤のうちの1つまたは複数を含むがこれらに限定されない固体剤形担体であってもよい。適切な医薬担体は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。

【0108】

単数形「a」、「an」、および「the」には、文脈で明確に指示されていない限り

10

20

30

40

50

、複数への言及が含まれる。したがって、例えば、「方法」への言及は、本明細書に記載されたおよび／または本開示を読むと当業者に明らかになるタイプの1つまたは複数の方法、および／またはステップを含む。

【0109】

「約」または「おおよそ」という用語は、統計的に意味のある値の範囲内にあることを含む。このような範囲は、所与の値または範囲の1桁以内、好ましくは50%以内、より好ましくは20%以内、さらにより好ましくは10%以内、さらにより好ましくは5%以内であり得る。「約」または「おおよそ」という用語に含まれる許容可能な変動は、試験中の特定のシステムに依存し、当業者によって容易に理解され得る。

【0110】

本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書に別段の記載がない限り、その範囲内にある各個別の値および各終点を個別に参照する簡略化された方法として機能することを意図しており、各個別の値および終点は、本明細書に個別に記載されているかのように明細書に組み込まれる。

【0111】

本発明の実施は、特に明記しない限り、当業者の内である、統計分析、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、および生化学の従来の技術を使用する。そのようなツールおよび技術は、例えば、Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York; Ausubel et al. eds. (2005) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Bonifacino et al. eds. (2005) *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Coligan et al. eds. (2005) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Coico et al. eds. (2005) *Current Protocols in Microbiology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; Coligan et al. eds. (2005) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ; および Enna et al. eds. (2005) *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJに詳細に記載されている。

【0112】

改変T細胞受容体

一態様では、本発明は、改変T細胞受容体（TCR）またはその機能的断片を提供し、改変TCRは、非置換野生型（WT）TCRのβ鎖のCDR2と比較して、改変TCRのβ鎖の相補性決定領域（CDR）2内に単一アミノ酸置換を含む。

【0113】

一実施形態では、本発明は、野生型（WT）TCRのアミノ酸配列においてTCRのβ鎖の相補性決定領域（CDR）2に位置する単一アミノ酸置換のみを有するアミノ酸配列を含む改変T細胞受容体（TCR）を提供し、改変TCRは、WT TCRと比較して、WT TCRの抗原特異性を保持し、がん抗原に対するより高い結合親和性を有し、配列番号1のCDR2に位置する単一アミノ酸置換を有することを除いて配列番号1のアミノ酸配列を含む。

【0114】

特定の実施形態において、改変TCRのがん抗原への結合親和性は、WT TCRのがん抗原への結合親和性と比較して、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、または100倍以上高い。

【0115】

解離定数（ K_D ）を使用して、改変TCRのがん抗原への結合親和性を評価することができる。特定の実施形態において、がん抗原に対する改変TCRの解離定数（ K_D ）は、約0.1～約10 μM の間である。非限定的な例として、がん抗原に対する改変TCRの解離定数（ K_D ）は、約0.1 μM 、約0.2 μM 、約0.3 μM 、約0.4 μM 、約0

10

20

30

40

50

・ 5 μ M、約 0.6 μ M、約 0.7 μ M、約 0.8 μ M、約 0.9 μ M、約 1 μ M、約 1.2 μ M、約 1.5 μ M、約 1.7 μ M、約 2 μ M、約 2.2 μ M、約 2.5 μ M、約 2.7 μ M、約 3 μ M、約 3.2 μ M、約 3.5 μ M、約 3.7 μ M、約 3.9 μ M、約 4 μ M、約 4.2 μ M、約 4.5 μ M、約 5 μ M、約 5.5 μ M、約 6 μ M、約 6.5 μ M、約 7 μ M、約 7.5 μ M、約 8 μ M、約 8.5 μ M、約 9 μ M、約 9.5 μ M、または約 10 μ M であり得る。

【0116】

一実施形態では、本発明は、TCRの β 鎖の相補性決定領域(CDR)2に位置する単一アミノ酸置換を有する以外は野生型(WT)TCRのアミノ酸配列を含む改変T細胞受容体(TCR)を提供し、改変TCRは、WT TCRと比較して、WT TCRの抗原特異性を保持し、がん抗原NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープ(配列番号8)に対するより高い結合親和性を有し、配列番号1のCDR2に位置する単一アミノ酸置換を有する以外は配列番号1のアミノ酸配列を含む。

10

【0117】

特定の実施形態において、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して、約2倍～約100倍高い。非限定的な例として、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約85倍、約90倍、約95倍、または100倍以上高い。様々な実施形態において、エピトープはNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅である。

20

【0118】

一実施形態では、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して、約5～約75倍高い。一実施形態では、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して、約10～約75倍高い。一実施形態では、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して、約25～約75倍高い。一実施形態では、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して、約40～約75倍高い。一実施形態では、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して、約40～約60倍高い。一実施形態では、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して、約40～約50倍高い。一実施形態では、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性は、WT TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性と比較して約50倍高い。様々な実施形態において、エピトープはNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅である。

30

【0119】

解離定数(K_D)を使用して、改変TCRのがん抗原NY-ESO-1への結合親和性を評価することができる。特定の実施形態において、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数(K_D)は、約0.1～約10 μ Mの間である。非限定的な例として、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数(K_D)は、約0.1 μ M、約0.2 μ M、約0.3 μ M、約0.4 μ M、約0.5 μ M、約0.6 μ M、約0.7 μ M、約0.8 μ M、約0.9 μ M、約1 μ M、約1.2 μ M、約1.5 μ M、約1.7 μ M、約2 μ M、約2.2 μ M、約2.5 μ M、約2.7 μ M、約3 μ M、約3.2 μ M、約3.5 μ M、約3.7 μ M、約3.9 μ M、約4 μ M、約4.2 μ M、約4.5 μ M、約5 μ M、約5.5 μ M、約6 μ M、約6.5 μ M、約7 μ M、約7.5 μ M、約8 μ M、約8.5 μ M、約9 μ M、約9.5 μ M、または約10 μ M であり得る。様々な実施形態において、エピトープはNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅である。

40

50

【0120】

一実施形態では、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約0.3~約4.5 μM の間である。一実施形態では、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約0.3~約2 μM の間である。一実施形態では、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約2~約3 μM の間である。一実施形態では、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は、約3~約4 μM の間である。一実施形態では、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は約0.4 μM である。一実施形態では、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は約0.41 μM である。一実施形態では、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRは約3.9 μM である。一実施形態では、がん抗原NY-ESO-1に対する改変TCRの解離定数 (K_D) は約3.89 μM である。様々な実施形態において、エピトープはNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅である。

10

【0121】

特定の実施形態において、改変TCRは、TCRの β 鎖のCDR2の残基53に位置する単一アミノ酸置換を含む。単一アミノ酸置換には、I53E、I53FおよびI53Wが含まれ得るが、これらに限定されない。

【0122】

特定の実施形態において、改変TCRは、TCRの β 鎖のCDR2の残基55に位置する単一アミノ酸置換を含む。単一アミノ酸置換には、D55Eが含まれ得るが、これに限定されない。

20

【0123】

特定の実施形態において、改変TCRは、TCRの β 鎖のCDR2の残基50、51、または52に位置する単一アミノ酸置換を含む。単一アミノ酸置換には、G50V、G50A、A51D、A51E、またはG52Qが含まれ得るが、これらに限定されない。

【0124】

特定の実施形態では、改変TCRの β 鎖配列は、改変TCRの β 鎖またはその機能的断片のCDR2領域の外側で、非置換WT TCRの β 鎖またはその機能的断片と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRの β 鎖またはその機能的断片は、非置換WT TCRの β 鎖またはその機能的断片のアミノ酸配列においてCDR2領域に単一アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、非置換WT TCRの β 鎖は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

30

【0125】

特定の実施形態において、改変TCRは、配列番号2~5のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号2のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号3のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

50

一実施形態では、改変TCRは、配列番号4のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号5のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。上記の実施形態のいずれかにおいて、改変TCRは、非置換WT TCRのβ鎖（例えば、配列番号1に記載される）と比較して、β鎖のCDR2内に単一アミノ酸置換を含む。

10

【0126】

特定の実施形態において、改変TCRは、配列番号2～5のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号2のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号4のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号5のアミノ酸配列を含む。

【0127】

特定の実施形態において、改変TCRは、配列番号11～14のいずれか1つから選択されたヌクレオチド配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号11のヌクレオチド配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号12のヌクレオチド配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号13のヌクレオチド配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号14のヌクレオチド配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。上記の実施形態のいずれかにおいて、改変TCRは、非置換WT TCRのβ鎖（例えば、配列番号1に記載される）と比較して、β鎖のCDR2内に単一アミノ酸置換を含む。

20

30

40

【0128】

特定の実施形態において、改変TCRは、配列番号11～14のいずれか1つから選択されるヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号11のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む

50

。一実施形態では、改変TCRは、配列番号12のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号13のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、改変TCRは、配列番号14のヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む。

【0129】

一態様では、本発明は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号2～5のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む、改変T細胞受容体(TCR)を提供する。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号5のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性75%を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。上記の実施形態のいずれかにおいて、改変TCRは、非置換WTTCRの β 鎖(例えば、配列番号1に記載される)と比較して、 β 鎖のCDR2内に単一アミノ酸置換を含む。

【0130】

一態様では、本発明は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号2～5のいずれか1つのアミノ酸配列を含む β 鎖を含む改変T細胞受容体(TCR)を提供する。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号2のアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号3のアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号4のアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号7のアミノ酸配列を含む α 鎖、および配列番号5のアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。

【0131】

一態様では、本発明は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされる α 鎖、および配列番号11～14のいずれか1つから選択されるヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少な

くとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む改変T細胞受容体(TCR)を提供する。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号11のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチドによってコードされるβ鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号12のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号13のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号14のヌクレオチド配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む。上記の実施形態のいずれかにおいて、改変TCRは、非置換WT TCRのβ鎖(例えば、配列番号1に記載される)と比較して、β鎖のCDR2内に単一アミノ酸置換を含む。

【0132】

一態様では、本発明は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号11~14のいずれかのヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む改変T細胞受容体(TCR)を提供する。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号11のヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号12のヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号13のヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む。一実施形態では、改変T細胞受容体(TCR)は、配列番号9のヌクレオチド配列によってコードされるα鎖、および配列番号14のヌクレオチド配列によってコードされるβ鎖を含む。

【0133】

本発明はまた、関連するポリペプチドおよびタンパク質、ならびに関連する核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、および遺伝子操作された細胞を含むがこれらに限定されない細胞の集団を提供する。

【0134】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の改変TCRの機能的部分を含む単離ポリペプチドを提供し、機能的部分は、TCRのα鎖およびβ鎖の変領域を含み、機能的部分はアミノ酸置換を含む。特定の実施形態において、単離ポリペプチドは、配列番号2~5から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0135】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の改変TCRの機能的部分を含む単離ポリペプチドを提供し、機能的部分は、TCRの α 鎖および β 鎖の定常領域をさらに含む。特定の実施形態では、定常領域はヒト起源のものである。他の実施形態では、定常領域はマウス起源である。

【0136】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の改変TCRのアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸配列を提供する。

【0137】

保存的アミノ酸置換が本明細書に記載されるもののいずれかのポリペプチドに導入され、例えば、参照配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性を有し、好ましくはその配列の活性を保持するポリペプチドを達成し得ることが理解されるであろう。当技術分野で公知であり本明細書で言及される保存的アミノ酸置換は、タンパク質中のアミノ酸を、例えば、構造、サイズ、および／または化学的特性に関して類似の側鎖を有するアミノ酸で置換することを含む。例えば、以下の各グループ内のアミノ酸は、同じグループ内の他のアミノ酸と交換することができる：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンを含む、脂肪族側鎖を有するアミノ酸；セリンおよびスレオニンなどの、非芳香族のヒドロキシル含有側鎖を有するアミノ酸；アスパラギン酸およびグルタミン酸などの、酸性側鎖を有するアミノ酸；グルタミンおよびアスパラギンを含む、アミド側鎖を有するアミノ酸；リシン、アルギニンおよびヒスチジンを含む、塩基性アミノ酸；フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンを含む、芳香族環側鎖を有するアミノ酸；システインおよびメチオニンを含む、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸。さらには、アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性側鎖を有するアミノ酸は、本明細書では、アスパラギンおよびグルタミンなどのアミド側鎖を有するアミノ酸と交換可能であると考えられる。

【0138】

本発明の様々な実施形態において有用な配列の例を以下に提供する。

【0139】

BC1 WT β 鎖

MAPRLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTL
QCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVP
NGYNVSRSTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGAAGE
LFFGEGSRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKAT
LVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA
LNDSTRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDE
WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATIL
YEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG* (配列番号1)

【0140】

I53E β 鎖

MAPRLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTL
QCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGETDQGEVP
NGYNVSRSTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGAAGE
LFFGEGSRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKAT
LVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA
LNDSTRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDE
WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATIL
YEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG* (配列番号2)

【0141】

I53F β 鎖

MAPRLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTL
QCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGFTDQGEVP

NGYNVSRSTT E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S Y V G A A G E
L F F G E G S R L T V L E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A
L N D S R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E
W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S V S Y Q Q G V L S A T I L
Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S R G * (配列番号 3)

【0142】

I 5 3 W β 鎖

M A P R L L C C A A L S L L W A G P V N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L
Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G W T D Q G E V P
N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S Y V G A A G E
L F F G E G S R L T V L E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A
L N D S R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E
W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S V S Y Q Q G V L S A T I L
Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S R G * (配列番号 4)

10

【0143】

D 5 5 E β 鎖

M A P R L L C C A A L S L L W A G P V N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L
Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T E Q G E V P
N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S Y V G A A G E
L F F G E G S R L T V L E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A
L N D S R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E
W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S V S Y Q Q G V L S A T I L
Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S R G * (配列番号 5)

20

【0144】

A 9 7 L β 鎖

M A P R L L C C A A L S L L W A G P V N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L
Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E V P
N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S Y V G L A G E
L F F G E G S R L T V L E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A
L N D S R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E
W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S V S Y Q Q G V L S A T I L
Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S R G * (配列番号 6)

30

【0145】

B C 1 W T α 鎖

M E T L L G L L I L W L Q L Q W V S S K Q E V T Q I P A A L S V P E G E N L V L
N C S F T D S A I Y N L Q W F R Q D P G K G L T S L L L I Q S S Q R E Q T S G R
L N A S L D K S S G R S T L Y I A A S Q P G D S A T Y L C A V R P Q T G G S Y I
P T F G R G T S L I V H P Y I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D
F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T V L D M R S M D F K S N S A V A W S N
K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S S C D V K L V E K S F E T D
T N L N F Q N L S V I G F R I L L L K V A G F N L L M T L R L W S S * (配列番号 7)

40

【0146】

N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 ペプチド

S L L M W I T Q C (配列番号 8)

【0147】

50

BC1 WT α 鎖

ATGGGAAACCCCTGCTGGGCGCTGCTGATCCTGTGGCTGCAGC
TGCAGTGGGTGTCCAGCAAGCAGGAAGTGACCCAGATCCC
TGCCGCCCTGAGCGTGCCCGAGGGCGAGAACCTGGGTGCTG
AACTGCAGCTTCAACGACAGCGCCATCTACAACCTGCAGT
GGTTCCGGCAGGACCCCGGCAAGGGCCTGACCAGCCTGCT
GCTGATCCAGAGCAGCCAGCGGGAGCAGACCAGCGGCAGG
CTGAACGCCAGCCTGGACAAGAGCAGCGGCAGAAGCACCC
TGTAACATCGCCGCCAGCCAGCCCGGCGACTCCGCCACCTA
CCTGTGCGCCGTGCGGCCCTCAGACCCGGCGGCAGCTACATC
CCCACCTTTCGGCAGGGGCGACCAGCCTGATCGTGCACCCCT
ACATCCAGAAACCCCGACCCCGCCGTGTACCAGCTGCGGGA
CAGCAAGTCCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCAACGAC
TTCGACAGCCAGACCAACGTGAGCCAGAGCAAGGACAGCG
ACGTGTACATCACCGACAAGACCGTGTGACATGCGGAG
CATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGGTCCAAC
AAGAGCGACTTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCA
TCATCCCCGAGGACACCTTTTTCAGCCCCGAGAGCAG
CTGCGACGTGAAACTGGTGGAGAAGAGCTTCGAGACCGAC
ACCAACCTGAACCTTCCAGAACCTGAGCGTGATCGGCTTCA
GAATTCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGAT
GACCCTGCGGCTGTGGAGCAGT (配列番号9)

【0148】

BC1 WT β 鎖

ATGGGCCCGCGGCTGCTGTGTGTGTGCGCGCCCTGAGCCTGC
TGTGGGCGCGGACCTGTGAACGCCCGGCGTGACCCAGACCCC
CAAGTTCCAGGTGCTGAAAACCGGCCAGAGCATGACCCTG
CAGTGCGCCCAGGACATGAACCACGAGTACATGAGCTGGT
ACAGGCAGGACCCCGGCATGGGCGCTGCGGCTGATCCACTA
CAGCGTGGGAGCCGGCATCACCGACCAGGGCGAGGTGCC
AACGGCTACAACGTGAGCAGAAGCACCAACCGAGGACTTCC
CCCTGAGGCTGCTGTCTGCGCGCCCTAGCCAGACCAGCGT
GTACTTCTGCGCCAGCAGCTATGTGGGAGCCGCCGGAGAG
CTGTTCTTCGGCGAGGGCAGCCGGCTGACCCTGCTGGAAG
ATCTGAACAAAGTGTTCCCCCCGAAGTGGCCGTGTTCTGA
GCCCAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGGCCACC
CTGGTGTGTCTGGCCACC GGCTTCTTCCCCGACCACGTGG
AGCTGTCTTGGTGGGTGAACGGCAAGGAAGTGACACAGCGG
CGTGTCCACCGACCCCGAGCCCTGAAGGAGCAGCCCGCC
CTGAACGATAGCAGATACTGCCTGAGCAGCCGGCTGAGAG
TGAGCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGGAACCACTTCTAG
ATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAG
TGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGT
CCGCCGAGGCCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTCAACAG
CGTGTCTTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTG
TACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGC
TGGTGTCCGCCCTGGTGTCTGATGGCTATGGTGAAGCGGAA
GGACAGCAGGGGCTGA (配列番号10)

【0149】

I53E β 鎖

10

20

30

40

50

ATGGCCCCGCGGGCTGCTGTGTTGTGCGCCCTGAGCCTGC
TGTGGGGCCGGACCTGTGAACGCCGGCGTGACCCAGACCCC
CAAGTTCCAGGTGCTGAAAACCGGCCAGAGCATGACCCTG
CAGTGCGCCCCAGGACATGAACCAACGAGTACATGAGCTGGT
ACAGGCAGGACCCCCGGCATGCGGCTGATCCACTA
CAGCGTGGGAGCCGGCGAGACCGAGGGCGAGGTGCC
AACGGCTACAACGTGAGCAGAAGCACCAACGAGGACTTCC
CCCTGAGGCTGCTGTCTGCCGCCCTAGCCAGACCAGCGT
GTACTTCTGCGCCAGCAGCTATGTGGGAGCCGCCGGAGAG
CTGTTCTTTCGGCGAGGGGCAGCCGGCTGACCCTGCTGGAAG
ATCTGAACAAAGTGTTCCCCCCCCGAAGTGGCCGTGTTTGA
GCCCAGCGAGGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAGGCCACC
CTGGTGTGTCTGGCCACC GGCTTCTTCCCCGACCACGTGG
AGCTGTCCTGGTGGGTGAACGGCAAGGAAGTGACACAGCGG
CGTGTCCACCGACCCCCAGCCCCCTGAAGGAGCAGCCCGCC
CTGAACGATAGCAGATACTGCCCTGAGCAGCCGGCTGAGAG
TGAGCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAAG
ATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCCTGAGCGAGAACGACGAG
TGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCCCGTGACCCAGATCGTGT
CCGCCGAGGGCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTCAACAG
CGTGTCTTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTG
TACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGC
TGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCTATGGTGAAGCGGAA
GGACAGCAGGGGGCTGA (配列番号11)

【0150】

I53F β 鎖

ATGGCCCCGCGGGCTGCTGTGTTGTGCGCCCTGAGCCTGC
TGTGGGGCCGGACCTGTGAACGCCGGCGTGACCCAGACCCC
CAAGTTCCAGGTGCTGAAAACCGGCCAGAGCATGACCCTG
CAGTGCGCCCCAGGACATGAACCAACGAGTACATGAGCTGGT
ACAGGCAGGACCCCCGGCATGCGGCTGATCCACTA
CAGCGTGGGAGCCGGCTTCAACCGAGGGCGAGGTGCC
AACGGCTACAACGTGAGCAGAAGCACCAACGAGGACTTCC
CCCTGAGGCTGCTGTCTGCCGCCCTAGCCAGACCAGCGT
GTACTTCTGCGCCAGCAGCTATGTGGGAGCCGCCGGAGAG
CTGTTCTTTCGGCGAGGGGCAGCCGGCTGACCCTGCTGGAAG
ATCTGAACAAAGTGTTCCCCCCCCGAAGTGGCCGTGTTTGA
GCCCAGCGAGGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAGGCCACC
CTGGTGTGTCTGGCCACC GGCTTCTTCCCCGACCACGTGG
AGCTGTCCTGGTGGGTGAACGGCAAGGAAGTGACACAGCGG
CGTGTCCACCGACCCCCAGCCCCCTGAAGGAGCAGCCCGCC
CTGAACGATAGCAGATACTGCCCTGAGCAGCCGGCTGAGAG
TGAGCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAAG
ATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCCTGAGCGAGAACGACGAG
TGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCCCGTGACCCAGATCGTGT
CCGCCGAGGGCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGCTTCAACAG
CGTGTCTTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTG
TACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGC
TGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCTATGGTGAAGCGGAA
GGACAGCAGGGGGCTGA (配列番号12)

10

20

30

40

50

I 5 3 W β 鎖

ATGTGGCCCGCGGGCTGCTGTGTGTGTCGCCGCTTGAGACCTTGAGACCTTG
 TGTGGGCGCGGACCTGTGAACGCCGCGTGACCCAGACCCCTG
 CAAGTTCCAGGTGCTGAAAACCGGCCAGAGCATGACCCCTG
 CAGTGCGCCCAGGACATGAACCAACGAGTACATGAGCTGGT
 ACAGGCGAGGACCCCGGCATGGGGCCTGCGGGCTGATCCACTA
 CAGCGTGGGAGCCGGCTGGACCAGACCAGGGCGAGGTGCCC
 AACGGCTACAACGTGAGCAGAAGCACCAACCGAGGACTTCC
 CCCTGAGGCTGCTGTCTGCCGCCCTAGCCAGACCAGCGT
 GTACTTCTGCGCCAGCAGCTATGTGGGAGCCGCCGGAGAG
 CTGTTCTTCGGCGAGGGCAGCCGGGCTGACCGTGCTGGAAG
 ATCTGAACAAGTGTTCCTCCCGAAGTGGCCGTGTTCTGA
 GCCCAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAGGCCACC
 CTGGTGTTCTGGCCACCGGCTTCTTCCCGACCAAGTGG
 AGCTGTCCTGGTGGGTGAAACGGCAAGGAAGTGACACAGCGG
 CGTGTCACACCGACCCCCAGCCCCCTGAAGGAGCAGCCCGCC
 CTGAACGATAGCAGATACTGCCCTGAGCAGCCGGCTGAGAG
 TGAGCGCCACCTTCTGGCAGAAACCCCGGAACCACTTCAG
 ATGCCAGGTGCAAGTTCTACGGCCCTGAGCGAGAACGACGAG
 TGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGT
 CCGCCGAGGCCCTGGGGCAGAGCCGACTGCGGGCTTCAACAG
 CGTGTCCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACAATCCTG
 TACGAGATCCTGCTGGGGCAAGGCCACACTGTACGCCGTGC
 TGGTGTCCTGCCCTGGTGCTGATGGCTATGGTGAAAGCGGAA
 GGACAGCAGGGGGCTGA (配列番号13)

10

20

【 0 1 5 2 】

D 5 5 E β 鎖

A T G G C C C C G C G G C T G C T G T G T T G T G C C G C C C T G A G A C C T G C
T G T G G G C C C G G A C C T G T G A A C G C C G G C G T G A C C C A G A C C C C
C A A G T T C C A G G T G C T G A A A A C C G G C C A G A G C A T G A C C C T G
C A G T G C G C C C A G G A C A T G A A C C A C G A G T A C A T G A G C T G G T
A C A G G C A G G A C C C C G G C A T G G G C C T G C G G C T G A T C C A C T A
C A G C G T G G G A G C C G G C A T C A C C G A G C A G G G C G A G G T G C C C
A A C G G C T A C A A C G T G A G C A G A A G C A C C A C C G A G G A C T T C C
C C C T G A G G C T G C T G T C T G C C G C C C C T A G C C A G A C C A G C G T
G T A C T T C T G C G C C A G C A G C T A T G T G G G A G C C G C C G G A G A G
C T G T T C T T C G G C G A G G G C A G C C G G C T G A C C G T G C T G G A A G
A T C T G A A C A A A G T G T T C C C C C C G A A G T G G C C G T G T T C G A
G C C C A G C G A G G C C G A G A T C A G C C A C A C C C A G A A G G C C A C C
C T G G T G T G T C T G G C C A C C G G C T T C T T C C C C G A C C A C G T G G
A G C T G T C C T G G T G G G T G A A C G G C A A G G A A G T G C A C A G C G G
C G T G T C C A C C G A C C C C C A G C C C C T G A A G G A G C A G C C C G C C
C T G A A C G A T A G C A G A T A C T G C C T G A G C A G C C G G C T G A G A G
T G A G C G C C A C C T T C T G G C A G A A C C C C C G G A A C C A C T T C A G
A T G C C A G G T G C A G T T C T A C G G C C T G A G C G A G A A C G A C G A G
T G G A C C C A G G A T A G A G C C A A G C C C G T G A C C C A G A T C G T G T
C C G C C G A G G C C T G G G G C A G A G C C G A C T G C G G C T T C A C C A G
C G T G T C C T A C C A G C A G G G C G T G C T G A G C G C C A C A A T C C T G
T A C G A G A T C C T G C T G G G C A A G G C C A C A C T G T A C G C C G T G C

