

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-526416

(P2023-526416A)

(43)公表日 令和5年6月21日(2023.6.21)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	Z N A 4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全76頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-570441(P2022-570441)	(71)出願人	500039463
(86)(22)出願日	令和3年5月21日(2021.5.21)		ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ
(85)翻訳文提出日	令和5年1月13日(2023.1.13)		ーシティ オブ テキサス システム
(86)国際出願番号	PCT/US2021/033619		BOARD OF REGENTS, TH
(87)国際公開番号	WO2021/237068		E UNIVERSITY OF TEX
(87)国際公開日	令和3年11月25日(2021.11.25)		AS SYSTEM
(31)優先権主張番号	63/028,262		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州
(32)優先日	令和2年5月21日(2020.5.21)		, オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ート 2 1 0
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志
		(74)代理人	100102118 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 V G L L 1 特異性を有する T 細胞受容体およびその使用法

(57)【要約】

本明細書において腫瘍抗原VGLL1特異的T細胞受容体を提供する。前記TCRは、がんを処置するための種々の治療に、例えば自己由来細胞移植に用いられ得る。また、VGLL1を標的とするT細胞の集団を増大させるための方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Vestigial様1 (VGLL1) に特異的に結合し、かつ

(a) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:10)、CDR2 (SEQ ID NO:11)、およびCDR3 (SEQ ID NO:12) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:21)、CDR2 (SEQ ID NO:22)、およびCDR3 (SEQ ID NO:23);

(b) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:33)、CDR2 (SEQ ID NO:34)、およびCDR3 (SEQ ID NO:35) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:44)、CDR2 (SEQ ID NO:45)、およびCDR3 (SEQ ID NO:46);

(c) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:56)、CDR2 (SEQ ID NO:57)、およびCDR3 (SEQ ID NO:58) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68)、およびCDR3 (SEQ ID NO:69);または

(d) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:79)、CDR2 (SEQ ID NO:80)、およびCDR3 (SEQ ID NO:81) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:90)、CDR2 (SEQ ID NO:91)、およびCDR3 (SEQ ID NO:92)

を含む、操作されたT細胞受容体 (TCR)。

【請求項 2】

鎖のCDR1 (SEQ ID NO:10)、CDR2 (SEQ ID NO:11)、およびCDR3 (SEQ ID NO:12) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:21)、CDR2 (SEQ ID NO:22)、およびCDR3 (SEQ ID NO:23) を含む、請求項1記載のTCR。

【請求項 3】

SEQ ID NO:15のアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域、および、SEQ ID NO:20のアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域を含む、請求項2記載のTCR。

【請求項 4】

SEQ ID NO:15の鎖可変領域およびSEQ ID NO:20のアミノ酸配列の鎖可変領域を含む、請求項2または3記載のTCR。

【請求項 5】

SEQ ID NO:3のヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域、および、SEQ ID NO:9のヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域を含む、請求項1～4のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 6】

SEQ ID NO:3のヌクレオチド配列を含む鎖可変領域およびSEQ ID NO:9のヌクレオチド配列を含む鎖を含む、請求項1～5のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 7】

CDRを除く前記TCRが、SEQ ID NO:13との少なくとも90%の同一性を有する、請求項1～6のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 8】

SEQ ID NO:13を含む、請求項1～7のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 9】

鎖のCDR1 (SEQ ID NO:33)、CDR2 (SEQ ID NO:34)、およびCDR3 (SEQ ID NO:35) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:44)、CDR2 (SEQ ID NO:45)、およびCDR3 (SEQ ID NO:46) を含む、請求項1記載のTCR。

【請求項 10】

SEQ ID NO:38のアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域、および、SEQ ID NO:43のアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域を含む、請求項9記載のTCR。

【請求項 1 1】

SEQ ID NO:38の鎖可変領域およびSEQ ID NO:43のアミノ酸配列の鎖可変領域を含む、請求項9または10記載のTCR。

【請求項 1 2】

SEQ ID NO:26のヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域、および、SEQ ID NO:32のヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域を含む、請求項9～11のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 1 3】

SEQ ID NO:26のヌクレオチド配列を含む鎖可変領域およびSEQ ID NO:32のヌクレオチド配列を含む鎖可変領域を含む、請求項9～12のいずれか一項記載のTCR。 10

【請求項 1 4】

CDRを除く前記TCRが、SEQ ID NO:36との少なくとも90%の同一性を有する、請求項9～13のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 1 5】

SEQ ID NO:36を含む、請求項9～14のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 1 6】

鎖のCDR1 (SEQ ID NO:56)、CDR2 (SEQ ID NO:57)、およびCDR3 (SEQ ID NO:58)ならびに鎖のCDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68)、およびCDR3 (SEQ ID NO:69)を含む、請求項1記載のTCR。 20

【請求項 1 7】

SEQ ID NO:61のアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域、および、SEQ ID NO:66のアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域を含む、請求項16記載のTCR。

【請求項 1 8】

SEQ ID NO:61の鎖可変領域およびSEQ ID NO:66のアミノ酸配列の鎖可変領域を含む、請求項16または17記載のTCR。

【請求項 1 9】

SEQ ID NO:49のヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域、および、SEQ ID NO:55のヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域を含む、請求項16～18のいずれか一項記載のTCR。 30

【請求項 2 0】

SEQ ID NO:49のヌクレオチド配列を含む鎖可変領域およびSEQ ID NO:55のヌクレオチド配列を含む鎖を含む、請求項16～19のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 2 1】

CDRを除く前記TCRが、SEQ ID NO:59との少なくとも90%の同一性を有する、請求項16～20のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 2 2】

SEQ ID NO:59を含む、請求項16～21のいずれか一項記載のTCR。 40

【請求項 2 3】

鎖のCDR1 (SEQ ID NO:79)、CDR2 (SEQ ID NO:80)、およびCDR3 (SEQ ID NO:81)ならびに鎖のCDR1 (SEQ ID NO:90)、CDR2 (SEQ ID NO:91)、およびCDR3 (SEQ ID NO:92)を含む、請求項1記載のTCR。

【請求項 2 4】

SEQ ID NO:84のアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域、および、SEQ ID NO:89のアミノ酸配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域を含む、請求項23記載のTCR。 50

【請求項 25】

SEQ ID NO:84の鎖可変領域およびSEQ ID NO:89のアミノ酸配列の鎖可変領域を含む、請求項23または24記載のTCR。

【請求項 26】

SEQ ID NO:72のヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域、および、SEQ ID NO:78のヌクレオチド配列との少なくとも90%の同一性を有する、CDRを除く鎖可変領域を含む、請求項23～25のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 27】

SEQ ID NO:72のヌクレオチド配列を含む鎖可変領域およびSEQ ID NO:78のヌクレオチド配列を含む鎖を含む、請求項23～26のいずれか一項記載のTCR。 10

【請求項 28】

CDRを除く前記TCRが、SEQ ID NO:82との少なくとも90%の同一性を有する、請求項23～27のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 29】

SEQ ID NO:82を含む、請求項23～28のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 30】

前記操作されたTCRがHLA-A*0101に結合する、請求項1～29のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 31】

膜貫通ドメインを含まない可溶性TCRとしてさらに定義される、請求項1～30のいずれか一項記載のTCR。 20

【請求項 32】

検出可能な標識をさらに含む、請求項1～31のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 33】

治療用物質に共有結合されている、請求項1～32のいずれか一項記載のTCR。

【請求項 34】

前記治療用物質がイムノトキシンまたは化学療法剤である、請求項33記載のTCR。

【請求項 35】

請求項1～34のいずれか一項記載のTCRを複数含む、多価TCR複合体。 30

【請求項 36】

前記多価TCRが、互いと会合している2、3、4つ、またはそれ以上のTCRを含む、請求項35記載の複合体。

【請求項 37】

前記多価TCRが、脂質二重層に、リポソームに存在するか、またはナノ粒子に結合されている、請求項35または36記載の複合体。

【請求項 38】

前記TCRがリンカー分子を介して互いと会合している、請求項36～38のいずれか一項記載の複合体。

【請求項 39】

請求項1～38のいずれか一項記載のTCRをコードしている、ポリペプチド。 40

【請求項 40】

請求項39記載のポリペプチドをコードしている、ポリヌクレオチド。

【請求項 41】

請求項1～38のいずれか一項記載のTCRをコードしている、発現ベクター。

【請求項 42】

前記TCRをコードしている配列がプロモーターの制御下にある、請求項41記載の発現ベクター。

【請求項 43】

ウイルスベクターである、請求項41または42記載の発現ベクター。 50

【請求項 44】

前記ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、請求項43記載の発現ベクター。

【請求項 45】

前記ベクターがリンカードメインをさらにコードしている、請求項41～44のいずれか一項記載の発現ベクター。

【請求項 46】

前記リンカードメインが前記鎖と前記鎖との間に位置している、請求項45記載の発現ベクター。

【請求項 47】

請求項1～34のいずれか一項記載のTCRを発現するように操作されている宿主細胞。

【請求項 48】

前記細胞がT細胞、NK細胞、インバリアントNK細胞、NKT細胞、間葉系幹細胞(MSC)、または人工多能性幹(iPS)細胞である、請求項47記載の宿主細胞。

【請求項 49】

免疫細胞である、請求項47または48記載の宿主細胞。

【請求項 50】

臍帯から単離される、請求項47～49のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項 51】

前記T細胞がCD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、またはT細胞である、請求項48～50のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項 52】

前記T細胞が制御性T細胞(Treg)である、請求項48～51のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項 53】

前記細胞が自己由来である、請求項47～53のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項 54】

前記細胞が同種異系である、請求項47～53のいずれか一項記載の宿主細胞。

【請求項 55】

請求項1～34のいずれか一項記載のTCRまたは請求項41～33のいずれか一項記載の発現ベクターと、前記免疫細胞を接触させることを含む、請求項47記載の宿主細胞を操作するための方法。

【請求項 56】

前記免疫細胞がT細胞または末梢血リンパ球である、請求項55記載の方法。

【請求項 57】

接触させることが、トランスフェクトすることまたは形質導入することとしてさらに定義される、請求項55または56記載の方法。

【請求項 58】

トランスフェクトすることが、請求項1～34のいずれか一項記載のTCRをコードしているRNAを前記免疫細胞内にエレクトロポレートすることを含む、請求項55～57のいずれか一項記載の方法。

【請求項 59】

前記免疫細胞の形質導入の前に、請求項41記載の発現ベクター由来のウイルス上清を生成することをさらに含む、請求項55～58のいずれか一項記載の方法。

【請求項 60】

前記免疫細胞が刺激されたリンパ球である、請求項55～59のいずれか一項記載の方法。

【請求項 61】

前記刺激されたリンパ球がヒトリンパ球である、請求項60記載の方法。

【請求項 62】

10

20

30

40

50

刺激することが、前記免疫細胞をOKT3および/もしくはIL-2と接触させること、または前記免疫細胞をOKT3および/もしくはIL-2中でインキュベートすることを含む、請求項60または61記載の方法。

【請求項63】

TCR操作T細胞を単離するために前記免疫細胞を選別することをさらに含む、請求項55～62のいずれか一項記載の方法。

【請求項64】

段階希釈によってT細胞クローニングを行なうことをさらに含む、請求項63記載の方法。

【請求項65】

急速増大プロトコールによるT細胞クローンの増大をさらに含む、請求項63または64記載の方法。

【請求項66】

有効量の請求項47～53のいずれか一項記載のTCR操作細胞を対象に投与することを含む、前記対象のがんを処置する方法。

【請求項67】

前記対象がHLA-A*0101対立遺伝子を有すると同定されている、請求項66記載の方法。

【請求項68】

前記TCR操作細胞がT細胞または末梢血リンパ球である、請求項66または67記載の方法。

【請求項69】

前記T細胞がCD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、またはTregである、請求項66記載の方法。

【請求項70】

前記がんが、膵臓がん、卵巣がん、胃がん、乳がん、膀胱がん、子宮がん、または子宮頸がんである、請求項66～69のいずれか一項記載の方法。

【請求項71】

前記対象がヒトである、請求項66～70のいずれか一項記載の方法。

【請求項72】

前記TCR操作細胞が自己由来である、請求項66～71のいずれか一項記載の方法。

【請求項73】

前記TCR操作細胞が同種異系である、請求項66～72のいずれか一項記載の方法。

【請求項74】

VGLL1特異的T細胞の投与の前に前記対象のリンパ球枯渇をさらに含む、請求項66～73のいずれか一項記載の方法。

【請求項75】

リンパ球枯渇がシクロホスファミドおよび/またはフルダラビンの投与を含む、請求項74記載の方法。

【請求項76】

第2の抗がん治療を実施することをさらに含む、請求項66～75のいずれか一項記載の方法。

【請求項77】

前記治療が、化学療法、免疫療法、手術、放射線療法、またはバイオセラピーである、請求項76記載の方法。

【請求項78】

前記TCR操作細胞および/または少なくとも1つの第2の治療用物質が、静脈内に、腹腔内に、気管内に、腫瘍内に、筋肉内に、内視鏡的に、病巣内に、経皮的に、皮下に、局部的に、または直接注射もしくは灌流によって投与される、請求項66～77のいずれか一項記載の方法。

【請求項79】

10

20

30

40

50

前記対象が、VGLL1を過剰発現するがん細胞を有すると判定されている、請求項66～78のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2020年5月21日に提出された米国特許仮出願第63/028,262号の恩典を主張し、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表の組み入れ

ファイル名“UTFCP1477WO_ST25.txt”で含められた58.7 KBであり（Microsoft Windowsで計測時）、2021年5月14日に作成された配列表が本明細書とともに電子提出によって出願されており、参照により本明細書に組み入れられる。

【0003】

1. 分野

本発明は全体として免疫学および薬の分野に関する。より詳しくは、腫瘍抗原特異的T細胞受容体、およびがんの処置のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 関連技術の記載

膵臓がんの最も侵襲性の形態である膵管腺癌（PDAC）は、その不良な予後および高い死亡率のため依然として悪評が高く、中でも8%という全5年生存率はすべての型のがんのうちで最も低い。早期検出は珍しく、患者の85%は局所進行疾患または転移性疾患を示す。有効な処置の進歩は遅々としており、PDAC関連死の発生率は上昇し続けている。手術および化学療法処置レジメンの順序の最適化によって最近ではある程度励みになる生存の改善が得られているが、進行期のPDAC患者には依然として、新しい有効な治療選択肢の開発が緊急に必要とされている（Strobel et al., 2019）。

【0005】

細胞傷害性Tリンパ球（CTL）ベースの免疫療法は、さまざまな型のがんで客観的臨床応答の誘導において好成績である。Tリンパ球の非特異的活性化によって作用するチェックポイント阻害物質（CPI）での治療では患者の長期生存に大きなプラスの影響をもたらされている。しかしながら、CPIの有益性は、主に、表面HLA分子との関連における多くの一連の潜在的ネオ抗原ペプチドを発現し得る黒色腫および肺腺癌などの高度変異腫瘍型に限定されている（Rizvi et al., 2015）。また、個々のがん患者に自身の腫瘍から増大したT細胞が再輸注される腫瘍浸潤リンパ球（TIL）療法も、巨大腫瘍の退縮の誘導に対する大きな有望性が示されている。TILはポリクローナルであり、患者特異的ネオ抗原ならびに共通腫瘍関連抗原（TAA）、例えばメラノサイト分化抗原（MDA）またはがん精巢抗原（CTA）のどちらも認識することができる。また、抗原特異的内在性T細胞（ETC療法）または遺伝子操作されたTCR-T細胞の輸注による個々の検証済みHLAクラスI拘束性TAAのターゲティングも、黒色腫および他の固形がんを有する患者における臨床応答の誘導において好成績であることが証明されている。

【0006】

CPIベースおよびCTLベースの免疫療法では、残念ながらPDAC患者の処置において同じ有益な影響が示されていない（Young et al., 2018）。この好成績の欠如は、ネオ抗原標的不足の一因となる比較的少ない遺伝子変異量に加えてPDACの高度に免疫抑制的な腫瘍微小環境（TME）に起因している（Yarchoan et al., 2017）。いくつかの潜在的にターゲティング可能なHLAクラスI拘束性ペプチド抗原がPDACにおいて同定されており、最も注目すべきは、とりわけ、がん胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）、ムチン16（MUC16）、メソテリン（MSLN）および変異KRASに由来するものである。有望であるが、このようなTAAを標的とする治療薬は、固有の限界、例えば非腫瘍組織に

10

20

30

40

50

おける毒性の誘導、低い標的抗原発現保有率または多くの場合、高親和性CTLの作製の妨げとなる自己寛容機構の破綻不能性に直面している。限定的な例外を除いて、このような抗原を標的とする臨床試験では残念な結果が得られており、PDAC患者において高保有率が示される安全な免疫原性標的を同定する必要性が強調される。したがって、このような悪性腫瘍の追加の標的抗原に対する新規なT細胞ベースの治療薬の未達の医学的必要性が存在している。

【発明の概要】

【0007】

概要

いくつかの態様において、本開示により、VGLL1 T細胞受容体 (TCR)、および、養子T細胞療法を含む治療などにおけるその使用のための方法を提供する。一態様において、操作されたT細胞受容体 (TCR) が提供され、TCRが、Vestigial様1 (VGLL1) に特異的に結合し、かつ (a) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:10)、CDR2 (SEQ ID NO:11)、およびCDR3 (SEQ ID NO:12) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:21)、CDR2 (SEQ ID NO:22)、およびCDR3 (SEQ ID NO:23); (b) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:33)、CDR2 (SEQ ID NO:34)、およびCDR3 (SEQ ID NO:35) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:44)、CDR2 (SEQ ID NO:45)、およびCDR3 (SEQ ID NO:46); (c) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:56)、CDR2 (SEQ ID NO:57)、およびCDR3 (SEQ ID NO:58) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68)、およびCDR3 (SEQ ID NO:69); または (d) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:79)、CDR2 (SEQ ID NO:80)、およびCDR3 (SEQ ID NO:81) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:90)、CDR2 (SEQ ID NO:91)、およびCDR3 (SEQ ID NO:92) を含む。

【0008】

いくつかの局面において、TCRは 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:10)、CDR2 (SEQ ID NO:11)、およびCDR3 (SEQ ID NO:12) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:21)、CDR2 (SEQ ID NO:22)、およびCDR3 (SEQ ID NO:23) を含む。特定の局面において、TCRは、SEQ ID NO:15のアミノ酸配列との少なくとも90% (例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域、および、SEQ ID NO:20のアミノ酸配列との少なくとも90% (例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域を含む。例えば、可変領域はCDRを含み、配列の残りの部分は少なくとも90% (例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の配列同一性を有する。特定の局面において、TCRはSEQ ID NO:15の 鎖可変領域およびSEQ ID NO:20のアミノ酸配列の 鎖可変領域を含む。特定の局面において、TCRは、SEQ ID NO:3のヌクレオチド配列との少なくとも90% (例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域、および、SEQ ID NO:9のヌクレオチド配列との少なくとも90% (例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域を含む。特定の局面において、TCRはSEQ ID NO:3のヌクレオチド配列を含む 鎖可変領域およびSEQ ID NO:9のヌクレオチド配列を含む 鎖を含む。いくつかの局面において、CDRを除くTCRはSEQ ID NO:13との少なくとも90%の同一性を有する。特定の局面において、TCRはSEQ ID NO:13を含む。

【0009】

特定の局面において、TCRは 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:33)、CDR2 (SEQ ID NO:34)、およびCDR3 (SEQ ID NO:35) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:44)、CDR2 (SEQ ID NO:45)、およびCDR3 (SEQ ID NO:46) を含む。特定の局面において、TCRは、SEQ ID NO:38のアミノ酸配列との少なくとも90% (例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性を有する、CDRを

除く 鎖可変領域、および、SEQ ID NO:43のアミノ酸配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域を含む。特定の局面において、TCRはSEQ ID NO:38の 鎖可変領域およびSEQ ID NO:43のアミノ酸配列の 鎖可変領域を含む。いくつかの局面において、TCRは、SEQ ID NO:26のヌクレオチド配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域、および、SEQ ID NO:32のヌクレオチド配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域を含む。いくつかの局面において、TCRはSEQ ID NO:26のヌクレオチド配列を含む 鎖可変領域およびSEQ ID NO:32のヌクレオチド配列を含む 鎖可変領域を含む。いくつかの局面において、CDRを除くTCRは、SEQ ID NO:36との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する。特定の局面において、TCRはSEQ ID NO:36を含む。

【0010】

特定の局面において、TCRは 鎖のCDR1（SEQ ID NO:56）、CDR2（SEQ ID NO:57）、およびCDR3（SEQ ID NO:58）ならびに 鎖のCDR1（SEQ ID NO:67）、CDR2（SEQ ID NO:68）、およびCDR3（SEQ ID NO:69）を含む。いくつかの局面において、TCRは、SEQ ID NO:61のアミノ酸配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域、および、SEQ ID NO:66のアミノ酸配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域を含む。いくつかの局面において、TCRはSEQ ID NO:61の 鎖可変領域およびSEQ ID NO:66のアミノ酸配列の 鎖可変領域を含む。特定の局面において、TCRは、SEQ ID NO:49のヌクレオチド配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域、および、SEQ ID NO:55のヌクレオチド配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域を含む。いくつかの局面において、TCRはSEQ ID NO:49のヌクレオチド配列を含む 鎖可変領域およびSEQ ID NO:55のヌクレオチド配列を含む 鎖を含む。特定の局面において、CDRを除くTCRは、SEQ ID NO:59との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する。特定の局面において、TCRはSEQ ID NO:59を含む。

【0011】

いくつかの局面において、TCRは 鎖のCDR1（SEQ ID NO:79）、CDR2（SEQ ID NO:80）、およびCDR3（SEQ ID NO:81）ならびに 鎖のCDR1（SEQ ID NO:90）、CDR2（SEQ ID NO:91）、およびCDR3（SEQ ID NO:92）を含む。特定の局面において、TCRは、SEQ ID NO:84のアミノ酸配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域、および、SEQ ID NO:89のアミノ酸配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域を含む。いくつかの局面において、TCRはSEQ ID NO:84の 鎖可変領域およびSEQ ID NO:89のアミノ酸配列の 鎖可変領域を含む。特定の局面において、TCRは、SEQ ID NO:72のヌクレオチド配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域、および、SEQ ID NO:78のヌクレオチド配列との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97、98%、または99%）の同一性を有する、CDRを除く 鎖可変領域を含む。いくつかの局面において、TCRはSEQ ID NO:72のヌクレオチド配列を含む 鎖可変領域およびSEQ ID

NO:78のヌクレオチド配列を含む鎖を含む。特定の局面において、CDRを除くTCRは、SEQ ID NO:82との少なくとも90%（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性を有する。特定の局面において、TCRはSEQ ID NO:82を含む。

【0012】

いくつかの局面において、操作されたTCRはHLA-A*0101に結合する。特定の局面において、TCRは、膜貫通ドメインを含まない可溶性TCRとしてさらに定義される。追加の局面において、TCRは検出可能な標識をさらに含む。いくつかの局面において、TCRは、治療用物質、例えばイムノトキシンまたは化学療法剤に共有結合される。

【0013】

さらなる一態様により、本態様またはその局面の複数のTCR（例えば、操作されたT細胞受容体（TCR）であって、Vestigial様1（VGLL1）に特異的に結合し、かつ（a）鎖のCDR1（SEQ ID NO:10）、CDR2（SEQ ID NO:11）、およびCDR3（SEQ ID NO:12）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:21）、CDR2（SEQ ID NO:22）、およびCDR3（SEQ ID NO:23）；（b）鎖のCDR1（SEQ ID NO:33）、CDR2（SEQ ID NO:34）、およびCDR3（SEQ ID NO:35）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:44）、CDR2（SEQ ID NO:45）、およびCDR3（SEQ ID NO:46）；（c）鎖のCDR1（SEQ ID NO:56）、CDR2（SEQ ID NO:57）、およびCDR3（SEQ ID NO:58）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:67）、CDR2（SEQ ID NO:68）、およびCDR3（SEQ ID NO:69）；または（d）鎖のCDR1（SEQ ID NO:79）、CDR2（SEQ ID NO:80）、およびCDR3（SEQ ID NO:81）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:90）、CDR2（SEQ ID NO:91）、およびCDR3（SEQ ID NO:92）を含む、TCR）を含む多価TCR複合体を提供する。いくつかの局面において、多価TCRは、互いと会合している2、3、4つ、またはそれ以上のTCRを含む。特定の局面において、多価TCRは、脂質二重層に、リボソームに存在するか、またはナノ粒子に結合されている。いくつかの局面において、TCRはリンカー分子を介して互いと会合している。