30

40

50

T G G T G T C C G C C C T G G T G C T G A T G G C T A T G G T G A A G C G G A A
G G A C A G C A G G G G C T G A (配列番号 1 4)

【 0 1 5 3 】

細胞の遺伝子操作

一態様では、本発明は、本明細書に記載の改変 T C R を発現するリンパ球系細胞の遺伝子操作の方法を提供する。一実施形態では、リンパ球系細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 2 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変 T C R を発現するように遺伝子操作される。一実施形態では、リンパ球系細胞は、配列番号 3 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 3 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変 T C R を発現するように遺伝子操作される。一実施形態では、リンパ球系細胞は、配列番号 4 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 4 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変 T C R を発現するように遺伝子操作される。一実施形態では、リンパ球系細胞は、配列番号 5 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 5 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変 T C R を発現するように遺伝子操作される。リンパ球系細胞は、P B M C、腫瘍流入領域リンパ節、または腫瘍浸潤物から得られる。特定の実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1 つまたは複数の外因性分子を発現するようにさらに操作される。特定の実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1 つまたは複数の細胞表面受容体を発現するようにさらに操作される。細胞表面受容体の例には、キメラ抗原受容体、およびがん抗原 N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ (配列番号 8) に対してではない T 細胞受容体が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1 つまたは複数の可溶性タンパク質を発現するようにさらに操作される。可溶性タンパク質の例には、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、可溶性受容体、リガンド、抗体、抗体フラグメント、および抗原結合ドメインが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1 つまたは複数の追加の受容体および可溶性タンパク質を発現するようにさらに操作される。

【 0 1 5 4 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載の改変 T C R を発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞を提供する。一実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 2 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変 T C R を発現する。一実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、配列番号 3 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 3 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %

、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現する。一実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、配列番号4のアミノ酸配列、あるいは配列番号4に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現する。一実施形態では、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、配列番号5のアミノ酸配列、あるいは配列番号5に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現する。上記の実施形態のいずれかにおいて、改変TCRは、非置換WT TCRのβ鎖（例えば、配列番号1に記載される）と比較して、β鎖のCDR2内に単一アミノ酸置換を含む。

【0155】

リンパ球系細胞は、PBMC、腫瘍流入領域リンパ節、または腫瘍浸潤物から得られる。特定の実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、追加の受容体を発現するようにさらに操作される。追加の受容体には、キメラ抗原受容体、およびがん抗原NY-ESO-1157-165エピトープ（配列番号8）に対してではないT細胞受容体が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、可溶性タンパク質を発現するようにさらに操作される。可溶性タンパク質には、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、可溶性受容体、リガンド、抗体、抗体フラグメント、および抗原結合ドメインが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、追加の受容体および可溶性タンパク質を発現するようにさらに操作される。

【0156】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号2のアミノ酸配列あるいは配列番号2に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。

【0157】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号3のアミノ酸配列あるいは配列番号3に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。

【0158】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号4のアミノ酸配列あるいは配列番号4に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。

【0159】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号5のアミノ酸配列あるいは配列番号5に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも8

5%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。

【0160】

様々な実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、非置換WT TCRのβ鎖（例えば、配列番号1に記載される）と比較してβ鎖のCDR2内に単一アミノ酸置換を含む改変TCRを発現する。

【0161】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の外因性分子をさらに発現するように遺伝子操作され得る。

【0162】

リンパ球系細胞は、抗原と特異的に反応して特定の細胞産物を作り上げる免疫系の細胞である。リンパ球系細胞を含むサンプルは、対象の多数の供給源から得ることができ、そのような供給源には、組織（腫瘍組織、ウイルス感染組織、炎症部位、リンパ球浸潤部位および白血球浸潤部位の組織を含む）、胸腺、腫瘍組織（例えば、サンプル、断片）、または酵素的に消化された組織、解離／懸濁細胞、リンパ節サンプル、または体液サンプル（例えば、血液、腹水、リンパ液）が含まれるが、それらに限定されない。例示的な組織には、皮膚、脂肪組織、心臓血管組織（静脈、動脈、毛細血管、弁など）、神経組織、骨髓、乳房、胃腸、肺組織、眼組織（角膜および水晶体など）、軟骨、骨、および粘膜組織が含まれる。

【0163】

サンプルは、未処理であっても、酵素処理されても、および／または解離／懸濁されて細胞懸濁液を形成してもよい。サンプルが酵素処理される場合、使用され得る酵素の非限定的な例には、コラゲナーゼ、ジスパーゼ、ヒアルロニダーゼ、リベラーゼ、およびデオキシリボヌクレアーゼ（DNase）が含まれる。

【0164】

特定の実施形態において、本発明で使用するためのリンパ球系細胞は、腫瘍浸潤免疫細胞を含む。腫瘍浸潤免疫細胞は、可変比率で単核免疫細胞と多形核免疫細胞の両方（すなわち、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、肥満細胞、好酸球、好塩基球など）で構成される。特定の実施形態において、本発明で使用するためのリンパ球は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を含む。TILは、血流を離れて腫瘍に向かって遊走した白血球である。TILは、多くの場合、腫瘍間質および腫瘍自体の内部に見られる。

【0165】

特定の実施形態において、本発明で使用するためのリンパ球系細胞は、末梢血リンパ球（PBL）を含む。特定の実施形態において、本発明で使用するためのリンパ球系細胞は、Tリンパ球（T細胞）および／またはナチュラルキラー細胞（NK細胞）を含む。

【0166】

特定の実施形態において、本発明で使用するためのリンパ球系細胞はT細胞である。特定の実施形態において、T細胞はCD8⁺T細胞である。特定の実施形態において、T細胞はCD4⁺細胞である。特定の実施形態では、T細胞は制御性T細胞である。

【0167】

特定の実施形態において、本発明で使用するためのリンパ球はNK細胞である。特定の実施形態では、NK細胞は、CD16⁺CD56⁺および／またはCD57⁺NK細胞である。NKは、特定の細胞溶解性酵素の活性化によって「自己」MHC／HLA抗原を発現しない細胞に結合して殺す能力、NK活性化受容体のリガンドを発現する腫瘍細胞または他の罹患細胞を殺す能力、および免疫応答を刺激または阻害するサイトカインと呼ばれるタンパク質分子を放出する能力を特徴とする。

【0168】

リンパ球培養に適した条件には、適切な培地（例えば、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンが添加され、無血清であるかまたは適切な量の血清（または血漿）もしくは規定されたホルモンのセット、および／または成長と拡大に十分な量のサイトカインが補足された、最小必須培地（MEM）、RPMI培地1640、Lonza RPMI1640、Advanced RPMI、Clicks、AIM-V、DMEM、a-MEM、F-12、TexMACS、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizer）が含まれる。

【0169】

リンパ球の拡大のための他の添加剤の例には、界面活性剤、プラスマネート（plasmate）、HEPESなどのpH緩衝液、ならびにN-アセチル-L-システインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤が含まれるが、これらに限定されない。抗生物質（例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシン）は、実験培養にのみ含まれ、対象に注入される細胞の培養には含まれない。標的細胞は、成長を支持するために必要な条件下、例えば、適切な温度（例えば、37℃）および雰囲気（例えば、空気+5%CO₂）の下で維持される。

【0170】

リンパ球系細胞の拡大は、当技術分野で知られている方法および条件を使用して実施することができる。特定の実施形態では、リンパ球系細胞の拡大は、PCT/EP2018/080343に記載されている方法に従って実施される。

【0171】

リンパ球系細胞の遺伝子操作は、トランスフェクション、形質導入、または一時的な細胞膜破壊（すなわち、セルスクイズ（cell squeeze））のうちの少なくとも1つによって達成され、改変TCRをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドをリンパ球系細胞に導入する。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、実質的に均質な細胞集団に組換え発現ベクターで形質導入することによってリンパ球系細胞に導入される。そのようなベクターは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターであり得る。本発明で使用するための例示的なウイルスベクターには、レトロウイルスベクター（レンチウイルスベクターを含む）、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、ヘルペスウイルスベクター、またはバキュロウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、本発明で使用するためのウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

【0172】

改変TCRを発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞に追加の受容体を導入してもよい。遺伝子操作されたリンパ球系細胞に追加の受容体があると、リンパ球系細胞の機能（例えば、抗腫瘍機能）が強化され得る。

【0173】

特定の実施形態において、追加の受容体は、キメラ抗原受容体（CAR）である。キメラ抗原受容体（CAR）は通常、免疫細胞を活性化または刺激することができる細胞内シグナル伝達ドメインに融合した抗原結合ドメインを有する。CARの細胞外結合ドメインは、マウスまたはヒト化モノクローナル抗体の変領域の重鎖および軽鎖を融合することにより生じる単鎖可変領域フラグメント（scFv）で構成され得る。あるいは、（例えば、Fabライブラリーから得られた抗体からではなく）Fab'sに由来するscFvを使用してもよい。scFvは、膜貫通ドメインに融合され、次に細胞内シグナル伝達ドメインに融合され得る。CARは、第1世代、第2世代、または第3世代のCARであり得る。「第1世代」CARには、抗原結合時にCD3ζ（ゼータ）シグナルのみを提供するものが含まれる。「第2世代」のCARには、共刺激（例えば、CD28またはCD137）および活性化（CD3ζ）を提供するものが含まれる。「第3世代」のCARには、複数の共刺激（例えば、CD28およびCD137）ならびに活性化（CD3ζ）を提供するものが含まれる。CARはがん抗原を特異的に認識し得る。

【0174】

特定の実施形態において、追加の受容体は、がん抗原NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープに特異的ではないTCRである。このようなTCRは、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅エピトープ以外のがん抗原を特異的に認識し得る。

【0175】

特定の実施形態において、がん抗原は、CD7、CD74、CDS、CEA、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、葉酸受容体α、GD2、GD3、HER2、hTERT、IL-13R-α2、KDR、K-軽鎖、LeY、LL細胞、MAGE-A1、メソテリン (Mesothelin)、MUC1、MUC16、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、がん胎児性抗原 (h5T4)、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、およびWT-1から選択され得る。

10

【0176】

改変TCRを発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、可溶性タンパク質または複数の可溶性タンパク質を発現および分泌するように操作され得る。本発明で使用するための可溶性タンパク質には、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、可溶性受容体、リガンド、抗体、抗体フラグメント、ならびにそれらの抗原結合ドメインおよび機能的バリエーションが含まれるが、これらに限定されない。

【0177】

本明細書に記載の遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現および／または分泌され得るサイトカインには、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-7 (IL-7)、インターロイキン-9 (IL-9)、インターロイキン-11 (IL-11)、インターロイキン-12 (IL-12)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-17 (IL-17)、インターロイキン-18 (IL-18)、インターロイキン-21 (IL-21)、インターロイキン-33 (IL-33)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターフェロンアルファ (IFN-αまたはIFN-α)、インターフェロンベータ (IFN-βまたはIFN-β)、インターフェロンガンマ (IFN-γまたはIFN-γ)、トランスフォーミング成長因子-β (TGF-β)、CCL19およびエリスロポエチンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現されるサイトカインはIL-2である。いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現されるサイトカインはIFN-γである。いくつかの実施形態において、遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現されるサイトカインはGM-CSFである。

20

30

【0178】

本明細書に記載の遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現および／または分泌され得るケモカインには、インターロイキン-8 (IL-8)、好中球活性化タンパク質-1 (NAP-1)、好中球活性化タンパク質-2 (NAP-2)、GRO、GROβ、GROγ、ENA-78、GCP-2、IP-10、MIG、CXCL1、CXCL12、CXCL16、CXCL19、およびPF4などのCXCKケモカイン；ならびにRANTES、MIP-1α、MIP-2β、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1)、MCP-2、MCP-3、CCL5、およびエオタキシンなどのCCケモカインが含まれるが、これらに限定されない。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第WO 2000078334号 (例えば、表1) に記載される適切なケモカインもまた、本発明によって企図される。

40

【0179】

本明細書に記載の遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現および／または分泌され得る成長因子には、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子、トランスフォーミング成長因子、表皮成長因子、幹細胞因子、血小板由来成長因子、神経成長因子、線維芽

50

細胞成長因子、インスリン様成長因子、成長ホルモン、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、ケラチノサイト成長因子、毛様体神経栄養因子、シュワン（Schwann）細胞由来成長因子、ワクシニアウイルス成長因子、ボンビキシン、neu分化因子、v-Sisおよびグリア成長因子（glial growth factor）が含まれるが、これらに限定されない。

【0180】

本明細書に記載の遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現および／または分泌され得る可溶性受容体には、IL-1RI、IL-1RII、TNFRI、TNFRII、IFN- α/β R、IL-4受容体、IL-6受容体、IL-10受容体、IL-11受容体、IL-13受容体、IL-18結合タンパク質、およびTGF- β 受容体などの可溶性サイトカイン受容体；ならびに可溶性上皮成長因子受容体（sEGFR）、可溶性血管内皮成長因子受容体およびPD-1細胞外ドメイン（ectodomain）などの可溶性成長因子受容体、可溶性VEGFR-1およびSIRP- α 分子が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載の遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現および／または分泌され得る可溶性受容体は、CD28細胞内ドメイン（endodomain）または41BB細胞内ドメイン、あるいは当技術分野で知られている他の任意の共刺激細胞内ドメイン（co-stimulatory endodomain）にさらに融合され得る。

【0181】

本明細書に記載の遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現および／または分泌され得るリガンドには、神経成長因子（NGF）、CD40L（CD154）、CD137L/4-1BBL、腫瘍壊死因子アルファ（TNF α ）、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fasリガンド（FasL）、Fasリガンドアゴニスト（FasLアゴニスト）、LAG3リガンド、VEGFR1リガンド、TIM3リガンド、TIGITリガンド、SIRP-アルファリガンド、CD30L/CD153、腫瘍壊死因子ベータ（TNF β ）/リンホトキシン-アルファ（LT α ）、リンホトキシン-ベータ（LT β ）、CD257/B細胞活性化因子（BAFF）/Blys/THANK/Ta11-1、グルココルチコイド誘発性TNF受容体リガンド（GITRL）、およびTNF関連アポトーシス誘発性リガンド（TRAIL）、およびLIGHT（TNFSF14）；などの腫瘍壊死因子（TNF）リガンド；CD80およびCD86などの免疫グロブリンスーパーファミリーリガンド；トール様受容体（TLR）に対するリガンド、4-1BBリガンド、アゴニスト、OX40リガンドアゴニスト、ICOSリガンドアゴニスト、Flt3リガンド、ホスホジエステラーゼ4B2（PDE4B2）、ホスホジエステラーゼ4A（PDE4A）、ホスホジエステラーゼ7A（PDE7A）、ホスホジエステラーゼ4C（PDE4C）、およびプログラムされた細胞死タンパク質-1（PD-1）リガンドが含まれるが、これらに限定されない。

【0182】

本明細書に記載の遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現および／または分泌され得る抗体には、がん抗原に特異的に結合するものが含まれる。このようながん抗原は、CD7、CD19、CD74、CDS、CEA、EGP-2、EGP-40、EpCAM、erb-B2、3、4、FBP、胎児型アセチルコリン受容体、葉酸受容体 α 、GD2、GD3、HER2、hTERT、IL-13R- α 2、KDR、K-軽鎖、LeY、L1細胞、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、MUC16、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、がん胎児性抗原（h5T4）、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGFR2、およびWT-1から選択され得る。前記抗原に特異的に結合するアミノ酸配列は、当技術分野で知られているか、あるいは当技術分野で知られている方法を使用して調製することができる。

【0183】

特定の実施形態において、抗体は、二重特異性抗体（例えば、二重特異性T細胞抗体（BiTE））である。二重特異性抗体は、2つの異なる抗原結合ドメインを含む組換え合成抗体である。例えば、抗原結合ドメインの一方はがん抗原を標的とし、他方はリンパ球

10

20

30

40

50

活性化分子に結合し得る。

【0184】

がん抗原に対して親和性を有する抗体フラグメントまたは抗原結合ドメインは、本明細書に記載の遺伝子操作されたリンパ球系細胞によって発現され得る。抗体フラグメントには、一本鎖抗体、F a bフラグメント、F vフラグメント、単鎖F vフラグメント（s c F v）、（F a b）2'フラグメントなどの二価抗体フラグメント、F（a b'）フラグメント、ジスルフィド結合F v（s d F v）、イントラボディ、ミニボディ、ジアボディ、トリアボディ、およびデカボディが含まれるが、これらに限定されない。

【0185】

改変T C Rを発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、P D-1、C T L A-4、L A G-3、T I G I T、V I S T A、T I M-3、およびC b l-eを含むがこれらに限定されない阻害／チェックポイント分子の遺伝子ノックダウンをさらに発現するように操作され得る。いくつかの実施形態において、遺伝子ノックダウンを発現するように操作され得る改変T C Rを発現する遺伝子操作されたリンパ球は、限定されないが、I L-2、I L-33、G M-C S F、C D 40アゴニストなどの追加の可溶性タンパク質を発現および分泌するようにさらに操作され得る。

【0186】

そのような遺伝子操作されたリンパ球系細胞を養子細胞移入療法において使用する方法も提供される。特定の実施形態において、リンパ球系細胞は、対象に対して自己由来（または自家）（autologous）、同種異系（allogeneic）、同系（syngeneic）、または異種（xenogeneic）であり得る。特定の実施形態において、リンパ球系細胞は、免疫療法処置のために対象に再導入されたときにリンパ球に対する免疫反応性応答を低減するために自己由来である。

【0187】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、T C Rを発現し、かつ1つまたは複数のタンパク質をさらに発現する遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。特定の実施形態において、タンパク質の少なくとも1つは可溶性タンパク質である。可溶性タンパク質は、例えば、成長因子（例えば、G M-C S F）であり得る。特定の実施形態では、タンパク質の少なくとも1つは細胞間タンパク質である。細胞間タンパク質は、例えば、ホスホジエステラーゼ（例えば、P D E 4 B 2）であり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。特定の実施形態において、T C Rは、外因性の野生型T C Rである。特定の実施形態において、T C Rは、改変T C Rである。

【0188】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号1のアミノ酸配列、あるいは配列番号1に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むT C Rを発現し、さらに1つまたは複数の可溶性タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。可溶性タンパク質は成長因子であり得る。成長因子はG M-C S Fであり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

【0189】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号2のアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号2に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変T C Rを発現し、さらに1つまたは複数の可溶性タンパク質を発現する、

遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。可溶性タンパク質は成長因子であり得る。成長因子はGM-CSFであり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

【0190】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号3のアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号3に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現し、さらに1つまたは複数の可溶性タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。可溶性タンパク質は成長因子であり得る。成長因子はGM-CSFであり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

10

【0191】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号4のアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号4に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現し、さらに1つまたは複数の可溶性タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。可溶性タンパク質は成長因子であり得る。成長因子はGM-CSFであり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

20

【0192】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号5のアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号5に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現し、さらに1つまたは複数の可溶性タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。可溶性タンパク質は成長因子であり得る。成長因子はGM-CSFであり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

30

【0193】

いくつかの実施形態において、GM-CSFは、マウスGM-CSFまたはその機能的断片である。マウスGM-CSFのUniProt識別子はUniProtKB-P01587である。

【0194】

いくつかの実施形態において、GM-CSFは、配列番号15のアミノ酸配列、あるいは配列番号15に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、GM-CSFは、配列番号15のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、GM-CSFをコードするヌクレオチド配列は、配列番号16のヌクレオチド配列、あるいは配列番号16に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、GM-CSFをコードするヌクレオチド配列は、配列

40

50

番号 16 のヌクレオチド配列を含む。

【0195】

いくつかの実施形態において、GM-CSF の機能的断片は、配列番号 19 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 19 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、GM-CSF の機能的断片は、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、GM-CSF の機能的断片をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 20 のヌクレオチド配列、あるいは配列番号 20 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、GM-CSF の機能的断片をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 20 のヌクレオチド配列を含む。

10

【0196】

いくつかの実施形態において、GM-CSF は、ヒト GM-CSF またはその機能的断片である。ヒト GM-CSF の UniProt 識別子は UniProtKB-P04141 である。

【0197】

いくつかの実施形態において、GM-CSF は、配列番号 21 または 34 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 21 または 34 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、GM-CSF は、配列番号 21 または 34 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、GM-CSF をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 22 または 35 のヌクレオチド配列、あるいは配列番号 22 または 35 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、GM-CSF をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 22 または 35 のヌクレオチド配列を含む。

20

30

【0198】

いくつかの実施形態において、GM-CSF の機能的断片は、配列番号 25 または 36 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 25 または 36 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、GM-CSF の機能的断片は、配列番号 25 または 36 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、GM-CSF の機能的断片をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 26 または 37 のヌクレオチド配列、あるいは配列番号 26 または 37 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、GM-CSF の機能的断片をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 26 または 37 のヌクレオチド配列を含む。

40

【0199】

50

GM-CSF またはその機能的断片を発現するのに有用な配列の例を以下に提供する。

【0200】

マウスGM-CSF（全長タンパク質配列）

MWLQNLLFLGIVVYSL SAPTRSPITVTRPWKHVEAIKEAL
NLLDDMPVTLNEEEVVSNEFSFKKLT CVQTRLKIFEQGL
RGNFTKLK GALNMTASY YQTYCPPTPETDCETQVTTYADF
IDSLKTFLTDIPFECKKPGQK（配列番号15）

【0201】

マウスGM-CSF（全長DNA配列）

ATGTGGCTG CAG AATTTACTTTT CCTGGGCATTGTGGTCT
ACAGCCTCTCAGCACCCACCCGCTCACCCATCACTGTCCAC
CCGGCCTTGG AAGCATGTAGAGGCCATCAAAGAAGCCCTG
AACCTCCTGGATGACATGCCTGT CACATTGAATGAAGAGG
TAGAAGTCGTCTCTAACGAGTTCTCCTTCAAAGAAGCTAAC
ATGTGTG CAGACCCGCCTGAAGATATTCGAGCAGGGTCTA
CGGGGCAATTTTCACCAAACTCAAGGGCGCCTTGAACATGA
CAGCCAGCTACTACCAGACATACTGCCCCCCCAACTCCGGA
AACGGACTGTGAAACACAAGTTAC CACCTATGCGGATTTT
ATAGACAGCCTTAA AACCTTTCTGACTGATATCCCTTTTG
AATGCAAAAAAACCAGGCCAAAAA（配列番号16）

【0202】

マウスGM-CSF（シグナルペプチドのタンパク質配列）

MWLQNLLFLGIVVYSL S（配列番号17）

【0203】

マウスGM-CSF（シグナルペプチドのDNA配列）

ATGTGGCTG CAG AATTTACTTTT CCTGGGCATTGTGGTCT
ACAGCCTCTCA（配列番号18）

【0204】

マウスGM-CSF（活性可溶性GM-CSFのタンパク質配列）

APTRSPITVTRPWKHVEAIKEALNLLDDMPVTLNEEEVV
SNEFSFKKLT CVQTRLKIFEQGLRGNFTKLK GALNMTASY
YQTYCPPTPETDCETQVTTYADFIDSLKTFLTDIPFECKK
PGQK（配列番号19）

【0205】

マウスGM-CSF（活性可溶性GM-CSFのDNA配列）

GCACCCACCCGCTCACCCATCACTGT CACCCGGCCTTGG A
AGCATGTAGAGGCCATCAAAGAAGCCCTGAACCTCCTGGA
TGACATGCCTGT CACATTGAATGAAGAGGTAGAAGTCGTC
TCTAACGAGTTCTCCTTCAAAGAAGCTAACATGTGTG CAGA
CCCGCCTGAAGATATTCGAGCAGGGTCTACGGGGGCAATTT
CACCAA AACTCAAGGGCGCCTTGAACATGACAGCCAGCTAC
TACCAGACATACTGCCCCCCCAACTCCGGAAACGGACTGTG
AAACACAAGTTAC CACCTATGCGGATTTTCATAGACAGCCT
TAA AACCTTTCTGACTGATATCCCTTTGAATGCAAAAAA
CCAGGCCAAAAA（配列番号20）

【0206】

ヒトGM-CSF（全長タンパク質1）

MWLQSLLLLGT VACSI SAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEAR
RLLNLSRD TAAEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYK
QGLRGSLTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQTITF

10

20

30

40

50

ESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE (配列番号21)

【0207】

ヒトGM-CSF (全長DNA1)

ATGTGGCTGCAATCTCTGCTGCTGCTGGGCACAGTGGCCT
GTTCTATTAGCGCCCTGCCAGATCTCCATCTCCTAGCAC
ACAGCCTTGGGAGCACGTGAACGCCATCCAAGAAGCCAGA
CGGCTGCTGAACCTGAGCAGAGATACAGCCGCCGAGATGA
ACGAGACAGTGGAAAGTGATCAGCGAGATGTTTCGACCTGCA
AGAGCCTACCTGCCTGCAGACCAGACTGGAAGTGTACAAG
CAGGGCCTGAGAGGCAGCCTGACCAAGCTGAAAGGCCCTC
TGACAATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCC
AACACCTGAGACAAGCTGTGCCACACAGACCATCACCTTC
GAGAGCTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTCCTGCTGGTCA
TCCCCTTCGACTGCTGGGAGCCCGTGCAAGAA (配列番号22)

【0208】

ヒトGM-CSF (シグナルペプチドのタンパク質配列)

MWLQSLLLLGTVACSIIS (配列番号23)

【0209】

ヒトGM-CSF (シグナルペプチドのDNA配列)

ATGTGGCTGCAATCTCTGCTGCTGCTGGGCACAGTGGCCT
GTTCTATTAGC (配列番号24)

【0210】

ヒトGM-CSF (活性可溶性GM-CSF1のタンパク質配列)

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTA AEMNETV
EVISEMF DLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMM
ASHYKQHCPPTPETSCATQTITFESFKENLKDFLLVIPFD
CWEPVQE (配列番号25)

(配列番号25)

【0211】

ヒトGM-CSF (活性可溶性GM-CSF1のDNA配列)