【0014】

別の態様により、本態様またはその局面のTCR（例えば、操作されたT細胞受容体（TCR）であって、Vestigial様1（VGLL1）に特異的に結合し、かつ（a）鎖のCDR1（SEQ ID NO:10）、CDR2（SEQ ID NO:11）、およびCDR3（SEQ ID NO:12）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:21）、CDR2（SEQ ID NO:22）、およびCDR3（SEQ ID NO:23）；（b）鎖のCDR1（SEQ ID NO:33）、CDR2（SEQ ID NO:34）、およびCDR3（SEQ ID NO:35）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:44）、CDR2（SEQ ID NO:45）、およびCDR3（SEQ ID NO:46）；（c）鎖のCDR1（SEQ ID NO:56）、CDR2（SEQ ID NO:57）、およびCDR3（SEQ ID NO:58）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:67）、CDR2（SEQ ID NO:68）、およびCDR3（SEQ ID NO:69）；または（d）鎖のCDR1（SEQ ID NO:79）、CDR2（SEQ ID NO:80）、およびCDR3（SEQ ID NO:81）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:90）、CDR2（SEQ ID NO:91）、およびCDR3（SEQ ID NO:92）を含む、TCR）をコードしているポリペプチドを提供する。さらなる一態様により、本態様またはその局面のTCRをコードしているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを提供する。

【0015】

また別の態様において、本態様またはその局面のTCR（例えば、操作されたT細胞受容体（TCR）であって、Vestigial様1（VGLL1）に特異的に結合し、かつ（a）鎖のCDR1（SEQ ID NO:10）、CDR2（SEQ ID NO:11）、およびCDR3（SEQ ID NO:12）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:21）、CDR2（SEQ ID NO:22）、およびCDR3（SEQ ID NO:23）；（b）鎖のCDR1（SEQ ID NO:33）、CDR2（SEQ ID NO:34）、およびCDR3（SEQ ID NO:35）ならびに鎖のCDR1（SEQ ID NO:44）、CDR2（SEQ ID NO:45）、およびCDR3（SEQ ID NO:46）；（c）鎖のCDR1（SEQ ID NO:56）、CDR2（SEQ ID NO:57）、およびCDR3（SEQ ID NO:58）ならびに

10

20

30

40

50

鎖のCDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68)、およびCDR3 (SEQ ID NO:69);または(d) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:79)、CDR2 (SEQ ID NO:80)、およびCDR3 (SEQ ID NO:81)ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:90)、CDR2 (SEQ ID NO:91)、およびCDR3 (SEQ ID NO:92)を含む、TCR)をコードしている発現ベクターが提供される。いくつかの局面において、TCRをコードしている配列はプロモーターの制御下にある。特定の局面において、発現ベクターはウイルスベクターである。いくつかの局面において、ウイルスベクターはレトロウイルスベクターである。追加の局面において、ベクターはリンカードメインをさらにコードしている。例えば、リンカードメインは 鎖と 鎖の間に位置している。

【0016】

さらなる一態様により、本態様またはその局面のTCR (例えば、操作されたT細胞受容体 (TCR) であって、Vestigial様1 (VGLL1) に特異的に結合し、かつ(a) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:10)、CDR2 (SEQ ID NO:11)、およびCDR3 (SEQ ID NO:12) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:21)、CDR2 (SEQ ID NO:22)、およびCDR3 (SEQ ID NO:23); (b) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:33)、CDR2 (SEQ ID NO:34)、およびCDR3 (SEQ ID NO:35) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:44)、CDR2 (SEQ ID NO:45)、およびCDR3 (SEQ ID NO:46); (c) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:56)、CDR2 (SEQ ID NO:57)、およびCDR3 (SEQ ID NO:58) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68)、およびCDR3 (SEQ ID NO:69); または(d) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:79)、CDR2 (SEQ ID NO:80)、およびCDR3 (SEQ ID NO:81) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:90)、CDR2 (SEQ ID NO:91)、およびCDR3 (SEQ ID NO:92) を含む、TCR) を発現するように操作されている宿主細胞を提供する。いくつかの局面において、細胞はT細胞、NK細胞、インバリアントNK細胞、NKT細胞、間葉系幹細胞 (MSC)、または人工多能性幹 (iPS) 細胞である。特定の局面において、宿主細胞は免疫細胞である。特定の局面において、宿主細胞は臍帯から単離される。いくつかの局面において、T細胞はCD8⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、または T細胞である。特定の局面において、T細胞は制御性T細胞 (Treg) である。いくつかの局面において、細胞は自己由来である。特定の局面において、細胞は同種異系である。

【0017】

別の態様により、本態様もしくはその局面のTCR (例えば、操作されたT細胞受容体 (TCR) であって、Vestigial様1 (VGLL1) に特異的に結合し、かつ(a) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:10)、CDR2 (SEQ ID NO:11)、およびCDR3 (SEQ ID NO:12) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:21)、CDR2 (SEQ ID NO:22)、およびCDR3 (SEQ ID NO:23); (b) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:33)、CDR2 (SEQ ID NO:34)、およびCDR3 (SEQ ID NO:35) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:44)、CDR2 (SEQ ID NO:45)、およびCDR3 (SEQ ID NO:46); (c) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:56)、CDR2 (SEQ ID NO:57)、およびCDR3 (SEQ ID NO:58) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:67)、CDR2 (SEQ ID NO:68)、およびCDR3 (SEQ ID NO:69); もしくは(d) 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:79)、CDR2 (SEQ ID NO:80)、およびCDR3 (SEQ ID NO:81) ならびに 鎖のCDR1 (SEQ ID NO:90)、CDR2 (SEQ ID NO:91)、およびCDR3 (SEQ ID NO:92) を含む、TCR) または本態様もしくはその局面のうちのいずれか1つの発現ベクターと、前記免疫細胞を接触させることを含む、本態様またはその局面の宿主細胞を操作するための方法を提供する。いくつかの局面において、免疫細胞はT細胞または末梢血リンパ球である。特定の局面において、接触させることはトランスフェクトすること、または形質導入することとしてさらに定義される。いくつかの局面において、トランスフェクトすることは、本態様またはその局面のTCRをコードしているRNAを免疫細胞内にエレクトロポレートすることを含む。いくつかの局面において、前記方法は、免疫細胞の形質導入の前に、請求項41記載の発現ベクター由来のウイルス上清を生成することをさらに含む。いくつかの局面において、免疫細胞

10

20

30

40

50

胞は刺激されたリンパ球、例えばヒトリンパ球である。特定の局面において、刺激することは、免疫細胞をOKT3および/もしくはIL-2と接触させること、または免疫細胞をOKT3および/もしくはIL-2中でインキュベートすることを含む。追加の局面において、前記方法は、TCR操作T細胞を単離するために免疫細胞を選別することをさらに含む。いくつかの局面において、前記方法は、段階希釈によってT細胞クローニングを行なうことをさらに含む。特定の局面において、前記方法は、急速増大プロトコールによるT細胞クローンの増大をさらに含む。

【0018】

さらなる一態様により、有効量の本態様またはその局面のTCR操作細胞を対象に投与することを含む、対象のがんを処置する方法を提供する。いくつかの局面において、対象はHLA-A*0101対立遺伝子を有すると同定されている。特定の局面において、TCR操作細胞はT細胞または末梢血リンパ球である。特定の局面において、T細胞はCD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、またはTregである。いくつかの局面において、がんは膵臓がん、卵巣がん、胃がん、乳がん、膀胱がん、子宮がん、または子宮頸がんである。特定の局面において、対象はヒトである。いくつかの局面において、TCR操作細胞は自己由来である。特定の局面において、TCR操作細胞は同種異系である。追加の局面において、前記方法は、VGLL1特異的T細胞の投与の前に対象のリンパ球枯渇をさらに含む。例えば、リンパ球枯渇はシクロホスファミドおよび/またはフルダラビンの投与を含む。追加の局面において、前記方法は、第2の抗がん治療を実施することをさらに含む。いくつかの局面において、前記治療は化学療法、免疫療法、手術、放射線療法、またはバイオセラピーである。特定の局面において、TCR操作細胞および/または少なくとも1つの第2の治療用物質は、静脈内に、腹腔内に、気管内に、腫瘍内に、筋肉内に、内視鏡的に、病巣内に、経皮的に、皮下に、局部的に、または直接注射もしくは灌流によって投与される。いくつかの局面において、対象は、VGLL1を過剰発現するがん細胞を有すると判定される。

【0019】

本発明の他の目的、特徴、および利点は以下の詳細な説明から明らかとなる。しかしながら、詳細な説明および具体的な実施例に本発明の好ましい態様を示しているが、当業者にはこの詳細な説明から本発明の趣旨および範囲の範囲内で種々の変更および修正が明らかとなるため、例示のためにのみ示しているにすぎないことは理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0020】

以下の図面は、本明細書の一部を構成し、本発明の特定の局面をさらに示すために含まれている。本発明は、これらの図面のうちの1つまたは複数の本明細書に提示した具体的な態様の詳細な説明と併せて参照することによってよりよく理解され得よう。

【図1】図1A~1C:イムノペプチド解析により、2つのPDAC患者由来類器官系によって発現されているVGLL1由来ペプチドが明らかになる。(図1A)35人のM.D.アンダーソンのPDAC患者に由来する39例の腫瘍検体からPDAC腫瘍特異的HLAクラスI結合ペプチドを同定するための実験ストラテジー。(図1B)溶出されたPDAC関連ペプチドの中から潜在的にターゲティング可能なTAAを同定するためのバイオインフォマティクススクリーニングストラテジー。ペプチドコード遺伝子をPDAC腫瘍RNAseq発現について、42例のGTex Portalの正常組織における転写物発現と比較して評価した。精巢を除いて、正常組織を異なる組織に対するオフ腫瘍殺作用活性により予想される潜在的毒性を反映する4つのカテゴリー(非必須組織、警告組織、ハザード組織、および危険組織)に分けた。すべてのペプチドコード遺伝子を、漸増ストリンジェンシーの4つの対応する発現閾値(30、10、3、および1 TPM、左の点線で示す)を用いて連続的にフィルタリングし、CTL療法(右の点線)との関連において自己免疫毒性を誘起する可能性が非常に高い候補TAAを排除した。PDAC患者MP015およびMP081の腫瘍類器官細胞株から単離された高信頼度ペプチドのスクリーニングを示すが、これは、このようなストリンジェント基準を満たす溶出ペプチドがほとんどなかったことを示す。(図1C)2つの異なるPDAC類器官細胞株MP015およびMP081から単離されたHLA-A*0101拘束性VGLL1由

来ペプチドの質量スペクトル（上2つのパネル）。患者由来ペプチドを合成の同位体標識VGLL1ペプチドLSELETPGKY（SEQ ID NO:93）（ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 標識リシン残基を含む）とともに共溶出させ、MSフラグメンテーションスペクトルをマッチさせた。 y^+ が表示された一連のフラグメンテーションは、予想される8原子質量単位のシフトを示す（下パネル）。

【図2】VGLL1は複数の型の腫瘍において過剰発現される。RNAseq解析によって測定された正常組織（左、GTEx Portalデータベース）およびヒトがん（右、TCGAデータベース）におけるVGLL1転写物発現。各点は、1つの正常ドナーまたは患者の腫瘍試料を表す。色は、図1において規定した4つの正常組織カテゴリーに対応する：緑、非必須組織（脂肪、子宮頸部、ebv、ファローピウス管、筋肉、卵巣、形質転換線維芽細胞、子宮、皮膚、精巣、膣、前立腺、乳房、唾液腺）；黄、警告組織（副腎、神経、脾臓、甲状腺、全血、膵臓、下垂体、膀胱）；オレンジ、ハザード組織（結腸、食道、肝臓、小腸、胃、腎臓、肺）；赤、危険組織（動脈、脳、心臓）。GTExの正常な警告、ハザード、および危険組織試料のうちの>95%は3転写物/100万（TPM、点線）未満に低下したが、有意な数のTCGAのがん患者でこの閾値より上のVGLL1転写物発現が示された（囲み）。

【図3】VGLL1は膵臓患者の不良な生存と関連している。上：腫瘍のVGLL1転写物発現によって層別化されたTCGAのPDAC患者の全生存期間（OS）を示す Kaplan-Meier 曲線（ $n=178$ ）。P値は、3つの群のVGLL1発現患者のOSをVGLL1の低発現を有するか、または発現なしの患者と比較したログランク有意性検定の結果を示す。（>100 TPMで最も短い全生存期間が示され、<1.5 TPMで最も長い全生存期間が示された）。下：MD Andersonの転移性PDAC患者の腫瘍の独立したコホートの患者由来の異種移植片（PDX）（ $n=37$ ）を免疫不全マウスにおいて成長させた後、RNAseq解析した。グラフは、OS期間の対応する3つの群に層別化されたPDX検体および対応するVGLL1転写物発現を示す。

【図4】図4A~4D：患者MP015の末梢血からのVGLL1抗原特異的CTLの作製。（図4A）ヒトドナーPBMCからVGLL1特異的CD8+ T細胞を作製するための実験手順の概略を示す模式図。（図4B）白血球アフェレーシスによってPDAC患者MP015から単離されたPBMCを、自己由来LSELETPGKY（SEQ ID NO:93）ペプチドパルス樹状細胞（DC）を用いて刺激した。2回の刺激後（上段）、CD8+およびVGLL1四量体陽性細胞を選別し、標準的な急速増大プロトコール（REP）を用いて増大させた。最初のREP後、抗原特異的細胞の数が少なかったため、VGLL1特異的T細胞を再選別し、2回目の増大を行なった。2回目のREPにより 19.6×10^9 個のVGLL1特異的CTLが得られ、これが患者MP015に輸注物として、個別化ETC療法のCompassionate INDプロトコール下で安全に投与された。（図4C）増大したVGLL1特異的CTLのTCRレパートリー解析を、24種類の異なる特異性に対応するV抗体を用いて行なった。（図4D）患者MP015由来の増大したVGLL1特異的T細胞を、機能性について標準的な ^{51}Cr 放出アッセイで試験し、用量設定された量のLSELETPGKY（SEQ ID NO:93）ペプチドでパルス処理されたMel888黒色腫細胞（VGLL1陰性HLA-A*0101陽性）の5:1のエフェクター対標的（E:T）比での比溶解を評価した。

【図5】図5A~5B：VGLL1特異的CTLは複数の同種異系膵臓がん細胞株を認識して殺作用を奏する。（図5A）患者MP015由来の増大したVGLL1特異的CD8+ T細胞をHLA-A*0101陽性PDAC腫瘍細胞株のパネルとともに標準的な ^{51}Cr 放出アッセイにおいて共培養し、異なるエフェクター対標的（E:T）細胞比での細胞傷害活性を測定した。WM793黒色腫細胞（VGLL1陰性HLA-A*0101陽性）を陰性対照細胞株として使用した。VGLL1-CTLは、VGLL1ペプチドが初めに単離された自己由来類器官細胞株MP015にロバストに殺作用を示し、また、4つの同種異系HLA-A*0101発現PDAC細胞株に対する細胞傷害活性も示した。結果は6連の試料の平均および標準偏差を示し、データは最低4回の反復実験の代表である。（図5B）試験した5つのすべてのPDAC細胞株におけるVGLL1タンパク質の発現を示すウエスタンブロット解析。

【図6】図6A~6D：VGLL1特異的T細胞は複数の型の腫瘍を認識して殺作用を奏するが

低い初代組織細胞株認識を有する。(図6A) VGLL1特異的CD8+ T細胞を、卵巣がん、肺がん、乳がん、膀胱がんまたは胃がん由来する13種類の異なるHLA-A*0101発現腫瘍細胞株とともに標準的な⁵¹Cr放出アッセイにおいて共培養し、異なるエフェクター対標的(E:T)細胞比での細胞傷害活性を測定した。5つのHLA-A*0101陰性細胞株(EBC1、HT1197、HT1376、GT-5、およびMKN74)は、HLA-A*0101を安定的に発現するようにレンチウイルスを用いて形質導入された;親細胞株(灰色の線)のVGLL1-CTL殺作用を、HLA-A*0101形質導入された対応する細胞(黒色の線)と比較して示す。(図6B)卵巣がん、肺がん、乳がん、膀胱がんまたは胃がん由来する腫瘍細胞株におけるVGLL1タンパク質発現を示すウエスタンブロット解析。(図6C) VGLL1特異的CTLを、膀胱、乳房、肺気道に由来するHLA-A*0101発現初代組織細胞または皮膚

10

メラノサイトとともに標準的な⁵¹Cr放出アッセイにおいて共培養し、細胞傷害活性を測定した。VGLL1-CTLアッセイの結果は6連の試料の平均および標準偏差を示し、データは最低2回の反復実験の代表である。(図6D)ウエスタンブロット解析によって評価された初代細胞株におけるVGLL1タンパク質発現。

【図7】免疫沈降したHLAクラスIの量はPDAC腫瘍検体の重量と相関する。PDAC患者由来の外科的切除腫瘍(n=34)または患者由来の異種移植片(n=3)を重量測定後に組織溶解させ、mAb W6/32を用いて全HLAクラスIの免疫沈降を行なった。回収されたHLAクラスIをウエスタンブロット解析に基づいて、HLAクラスIバンド強度(予想サイズ42~44 KD)を0(検出なし)から4(最も高レベルで検出)までのスケールで評価することによって定量した。グラフは、ウエスタンブロットバンド強度をプロットした検体の重量を示す;点線は、予想よりHLAクラスIの回収が少なく、腫瘍のHLA発現が低いことを示す試料を示す。

20

【図8】検出されたPDAC関連ペプチドの総数は回収されるHLAクラスIの量と相関する。PDAC患者由来の外科的切除物(n=34)、異種移植片(n=3)または類器官細胞株(n=2)から回収されたHLAクラスIをウエスタンブロット解析により、HLAクラスIバンド強度(サイズ42~44 KD)を0(検出なし)から4(最も高レベルで検出)までのスケールで評価することによって定量した。免疫沈降したHLAクラスIから溶出されたペプチドをタンデムMSによって解析し、SwissProt ヒトプロテオームデータベースで検索した。グラフは、ウエスタンブロットによって解析されたHLAクラスI強度に対してプロットしたユニークな高品質のペプチドマッチの数を示す。

30

【図9】VGLL1由来ペプチドはPANC-1005細胞株から溶出させた。PDAC細胞株PANC10.05から単離されたHLA-A*0101拘束性VGLL1由来ペプチドの質量スペクトル(上パネル)。天然状態のペプチドを、¹³C/¹⁵N標識リシン残基を含む合成の同位体標識ペプチドLSELETPGKY (SEQ ID NO:93)とともに共溶出させ、MSフラグメンテーションスペクトルをマッチさせた(下パネル)。

【図10】VGLL1は他の乳がんサブタイプと比べて基底細胞様乳がんにおいて優先的に発現される。TCGAの乳がん患者を5つの主なサブタイプ(LumA、LumB、基底細胞様、HER2過剰発現および正常様)に細分し、腫瘍のVGLL1発現についてRNAseq解析によって解析した。各点は、1つのTCGAの患者試料を表し、VGLL1転写物発現は断片/キロベース転写物/100万マップリード数(FPKM)で示している。

40

【図11】さまざまな型のがんに由来する腫瘍細胞株におけるVGLL1遺伝子発現。Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)の多様な一群の腫瘍細胞株(n=679)の遺伝子発現マイクロアレイ解析により、VGLL1は、有意な割合の乳がん細胞株、胃がん細胞株、卵巣がん細胞株および肺がん細胞株に加えて大部分のPDACおよび膀胱がん細胞株でも発現されることが示された。黒色腫、甲状腺がん、または造血系のがんに由来する細胞株ではVGLL1発現はみられなかった。VGLL1抗原陽性の閾値はバックグラウンドシグナルの3倍上であった。

【図12】図12A~12D:腫瘍の高いVGLL1発現は複数の型のがんにおいて低い生存率と関連している。TCGAのがん患者を、RNAseq解析によって測定された腫瘍のVGLL1発現に従って3つの群に層別化した。 Kaplan-Meier 曲線は、(図12A)胃腺癌患者

50

(> 10 TPMで最も短い全生存期間が示され、 < 1.5で最も長い全生存期間が示された)、 (図12B) 乳癌患者 (> 50 TPMで最も短い全生存期間が示され、 < 1.5で最も長い全生存期間が示された)、 (図12C) 卵巣漿液性腺癌患者および (図12D) 膀胱尿路上皮癌患者についての各群の全生存期間 (OS) を示す。P値は、最も低いVGLL1発現を有する群と最も高いVGLL1発現を有する群のOSを比較したログランク有意性検定の結果を示す。

【図13】図13A~13B: 複数の正常ドナーのPBMCからのHLA-A*0101拘束性VGLL1抗原特異的CTLの作製。(図13A) 2例の健常ドナーのPBMCからのVGLL1特異的CD8 T細胞の誘導。HLA-A*0101発現ドナーのPBMCを、LSELETPGKY (SEQ ID NO:93) ペプチドパルス樹状細胞を用いて2週間かけて2回刺激した。VGLL1四量体陽性CD8⁺ T細胞をARIAソーターによって選別し (上パネル)、選別されたT細胞を、標準的な急増大プロトコル (REP) を用いて増大させた。(図13B) 増大したVGLL1特異的CTLのTCRレパートリー解析を、24種類の異なる特異性に対応するV抗体を用いて行なった。

10

【図14】PDAC患者MP015はVGLL1-CTL療法の前ではVGLL1抗原発現の低下を示した。PDAC患者MP015の肺腫瘍転移のRNAseq解析により、2013年11月から2015年12月の間でのVGLL1転写物発現の低下が明らかになった。

【図15】フローサイトメトリーにより標的細胞株において確認されたHLA-A*0101表面発現。この試験で使用した腫瘍細胞株および正常初代細胞はすべて、フルオロフォア標識HLA-A*0101特異的mAbで染色し、フローサイトメトリーによって解析して天然の内在性HLA-A*0101の表面発現 (灰色のヒストグラム) を確認した後、VGLL1特異的CTLアッセイの標的として使用した。5つの腫瘍細胞株はHLA-A*0101を発現するように、レンチウイルス発現ベクターを用いて形質導入された。

20

【図16】VGLL1-CTL殺作用はHLAクラスI特異的抗体によってブロックされる。増大したVGLL1特異的CD8⁺ T細胞をHLA-A*0101陽性PDAC腫瘍細胞株PANC10.05とともに標準的な⁵¹Cr放出アッセイにおいて共培養し、異なるエフェクター対標的 (E:T) 細胞比での細胞傷害活性を測定した。HLAクラスIブロック抗体W6/32の添加によってVGLL1-CTL殺作用が大幅に低下し、抗腫瘍CTL活性はHLAクラスI拘束性であることが示された。

【図17】TCR発現T細胞は、ペプチドでパルス処理されたMe1888HLAA1細胞に効率的に殺作用を奏し得る。PBMCに、ペプチドでパルス処理されたMe1888HLAA1細胞を標的とするためのVGLL1 TCRを形質導入した。

30

【図18】クローニングされたVGLL1 TCRは内因性発現抗原を認識することができる。Me1888A1細胞はHLA⁺VGLL1⁻であり、Panc細胞はHLAA1⁺VGLL1⁺である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

例示的な態様の説明

細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) ベースのがん免疫療法は、腫瘍関連抗原 (TAA) を標的とすることによる臨床的退縮の誘導に対する大きな有望性が示されている。膵管腺癌 (PDAC) のTAAの展望を開くため、35人のPDAC患者の腫瘍検体由来のHLAクラスI結合ペプチドのタンデム質量分析による解析を行なった。これにより、複数種類の腫瘍型で過剰発現を示し、正常な必須組織では低転写物発現または転写物発現の非存在を示す新規な推定TAAである、共転写活性化因子であるVestigial様1 (VGLL1) 由来の共通HLA-A*0101拘束性ペプチドの同定がもたらされた。男性PDAC患者の血液からVGLL1特異的CTLを単離して増大させると、PDAC由来のものだけでなく膀胱がん、卵巣がん、胃がん、肺がん、および基底細胞様乳がん由来するものの大多数のHLA-A*0101同種異系腫瘍細胞株を抗原特異的様式で認識して死滅させる能力が示された。遺伝子発現プロファイリングにより、VGLL1は、複数種類の異なる型のがんを有する患者のための免疫療法用TAA標的を構成している可能性があるユニークな一群のがん-胎盤抗原 (cancer-placenta antigen) (CPA) のメンバーであることが明らかになった。本研究により、VGL

40

50

L1は、その全体が本明細書に組み入れられる国際特許公報番号WO2018/067869に記載のような膵臓溶離液由来の腫瘍関連抗原として同定された。

【0022】

このようなペプチドエピトープを使用し、膵臓患者の末梢血単核細胞（PBMC）から、HLA適合同種異系腫瘍細胞株上の内因性提示された抗原を認識して腫瘍細胞殺作用をもたらす抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）を作製した。このような抗原特異的CTL由来のT細胞受容体（TCR）をクローニングし、シーケンシングした。これは、種々の具体化においてがん患者のがん、例えば膵臓腫瘍、卵巣腫瘍、胃の腫瘍、および乳房腫瘍を標的とするための強力なツールとなり得る。したがって、本明細書において提供されるこのようなVGLL1特異的TCRは、固形がん（例えば、膵臓がん、卵巣がん、胃がん、および乳がん）を標的とするために使用され得る。

10

【0023】

したがって、本開示により、VGLL1、例えばVGLL1ペプチドエピトープ（LSELETPGKY:SEQ ID NO:93）に特異的に結合するTCR（例えば、SEQ ID NO:1~92）を提供する。また、本開示により、このようなTCRをコードしているヌクレオチド配列、ナイーブT細胞を改変してVGLL1特異的T細胞を作製するために使用され得る前記ヌクレオチド配列を含む発現ベクターを提供する。本開示により、悪性細胞がVGLL1抗原を発現するがんの患者、例えばHLA-A*0101陽性がん患者に対する治療、例えば養子細胞療法のためのVGLL1特異的T細胞の使用をさらに提供する。本明細書において提供される抗原特異的T細胞、例えばCTLは固形がんを標的とするために使用され得る。

20

【0024】

1. 定義

本明細書において使用する場合、「本質的に無含有」とは明記された成分に関して、本明細書において明記された前記成分が、いずれも組成物中に意図的に配合されていない、および/または混入物として、もしくは微量に存在するにすぎないことを意味するために使用する。したがって、組成物のなんらかの故意でない汚染に起因する明記された前記成分の総量は0.05%より充分に下、好ましくは0.01%未満である。最も好ましいのは、明記された前記成分の量が標準的な分析方法を用いて全く検出され得ない組成物である。

【0025】

本明細書においてここで使用する場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」は1つまたは複数(one or more)を意味し得る。1つまたは複数の請求項においてここで使用する場合、「~を含む(comprising)」という語とともに使用されているとき、「1つの(a)」または「1つの(an)」という語は1つまたは1つより多く(one or more than one)を意味し得る。

30

【0026】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、択一選択肢のみを示すこと、または択一選択肢が相互に排他的であることを明示していない限り、「および/または」を意味するために使用しているが、本開示では、択一選択肢のみと「および/または」を示す定義をサポートする。本明細書において使用する場合、「別の」は少なくとも第2の、またはそれより多くを意味し得る。

40

【0027】

用語「本質的に」は、方法または組成物が、明記された工程または材料ならびに前記方法および組成物の基本的かつ新規な特徴に実質的に影響しないもののみを含むと理解されたい。

【0028】

本明細書において使用する場合、明記された物質または材料を「実質的に無含有」である組成物または培地は 30%、 20%、 15%、 より好ましくは 10%、 さらにより好ましくは 5%または最も好ましくは 1%の前記物質または材料を含む。

【0029】

用語「実質的に」または「およそ」は、本明細書において使用する場合、関連する基本

50

的機能の変化をもたらすことなく許容範囲で変化し得る任意の定量的比較、値、測定値、または他の表示を修飾するために適用され得る。

【0030】

用語「約」は一般に、記載の値を測定するための標準的な分析手法を用いて測定したとき記載の値の標準偏差の範囲内であることを意味する。また、この用語は、記載の値のプラスかマイナス5%と示すことによって使用される場合もあり得る。

【0031】

「処置」および「処置する」は、対象への治療用物質の投与もしくは適用または対象に対して疾患もしくは健康関連状態の治療有益性を得る目的のための措置もしくはモダリティを実施することを示す。例えば、処置はT細胞療法薬の投与を含み得る。

10

【0032】

「対象」および「患者」は、ヒトまたは非ヒト、例えば霊長類、哺乳動物および脊椎動物のいずれかを示す。特定の態様において、対象はヒトである。

【0033】

用語「治療有益性」または「治療上有効な」が使用されている場合、本明細書全体を通して、本病態の医療処置に対する対象のウェルビーイングを促進または向上させる任意のものを示す。これは、非限定的に、疾患の徴候または症状の頻度または重症度の低減を含む。例えば、がんの処置は、例えば、腫瘍サイズの縮小、腫瘍浸潤性の低減、がんの成長速度の低下または転移の予防を伴い得る。また、がんの処置は、がんを有する対象の生存期間の延長を示す場合もあり得る。

20

【0034】

「抗がん」剤は、例えば、がん細胞の殺作用を促進させること、がん細胞にアポトーシスを誘導すること、がん細胞の成長速度を低下させること、転移の発生もしくは数を低減させること、腫瘍サイズを縮小させること、腫瘍の成長を阻害すること、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給を低減させること、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答を促すこと、がんの進行を抑制もしくは阻害すること、またはがんを有する対象の寿命を延ばすことによって対象のがん細胞/腫瘍に悪影響を及ぼすことができるものである。

【0035】

語句「薬学的または薬理的に許容される」とは、分子実体および組成物が、必要に応じて動物、例えばヒトに投与されたとき有害な、アレルギー性の、または他の都合の悪い反応をもたらさないことを示す。抗体または追加の活性成分を含む薬学的組成物の調製は、本開示に鑑みると当業者にわかるであろう。さらに、動物（例えば、ヒト）への投与のためには、調製物は、FDAのOffice of Biological Standardが求める滅菌性、ピロジェン性（pyrogenicity）、一般的安全性および純度の基準を満たすべきであることは理解されよう。

30

【0036】

本明細書において使用する場合、「薬学的に許容される担体」は、当業者であればわかるであろう任意のあらゆる水性溶媒（例えば、水、アルコール性/水性の溶液、生理食塩水溶液、非経口用ビヒクル、例えば塩化ナトリウム、リンゲルデキストロース液など）、非水性溶媒（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油および注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチル）、分散媒、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例えば、抗菌剤または抗真菌剤、酸化防止剤、キレート剤および不活性ガス）、等張剤、吸収遅延剤、塩、薬物、薬物安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、香味剤、色素、体液および栄養の補給剤、かかる同様の物質ならびにそれらの組合せを包含する。薬学的組成物中の種々の成分のpHおよび厳密な濃度は周知のパラメータに応じて調整される。

40

【0037】

用語「単位用量」または「投薬量」は、対象における使用に適した物理的に独立した単位を示し、各単位は、その投与、すなわち適切な経路および処置レジメンに付随して上記に論考した所望の応答がもたらされるように計算された所定量の治療用組成物を含む。投

50

与される量は、処置の回数および単位用量の両方に応じて、所望される効果に依存する。患者または対象に投与される本態様の組成物の投薬量の実際の量は、身体的要素および生理学的要素、例えば対象の体重、年齢、健康状態および性別、処置される疾患の型、疾患浸透の程度、以前または現在の治療介入、患者の突発性疾患、投与経路ならびに具体的な治療用物質の効力、安定性および毒性によって決定され得る。また、例えば、用量は、投与1回あたり約1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ ~ 約1000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ (かかるこの範囲は介在用量を含む) またはそれより多く、およびこの範囲内で誘導可能な任意の範囲を含み得る。本明細書に示した数値から誘導可能な範囲の非限定的な例において、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ ~ 約100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、約5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ ~ 約500 $\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ などの用量が投与され得る。投与を担う実行者が、任意の事象において、組成物中の1つまたは複数の活性成分の濃度および個々の対象に対する1つまたは複数の適切な用量を決定する。いくつかの態様において、輸注される抗原特異的T細胞の投薬量は約1億 ~ 約300億個の細胞、例えば100億、150億、または200億個の細胞を含み得る。

10

【0038】

用語「腫瘍関連抗原」、「腫瘍抗原」および「がん細胞抗原」は本明細書において互換的に使用される。各場合において、前記用語は、がん細胞によって特異的または優先的に発現されるタンパク質、糖タンパク質または糖鎖を示す。

【0039】

用語「キメラ抗原受容体(CAR)」は、本明細書において使用する場合、例えば人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体またはキメラ免疫受容体を示し得、特定の免疫エフェクター細胞上に人工特異性部がグラフトされた操作された受容体を包含し得る。CARは、T細胞に対してモノクローナル抗体の特異性を付与し、それにより、例えば養子細胞療法における使用のための大量数の特異的T細胞が作製されることを可能にするために使用され得る。特定の態様において、CARは、前記細胞の特異性を例えば腫瘍関連抗原に指向する。いくつかの態様において、CARは細胞内活性化ドメインと、膜貫通ドメインと、腫瘍関連抗原結合領域を含む細胞外ドメインとを含む。特定の局面において、CARは、CD3 に融合されたモノクローナル抗体に由来する単鎖可変領域フラグメント(scFv)膜貫通ドメインおよびエンドドメインの融合体を含む。他のCARデザインの特異性は、受容体のリガンド(例えば、ペプチド)またはパターン認識受容体、例えばデクチンに由来し得る。特定の場において、活性化誘導性細胞死が低減されるように抗原認識ドメインのスペーシングが変更され得る。特定の場において、CARは追加の共刺激シグナル伝達のためのドメイン、例えばCD3、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10および/またはOX40を含む。いくつかの場において、分子、例えば共刺激分子、イメージングのための(例えば、陽電子放出断層撮影のための)レポーター遺伝子、プロドラッグが添加されるとT細胞を条件付きで除去する遺伝子産物、ホーミング受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカインおよびサイトカイン受容体がCARとともに共発現され得る。

20

30

【0040】

ポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド領域(またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域)は、別の配列と特定のパーセンテージ(例えば、80%、85%、90%、または95%)の「配列同一性」または「相同性」を有し、これは、アラインメントしたとき、2つの配列の比較において前記パーセンテージの塩基(またはアミノ酸)が同じであることを意味する。このアラインメントおよび相同性または配列同一性のパーセントは、当技術分野において公知のソフトウェアプログラム、例えばCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M.Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30, section 7.7.18, 表7.7.1に記載のものを用いて決定され得る。好ましくは、アラインメントではデフォルトパラメータが使用される。好ましいアラインメントプログラムはBLASTであり、デフォルトパラメータが使用される。特に、好ましいプログラムはBLAST NおよびBLASTPであり、以下のデフォルトパラメータ: 遺伝コード = 標準; フィルター = なし; 鎖 = 両方; カットオフ = 60; 待機時間(expect) = 10; 行列 = BLOSUM62; Descri

40

50

ptions = 50配列;ソート (sort by) = HIGH SCORE;Databases = 重複なし、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIRが使用される。

【 0 0 4 1 】

II. VGLL1 TCRの方法および組成物

いくつかの態様において、本開示によりVGLL1特異的TCRを提供する。前記TCRはSEQ ID NO:16~19、39~41、62~64、もしくは86~87の鎖のCDRおよび/またはSEQ ID NO:21~23、44~46、67~69、もしくは90~92の鎖のCDRを含み得る。前記TCRはSEQ ID NO:15、38、61、もしくは84との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性もしくは類似性を有する可変鎖および/またはSEQ ID NO:20、43、66、もしくは89との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性もしくは類似性を有する可変鎖を含み得る。前記TCRはSEQ ID NO:13、36、59、または82との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を含み得る。

10

【 0 0 4 2 】

また、本明細書において、本明細書において提供されるVGLL1 TCRの鎖および/または鎖をコードしているポリヌクレオチドを提供する。本TCRをコードしているポリヌクレオチドはSEQ ID NO:4~6、27~29、50~52、もしくは73~75の鎖のCDRおよび/またはSEQ ID NO:10~12、33~35、56~58、もしくは79~81の鎖のCDRを含み得る。前記TCRは、SEQ ID NO:1、24、47、もしくは70との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性もしくは類似性を有する鎖および/またはSEQ ID NO:7、30、53、もしくは76との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性もしくは類似性を有する鎖にコードされ得る。前記TCRは、SEQ ID NO:3、26、49、もしくは72との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性もしくは類似性を有する可変鎖および/またはSEQ ID NO:9、32、55、もしくは78との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性もしくは類似性を有する可変鎖にコードされ得る。

20

30

【 0 0 4 3 】

本TCRの抗原結合領域はキメラ抗原受容体 (CAR) 内に、抗原結合領域を含む細胞外ドメインとして含められ得る。前記TCRにより、養子細胞移入療法に使用され得る細胞 (例えば、自己由来細胞または同種異系細胞) がトランスフェクトされ得る。いくつかの態様において、CARは免疫原性を低減させるためにヒト化される (hCAR)。

【 0 0 4 4 】

VGLL1 TCRの配列を以下に示す。

40

50

VGLL1 TCR #1 TRAV19*01 J56*01/ TRBV1 5-6*01 J1-1 α 鎖

TCTAGACCCGCATGGGTCGACGCCACCATGAACATGCTGACTGCCAGCCTGTTGAGGGC
 AGTCATAGCCTCCATCTGTGTTGTATCCAGCATGGCTCAGAAGGTAAGTCAAGCGCAGAC
 TGAAATTTCTGTGGTGGAGAAGGAGGATGTGACCTGGACTGTGTGTATGAAACCCGTG
 ATACTACTTATTACTTATTCTGGTACAAGCAACCACCAAGTGGAGAATTGGTTTTCTTAT
 TCGTCGGAACCTTTTTGATGAGCAAAAATGAAATAAGTGGTCGGTATTCTTGGAACCTCCA
 GAAATCCACCAGTTCCTTCAACTTCACCATCACAGCCTCACAAGTCGTGGACTCAGCAGT
 ATACTTCTGTGCTCTGAGTCCTGGAGCCAATAGTAAGCTGACATTTGGAAAAGGAATAAC
 TCTGAGTGTTAGACCAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTC
 TAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAATGTGTC
 ACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACATGAGGTCTA
 TGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCA
 AACGCCTTCAACAACAGCATTATTCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGAAAGTTCC
 TGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAAAA
 CCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTAATCTGCTCAT
 GACGCTGCGGCTGTGGTCCAGC (SEQ ID NO:1)

10

VGLL1 TCR #1 α 鎖シグナルペプチド

ATGAACATGCTGACTGCCAGCCTGTTGAGGGCAGTCATAGCCTCCATCTGTGTTG
 TATCCAGCATGGCT (SEQ ID NO:2)

VGLL1 TCR #1 α 鎖V領域

CAGAAGGTAAGTCAAGCGCAGACTGAAATTTCTGTGGTGGAGAAGGAGGATGTG
 ACCTTGGACTGTGTGTATGAAACCCGTGATACTACTTATTACTTATTCTGGTACAA
 GCAACCACCAAGTGGAGAATTGGTTTTCTTATTTCGTCGGAACCTTTTTGATGAG
 CAAAATGAAATAAGTGGTCGGTATTCTTGGAACCTCCAGAAATCCACCAGTTCCT
 TCAACTTCACCATCACAGCCTCACAAGTCGTGGACTCAGCAGTATACTTCTGTGC
 TCTGAGTCCTGGAGCCAATAGTAAGCTGACATTTGGAAAAGGAATAACTCTGAG
 TGTTAGACCAG (SEQ ID NO:3)

20

VGLL1 TCR #1 α 鎖 CDR1

ACCCGTGATACTACTTATTAC (SEQ ID NO:4)

VGLL1 TCR #1 α 鎖 CDR2

CGGAACCTTTTTGATGAGCAAAAAT (SEQ ID NO:5)

30

VGLL1 TCR #1 α 鎖 CDR3

TGTGCTCTGAGTCCTGGAGCCAATAGTAAGCTGACATTT (SEQ ID NO:6)

VGLL1 TCR #1 β 鎖

ATGGGCCCCGGGCTCCTCTGCTGGGCACTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCTTAG
 TGGACGCTGGAGTCACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAACGAGAGGACAGC
 AAGTACTCTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCCTGGTACCA
 ACAGGCCCTGGGTCAGGGGCCCCAGTTTATCTTTTCAGTATTATGAGGAGGAAGA
 GAGACAGAGAGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAGTTCCTAACTAT
 AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCCTTGTGCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCT

40

50

GTGCCAGCAGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCA
 GACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTT
 TGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCT
 GGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAA
 GGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGC
 CCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC
 TGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGG
 AGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCG
 CCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTTACCTCGGTGTCCTACCAGCAAG
 GGGTCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCCTGCTAGGGAAGGCCACCCTGTA
 TGCTGTGCTGGTCAGCGCCCTTGTGTTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTC
 TGACTCGAGAAGCTTGCGGCCGCGGATCCGATAAAATAA (SEQ ID NO:7)

10

VGLL1 TCR #1 β 鎖シグナルペプチド

ATGGGCCCGGGCTCCTCTGCTGGGCACTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCTTAG
 TGGACGCT (SEQ ID NO:8)

VGLL1 TCR #1 β 鎖V領域

GGAGTCACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAAACGAGAGGACAGCAAGTGACT
 CTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCTTGGTACCAACAGGCCC
 TGGGTACAGGGGCCCCAGTTTATCTTTCAGTATTATGAGGAGGAAGAGAGACAGA
 GAGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAGTTCCCTAACTATAGCTCTGA
 GCTGAATGTGAACGCCTTGTGCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCTGTGCCAGC
 AGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCACA
 GTTGTAG (SEQ ID NO:9)

20

VGLL1 TCR #1 β 鎖 CDR1

TCTGGGCATGACACT (SEQ ID NO:10)

VGLL1 TCR #1 β 鎖 CDR2

TATTATGAGGAGGAAGAG (SEQ ID NO:11)

VGLL1 TCR #1 β 鎖 CDR3

TGTGCCAGCAGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTT (SEQ ID NO:12)

30

VGLL1 TCR #1 アミノ酸配列

MNMLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDCVYETRDTTYLLF
 WYKQPPSGELVFLIRNRSFDEQNEISGRYSWNFQKSTSSFNFTITASQVVDSAVYFCA
 LSPGANSKLTFGKGITLSVRPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS
 KSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSC
 DVKLVKESFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSRSGSATN
 FSLLKQAGDVEENPGMPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPHLLIKTRGQVTL
 RCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGNFPDRFSGHQFPNYSSSELNV
 NALLLGDSALYLCASSVGTGITEAFFGQGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISH
 TQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSR

40

50

LRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT
SVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF (SEQ ID NO:13)

VGLL1 TCR #1 α 鎖シグナルペプチド
MNMLTASLLRAVIASICVVSSM (SEQ ID NO:14)

VGLL1 TCR #1 α 鎖V領域
AQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDCVYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDEQ
NEISGRYSWNFKSTSSFNFTITASQVVDSAVYFCALSPGANSKLTFGKGITLSVRPDI
Q (SEQ ID NO:15)

VGLL1 TCR #1 α 鎖 CDR1
TRDTTYY (SEQ ID NO:16)

VGLL1 TCR #1 α 鎖 CDR2
RNSFDEQN (SEQ ID NO:17)

VGLL1 TCR #1 α 鎖 CDR3
CALSPGANSKLT (SEQ ID NO:18)

VGLL1 TCR #1 β 鎖シグナルペプチド
MGPGLLCWALLCLLG (SEQ ID NO:19)

VGLL1 TCR #1 β 鎖V領域
AGLVDAGVTQSPHLLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYYEE
EERQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSVGTGITEAFFGQGTRL
TVVE (SEQ ID NO:20)

VGLL1 TCR #1 β 鎖 CDR1
SGHDT (SEQ ID NO:21)

VGLL1 TCR #1 β 鎖 CDR2
YEEEE (SEQ ID NO:22)

VGLL1 TCR #1 β 鎖 CDR3
CASSVGTGITEAFF (SEQ ID NO:23)

VGLL1 TCR#2 TRAV13-1*02 J10/ TRBV1 5-6*01 J1-1 α 鎖

TCTAGACCGCCATGGGTCCGACGCCACCATGACATCCATTCGAGCTGTATTTATAT
TCCTGTGGCTGCAGCTGGACTTGGTGAATGGAGAGAATGTGGAGCAGCATCCTTC
AACCTGAGTGTCCAGGAGGGAGACAGCGCTGTTATCAAGTGTACTTATTCAGA
CAGTGCCTCAAACACTTCCCTTGGTATAAGCAAGAACTTGAAAAAGACCTCA
GCTTATTATAGACATTCGTTCAAATGTGGCGAAAAGAAAGACCAACGAATTGC
TGTTACATTGAACAAGACAGCCAAACATTTCTCCCTGCACATCACAGAGACCCAA
CCTGAAGACTCGGCTGTCTACTTCTGTGCAGCAAGGGGACTCACGGGAGGAGGA
AACAAACTCACCTTTGGGACAGGCACTCAGCTAAAAGTGGAACCTCAATATCCAG
AACCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTG
TCTGCCTATTCACCGATTTTATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTC

10

20

30

40

50

TGATGTGTATATCACGGACAAAACACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAG
 AGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCC
 TTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTTCT
 GTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTC
 AAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAA
 TCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGC (SEQ ID NO:24)

VGLL1 TCR #2 α 鎖シグナルペプチド

ATGACATCCATTTCGAGCTGTATTTATATTCTGTGGCTGCAGCTGGACTTGGTGA
 AT (SEQ ID NO:25)

10

VGLL1 TCR #2 α 鎖V領域

GGAGAGAATGTGGAGCAGCATCCTTCAACCCTGAGTGTCCAGGAGGGAGACAGC
 GCTGTTATCAAGTGTACTTATTCAGACAGTGCCTCAAACCTACTTCCCTTGGTATA
 AGCAAGAACTTGGAAAAAGACCTCAGCTTATTATAGACATTCGTTCAAATGTGG
 GCGAAAAGAAAGACCAACGAATTGCTGTTACATTGAACAAGACAGCCAAACATT
 TCTCCCTGCACATCACAGAGACCCAACCTGAAGACTCGGCTGTCTACTTCTGTGC
 AGCAAGGGGACTCACGGGAGGAGGAAACAACTCACCTTTGGGACAGGCACCTC
 AGCTAAAAGTGGAACCTCA (SEQ ID NO:26)

VGLL1 TCR #2 α 鎖 CDR1

GACAGTGCCTCAAACCTAC (SEQ ID NO:27)

20

VGLL1 TCR #2 α 鎖 CDR2

ATTCGTTCAAATGTGGGCGAA (SEQ ID NO:28)

VGLL1 TCR #2 α 鎖 CDR3

TGTGCAGCAAGGGGACTCACGGGAGGAGGAAACAACTCACCTTT (SEQ ID
 NO:29)

VGLL1 TCR #2 β 鎖

ATGGGCCCCGGGCTCCTCTGCTGGGCACTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCTTAG
 TGGACGCTGGAGTACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAACGAGAGGACAGC
 AAGTGA CTCTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCTGTTACCA
 ACAGGCCCTGGGTCAGGGGCCCCAGTTTATCTTTCAGTATTATGAGGAGGAAGA
 GAGACAGAGAGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAGTTCCTAACTAT
 AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCCTTGTGCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCT
 GTGCCAGCAGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCA
 GACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTT
 TGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCT
 GGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAA
 GGAGGTGCACAGTGGGGTACGACACGGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGC
 CCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC
 TGGCAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGG
 AGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCG
 CCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTACCTCGGTGTCCTACCAGCAAG

30

40

50

GGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCCTGCTAGGGAAGGCCACCCTGTA
TGCTGTGCTGGTCAGCGCCCTTGTGTTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTC
TGACTCGAGAAGCTTGCGGCCGCGGATCCGATAA (SEQ ID NO:30)

VGLL1 TCR #2 β 鎖シグナルペプチド

ATGGGCCCCGGGCTCCTCTGCTGGGCACTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCTTAG
TGGACGCT (SEQ ID NO:31)

VGLL1 TCR #2 β 鎖V領域

GGAGTACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAAACGAGAGGACAGCAAGTGACT
CTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCTGTTACCAACAGGCC
TGGGTACAGGGGCCCCAGTTTATCTTTCAGTATTATGAGGAGGAAGAGACAGA
GAGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAGTTCCCTAACTATAGCTCTGA
GCTGAATGTGAACGCCTTGTTGCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCTGTGCCAGC
AGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCACA
GTTGTAG (SEQ ID NO:32)

10

VGLL1 TCR #2 β 鎖 CDR1

TCTGGGCATGACACT (SEQ ID NO:33)

VGLL1 TCR #2 β 鎖 CDR2

TATTATGAGGAGGAAGAG (SEQ ID NO:34)

20

VGLL1 TCR #2 β 鎖 CDR3

TGTGCCAGCAGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTCTTT (SEQ ID NO:35)