GCCCCCTGCCAGATCTCCATCTCCTAGCACACAGCCTTGGG
AGCACGTGAACGCCATCCAAGAAGCCAGACGGCTGCTGAA
CCTGAGCAGAGATACAGCCGCCGAGATGAACGAGACAGTG
GAAGTGATCAGCGAGATGTTTCGACCTGCAAGAGCCTACCT
GCCTGCAGACCAGACTGGAAGTGTACAAGCAGGGGCCTGAG
AGGCAGCCTGACCAAGCTGAAAGGCCCTCTGACAATGATG
GCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACACCTGAGA
CAAGCTGTGCCACACAGACCATCACCTTCGAGAGCTTCAA
AGAGAACCTGAAGGACTTCCTGCTGGTCA TCCCCTTCGAC
TGCTGGGAGCCCCGTGCAAGAA (配列番号26)

【0212】

ヒトGM-CSF (全長タンパク質2)

MWLQSLLLLGTVACSIISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEAR
RLLNLSRDTA AEMNETVEVISEMF DLQEPTCLQTRLELYK
QGLRGS LTKLKGPLTMMASHYKQHCPPTPETSCATQIITF
ESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE (配列番号34)

【0213】

ヒトGM-CSF (全長DNA2)

ATGTGGCTGCAATCTCTGCTGCTGCTGGGCACAGTGGCCT
GTTCTATTAGCGCCCTGCCAGATCTCCATCTCCTAGCAC

10

20

30

40

50

ACAGCCTTGGGAGCACGTGAACGCCATCCAAGAAGCCAGA
CGGCTGCTGAACCTGAGCAGAGATACAGCCGCCGAGATGA
ACGAGACAGTGGAAGTGATCAGCGAGATGTTTCGACCTGCA
AGAGCCTACCTGCCTGCAGACCAGACTGGAACCTGTACAAG
CAGGGCCTGAGAGGCAGCCTGACCAAGCTGAAAGGCCCTC
TGACAATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCC
AACACCTGAGACAAGCTGTGCCACACAGATCATCACCTTC
GAGAGCTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTCCTGCTGGTCA
TCCCCTTCGACTGCTGGGAGCCCCGTGCAAGAA (配列番号35)
【0214】

10

ヒトGM-CSF (活性可溶性GM-CSF2のタンパク質配列)

APARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLNLSDRTAAEMNETV
EVISEMFDLQEP TCLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMM
ASHYKQHCPPTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFD
CWEPVQE (配列番号36)
【0215】

ヒトGM-CSF (活性可溶性GM-CSF2のDNA配列)

GCCCCCTGCCAGATCTCCATCTCCTAGCACACAGCCTTGGG
AGCACGTGAACGCCATCCAAGAAGCCAGACGGCTGCTGAA
CCTGAGCAGAGATACAGCCGCCGAGATGAACGAGACAGTG
GAAGTGATCAGCGAGATGTTTCGACCTGCAAGAGCCTACCT
GCCTGCAGACCAGACTGGAACCTGTACAAGCAGGGCCTGAG
AGGCAGCCTGACCAAGCTGAAAGGCCCTCTGACAATGATG
GCCAGCCACTACAAGCAGCACTGCCCTCCAACACCTGAGA
CAAGCTGTGCCACACAGATCATCACCTTCGAGAGCTTCAA
AGAGAACCTGAAGGACTTCCTGCTGGTCA TCCCCCTTCGAC
TGCTGGGAGCCCCGTGCAAGAA (配列番号37)
【0216】

20

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号1のアミノ酸配列、あるいは配列番号1に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むTCRを発現し、さらに1つまたは複数の細胞内タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。細胞内タンパク質は、ホスホジエステラーゼ (例えば、PDE4B2) であり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

30

【0217】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号2のアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号2に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変TCRを発現し、さらに1つまたは複数の細胞内タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。細胞内タンパク質は、ホスホジエステラーゼ (例えば、PDE4B2) であり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

40

【0218】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号3のアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号3に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくと

50

も 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変 T C R を発現し、さらに 1 つまたは複数の細胞内タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。細胞内タンパク質は、ホスホジエステラーゼ（例えば、P D E 4 B 2）であり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1 つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

【0219】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号 4 のアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号 4 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変 T C R を発現し、さらに 1 つまたは複数の細胞内タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。細胞内タンパク質は、ホスホジエステラーゼ（例えば、P D E 4 B 2）であり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1 つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

10

【0220】

一実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号 5 のアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号 5 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む改変 T C R を発現し、さらに 1 つまたは複数の細胞内タンパク質を発現する、遺伝子操作されたリンパ球系細胞である。細胞内タンパク質は、ホスホジエステラーゼ（例えば、P D E 4 B 2）であり得る。遺伝子操作されたリンパ球系細胞は、1 つまたは複数の細胞表面受容体をさらに発現し得る。

20

【0221】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される遺伝子操作されたリンパ球は、本発明の改変 T C R に加えて、ホスホジエステラーゼを発現する。いくつかの実施形態において、ホスホジエステラーゼは、ホスホジエステラーゼ 4 B 2（P D E 4 B 2）、ホスホジエステラーゼ 4 A（P D E 4 A）、ホスホジエステラーゼ 7 A（P D E 7 A）、またはホスホジエステラーゼ 4 C（P D E 4 C）である。一実施形態では、ホスホジエステラーゼは、ホスホジエステラーゼ 4 B 2（P D E 4 B 2）である。

30

【0222】

一実施形態では、P D E 4 B 2 は、ヒト P D E 4 B 2 またはその機能的断片である。ヒト P D E 4 B 2 の G e n l n f o 識別子は 8 2 7 9 9 4 8 2 であり、N C B I アクセション番号は N P _ 0 0 1 0 3 2 4 1 6 である。

【0223】

いくつかの実施形態において、P D E 4 B 2 は、配列番号 27 のアミノ酸配列、あるいは配列番号 27 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、P D E 4 B 2 は、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、P D E 4 B 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 28 のヌクレオチド配列、あるいは配列番号 28 に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 %の配列同一性を有するヌクレオ

40

50

チド配列を含む。一実施形態では、PDE4B2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号28のヌクレオチド配列を含む。

【0224】

一実施形態では、PDE4B2は、マウスPDE4B2またはその機能的断片である。マウスPDE4B2のGenlnfo識別子は295789129であり、NCBIアクセス番号はNP_001171451である。

【0225】

いくつかの実施形態では、PDE4B2は、配列番号29のアミノ酸配列、あるいは配列番号29に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、PDE4B2は、配列番号29のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PDE4B2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号30のヌクレオチド配列、あるいは配列番号30に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、PDE4B2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号30のヌクレオチド配列を含む。

【0226】

PDE4B2またはその機能的断片を発現するのに有用な配列の例を以下に提供する。

【0227】

ヒトPDE4B2アミノ酸配列

MKEHGGTFSSSTGISGGSGDSAMDLSQLQPNYMPVCLFAE
ESYQKLAMETLEELDWCLDQLETIQTYRSVSEMASNKFKR
MLNRELTHLSEMSRSGNQVSEYISNTFLDKQNDVEIPSP
TKDREKKKKKQQLMTQISGVKKLMHSSSLNNTSISRFGVNT
ENEDHLAKELEDLNKWGLNIFNVAGYSHNRPLTCIMYAI
FQERDLLKTFRISSDTFITYMMTLEDHYHSDVAYHNSLHAA
DVAQSTHVL LSTPALDAVF TDLEILAAIFAAAIHDVDHPG
VSNQFLINTNSELALMYNDESVLENHHLAVGFKLLQEEHC
DIFMNLTKKQRQT LRKMVIDMV LATDMSKHMSLLADLKT
M VETKKVTSSGVL LLDNYTDRIQVLRNMVHCADLSNPTKSL
ELYRQWTD RIMEEFFQ QGDKERER GMEISPMCDKHTASVE
KSQVGFIDYIVHPLWETWADLVQPD AQDILD TLEDNRNWY
QSMIPQSPSPPLDEQNRDCQGLMEKFQFELTLDEEDSEGP
EKEGEGHSYFSSSTKTL CVIDPENRDSLGETDIDIATEDKS
PVD T (配列番号27)

【0228】

ヒトPDE4B2のヌクレオチド配列

ATGAAGGAACACGGCGGCACCTTTAGCAGCACAGGCATCT
CTGGTGGCAGCGGCGATAGCGCCATGGATTCTCTGCAACC
CCTGCAGCCTAACTACATGCCCGTGTGCCTGTTCTGCCGAG
GAAAGCTACCAGAAACTGGCCATGGAAACCCTGGAAGAAC
TGGACTGGTGCCTGGACCAGCTGGAAACCATCCAGACCTA
CAGATCCGTGTCCGAGATGGCCAGCAACAAGTTCAAGCGG
ATGCTGAACAGAGAGCTGACCCACCTGAGCGAGATGAGCC
GCTCTGGAAATCAGGTGTCCGAGTATATCAGCAACACCTT
CCTGGACAAGCAGAACGACGCTGGAAATCCCATCTCTCTACA

CAG AAGG ACCGCGAG AAGAAG AAAAGCAGCAGCTGATGA
CCCAGATCAGCGGCGTG AAGAAACTGATGCACAGCAGCAG
CCTGAACAACACCAGCATCAGCAGATTCTGGCGTGAAACACC
GAGAACGAGGACCACCTGGCCAAAGAGCTGGAAGATCTGA
ACAAATGGGGCCTGAACATCTTCAACGTGGCCGGCTACAG
CCACAACAGACCCCTGACCTGCATTATGTACGCCATCTTTC
CAAGAGCGGGACCTGCTGAAAACCTTCCGGATCAGCAGCG
ACACCTTTCATCACCTACATGATGACCCTTGAGGACCACTA
CCACAGCGACGTGGCCTACCACAATAGCCTGCATGCCGCT
GATGTGGCCCAGAGCACACACGTGCTGCTGTCTACACCAG
CTCTGGATGCCGTGTTCAACCGACCTGGAAATTCTGGCCGC
CATCTTTGCCGCCGCTATCCACGATGTTGATCACCCCGGC
GTGTCCAACCAGTTCCTGATCAATACCAACAGCGAGCTGG
CCCTGATGTACAACGACGAGAGCGTGCTGGAAAACCA
TCTGGCCGCTGGGCTTCAAGCTGCTGCAAGAGGAACACTGC
GACATCTTTCATGAACCTGACCAAGAAGCAGCGGCAGACCC
TGCGGAAGATGGTTCATCGATATGGTGCTGGCCACCGACAT
GAGCAAGCACATGTCTCTGCTGGCCGACCTGAAAACCATG
GTCGAGACAAAGAAAGTGACCAAGCAGCGGCGTTCTGCTGC
TGGACAACCTACACCGACAGAATCCAGGTGCTGAGAAACAT
GGTGCACTGCGCCGATCTGAGCAACCCCAACCAAGAGCCTG
GAACTGTACAGACAGTGGACCGACCGGATCATGGAAGAGT
TCTTTCAGCAAGGCGACAAAGAACGCGAGCGCGGCATGGA
AATCTCCCCAATGTGCGATAAGCACACCGCCAGCGTGGA
AAGTCCCAAGTGGGCTTTATCGACTACATCGTGACCCCTC
TGTGGGAGACATGGGCGGATCTGGTTTCAGCCTGACGCTCA
GGACATCCTGGACACACTGGAAGATAACCGGAACTGGTAT
CAGAGCATGATCCCTCAGAGCCCCCTCTCCACCTCTGGATG
AGCAGAACAGAGATTGCCAGGGCCTGATGGAAAAGTTCCA
GTTTCGAGCTGACACTGGACGAAGAGGACTCTGAGGGCCCC
GAGAAAGAAGGCGAGGGGCCACAGCTACTTCAGCAGCACA
AGACCCCTGTGCGTGATCGACCCCGAGAACAGGGATAGCCT
GGGCGAGACAGACATCGACATTGCCACCGAGGACAAGAGC
CCCGTG GATACA (配列番号 28)

【0229】

マウスPDE4B2のアミノ酸配列

MKEQGGTVSGAASSRGGGDSAMASLQPLQPNYLSVCLFPE
ESYQKLAMETLEELDWC LDQLETIQTYRSVSEMASNKFKR
MLNRELTHLSEMSRSGNQVSEYISNTFLDKQNDVEIPSPT
QKDREKKKKQQLMTQISGVKKLMHSSSLNNTSISRFGVNT
ENEDHLAKELEDLNKWGLNIFNVAGYSHNRPLTCIMY AIF
QERDLLKTFKISSDTFVTYMMTLEDHYHSDVAYHNSLHAA
DVAQSTHVL LSTPALDAVF TDLEILAAIFAAAIHDVDHPG
VSNQFLINTNSELALMYNDESVLENHHLAVGFKL LQEEHC
DIFQNLTKKQRQTLRKMVIDMV LATDMSKHMSLLADLKT
M VETKKVTSSGVLLLDNYTDRIQVLRNMVHCADLSNPTKSL
ELYRQWTD RIMEEFFQQGDKERERGM EISPMCDKHTASVE
KSQVGFIDYIVHPLWETWADLVQPDAQDILDTLEDNRNWY
QSMIPQSPSPPLDERSRDCQGLMEKFQFELTLEEEDSEGP
EKEGEGHSYFSSTKTLCVIDPENRDSLEETDIDIATEDKS

10

20

30

40

50

P I D T (配列番号 29)

【0230】

マウスPDE4B2のヌクレオチド配列

ATGAAGGAACAGGGCGGCACCGTGTCCTGGCGCCGCTTCTA
GTAGAGGCGGAGGCGATAGCGCCATGGCCAGTCTGCAGCC
ACTGCAGCCCAACTACCTGAGCGTGTGCCTGTTCCCCGAG
GAAAGCTACCAGAAACTGGCTATGGAAACCTTGGAAGAAC
TGGACTGGTGCCCTGGACCAGCTGGAAACCATCCAGACCTA
CAGATCCGTGTCCGAGATGGCCAGCAACAAGTTCAAGAGG
ATGCTGAACAGAGAGCTGACCCACCTGAGCGAGATGAGCA
GATCCGGCAACCAGGTGTCCGAGTATATCAGCAACACCTT
CCTGGACAAGCAGAACGACGTGGAAATCCCCAGCCCCACC
CAGAAGGACC GCGAGAAGAAAGAAAAAGCAGCAGCTGATGA
CCCAGATCAGCGGCGTGAAAGAAACTGATGCACAGCAGCAG
CCTGAACAACACACAGCATCAGCAGATTCTGGCGTGAAACAC
GAGAACGAGGACCACCTGGCCAAAGAGCTGGAAGATCTGA
ACAAATGGGGCCTGAACATCTTCAACGTGGCCGGCTACAG
CCACAACAGACCCCTGACCTGCATTATGTACGCCATCTTC
CAGGAACGGGACCTGCTGAAAACCTTCAAGATCAGCAGCG
ACACCTTCTGTGACCTACATGATGACACTGGAAGATCACTA
CCACAGCGACGTGGCCTACCACAACCTCTCTGCACGCCGCC
GATGTGGCCCAAGAGCACTCATGTGCTGCTGAGCACCCCTG
CCCTGGACGCCGTGTTCAACCGATCTGGAAATCCTGGCCGC
TATCTTCGCCCGCTGCCATCCACGATGTGGACCACCCCTGGC
GTGTCCAACCAGTTCCTGATCAACACAAACAGCGAGCTGG
CCCTGATGTACAACGACGAGAGCGTGCTGGAAAACCAACCA
TCTGGCCGTGGGCTTCAAGCTGCTGCAGGAAGAACACTGC
GACATCTTTTCAGAACCTGACCAAGAAGCAGAGGCGAGACCC
TGAGAAAGATGGTCAATCGACATGGTGCTGGCCACCGACAT
GAGCAAGCACATGTCCCTGCTGGCCGACCTGAAAACCATG
GTGGAAACAAAGAAAGTGACCAGCTCCGGCGTGCTGCTGC
TGGACAACCTACACCGACAGAAATCCAGGTGCTGAGGAACAT
GGTGCACTGCGCCGACCTGTCCAACCCCAACCAAGAGCCTG
GAACTGTACAGACAGTGGACCAGACAGGATCATGGAAGAGT
TCTTTTCAGCAAGGCGACAAAGAAACGCGAGAGGGGCGATGGA
AATCAGCCCCATGTGCGACAAAGCACACCGCCAGCGTGGA
AAGTCCCAAGTGGGCTTTATCGACTACATCGTGCACCCCC
TGTGGGAGACATGGGCGGATCTGGTGACGCTGACGCCCA
GGACATCCTGGACACTCTGGAAGATAACCGGAACCTGGTAT
CAGAGCATGATCCCCCAGAGCCCCAGCCCTCCACTGGACG
AGAGATCCAGAGACTGCCAGGGCCTGATGGAAAAGTTCCA
GTTTCGAGCTGACTCTGGAAGAAAGAGGACAGCGAGGGCCCC
GAGAAAGAAAGGCGAGGGGCCACTCTTACTTTCAGCAGCACCA
AGACACTGTGCGTGATCGACCCCGAGAACAGGGACAGCCT
CGAAGAGACTGACATCGACATTGCCACCGAGGACAAGAGC
CCCATCGATACA (配列番号 30)

【0231】

二機能性分子

強力な抗腫瘍T細胞免疫の欠如を克服するための1つのアプローチは、上記のT細胞受容体または抗体由来受容体のいずれかから作製される親和性増強受容体の使用による、腫

10

20

30

40

50

瘍を標的とするT細胞のex vivo遺伝子改変である。T細胞のex vivo操作を必要としない補完的なアプローチは、腫瘍認識とT細胞誘導(T cell engaging)ドメインを組み合わせることでT細胞を標的腫瘍に向けなおす(redirect)融合タンパク質の使用を含む。そのような融合タンパク質の特異性および抗腫瘍活性は、例えば、Cancer Immunol Immunother (2013) 62:773-785, Nat Med. 2012 Jun;18(6):980-7、および米国特許第7,763,718号に記載され、これらのそれぞれは、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0232】

一態様では、本明細書に提供されるのは、本明細書に開示される改変TCRまたはその機能的断片と、T細胞上の細胞表面タンパク質に特異的に結合するポリペプチドを含む二機能性分子である。T細胞上の細胞表面タンパク質の例には、CD2、CD3、CD4、CD8、CD44、CD45RA、CD45RB、CD45RO、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD16、CD28、およびIL-2Rが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0233】

特定の実施形態において、ポリペプチドは、免疫エフェクターポリペプチドである。

【0234】

本明細書で使用される場合、「免疫エフェクターポリペプチド」という用語は、一般に、T細胞の活性化などによる、免疫系の液性または細胞性アームの直接的または間接的活性化を通して、免疫応答を誘導または刺激する任意の分子を指す。免疫エフェクターポリペプチドの例には、IL-1、IL-1 α 、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、IL-23、TGF- β 、IFN- γ 、TNF α 、抗CD2抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD44抗体、抗CD45RA抗体、抗CD45RB抗体、抗CD45RO抗体、抗CD49a抗体、抗CD49b抗体、抗CD49c抗体、抗CD49d抗体、抗CD49e抗体、抗CD49f抗体、抗CD16抗体、抗CD28抗体、抗IL-2R抗体、ウイルスタンパク質およびペプチド、および細菌タンパク質またはペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0235】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、抗体または抗体フラグメントを含む。抗体フラグメントには、一本鎖抗体、Fabフラグメント、Fvフラグメント、単鎖Fvフラグメント(scFv)、(Fab) $_{2'}$ フラグメントなどの二価抗体フラグメント、F(ab') $_{2}$ フラグメント、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、イントラボディ、ミニボディ、ジアボディ、トリアボディ、およびデカボディが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、ポリペプチドはscFvを含む。特定の実施形態において、ポリペプチドは免疫エフェクターポリペプチドである。

30

【0236】

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、CD3に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、抗CD3抗体を含む。抗CD3抗体の例には、OKT3、UCHT-1、BMA031、および12F6が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、抗CD3抗体に由来するscFvを含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、OKT3、UCHT-1、BMA031または12F6に由来するscFvを含む。特定の実施形態において、CD3に特異的に結合するポリペプチドは、免疫エフェクターポリペプチドである。

40

【0237】

特定の実施形態において、TCRのN末端は、T細胞上の細胞表面タンパク質に特異的に結合するポリペプチドのC末端に連結される。特定の実施形態において、TCRのC末端は、T細胞上の細胞表面タンパク質に特異的に結合するポリペプチドのN末端に連結される。特定の実施形態において、TCRは、ヘテロ二量体 $\alpha\beta$ TCRポリペプチド対、または一本鎖 $\alpha\beta$ TCR(scTCR)ポリペプチドであり、ヘテロ二量体TCRポリペプ

50

チド対の α 鎖もしくは β 鎖のN末端、またはs c T C RポリペプチドのN末端は、T細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合するポリペプチドのC末端アミノ酸に連結される。特定の実施形態において、T C Rは、ヘテロ二量体 $\alpha \beta$ T C Rポリペプチド対、または一本鎖 $\alpha \beta$ T C Rポリペプチドであり、ヘテロ二量体T C Rポリペプチド対の α 鎖もしくは β 鎖のC末端、またはs c T C RポリペプチドのC末端は、T細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合するポリペプチドのN末端アミノ酸に連結される。

【0238】

T C Rと、T細胞の細胞表面タンパク質に特異的に結合するポリペプチドとの連結は、直接的であっても、またはリンカー配列を介して間接的であってもよい。リンカー配列は通常柔軟性があり、それら配列は、柔軟性を制限する可能性のある嵩高い側鎖を持たないグリシン、アラニン、セリンなどのアミノ酸で構成される。リンカー配列の使用可能なまたは最適な長さは、任意の所与のT C R二機能性分子の場合において簡単に決定される。一部の例では、リンカーは、約12未満、例えば、約10未満、または5～10のアミノ酸長である。

【0239】

本明細書に記載の二機能性分子のいくつかの実施形態において、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号2～5のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号5のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。上記の実施形態のいずれかにおいて、改変T C Rまたはその機能的断片は、非置換W T T C Rの β 鎖（例えば、配列番号1に記載される）と比較して、 β 鎖のC D R 2内に単一アミノ酸置換を含む。

【0240】

本明細書に記載の二機能性分子の特定の実施形態において、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号2～5のいずれか1つから選択されるアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号2のアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号3のアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T C Rまたはその機能的断片は、配列番号4のアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。一実施形態では、改変T C Rまたはその機能的

断片は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む β 鎖を含む。

【0241】

本明細書に記載の二機能性分子の特定の実施形態において、改変 T C R またはその機能的断片は、配列番号 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む α 鎖をさらに含む。一実施形態では、改変 T C R またはその機能的断片は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む α 鎖をさらに含む。

【0242】

様々な実施形態において、本明細書に記載の二機能性分子は、本明細書に記載の宿主細胞または医薬組成物と組み合わせて使用され得る。

【0243】

治療方法

一態様では、本明細書で提供されるのは、対象におけるがんを治療する方法である。この方法は、そのようながんを患っている対象に、有効量の本発明の改変 T C R を提示するリンパ球系細胞、またはそのような細胞を含む医薬組成物を投与することを含む。本明細書に記載の方法によって治療可能ながんの非限定的な例には、例えば、神経芽細胞腫、骨髄腫、転移性メラノーマ（黒色腫）、滑膜肉腫、膀胱がん、食道がん、肝細胞がん、頭頸部がん、非小細胞肺がん、卵巣がん、前立腺がん、および乳がんが含まれる。

【0244】

一態様では、本明細書で提供されるのは、哺乳動物における免疫応答を刺激または増強する方法であり、有効量の本発明の遺伝子操作されたリンパ球系細胞、またはそのような細胞を含む医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む。

【0245】

がんの追加の例には、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫 (blastoma)、肉腫（例えば、骨肉腫または横紋筋肉腫）、および白血病またはリンパ性悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。そのようながんのより具体的な例には、扁平上皮がん（例えば、上皮性扁平上皮がん）、腺扁平上皮がん、肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がん、肺の扁平上皮がんを含む）、腹膜がん、肝細胞がん、胃がんまたは腹部がん (gastric or stomach cancer)（例えば、消化器がん、脾臓がんを含む）、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、尿路がん、肝細胞がん (hepatoma)、乳がん、結腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がんまたは子宮がん、唾液腺がん、腎臓がんまたは腎がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝がん、肛門がん、陰茎がん、原発性または転移性メラノーマ（黒色腫）、多発性骨髄腫および B 細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、脳（例えば、高悪性度神経膠腫（グリオーマ）、びまん性橋膠腫 (diffuse pontine glioma)、上衣腫、神経芽細胞腫（もしくは神経膠腫） (neuroblastoma)、または膠芽腫 (glioblastoma)）、および頭頸部がん、ならびに関連する転移が含まれる。腫瘍の追加の例は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, § on Hematology and Oncology, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 20th Edition, § on Hematology and Oncology, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2018 (ISBN 978-0-911-91042-1) (2018 digital online edition at internet website of Merck Manuals); および SEER Program Coding and Staging Manual 2016 に記載され、これらはそれぞれ、すべての目的のために参照により完全に組み込まれる。

【0246】

様々な実施形態において、本明細書に記載の方法によって治療可能ながんは、その細胞の表面にがん抗原 NY - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ（配列番号 8）を提示する。

【0247】

上記の治療方法のいずれかのいくつかの実施形態では、組成物は治療有効量で投与される。本発明の方法で投与される組成物の投与量は、対象の身体パラメータ、投与頻度、投与方法、クリアランス速度などに応じて大きく変化するであろう。初期用量はより多くなる可能性があり、その後により少ない維持用量が続く可能性がある。有効な投与量レベルを維持するために、用量は、毎週または隔週のように少ない頻度で投与されるか、あるいはより少ない用量に分割されて、毎日、半週ごとなどに投与され得る。様々な用量が改変宿主細胞の *in vivo* 持続性を達成するのに有効となり得ることが企図される。また、様々な用量が改変宿主細胞の *in vivo* エフェクター機能を改善するのに有効となり得ることも企図される。