VGLL1 TCR #2 アミノ酸配列

MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQ
ELGKRPQLIIDIRSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFLHITETQPEDSAVYFCAARGLT
GGGNKLTFGTGTQLKVELNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD
SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDV
KLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSGGATNFSL
LKQAGDVEENPGPMGPGLLCWALLCLLGLVLDAGVTQSPHLLIKTRGQQVTLRCS
PKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNAL
LLGDSALYLCASSVGTGITEAFFGQGTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQK
ATLVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV
SATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVS
YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF (SEQ ID NO:36)

30

VGLL1 TCR #2 α 鎖シグナルペプチド

MTSIRAVFIFLWLQLDLVNG (SEQ ID NO:37)

VGLL1 TCR #2 α 鎖V領域

ENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGEKKD
QRIAVTLNKTAKHFLHITETQPEDSAVYFCAARGLTGGGNKLTFGTGTQLKVELNI
Q (SEQ ID NO:38)

40

VGLL1 TCR #2 α 鎖 CDR1

DSASNY (SEQ ID NO:39)

VGLL1 TCR #2 α 鎖 CDR2

IRSNVGE (SEQ ID NO:40)

VGLL1 TCR #2 α 鎖 CDR3

CAARGLTGGGNKLT (SEQ ID NO:41)

VGLL1 TCR #2 β 鎖シグナルペプチド

MGPGLLCWALLCLLGLVDA (SEQ ID NO:42) 10

VGLL1 TCR #2 β 鎖V領域

GVTQSPHLIKTRGQQVTLRCSKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGN
 FPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDALYLCASSVGTGITEAFFGQGTRRLTVVE
 (SEQ ID NO:43)

VGLL1 TCR #2 β 鎖 CDR1

SGHDT (SEQ ID NO:44)

VGLL1 TCR #2 β 鎖 CDR2

YEEEE (SEQ ID NO:45) 20

VGLL1 TCR #2 β 鎖 CDR3

CASSVGTGITEAFF (SEQ ID NO:46)

VGLL1 TCR#3 TRAV13-1*02 J1301/ TRBV1 5-6*01 J1-1 α 鎖

TCTAGACCGCCATGGGTCGACGCCACCATGACATCCATTCGAGCTGTATTTATAT
 TCCTGTGGCTGCAGCTGGACTTGGTGAATGGAGAGAATGTGGAGCAGCATCCTTC
 AACCTGAGTGTCCAGGAGGGAGACAGCGCTGTTATCAAGTGTACTTATTCAGA
 CAGTGCCTCAAACACTTCCCTTGGTATAAAGCAAGAACTTGGAAAAAGACCTCA
 GCTTATTATAGACATTCGTTCAAATGTGGGCGAAAAGAAAAGACCAACGAATTGC
 TGTTACATTGAACAAGACAGCCAAACATTTCTCCCTGCACATCACAGAGACCCAA
 CCTGAAGACTCGGCTGTCTACTTCTGTGCAGCAATTCCTAATTCTGGGGGTTACC
 AGAAAGTTACCTTTGGAATTGGAACAAAGCTCCAAGTCATCCCAAATATCCAGA
 ACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGT
 CTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCT
 GATGTGTATATCACAGACAAAACACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAG
 AGCAACAGTGTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCC
 TTCAACAACAGCATTATTCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCAGAAAGTTCTT
 GTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAACTTTC
 AAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTAA
 TCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGC (SEQ ID NO:47)

VGLL1 TCR #3 α 鎖シグナルペプチド

ATGACATCCATTCGAGCTGTATTTATATTCCTGTGGCTGCAGCTGGACTTGGTGA
 AT (SEQ ID NO:48) 40

VGLL1 TCR #3 α 鎖V領域

GGAGAGAATGTGGAGCAGCATCCTTCAACCCTGAGTGTCCAGGAGGGAGACAGC
 GCTGTTATCAAGTGTACTTATTCAGACAGTGCCTCAAACACTTCCCTTGGTATA
 AGCAAGAACTTGGAAAAAGACCTCAGCTTATTATAGACATTCGTTCAAATGTGG
 GCGAAAAGAAAGACCAACGAATTGCTGTTACATTGAACAAGACAGCCAAACATT
 TCTCCCTGCACATCACAGAGACCAACCTGAAGACTCGGCTGTCTACTTCTGTGC
 AGCAATTCCTAATTCTGGGGGTTACCAGAAAGTTACCTTTGGAATTGGAACAAAG
 CTCCAAGTCATCCAAA (SEQ ID NO:49)

VGLL1 TCR #3 α 鎖 CDR1

GACAGTGCCTCAAACACTAC (SEQ ID NO:50)

10

VGLL1 TCR #3 α 鎖 CDR2

ATTCGTTCAAATGTGGGCGAA (SEQ ID NO:51)

VGLL1 TCR #3 α 鎖 CDR3

TGTGCAGCAATTCCTAATTCTGGGGGTTACCAGAAAGTTACCTTT (SEQ ID NO:52)

VGLL1 TCR #3 β 鎖

ATGGGCCCCGGGCTCCTCTGCTGGGCACCTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCTTAG
 TGGACGCTGGAGTCACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAACGAGAGGACAGC
 AAGTGAAGTCTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCTGGTACCA
 ACAGGCCCTGGGTCAGGGGCCAGTTTATCTTTCAGTATTATGAGGAGGAAGA
 GAGACAGAGAGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAGTTCCTAACTAT
 AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCCTTGTGCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCT
 GTGCCAGCAGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCA
 GACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTT
 TGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCT
 GGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAA
 GGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGC
 CCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC
 TGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGG
 AGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCG
 CCGAGGCCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTTACCTCGGTGTCCTACCAGCAAG
 GGGTCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCCTGCTAGGGAAGGCCACCCTGTA
 TGCTGTGCTGGTCAGCGCCCTTGTGTTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTC
 TGACTCGAGAAGCTTGGCGCCGCGGATCCGATAAA (SEQ ID NO:53)

20

30

VGLL1 TCR #3 β 鎖シグナルペプチド

ATGGGCCCCGGGCTCCTCTGCTGGGCACCTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCTTAG
 TGGACGCT (SEQ ID NO:54)

VGLL1 TCR #3 β 鎖V領域

GGAGTCACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAACGAGAGGACAGCAAGTGAAGT
 CTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCTGGTACCAACAGGCC
 TGGGTCAGGGGCCAGTTTATCTTTCAGTATTATGAGGAGGAAGAGAGACAGA
 GAGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAGTTCCTAACTATAGCTCTGA
 GCTGAATGTGAACGCCTTGTGCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCTGTGCCAGC
 AGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCACA
 GTTGTAG (SEQ ID NO:55)

40

50

VGLL1 TCR #3 β 鎖 CDR1
TCTGGGCATGACACT (SEQ ID NO:56)

VGLL1 TCR #3 β 鎖 CDR2
TATTATGAGGAGGAAGAG (SEQ ID NO:57)

VGLL1 TCR #3 β 鎖 CDR3
TGTGCCAGCAGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTT (SEQ ID NO:58)

VGLL1 TCR #3 アミノ酸配列 10
MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQ
ELGKRPQLIIDIRSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAAIPNSG
GYQKVTFGIGTKLQVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSD
VYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKL
VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTRLWSSRAKRSRSGGATNFSLLK
QAGDVEENPGMPGGLLCWALLCCLLGLVDAVGTQSPHLLIKTRGQQVTLRCSFK
SGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLL
GDSALYLCASSVGTGITEAFFGQGTRLTVVEDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKAT
LVCLATGFFPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA
TFWQNPRNHFRCCVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQ
QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRDKDF (SEQ ID NO:59)

VGLL1 TCR #3 α 鎖シグナルペプチド 20
MTSIRAVFIFLWLQLDLVNG (SEQ ID NO:60)

VGLL1 TCR #3 α 鎖V領域
ENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGEKKD
QRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAAIPNSGGYQKVTFGIGTKLQVIPNI
(SEQ ID NO:61)

VGLL1 TCR #3 α 鎖 CDR1
DSASNY (SEQ ID NO:62)

VGLL1 TCR #3 α 鎖 CDR2
IRSNVGE (SEQ ID NO:63)

VGLL1 TCR #3 α 鎖 CDR3 30
CAAIPNSGGYQKVTF (SEQ ID NO:64)

VGLL1 TCR #3 β 鎖シグナルペプチド
MGPGLLCWALLCCLLGLVDA (SEQ ID NO:65)

VGLL1 TCR #3 β 鎖V領域
GVTQSPHLLIKTRGQQVTLRCSFKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGN
FPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLL GDSALYLCASSVGTGITEAFFGQGTRLTVV (SEQ
ID NO:66)

VGLL1 TCR #3 β 鎖 CDR1 40
SGHDT (SEQ ID NO:67)

VGLL1 TCR #3 β鎖 CDR2

YYEEE (SEQ ID NO:68)

VGLL1 TCR #3 β鎖 CDR3

CASSVGTGITEAFF (SEQ ID NO:69)

VGLL1 TCR #4 TRAV23 J12/TRBV5-6*01 FJ1-1*01 F α鎖

TCTAGACCGCCATGGGTGACGCCACCATGGACAAGATCTTAGGAGCATCATTTT
 TAGTTCTGTGGCTTCAACTATGCTGGGTGAGTGGCCAACAGAAGGAGAAAAGTG
 ACCAGCAGCAGGTGAAACAAAGTCCTCAATCTTTGATAGTCCAGAAAGGAGGGA
 TTTCAATTATAAACTGTGCTTATGAGAACACTGCGTTTGACTACTTTCCATGGTAC
 CAACAATTCCCTGGGAAAGGCCCTGCATTATTGATAGCCATACGTCCAGATGTGA
 GTGAAAAGAAAGAAGGAAGATTACAATCTCCTTCAATAAAAGTGCCAAGCAGT
 TCTCATTGCATATCATGGATTCCCAGCCTGGGAGACTCAGCCACCTACTTCTGTGC
 AGCCGTAAGATACAACCTCAACAAATTTACTTTGGATCTGGGACCAAACCTCAAT
 GTAAAACCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCT
 AAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATG
 TGTCAAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGCTAGACAT
 GAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGA
 CTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTC
 CCCAGCCCAGAAAGTTCTGTGATGTCAAGCTGGTTCGAGAAAAGCTTTGAAACA
 GATACGAACCTAAACTTTCAAACCTGTCAAGTATTGGGTTCCGAATCCTCCTCC
 TGAAAGTGGCCGGGTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGC (SEQ
 ID NO:70)

10

20

VGLL1 TCR #4 α鎖シグナルペプチド

ATGGACAAGATCTTAGGAGCATCATTTTTAGTTCTGTGGCTTCAACTATGCTGGG
 TGAGTGGC (SEQ ID NO:71)

VGLL1 TCR #4 α鎖V領域

CAACAGAAGGAGAAAAGTGACCAGCAGCAGGTGAAACAAAGTCCTCAATCTTTG
 ATAGTCCAGAAAGGAGGGATTTCAATTATAAACTGTGCTTATGAGAACACTGCGT
 TTGACTACTTTCCATGGTACCAACAATTCCCTGGGAAAGGCCCTGCATTATTGAT
 AGCCATACGTCCAGATGTGAGTGAAAAGAAAGAAGGAAGATTACAATCTCCTT
 CAATAAAAGTGCCAAGCAGTTCTCATTGCATATCATGGATTCCCAGCCTGGAGAC
 TCAGCCACCTACTTCTGTGCAGCCGTAAGATACAACCTTCAACAAATTTACTTTG
 GATCTGGGACCAAACCTCAATGTAACCAA (SEQ ID NO:72)

30

VGLL1 TCR #4 α鎖 CDR1

AACACTGCGTTTGACTAC (SEQ ID NO:73)

VGLL1 TCR #4 α鎖 CDR2

ATACGTCCAGATGTGAGTGAA (SEQ ID NO:74)

VGLL1 TCR #4 α鎖 CDR3

TGTGCAGCCGTAAGATACAACCTTCAACAAATTTACTTT (SEQ ID NO:75)

40

50

VGLL1 TCR #4 β 鎖

ATGGGCCCCGGGCTCCTCTGCTGGGCACTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCTTAG
 TGGACGCTGGAGTCACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAAACGAGAGGACAGC
 AAGTGA CTCTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCTGGTACCA
 ACAGGCCCTGGGTCAGGGGCCCCAGTTTATCTTTAGTATTATGAGGAGGAAGA
 GAGACAGAGAGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAGTTCCTAACTAT
 AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCCTTGTGCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCT
 GTGCCAGCAGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCA
 GACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTT
 TGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCT
 GGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAA
 GGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGC
 CCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTC
 TGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGG
 AGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCG
 CCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTTACCTCGGTGTCCTACCAGCAAG
 GGGTCTGTCTGCCACCATCTCTATGAGATCCTGCTAGGGAAGGCCACCCTGTA
 TGCTGTGCTGGTCAGCGCCCTTGTGTTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTC
 TGACTCGAGAAGCTTGCGGCCGCGGATCCGATAAA (SEQ ID NO:76)

10

VGLL1 TCR #4 β 鎖シグナルペプチド

ATGGGCCCCGGGCTCCTCTGCTGGGCACTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCTTAG
 TGGACGCT (SEQ ID NO:77)

20

VGLL1 TCR #4 β 鎖V領域

GGAGTCACCCAAAGTCCCACACACCTGATCAAAACGAGAGGACAGCAAGTGACT
 CTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCTGGTACCAACAGGCC
 TGGGTCAGGGGCCCCAGTTTATCTTTAGTATTATGAGGAGGAAGAGAGACAGA
 GAGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAGTTCCTAACTATAGCTCTGA
 GCTGAATGTGAACGCCTTGTGCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCTGTGCCAGC
 AGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCACA
 GTTGTAG (SEQ ID NO:78)

30

VGLL1 TCR #4 β 鎖 CDR1

TCTGGGCATGACACT (SEQ ID NO:79)

VGLL1 TCR #4 β 鎖 CDR2

TATTATGAGGAGGAAGAG (SEQ ID NO:80)

VGLL1 TCR #4 β 鎖 CDR3

TGTGCCAGCAGCGTCGGGACAGGTATCACTGAAGCTTTCTTT (SEQ ID NO:81)

VGLL1 TCR #4 アミノ酸配列

MDKILGASFLVLWLQLCWVSGQQKEKSDQQQVKQSPQSLIVQKGGISIINCAYENTA
 FDYFPWYQQFPKGPALLIAIRPDVSEKKEGRFTISFNKSAKQFSLHIMDSQPGDSAT

40

50

YFCAAVRYNFNKIFYFGSGTKLNVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT
 NVSQSKDSVDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFP
 SPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRSG
 SGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGPGLLCWALLCCLLGAGLVDAGVTQSPHLLIKTRG
 QQVTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYYEEEEERQRGNFPDRFSGHQFPNYS
 SELNVNALLLGDSALYLCASSVGTGITEAFFGQGTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSE
 AEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY
 CLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCVQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA
 DCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF (SEQ ID
 NO:82)

10

VGLL1 TCR #4 α 鎖シグナルペプチド
 MDKILGASFLVLWLQLCWVSG (SEQ ID NO:83)

VGLL1 TCR #4 α 鎖V領域
 QQKEKSDQQVKQSPQSLIVQKGGISIINCAYENTAFDYFPWYQQFPGKGPALLIAIR
 PDVSEKKEGRFTISFNKSAKQFSLHIMDSQPGDSATYFCAAVRYNFNKIFYFGSGTKL
 NVKPNIQ (SEQ ID NO:84)

VGLL1 TCR #4 α 鎖 CDR1
 NTAFDY (SEQ ID NO:85)

20

VGLL1 TCR #4 α 鎖 CDR2
 IRPDVSE (SEQ ID NO:86)

VGLL1 TCR #4 α 鎖 CDR3
 CAAVRYNFNKIFYF (SEQ ID NO:87)

VGLL1 TCR #4 β 鎖シグナルペプチド
 MGPGLLCWALLCCLLGAGLVDA (SEQ ID NO:88)

VGLL1 TCR #4 β 鎖V領域
 GVTQSPHLLIKTRGQQVTLRCSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYYEEEEERQRGN
 FPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSVGTGITEAFFGQGTRLTVV (SEQ
 ID NO:89)

30

VGLL1 TCR #4 β 鎖 CDR1
 SGHDT (SEQ ID NO:90)

VGLL1 TCR #4 β 鎖 CDR2
 YEEEE (SEQ ID NO:91)

VGLL1 TCR #4 β 鎖 CDR3
 CASSVGTGITEAFF (SEQ ID NO:92)

40

【 0 0 4 5 】

いくつかの態様において、本開示の宿主細胞、例えばT細胞（例えば、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、T細胞、およびTreg）、NK細胞、インバリアントNK細胞、NKT細胞、間葉系幹細胞（MSC）、または人工多能性幹（iPS）細胞は、抗原受容体、例えば操作されたTCRおよび/またはCARを発現するように遺伝子操作され得る。したがって、本明細書において、本明細書において提供されるVGLL1特異的TCRを発現するように操作された細胞、例えばT細胞、NK細胞、インバリアントNK細胞、NKT細胞、MSCまたはiPS細胞がさらに提供される。例えば、自己由来細胞または同種異系細胞（例えば、臍帯から単離される）は、がん抗原に対する抗原特異性を有するTCRを発現するように改変

50

される。このような非T細胞エフェクター免疫細胞は、TCRとともにCD3分子または前記TCRに連結された、このような細胞においてシグナル伝達を開始させると考えられる他のシグナル伝達ドメインを発現し得る。好適な改変方法は当技術分野において公知である。例えば、前出のSambrook and Ausubelを参照のこと。例えば、前記T細胞は、がん抗原に対する抗原特異性を有するTCRを発現するように、Heemskerk et al. Hum Gene Ther. 19:496-510 (2008) および Johnson et al. Blood 114:535-46 (2009) に記載の形質導入手法を用いて形質導入され得る。

【0046】

いくつかの態様において、抗原特異的細胞は、本明細書において提供されるVGLL1 TCR (例えば、SEQ ID NO:1~92) を使用することによって作製され得る。この方法では、TCRの配列がベクター (例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター) 内に挿入され、これが宿主細胞、例えばT細胞 (例えば、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、T細胞およびTreg)、NK細胞、インバリアントNK細胞、NKT細胞、MSCまたはiPS細胞内に導入され、がん患者に対する養子細胞療法のために使用され得る抗原特異的細胞が作製される。

10

【0047】

操作された免疫細胞は、当業者に公知の多くの十分に確立された任意の遺伝子導入方法を用いて構築され得る。特定の態様において、操作された細胞は、VGLL1特異的TCRをコードしている核酸を導入するのにウイルスベクターベースの遺伝子導入方法を用いて構築される。ウイルスベクターベースの遺伝子導入方法はレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターを含み得る。特定の態様において、操作された細胞は、VGLL1特異的TCRをコードしている核酸を導入するのに非ウイルスベクターベースの遺伝子導入方法を用いて構築される。TCRのためのベクターにより鎖ポリペプチドと鎖ポリペプチドが構成され得、これらはリンカードメインまたはIRES配列によって連結されていてもよい。特定の態様において、非ウイルスベクターベースの遺伝子導入方法は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) および規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) (CRISPR) /CRISPR関連タンパク質9 (Cas9) ヌクレアーゼからなる群より選択される遺伝子編集方法を含む。特定の態様において、非ウイルスベクターベースの遺伝子編集方法は、リポフェクション、ヌクレオフェクション、ピロソーム、リボソーム、ポリカチオンまたは脂質:核酸コンジュゲート、裸のDNA、人工ビリオン、およびDNAの作用物質増強性取込みからなる群より選択されるトランスフェクション方法または形質転換方法を含む。

20

30

【0048】

完全長TCRの α および β (または α および β) 鎖をコードしているRNAのエレクトロポレーションは、レトロウイルスにより形質導入されたTCR鎖と内在性TCR鎖のペアリングによって引き起こされる自己反応性に伴う長年の問題を打開するための代替法として使用され得る。かかる代替的ペアリングが一過性のトランスフェクションストラテジーにおいて起こる場合であっても、導入されたTCRの α 鎖および β 鎖は一過的にした発現されないため、場合によって生成する自己反応性T細胞がこの自己反応性を失うのは通常、ある程度の期間後である。導入されたTCRの α 鎖および β 鎖の発現が減衰すると、正常な自己由来T細胞のみが残る。完全長TCR鎖が安定なレトロウイルスによる形質導入によって導入される場合はそうではなく、導入されたTCR鎖は失われず、患者において定常的な自己反応性の存在が引き起こされる。

40

【0049】

例示的な抗原受容体、例えばCARおよび組換えTCRならびに前記受容体を操作して細胞内に導入するための方法としては、例えば国際特許公報番号WO200014257、同WO2013126726、同WO2012/129514、同WO2014031687、同WO2013/166321、同WO2013/071154、同WO2013/123061 米国特許出願公開第2002131960

50

号、US2013287748、US20130149337、米国特許第:6,451,995号、同第7,446,190号、同第8,252,592号、同第8,339,645号、同第8,398,282号、同第7,446,179号、同第6,410,319号、同第7,070,995号、同第7,265,209号、同第7,354,762号、同第7,446,191号、同第8,324,353号および同第8,479,118号ならびに欧州特許出願公開第2537416号に記載のもの、および/またはSadelain et al., *Cancer Discovery*. 2013 April; 3(4):388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4):e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5):633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2):160-75に記載のものが挙げられる。いくつかの局面において、遺伝子操作された抗原受容体としては、米国特許第:7,446,190号に記載のようなCARおよび国際特許公報番号WO2014055668 A1に記載のものが挙げられる。

10

【0050】

A. T細胞受容体

いくつかの態様において、遺伝子操作された抗原受容体は、組換えTCRおよび/または天然に存在するT細胞からクローニングされたTCRを含む。「T細胞受容体」または「TCR」は、可変 α 鎖および鎖（それぞれ、TCR およびTCR としても公知）または可変鎖および鎖（それぞれ、TCR γ およびTCR としても公知）を含み、かつMHC受容体に結合されている抗原ペプチドに特異的に結合することができる分子を示す。いくつかの態様において、TCRは型である。

【0051】

典型的には、型および型で存在するTCRは一般的に構造的に類似しているが、これらを発現しているT細胞は、相違する解剖学的存在箇所または機能を有し得る。TCRは細胞の表面上に、または可溶性形態でみられ得る。一般的に、TCRはT細胞（またはTリンパ球）の表面上にみられ、そこで一般的には、主要組織適合性複合体（MHC）分子に結合されている抗原の認識を担う。いくつかの態様において、TCRはまた、定常ドメイン、膜貫通ドメインおよび/または短い細胞質テールを含み得る（例えば、Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p.433, 1997参照）。例えば、いくつかの局面において、TCRの各鎖は1つのN末端側免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域およびC末端に短い細胞質テールを有し得る。いくつかの態様において、TCRは、シグナル伝達の媒介に関与するCD3複合体のインバリアントタンパク質と会合する。特に記載のない限り、用語「TCR」は、その機能性のTCR断片も包含していると理解されたい。また、この用語は、インタクトな、または完全長のTCR、例えば型または型のTCRも包含している。

20

30

【0052】

したがって、本明細書における解釈上、TCRに対する言及は、任意のTCRまたは機能性の断片、例えばMHC分子に結合されている特異的抗原性ペプチド、すなわちMHC-ペプチド複合体に結合するTCRの抗原結合部分を含む。TCRの「抗原結合部分」または「抗原結合断片」は、互換的に使用され得、含まれているのはTCRの構造ドメインの一部だが完全なTCRが結合する抗原（例えば、MHC-ペプチド複合体）に結合する分子を示す。いくつかの場合において、抗原結合部分は、特異的MHC-ペプチド複合体に結合するための結合部位を形成するのに十分なTCRの可変ドメイン、例えばTCRの可変 α 鎖および可変鎖を含み、例えば一般的に、この場合、各鎖は3つの相補性決定領域を含む。

40

【0053】

いくつかの態様において、TCR鎖の可変ドメインは会合して免疫グロブリンと同様のループまたは相補性決定領域（CDR）を形成し、これが抗原認識を付与し、TCR分子の結合部位を形成することによってペプチド特異性を決定し、ペプチド特異性を決定する。典型的には、免疫グロブリンと同様、CDRはフレームワーク領域（FR）によって隔離されている（例えば、Jores et al., *PNAS U.S.A.* 87:9138, 1990; Chothia et al., *EMBO J.* 7:3745, 1988; see also Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 27:55, 2003参照）。いくつかの態様において、CDR3は、プロセッシングされた抗原の認識を担