【0248】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法によって作製された改変宿主細胞を含む組成物は、 $10^2 \sim 10^{10}$ 細胞/kg 体重、 $10^5 \sim 10^9$ 細胞/kg 体重、 $10^5 \sim 10^8$ 細胞/kg 体重、 $10^5 \sim 10^7$ 細胞/kg 体重、 $10^7 \sim 10^9$ 細胞/kg 体重、または $10^7 \sim 10^8$ 細胞/kg 体重（これらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得る。改変宿主細胞の数は、組成物が意図される治療用途に依存するであろう。

【0249】

改変宿主細胞は、上記の投与量で複数回投与されてもよい。改変宿主細胞は、治療を受けている患者に対して、同種異系、同系、異種、または自己由来（自家）であり得る。

【0250】

本開示に記載される組成物および方法は、化学療法、外科手術、放射線療法、遺伝子治療などの他のタイプの腫瘍治療と組み合わせて利用することができる。

【0251】

様々な疾患／障害を治療するために使用される場合、本開示の組成物および方法は、同じまたは類似の疾患／障害に適した他の治療方法／薬剤と共に利用され得ることも企図される。そのような他の治療方法／薬剤を共投与（同時にまたは逐次的に）して、相加的または相乗的効果を生み出すことができる。各薬剤の適切な治療上有効な投与量は、相加作用または相乗効果のために低減され得る。

【0252】

上記の治療方法のいずれかのいくつかの実施形態において、この方法は、免疫抑制剤、生物学的製剤、プロバイオティクス、プレバイオティクス、およびサイトカイン（例えば、GM-CSF、IFNまたはIL-2）からなる群より選択される1つまたは複数の追加の化合物を対象に投与することをさらに含む。

【0253】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の方法は、本開示のキメラサイトカイン受容体を発現する免疫細胞の機能を増強するために、免疫細胞によって産生されるGM-CSFに加えて、外因性GM-CSFを提供することをさらに含む。外因性GM-CSFは、例えば、i) FDA承認のGM-CSF薬サルグラモスチム（Leukine（商標））の注射、またはii) GM-CSFを発現する非ウイルスまたはウイルスベクター（例えば、FDA承認のGM-CSFを発現する腫瘍溶解性ウイルス タリモジェンラヘルパレプベック [TVEC、Imlygic（商標）]）の使用によって提供され得る。これらの薬物は、本開示のキメラサイトカイン受容体を発現する免疫細胞の患者への投与（例えば、注入）の前に、投与と一緒に、または投与後に与えることができる。

【0254】

非限定的な例として、本発明は、（例えば、IL1、INF α/β 、IL6、TNF、IL23などの遮断を介して）炎症を遮断する他の治療法と組み合わせることができる。

【0255】

本発明の方法および組成物は、例えば、治療用ワクチン（GVAX、DCベースのワクチンなどを含むがこれらに限定されない）、チェックポイント阻害剤（CTLA4、PD1、LAG3、TIM3などを遮断する薬剤を含むがこれらに限定されない）、または活

10

20

30

40

50

性化剤（４－１ＢＢ、ＯＸ４０などを増強する薬剤を含むがこれらに限定されない）などの他の免疫調節治療と組み合わせることができる。本発明の方法はまた、ＮＫＴ機能または安定性を調節する能力を有する他の治療と組み合わせることができ、これには、抗原をロードされていないまたはロードされた、ＣＤ１ｄ、ＣＤ１ｄ融合タンパク質、ＣＤ１ｄ二量体またはＣＤ１ｄのより大きなポリマー；ＣＤ１ｄ－キメラ抗原受容体（ＣＤ１ｄ－ＣＡＲ）；またはヒトに存在する５つの既知のＣＤ１異性体（ＣＤ１ａ、ＣＤ１ｂ、ＣＤ１ｃ、ＣＤ１ｅ）のいずれかが含まれるが、これらに限定されない。本発明の方法はまた、ミドスタウリン（midostaurin）、エナシデニブ（enasidenib）、またはそれらの組み合わせなどの他の治療と組み合わせることもできる。

【０２５６】

本発明の治療方法は、追加の免疫療法および治療法と組み合わせることができる。例えば、腫瘍を治療するために使用される場合、本発明の組成物は、腫瘍のタイプ、患者の状態、他の健康問題および様々な因子に応じて、例えば、外科手術、放射線療法、化学療法またはそれらの組み合わせなどの従来の治療法と組み合わせて使用することができる。特定の態様において、本発明の阻害剤との組み合わせ腫瘍治療に有用な他の治療薬には、抗血管新生剤が含まれる。多くの抗血管新生剤が同定され、当技術分野で知られており、それには、例えば、ＴＮＰ－４７０、血小板第４因子、トロンボスポンジン－１、組織メタロプロテアーゼ阻害物質（ＴＥＭＰ１およびＴＥＭＰ２）、プロラクチン（１６－Ｋｄ断片）、アンギオスタチン（プラスミノゲンの３８－Ｋｄ断片）、エンドスタチン、ｂＦＧＦ可溶性受容体、トランスフォーミング成長因子ベータ、インターフェロンアルファ、可溶性ＫＤＲおよびＦＬＴ－１受容体、胎盤ポリリフェリン関連タンパク質、ならびにＣarmeliet and Jain（２０００）に列挙されたものが含まれる。一実施形態では、本発明の改変宿主細胞は、抗ＶＥＧＦ抗体、ＶＥＧＦバリエーション、可溶性ＶＥＧＦ受容体断片、ＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲを遮断することができるアプタマー、抗ＶＥＧＦＲ中和抗体、ＶＥＧＦＲチロシンキナーゼの阻害剤、およびそれらの任意の組み合わせ（例えば、抗ｈＶＥＧＦ抗体Ａ４．６．１、ベバシズマブまたはラニズマブ）などの、ＶＥＧＦアンタゴニストまたはＶＥＧＦ受容体アンタゴニストと組み合わせて使用することができる。

【０２５７】

本開示の併用療法（combination treatment）で使用することができる化学療法化合物の非限定的な例には、例えば、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、アザシチジン、ｂｃｇ、ピカルタミド、ブレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンプトテシン（camptothecin）、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロドロネート、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デシタビン、ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタビン、ゲニステイン、ゴセレリン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン、イロノテカン（ironotecan）、レトロゾール、ロイコボリン、ロイプロリド、レバミソール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストステロン、チオグアニン、チオテパ、チタノセンジクロリド、トポテカン、トラスツズマブ、トレチノイン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビンが含まれる。

【０２５８】

これらの化学療法化合物は、それらの作用機序によって、例えば、以下のグループに分類され得る：代謝拮抗剤／抗がん剤、例えば、ピリミジン類似体（５－フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタビン、ゲムシタビンおよびシタラビン）およびプリン類似体、葉酸拮抗剤および関連阻害剤（メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチン、および２－クロロデオキシアデノシン（クラドリビン））；抗増殖／抗有糸分裂剤、例えば、ビンカルカロイド（ビンブラスチン、ビンクリスチン、およびビノレルビン）などの天然物、タキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン、およびナベルピンなどの微小管崩壊剤（microtubule disruptor）、エピジポドフィロシトキシン（epidipodophyllotoxin）（エトポシド、テニポシド）、DNA損傷剤（アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミン、オキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソウレア、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテル（texotere）、テニポシド、トリエチレンチオホスホラミドおよびエトポシド（VP16））；抗生物質、例えば、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）、ダウノルビシン、ドキシソルビシン（アドリアマイシン）、イダルビシン、アントラサイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミスラマイシン）およびマイトマイシン；酵素（L－アスパラギンを体系的に代謝し、自身でアスパラギンを合成する能力を持たない細胞を取り除くL－アスパラギナーゼ）；抗血小板剤；抗増殖／抗有糸分裂アルキル化剤、例えばナイトロジェンマスタード（メクロレタミン、シクロホスファミドおよび類似体、メルファラン、クロラムブシル）、エチレンイミンおよびメチルメラミン（ヘキサメチルメラミンおよびチオテパ）、アルキルスルホネートブスルファン、ニトロソウレア（カルムスチン（BCNU））および類似体、ストレプトゾシン）、トラゼン－ダカルバジニン（trazenes-dacarbazine）（DTIC）；抗増殖／抗有糸分裂抗代謝剤、例えば葉酸類似体（メトトレキサート）；プラチナ配位錯体（シスプラチン、カルボプラチン）、プロカルバジン、ヒドロキシウレア、ミトタン、アミノグルテチミド；ホルモン、ホルモン類似体（エストロゲン、タモキシフェン、ゴセリリン、ピカルタミド、ニルタミド）、およびアロマターゼ阻害剤（レトロゾール、アナストロゾール）；抗凝固剤（ヘパリン、合成ヘパリン塩、および他のトロンビン阻害剤）；血栓溶解剤（組織プラスミノゲン活性化因子、ストレプトキナーゼおよびウロキナーゼなど）、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗遊走剤（antimigratory agent）；抗分泌剤（ブレフェルジン（breveldin））；免疫抑制剤（シクロスポリン、タクロリムス（FK-506）、シロリムス（ラパマイシン）、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル）；抗血管新生化合物（例えば、TNP-470、ゲニステイン、ベバシズマブ）および成長因子阻害剤（例えば、線維芽細胞成長因子（FGF）阻害剤）；アンジオテンシン受容体遮断薬；一酸化窒素ドナー；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体（トラスツズマブ）；細胞周期阻害剤および分化誘導因子（トレチノイン）；mTOR阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤（ドキシソルビシン（アドリアマイシン）、アムサクリン、カンプトテシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エニポシド、エピルビシン、エトポシド、イダルビシンおよびミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン）、コルチコステロイド（コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾンおよびプレニゾロン）；成長因子シグナル伝達キナーゼ阻害剤；ミトコンドリア機能不全誘導因子およびカスパーゼ活性化因子；およびクロマチン崩壊剤。

【0259】

本明細書に記載の方法の様々な実施形態において、対象はヒトである。対象は、年齢や性別を問わず、若年者であっても成人であってもよい。

【0260】

医薬組成物、剤形および投与

10

20

30

40

50

一態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の改変TCRを有するリンパ球系細胞、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。

【0261】

担体は、例えば、水、生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、および植物油を含む、溶媒または分散媒体であり得る。微生物の作用の防止は、当技術分野で知られている様々な抗菌剤および抗真菌剤によってもたらすことができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましいであろう。

【0262】

本明細書に記載の改変TCRを有する遺伝子操作されたリンパ球系細胞の集団に基づく医薬組成物は、1つまたは複数の生理学的に許容される担体および／または賦形剤を使用して任意の従来の方法で処方することができる。リンパ球系細胞は、例えば、注射、非経口、腫、直腸投与による、または腫瘍への直接投与による投与のために処方され得る。

【0263】

医薬組成物は、注射による（例えば、ボラス注射または持続注入による）非経口投与用に処方することができる。注射用製剤は、任意選択で防腐剤を含む、例えばアンプルまたは複数回投与容器中の単位剤形で提示することができる。医薬組成物はさらに、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液または乳濁液として処方することができ、懸濁剤、安定剤および／または分散剤などの他の薬剤を含み得る。

【0264】

注射用途に適した剤形には、滅菌水溶液または分散液；ごま油、ピーナッツ油または水性プロピレングリコールを含む製剤；および無菌注射溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末が含まれ得る。すべての場合において、製剤は無菌でなければならず、また流動性でなければならない。製造条件および特定の保管パラメータ（例えば、冷蔵および凍結など）の下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。

【0265】

調合すると、溶液は、剤形と適合性のある方法で、治療上有効であるような量で投与され得る。用量範囲および投与頻度は、本明細書に記載の改変TCRを有する遺伝子操作されたリンパ球系細胞の集団の性質、および病状、ならびに特定の患者のパラメータおよび使用される投与経路に応じて変化し得る。

【0266】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の改変TCRを有する遺伝子操作されたリンパ球系細胞の集団は、約 10^7 ～約 10^{12} の範囲の用量で対象に投与され得る。より正確な用量は、それが投与されている対象に依存し得る。例えば、対象が若年である場合、より低い用量が必要とされ、対象が成人ヒト対象である場合、より高い用量が必要とされ得る。特定の実施形態において、より正確な用量は、対象の体重に依存し得る。

【実施例】

【0267】

本発明をさらに以下の実施例によって説明および実証する。しかしながら、明細書におけるこれらおよび他の実施例の使用はいずれも、単なる例示であり、決して本発明のまたは任意の例示された用語の範囲および意味を限定するものではない。同様に、本発明は、ここに記載された特定の好ましい実施形態に限定されない。実際に、本明細書を読むと、本発明の多くの修正および変更が当業者に明らかであり、そのような変更は、本発明の精神または範囲から逸脱することなく行うことができる。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲およびそれら特許請求の範囲が権利を有する等価物の全範囲によってのみ限定されるべきである。

【0268】

実施例1. 可溶性の合理的に操作されたBC1 TCRバリエーションの結合親和性材料および方法

10

20

30

40

50

T C Rのアミノ酸置換を、構造ベースのコンピューター支援タンパク質工学によって設計した。野生型T C R-p M H C複合体 (P D B I D 2 b n r) の実験構造から始めて、結合自由エネルギーへの各T C Rおよびp M H C残基の寄与を、M o l e c u l a r M e c h a n i c s - G e n e r a l i z e d B o r n S u r f a c e A r e a (M M - G B S A) を使用して推定した。これらの結果を使用して、p M H Cに対するT C Rの親和性を高める可能性のある配列修飾を決定した。後者をコンピューター上でT C R構造に導入し、結果として生じる結合自由エネルギーの変化を、M M - G B S Aを使用して再度推定した。i n s i l i c o (インシリコ) で結合自由エネルギーが有利に増加すると予測された配列修飾が、実験的検証のために保持された。可溶性T C Rは、哺乳動物細胞培養システムと細菌封入体からの両方で生成された。可溶性p M H Cに対する直接滴定E L I S Aを使用して、野生型T C Rと比較した結合強度を比較した。目的のT C Rを、 α 鎖および β 鎖の細菌封入体のリフォールディングから作製し、親和性および速度論 (k i n e t i c s) を測定するために表面プラズモン共鳴によって特徴付けした。

10

【0269】

B C 1と名付けられた野生型T C Rは、よく特徴付けられたT C R 1 G 4からわずか4アミノ酸 (α 鎖に2つ、 β 鎖に2つ) だけ異なる (Chen, J. L., et al., J Exp Med 2005. 201, 1243-1255、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。B C 1 T C Rは、長期生存しているがん患者の免疫優勢クローンに由来するため、臨床的に興味深いものである。

【0270】

20

H E K - 2 9 3細胞での可溶性T C Rの製造および精製

T C R B C 1の α 鎖および β 鎖を、C M Vプロモーターの制御下で発現ベクターp H Y K 8に別々にクローン化した。ヘテロ二量体鎖のペアリングを、C h a n gらの戦略に従って酸性-塩基性ジッパーで促進した (Chang, H. C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91, 11408-11412)。T C R β 鎖はC y s 2 4 2の位置の後ろで切り捨て、柔軟なリンカー領域、トロンビン部位、酸性ジッパー、およびH I S タグに置き換え、 α 鎖はC y s 2 0 9の後ろで切り捨て、リンカー領域、トロンビン部位、および塩基性ジッパーで置き換えた。可溶性T C Rは、線形25 k D a ポリエチレンイミンを用いてプラスミドをH E K - 2 9 3細胞にコトランスフェクションすることにより製造した。トランスフェクトされた細胞を、(酸性化を最小限に抑えるため) 4 m M のバルプロ酸を添加したP r o 2 9 3 C D M培地 (L o n z a) で最大7日間懸濁培養した。培養上清を遠心分離によって収集し、製造元の提案に従ってN i - N T Aアガロース (Q i a g e n) を使用してT C Rを精製した。

30

【0271】

細菌封入体からの可溶性T C Rおよびp M H Cの製造

B L 2 1 (D E 3) p L y s細菌細胞を使用して、封入体としてT C R α 鎖および β 鎖 (p G M T 7にクローニング) を作製し、以前記載したように透析によって可溶化およびリフォールディングした (Boulter, J. M., et al., Protein Eng 2003. 16, 707-711)。次に、T C Rを濃縮およびろ過した後、N i ²⁺固定化金属キレートセファロース (G E H e a l t h c a r e) およびイミダゾール溶出を用いて高速タンパク質液体クロマトグラフィーH I S タグ精製を行った。S P R分析の前に、サンプルを10 k D a M W C O スピンフィルター (M i l l i p o r e) で濃縮し、S 2 0 0カラムを用いてH B S - E Pバッファー (10 m M H E P E S, p H 7. 4, 0. 15 M N a C l, 3 m M E D T A, 0. 005% (v/v) P 2 0界面活性剤) 中にゲルろ過し、凝集体を除去した。ビオチン化A 2 / N Y - E S O 1 5 7 - 1 6 5は、以前に説明されたように調製した (Altman, J. D., et al., Science, 1996. 274, 94-96)。

40

【0272】

合理的に開発されたT C Rの滴定E L I S A

ビオチン化p M H C (A 2 / N Y - E S O 1 5 7 - 1 6 5複合体) を、トリス緩衝生理食塩水 (T B S, p H 7. 4) 中の2% B S AでブロッキングしたS Aコーティングプレ

50

ート（96ウェル、高結合プレート、Corning Life Sciences）で捕捉した。各ステップ間にTBS（0.1% Tween）でプレートを完全に洗浄した。TBS（1% BSA、0.1% Tween）中の可溶性TCRと室温で1.5時間インキュベートした後、SAの遊離部位をビオチンでブロックした。結合したTCRを、TBS（1% BSA、0.1% Tween）で1/1500に希釈した抗β鎖TCR mAb（TCR 1151、Thermo Scientific、ロックフォード、イリノイ州、米国）、続いてTBS（0.1% Tween）で1/1500に希釈したHRP結合ヤギ抗抗マウスIgG-Ab（Thermo Scientific）、およびH₂O₂を含有するクエン酸-リン酸緩衝液中の2,2'-アジノービス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）でのHRP検出を用いて検出した。30分後にOD₄₀₅₋₄₉₀でプレートの読み取りを行った。各TCRについてELISAを少なくとも3回繰り返した。

10

【0273】

表1において、WT BC1 TCRの結合は「+++」として定義され、WT BC1 TCRより大きい結合は「++++」として示され、WTより小さい結合は「++」として示され、非常に弱い結合は「+」として示され、結合無しは「-」として示された。

20

30

40

50

【表 1】

表1. 野生型 TCR BC1 の結合と比較した、可溶性の合理的に設計された TCR のプレート捕捉 pMHC への直接 ELISA 結合

変異	配列番号	CDR2 α	配列番号	CD3 α	CD1 β	配列番号	CD2 β	配列番号	CD3 β	結合
α 鎖		5 5 5 5 1 2 3 4		9 9 9 9 5 6 7 8	2 2 2 7 8 9		4 5 5 5 5 5 9 0 1 2 3 4 5		9 9 9 9 4 5 6 7	
WT TCR (BC 1)	38	Q S S Q	44	Q T G G	N H E	50	V G A G I T D	61	Y V G A	+++
α-S52T	39	Q T S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	+
α-S53T	40	Q S T Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	+
α-S53N	41	Q S N Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	-
α-Q54W	42	Q S S W	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	+
α-T96E	43	Q S S Q	46	Q E G G	N H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	++
α-T96Y	43	Q S S Q	47	Q Y G G	N H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	++++
α-G98A	43	Q S S Q	48	Q T G A	N H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	-
α-G98S	43	Q S S Q	49	Q T G S	N H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	-
β 鎖										
β-N27L	43	Q S S Q	45	Q T G G	L H E	51	V G A G I T D	62	Y V G A	+
β-E29Q	43	Q S S Q	45	Q T G G	V H Q	51	V G A G I T D	62	Y V G A	-
β-G50V	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	52	V V A G I T D	62	Y V G A	-
β-A51D	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	53	V G D G I T D	62	Y V G A	++
β-G50A+ A51D	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	54	V A D G I T D	62	Y V G A	++
β-G52Q	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	55	V G A Q I T D	62	Y V G A	++
β-I53F	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	56	V G A G F T D	62	Y V G A	++++
β-I53W	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	57	V G A G W T D	62	Y V G A	++++
β-I53E	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	58	V G A G E T D	62	Y V G A	++++
β-D55E	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	59	V G A G I T E	62	Y V G A	++++
β-Y94N	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	63	N V G A	++++
β-V95L	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	64	Y L G A	++
β-V95I	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	65	Y I G A	-
β-G96S	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	66	Y V S A	-
β-A97V	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	67	Y V G V	+
β-A97I	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	68	Y V G I	-
β-A97L	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	69	Y V G L	++++
β-A97D	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	51	V G A G I T D	70	Y V G D	++
β-G50A+ A51E+ A97D	43	Q S S Q	45	Q T G G	N H E	60	V A E G I T D	70	Y V G D	++++

【0274】

合理的に開発された TCR の表面プラズモン共鳴 (SPR)

SPRは、BIAcore 3000およびSAコーティングされたCM5センサーチップ (BIAcore、GE Healthcare) 上において25℃で実施した。フローセルに、均一に分布させるために10μl/分の速度で200反応単位 (response unit) のビオチン化pMHCをロードした。ストレプトアビジン (SA) の遊離部位をビオチンでブロックし、参照セルをサンプル溶液の注入時のバルク屈折率の変化に対する対照として使用した。速度論的分析のために、ロードされたチップ上にTCRの6～8段階希釈液を50～100μl/分で注入した。データは、2重または3重で行われた少なくとも

も2つの独立した実験のうちの1つの実験からの代表であり、最善の $Ch i 2$ 値を与える。各 TCR の k_{on} 値および k_{off} 値は、1:1 のラングミュア結合を想定して計算し、データは B I A e v a l u a t i o n 4. 1 およびグローバルフィットアルゴリズムを使用して解析した。 K_D は k_{off} / k_{on} によって計算した。

【0275】

表2において、「*」は、A97LおよびDMbが、以前に公開されたT細胞に最適な機能的活性を付与するTCRであることを示す(Irving, M., et al., JBC 2012. 287, 23068-23078、これは参照によりすべての目的のためにその全体が本明細書に組み込まれる)。「**」は、1G4が、NY-ESO-1157-165に結合する特性を有する患者から分離された野生型TCRであることを示す(Dunn, S. M., et al., Protein Sci 2006. 15, 710-721; Robbins, P. F., et al., J Clin Oncol 2011. 29, 917-924; Rapoport, A. P., et al., Nat Med 2015. 21, 914-921; Chen, J. L., J Exp Med 2005. 201, 1243-1255、これらのそれぞれは、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。「***」は、1G4LYが、臨床試験で使用されている1G4の高親和性バリエーションであることを示す(Dunn, S. M., et al., Protein Sci 2006. 15, 710-721; Robbins, P. F., et al., J Clin Oncol 2011. 29, 917-924; Rapoport, A. P., et al., Nat Med 2015. 21, 914-921; Chen, J. L., J Exp Med 2005. 201, 1243-1255、これらのそれぞれは、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる)。BC1 TCRバリエーションにおける変異は太字で強調表示されている。

【表2】

表2. 選択された合理的に設計された TCR のバイオコア(Biocore)分析

	配 列 番 号	CDR2β								配 列 番 号	CDR3β				K_D		
TCR BV13		4 8	4 9	5 0	5 1	5 2	5 3	5 4	5 5		9 6	9 7	9 8	9 9	K_D (μM)	k_{on} ($M^{-1} sec^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
WT (Lau155 BV13c1) “BC1”	71	S	V	G	A	G	I	T	D	78	G	A	A	G	21.4	1.1×10^4	0.23
A97L*	72	S	V	G	A	G	I	T	D	79	G	L	A	G	2.7	2.3×10^4	0.061
I53E	73	S	V	G	A	G	E	T	D	80	G	A	A	G	3.89	6.35×10^4	0.247
I53F	74	S	V	G	A	G	F	T	D	80	G	A	A	G	0.41	2.13×10^4	0.009
I53W	75	S	V	G	A	G	W	T	D	80	G	A	A	G			
D55E	76	S	V	G	A	G	I	T	E	80	G	A	A	G			
DMb (G50A+ A51E)*	77	S	V	A	E	G	I	T	D	80	G	A	A	G	1.91	2.35×10^4	0.045
1G4**	72	S	V	G	A	G	I	T	D	81	G	N	T	G	14.2	1.7×10^4	0.12
1G4LY***	72	S	V	G	A	G	I	T	D	82	G	L	Y	G			

【0276】

結果および考察

上記のように、合理的設計(MM-GBSA計算)(Zoete, V. et al., JMR 2010. 23, 142-152; Zoete, V., and Michielin, O. Proteins 2007. 67, 1026-1047; Zoete, V., et al., Proteins 2005. 61, 79-93)により、初代ヒトT細胞と比較して、増大する親和性および高められた機能を有するHLA-A2-NY-ESO157-165 TCRのパネルを開発した(Zoete, V. et al., JMR 2010. 23, 142-152; Schmid, D. A., et al., Journal of immunology 2010. 184, 4936-4946; Irving, M., et al., JBC 201

2. 287, 23068-23078)。

【0277】

表1および2に示すように、TCRのパネルは、HLA-A2-NY-ESO157-165に対する親和性の増大を示す。表1は、滴定ELISAによるTCRのpMHCへの直接結合を示し、表2は、これらTCRのサブセットについて決定された親和性および速度論を示す。表1において太字で強調表示されているように、結合について「++++」で示される、WT TCRよりも高い親和性でpMHCに結合する単一アミノ酸置換TCRがいくつかある。表2に示すように、WT BC1 TCRの残基53での少なくとも2つの異なる単一アミノ酸置換(I53E、およびI53F)が、WT BC1 TCRと比較した場合に、より高い結合親和性(K_D WT>I53E>I53F)をもたらし、I53FがHLA-A2-NY-ESO-1157-165に対して最も高い親和性を有する。

10

【0278】

抗TCR BV13.1 Abおよび蛍光標識テトラマーで染色されたいくつかの異なるBC1 TCRバリエントで操作されたCD4⁺およびCD8⁺細胞のフローサイトメトリー分析(2A~2Bおよび図3A~3B)は、試験したすべてのバリエント(I53E、I53F、I53W、D55E、およびDMb)が、野生型(BC1 TCR形質導入細胞)および陽性対照A97Lおよび1G4LYに匹敵する発現を示すことを表す。

【0279】

実施例2. NY-ESO-1 TCRバリエントを発現するT細胞によるサイトカイン産生材料および方法
細胞株培養

20

293TおよびJurkat細胞株はATCCから購入した。すべての細胞株を、10%熱不活化FBS、2mmol/lのL-グルタミン、100μg/mlのペニシリン、および100U/mlのストレプトマイシンを添加したRPMI-1640で培養した。293T細胞株は、レンチウイルスのパッケージングおよび調製に使用した。

【0280】

TCRα鎖およびTCRβ鎖のクローニングおよびレンチウイルスの作製

TCRa23およびTCRb13.1の両方のORFをレンチウイルスベクターpRRLに組み込み、その際に3'の長い末端反復のU3領域のほとんどが欠失され、自己不活性化3'長末端反復(self-inactivating 3' long terminal repeat)(SIN)が生じた。TCRa鎖とTCRb鎖は、ピコルナウイルス由来の2A配列によって分離された。

30

【0281】

レンチウイルスは、TurboFectを使用した293T細胞の一過性トランスフェクションによって産生された。簡単に説明すると、293T細胞に、NY-ESO TCRaおよびTCRb鎖をコードするレンチウイルスベクターpRRLとレンチウイルスヘルパープラスミドと(R8.74およびpMD2G)をコトランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後にレンチウイルス上清を回収し、ろ過し、超遠心分離によって濃縮した。ペレットを適切な量のRPMI 10%FBSに再懸濁し、-80℃で保存するかまたは直接使用した。

40

【0282】

レンチウイルス形質導入の前に、合計 0.5×10^6 のCD4⁺またはCD8⁺T細胞を、50IU/mlのインターロイキン2の存在下で 1×10^6 のαCD3/αCD28ビーズで18~20時間刺激した。5日目にビーズを除去し、T細胞を10ng/mlのIL-7および10ng/mlのIL-15の存在下で培養した。TCRの発現は、フローサイトメトリー分析により、形質導入後6日目およびそれ以降の時点に決定した。使用した抗体は、PE標識ヒトTCRVb13.1、ならびにAPC標識抗ヒトCD4および抗ヒトCD8抗体であった。NY-ESO157-165を提示するPE標識HLA-A2テトラマーを使用して、導入されたTCRの正しいフォールディングを検出した。FlowJoソフトウェアを使用して染色細胞を解析した。

50

【0283】

細胞株

HLA-A2.1⁺/NY-ESO⁺メラノーマ細胞株Mw275およびA375、ならびにNY-ESO陰性細胞株NA8は、10%FBSおよび抗生物質（100IE/mlのペニシリンおよび100μg/mlのストレプトマイシン）を添加したIMDMで培養した。Saos-2（骨肉腫）およびU266（B細胞）、両方ともHLA-A2.1/NY-ESO⁺、ならびにOVCAr3（卵巣）およびSKO#（卵巣）、両方ともNY-ESO陰性は、10%FBSおよび抗生物質を添加したRPMIで培養した。

【0284】

NY-ESO陰性細胞株、U87MG（脳）、A431（皮膚）、A673（肉腫）、RD-ES（肉腫）、HT-29（肺）、およびSK-N-AS（神経芽細胞腫）は、10%のFBSと抗生物質を添加したDMEM添加で培養した。

【0285】

初代T細胞の精製および形質導入

初代ヒトT細胞は、健康ドナーに由来するバフィーコートの末梢血単核細胞（PBMC）から分離した。すべての血液サンプルは、ドナーのインフォームドコンセントを得て収集し、ヴォー州（スイス）の倫理承認を受けて遺伝子操作した。遠心分離の標準プロトコルを使用して、Lymphoprep（Axonlab）分離溶液を介して全PBMCを取得し、磁気ビーズ分離（easySEP、Stem Cell Technology）と組み合わせたネガティブセレクションキットを使用してCD4⁺およびCD8⁺T細胞を分離した。T細胞を完全培地（10%熱不活化ウシ胎児血清、100U/mlのペニシリン、100μg/mlの硫酸ストレプトマイシン（Invitrogen、Lifetechnologies）を添加した、Glutamaxを含むRPMI1640）で培養し、抗CD3および抗CD28モノクローナル抗体（mAb）コーティングビーズ（Lifetechnologies）を用いて、1:2のT細胞:ビーズの比で刺激した。活性化の12~24時間後、約5~10の感染多重度（MOI）で、レンチウイルス粒子でT細胞に形質導入した。ヒト組換えインターロイキン-2（h-IL2; Glaxo）を1日おきに添加して、刺激の5日後（+5日）までに50IU/mlの最終濃度を得た。この時点で、磁気ビーズを除去し、IL2をさらに添加しないで、h-IL15を10ng/ml（Miltenyi Biotec GmbH）で添加した。拡大のために0.5~1x10⁶細胞/mlの細胞密度を維持した。導入されたTCRを、形質導入の5日後に蛍光マルチマー染色によって測定した。すべての機能アッセイの前に、休止状態の操作されたT細胞を、同一の導入遺伝子発現となるように調整した。

【0286】

サイトカイン産生

サイトカイン放出アッセイは、最終体積200μlのRPMI培地中、96ウェル丸底プレートにおいて、二重で、ウェルあたり5x10⁴の標的細胞と5x10⁴のT細胞を共培養することにより実施した。24時間後、共培養上清を回収し、製造元のプロトコル（BioLegend）に従って、ELISAキットを使用してIFN-γおよびIL-2の存在について調べた。報告値は、4人の健康ドナー（HD）に由来する形質導入されたT細胞の平均を表す。

【0287】

結果および考察

サイトカイン産生に対するTCR結合パラメータの影響を評価するために、形質導入されていない、ならびに様々なTCRバリエーションおよびWT B C 1 TCRで形質導入されたCD4⁺およびCD8⁺細胞を、NY-ESO₁₅₇₋₁₆₅ペプチドの連続10倍希釈液をロードしたT2細胞とインキュベートした。TCRを介した活性化に応答して産生されたIL-2について、分泌は、TCR I53F、I53W、D55E、DMb、および1G4LYを発現する操作されたCD4⁺細胞で最大に達した。TCR I53F、I53W、D55E、およびDMbを発現する操作されたCD4⁺細胞は、WT TCRと

比較した場合に、IL-2産生に関してより良好に機能するように思われ、それらの機能は1G4LY TCRと同様である(図4A)。操作されたTCRバリエーションであるI53Eは、このアッセイでWT TCRと同様の機能を示した。同じ条件下で、非形質導入CD4⁺細胞によってIL-2は産生されなかった(図4A)。

【0288】

IL-2は、HLA/A2-NY-ESO-1を自然に発現する腫瘍T細胞株(Me275)、またはHLA/A2-NY-ESO-1を発現するように遺伝子操作された腫瘍T細胞株(OVCAR5 NLMおよびA2008-A2-NLM)において、非形質導入(NT)細胞(ネガティブコントロール)、野生型BC1 TCR形質導入細胞、およびTCR I53Eを発現するように形質導入された細胞、およびA97Lを発現するように形質導入された細胞と比較して、TCR I53Fを発現するように操作された健康ドナー(HD)のT細胞によって最も効率的に産生される。HLA/A2-NY-ESO-1を発現していない腫瘍細胞株(OVCAR5およびA2008-A2およびNA8)との交差反応性はない(図5)。

【0289】

IL-2は、非形質導入(NT)細胞(ネガティブコントロール)と比較して、Me275、Saos-2、およびU266細胞において、TCR I53F、およびI53Wを発現するように操作されたCD4⁺T細胞によって最も効率的に産生される。TCR DMbおよび1G4LYを発現するように操作されたCD4⁺T細胞によるIL-2産生が顕著ではない他のNY-ESO陽性細胞株と比較して、Saos-2およびU266細胞において、TCR DMbおよび1G4LYを発現するように操作されたCD4⁺T細胞によるIL-2産生がある。IL-2は、NY-ESO陽性細胞株のいずれにおいても、TCR I53E、D55Eを発現するように操作されたCD4⁺細胞、野生型BC1 TCR形質導入細胞、およびTCR A97Lを発現するように形質導入された細胞によって産生されなかった(図6)。WT BC1 TCRで形質導入されたCD4⁺T細胞では、A2/NY-ESO-NY-1157-165の認識はCD8受容体に依存する。この場合、WT BC1 TCRで形質導入されたCD4⁺T細胞は、MHCクラスIに結合したNY-ESOエピトープに反応するようには見えない。しかしながら、CD4⁺T細胞が、MHCクラスIに結合したNY-ESOエピトープへの結合親和性が高い(WT BC1 TCRと比較して) TCRバリエーション(すなわち、I53FおよびI53W TCR)で形質導入された場合、これら操作されたT細胞によるIL-2産生がより高くなることが観察され、I53F TCR形質導入細胞のCD8共受容体(co-receptor)依存性が低いことを示す。

【0290】

図9では、IL-2は、野生型BC1 TCRおよびI53E TCRを発現するように操作された細胞と比較して、TCR I53Fを発現するように操作されたCD4⁺T細胞によって最も効率的に産生される。野生型BC1 TCR操作細胞およびI53Eを発現するように操作された細胞と比較した場合に、TCR I53Fで操作されたCD4⁺T細胞はCD8共受容体依存性が低い傾向があり(図9)、また図5で比較すると、I53F TCR発現細胞によるIL-2産生を、野生型BC1 TCR操作細胞、I53Eを発現するように操作された細胞、およびA97L TCRを発現する細胞と比較した場合にも、同じ傾向が見られる。

【0291】

TCRを介した活性化にตอบสนองして産生されたIFN-γについて、TCR A97L、I53E、I53F、I53W、D55E、DMb、および1G4LYを発現する操作されたCD8⁺細胞は、このアッセイでWT BC1 TCRと同様の機能を示した。同じ条件下で、非形質導入CD8⁺細胞によってIFN-γは産生されなかった(図4B)。

【0292】

IFN-γは、HLA/A2-NY-ESO-1を自然に発現する腫瘍T細胞株(Me275)、またはHLA/A2-NY-ESO-1を発現するように遺伝子操作された腫

10

20

30

40

50

瘍T細胞株（OVCAR5 NLMおよびA2008-A2-NLM）において、非形質導入（NT）細胞（ネガティブコントロール）と比較して、TCR A97L、I53E、およびI53Fを発現するように操作された健康ドナー（HD）T細胞によって効率的に産生される。HLA/A2-NY-ESO-1を発現していない腫瘍細胞株（OVCAR5およびA2008-A2およびNA8）との交差反応性はない。親和性が増強されたBC1 TCRバリエーションのパネルによるIFN- γ 産生は、野生型BC1 TCRを発現するように操作されたT細胞と類似していた（図7）。図10において、IFN- γ は、野生型BC1 TCRおよびI53E TCRを発現する細胞と比較して、I53F TCRを発現するように操作されたCD8⁺細胞によって最も効率的に産生される。

【0293】

IFN- γ は、Me275細胞では、TCR I53F、D55E、およびDMb；A375細胞では、I53FおよびDMb；Saos-2細胞では、I53F、I53W、D55EおよびDMb；U266細胞では、I53F、I53W、D55E、DMb；を発現するように操作されたCD8⁺T細胞によって最も効率的に産生される。IFN- γ は、すべてのNY-ESO陽性細胞株において、A97L（野生型BC1 TCRの陽性対照変異体）および1G4LY（野生型1G4 TCRの陽性対照変異体）を発現するように操作されたCD8⁺T細胞によって効率的に産生される。IFN- γ は、A375を除くすべてのNY-ESO陽性細胞株において、野生型BC1 TCRを発現するように操作されたCD8⁺T細胞によって適度なレベルで産生された（図8）。

【0294】

NY-ESO陽性細胞株A375を使用した場合に、I53F TCRを発現するように操作されたCD8⁺T細胞は、1G4LYと同様のレベルのIFN- γ 産生を示したが、I53Wは、I53Fおよび1G4（LY）の両方と比較して、より少ないIFN- γ を産生した。NY-ESO陰性細胞株を使用した場合、IFN- γ の産生はなかった（図11）。

【0295】

実施例3. NY-ESO-1 TCRバリエーションを発現するT細胞の細胞傷害活性

NY-ESO TCR特異的CD8⁺T細胞の細胞傷害活性を、Incucyteを使用して測定した。簡単に説明すると、 1×10^4 のT2標的細胞を、細胞傷害性赤色試薬（Essen Bioscience, Ann Arbor, Michigan, USA）の存在下で、ウェルあたり $2.5 / 10^4$ のNY-ESOテトラマー陽性CD8⁺T細胞と共培養した。Incucyte zoomソフトウェアを使用して、2時間ごとに画像を撮影した。

【0296】

I53FおよびI53Eで形質導入されたCD8⁺T細胞の細胞傷害活性は、野生型BC1 TCRを発現するCD8⁺T細胞の細胞傷害活性と類似していた（図12）。

【0297】

実施例4. NY-ESO-1 TCRバリエーションを発現するT細胞の抗腫瘍活性

NOD SCID γ KOマウス（NSG）に皮下注射する直前に、 3×10^6 のMe275細胞を $6 / 10^6$ のNY-ESO特異的T細胞と混合するWinnアッセイを実施した。T細胞は30%のCD4⁺T細胞と70%のCD8⁺T細胞で構成されていた。腫瘍サイズを週に2回測定した。腫瘍体積が 1000 mm^3 に達するとマウスを殺した。

【0298】

図13Bに見られるように、A97LおよびI53Fで形質導入されたT細胞の両方が、43日間腫瘍サイズを約 0 mm^3 に維持するのに効果的であった。I53E形質導入T細胞は、このアッセイで野生型BC1 TCR形質導入T細胞と同様に機能した。非形質導入T細胞では、腫瘍サイズは43日目に約 700 mm^3 のサイズに達した。

【0299】

実施例5. NY-ESO-1 TCRバリエーションを発現するT細胞の抗腫瘍活性

NSGマウスに 5×10^6 のMe275細胞を注射した。腫瘍サイズが $50 \sim 100 \text{ mm}^3$

10

20

30

40

50

m^3 に達したら、 10×10^6 のNY-ESO特異的T細胞を腫瘍周囲または静脈内に2回注射した(10日目と13日目)。T細胞は30%の $\text{CD}4^+$ T細胞と70%の $\text{CD}8^+$ T細胞で構成されていた。腫瘍サイズを週に2回ノギスで測定した。腫瘍が 1000 mm^3 に達するとマウスを殺した。

【0300】

A97LおよびI53Fで形質導入されたT細胞は、腫瘍周囲に投与した場合、30日間腫瘍サイズを 100 mm^3 未満に維持するのに効果的であった。I53E形質導入T細胞は、このアッセイで野生型BC1 TCR形質導入T細胞と同様に機能した。非形質導入T細胞では、腫瘍は30日目に約 275 mm^3 のサイズに達した(図14B)。

【0301】

静脈内投与した場合、I53F TCRで形質導入されたT細胞(健康ドナー1から得られた)は、50日間にわたって腫瘍を無視できるサイズに保つのに効果的であった(図15B、左)。別の健康ドナー(健康ドナー2)からのT細胞を使用してI53F TCRで形質導入した場合、そのような形質導入された細胞は、65日間にわたって腫瘍を約 350 mm^3 未満に保つのに効率的であった(図15B、右)。

【0302】

静脈内投与した場合、I53Fと1G4LYで別々に形質導入されたT細胞(健康ドナー3から得られた)は両方とも効果的であり、漸増する滴定で、非形質導入T細胞と比較して腫瘍体積サイズを小さく維持するという点で同様のプロファイルを示した(図16B)。

【0303】

実施例6. NY-ESO-1 TCRおよびGM-CSFを発現する改変T細胞

材料および方法

マウス

NOD.Cg-Prkdcscid Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)マウスは、特定病原微生物排除(SOPF)条件下において施設内で飼育し、すべての動物実験は、ローザンヌ大学の動物施設で特定病原微生物排除(SPF)条件下において実施した。すべての実験は、ヴォー州の獣医当局によって承認され、スイス連邦法に従って実施した。

【0304】

細胞株

野生型親A375($\text{HLA-A}2^+$ 、NY-ESO-1⁺)、Me1A v13($\text{HLA-A}2^+$ 、NY-ESO-1⁻)およびNA8($\text{HLA-A}2^+$ 、NY-ESO-1⁻)メラノーマ、H1650($\text{HLA-A}2^+$ 、NY-ESO-1⁻)非小細胞肺癌、およびLN-18($\text{HLA-A}2^+$ 、NY-ESO-1⁺)膠芽腫細胞株は、ATCCにより購入した。Me275($\text{HLA-A}2^+$ 、NY-ESO-1⁺)メラノーマ細胞株はD. Speiser教授(ローザンヌ大学、Ludwig Institute for Cancer Researchのローザンヌ支部)から提供され、*in vivo*でその活性を追跡するためにルシフェラーゼを安定発現するように操作された。OVCAR5($\text{HLA-A}2^+$ 、NY-ESO-1⁻)およびA2008-A2($\text{HLA-A}2^+$ 、NY-ESO-1⁻)卵巣がん細胞株は、ペンシルベニア大学から入手され、全長NY-ESO-1がん/精巣ファミリー腫瘍抗原配列、ならびにそれぞれ*in vitro*および*in vivo*でそれらの活性を追跡するためにmCherryおよびルシフェラーゼを安定発現するように操作された。すべてのメラノーマ細胞株は、10% FCSおよび1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したIMDM+Glutamax(Thermo)で維持し、残りの細胞株は、10% FCSおよび1% ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したRPMI(Thermo)で維持した。

【0305】

分子クローニング

マウスCSF2(GM-CSF)cDNA(Uniprot:P01587)の全配列はInvitrogenによって合成された。続いて、PCRおよび標準的な分子クロー

10

20

30

40

50

ニング技術を使用して、Thy1.1-T2A (CD90.1) レポーター遺伝子カセットに続いて、配列をpMSGVレトロウイルスベクター (Hughes, Human Gene Therapy, 2005;16:457-472) にクローン化し、pMSGV-Thy1.1-T2A-mGM-CSFレトロウイルスプラスミドを作製した。pMSGV-Thy1.1-T2Aを対照ベクターとして使用した。

【0306】

フローサイトメトリー

APC抗ヒトCD8、APC抗ヒトCD4、およびAPC抗マウスThy1.1 (CD90.1) はBioLegendから購入した。NY-ESO-1 TCRテトラマーは、ローザンヌ大学のペプチドおよびテトラマー施設 (Peptide and Tetramer facility) によって施設内で製造された。FITC抗ヒトMCSPはMiltenyi Biotecで購入した。APC抗マウスCD45、APCCy7抗マウスF4/80、およびPECy7抗マウスCD11bは、フローサイトメトリー施設、FBM、LICR/UNILにより提供されおよび／または施設内で製造された。データ取得はLSRIIFローサイトメーター (BD Biosciences) で実施し、FlowJo (TreeStar) でデータを解析した。

【0307】

レトロウイルス／レンチウイルスの作製

レトロウイルス粒子を作製するために、HEK293T細胞に、pMSGVトランスファープラスミドと、レトロウイルスパッケージングプラスミドpMD-Gag/PolおよびpMD RD114 (Milone et al, 2018 Leukemia 32, 1529-1541) ネコ内在性ウイルスエンベロープ糖タンパク質をコトランスフェクションした。トランスフェクションの24時間後、48時間後、および72時間後に培養上清を回収し、24,000xgで2時間超遠心分離して濃縮した。濃縮ウイルスは使用するまで-80℃で保存した。ウイルス力価およびMOIは、HEK293T細胞におけるThy1.1レポーター遺伝子の発現によって決定した。

【0308】

ヒトT細胞刺激およびレンチウイルス／レトロウイルス形質導入

健康ドナーのアフェレーシス製品は、承認された大学の倫理委員会のプロトコルに基づく書面による同意を得て、スイスのエパランジュにあるTransfusion Interregionale CRS SA, Epalingesから購入した。Lymphoprep (StemCell Technologies) 密度勾配遠心分離を使用してPBMCを調製し、CD8またはCD4磁気マイクロビーズ (Miltenyi) を使用して、製造元のプロトコルに従って、CD8またはCD4 T細胞をネガティブ分離した。分離されたCD8およびCD4 T細胞を、抗CD3/CD28ビーズ (Invitrogen) により、ヒトIL-2 (GlaxoSmithKline) の存在下において2:1のビーズ:T細胞比で刺激した。

【0309】

ヒトT細胞のレンチウイルス／レトロウイルス形質導入

T細胞のレンチウイルス形質導入は、培地にウイルス粒子を直接添加することにより、活性化の24時間後に実施し (MOI 20)、Lentiboost (Sirion Biotech) を同時に添加することにより増強した。T細胞のレトロウイルス形質導入は、活性化の48時間後に実施した。簡単に説明すると、事前にレトロウイルス粒子を2000xgで1.5時間スピノキュレートしたレトロネクチンコーティングプレートにT細胞を移した。翌日、レトロネクチンコーティングプレートからT細胞を取り出した。CD3/CD28ビーズは活性化の5日後に除去し、T細胞はその後、下流で使用するまで、 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ T細胞/mlで、10%熱不活化ウシ胎児血清 (ThermoFisher Scientific)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、10ng/ml ヒトIL-7 (Miltenyi)、および10ng/ml IL-15 (Miltenyi) を添加したRPMI 1640-Glutamax (ThermoFisher

10

20

30

40

50

Scientific)で維持した。

【0310】

IFN γ 産生／T細胞細胞傷害性アッセイ

10⁵の休止T細胞(4:1のCD8⁺:CD4⁺)を完全培地中において10⁵の腫瘍細胞と48時間共培養した。形質導入効率に基づいてT細胞数を正規化し、条件間で同様のT細胞頻度を達成するために必要な場合は、非形質導入T細胞を添加した。48時間後、収集した無細胞培養上清中のIFN γ レベルを、メーカーのプロトコルに従ってELISA(ThermoFisher Scientific)で測定した。T細胞の細胞傷害性は、細胞のフローサイトメトリー分析によって決定し、培養物中のアネキシンV⁺/DAPI⁺腫瘍細胞のパーセンテージとして定義した。結果を、腫瘍細胞のみを含む培養物中のアネキシンV⁺/DAPI⁺のパーセンテージに対して正規化した。

10

【0311】

ヒトT細胞によるトランスジェニックマウスGM-CSF産生

T細胞(CD8またはCD4)を10⁶T細胞/mlの濃度で、10ng/mlのIL-7/IL-15を添加した無血清培地中において24時間培養した。生存率および細胞数を、血球計算盤を使用して事前に決定した。形質導入効率に基づいてT細胞数を正規化し、条件間で同様のT細胞頻度を達成するために必要に応じて非形質導入T細胞を添加した。24時間後、収集した無細胞上清中のマウスGM-CSFレベルを、メーカーのプロトコルに従ってELISA(ThermoFisher Scientific)で測定した。

20

【0312】

骨髓由来マクロファージ(BMDM)の作製

NSGマウスの大腿骨と脛骨をフラッシングすることにより、全骨髓細胞を単離した。10%FCS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、50 μ M β -メルカプトエタノールおよび50ng/mlのマウスM-CSF(PeproTech)を添加したDME M+Glutamax(Thermo)培地中において全骨髓細胞を7日間インキュベートし、付着画分を採取することによってマクロファージを作製した。3日目と6日目に培地をリフレッシュした。

【0313】

ウィンアッセイ(Winn assay)

6~12週齢の雄NSGマウスの脇腹に、5x10⁶(または指定される数)のNY-ESO-1 TCR発現マウスGM-CSF分泌ヒトT細胞(4:1のCD8⁺:CD4⁺)または同等数のモック(mock)形質導入マウスGM-CSF分泌ヒトT細胞と事前に混合した5x10⁶のMe275メラノーマ細胞を皮下接種した。腫瘍の成長を週に2回のノギス測定によって監視し、式 $V = 1/2 (L \times W^2)$ (ここで、Lは最大の縦方向の直径、W(幅)は最大の横方向の直径である)を使用して腫瘍体積を計算した。腫瘍が1000mm³に達したとき、元の体重の>20%を失ったとき、または弱まって瀕死になったときに、マウスを殺した。各群は5匹以上のマウスで構成された。

30

【0314】

異種移植モデル

6~12週齢の雄NSGマウスの横腹に、5x10⁶のMe275メラノーマ細胞を皮下接種した。同時に、上記のようにヒトT細胞を活性化、形質導入、および拡大した。接種の約2週間後に腫瘍が50~100mm³に達したときに、T細胞をマウスに養子移入した。T細胞は、注射ごとに、1x10⁷のNY-ESO-1 TCR発現マウスGM-CSF分泌ヒトT細胞(4:1のCD8⁺:CD4⁺)または同等数のモック形質導入マウスGM-CSF分泌ヒトT細胞で、13日目と15日目に2回投与した。上記のように、腫瘍の成長をノギス測定によって監視した。

40

【0315】

結果および考察

この研究で使用されたレトロウイルスマウスGM-CSFおよびレンチウイルスNY-

50

ESO-1 TCR構築物の概略図を図17Aに示す。ウイルス形質導入後7日目に、ヒトCD8⁺およびCD4⁺T細胞によるNY-ESO-1 TCRおよびマウスGM-CSFの発現がフローサイトメトリーによって確認された(図17B)。形質導入されたCD8⁺T細胞の培養物の上清において、分泌されたマウスGM-CSFをELISAによって検出することができる(図17C)。これは、NY-ESO-1 TCRを安定発現しかつマウスGM-CSFを分泌するようにヒトT細胞を効率的に共操作(co-engineer)できることを示す。

【0316】

NY-ESO-1 TCRで操作されたT細胞によるIFN γ 分泌は、HLA-A2⁺NY-ESO-1⁺腫瘍細胞の認識に基づき検出され得る(図18A)。IFN γ レベルに対するマウスGM-CSFの影響はない。NY-ESO-1 TCRで操作されたT細胞は、HLA-A2⁺NY-ESO-1⁺腫瘍細胞を容易に殺すことができ、その細胞傷害活性はマウスGM-CSFによる影響を受けない(図18B)。これは、分泌されたマウスGM-CSFがヒトT細胞の活性に影響を及ぼさないことを示す。