50

う主要CDRであるが、鎖のCDR1もまた抗原性ペプチドのN末端部分と相互作用することが示されており、一方、鎖のCDR1は前記ペプチドのC末端部分と相互作用する。CDR2はMHC分子を認識すると考えられている。いくつかの態様において、鎖の可変領域はさらなる超可変性（HV4）領域を含み得る。

【0054】

いくつかの態様において、TCR鎖は定常ドメインを含む。例えば、免疫グロブリンと同様に、TCR鎖の細胞外部分（例えば、 α 鎖、 β 鎖）は、N末端に可変ドメインである2つの免疫グロブリンドメイン（例えば、 V_{α} または V_{β} ;典型的には、Kabatナンバリング Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.に基づくアミノ酸1~116）および細胞膜に隣接する1つの定常ドメイン（例えば、 α 鎖定常ドメインまたは C_{α} 、典型的には、Kabatに基づくアミノ酸117~259、 β 鎖定常ドメインまたは C_{β} 、典型的には、Kabatに基づくアミノ酸117~295）を含み得る。例えば、いくつかの場合において、2つの鎖によって形成されるTCRの細胞外部分は2つの膜近位定常ドメインと、CDRを含む2つの膜遠位可変ドメインとを含む。TCRドメインの定常ドメインは、システイン残基がジスルフィド結合を形成し、2つの鎖間の連結部を構成している短い連結配列を含む。いくつかの態様において、TCRは鎖および鎖の各々に、TCRが定常ドメイン内に2つのジスルフィド結合を含むような追加のシステイン残基を有し得る。

【0055】

いくつかの態様において、TCR鎖は膜貫通ドメインを含み得る。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは正帯電である。いくつかの場合において、TCR鎖は細胞質テールを含む。いくつかの場合において、その構造により、TCRがCD3などの他の分子と会合することが可能である。例えば、膜貫通領域を有する定常ドメインを含むTCRは、タンパク質を細胞膜にアンカリングし、CD3シグナル伝達装置またはCD3シグナル伝達複合体のインバリアントサブユニットと会合し得る。

【0056】

一般的に、CD3は、哺乳動物では3つの相違する鎖（ ζ 、 η および ϵ ）と鎖を有し得る多タンパク質複合体である。例えば、哺乳動物では、前記複合体はCD3鎖、CD3鎖、2つのCD3鎖およびCD3鎖のホモ二量体を含み得る。CD3 ζ 、CD3 η およびCD3 ϵ 鎖は、単一の免疫グロブリンドメインを含む免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連している細胞表面タンパク質である。CD3 ζ 、CD3 η およびCD3 ϵ 鎖の膜貫通領域は負帯電であり、これは、これらの鎖が正帯電のT細胞受容体鎖と会合することを可能にする特徴である。CD3 ζ 、CD3 η およびCD3 ϵ 鎖の細胞内テールは各々、免疫受容体活性化チロシンモチーフまたはITAMとして公知の単一の保存されたモチーフを含むが、各CD3鎖は3つ有する。一般的に、ITAMはTCR複合体のシグナル伝達能に関与している。このようなアクセサリ分子は負帯電の膜貫通領域を有し、TCRから細胞内へのシグナル伝播において役割を果たす。CD3鎖および鎖はTCRとともに、T細胞受容体複合体として公知のものを形成する。

【0057】

いくつかの態様において、TCRは2つの鎖と（もしくは任意でと）のヘテロ二量体であり得るか、または単鎖TCR構築物であり得る。いくつかの態様において、TCRは、例えば1つまたは複数のジスルフィド結合によって連結された2つの別個の鎖（鎖と鎖または鎖と鎖）を含むヘテロ二量体である。いくつかの態様において、標的抗原（例えば、がん抗原）に対するTCRが同定され、細胞内に導入される。いくつかの態様において、前記TCRをコードしている核酸は、さまざまな供給源から例えば公的に入手可能なTCR DNA配列のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅によって得られ得る。いくつかの態様において、TCRは生物学的供給源、例えば細胞、例えばT細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、T細胞ハイブリドーマまたは他の公的に入手可能な供給源から得られる。いくつかの態様において、T細胞はインビボ単離細胞から得られ得る。いくつかの態様

10

20

30

40

50

において、高親和性T細胞クローンが患者から単離され得、TCRが単離され得る。いくつかの態様において、T細胞は、培養T細胞のハイブリドーマまたはクローンであり得る。いくつかの態様において、標的抗原に対するTCRクローンは、ヒト免疫系遺伝子（例えば、ヒト白血球抗原系またはHLA）を有するように操作されたトランスジェニックマウスにおいて作製されている。例えば、腫瘍抗原（例えば、Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res.15:169-180およびCohen et al. (2005) J Immunol.175:5799-5808参照）を参照のこと。いくつかの態様において、ファージディスプレイが、標的抗原に対するTCRを単離するために使用される（例えば、Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med.14:1390-1395およびLi (2005) Nat Biotechnol.23:349-354参照）。いくつかの態様において、TCRまたはその抗原結合部分は、TCRの配列を知ることにより合成によって作製することができる。

10

【0058】

B. キメラT細胞受容体

いくつかの態様において、操作された抗原受容体としては、CAR、例えば活性化性もしくは刺激性のCAR、共刺激性CAR（WO2014/055668参照）および/または阻害性CAR（iCAR、Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5 (215) (December, 2013)参照、が挙げられる。CARは一般的に、いくつかの局面においてリンカーおよび/または1つもしくは複数の膜貫通ドメインを介して1つまたは複数の細胞内シグナル伝達成分に連結される細胞外の抗原（またはリガンド）結合ドメインを含む。かかる分子は典型的には、天然の抗原受容体を介するシグナル、共刺激性受容体との組合せでかかる受容体を介するシグナルおよび/または共刺激性受容体単独を介するシグナルを模倣または近似し得る。いくつかの態様において、CARは、抗体分子の1つまたは複数の抗原結合部分、例えばモノクローナル抗体（mAb）の重鎖可変部（VH）および軽鎖可変部（VL）に由来する単鎖抗体断片（scFv）を含む。

20

【0059】

CARの抗原結合ドメインの編成は多量体型、例えばダイアボディまたは多量体であり得る。多量体は、軽鎖および重鎖の可変部分のダイアボディと称され得るものへのクロスペアリングによって形成され得る。CARのヒンジ部分は、いくつかの態様において、短縮または除外され得る（すなわち、抗原結合ドメイン、膜貫通領域および細胞内シグナル伝達ドメインのみを含むCARが作製される）。本発明では、例えば表1に示すような多様なヒンジが使用され得る。いくつかの態様において、ヒンジ領域は、維持されているか、あるいはプロリンもしくはセリン置換によって変異された第1システインを有し得るか、または第1システインまで切断型であり得る。Fc部分は、本発明によるCARを作製するための抗原結合領域として使用されるscFvから除去され得る。いくつかの態様において、抗原結合領域は、ヒト免疫グロブリンのFcドメインのうち的一方だけ、例えばCH2ドメインまたはCH3ドメインのいずれかだけをコードしていてもよい。また、二量体化およびオリゴマー化を改善するために改変されているヒト免疫グロブリンのヒンジ、CH2、およびCH3領域を含めてもよい。いくつかの態様において、ヒンジ部分は8~14個のアミノ酸のペプチド（例えば、12個のAAのペプチド）、CD8_αの一部もしくはIgG4 Fcを含み得るか、または8~14個のアミノ酸のペプチド（例えば、12個のAAのペプチド）、CD8_αの一部もしくはIgG4 Fcからなり得る。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは細胞表面から、オリゴマー化を促進させるドメイン、例えばCD8_αを用いて懸垂されていてもよい。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは細胞表面から、モノクローナル抗体（mAb）クローン2D3（例えば、Singh et al., 2008に記載のmAbクローン2D3）によって認識されるドメインを用いて懸垂されていてもよい。

30

40

【0060】

CARのエンドドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは一般的に、前記CARを含む免疫細胞の正常なエフェクター機能のうち少なくとも1つの活性化を引き起こし得るか、または前記活性化を促進させ得る。例えば、エンドドメインはT細胞のエフェクター機能、例えば細胞溶解活性またはヘルパー活性、例えばサイトカインの分泌などを促進さ

50

せ得る。ナイーブT細胞、メモリーT細胞またはメモリー型T細胞におけるエフェクター機能としては抗原依存性増殖が挙げられ得る。用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」または「エンドドメイン」は、エフェクター機能のシグナルを伝達し得るCAR部分および/または細胞に特殊な機能を行なうように指令し得るCAR部分を示す。通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体がCAR内に含まれ得るが、いくつかの場合では、エンドドメインの短縮型部分が含まれ得る。一般的に、エンドドメインは短縮型エンドドメインを包含しており、この場合、短縮型エンドドメインはエフェクター機能のシグナルを細胞内に伝達する能力を保持している。

【0061】

いくつかの態様において、エンドドメインは、T細胞受容体の鎖またはそのホモログのいずれか（例えば、 α 、 β 、 γ 、もしくは δ ）、MB1鎖、B29、Fc RIII、Fc RIおよびシグナル伝達分子の組合せ、例えばCD3 とCD28、CD27、4-1BB、DAP-10、OX40、およびそれらの組合せ、ならびに他の同様の分子および断片を含む。活性化タンパク質のファミリーの他のメンバーの細胞内シグナル伝達部分、例えばFc RIIIおよびFc RIを使用してもよい。このような代替の膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインの例は、例えばGross et al. (1992)、Stancovski et al. (1993)、Moritz et al. (1994)、Hwu et al. (1995)、Weijtens et al. (1996) およびHekele et al. (1996) にみられ得、これらは参照により (by reference) その全体が本明細書に組み入れられる。いくつかの態様において、エンドドメインはヒトCD3 の細胞内ドメインを含み得る。

10

20

【0062】

抗原特異的細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインは好ましくは膜貫通ドメインによって連結されている。CAR内に含まれ得る膜貫通ドメインとしては、例えば、ヒトIgG4のFcヒンジおよびFc領域、ヒトCD4の膜貫通ドメイン、ヒトCD28の膜貫通ドメイン、ヒトCD3 の膜貫通ドメインもしくはシステイン変異型ヒトCD3 ドメインまたはヒト膜貫通型シグナル伝達タンパク質、例えばCD16およびCD8などに由来する膜貫通ドメインならびにエリスロポエチン受容体が挙げられる。

【0063】

いくつかの態様において、エンドドメインは、共刺激性受容体、例えば、改変型CD28細胞内シグナル伝達ドメインなど、またはCD28、CD27、OX-40 (CD134)、DAP10、もしくは4-1BB (CD137) 共刺激性受容体をコードしている配列を含む。いくつかの態様において、形質転換されたT細胞をより有効に活性化させるために、CD3 によって開始される一次シグナル、ヒト共刺激性受容体によってもたらされる追加のシグナルの両方がCAR内に含まれ得、これにより、インビボ持続的存在の改善および養子免疫療法の治療好成績が補助され得る。表1に記載のように、エンドドメインまたは細胞内受容体シグナル伝達ドメインはCD3の鎖を単独で、またはFc RIII共刺激シグナル伝達ドメイン、例えばCD28、CD27、DAP10、CD137、OX40、CD2、4-1BBなどとの組合せで含み得る。いくつかの態様において、エンドドメインはTCR 鎖、CD28、CD27、OX40/CD134、4-1BB/CD137、Fc RI、ICOS/CD278、IL-2R /CD122、IL-2R /CD132、DAP10、DAP12およびCD40のうちの1つまたは複数の一部または全部を含む。いくつかの態様において、1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれより多くの細胞質ドメインがエンドドメイン内に含まれ得る。例えば、いくつかのCARでは、少なくとも2つまたは3つのシグナル伝達ドメインを一体に融合すると相加効果または相乗効果がもたらされ得ることが観察されている。

30

40

【0064】

いくつかの局面において、CARをコードするDNA配列を含む単離された核酸セグメントおよび発現カセットが作製され得る。さまざまなベクターが使用され得る。いくつかの好ましい態様において、ベクターにより、CARをコードしているDNAのT細胞などの免疫細胞への送達が可能になり得る。CARの発現は、調節型の真核生物プロモーター、例えばMNDU3プロモーター、CMVプロモーター、EF1 プロモーターまたはユビキチン

50

プロモーターなどの制御下であり得る。また、ベクターは、そのインビトロでの操作を容易にするためだけの理由で選択可能マーカーを含み得る。いくつかの態様において、CARを、DNA鋳型からインビトロで転写されたmRNAから発現させてもよい。

【0065】

キメラ抗原受容体分子は組換え型であり、抗原に結合するとともに、自身の細胞質テール内に存在する免疫受容体活性化モチーフ (ITAM) を介して活性化シグナルを伝達するその能力によって区別される。抗原結合部分 (例えば、一本鎖抗体 (scFv) から作製される) が用いられる受容体構築物は、標的細胞表面上の天然状態の抗原にHLA非依存的様式で結合することができる点で「ユニバーサル」であるという追加の利点をもたらす。例えば、scFv構築物は、CD3複合体のゼータ鎖 () の細胞内部分、Fc受容体鎖およびskyチロシンキナーゼをコードしている配列に融合され得る (Eshhar et al., 1993; Fitzer-Attas et al., 1998)。再指向T細胞エフェクター機構、例えば腫瘍認識およびCTLによる溶解が、いくつかのマウスおよびヒト抗原-scFv系において報告されている (Eshhar et al., 1997; Altenschmidt et al., 1997; Brocker et al., 1998)。

10

【0066】

いくつかの態様において、TCRはCAR内に抗原結合ドメインとして (例えば、scFv領域として) 含まれ、前記CARはヒンジ領域、膜貫通領域およびエンドドメインをさらに含む。

【0067】

C. 可溶性TCRおよびBiTE

20

また、本開示により、がん陽性患者を直接的に処置するために使用され得る可溶性TCRを提供する。可溶性二重特異性T細胞誘導分子 (BiTE) は、VGLL1 TCRをCD3特異的Fab断片に連結することによって作製され得る。このような二重特異性分子は腫瘍細胞表面に、自身のVGLL1 TCRがペプチド/HLA複合体に結合することによって結合し得、CD3特異的Fab断片は前記TCRに架橋し得る。これによって細胞の活性化および標的細胞の排除がもたらされると考えられる。したがって、このような可溶性二重特異性TCR構築物は、がん患者を直接的に処置するために使用され得る。

【0068】

最後に、可溶性TCRは、腫瘍細胞におけるペプチド/MHCの診断評価のためのプローブとして、または治療用分子を腫瘍部位に指向するために使用され得る。また、この可溶性TCR分子をトレーサー、例えば蛍光プローブまたは放射性プローブで標識し、次いで腫瘍細胞におけるペプチド/MHCの提示の診断評価のために使用することもできよう。さらに、この可溶性TCR分子を、治療用分子、例えば毒素と連結し、次いで、このような治療用分子をがん患者の処置のために腫瘍部位に指向することができよう。

30

【0069】

いくつかの態様において、本開示により可溶性TCR、例えば本明細書において提供されるVGLL1特異的TCRを提供する。可溶性TCRは、特異的なTCR-pMHC相互作用を検討するために、または感染を検出するため、もしくは自己免疫疾患マーカーを検出するための診断ツールとして使用され得る。可溶性TCRは、例えば細胞を、MHCとの関連において提示された特定のペプチド抗原の存在について染色するための染色における用途を有し得る。同様に、可溶性TCRは、治療用物質、例えば細胞傷害性化合物または免疫賦活化合物を、特定の抗原を提示している細胞に送達するために使用され得る。また、可溶性TCRはT細胞、例えば自己免疫ペプチド抗原に反応性のものを阻害するためにも使用され得る。いくつかの局面において、TCRは、細胞を腫瘍近接部に送達する別の分子に連結される。さらなる局面において、TCRは毒素、サイトカイン、共刺激性リガンド、または阻害性リガンドを送達し、前記分子、細胞または化合物を、ペプチド-MHCを発現している標的細胞に指向する。

40

【0070】

いくつかの局面において、本開示により、(i) 膜貫通ドメインを除くTCR鎖 (例えば、SEQ ID NO: 1、24、47、または70) の全部または一部および(ii) 膜貫通ドメイ

50

ンを除くTCR 鎖（例えば、SEQ ID NO:7、30、53、または76）の全部または一部を含み、(i)と(ii)は、各々、前記TCR鎖の機能性の可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを含み、定常ドメイン残基間の天然状態のTCRには存在しないジスルフィド結合によって連結されている可溶性T細胞受容体（sTCR）を提供する。

【0071】

いくつかの局面において、可溶性TCRは、1対のC末端二量体化ペプチド、例えばロイシンジッパーによって、それぞれTCR または 鎖の細胞外ドメインと二量体化されたTCR または 鎖の細胞外ドメインを含む。

【0072】

本開示の可溶性TCRは実質的に純粋な形態で、または精製もしくは単離された調製物として提供され得る。例えば、これは、他のタンパク質が実質的に無含有である形態で提供され得る。

【0073】

複数の本開示の可溶性TCRは多価複合体で提供され得る。したがって、本開示により、一局面において、複数の本明細書に記載のような可溶性TCRを含む多価TCR複合体を提供する。前記複数の可溶性TCRの各々は好ましくは同一である。

【0074】

その最も単純な形態において、本開示による多価TCR複合体は、好ましくはリンカー分子を介して互いと会合している（例えば、共有結合により、または別の様式で連結された）2つ、または3つ、または4つ、またはそれより多くのT細胞受容体分子の多量体を含む。好適なリンカー分子としては、非限定的に、多価の結合分子、例えばアビジン、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、およびエクストラアビジンが挙げられ、これらは各々、ビオチンに対する4つの結合部位を有する。したがって、ビオチン化TCR分子は、複数のTCR結合部位を有するTCRの多量体に形成され得る。多量体内のTCR分子の数は、前記多量体を作製するために使用されるリンカー分子の量に対するTCRの量に依存し、また、任意の他のビオチン化分子の有無にも依存する。好ましい多量体は二量体型、三量体型、または四量体型のTCR複合体である。

【0075】

本方法における使用に好適な構造体としては、膜構造体、例えばリポソームおよび好ましくは粒子、例えばビーズ、例えばラテックスビーズであるソリッド構造体が挙げられる。また、T細胞受容体分子で外部コートされ得る他の構造体も好適である。好ましくは、前記構造体は、個々のT細胞受容体分子ではなくT細胞受容体多量体でコートされる。

【0076】

リポソームの場合、T細胞受容体分子またはその多量体は、膜に結合され得るか、または別の様式で会合され得る。このための手法は当業者に周知である。

【0077】

標識または別の部分、例えば毒性部分もしくは治療性部分を本開示の多価TCR複合体内に含めてもよい。例えば、標識または他の部分は混合型分子多量体内に含められ得る。かかる多量体型分子の一例は、3つのTCR分子および1つのペルオキシダーゼ分子を含む四量体である。これは、TCRと酵素を3:1のモル比で混合して四量体型複合体を作製し、正しい比率の分子を含むものでない任意の複合体から所望の複合体を単離することによって得られ得よう。このような混合型分子には任意の組合せの分子が含まれ得ようが、前記分子の所望の機能が立体障害によって損なわれない、または有意に損なわれないものとする。ストレプトアビジン分子上の結合部位のポジショニングは、立体障害が起こる可能性が低い場合混合型四量体に適している。

【0078】

本開示のTCR（またはその多価複合体）は代替的または付加的に、例えば細胞殺作用における使用のための毒性部分であり得る治療用物質、または例えばインターロイキンもしくはサイトカインであり得る免疫賦活剤と会合（例えば、共有結合により、または別の様式で連結）され得る。本開示の多価TCR複合体は、非多量体型T細胞受容体ヘテロ二量

10

20

30

40

50

体と比べて向上したTCRリガンドに対する結合能を有し得る。したがって、本開示による多価TCR複合体は、特定の抗原を提示している細胞をインビトロまたはインビボで追跡または標的とするために特に有用であり、また、かかる用途を有するさらなる多価TCR複合体の作製のための中間体としても有用である。したがって、TCRまたは多価TCR複合体は、インビボでの使用のための薬学的に許容される製剤で提供され得る。

【0079】

また、本開示により、本開示によるTCRまたは多価TCR複合体と潜在的標的細胞を、前記TCRまたは多価TCR複合体の標的細胞への結合を可能にする条件下で接触させることを含む、治療用物質を標的細胞に送達するための方法であって、前記TCRまたは多価TCR複合体は前記TCRのリガンドに特異的であり、かつ前記治療用物質と会合されている、方法を提供する。 10

【0080】

特に、可溶性TCRまたは多価TCR複合体は、治療用物質を特定の抗原を提示している細胞の場所へ送達するために使用され得る。これは多くの状況で、特に腫瘍に対して有用であると考えられる。治療用物質は、これがその効果を局所性に奏し得るが結合する細胞に対してだけでなく送達することができよう。したがって、一例の特定のストラテジーでは、腫瘍抗原に特異的なT細胞受容体または多価TCR複合体に連結された抗腫瘍分子が想定される。

【0081】

多くの治療用物質、例えば放射性化合物、酵素（例えば、パーフォリン）または化学療法剤（例えば、シスプラチン）が、この使用のために使用され得よう。毒性効果が所望の場所で奏されることを確実にするため、毒素は、前記化合物がゆっくり放出されるように、ストレプトアビジンに連結されたりリポソーム内部に存在させることができよう。これにより、体内での輸送中の損傷性効果が抑制され、毒素はTCRが該当する抗原提示細胞に結合した後に最大効果を有することが確実になる。 20

【0082】

本開示の可溶性TCRは、特異的TCRリガンドに結合し、それによりT細胞活性化を阻害することによってT細胞活性化を調節するために使用され得る。T細胞媒介性炎症および/または組織損傷を伴う自己免疫疾患、例えば1型糖尿病はこのアプローチに適しているだろう。該当するpMHCによって提示される具体的なペプチドエピトープを知ることがこの使用に必要とされる。 30

【0083】

がんまたは自己免疫疾患の処置のための組成物の調製における本開示の可溶性TCRおよび/または多価TCR複合体の使用もまた想定される。

【0084】

また、その必要がある患者に有効量の本開示の可溶性TCRおよび/または多価TCR複合体を投与することを含む、がんまたは自己免疫疾患の処置方法が提供される。

【0085】

抗がん治療および自己免疫療法では一般的であるように、本開示の可溶性TCRは、がんおよび自己免疫疾患ならびに同様の患者群にみられる他の関連病態の処置のための他の作用物質との組合せで使用され得る。 40

【0086】

III. 養子細胞移入療法

本明細書において、個体に有効量の抗原特異的細胞（例えば、自己由来または同種異系のT細胞（例えば、制御性T細胞、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞、もしくは T細胞）、NK細胞、インバリアントNK細胞、NKT細胞、MSC、またはiPS細胞）療法薬、例えばVGLL1特異的細胞療法薬を投与することを含む、個体のがんを処置するため、またはその進行を遅らせるための方法を提供する。遺伝子操作されたTCR形質導入T細胞（例えば、SEQ ID NO:1~92のうちの1つを含むTCRを発現している）を用いる養子T細胞療法もまた本明細書において提供される。いくつかの態様において、養子細胞移入療法は、対象 50

(例えば、ヒト患者)に第2の治療(as second therapy)、例えば化学療法、放射線療法、手術または第2の免疫療法との組合せで提供される。

【0087】

本開示の諸態様は、TCR操作細胞を得て、これを対象に、がん細胞を標的とするための免疫療法薬として投与することに関する。特に、TCR操作細胞は抗原特異的細胞(例えば、VGLL1特異的細胞)である。機能性の抗腫瘍エフェクター細胞の誘導体化、活性化、および増大のためのいくつかの基本的アプローチがこの20年間で報告されている。このようなものとしては:自己由来細胞、例えば腫瘍浸潤リンパ球(TIL);自己由来DC、リンパ球、人工抗原提示細胞(APC)もしくはT細胞リガンドでコートされたビーズおよび活性化抗体を用いてエクスピボで活性化されたT細胞、または捕捉性標的細胞膜によって単離された細胞;抗宿主腫瘍T細胞受容体(TCR)を天然に発現している同種異系細胞;ならびに「Tボディ」として公知の抗体様腫瘍認識能力を示す腫瘍反応性TCRまたはキメラTCR分子を発現するように遺伝子がリプログラムまたは「再指向」された非腫瘍特異的自己由来細胞または同種異系細胞が挙げられる。このようなアプローチにより、本明細書に記載の方法に使用され得る、T細胞の調製および免疫処置のための数多くのプロトコールが生み出されている。

10

【0088】

A. T細胞の調製

いくつかの態様において、T細胞は血液、骨髄、リンパまたはリンパ系器官に由来する。いくつかの局面において、細胞はヒト細胞である。細胞は典型的には初代細胞、例えば対象から直接単離されたもの、および/または対象から単離され、凍結されたものである。いくつかの態様において、細胞は、T細胞または他の細胞型の1つまたは複数のサブセット、例えば全T細胞集団、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞およびその亜集団、例えば機能、活性化状態、成熟度、分化潜在能、増大、再循環、局在化、および/または持続的存在能、抗原特異性、抗原受容体の型、特定の器官もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカインの分泌プロファイルおよび/または分化度によって規定されるものを含む。処置される対象に対して、細胞は同種異系および/または自己由来であり得る。いくつかの局面において、例えばオフザシェルフ(off-the-shelf)では、細胞は多能性および/または多分化能の、例えば幹細胞、例えば人工多能性幹細胞(iPSC)である。いくつかの態様において、前記方法は、細胞を対象から単離すること、前記細胞を本明細書に記載のようにして調製、加工処理、培養および/または操作すること、ならびに凍結保存の前または後に前記細胞を同じ対象に再導入することを含む。

20

30

【0089】

中でも、T細胞のサブタイプおよび亜集団(例えば、CD4⁺および/またはCD8⁺T細胞)はナイーブT(T_N)細胞、エフェクターT細胞(T_{EFF})、メモリーT細胞およびそのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT(T_{SCM})、セントラルメモリーT(T_{CM})、エフェクターメモリーT(T_{EM})または最終分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT(MAIT)細胞、天然に存在する適応性制御性T(T_{reg})細胞、ヘルパーT細胞、例えばTH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、 / T細胞ならびに / T細胞である。

40

【0090】

いくつかの態様において、1つまたは複数のT細胞集団は、特異的マーカー、例えば表面マーカーについて陽性である細胞または特異的マーカーについて陰性である細胞が濃縮されるか、または枯渇される。いくつかの場合において、かかるマーカーは、特定の集団のT細胞(例えば、非メモリー細胞)上に存在しないか、または比較的低レベルで発現されるが他の特定の集団のT細胞(例えば、メモリー細胞)上には存在するか、または比較的高レベルで発現されるものである。

【0091】

いくつかの態様において、T細胞はPBMC試料から、非T細胞、例えばB細胞、単球ま

50

たは他の白血球上に発現されるマーカー、例えばCD14の負の選択によって分離される。いくつかの局面において、CD4⁺ヘルパーT細胞とCD8⁺細胞傷害性T細胞を分離するためにCD4⁺またはCD8⁺選択工程が使用される。かかるCD4⁺集団およびCD8⁺集団は、1つまたは複数のナイーブ、メモリーおよび/またはエフェクターT細胞亜集団上に発現されるか、または比較的高度に発現されるマーカーについての正の選択または負の選択によって亜集団にさらに選別され得る。

【0092】

いくつかの態様において、CD8⁺T細胞は、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリーおよび/またはセントラルメモリー幹細胞が、例えばそれぞれの亜集団と関連している表面抗原に基づいた正の選択または負の選択によってさらに濃縮されるか、または枯渇される。いくつかの態様において、セントラルメモリーT(T_{CM})細胞の濃縮は、有効性を高めるため、例えば、いくつかの局面においてかかる亜集団において特にロバストである長期生存、増大、および/または投与後の生着を改善するために行なわれる。Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother .35(9):689-701を参照のこと。

10

【0093】

いくつかの態様において、T細胞は自己由来T細胞である。この方法では、腫瘍試料を患者から採取し、単細胞懸濁液を得る。単細胞懸濁液は、任意の適切な様式で、例えば、機械的に(例えば、gentleMACS(商標) Dissociator, Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.を用いて腫瘍をバラバラにする)または酵素的に(例えば、コラゲナーゼもしくはDNase)得られ得る。腫瘍の酵素消化物の単細胞懸濁液はインターロイキン-2(IL-2)中で培養される。細胞はコンフルエンス(例えば、約 2×10^6 個のリンパ球)まで、例えば約5~約21日間、好ましくは約10~約14日間培養される。

20

【0094】

培養されたT細胞はプールされ、急速に増大し得る。急速な増大により、約10~約14日間の期間で少なくとも約50倍(例えば、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、もしくは100倍またはそれ以上)の抗原特異的T細胞の数の増加がもたらされる。より好ましくは、急速増大により、約10~約14日の期間で少なくとも約200倍(例えば、200倍、300倍、400倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、またはそれ以上)の増加がもたらされる。

30

【0095】

増大は、当技術分野において公知であるようないくつかの任意の方法によって行なわれ得る。例えば、T細胞は、フィーダーリンパ球およびインターロイキン-2(IL-2)またはインターロイキン-15(IL-15)のいずれかの存在下での非特異的T細胞受容体刺激を用いて急速に増大し得、IL-2が好ましい。非特異的T細胞受容体刺激剤としては、およそ30 ng/mlのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体(Ortho-McNeil(登録商標)、Raritan, N.J.により入手可能)が挙げられ得る。あるいはまた、T細胞は、任意でベクターから発現され得る1つまたは複数のがん抗原(例えば、その抗原性部分、例えば1つまたは複数のエピトープまたは細胞)、例えばヒト白血球抗原A1(HLA-A1)結合ペプチド、によるT細胞増殖因子、例えばIL-2の存在下での末梢血単核細胞(PBMC)のインビトロでの刺激によって急速に増大し得る。インビトロ誘導性T細胞は、HLA-A1発現抗原提示細胞に対してパルスされる1つまたは複数の同じがん抗原での再刺激によって急速に増大する。あるいはまた、T細胞は、例えば放射線照射された自己由来リンパ球で、または放射線照射されたHLA-A1+同種異系リンパ球およびIL-2で再刺激され得る。

40

【0096】

自己由来T細胞は、自己由来T細胞の成長および活性化を促進させるT細胞増殖因子を発現するように改変され得る。好適なT細胞増殖因子としては、例えばインターロイキン(IL)-2、IL-7、IL-15およびIL-12が挙げられる。好適な改変方法は当技術分野において公知である。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; お

50

よび Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994 を参照のこと。特定の局面において、改変された自己由来 T 細胞は T 細胞増殖因子を高レベルで発現する。T 細胞増殖因子コード配列、例えば IL-12 のものは、プロモーターと同様に、当技術分野において容易に入手可能であり、T 細胞増殖因子コード配列とのその機能的な連結によって高レベル発現が促進される。

【0097】

B. 処置方法

本明細書において、個体に有効量の抗原特異的 T 細胞療法薬、例えば VGLL1 特異的 T 細胞療法薬を投与することを含む、個体のがんを処置するため、またはその進行を遅らせるための方法がさらに提供される。遺伝子操作された TCR 形質導入 T 細胞を有する (TCR を他の生体反応性タンパク質 (例えば、抗 CD3) にコンジュゲートさせる養子 T 細胞療法もまた本明細書において提供される。さらなる態様において、対象を、精製された腫瘍抗原または免疫優性腫瘍抗原特異的ペプチドを用いて免疫処置することを含むがんの処置のための方法が提供される。

10

【0098】

処置が想定されるがんの例としては、肺がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎がん、骨のがん、精巣がん、子宮頸部のがん、胃腸のがん、リンパ腫、肺内の新生物発生前病変、結腸がん、黒色腫および膀胱がんが挙げられる。さらなる例示的ながんとしては、非限定的に、肺がん、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎がん、骨のがん、精巣がん、子宮頸部のがん、胃腸のがん、リンパ腫、肺内の新生物発生前病変、結腸がん、黒色腫および膀胱がんが挙げられる。がんのさらなる例としては、黒色腫、悪性黒色腫、結腸癌、リンパ腫、肉腫、芽細胞腫、腎癌、胃腸の腫瘍、グリオーマ、前立腺腫瘍、膀胱がん、直腸腫瘍、胃がん、食道がん、膵臓がん、肝臓がん、乳癌、子宮がん、子宮頸部のがん、急性骨髄性白血病 (AML)、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性骨髄性白血病 (CML)、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、白血病、ヘパトーマ、種々のウイルス誘導性腫瘍、例えば、パピローマウイルス誘導性癌 (例えば、子宮頸癌)、腺癌 (adenocarcinoma)、ヘルペスウイルス誘導性腫瘍 (例えば、バーキットリンパ腫、EBV 誘導性 B 細胞リンパ腫)、ヘプタティス (hepatitis) B 誘導性腫瘍 (肝細胞癌)、HTLV-1 および HTLV-2 誘導性リンパ腫 (lymphoma) など、聴神経腫、肺癌、小細胞肺癌、咽頭がん、肛門癌、膠芽細胞腫、直腸癌、星状細胞腫 (astrocytoma)、脳腫瘍、網膜芽細胞腫、基底細胞腫、脳転移、髄芽細胞腫、膣がん、膵臓がん、精巣がん、ホジキン症候群、髄膜腫、シュネーベルガー (Schneeberger) 病、下垂体腫瘍、菌状息肉腫、カルチノイド、神経鞘腫、棘細胞癌、バーキットリンパ腫、喉頭がん、腎がん、胸腺腫、子宮体 (corpus) 癌、骨のがん、非ホジキンリンパ腫、尿道がん、CUP 症候群、頭部/頸部腫瘍、乏突起膠腫 (oligodendroglioma)、外陰がん、腸のがん、結腸癌、食道癌、疣浸潤 (wart involvement)、小腸の腫瘍、頭蓋咽頭腫、卵巣癌 (carcinoma)、生殖器系腫瘍、卵巣がん、膵臓癌、子宮内膜癌、肝臓転移、陰茎がん、舌がん、胆嚢がん、白血病、形質細胞腫、眼瞼腫瘍および前立腺がんが挙げられる。

20

30

【0099】

いくつかの態様において、T 細胞は自己由来である。しかしながら、細胞は同種異系であってもよい。いくつかの態様において、T 細胞は前記細胞が自己由来となるように患者自身から単離される。T 細胞が同種異系である場合、いくつかのドナー由来の T 細胞がプールされ得る。細胞は関心対象の対象に、処置される疾患の症状および徴候をコントロール、低減または消失するのに十分な量で投与される。

40

【0100】

いくつかの態様において、対象に、T 細胞療法の前に骨髄非破壊的リンパ球枯渇化学療法が実施され得る。骨髄非破壊的リンパ球枯渇化学療法は、任意の適切な経路によって実施され得る任意の適切なかかる治療であり得る。骨髄非破壊的リンパ球枯渇化学療法は、例えば、特にがんが転移性であり得る黒色腫である場合、シクロホスファミドとフルダラ

50

ピンの投与を含み得る。シクロホスファミドとフルダラビンの例示的な投与経路は静脈内である。同様に、任意の適切な用量のシクロホスファミドとフルダラビンが投与され得る。特定の局面において、およそ60 mg/kgのシクロホスファミドが2日間投与され、その後、およそ25 mg/m²のフルダラビンが5日間投与される。

【0101】

特定の態様において、自己由来T細胞の成長および活性化を促進させるT細胞増殖因子が対象に自己由来T細胞と併存的または自己由来T細胞の後のいずれかで投与される。T細胞増殖因子は、自己由来T細胞の成長および活性化を促進させる任意の適切な増殖因子であり得る。好適なT細胞増殖因子の例としてはインターロイキン(IL)-2、IL-7、IL-15、およびIL-12が挙げられ、これらは単独で、または種々の組合せ、例えばIL-2とIL-7、IL-2とIL-15、IL-7とIL-15、IL-2、IL-7とIL-15、IL-12とIL-7、IL-12とIL-15、もしくはIL-12とIL2で使用され得る。IL-12は好ましいT細胞増殖因子である。

10

【0102】

T細胞は静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所的に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植によって、吸入によって、髄腔内に、脳室内に、または鼻腔内に投与される。T細胞療法薬の適切な投薬量は処置される疾患の型、疾患の重症度および経過、個体の臨床状態、個体の既往歴および処置に対する奏効ならびに担当医の裁量に基づいて決定され得る。

【0103】

離散型で固形の到達可能な腫瘍では腫瘍内注射または腫瘍の血管系内への注射が具体的に想定される。また、局所性、局部的、または全身性投与が適切な場合もあり得る。>4 cmの腫瘍では、投与される容量は約4~10 ml(特に、10 ml)であるが、<4 cmの腫瘍では、約1~3 mlの容量が使用される(特に、3 ml)。単回用量として送達される反復注射は約0.1~約0.5 ml用量を含む。

20

【0104】

C. 薬学的組成物

選択された態様において、本明細書に開示のようなTCRを発現している細胞、TCRの可変領域を含むタンパク質または本開示のTCRの可変領域をコードしているDNAがワクチン組成物に含められ、対象においてがん、例えばVGLL1を発現するがんに対する治療的免疫応答を誘導するために対象に投与されることが想定される。対象における薬学的使用のためのワクチン組成物は本明細書に開示された腫瘍抗原ペプチド(例えば、VGLL1)組成物および薬学的に許容される担体を含み得る。対象における薬学的使用のための治療用組成物は本明細書に開示されたTCR組成物、例えば可溶性TCR(任意でイメージング剤に結合されている)および薬学的に許容される担体を含み得る。

30

【0105】

本明細書において使用する場合、「防御免疫応答」は、哺乳動物宿主の免疫系によるがんに対する応答を示す。防御免疫応答により、がんの処置のための治療効果、例えば腫瘍サイズの縮小、生存期間の延長などがもたらされ得る。

【0106】

医療技術分野の当業者には、動物またはヒト患者に投与される治療用組成物の実際の投薬量の量は身体的要素および生理学的要素、例えば体重、病態の重症度、処置される疾患の型、以前または現在の治療介入、患者の突発性疾患および投与経路によって決定されることが認識されよう。投与を担う実行者は、任意の事象において、組成物中の1つまたは複数の活性成分の濃度および個々の対象に対する1つまたは複数の適切な用量を決定する。

40

【0107】

本明細書に開示された治療用組成物は静脈内に、皮内に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所的に、腫瘍内に、筋肉内に、腹腔内に、皮下に、結膜下に、小胞的に(intravesicularly)、粘膜経由で、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口的に、局

50

所的に、局所性に、ならびに吸入、注射、輸注、連続輸注、洗浄、および局所性灌流によって投与され得る。また、治療用組成物は対象にカテーテルによって、クリーム剤にて、脂質組成物にて、ポリスティック粒子状物質送達によって、または当業者であればわかるであろう他の方法もしくは前述のものの任意の組合せによって投与され得る（例えば、参照により本明細書に組み入れられるRemington:The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2005参照）。

【0108】

当業者に公知の任意の適切な担体が本発明の薬学的組成物において使用され得るが、担体の型は投与様式に応じて異なる。非経口投与、例えば皮下注射では、担体は好ましくは水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックスまたはバッファーを含む。経口投与では、上記の任意の担体または固形担体、例えばマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロースおよび炭酸マグネシウムが使用され得る。生分解性マイクロスフェア（例えば、ポリ乳酸ガラクトド）もまた、本発明の薬学的組成物用の担体として使用され得る。好適な生分解性マイクロスフェアは、例えば米国特許第4,897,268号および同第5,075,109号に開示されている。

10

【0109】

いくつかの態様において、ワクチン組成物はマイクロ構造体での経皮送達またはポリスティック粒子での送達によって投与され得る。ワクチン製剤用の担体としてのマイクロ構造体はワクチン用途のための望ましい構成であり、当技術分野において広く公知である（Gerstel and Place 1976（米国特許第3,964,482号）；Ganderton and McAinsh 1974（米国特許第3,814,097号）；米国特許第5,797,898号、同第5,770,219号および同第5,783,208号ならびに米国特許出願公開第2005/0065463号）。このような態様において、支持基材としては、非限定的に、マイクロカプセル、マイクロ粒子、マイクロスフェア、ナノカプセル、ナノ粒子、ナノスフェア、またはそれらの組合せが挙げられ得る。

20

【0110】

TCR、例えば本明細書に開示された可溶性TCR用の支持基材としての機能を果たすマイクロ構造体またはポリスティック粒子は生分解性物質および非生分解性物質で構成され得、かかる支持基材は合成ポリマー、シリカ、脂質、糖質、タンパク質、レクチン、イオン性作用物質、クロスリンカー、および当技術分野において使用可能な他のマイクロ構造構成材で構成され得る。本発明のペプチドをかかる物質で構成された支持基材に固定化するためのプロトコールおよび試薬は広く市販されており、当技術分野において使用可能である。

30

【0111】

他の態様において、ワクチン組成物は、固定化された、または封入されたTCRまたは本明細書に開示された可溶性TCRおよび支持基材を含む。このような態様において、支持基材としては、非限定的に、脂質マイクロスフェア、脂質ナノ粒子、エトソーム、リポソーム、ニオソーム、リン脂質、スフィンゴソーム（sphingosome）、界面活性剤、トランスファーソーム、乳剤、またはそれらの組合せが挙げられ得る。リポソームならびに他の脂質ナノ担体およびマイクロ担体制剤の形成および使用は当業者に一般的に公知であり、リポソーム、マイクロ粒子、ナノカプセルなどの使用は治療薬の送達において広範に行なわれている（例えば、米国特許第5,741,516号、参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる）。数多くのリポソーム調製方法および潜在的薬物担体としてのリポソーム様調製物、例えばペプチドの封入が検討されている（米国特許第5,567,434号；同第5,552,157号；同第5,565,213号；同第5,738,868号および同第5,795,587号、これらの各々は参照によりその全体が具体的に組み入れられる）。

40

【0112】

本明細書に記載の送達方法に加えて、本開示のワクチン組成物を投与するために、いくつかの代替手法もまた想定される。非限定的な一例として、ワクチン組成物は、循環系内

50

および循環系中での薬物透過の速度および有効性を向上させるために使用されており、米国特許第5,656,016号に記載されているソノフォレシス(すなわち、超音波);骨内注射(米国特許第5,779,708号)またはフィードバック制御送達(米国特許第5,697,899号)によって投与され得、この段落の各特許は参照によりその全体が本明細書に具体的に組み入れられる。

【0113】

任意のさまざまなアジュバントが、免疫応答を非特異的に向上させるために本開示のワクチンにおいて使用され得る。ほとんどのアジュバントは、抗原が急速な異化作用から保護されるように設計された物質、例えば水酸化アルミニウムまたは鉱物油および免疫応答の非特異的刺激因子、例えばリピドA、ボルタデラ・パーツシス(Bortadella pertussis)またはヒト型結核菌(Mycobacterium tuberculosis)を含む。好適なアジュバントは、例えば、不完全フロイントアジュバントおよび完全フロイントアジュバント(Difco Laboratories, Detroit, Mich.)ならびにMerck Adjuvant 65(Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.)として市販されている。他の好適なアジュバントとしては、ミョウバン、生分解性マイクロスフェア、モノホスホリルリピドAおよびquil Aが挙げられる。

10

【0114】

可溶性TCRは中性形態または塩形態の組成物に製剤化され得る。薬学的に許容される塩としては、酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基とともに形成される)および無機酸、例えば塩酸もしくはリン酸などまたは酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸などとともに形成されるものが挙げられる。また、遊離カルボキシル基とともに形成される塩は、無機塩基、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは第二鉄の水酸化物など、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基などから誘導され得る。

20

【0115】

任意の場合において、前記組成物は、1つまたは複数の成分の酸化を遅らせるための種々の酸化防止剤を含み得る。さらに、微生物の作用の抑制は、防腐剤、例えば種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば非限定的に、パラベン(例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン)、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル、またはそれらの組合せによってもたらされ得る。

30

【0116】

滅菌注射用溶液は、必要とされる量の活性ペプチドを適切な溶媒中に、必要に応じて上記に列挙した種々のその他の成分とともに組み込んだ後、滅菌濾過することによって調製される。一般的に、分散剤は、種々の滅菌された活性成分を、ベースの分散媒および/またはその他の成分を含む滅菌されたビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌された注射用の液剤、懸濁剤または乳剤の調製用の滅菌された粉末剤の場合、好ましい調製方法は真空乾燥手法または凍結乾燥手法であり、これにより、活性成分+任意の追加の所望の成分の粉末がその事前に滅菌濾過された液状媒体から生成する。液状媒体は、必要であれば適切に緩衝状態にするのがよく、液状希釈剤は、十分な生理食塩水またはグルコースとともに注射する前にまず等張性にするのがよい。また、直接注射のための高度に濃縮された組成物の調製も想定され、この場合、溶媒としてDMSOの使用が想定され、極めて速やかな浸透がもたらされ、高濃度の活性作用物質が狭い面積に送達される。

40

【0117】

前記組成物は製造および保存の条件下で安定でなければならず、微生物、例えば細菌および真菌の汚染作用に対して保護されていなければならない。エンドトキシン混入は安全レベルに、例えば0.5 ng/mg未満のタンパク質に最低限に維持されるべきであることは認識されよう。

【0118】

特定の態様において、注射用組成物の長期吸収は組成物中に吸収を遅延させる作用物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、またはそれらの組合せなどを使用

50

することによってもたらされ得る。

【0119】

D. 併用療法

特定の態様において、本態様の組成物および方法は少なくとも1つの追加の治療との組合せでの抗原ペプチドまたは抗原特異的T細胞集団を伴う。追加の治療は放射線療法、手術（例えば、乳腺腫瘍摘出術および乳房切除術）、化学療法、遺伝子治療、DNA治療、ウイルス療法、RNA治療、免疫療法、骨髄移植、ナノ治療（nanotherapy）、モノクローナル抗体療法、または前述のものの組合せであり得る。追加の治療はアジュバント療法またはネオアジュバント療法の形態であり得る。

【0120】

いくつかの態様において、追加の治療は小分子酵素阻害物質または抗転移作用物質の投与である。いくつかの態様において、追加の治療は副作用制限作用物質（例えば、処置の副作用の発生および/または重症度を低減させることが意図された作用物質、例えば制嘔吐剤など）の投与である。いくつかの態様において、追加の治療は放射線療法である。いくつかの態様において、追加の治療は手術である。いくつかの態様において、追加の治療は放射線療法と手術の組合せである。いくつかの態様において、追加の治療はガンマ線照射である。いくつかの態様において、追加の治療は、PBK/AKT/mTOR経路を標的とする治療、HSP90阻害物質、チューブリン阻害物質、アポトーシス阻害物質、および/または化学予防剤である。追加の治療は当技術分野において公知の化学療法剤のうちの1つまたは複数であり得る。

【0121】

T細胞療法は追加のがん治療、例えば免疫チェックポイント療法の前、その間、その後、または種々の組合せで投与され得る。投与は同時進行から数分間～数日間～数週間までの範囲の期間であり得る。T細胞療法が患者に追加の治療用物質と別々に提供される態様において、一般的に、2つの化合物が患者に対して依然として好都合な複合効果を奏することができるように各送達時点間で有意な期間が過ぎないことが確実にされるようにされることが考えられる。かかる場合には、患者に抗体療法と抗がん治療が互いに約12～24または72時間以内、より特別には互いに約6～12時間以内に提供されることが想定される。いくつかの状況において、処置のための期間を有意に長くすることが望ましい場合があり得、その場合、それぞれの投与同士の間は数（2、3、4、5、6、または7）日間から数（1、2、3、4、5、6、7、または8）週間、経過させる。

【0122】

種々の組合せが使用され得る。以下の例では、抗原特異的T細胞療法が「A」であり、抗がん治療が「B」である：

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

。 40

【0123】

患者に対する本態様の任意の化合物または治療薬の投与は、かかる化合物の投与のための一般的なプロトコールに従い、これらの作用物質に毒性があればこれを考慮する。したがって、いくつかの態様では、併用療法に起因し得る毒性をモニタリングする工程がある。

【0124】

1. 化学療法

多種多様な化学療法剤が本態様により使用され得る。用語「化学療法」は、がんを処置するための薬物の使用を示す。「化学療法剤」は、がんの処置において投与される化合物または組成物を意味するために使用される。このような作用物質または薬物は、その細胞

50

内での活性の様式、例えば、細胞周期に影響を及ぼすかどうか、およびどの段階で細胞周期に影響を及ぼすかによってカテゴリ分類される。あるいはまた、作用物質は、DNAを直接架橋する能力、DNA内にインターカレートする能力、または核酸合成に影響を及ぼすことによって染色体異常および有糸分裂の異常を誘発する能力に基づいて特徴決定され得る。