【0317】

マウスGM-CSFを分泌するように共操作されたヒトNY-ESO-1 TCR発現T細胞は、NY-ESO-1 TCRのみを発現する対照T細胞と比較して、Me275メラノーマ細胞の生着および確立を効果的に遅らせることができる(図19A)。これは、マウスの生存に大きく反映しており、NY-ESO-1 TCR発現マウスGM-CSF分泌T細胞で処置されたマウスの40%で腫瘍がなかった(図19B)。2x10⁷のNY-ESO-1 TCR発現マウスGM-CSF分泌T細胞の養子移入は、NY-ESO-1 TCR単独と比較して、確立されたMe275腫瘍のより優れた腫瘍制御を示した(図19C)。これは、NSGヒトメラノーマ異種移植マウスモデルにおいて、腫瘍微小環境で分泌されたT細胞由来マウスGM-CSFが、NY-ESO-1特異的T細胞による腫瘍成長の制御を有意に増強できることを示す。

【0318】

実施例7. NY-ESO-1 TCR「I53F」バリエーションおよびPDE4B2を発現する改変T細胞

材料および方法

分子クローニング

ヒトT細胞においてヒトPDE4B2ホモログを過剰発現させるために、Bobisse, S. et al. Cancer Res. 69, 9385-9394 (2009)で使用されているレンチウイルスベクターpRRLを使用した。特に、ヒトPGKプロモーターおよびコザック(Kozak)エレメント(GCCACC(配列番号31)の下流にクローン化された配列は、ヒトWT PDE4B2(NCBI参照配列: NP_001032416.1; 図26の配列番号27)をコードし、DGGG(配列番号32)リンカーを介して以下のアミノ酸配列に融合される: GKPIPNPLLLGLDSTGGSGGGKPIPNPLLLGLDSTGGSGSGSGKPIPNPLLLGLDST(配列番号33)。この配列は、V5タグエピトープの3つの繰り返しと、Reddy Chichili et al., Protein Sci. 22, 153-167 (2013)で使用されている2つのリンカーを含む。対照T細胞の操作には、同じpRRLベクターバックボーンが用いられ、ヒトPGKプロモーターおよびコザックエレメントの下流にeGFPコード配列が導入された。T細胞にNY-ESO-1抗原特異性を与えるために、Lammers, C. H. J. et al. Cancer Gene Ther. 15, 268-274 (2008)で用いられているSFGLetroウイルスベクターが使用され、それはNY-ESO-1 TCRバリエーション β -I53Fの α 鎖ならびに β 鎖をコードする。導入されたすべてのDNA配列は、ヒト細胞でのタンパク質発現のためにコドン最適化された。

【0319】

濃縮レンチウイルスまたはレトロウイルスの作製

ウイルス粒子を作製する目的で、HEK-293T細胞にトランスフェクトした。簡単に説明すると、レンチウイルス粒子の作製のために、18 μ gのgag/polコードR

10

20

30

40

50

8. 74プラスミド、7 μ gのエンベロープタンパク質コードVSVGプラスミド、ならびに15 μ gの導入遺伝子コードpRRLベクターを、3mLのOpti-MEM (11058-021、Thermo Fisher Scientific)と事前に混合したTurboFect (R0532、Thermo Fisher Scientific) 120 μ Lで希釈した。同様に、レトロウイルス粒子の作製のために、18 μ gのgag/polコードPegPam、7 μ gのエンベロープタンパク質コードRD114プラスミド、ならびに22 μ gのSFGレトロウイルスベクターを、3mLのOpti-MEMと事前に混合したTurboFect (R0532、Thermo Fisher Scientific) 120 μ Lで希釈した。注目すべきことに、TurboFect/Opti-MEM溶液を、パッケージング/導入遺伝子プラスミドの希釈に使用する前に、室温で5分間インキュベートした。続いて、トランスフェクションミックスを、室温で30分間インキュベートした後、90~95%コンフルエントのHEK-293T細胞を含むT150組織培養フラスコにおいて、10%ウシ胎児血清およびペニシリン/ストレプトマイシン (4-01F00-H、Bioconcept)を添加したRPMI 1640 (11875085、Thermo Fisher Scientific)から構成される新鮮なR10培地の上に添加した。24時間後、培養上清を新鮮なR10に交換し、さらに24時間経過した後それを回収し、ろ過 (45 μ m) および24000gで2時間の遠心分離にかけた。最後に、ウイルス粒子を400 μ LのR10に再懸濁した後、ドライアイスで急速凍結し、-80℃に置いた。

【0320】

T細胞の分離、形質導入および培養

健康ドナーからのPBMCを、標準的なFicoll-Paque遠心分離によって0日目に分離し、メーカーの指示に従ってそれぞれのネガティブ分離キット (130-096-533、130-096-495 Miltenyi) を使用してCD4⁺またはCD8⁺T細胞を精製した。分離直後に、50U/mLの組換えヒトIL2 (GlaxoSmithKlineから贈与)の存在下において、T細胞あたり2ビーズの比率で、T細胞をR10中において抗CD3/CD28コーティングマイクロビーズ (11132D、Thermo Fisher Scientific)で刺激した。48ウェルプレートにおいて、0.5 $\times$ 10⁶T細胞/ウェル、1/10⁶T細胞/mLの濃度で、T細胞を活性化した。レンチウイルス形質導入のために、1:500希釈で使用されたLentiBOOST (商標) (Sirion Biotech GmbH)の存在下での刺激の18~22時間後に、0.5/10⁶のT細胞を含むウェルあたり、100 μ Lの濃縮レンチウイルスを加えた。レトロウイルスの形質導入は、未処理の48ウェル細胞培養プレート内で生じた。具体的には、そのようなウェルを、PBS中の20ng/mLのレトロネクチン (RetroNectin) (T100B、Takara) 溶液で4℃で一晩コーティングした後、PBSで洗浄し、続いて37℃で30分間R10でブロッキングした。これらウェルをPBSで洗浄した後、50 μ Lの濃縮レトロウイルスを50 μ LのR10とともに添加し、プレートを25℃、2000gで90分間遠心した。レトロウイルスのコトランスダクション (co-transduction) を行うために、事前にレンチウイルスに曝露されたT細胞を、刺激後40~44時間以内に、レトロネクチン (RetroNectin) /レトロウイルスコーティングウェルに移し、260gで10分間スピンドウンした。このようなT細胞を、レトロウイルス形質導入の24時間後に組織培養処理ウェルに移した。T細胞の拡大を支援するためにIL2 (50U/mL)を加えたR10を、T細胞活性化マイクロビーズが除去される5日目まで培養物に添加した。5日目以降、10ng/mLの組換えヒトIL7およびIL15 (130-095-764、130-095-362、Miltenyi)を加えたR10をT細胞培養物に添加した。形質導入効率は7日目にFACSで評価し、T細胞は8~21日目の間に細胞内cAMPの定量化または機能アッセイに使用した。

【0321】

cAMPの測定

休止T細胞を洗浄し、様々な濃度のフォルスコリンまたはPGE₂に1時間曝露した。T細胞は12ウェルプレートにおいて 1×10^6 T細胞/mLの濃度で処理したが、条件ごとに 2.5×10^6 T細胞を使用した。続いて、T細胞を250 μ lの0.1M HCLで溶解し、それらの細胞内cAMP含有量を、製造元の指示に従って直接cAMP ELISAキット (ADI-900-066、Enzo Life Sciences) で評価した。

【0322】

フローサイトメトリー

すべてのFACSデータをLCRIIFローサイトメーター (BD) で取得し、FlowJoソフトウェアを使用して解析した。死細胞除去のために、製造元の指示に従ってfixable aqua dead dye L34965またはL34975 (Invitrogen) を使用し、一方、T細胞染色のためには以下の抗体を使用した: CD45: Pac Blue (304029、BioLegend)、抗V5タグ: FITC (R96325、Thermo Fisher Scientific)、抗V5タグ: Dy650 (NBP2-52653C、Novus biologicals)、Vb13.1: PE (IM2292、BD)、IFN γ : PeCy7 (502527、BioLegend)、TNF- α : PE (502909、BioLegend)、抗BrdU: APC (12-5071-42、Thermo Fisher Scientific)。FACSにより細胞内サイトカイン産生を評価するために、ウェルあたり 50×10^3 の生きたT細胞を、丸底96ウェルプレートにおいて、プレートコーティングaCD3 (5 μ g/mL) と可溶性aCD28 (2 μ g/mL) の組み合わせで7時間刺激した。サイトカイン分泌を防ぐために、アッセイ開始の1.5時間後に、1:400の希釈率でゴルジストップ (Golgi stop) (554724、BD) をウェルに添加した。形質導入効率またはサイトカインを産生する能力を評価する前に、標準の固定/透過処理キット (554714、BD) を製造元の指示に従って使用して、T細胞を固定および透過処理した。フローサイトメトリー用のBrdU染色キット (8817-6600-42、Thermo Fisher Scientific) を使用して、T細胞の増殖を定量化した。簡単に説明すると、ウェルあたり 1×10^5 の生きたT細胞を、平底96ウェルプレート内においてプレートコーティングaCD3 (5 μ g/mL) で48時間活性化し、アッセイ終了の7時間前にBrdUを10 μ Mの作業濃度でウェルに添加した。

【0323】

IFN γ 分泌の定量化

GFP、PDE4B2、eGFP & NY-ESO-1 TCR、またはPDE4B2 & NY-ESO-1 TCRを形質導入した休止状態のCD8 T細胞を、様々な濃度のPGE₂またはフォルスコリンの存在下で、NY-ESO-1 提示メラノーマ細胞A375と48時間共培養し、共培養上清中のIFN γ の存在を、製造業者の指示に従ってELISAキット (88-7316-88、Thermo Fisher Scientific) により評価した。共培養は平底96ウェルプレートで行い、 1×10^5 のA375細胞と、 1×10^5 のTCR⁺の生きたT細胞または対応する数のeGFP-/PDE4B2-形質導入T細胞をウェルごとに添加した。

【0324】

細胞傷害アッセイ

eGFP、PDE4B2、eGFP & NY-ESO-1 TCR、またはPDE4B2 & NY-ESO-1 TCRを形質導入した休止状態のCD4またはCD8 T細胞を、PGE₂の存在下または非存在下で、それぞれ47時間または44時間、A375細胞と共培養した。共培養は、Incucyte機器によってモニターされ、 1×10^4 のA375腫瘍細胞、ならびに 25×10^3 のTCR⁺の生きたT細胞または対応する数のeGFP-/PDE4B2-形質導入T細胞をウェルごとに添加した平底96ウェルプレートで行った。使用したA375腫瘍細胞は、ウェル内での直接検出を可能にするために、核蛍光タンパク質mCherryを発現するように操作された。

【0325】

結果および考察

初代ヒトT細胞における外因性PDE4B2の発現、または外因性PDE4B2とNY-ESO-1 TCRバリエーションβ-I53Fの共発現が、フローサイトメトリーによって確認された(図21)。NY-ESO-1 TCRは、TCRβ鎖のVβ13.1バリエーションを含むため、前者の存在は、完全に正確ではないが、Vβ13.1の検出によって推測できる。

【0326】

eGFPまたはPDE4B2を形質導入した休止状態のCD4T細胞の細胞内cAMPレベルを、FskまたはPGE₂に1時間曝露した時点で測定した。処理後、T細胞を溶解し、cAMPレベルをELISAで定量化した。結果は、PDE4B2の過剰発現が細胞内cAMPの蓄積を防ぐことを示す(図22)。

【0327】

eGFPまたはPDE4B2を形質導入した休止状態のCD4T細胞がIFNγまたはTNF-αを産生する能力を、PGE₂またはフォルスコリンの存在下でプレート結合aCD3および可溶性aCD28有りまたは無しで7時間刺激した時点で、細胞内サイトカイン染色(ICS)により決定した。PGE₂またはフォルスコリンの存在下でのNY-ESO-1提示メラノーマ細胞A375との48時間の共培養に応答した、eGFP、PDE4B2、eGFP&NY-ESO-1 TCR、またはPDE4B2&NY-ESO-1 TCRで形質導入した休止状態のCD8T細胞によるIFNγの分泌をELISAで評価した。両方の結果は、PDE4B2の過剰発現が、細胞内cAMP蓄積を誘導する条件下で、Th-1サイトカイン産生を促進することを示す(図23A、23B)。

【0328】

eGFPまたはPDE4B2で形質導入したCD4T細胞が増殖する能力を、BrDU取り込みアッセイによって決定した。T細胞を、PGE₂またはフォルスコリンの存在下で、プレート結合aCD3有りまたは無しで48時間再刺激した。結果は、PDE4B2の過剰発現が細胞内cAMP蓄積を誘導する条件下で増殖を促進することを示す(図24)。

【0329】

eGFP、PDE4B2、eGFP&NY-ESO-1 TCR、またはPDE4B2&NY-ESO-1 TCRで形質導入した休止状態のCD4またはCD8T細胞が、PGE₂の存在下または不在下で、NY-ESO-1提示メラノーマ細胞A375の拡大を抑制する能力をIncucyteによって評価した。図25に示すように、PDE4B2の過剰発現は、PGE₂の存在下でT細胞の細胞傷害性を促進する。

【参考文献】

【0330】

1. Dunn, S. M., Rizkallah, P. J., Baston, E., Mahon, T., Cameron, B., Moysey, R., Gao, F., Sami, M., Boulter, J., Li, Y., and Jakobsen, B. K. (2006) Directed evolution of human T cell receptor CDR2 residues by phage display dramatically enhances affinity for cognate peptide-MHC without increasing apparent cross-reactivity. *Protein Sci* 15, 710-721.
2. Robbins, P. F., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Nahvi, A. V., Helman, L. J., Mackall, C. L., Kamnula, U. S., Hughes, M. S., Restifo, N. P., Raffeld, M., Lee, C. C., Levy, C. L., Li, Y. F., El-Gamil, M., Schwarz, S. L., Laurencot, C., and Rosenberg, S. A. (2011) Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered リンパ球 reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 29, 917-924.
3. Rapoport, A. P., Stadtmauer, E. A., Binder-Scholl, G. K., Goloubeva, O., Vogl, D. T., Lacey, S. F., Badros, A. Z., Garfall, A., Weiss, B., Finklestein, J., Kulik

- ovskaya, I., Sinha, S. K., Kronsberg, S., Gupta, M., Bond, S., Melchiori, L., Brewer, J. E., Bennett, A. D., Gerry, A. B., Pumphrey, N. J., Williams, D., Tayton-Martin, H. K., Ribeiro, L., Holdich, T., Yanovich, S., Hardy, N., Yared, J., Kerr, N., Philip, S., Westphal, S., Siegel, D. L., Levine, B. L., Jakobsen, B. K., Kalos, M., and June, C. H. (2015) NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 21, 914-921.
4. Chen, J. L., Stewart-Jones, G., Bossi, G., Lissin, N. M., Wooldridge, L., Choi, E. M., Held, G., Dunbar, P. R., Esnouf, R. M., Sami, M., Boulter, J. M., Rizkallah, P., Renner, C., Sewell, A., van der Merwe, P. A., Jakobsen, B. K., Griffiths, G., Jones, E. Y., and Cerundolo, V. (2005) Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *J Exp Med* 201, 1243-1255.
5. Zoete, V., Irving, M. B., and Michielin, O. (2010) MM-GBSA binding free energy decomposition and T cell receptor engineering. *Journal of molecular recognition*. *JMR* 23, 142-152.
6. Zoete, V., and Michielin, O. (2007) Comparison between computational alanine scanning and per-residue binding free energy decomposition for protein-protein association using MM-GBSA: application to the TCR-p-MHC complex. *Proteins* 67, 1026-1047.
7. Zoete, V., Meuwly, M., and Karplus, M. (2005) Study of the insulin dimerization: binding free energy calculations and per-residue free energy decomposition. *Proteins* 61, 79-93.
8. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
9. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
10. Schmid, D. A., Irving, M. B., Posevitz, V., Hebeisen, M., Posevitz-Fejfar, A., Sarria, J. C., Gomez-Eerland, R., Thome, M., Schumacher, T. N., Romero, P., Speiser, D. E., Zoete, V., Michielin, O., and Rufer, N. (2010) Evidence for a TCR affinity threshold delimiting maximal CD8 T cell function. *Journal of immunology* 184, 4936-4946.
11. Chang, H. C., Bao, Z., Yao, Y., Tse, A. G., Goyarts, E. C., Madsen, M., Kawasaki, E., Brauer, P. P., Sacchettini, J. C., Nathenson, S. G., and et al. (1994) A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: a application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11408-11412.
12. Boulter, J. M., Glick, M., Todorov, P. T., Baston, E., Sami, M., Rizkallah, P., and Jakobsen, B. K. (2003) Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. *Protein Eng* 16, 707-711.
13. Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M. (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.
14. Irving, M., Zoete V., Hebeisen M., Schmid D., Baumgartner P., Guillaume P., Romero P., Speiser D., Luescher I., Rufer N., Michielin O., (2012) Interplay between T Cell Receptor Binding Kinetics and the Level of Cognate Peptide Presented by Major Histocompatibility Complexes Governs CD8⁺ T Cell Responsiveness. *JBC* 287, 23068-23078.
15. Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Sahin, U., Tuereci, O., Gure, A. O., Tsang, S., Williamson, B., Stockert, E., Pfreundschuh, M., and Old L. J. (1997) A testicular

10

20

30

40

50

ar antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1914-1918.

16. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 2011. 480: p. 480.

17. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology*, 2012. 12: p. 269.

18. Rosenberg, S.A., et al., Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(13): p. 4550-7.

19. Robbins, P.F., et al., Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered リンパ球 reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol*, 2011. 29(7): p. 917-24.

20. Kochenderfer, J.N., et al., B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 2012. 119: p. 2709-2720.

21. Gust, J., et al., Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discovery*, 2017. 7: p. 1404-1419.

22. Zou, W., Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer*, 2005. 5: p. 263.

23. Baruch, E.N., et al., Adoptive T cell therapy: An overview of obstacles and opportunities. *Cancer*, 2017. 123(S11): p. 2154-2162.

24. Zhang, H. and J. Chen, Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*, 2018. 9(10): p. 1773-1781.

25. Kunert, A. and R. Debets, Engineering T cells for adoptive therapy: outsmarting the tumor. *Current Opinion in Immunology*, 2018. 51: p. 133-139.

26. Yoon, D.H., et al., Incorporation of Immune Checkpoint Blockade into Chimeric Antigen Receptor T Cells (CAR-Ts): Combination or Built-In CAR-T. *International journal of molecular sciences*, 2018. 19(2): p. 340.

27. Noy, R. and J.W. Pollard, Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, 2014. 41(1): p. 49-61.

28. Fridlender, Z.G. and S.M. Albelda, Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*, 2012. 33(5): p. 949-55.

29. Mach, N., et al., Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res*, 2000. 60(12): p. 3239-46.

30. Ushach, I. and A. Zlotnik, Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology*, 2016. 100: p. 481-489.

31. Becher, B., S. Tugues, and M. Greter, GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*, 2016. 45: p. 963-973.

32. Hercus, T.R., et al., The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood*. 2009. 114: p. 1289-1298.

33. Shi, Y., et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res*. 2006. 16(2):126-33.

34. Arellano, M. and S. Lonial. Clinical uses of GM-CSF, a critical appraisal and update. in *Biologics: Targets & Therapy*. Biologics. 2008;2(1):13-27.

10

20

30

40

50

35. Gupta, R. and L.A. Emens, GM-CSF-secreting vaccines for solid tumors: moving forward. *Discovery medicine*, 2010. 10(50): p. 52-60.
36. Mookerjee, A., M. Graciotti, and L. Kandalaft, A cancer vaccine with dendritic cells differentiated with GM-CSF and IFN α and pulsed with a squaric acid treated cell lysate improves T cell priming and tumor growth control in a mouse model. *BioImpacts: BI*, 2018. 8(3): p. 211-221.
37. Shi, F.S., et al., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF. *Cancer Gene Ther*, 1999. 6(1): p. 81-8.
38. Nasi, M.L., et al., Intradermal injection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in patients with metastatic melanoma recruits dendritic cells. *Cytokines Cell Mol Ther*, 1999. 5(3): p. 139-44.
39. Lawson, D.H., et al., Randomized, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Yeast-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Versus Peptide Vaccination Versus GM-CSF Plus Peptide Vaccination Versus Placebo in Patients With No Evidence of Disease After Complete Surgical Resection of Locally Advanced and/or Stage IV Melanoma: A Trial of the Eastern Cooperative Oncology Group-American College of Radiology Imaging Network Cancer Research Group (E4697). *J Clin Oncol*, 2015. 33(34): p. 4066-76.
40. Antman, K.S., et al., Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *N Engl J Med*, 1988. 319(10): p. 593-8.
41. Pylayeva-Gupta, Y., et al., Cancer Cell Oncogenic Kras-Induced GM-CSF Production Promotes the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Cell*, 2012. 21: p. 836-847.
42. Bobisse, S. et al. Reprogramming T リンパ球 for melanoma adoptive immunotherapy by T-cell receptor gene transfer with lentiviral vectors. *Cancer Res*. 69, 9385-9394 (2009).
43. Reddy Chichili, V. P., Kumar, V. & Sivaraman, J. Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. *Protein Sci*. 22, 153-167 (2013).
44. Lamers, C. H. J. et al. Retroviral vectors for clinical immunogene therapy are stable for up to 9 years. *Cancer Gene Ther*. 15, 268-274 (2008).

【0331】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲を限定されるべきではない。実際、本明細書に記載されたものに加えて、本発明の様々な修正が、前述の説明から当業者に明らかになるであろう。このような変更は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

【0332】

本明細書で引用されるすべての特許、出願、刊行物、試験方法、文献、および他の資料は、本明細書に物理的に存在するかのように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

最後に、本発明の好ましい実施態様を項分け記載する。

〔実施態様 1〕

改変 T 細胞受容体 (TCR) またはその機能的断片をコードするポリヌクレオチドであって、前記改変 TCR は、非置換野生型 (WT) TCR の β 鎖の相補性決定領域 (CDR) 2 と比較して、改変 TCR の β 鎖の CDR 2 内に単一アミノ酸置換を含む、ポリヌクレオチド。

〔実施態様 2〕

前記改変 TCR の β 鎖配列が、該改変 TCR の β 鎖またはその機能的断片の CDR 2 領域の外側で、非置換 WT TCR の β 鎖またはその機能的断片と少なくとも 80% 同一で

あるアミノ酸配列を含む、実施態様 1 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 3〕

前記改変 T C R の β 鎖またはその機能的断片が、非置換 W T T C R の β 鎖またはその機能的断片のアミノ酸配列において C D R 2 領域に単一アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 4〕

非置換 W T T C R の β 鎖が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、実施態様 1 ～ 3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 5〕

前記単一アミノ酸置換が、W T T C R に対して残基 5 0、5 1、5 3、または 5 5 で生じる、実施態様 1 ～ 4 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 6〕

前記単一アミノ酸置換が、W T T C R に対して残基 5 3 または 5 5 で生じる、実施態様 1 ～ 5 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 7〕

前記単一アミノ酸置換が、I 5 3 E、I 5 3 F、I 5 3 W、または D 5 5 E である、実施態様 1 ～ 6 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 8〕

前記改変 T C R が、W T T C R よりも高い結合親和性でがん抗原に結合する、実施態様 1 ～ 7 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 9〕

前記がん抗原が N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ（配列番号 8）である、実施態様 8 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 0〕

前記改変 T C R のがん抗原への結合親和性が、W T T C R のがん抗原への結合親和性と比較して約 5 倍～約 7 5 倍高い、実施態様 8 または 9 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 1〕

前記改変 T C R のがん抗原への結合親和性が、W T T C R のがん抗原への結合親和性と比較して約 1 0 倍～約 7 5 倍高い、実施態様 1 0 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 2〕

前記改変 T C R のがん抗原への結合親和性が、W T T C R のがん抗原への結合親和性と比較して約 2 5 倍～約 7 5 倍高い、実施態様 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 3〕

前記改変 T C R のがん抗原への結合親和性が、W T T C R のがん抗原への結合親和性と比較して約 4 0 倍～約 7 5 倍高い、実施態様 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 4〕

前記改変 T C R のがん抗原への結合親和性が、W T T C R のがん抗原への結合親和性と比較して約 4 0 倍～約 6 0 倍高い、実施態様 1 3 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 5〕

前記改変 T C R のがん抗原への結合親和性が、W T T C R のがん抗原への結合親和性と比較して約 4 0 倍～約 5 0 倍高い、実施態様 1 4 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 6〕

前記改変 T C R のがん抗原への結合親和性が、W T T C R のがん抗原への結合親和性と比較して約 5 0 倍高い、実施態様 8 または 9 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 7〕

前記改変 T C R のがん抗原に対する解離定数 (K_D) が約 $0.30 \mu M$ ～約 $4.5 \mu M$ の間である、実施態様 8 または 9 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 1 8〕

前記改変 T C R のがん抗原に対する解離定数 (K_D) が約 $0.30 \mu M$ ～約 $2 \mu M$ の間である、実施態様 1 7 に記載のポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

〔実施態様 19〕

前記改変 TCR のがん抗原に対する解離定数 (K_D) が約 $2 \mu M$ ~ 約 $3 \mu M$ の間である、実施態様 17 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 20〕

前記改変 TCR のがん抗原に対する解離定数 (K_D) が約 $3 \mu M$ ~ 約 $4 \mu M$ の間である、実施態様 17 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 21〕

前記改変 TCR のがん抗原に対する解離定数 (K_D) が約 $0.41 \mu M$ である、実施態様 17 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 22〕

前記改変 TCR のがん抗原に対する解離定数 (K_D) が約 $3.89 \mu M$ である、実施態様 17 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 23〕

前記改変 TCR が、配列番号 2 ~ 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその機能的断片、あるいは配列番号 2 ~ 5 のいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 1 ~ 22 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 24〕

前記改変 TCR が、配列番号 11 ~ 14 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列、または配列番号 11 ~ 14 のいずれか 1 つに対して少なくとも 80 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコードされる、実施態様 1 ~ 23 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 25〕

改変 TCR の発現のための少なくとも 1 つの調節エレメントに作動可能に連結されている、実施態様 1 ~ 24 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 26〕

前記少なくとも 1 つの調節エレメントがプロモーターである、実施態様 25 に記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 27〕

DNA 分子である、実施態様 1 ~ 26 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 28〕

RNA 分子またはその誘導体である、実施態様 1 ~ 26 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

〔実施態様 29〕

実施態様 1 ~ 28 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクターであって、前記ポリヌクレオチドが、改変 T 細胞受容体 (TCR) の発現のための少なくとも 1 つの調節エレメントに作動可能に連結されている、組換えベクター。

〔実施態様 30〕

ウイルスベクターである、実施態様 29 に記載のベクター。

〔実施態様 31〕

前記ウイルスベクターが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、またはワクシニアウイルスベクターである、実施態様 30 に記載のベクター。

〔実施態様 32〕

非ウイルスベクターである、実施態様 29 に記載のベクター。

〔実施態様 33〕

実施態様 1 ~ 28 のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる改変 TCR の β 鎖またはその機能的断片を含む、改変 T 細胞受容体 (TCR)。

〔実施態様 34〕

a) 実施態様 1 ~ 29 のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる改変

10

20

30

40

50

T C Rのβ鎖またはその機能的断片、および

b) α鎖またはその機能的断片
を含む、改変T細胞受容体(T C R)。

〔実施態様35〕

実施態様1～28のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされる改変T C Rのβ鎖のC D Rを含む、改変T細胞受容体(T C R)。

〔実施態様36〕

a) 改変T C Rのβ鎖の機能的断片であって、実施態様1～28のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされるβ鎖のC D Rを含む機能的断片、および

b) α鎖の機能的断片であって、α鎖のC D Rを含む機能的断片
を含む、改変T細胞受容体(T C R)。

〔実施態様37〕

a) の機能的断片がT C R β鎖の定常領域をさらに含む、および／またはb) の機能的断片がT C R α鎖の定常領域をさらに含む、実施態様36に記載の改変T C R。

〔実施態様38〕

前記定常領域のいずれかがヒト起源である、実施態様37に記載の改変T C R。

〔実施態様39〕

前記定常領域のいずれかがマウス起源である、実施態様37に記載の改変T C R。

〔実施態様40〕

前記α鎖が、W T T C Rのα鎖またはその機能的断片を含む、実施態様34～39のいずれかに記載の改変T C R。

〔実施態様41〕

W T T C Rのα鎖が、配列番号7のアミノ酸配列を含む、実施態様40に記載の改変T C R。

〔実施態様42〕

配列番号2～5のいずれか1つのアミノ酸配列またはその断片、あるいは配列番号2～5のいずれか1つに対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様33～41のいずれかに記載の改変T C R。

〔実施態様43〕

配列番号7のアミノ酸配列を含むα鎖、および配列番号2～5のいずれか1つのアミノ酸配列を含むβ鎖を含む、改変T細胞受容体(T C R)。

〔実施態様44〕

実施態様33～43のいずれかに記載の改変T細胞受容体(T C R)を含む単離宿主細胞。

〔実施態様45〕

実施態様1～28のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む単離宿主細胞。

〔実施態様46〕

前記ポリヌクレオチドが、宿主細胞における改変T細胞受容体(T C R)の発現を媒介することができる少なくとも1つの調節エレメントに作動可能に連結されている、実施態様45に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様47〕

実施態様29～32のいずれかに記載のベクターを含む単離宿主細胞。

〔実施態様48〕

哺乳動物細胞である、実施態様44～47のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様49〕

リンパ球系細胞である、実施態様44～48のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様50〕

前記リンパ球系細胞がT細胞である、実施態様49に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様51〕

前記リンパ球系細胞がナチュラルキラー(N K)細胞である、実施態様49に記載の単

10

20

30

40

50

離宿主細胞。

〔実施態様 5 2〕

末梢血単核細胞（P B M C）、腫瘍流入領域リンパ節、または腫瘍浸潤物から得られたものである、実施態様 4 8～5 1 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 5 3〕

e x v i v o で活性化および／または拡大されている、実施態様 4 4～5 2 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 5 4〕

同種異系細胞である、実施態様 4 4～5 3 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 5 5〕

自己細胞である、実施態様 4 4～5 3 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 5 6〕

疾患を有する対象から単離されたものである、実施態様 5 5 に記載の単離自己宿主細胞。

〔実施態様 5 7〕

前記疾患ががんである、実施態様 5 6 に記載の単離自己宿主細胞。

〔実施態様 5 8〕

前記がんが、その細胞の表面にがん抗原 N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ（配列番号 8）を提示する、実施態様 5 7 に記載の単離自己宿主細胞。

〔実施態様 5 9〕

前記がんが、骨髄腫、メラノーマ、肉腫、膀胱がん（bladder cancer）、食道がん、肝細胞がん、頭頸部がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん（urinary bladder cancer）、皮膚がん、肺がん、卵巣がん、または脳腫瘍である、実施態様 5 7 または 5 8 に記載の単離自己宿主細胞。

〔実施態様 6 0〕

1 つまたは複数の外因性分子を発現するようにさらに操作された、実施態様 4 4～5 9 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 6 1〕

前記 1 つまたは複数の外因性分子が免疫シグナル伝達分子である、実施態様 6 0 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 6 2〕

前記免疫シグナル伝達分子がサイトカインである、実施態様 6 1 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 6 3〕

前記免疫シグナル伝達分子がケモカインである、実施態様 6 1 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 6 4〕

前記免疫シグナル伝達分子が成長因子である、実施態様 6 1 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 6 5〕

前記成長因子が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）である、実施態様 6 4 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 6 6〕

がん抗原に結合する T 細胞受容体（T C R）またはその機能的断片を含む単離宿主細胞であって、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）を発現するようにさらに操作されている、単離宿主細胞。

〔実施態様 6 7〕

前記がん抗原が N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ（配列番号 8）である、実施態様 6 6 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 6 8〕

T 細胞受容体（T C R）が W T T C R である、実施態様 6 6 または 6 7 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 6 9〕

W T T C R の β 鎖が、配列番号 1 のアミノ酸配列、または配列番号 1 に対して少なくとも

10

20

30

40

50

も 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 66 ～ 68 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 70〕

WT TCR の α 鎖が、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、実施態様 66 ～ 69 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 71〕

GM-CSF のアミノ酸配列が、配列番号 21、34 または 15、あるいは配列番号 21、34 または 15 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 65 ～ 70 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 72〕

GM-CSF をコードするヌクレオチド配列が、配列番号 22、35 または 16、あるいは配列番号 22、35 または 16 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施態様 65 ～ 71 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 73〕

前記 1 つまたは複数の外因性分子が可溶性受容体である、実施態様 60 または 61 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 74〕

前記 1 つまたは複数の外因性分子がリガンドである、実施態様 60 または 61 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 75〕

前記 1 つまたは複数の外因性分子が抗原結合タンパク質である、実施態様 60 または 61 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 76〕

前記抗原結合タンパク質が抗体または抗体フラグメントである、実施態様 75 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 77〕

前記 1 つまたは複数の外因性分子がホスホジエステラーゼである、実施態様 60 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 78〕

前記ホスホジエステラーゼが PDE4B2 である、実施態様 77 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 79〕

がん抗原に結合する T 細胞受容体 (TCR) またはその機能的断片を含む単離宿主細胞であって、PDE4B2 を発現するようにさらに操作されている、単離宿主細胞。

〔実施態様 80〕

前記がん抗原が NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ エピトープ (配列番号 8) である、実施態様 79 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 81〕

T 細胞受容体 (TCR) が WT TCR である、実施態様 79 または 80 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 82〕

WT TCR の β 鎖が、配列番号 1 のアミノ酸配列、または配列番号 1 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 79 ～ 81 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 83〕

WT TCR の α 鎖が、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む、実施態様 79 ～ 82 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 84〕

PDE4B2 のアミノ酸配列が、配列番号 27 または 29、あるいは配列番号 27 または 29 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 78 ～ 83 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

10

20

30

40

50

〔実施態様 8 5〕

P D E 4 B 2 をコードするヌクレオチド配列が、配列番号 2 8 または 3 0、あるいは配列番号 2 8 または 3 0 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施態様 7 8 ～ 8 4 のいずれかに記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 8 6〕

前記 1 つまたは複数の外因性分子が細胞表面受容体である、実施態様 6 0 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 8 7〕

前記細胞表面受容体がキメラ抗原受容体である、実施態様 8 6 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 8 8〕

前記細胞表面受容体が、がん抗原 N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ（配列番号 8）に結合しない T 細胞受容体である、実施態様 8 6 に記載の単離宿主細胞。

〔実施態様 8 9〕

実施態様 3 3 ～ 4 3 に記載の改変 T 細胞受容体（T C R）またはその機能的断片、ならびに T 細胞上の細胞表面タンパク質に特異的に結合する免疫エフェクターポリペプチドを含む、二機能性分子。

〔実施態様 9 0〕

前記免疫エフェクターポリペプチドが抗体または抗体フラグメントを含む、実施態様 8 9 に記載の二機能性分子。

〔実施態様 9 1〕

前記免疫エフェクターポリペプチドが単鎖可変領域フラグメント（s c F v）を含む、実施態様 8 9 または 9 0 に記載の二機能性分子。

〔実施態様 9 2〕

前記免疫エフェクターポリペプチドが C D 3 に特異的に結合する、実施態様 8 9 ～ 9 1 のいずれかに記載の二機能性分子。

〔実施態様 9 3〕

前記免疫エフェクターポリペプチドが、O K T 3、U C H T - 1、B M A 0 3 1、または 1 2 F 6 に由来する抗体または抗体フラグメントを含む、実施態様 9 2 に記載の二機能性分子。

〔実施態様 9 4〕

実施態様 4 4 ～ 8 8 のいずれかに記載の宿主細胞、または実施態様 8 9 ～ 9 3 のいずれかに記載の二機能性分子、ならびに薬学的に許容される担体および／または賦形剤を含む、医薬組成物。

〔実施態様 9 5〕

養子細胞移入療法で使用される、実施態様 9 4 に記載の医薬組成物。

〔実施態様 9 6〕

実施態様 1 ～ 2 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは実施態様 2 9 ～ 3 2 のいずれかに記載のベクターを用いて宿主細胞を遺伝子操作することを含む、実施態様 4 4 ～ 8 8 のいずれかに記載の宿主細胞を作製する方法。

〔実施態様 9 7〕

実施態様 3 3 ～ 4 3 のいずれかに記載の改変 T 細胞受容体（T C R）またはその機能的断片を発現するように宿主細胞を遺伝子操作する方法。

〔実施態様 9 8〕

実施態様 1 ～ 2 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは実施態様 2 9 ～ 3 2 のいずれかに記載のベクターを用いて宿主細胞を遺伝子操作することを含む、実施態様 9 7 に記載の方法。

〔実施態様 9 9〕

遺伝子操作ステップがウイルス遺伝子送達を介して行われる、実施態様 9 6 ～ 9 8 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 0 0〕

遺伝子操作ステップが非ウイルス遺伝子送達を介して行われる、実施態様 9 9 に記載の方法。

〔実施態様 1 0 1〕

ex vivoで行われる、実施態様 9 6～1 0 0 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 0 2〕

ex vivoで宿主細胞を活性化および／または拡大することをさらに含む、実施態様 9 6～1 0 1 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 0 3〕

前記改変 T C R が、配列番号 2～5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその断片、あるいは配列番号 2～5 のいずれか 1 つに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 9 6～1 0 2 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 0 4〕

1 つまたは複数の外因性分子をさらに発現するように前記宿主細胞を遺伝子操作することをさらに含む、実施態様 9 6～1 0 3 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 0 5〕

前記 1 つまたは複数の外因性分子が免疫シグナル伝達分子である、実施態様 1 0 4 に記載の方法。

〔実施態様 1 0 6〕

前記外因性分子が、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、可溶性受容体、リガンド、ホスホジエステラーゼ、抗原結合タンパク質、または細胞表面受容体である、実施態様 1 0 4 または 1 0 5 に記載の方法。

〔実施態様 1 0 7〕

前記成長因子が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) である、実施態様 1 0 6 に記載の方法。

〔実施態様 1 0 8〕

G M - C S F のアミノ酸配列が、配列番号 2 1、3 4 または 1 5、あるいは配列番号 2 1、3 4 または 1 5 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 1 0 7 に記載の方法。

〔実施態様 1 0 9〕

G M - C S F をコードするヌクレオチド配列が、配列番号 2 2、3 5 または 1 6、あるいは配列番号 2 2、3 5 または 1 6 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施態様 1 0 7 または 1 0 8 に記載の方法。

〔実施態様 1 1 0〕

ホスホジエステラーゼが P D E 4 B 2 である、実施態様 1 0 6 に記載の方法。

〔実施態様 1 1 1〕

P D E 4 B 2 のアミノ酸配列が、配列番号 2 7 または 2 9、あるいは配列番号 2 7 または 2 9 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、実施態様 1 1 0 に記載の方法。

〔実施態様 1 1 2〕

P D E 4 B 2 をコードするヌクレオチド配列が、配列番号 2 8 または 3 0、あるいは配列番号 2 8 または 3 0 に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、実施態様 1 1 0 または 1 1 1 に記載の方法。

〔実施態様 1 1 3〕

前記抗原結合タンパク質が抗体または抗体フラグメントである、実施態様 1 0 6 に記載の方法。

〔実施態様 1 1 4〕

前記細胞表面受容体が、キメラ抗原受容体、またはがん抗原 N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ (配列番号 8) に結合しない T 細胞受容体である、実施態様 1 0 6 に記載の方法。

〔実施態様 1 1 5〕

前記宿主細胞が哺乳動物細胞である、実施態様 9 6 ～ 1 1 4 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 1 6〕

前記宿主細胞がリンパ球系細胞である、実施態様 9 6 ～ 1 1 5 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 1 7〕

前記リンパ球系細胞が T 細胞である、実施態様 1 1 6 に記載の方法。

〔実施態様 1 1 8〕

前記リンパ球系細胞がナチュラルキラー（NK）細胞である、実施態様 1 1 6 に記載の方法。

〔実施態様 1 1 9〕

前記宿主細胞が、末梢血単核細胞（P B M C）、腫瘍流入領域リンパ節、または腫瘍浸潤物から得られる、実施態様 1 1 5 ～ 1 1 8 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 2 0〕

前記宿主細胞が e x v i v o で活性化および／または拡大されている、実施態様 9 6 ～ 1 1 9 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 2 1〕

前記宿主細胞が同種異系細胞である、実施態様 9 6 ～ 1 2 0 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 2 2〕

前記宿主細胞が自己細胞である、実施態様 9 6 ～ 1 2 0 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 2 3〕

前記宿主細胞が、疾患を有する対象から単離される、実施態様 9 6 ～ 1 2 2 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 2 4〕

前記疾患ががんである、実施態様 1 2 3 記載の方法。

〔実施態様 1 2 5〕

前記がんの細胞が、その表面にがん抗原 N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ（配列番号 8）を提示する、実施態様 1 2 4 に記載の方法。

〔実施態様 1 2 6〕

前記がんが、骨髄腫、メラノーマ、肉腫、膀胱がん（bladder cancer）、食道がん、肝細胞がん、頭頸部がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん（urinary bladder cancer）、皮膚がん、肺がん、卵巣がん、または脳腫瘍である、実施態様 1 2 4 または 1 2 5 に記載の方法。

〔実施態様 1 2 7〕

必要とする哺乳動物において免疫応答を刺激または増強する方法であって、有効量の、実施態様 3 3 ～ 4 3 のいずれかに記載の改変 T 細胞受容体（T C R）を含むリンパ球系細胞、実施態様 4 4 ～ 8 8 のいずれかに記載の宿主細胞、実施態様 8 9 ～ 9 3 のいずれかに記載の二機能性分子、実施態様 9 4 または 9 5 に記載の組成物、あるいは実施態様 9 6 ～ 1 2 6 のいずれかに記載の方法によって作製された宿主細胞を哺乳動物に投与することを含む、方法。

〔実施態様 1 2 8〕

必要とする対象におけるがんの治療方法であって、有効量の、実施態様 3 3 ～ 4 3 のいずれかに記載の改変 T 細胞受容体（T C R）を含むリンパ球系細胞、実施態様 4 4 ～ 8 8 のいずれかに記載の宿主細胞、実施態様 8 9 ～ 9 3 のいずれかに記載の二機能性分子、実施態様 9 4 または 9 5 に記載の組成物、あるいは実施態様 9 6 ～ 1 2 6 のいずれかに記載の方法によって作製された宿主細胞を対象に投与することを含む、方法。

〔実施態様 1 2 9〕

前記がんの細胞が、その表面にがん抗原 N Y - E S O - 1 1 5 7 - 1 6 5 エピトープ（配列番号 8）を提示する、実施態様 1 2 8 に記載の方法。

〔実施態様 1 3 0〕

前記がんが、骨髄腫、メラノーマ、肉腫、膀胱がん（bladder cancer）、食道がん、肝細胞がん、頭頸部がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん（urinary bladder cancer）、

10

20

30

40

50

皮膚がん、肺がん、卵巣がん、または脳腫瘍である、実施態様 1 2 8 または 1 2 9 に記載の方法。

〔実施態様 1 3 1〕

a) 対象または哺乳動物の T 細胞を分離すること；

b) 実施態様 1 ～ 2 8 のいずれかに記載のポリヌクレオチドまたは実施態様 2 9 ～ 3 2 のいずれかに記載のベクターを用いて *ex vivo* で前記 T 細胞を遺伝子改変すること；

c) 任意選択で、ステップ b) の前、後、または最中に、前記 T 細胞を拡大および／または活性化すること；

d) 遺伝子改変された T 細胞を前記対象または哺乳動物に導入すること；
を含む、実施態様 1 2 8 ～ 1 3 0 のいずれかに記載の方法。

〔実施態様 1 3 2〕

前記対象または哺乳動物がヒトである、実施態様 1 2 8 ～ 1 3 1 のいずれかに記載の方法。

【図面】

【図 1 A】

BC1 WT α 鎖:

METLLGLLLILWLQLQWVSSKQEVTPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDP
GKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPQTGGSYI
PTFGRGTSILVHPYIQNPDPAAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDK
TVLDMRSMDFKSNSSAVAWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETD
TNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS* (配列番号 7)

BC1 WT β 鎖 (残基53を太字で強調表示):

MAPRLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQ
DPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYV
GAAGELFFGEGSRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVEL
SWVWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPРНHFRСQVQFY
GLSENDEWTQDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
VLVSALVLMAMVKRKDSRG* (配列番号 1)

【図 1 B】

153E α 鎖:

METLLGLLLILWLQLQWVSSKQEVTPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDP
GKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPQTGGSYI
PTFGRGTSILVHPYIQNPDPAAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDK
TVLDMRSMDFKSNSSAVAWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETD
TNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS* (配列番号 7)

153E β 鎖 (残基53を太字で強調表示):

MAPRLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQ
DPGMGLRLIHYSVGAGETDQGEVPNGYNVSRSTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYV
GAAGELFFGEGSRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVEL
SWVWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPРНHFRСQVQFY
GLSENDEWTQDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
VLVSALVLMAMVKRKDSRG* (配列番号 2)

【図 1 C】

153F α 鎖:

METLLGLLLILWLQLQWVSSKQEVTPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDP
GKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPQTGGSYI
PTFGRGTSILVHPYIQNPDPAAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDK
TVLDMRSMDFKSNSSAVAWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETD
TNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS* (配列番号 7)

153F β 鎖 (残基53を太字で強調表示):

MAPRLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQ
DPGMGLRLIHYSVGAGFTDQGEVPNGYNVSRSTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYV
GAAGELFFGEGSRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVEL
SWVWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPРНHFRСQVQFY
GLSENDEWTQDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
VLVSALVLMAMVKRKDSRG* (配列番号 3)

【図 1 D】

153W α 鎖:

METLLGLLLILWLQLQWVSSKQEVTPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQDP
GKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPQTGGSYI
PTFGRGTSILVHPYIQNPDPAAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDK
TVLDMRSMDFKSNSSAVAWSNKSDFAACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETD
TNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS* (配列番号 7)

153W β 鎖 (残基53を太字で強調表示):

MAPRLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQ
DPGMGLRLIHYSVGAGWTDQGEVPNGYNVSRSTTDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYV
VGAAGELFFGEGSRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVE
LSWVWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPРНHFRСQVQFY
YGLSENDEWTQDRAKPVTOIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
AVLVSALVLMAMVKRKDSRG* (配列番号 4)

10

20

30

40

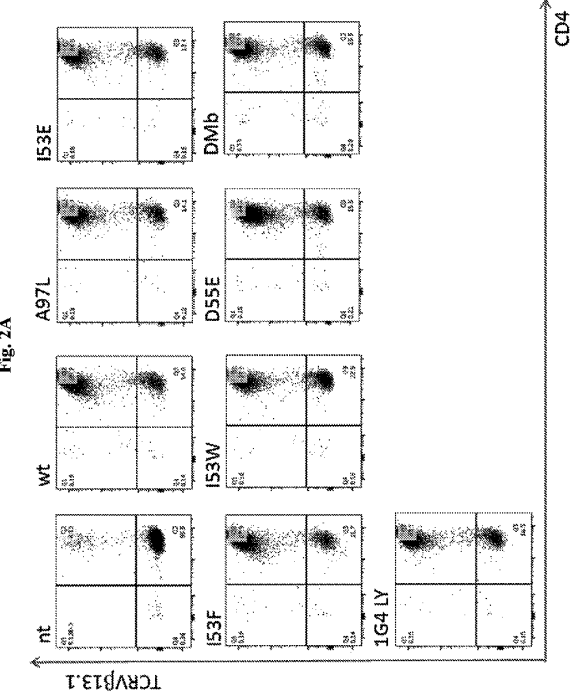
50

【図 1 E】

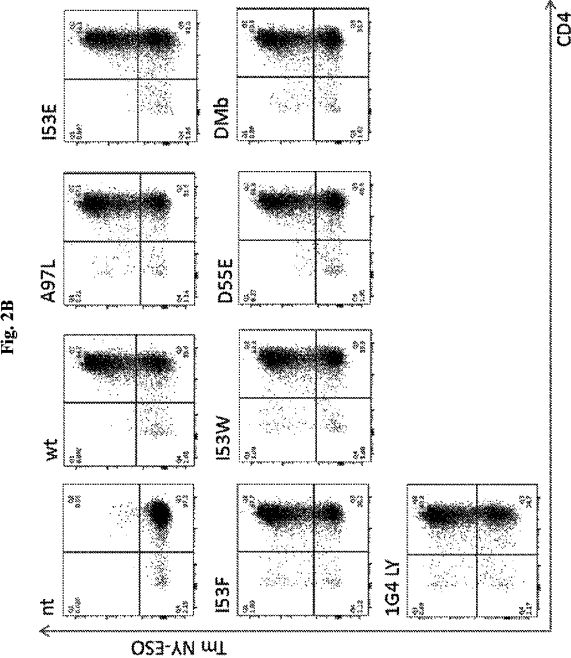
D55E α鎖:
METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTOIPAALSVPEGENVLNCSTDSAIYNLQWFRDPP
GKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAYRPQTGGSYI
PTFGRGTLIVHPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSYITDK
TVLDMRSMDFKSNASAVWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFPPSPSSCDVKLVEKSFETD
TNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS* (配列番号 7)

D55E β鎖(残基55を太字で強調表示):
MAPRLLCCAALLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQ
DPGMGLRLIHYSVGAGIT**E**QGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYV
GAAGLFFGEGSRLTVLEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVEL
SWWVNGKEVHSGVSTDPOPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPРНHFCQVQFY
GLSENDEWTDRAKPVTOIVSAEAWGRADCFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
VLVSALVLMAMVKKRDSRG* (配列番号 5)

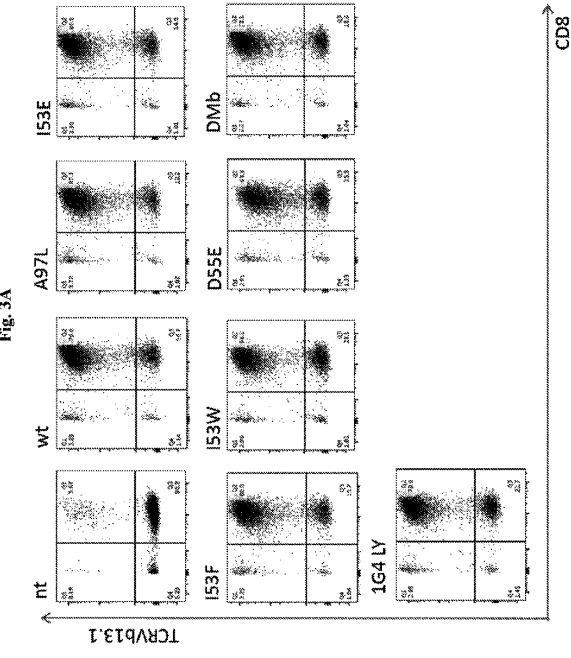
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 3 A】