【 0 1 2 5 】

化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド；アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン、例えばベンゾドパ、カルボコン、メツレドパおよびウレドパ；エチレンイミンおよびメチラメラミン（methyldiamine）、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド（triethiylenethiophosphoramidate）およびトリメチロロメラミン（trimethylolomelamine）；アセトゲニン（特に、プラタシンおよびプラタシノン）；カンプトテシン（例えば、合成アナログのトポテカン）；プリオスタチン；カリストアチン；CC-1065（例えば、そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成アナログ）；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（例えば、合成アナログKW-2189およびCB1-TM1）；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン（sarcodictyin）；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピシン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン、トロホスファミドおよびウラシルマスタード；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムヌスチン（ranimustine）；抗生物質、例えばエンジン系抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシン IIおよびカリケアミシンオメガ11）；ジネマイシン、例えばジネマイシンA；ピスホスホネート、例えばクロドロネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジン系抗生物質発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラルニシン（authrarnycin）、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabycin）、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス（chromomycinis）、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン（detorubicin）、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン（例えば、モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシン）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン（marcellomycin）、マイトマイシン、例えばマイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラルナイシン（nogalarnycin）、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチンおよびゾルピシン；代謝拮抗薬、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸アナログ、例えばデノプテリン、プテロプテリン（pteropterin）およびトリメトトレキサート；プリンアナログ、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリンおよびチオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピンおよびフロクスウリジン；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタンおよびテストラクトン；抗副腎薬（anti-adrenal）、例えばミトタンおよびトリロスタン；葉酸補給剤（replenisher）、例えばフォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル（bestrabucil）；ピサントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルホルミチン（elformithine）；酢酸エリプチニウム（elliptinium acetate）；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウ

10

20

30

40

50

レア;レンチナン;ロニダイニン (lonidainine);メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサミトシン;ミトグアゾン;ミトザントロン;モピダンモール (mopidanmol);ニトラエリン (nitraerine);ペントスタチン;フェナメット;ピラルピシン;ロソキサントロン;ポドフィリン酸;2-エチルヒドラジド;プロカルバジン;PSK多糖複合体;ラゾキサン;リゾキシン;シゾフィラン;スピロゲルマニウム;テヌアゾン酸;トリアジクオン;2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン;トリコテセン (特に、T-2トキシシ、ベラクリン (veracurin) A、ロリジンAおよびアングエイジン);ウレタン;ピンデシン;ダカルバジン;マンノムスチン;ミトプロニトール;ミトラクトール;ピボプロマン;ガシトシン (gacytosine);アラビノシド (「Ara-C」);シクロホスファミド;タキソイド、例えばパクリタキセルおよびドセタキセル ゲムシタピン;6-チオグアニン;メルカプトプリン;白金配位錯体、例えばシスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン;ピンラスチン;白金;エトポシド (VP-16);イホスファミド;ミトザントロン;ピンクリスチン;ピノレルピン;ノバントロン;テニポシド;エダトレキサート;ダウノマイシン;アミノプテリン;ゼローダ;イバンドロネート;イリノテカン (例えば、CPT-11);トポイソメラーゼ阻害物質RFS 2000;ジフルオロメチルオルニチン (DMFO);レチノイド、例えばレチノイン酸;カペシタピン;カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン (plicomycin)、ゲムシタピン、ナベルピン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害物質、トランス白金 (transplatinum)、ならびに上記のものの中のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。

10

20

【0126】

2. 放射線療法

DNA損傷を引き起こし、かつ広く使用されている他の因子としては、線、X線として一般的に公知のもの、および/または腫瘍細胞への放射性同位体の指向型送達挙げられる。他の形態のDNA損傷因子、例えばマイクロ波、陽子線照射 (米国特許第5,760,395号および同第4,870,287号) ならびにUV照射もまた想定される。このような因子はすべて、DNAに対する、DNAの前駆体に対する、DNAの複製および修復に対する、ならびに染色体の組織化および維持に対する広範な損傷に影響する可能性が高い。X線の線量範囲は、毎日50~200レントゲンの線量を長期間 (3~4週間) から2000~6000レントゲンの単回線量までの範囲である。放射性同位体の線量範囲は広く異なり、同位体の半減期、放射される放射線の強度および型ならびに新生物細胞による取込みに依存する。

30

【0127】

3. 免疫療法

当業者には、追加の免疫療法が本態様の方法と併用して、または本態様の方法とともに使用され得ることが理解されよう。がんの処置との関連において、免疫療法は一般的に、がん細胞を標的として破壊する免疫エフェクターである細胞および分子の使用に依存する。リツキシマブ (RITUXAN (登録商標)) はかかる一例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカースに特異的な抗体であり得る。前記抗体は単独で治療のエフェクターとしての機能を果たし得るか、または他の細胞を動員して実際に細胞殺作用に影響を及ぼし得る。また、抗体を薬物または毒素 (化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など) にコンジュゲートさせ、ターゲティング物質として使用してもよい。あるいはまた、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接的のいずれかで相互作用する表面分子を担持しているリンパ球であり得る。種々のエフェクター細胞としては細胞傷害性T細胞およびNK細胞が挙げられる。

40

【0128】

がん治療薬の開発に対する画期的なアプローチとして抗体-薬物コンジュゲートが登場している。がんは、世界中の主な死亡原因の1つである。抗体-薬物コンジュゲート (ADC) は、細胞殺作用薬物に共有結合により連結されたモノクローナル抗体 (MAb) を含む。このアプローチは、MAbのその抗原標的に対する高い特異性を高度に強力な細胞傷害薬と組み合わせ、濃縮されたレベルの抗原を有する腫瘍細胞にペイロード (薬物) を送達する「武装化」MAbをもたらす。また、前記薬物の標的送達によって正常組織内への曝

50

露が最小限になり、毒性の低下および治療指数の改善がもたらされる。2011年にADCE TRIS（登録商標）（ブレンツキシマブベドチン）および2013年にKADCYLA（登録商標）（トラスツズマブエムタンシンまたはT-DM1）の2つのADC薬のFDAによる承認によって前記アプローチが認定された。現在、30種類を超えるADC薬候補が、がん処置のための臨床試験の種々の段階である（Leal et al., 2014）。抗体操作およびリンカー-ペイロード最適化がますます成熟状態になりつつあるため、新たなADCの創薬および開発は、このアプローチに適した新たな標的の同定および検証ならびにターゲティングMAbの作製への依存が高まっている。ADC標的の2つの基準は、腫瘍細胞内での上方調節された/高い発現レベルおよびロバストな内在化である。

【0129】

10

免疫療法の一局面において、腫瘍細胞は、ターゲティングを受けやすい、すなわち大多数の他の細胞には存在しないいくつかのマーカーを担持していなければならない。多くの腫瘍マーカーが存在しており、その任意のものが本態様との関連におけるターゲティングに適切であり得る。一般的な腫瘍マーカーとしては、CD20、癌胎児性抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erb Bおよびp155が挙げられる。免疫療法の択一的な局面は、抗がん効果を免疫賦活効果と組み合わせることである。また、免疫賦活分子、例えば：サイトカイン、例えばIL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN、ケモカイン、例えばMIP-1、MCP-1、IL-8および増殖因子、例えばFLT3リガンドも存在する。

【0130】

20

現在治験中であるか、または使用されている免疫療法薬の例は、免疫アジュバント、例えばウシ型結核菌（*Mycobacterium bovis*）、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）、ジニトロクロロベンゼンおよび芳香族化合物（米国特許第5,801,005号および同第5,739,169号；Hui and Hashimoto, 1998；Christodoulides et al., 1998）；サイトカイン療法、例えばインターフェロン α 、 β 、 γ 、およびIL-1、GM-CSFならびにTNF（Bukowski et al., 1998；Davidson et al., 1998；Hellstrand et al., 1998）；遺伝子治療、例えば、TNF、IL-1、IL-2およびp53（Qin et al., 1998；Austin-Ward and Villaseca, 1998；米国特許第5,830,880号および同第5,846,945号）；ならびにモノクローナル抗体、例えば抗CD20、抗ガングリオシドGM2および抗p185（Hollander, 2012；Hanibuchi et al., 1998；米国特許第5,824,311号）である。1つまたは複数の抗がん治療薬が本明細書に記載の抗体療法薬とともに使用され得ることが想定される。

30

【0131】

いくつかの態様において、免疫療法薬は免疫チェックポイント阻害物質であり得る。免疫チェックポイントはシグナルを強める（例えば、共刺激分子）か、またはシグナルを弱めるかのいずれかである。免疫チェックポイントのブロックによって標的とされ得る阻害性免疫チェックポイントとしては、アデノシンA2A受容体（A2AR）、B7-H3（CD276としても公知）、BおよびTリンパ球減衰器（BTLA）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4、CD152としても公知）、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）、キラー細胞免疫グロブリン（KIR）、リンパ球活性化遺伝子-3（LAG3）、プログラム細胞死1（PD-1）、T細胞免疫グロブリン-ムチンドメイン3（TIM-3）ならびにT細胞活性化のVドメインIgサブレッサー（VISTA）が挙げられる。特に、免疫チェックポイント阻害物質はPD-1軸および/またはCTLA-4を標的とする。

40

【0132】

免疫チェックポイント阻害物質は薬物、例えば小分子、組換え形態のリガンドもしくは受容体であり得るか、または特に抗体、例えばヒト抗体である（例えば、国際特許公報WO2015016718；Pardoll, 2012；ともに参照により本明細書に組み入れられる）。免疫チェックポイントタンパク質またはそのアナログの公知の阻害物質が使用され得、特にキメラ化された、ヒト化された、またはヒト形態の抗体が使用され得る。当業者にはわかるように、本開示において言及した特定の抗体は択一的および/または等価な名称が使用さ

50

れている場合があり得る。かかる択一的および/または等価な名称は本開示との関連において互換的である。例えば、MK-3475およびペムブロリズマブの択一的および等価な名称のラムブロリズマブも知られていることは公知である。

【0133】

いくつかの態様において、PD-1結合アンタゴニストはPD-1のそのリガンド結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の一局面において、PD-1リガンド結合パートナーはPDL1および/またはPDL2である。別の態様において、PDL1結合アンタゴニストはPDL1のその結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の一局面において、PDL1結合パートナーはPD-1および/またはB7-1である。別の態様において、PDL2結合アンタゴニストはPDL2のその結合パートナーへの結合を阻害する分子である。特定の一局面において、PDL2結合パートナーはPD-1である。アンタゴニストは抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質またはオリゴペプチドであり得る。例示的な抗体は米国特許第8735553号、同第8354509号および同第8008449号に記載されており、すべて、参照により本明細書に組み入れられる。本明細書において提供される方法における使用のための他のPD-1軸アンタゴニストは当技術分野において公知であり、例えば、すべて参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20140294898号、同第2014022021号および同第20110008369号に記載のものである。

10

【0134】

いくつかの態様において、PD-1結合アンタゴニストは抗PD-1抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体）である。いくつかの態様において、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブおよびCT-011からなる群より選択される。いくつかの態様において、PD-1結合アンタゴニストはイムノアドヘシン（例えば、免疫グロブリン配列の定常領域（例えば、Fc領域に融合されたPDL1またはPDL2の細胞外部分またはPD-1結合部分を含むイムノアドヘシン）である。いくつかの態様において、PD-1結合アンタゴニストはAMP-224である。MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558およびOPDIVO（登録商標）としても公知のニボルマブは、WO2006/121168に記載の抗PD-1抗体である。MK-3475、Merck 3475、ラムブロリズマブ、KEYTRUDA（登録商標）およびSCH-900475としても公知のペムブロリズマブは、WO2009/114335に記載の抗PD-1抗体である。hBATまたはhBAT-1としても公知のCT-011は、WO2009/101611に記載の抗PD-1抗体である。B7-DCIgとしても公知のAMP-224は、WO2010/027827およびWO2011/066342に記載のPDL2-Fc融合可溶性受容体である。

20

30

【0135】

本明細書において提供される方法において標的とされ得る別の免疫チェックポイントは、CD152としても公知の細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）である。ヒトCTLA-4の完全cDNA配列はGenbankアクセッション番号L15006を有する。CTLA-4はT細胞の表面上にみられ、抗原提示細胞の表面上のCD80またはCD86に結合している場合、「オフ」スイッチとしての機能を果たす。CTLA4は、ヘルパーT細胞の表面上に発現され、かつT細胞に阻害性シグナルを伝達する免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。CTLA4はT細胞共刺激タンパク質CD28と類似しており、どちらの分子も、抗原提示細胞上のそれぞれB7-1およびB7-2とも称されるCD80およびCD86に結合する。CTLA4はT細胞に阻害性シグナルを伝達するが、CD28は刺激性シグナルを伝達する。また、細胞内CTLA4は制御性T細胞にもみられ、前記細胞の機能にとって重要であり得る。T細胞受容体およびCD28を介するT細胞活性化により、B7分子の阻害性受容体であるCTLA-4の発現上昇がもたらされる。

40

【0136】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害物質は抗CTLA-4抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、もしくはキメラ抗体）、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質またはオリゴペプチドである。

【0137】

50

本方法における使用に適した抗ヒト-CTLA-4抗体（あるいはこれに由来するVHおよび/またはVLドメイン）は、当技術分野において周知の方法を用いて作製され得る。あるいはまた、当技術分野で認知されている抗CTLA-4抗体が使用され得る。例えば：US8,119,129、WO01/14424、WO98/42752；WO00/37504に開示された抗CTLA-4抗体（トレメリムマブ；以前はチシリムマブとしても公知のCP675,206）、米国特許第6,207,156号；Hurwitz et al., 1998；Camacho et al., 2004；およびMokyr et al., 1998に開示された抗CTLA-4抗体が本明細書に開示された方法において使用され得る。前述の各刊行物の教示は参照により本明細書に組み入れられる。また、CTLA-4に対する結合についてこのような当技術分野で認知されている任意の抗体と競合する抗体も使用され得る。例えば、ヒト化CTLA-4抗体は国際特許出願番号WO2001014424、WO2000037504、および米国特許第8017114号に記載されており；すべて参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0138】

例示的な抗CTLA-4抗体はイピリムマブ（10D1、MDX-010、MDX-101およびYervoy（登録商標）としても公知）またはその抗原結合断片ならびにバリエーション（例えば、WO01/14424参照）である。他の態様において、前記抗体はイピリムマブの重鎖および軽鎖のCDRまたはVRを含む。したがって、一態様において、前記抗体はイピリムマブのVH領域のCDR1、CDR2およびCDR3ドメインならびにイピリムマブのVL領域のCDR1、CDR2およびCDR3ドメインを含む。別の態様において、前記抗体は結合について上記の抗体と競合する、および/またはCTLA-4上の上記の抗体と同じエピトープに結合する。別の態様において、前記抗体は、上記の抗体との少なくとも約90%の可変領域アミノ酸配列同一性（例えば、イピリムマブとの少なくとも約90%、95%、または99%の可変領域同一性）を有する。

20

【0139】

CTLA-4を調節するための他の分子としては、例えばすべて参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5844905号、同第5885796号ならびに国際特許出願番号WO1995001994および同WO1998042752に記載のCTLA-4リガンドおよび受容体ならびに例えば参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8329867号に記載のイムノアドヘシンが挙げられる。

【0140】

4. 手術

がんを有する人のおよそ60%は、なんらかの型の手術を受け、その型としては、予防的手術、診断またはステージ判定のための手術、治癒的手術および姑息手術が挙げられる。治癒的手術は、がん性組織の全部または一部を物理的に除去、摘出および/または破壊する切除を含み、他の治療、例えば本態様の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子治療、免疫療法および/または択一的な治療とともに使用され得る。腫瘍切除は腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を示す。腫瘍切除に加えて、手術による処置としては、レーザー手術、凍結手術、電気手術および顕微鏡下手術（モーズ手術）が挙げられる。

30

【0141】

がん性の細胞、組織、または腫瘍の一部または全部を摘出したら、体内に空洞が形成され得る。処置は、その領域への追加の抗がん治療薬の灌流、直接注射、または局所性適用によって行なわれ得る。かかる処置は、例えば1日毎、2日毎、3日毎、4日毎、5日毎、6日毎、もしくは7日毎、または、1週間毎、2週間毎、3週間毎、4週間毎、および5週間毎、または、1ヶ月毎、2ヶ月毎、3ヶ月毎、4ヶ月毎、5ヶ月毎、6ヶ月毎、7ヶ月毎、8ヶ月毎、9ヶ月毎、10ヶ月毎、11ヶ月毎、もしくは12ヶ月毎に反復され得る。このような処置は、投薬量も同様にさまざまであり得る。

40

【0142】

5. 他の作用物質

処置の治療有効性を改善するために他の作用物質が本態様の特定の局面との組合せで使用され得ることが想定される。このような追加の作用物質としては、細胞表面受容体およ

50

びギャップ結合の上方調節に影響を及ぼす作用物質、細胞増殖抑制剤および分化剤、細胞接着の阻害物質、アポトーシス誘導剤に対する過剰増殖性細胞の感受性を高める作用物質または他の生物製剤が挙げられる。ギャップ結合の数を増やすことによる細胞間シグナル伝達の亢進により、近隣の過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖効果が高くなると考えられる。他の態様において、細胞増殖抑制剤または分化剤は、処置の抗過剰増殖有効性を改善するために本態様の特定の局面との組合せで使用され得る。細胞接着の阻害物質は本態様の有効性を改善することが想定される。細胞接着阻害物質の例は焦点接着キナーゼ（FAK）阻害物質およびロバスタチンである。アポトーシスに対する過剰増殖性細胞の感受性を高める他の作用物質、例えば抗体c225が処置の有効性を改善するために本態様の特定の局面との組合せで使用され得ると考えられることがさらに想定される。

10

【0143】

IV. 製造物品またはキット

また、抗原特異的T細胞またはTCRを備えた提供される製造物品またはキットが本明細書において提供される。製造物品またはキットは、個体のがんを処置するため、もしくはその進行を遅延させるため、またはがんを有する個体の免疫機能を向上させるために抗原特異的T細胞を使用するための指示を含む添付文書をさらに備えていてもよい。本明細書に記載の任意の抗原特異的T細胞が製造物品またはキットに含まれ得る。好適な容器としては、例えばビン、バイアル、バッグおよびシリンジが挙げられる。容器は、さまざまな材質、例えばガラス、プラスチック（例えば、ポリ塩化ビニルもしくはポリオレフィン）または金属合金（例えば、ステンレス鋼もしくはハステロイ）で形成されたものであり得る。いくつかの態様において、容器には製剤が保持され、容器上または容器に付随したラベルに使用のための指示が示され得る。製造物品またはキットは、市販品およびユーザーの見地から望ましい他の物質、例えば他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジおよび使用のための指示を含む添付文書をさらに含み得る。いくつかの態様において、製造物品は1つまたは複数の別の作用物質（例えば、化学療法剤および抗新生物剤）をさらに含む。前記1つまたは複数の作用物質のための好適な容器としては、例えばビン、バイアル、バッグおよびシリンジが挙げられる。

20

【実施例】

【0144】

V. 実施例

30

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含めている。当業者には、以下の実施例に開示した手法は、本発明者が諸態様の実施において十分に機能することを見出した手法であり、したがって、その実施のための好ましい実施形態を構成しているとみなされることが認識されよう。しかしながら、当業者には、本開示に鑑みて、開示されている具体的な態様において多くの変更が行なわれ得、それでもなお、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく類似または同様の結果が得られることが認識されよう。

【0145】

実施例1 - Vestigial様1は膵臓がんおよび基底細胞様乳がんによって発現される共通のターゲティング可能ながん-胎盤抗原である

PDAC患者の腫瘍のイムノペプチドーム解析により腫瘍関連ペプチドを同定する:PDACのCTLベースの免疫療法のためのペプチド標的を同定するため、M.D.アンダーソンがんセンターで処置された35人のPDAC患者に由来する39例の腫瘍検体を解析した。これには、3例の患者由来の異種移植片（PDX）および転移に由来する2例の類器官細胞株に加えて、34例の摘出されたばかりの手術検体（20例の転移性腫瘍および14例の原発腫瘍）を含めた。腫瘍細胞を溶解させ、全HLAクラスI免疫沈降および酸溶出に供した後、タンデム質量分析（MS）を行ない、HLA結合ペプチドを解析した。溶出ペプチドのフラグメンテーションスペクトルをSwiss-Protデータベース（2018年9月にアップデート）で検索し、ヒトプロテオーム内にコードされたマッチを同定した。個々のペプチドマッチを、いくつかのオルトゴナルパラメータ、例えばMascot Ionスコア、MS1質量差（質量）を用いて評価し、高分解能遺伝子シーケンシングによって測定されるような患者

40

50

のHLAアロタイプに対する結合を予想した。さらなる検証および治療TAA標的としての潜在的好適性を、全ペプチドコード遺伝子を(1)RNAseqによって測定される患者の腫瘍組織転写物発現、(2)正常組織転写物発現(GTex Portalデータベース)および(3)腫瘍組織における全発現(TCGAデータベース)について評価することによって判定した(図1A)。

【0146】

免疫沈降したHLAクラスIの量は、解析した新鮮腫瘍検体のサイズと相関していた($R^2 = 0.79$)が8例の腫瘍(21.6%)は例外であり、これらは、ウエスタンブロット解析による評価時、比較的低いHLAクラスI発現を示した(図7、表1)。予想どおり、HLAクラスIタンパク質レベルは、溶出ペプチドとSwis-Protデータベースとのマッチの数と相関した($R^2 = 0.62$ 、図8)。全体的に、解析した39例の腫瘍検体では、合計23,245個のユニークな高信頼度ペプチド具体物が得られ、そのうち7,966個のペプチド(34.3%)は、1つまたは複数の患者HLAクラスIアロタイプに結合することが予想される8量体~13量体ペプチドであった。新鮮腫瘍検体では、238~1657の範囲(平均=542)の変動が大きい数のペプチドが得られた。3人の患者では、PDX誘導体化によって、より大きな腫瘍検体を得、3つのすべての場合で、より多くの数の溶出ペプチドが得られた。2例の患者由来類器官細胞株のうちの1つ(MP015)では、全体で最も多くの数の溶出ペプチドが得られ($n = 1903$)、MS解析の前に腫瘍検体をインピットロで増大させることによってもたらされる定量上の利点をはっきりと示された(表2、図8)。

10

20

【0147】

(表2)2例のHLA-A*0101+PDAC患者腫瘍類器官から溶出されたVGLL1由来ペプチド

患者識別番号	溶出ペプチド	ソース遺伝子	マッチランク	腫瘍RNA発現(RNAseq, TPM)	HLA結合親和性予測値(nM)					
					A*0101	A*2601	B*3502	B*3801	C*0401	C*1203
C1203	LSELETPGKY	VGLL1	1	77.53	A*0101	A*2601	B*3502	B*3801	C*0401	C*1203
					51	12558	33903	29369	30164	6181
MP081	LSELETPGKY	VGLL1	1	56.39	A*0101	A*0101	B*3502	B*5701	C*0401	C*0602
					51	51	33903	11936	30164	35852

30

【0148】

ペプチドコード遺伝子の発現プロファイリングによりVGLL1が新規な膵臓がんTAAとして同定される:いずれかの溶出ペプチドが潜在的な治療用CTLの標的を構成しているかどうかを評価するため、ペプチドコード遺伝子を、>50例の異なるヒト組織に由来するRNAseqデータを含むGTex Portalデータベースを参照して正常組織転写物発現について個々に評価した。正常組織(精巣を除く)を、抗原特異的CTLによるオフターゲット殺作用活性から予想される潜在的毒性を反映する4つの群にカテゴリー分類した(表2)。次いで、ペプチドコード遺伝子を、CTL療法との関連において最も自己免疫毒性を惹起する可能性が高い候補TAAを排除するために漸増ストリンジェンシーの4つの対応する発現フィルターを用いてスクリーニングした(図1B)。したがって、非必須組織(例えば、前立腺、乳房および脂肪組織)では最大30 TPMまでのTAA転写物発現を許容したが、高度に必須の組織、例えば心臓および脳では、CTLによる認識が致命的となり得るため、最大発現閾値を1 TPMとした。このようなストリンジェント基準を使用し、12種類のTAAペプチドがターゲティングするのに非常に安全であるとみなされ、これらのペプチドをコードしている遺伝子はMUC16(5つのユニークペプチドをコードしている)、MUC19、ZNF717、EIF5AL1、RGPD1、SLC30A8、MIA2およびVGLL1(各々、1つのユニークペプチドをコードしている)であった。また、TAA MSLNおよびIDO1

40

50

にコードされたペプチドも検出されたが、正常肺組織においてRNA転写物発現が高値であるためスクリーニングでは除外した（それぞれ、88 TPMおよび16 TPM、図1B）。ターゲティングするのに非常に安全であるとみなされたTAAの中でも、2つのペプチド（MIA2およびVGLL1に由来）のみが1人より多くのPDAC患者の腫瘍によって提示されていることがわかった（表2）。