10

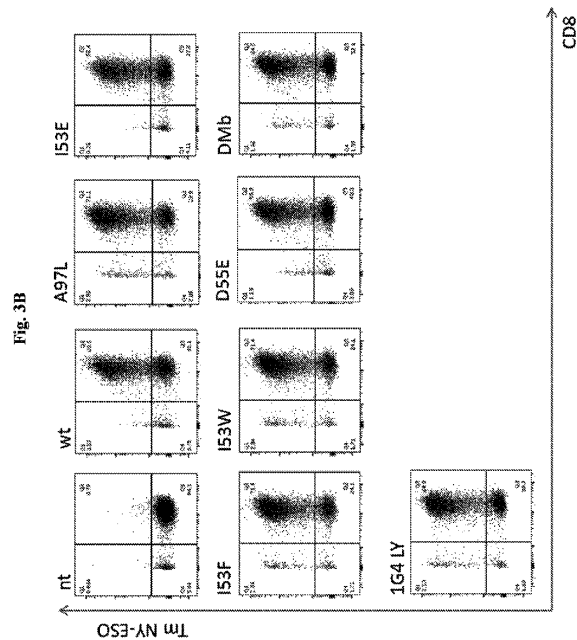
20

30

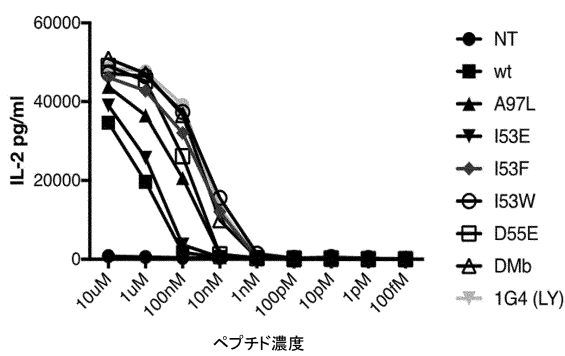
40

50

【図 3 B】

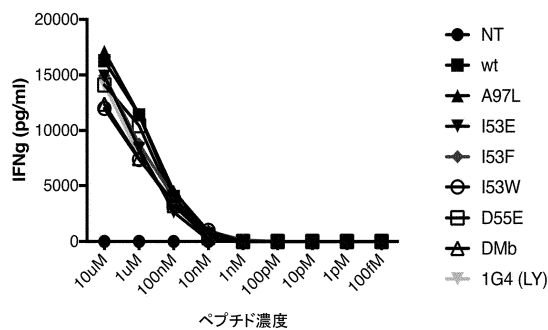


【図 4 A】

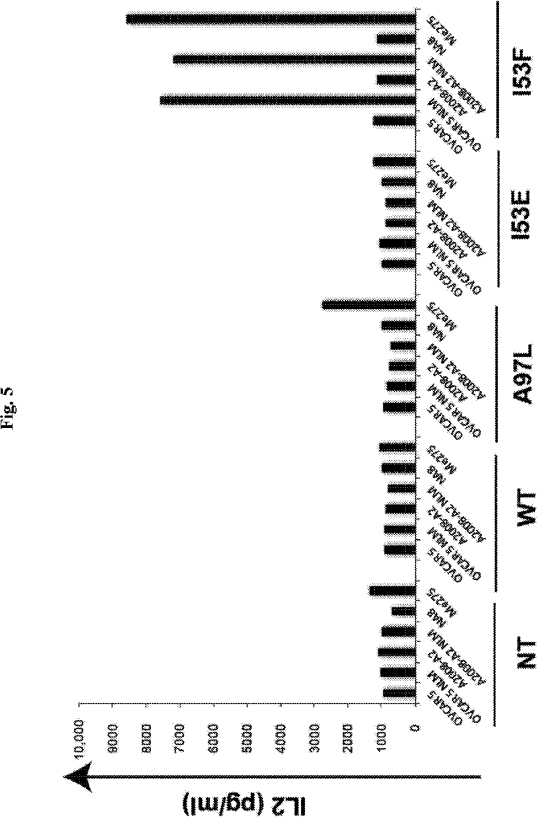


10

【図 4 B】



【図 5】



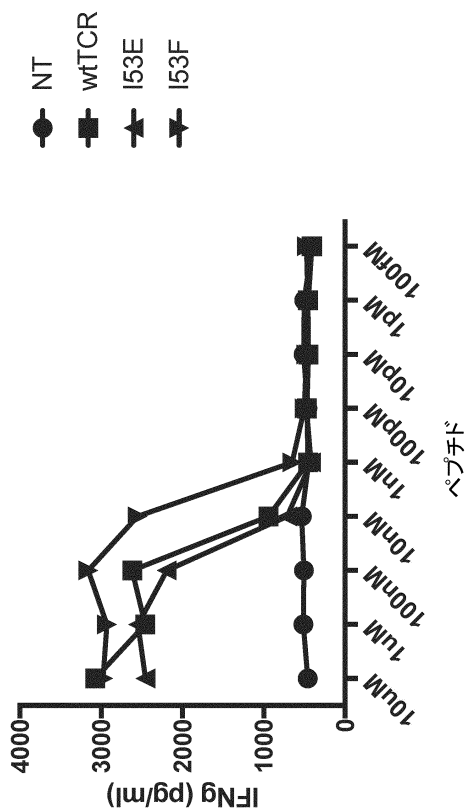
20

30

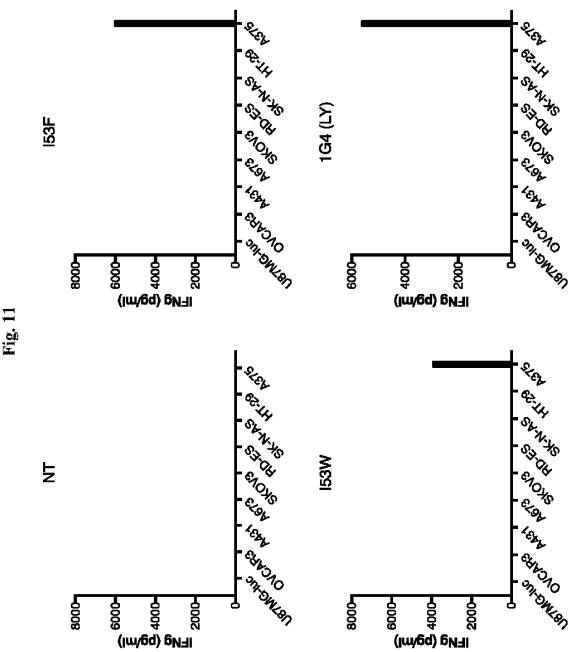
40

50

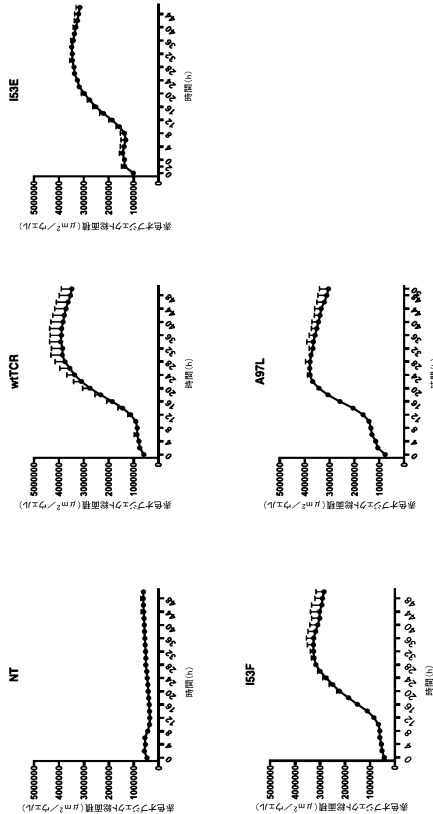
【図 1 0】



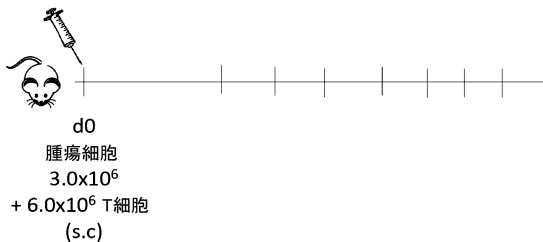
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3 A】



10

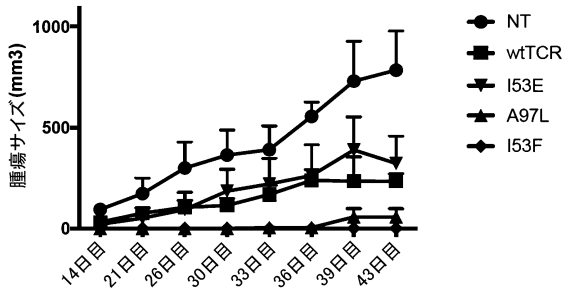
20

30

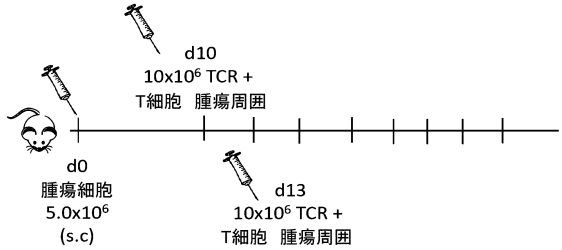
40

50

【図 1 3 B】

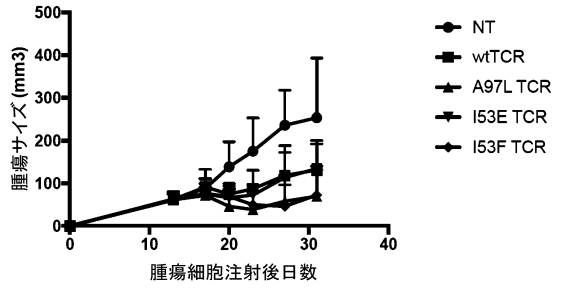


【図 1 4 A】

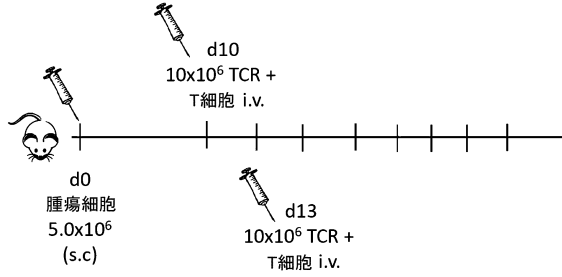


10

【図 1 4 B】



【図 1 5 A】



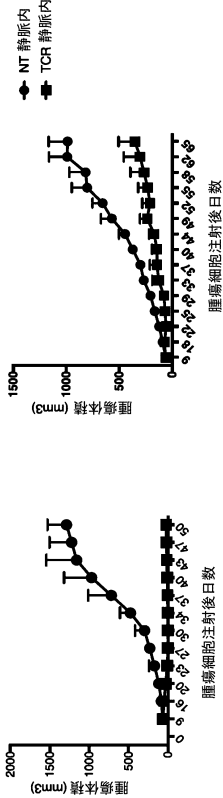
20

30

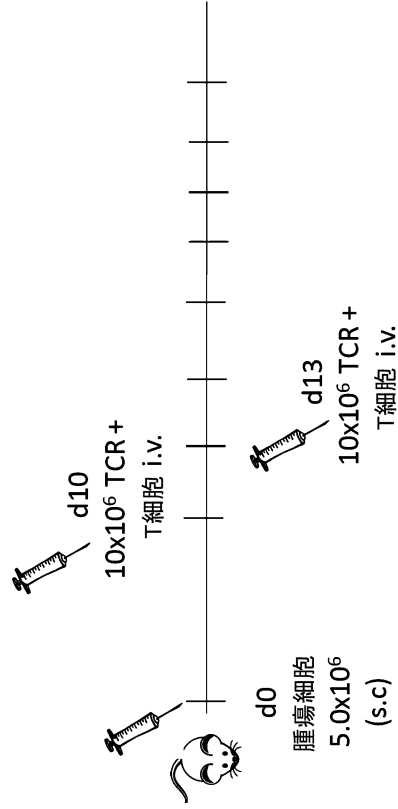
40

50

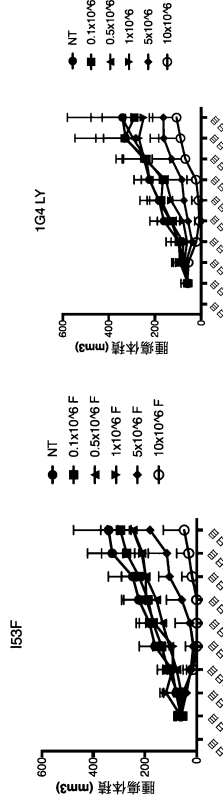
【図 1 5 B】



【図 1 6 A】

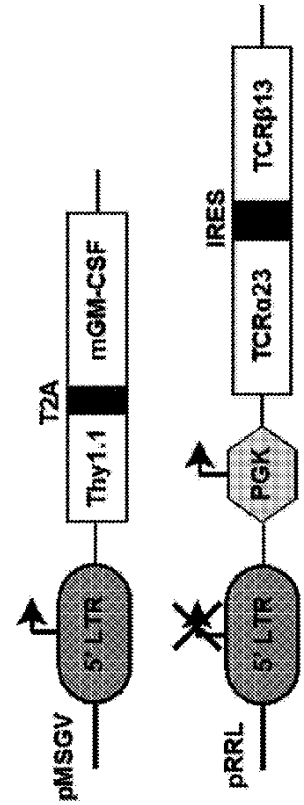


【図 1 6 B】



【図 1 7 A】

Fig. 17A



10

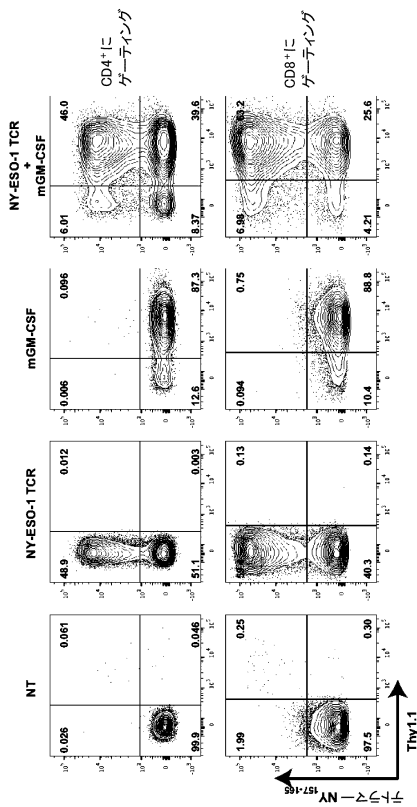
20

30

40

50

【図 17 B】



【図 17 C】

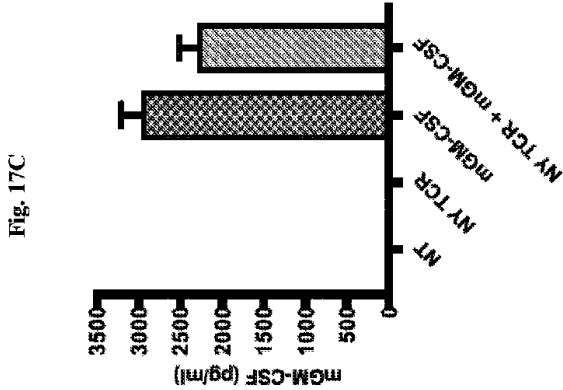


Fig. 17C

【図 18 A】

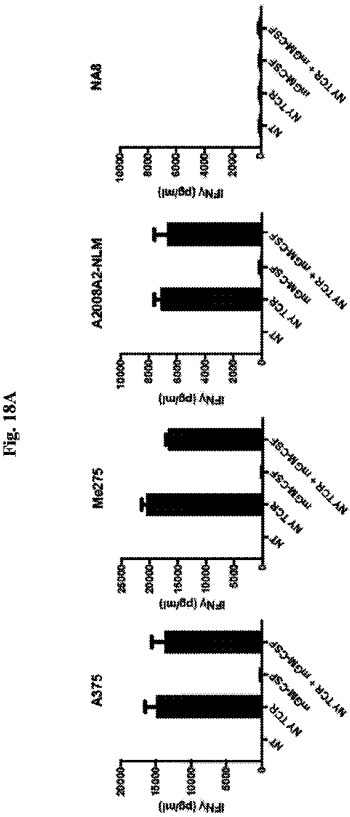
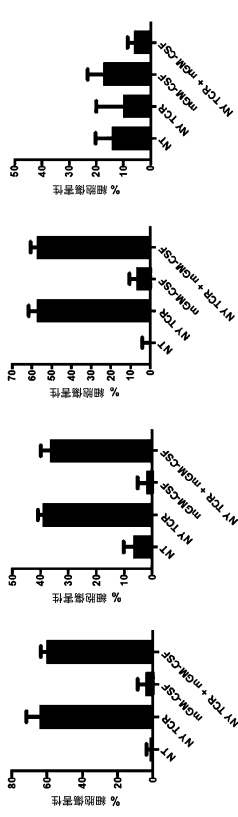


Fig. 18A

【図 18 B】



10

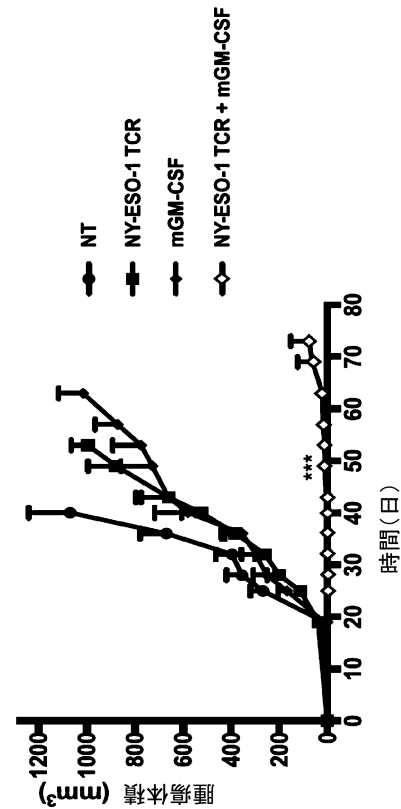
20

30

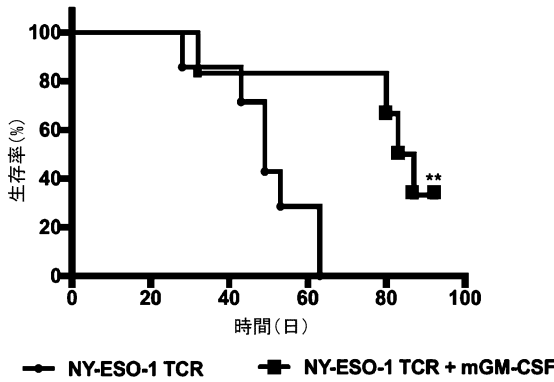
40

50

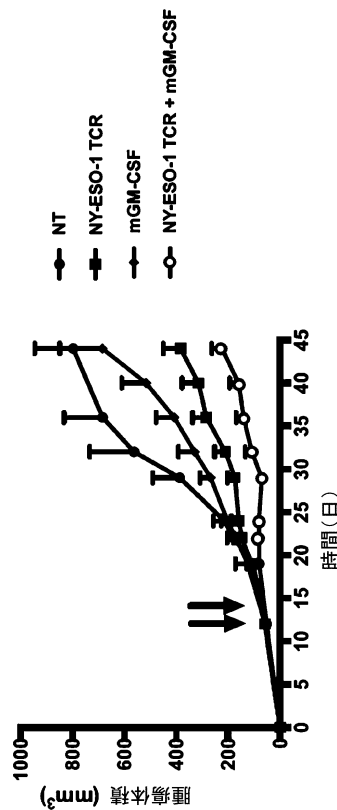
【図 19 A】



【図 19 B】



【図 19 C】



【図 20 A】

マウス GM-CSF:
(UniProtKB-P01587)
全長タンパク質=141 (141aa, 16.1kDa)
シグナルペプチド=17 (17aa)
活性可溶性 GM-CSF = 18-141 (124aa, 14.2kDa)

タンパク質配列:
DVEIQLLEGGVYSLSAPTRSPHTVTRPWKHVEAKENLLDDMPVTLNIEVEVSNFSEFKLTCTQTRLKFEQGLRGNTFKLGALNNMTASYQTYCPPTPET
DCEIQVITYADHDSLKITLIDPECKRPGQK (配列番号 15)

DNA配列:
ATGTGGCTGCAGATTACTTTCTGGGCGATGTGGCTACAGCCCTCTAGACCCCGCTCACCCGCTCCTGAGGAGCATGTAGAGGC
CATCAAGAGAGCCCTGACCTCTCTGGATGACATGCCCTGTGTACATTAATGAAGAGAGGTAGAGTCTCTAACGAGTCTCTCTCAAGAGAGCTAACATGTGT
GCAGACCCCGCTGAGATATTGAGACAGGGTCTACGGGGCAATTTACCAAACTCAAGGGGCGCTTGAACATGACAGCCAGCTACTACACAGATACTGCC
CCCCAAGCTCGGAAACGAGCTGTGAAACACAAAGTTACACCTATGCGGATTTCTAGAGAGCCCTTAAACCTTTCTGACTGATATCCCTTTTGAATGCAAAA
ACCAGGCCAAAAA (配列番号 16)

10

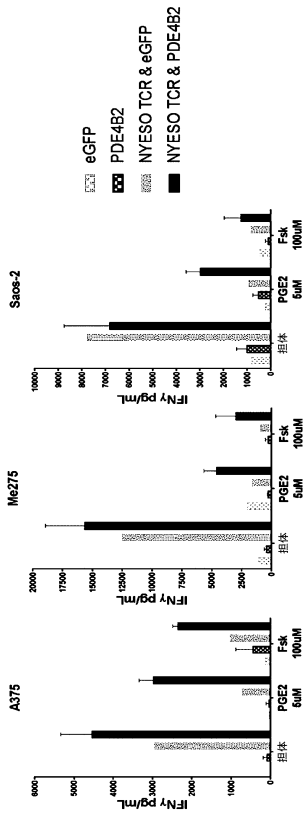
20

30

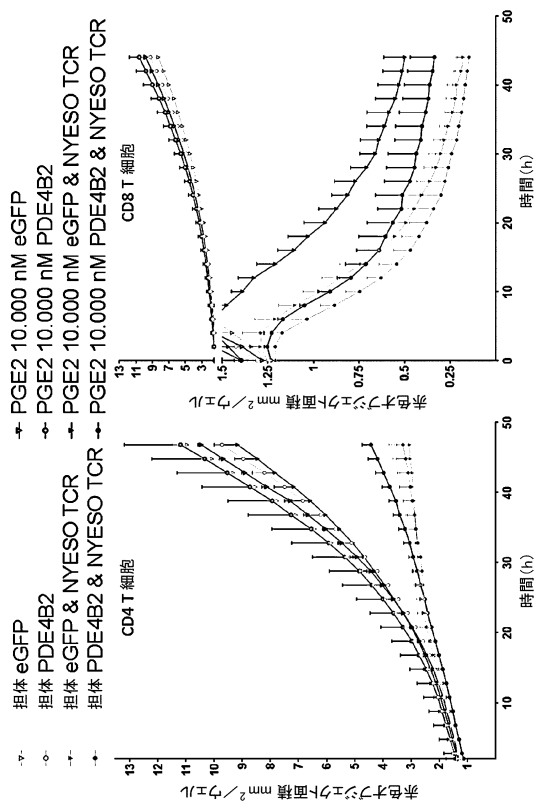
40

50

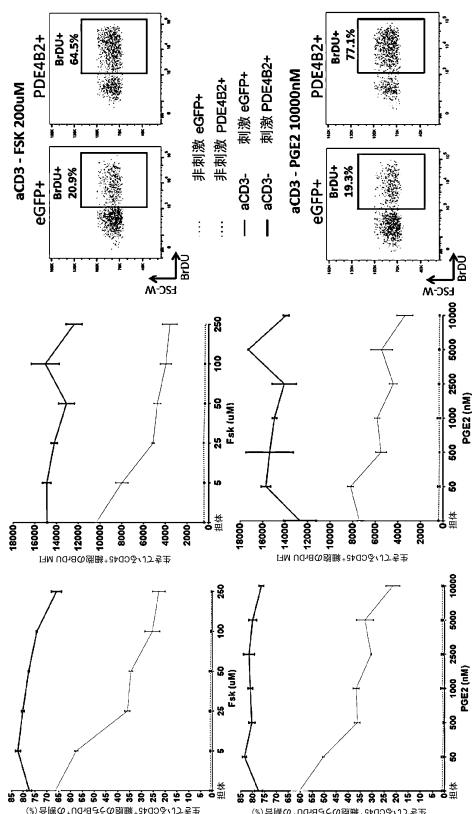
【図 2 3 B】



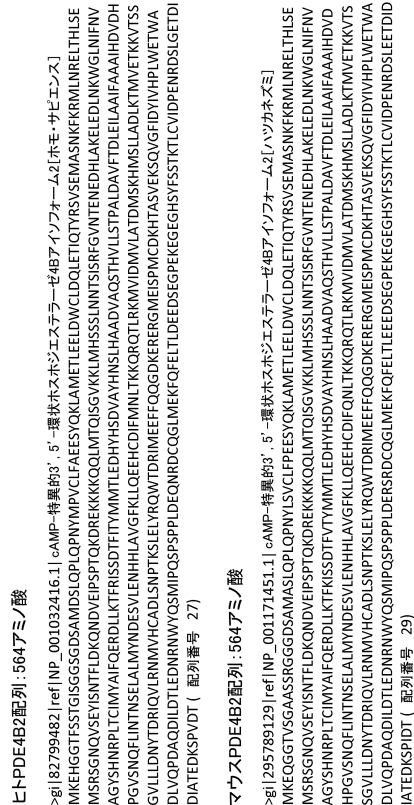
【図 2 5】



【図 2 4】



【図 2 6】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007680032000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 35/17 (2025.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)

F I

A 6 1 K 35/17
A 6 1 P 35/00

イック インスティテュート フォア キャンサー リサーチ リミテッド

(72)発明者 アーヴィング, メリタ

スイス国 1 0 6 6 ヴォー エパランジュ シュマン デ ボヴェルッス 1 5 5 ビオポール トロワ

(72)発明者 ゾーテ, ヴィンセント

スイス国 1 0 6 6 ヴォー エパランジュ シュマン デ ボヴェルッス 1 5 5

(72)発明者 ミシュラン, オリヴィエ

スイス国 1 0 1 1 ローザンヌ リュ デュ ビュニヨン 4 6

審査官 坂井田 京

(56)参考文献

特表 2 0 0 7 - 5 3 7 7 4 3 (J P, A)

特表 2 0 0 8 - 5 0 9 0 9 0 (J P, A)

国際公開第 2 0 0 8 / 0 3 7 9 4 3 (W O, A 1)

ZOETE, V et al., Structure-based, rational design of T cell Receptors , Front Immunol., vol .4, 2013年09月12日, 268

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q