【0149】

VGLL1に固有にコードされた10量体ペプチドLSELETPGKY（SEQ ID NO:93）がPDAC患者由来類器官細胞株MP015-OrgおよびMP081-Orgの両方から溶出された。このペプチドは、高い親和性でHLA-A*0101に結合すると予想され（51 nM）、RNAseq解析により、両方の類器官系において高いVGLL1転写物発現が確認された（表2）。ペプチド同一性を、合成ペプチドを類器官の腫瘍関連ペプチドとの混合物の一部として解析するターゲットLC-MSによって確認した。図1Cに示されるように、合成の同位体標識ペプチドLSELETPGKY（SEQ ID NO:93）では、PDAC類器官系MP015-OrgおよびMP081-Orgで検出された天然状態のVGLL1ペプチドと非常に類似したフラグメンテーションスペクトルが生成し、また、ほぼ同一のLC-MS保持時間で検出された。2つの追加のHLA-A*0101発現細胞株（PANC10.05およびBXPC3）におけるターゲットMS解析により、PANC10.05でも同じペプチドが検出され得ることが示され、LSELETPGKY（SEQ ID NO:93）は広く共有されたTAAを構成している可能性があることが示唆された（図9）。

【0150】

VGLL1は複数の型のがんによって発現されかつ不良な全生存期間と関連している:TONDUとしても公知のVGLL1は最初、羽の発生の重要な調節因子であるショウジョウバエのVestigial (Vg) タンパク質のヒトホモログとして同定された。VGLL1は、がんの発生に関与しているTEAドメイン転写因子ファミリー（TEF）に結合する転写コアクチベータであるため、VGLL1転写物発現を、TCGAに示された31の型のがんにおいてさらに調べた。図2Aに示されるように、ほとんどの正常組織との比較において、VGLL1は、いくつかの異なるがん、例えばPDAC、膀胱がん、卵巣がん、乳がん、肺がんおよび胃がんにおいて過剰発現される。興味深いことに、VGLL1は基底細胞様乳がんにおいて優先的に発現されるようであるが、他の乳がんサブタイプでは比較的低い保有率が示される（図10）。同様のプロファイルが、Cancer Cell Line Encyclopediaに示された腫瘍細胞株の遺伝子発現解析によって確認された（CCLE、図11）。GTex RNAseqデータベースによれば、最も高いVGLL1転写物発現中央値は3つの非必須組織:膀胱（15.3 TPM）、唾液腺（3.9 TPM）および乳房（1.3 TPM）においてみられた。必須組織におけるVGLL1転写物発現の最高レベルは正常な肺（1.0 TPM）、食道（0.73 TPM）および腎臓（0.34 TPM）においてであったが、心臓および脳組織におけるVGLL1発現は事実上、検出不可能であった（図2A）。総合すると、このデータにより、VGLL1は、複数の型のがんの安全なターゲティング可能なTAAを構成している可能性があることが示唆された。

【0151】

次に、腫瘍のVGLL1転写物発現ががん患者の生存期間と関連しているかどうかを評価した。図2Bに示されるように、TCGAのPDAC患者の生存期間（n = 179）はVGLL1発現と逆相関していることがわかった:高発現を有する患者は、低発現を有するか、または発現がない患者と比べて有意に短い全生存期間の中央値を有した（16ヶ月間対37ヶ月間、p = 0.001）。これを、PDX組織が由来し得る37人のM.D.アンダーソンのPDAC患者の独立したコホートにおいて確認した:18ヶ月より少ない全生存期間を示す患者では、36ヶ月より長く生存した患者と比べて有意に高い平均PDX VGLL1発現が示された（57.3 TPM対9.6 TPM、p = 0.003、図2C）。VGLL1転写物発現がPDAC腫瘍細胞株およびPDX組織において、外科的に切除されたPDAC腫瘍と比べてかなり高いことがわかったことは注目に値し、おそらく多くのインサイチュ-PDAC腫瘍は間質含有量が高いためである（図2A、2C、表2）。また、非常に高値のVGLL1発現は乳がん（p = 0.037）お

10

20

30

40

50

よび胃がん ($p = 0.047$) においても短い全生存期間と関連していたが、卵巣がんでは生存期間との関連は示されなかった (図13)。興味深いことに、VGLL1の低発現または発現なしは、膀胱がんにおいて短い生存期間と関連していた ($p = 0.036$)。考えられ得る説明の1つは、VGLL1などの正常な膀胱組織抗原の減少が、膀胱がんおよび多くの他の腫瘍型の予後不良と関連している腫瘍の脱分化を示している可能性があるということである。

【0152】

VGLL1は治療潜在能を有するユニークな一群のがん-胎盤抗原 (CPA) の一部である: VGLL1は以前に、ヒト胎盤発生の初期事象の際に調節的役割を有することが確認されており、増殖性栄養膜細胞の特異的マーカーである。これに従い、7例のヒト胎盤試料のRNAseq遺伝子発現データにより、VGLL1は、広いマージンによりこの組織において最も高発現を示し (平均 = 302.7 TPM)、その正常な膀胱での発現よりほぼ20倍高いことが示された (図3A)。これにより、がん-胎盤抗原 (CPA) は、CTLベース療法により成功裡に標的とされているがん-精巢抗原 (CTA) と同様のターゲティング可能なTAAの相違するカテゴリーを構成している可能性があるという見解を探索するに至った。VGLL1と同様の発現プロファイルを有する他のCPAを同定するため、GTex、TCGAおよび他のRNAseqデータベースを、以下の属性: (1) 胎盤において最も高い正常組織での発現; (2) 他の正常組織において低発現から発現なし; ならびに (3) 膵臓がん、乳がん、膀胱がんおよび/または卵巣がんにおいて高値発現を示す遺伝子について検索した。この検索により、以前にがん患者において体液性抗腫瘍免疫の標的であることが確認された胎盤特異的1 (PLAC1) を含む9つの追加の遺伝子が得られた。

10

20

【0153】

興味深いことに、妊娠中に胎盤栄養膜によって産生される絨毛性ゴナドトロピン (CG) ホルモン複合体の成分であるCG サブユニット3および5 (CGB3/CGB5) もまた、膵臓がん、精巢がん、子宮がんおよび膀胱がんのサブセットにおけるその過剰発現のため、潜在的CPAであることが確認された (図3B)。その他の6つの推定CPAでは、限られた一群の型のがんにおいてのみみられるもの (IGF2BP3、ADAM12) から、ほとんどの型のがんにおいて過剰発現されるだけでなく、正常な女性生殖組織でも高値発現を示すもの (CAPN6、MMP11) まで多岐にわたる多様な発現プロファイルが示された (図3、14~23)。

30

【0154】

これらの遺伝子に由来するペプチドがこの一群のPDAC検体において検出されたが、これらの推定CPAのうちのいくつかのエピトープは複数の腫瘍型において同定されており、Immune Epitope Database (IEDB) に示されている。

【0155】

VGLL1特異的細胞傷害性T細胞をPDAC患者MP015の末梢血から増大させた:患者MP015は、2011年12月に原発性PDACであると最初に診断されたとき50歳の男性であった。原発膵臓腫瘍の外科的除去後2年目、左肺病変の胸腔鏡下楔状切除が2013年11月に行なわれ、類器官細胞株MP015-Orgの誘導に使用された。患者の疾患は一連の化学療法レジメンによってその後ほぼ2年間は抑えられたが、進行後、この患者は、自己由来増大腫瘍抗原特異的CTLを受けるためにM.D.アンダーソンでのIRB承認済み細胞療法プロトコルに登録された。この増大類器官細胞株に対してイムノペプチドーム解析が行なわれた。

40

【0156】

2015年5月のMP015-Orgにより、安全でターゲティング可能なTAAという基準を満たす6つのHLAクラスI結合ペプチド (MUC16に由来する4つと、ZNF717およびVGLL1に由来する1つずつ) の同定がもたらされた (図1Bおよび表2)。この6つの潜在的標的のうち3つ: 2つのHLA-B*3502拘束性MUC16ペプチドおよび1つのHLA-A*0101拘束性VGLL1ペプチドの臨床グレードのカスタム四量体が入手可能であった。

【0157】

50

白血球アフェレーシス後、患者MP015のPBMCを、個々のペプチドパルスDCを用いてIL-21の存在下で2回刺激した後、抗原特異的CD8+ T細胞の四量体ベース選別を行なった(図4A)。MUC16特異的CTLは患者のPBMCから増大できなかったが、VGLL1 CTLは成功裡に増大し、VGLL1四量体陽性T細胞は、2週間のDCペプチド刺激後、3.4%のCD8+を含んでいた(図4B)。細胞選別の後、急速増大プロトコール(REP)の使用を2回繰り返し、ほぼ200億個の増大CTLが得られ、そのうち>90%はVGLL1四量体陽性であり、V 使用の拘束が示された(図4BおよびC)。また、VGLL1特異的CTLは2例の健常HLA-A*0101陽性血液ドナーのうち2例からも成功裡に増大し、LSELETPGKY(SEQ ID NO:93)ペプチドの一般免疫原性が示された(図14)。

【0158】

患者MP015由来の増大したCTLを、標準的な⁵¹Cr放出アッセイを用いて機能試験した。Mel888黒色腫細胞(VGLL1陰性、HLA-A*0101陽性)を、用量設定された量のVGLL1ペプチドでパルス処理すると、10 nMという低いペプチド濃度でCTLによる認識および殺作用が誘起され、コグネートペプチドに対する比較的高い親和性が示された(図4D)。重要なことに、増大した患者由来CTLはまた、VGLL1ペプチドがMSによって初めに検出された自己由来類器官細胞株MP015-Orgのロバストな認識を示した(図5A)。シトキサンの前処置レジメンの後の2015年10月、患者MP015に196億個の自己由来の増大したVGLL1特異的CTLを輸注し、続いてインターロイキン-2およびペムプロリズマブを投与した。患者に一過性の発熱(T細胞輸注誘導性サイトカイン放出のよくある副作用)が起こったが、CTL媒介性毒性の可能性を示す有害事象は起こらなかった。

【0159】

残念ながら、2015年11月下旬のスキャンで、肺病変区間の増加および胸膜由来の転移性疾患として顕在化した急速な疾患進行が示された。驚くべきことに、この時点で採取された胸膜由来小瘤の生検により、低分化神経内分泌腫瘍が明らかになった。先の18ヶ月間にわたって採集された一連の液状生検材料のDNAシーケンシング解析により、数多くの進行性の遺伝子の増幅、欠失、再編成および後成的変化による患者MP015のがんの極めて急速な進展のエビデンスが得られた。また、肺転移のRNAseq解析により、2013年11月から2015年12月の間にVGLL1転写物発現の劇的な低減(35.1 TPMから1.6 TPMに)が起こったことが示され、ETC療法に対する臨床応答の欠如の説明となる可能性が示された(図14)。患者MP015は、肺転移の進行に由来する広範な合併症のため2016年1月に亡くなった。

【0160】

VGLL1特異的CTLは複数の同種異系PDAC腫瘍細胞株に対して細胞傷害性を示す:患者MP015は自身のVGLL1特異的CTLの養子移入による臨床的有益性が得られなかったが、このようなT細胞によってインビトロで示されたロバストな抗腫瘍活性により、これが他のPDAC患者に対して治療潜在能を有し得るかどうかを探索するに至った。HLA-A*0101はPDAC患者コホートの約30%によって発現され、TCGAおよびMDACCのPDAC手術検体およびPDXのRNAseq解析により、患者の43.2%~62.5%でVGLL1転写物が>5 TPMのレベルで発現されることが示された。このようなデータから、PDAC患者の12%~15%がHLA-A*0101との関連におけるLSELETPGKY(SEQ ID NO:93)ペプチド標的を提示し、したがって、VGLL1-CTL療法の恩恵を場合によっては受けることができるという可能性が推定される。

【0161】

患者MP015に由来するVGLL1-CTLが同種異系PDAC腫瘍を認識することができるかどうかを調べるため、PDAC腫瘍細胞株を発現しているHLA-A*0101のパネルを殺作用の標的として、⁵¹Cr放出アッセイを用いて試験した。ウエスタンブロット解析を用いてVGLL1タンパク質発現を確認し、フローサイトメトリーを用いて細胞株におけるHLA-A*0101の表面発現を確認した(図15)。対照細胞株WM793(VGLL1陰性、HLA-A*0101陽性)は認識されなかったが、VGLL1特異的CTLは自己由来MP015-Org細胞および試験した4つの同種異系PDAC株のうち4つを認識し、例えばPANC-1005、CAPAN

10

20

30

40

50

-1およびBXPC3のロバストな殺作用を誘導した(図5Aおよび5B)。また、患者MP081に由来するPDAC類器官細胞もVGLL1-CTLによって溶解されたが、おそらく、培養物内でのVGLL1陰性細胞の増生のため効率は低かった。VGLL1-CTL特異性はpan-MHCクラスI抗体W6/32との共インキュベーションによって示され、これによりPANC10.05の認識および溶解のブロックがもたらされた(図27)。総合すると、このような結果は、LSELETPGKYペプチドが、VGLL1特異的CTLを用いて有効に標的とされ得る共通PDAC腫瘍抗原を構成しているというエビデンスを示す。

【0162】

VGLL1-CTLは複数の型の腫瘍に対する活性および低い初代細胞認識を示す:TCGAのRNAseqデータ解析により、VGLL1はいくつかの型のがん(31種類のうち16種類)によって発現され、非常に注目すべきことに、膀胱がん、卵巣がんおよび基底細胞型乳がんを有する患者の75~80%ならびに肺がんおよび胃がんを有する患者の15~20%で発現されることが示された(図3B)。したがって、これらの型のがんに由来する細胞株がVGLL1特異的CTLの標的となり得るかどうかを調べることに着手した(図6A)。卵巣がん細胞株、基底細胞型乳がん細胞株、膀胱がん細胞株、胃がん細胞株および肺がん細胞株のパネルのウエスタンブロット解析により、解析した14の細胞株のうち12の細胞株で高いVGLL1発現が示された(図6B)。天然状態でHLA-A*0101を発現する8つの細胞株のうち、VGLL1-CTLは、3つの卵巣がん細胞株のうち2つ、3つの乳がん細胞株のうち2つ、および2つの膀胱がん細胞株のうち2つ、ならびに肺がん細胞株に対して殺作用を示した(図6A)。5つの追加のHLA-A*0101陰性細胞株(2つの胃がん細胞株、2つの膀胱がん細胞株および1つの肺がん細胞株)が、HLA-A*0101を発現するように形質導入された後、VGLL1-CTLの標的としてのこれらを試験した。図6Aに示されるように、5つのHLA-A*0101形質導入細胞株はすべて、VGLL1-CTLによる殺作用に感受性となり、プロセッシングされた内因性発現VGLL1タンパク質由来のLSELETPGKY(SEQ ID NO:93)ペプチドの提示が示された。総合すると、このような結果により、VGLL1-CTLは、PDACの他に少なくとも5つの追加の型のがんに対して潜在的治療価値を有することが示唆される。

【0163】

治療的使用の可能性のためのVGLL1-CTLの安全性を評価するため、これを、GTex正常組織での発現プロファイルによるとVGLL1特異的反応性を誘起する可能性が非常に高い正常初代細胞のパネルに対して試験した(図2A)。膀胱が最も高い正常組織VGLL1転写物発現が示されたため、2つの異なるHLA-A*0101陽性初代膀胱細胞株をVGLL1-CTL殺作用の標的として試験した。図6Cに示されるように、特異的溶解は低く、1例の膀胱細胞株で検出可能であったが最も高いE:T比においてのみであった。GTexデータベースでは、VGLL1転写物が正常な乳房および肺でも低レベルで発現されることが示されたため、VGLL1-CTL殺作用活性を、HLA-A*0101発現初代乳腺細胞および肺気道細胞ならびに陰性対照として初代メラノサイトに対して試験した。このパネルのうち、乳腺細胞では、VGLL1特異的CTLによって中程度に高レベルの殺作用が誘起され、ウエスタンブロットによる評価時のVGLL1タンパク質レベルと整合する結果であった(図6D)。対照的に、肺気道上皮細胞は、十分なHLA-A*0101表面発現を示すにもかかわらずVGLL1-CTLによる殺作用は示されなかった(図15)。このような結果は、VGLL1特異的T細胞が必須の正常組織を認識する可能性は低いというエビデンスを示すが、しかしながら、いくつかの非必須組織に対する反応性の可能性のため安全性の懸念は妥当であり得る。

【0164】

35人のPDAC患者に由来する腫瘍検体の公正な免疫ペプチドーム解析を使用し、VGLL1は、必須正常組織との比較において、腫瘍での発現に関してMUC16に次いで第2位にランキングされる新規な推定共通TAAであることが確認された。しかしながら、MUC16エピトープとは対照的に、HLA-A*0101拘束性VGLL1ペプチドの方が、免疫原性がかなり高く、1人のPDAC患者を含む複数のPBMCドナー由来の抗原特異的CTLを誘起することができた。かかる免疫原性により、がん患者のための内在性T細胞(ETC)療法薬の

開発との関連における大きな利点をもたらされる。HLA-A*0101は西欧諸国および北米の国において比較的高い保有率(25~30%)で発現され、このような患者集団が、このエピトープを標的とすることについての恩恵を受ける可能性が高いと考えられるということが示唆される⁵²。増大したVGLL1特異的CTLは、同種異系PDAC腫瘍細胞株のパネルを認識して殺作用を示しただけでなく、5つの他の型のがん由来するA*0101発現腫瘍細胞に対する反応性も示した。この単一のVGLL1エピトープを標的とすることにより、大量数の西洋人がん患者、例えば、卵巣がん、膀胱がんまたは基底細胞様乳がんを有する患者の20%超、PDACを有する患者の約12%および肺がん、胃がん、子宮頸がん、子宮がんまたは頭頸部がんを有する患者の5~10%が恩恵を受けることができると考えられるという可能性が推定される(図3)。

10

【0165】

実施例2 - 材料および方法

細胞株。VGLL1 mRNA発現を示すヒトがん細胞株は、Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)のマイクロアレイベースの遺伝子発現解析を用いて確認した。HLA-A*0101発現がん細胞株PANC10.05、CAPAN-1 OAW28、HT1197、HT1376、BXP3、UBCL-1および初代細胞株は市販の供給元(ATCCおよびSigma-Aldrich)から入手した。患者由来類器官細胞株MP015-Org(hMIA2D)は、コールド・スプリング・ハーバー研究所のTuveson研究室で既報³³のとおりにより作製された。患者由来類器官細胞株MP081-OrgはMaitra研究室で、楔状生検材料由来する腫瘍組織から作製された。胃がん細胞株GT-5およびMKN74はDr. Lee Ellisからのご厚意による戴き物であった。WM793、MKN74、PANC1005、GT-5およびOAW28細胞は、10%のウシ胎仔血清、1%のペニシリン-ストレプトマイシン(Pen-Strep)(Cellgrow)および1%のインスリン-トランスフェリン-セレウム(Seleum)-A(GIBCO)を含むRPMI 1640培地(GIBCO)中で培養した。BT20および膀胱細胞株は、FBS、Pen-Strepおよび1%のビルビン酸ナトリウム(GIBCO)を含む同じ割合のDMEM F12KとMEM Alpha中で培養した。他の細胞株はすべて、HEPES(GIBCO)およびGlutamax(GIBCO)を添加したRPMI 1640、FBSおよびPenn-strep中で培養した。

20

【0166】

レンチウイルス形質導入。VGLL1タンパク質を天然に発現するいくつかのHLA-A*0101陰性腫瘍細胞株に、ヒトPGKプロモーターによって駆動されるHLA-A*0101を発現するためのレンチウイルス遺伝子導入ベクターを既報のとおりにより形質導入した(Bradley et al., 2015)。A*0101の異所性細胞表面発現を抗ヒトHLA-A1-ビオチンおよびストレプトアビジン-FITC(US Biological)での染色ならびにFACSanto IIフローサイトメーター(BD Biosciences)を用いた蛍光測定によって評価した。生理学的同等レベルの表面HLA-A*0101を発現している腫瘍細胞を細胞選別によって単離し、後続の実験で使用した。

30

【0167】

VGLL1タンパク質発現。VGLL1タンパク質発現は、すべての細胞株でウエスタンブロット解析によって確認した。腫瘍および初代細胞株から細胞ライセートを調製し、タンパク質含有量を、BCA法(Thermo-Fisher)を用いて正規化した。標準的なウエスタンブロット手法を使用し、細胞ライセートをポリアクリルアミドゲル電気泳動によって移動させ、転写し、膜を、VGLL1特異的ウサギポリクローナル抗体(TA322329、OriGene)を用いてプローブ結合した。VGLL1タンパク質を、酵素連結抗ウサギmAbを用いて、Scientific Pierce Fast Western Blot Kitにより製造業者の指示に従って可視化した。

40

【0168】

ペプチドの同定、選択、および検証。患者由来の腹腔鏡下楔状生検材料、異種移植片(PDX)または細胞株を、Triton X-100を用いて溶解させ、細胞ライセートを4で一晩、タンパク質10 mgに対して1 μgのpan-HLA-ABC特異的mAb W6/32とともにインキュベートした。Protein A/G Ultralink樹脂ビーズを用いてHLAクラスI分子を免

50

疫沈降させ、次いでHLA結合ペプチドを、0.1M酢酸を用いて溶出させた。HLA-A、B、Cの単離をウエスタンブロット解析によって確認し、次いでHLA陽性溶出物をタンデム質量分析(MS/MS)によって解析した。HLAクラスIタンパク質の回収を、ウエスタンブロットのバンド強度を0(検出可能でない)から4(最も高強度)までのスケールで等級分けすることによって半定量的に評価した。腫瘍関連HLA結合ペプチドをHPLCシステム(Dionex 3000 RSLC)にインジェクトし、MS/MS検出フェーズ(discovery phase)の1.8 μ m C18(Agilent Technologies)で0.1%のギ酸含有水-アセトニトリルの逆相クロマトグラフィーによって分離した。ペプチドをOrbitrap Elite質量分析計(Thermo-Fisher)で、データ依存型取得を用いて解析した。取得されたMS/MSスペクトルを解析するため、Mascotアルゴリズムを用いて、SwissProt完全ヒトタンパク質データベース(2018年9月にアップデート)に対してスペクトルを検索し、これにより、従来のアノテーションされたペプチドとの潜在的マッチを得た。

10

【0169】

個々のペプチドマッチに対して、複数のオルトゴナルパラメータ、例えばMascot Ionスコア、MS1測定値とペプチド質量の計算値との差(質量)を参照することによって品質評価を行ない、高分解能遺伝子シーケンシングならびにNetMHCおよびNetMHCpanアルゴリズムによって決定される患者のHLAアロタイプとの結合を予想した。高信頼度ペプチドマッチをBLAST検索によって解析し、潜在的ソース遺伝子をすべて同定し、次いで、これらを個々の腫瘍試料で得られたRNAseqデータと相互参照し、ペプチド同一性のさらなる検証を得た(検証には、最低限0.3転写物/100万、TPMのソース遺伝子発現が必要であった)。溶出されたTAAペプチドを、潜在的CTL標的としての安全性について、逐次RNA転写物発現フィルターを適用することによってスクリーニングし、正常組織での発現(GTex Portal RNAseqデータ)のため自己免疫毒性を誘起する可能性が非常に高いペプチドを排除した。精巣および胎盤を除いて、非必須組織では最大30 TPM、「警告」組織では10 TPM、「ハザード」組織では3 TPMならびに高度に必須の「危険」組織(例えば、心臓および脳)では1 TPMのソース遺伝子転写物発現が可能であった。また、推定TAA遺伝子を異なる型のがんでの発現および保有率について、TCGAのRNAseqデータの解析によってスクリーニングした。選択された場合では、TAAペプチドの同一性を確認するためにターゲットMS/MS解析を行なった。この解析では、¹³C/¹⁵N同位体標識合成ペプチド標準の保持時間ウィンドウを、前記合成ペプチドのMS解析によって事前に測定し、次いでターゲットTAAペプチド検索法を、およそ1 m/z毎に3 Daの質量ウィンドウを用いて構築した。

20

30

【0170】

遺伝子発現解析および患者生存期間。全トランスクリプトームシーケンシング(RNAseq)解析をすべてのPDAC腫瘍検体、異種移植片および類器官細胞株に由来するRNAに対して、各腫瘍RNA試料についておよそ2億のペアエンドリード(paired-end read)を有するRibo-Zero Goldを有するIllumina TruSeq Stranded Total RNAキット(Avera Institute for Human Genetics)を用いて行なった。VGLL1および他のがんの胎盤抗原の遺伝子発現プロファイルを、正常ヒト初代組織(GTex Portal)および腫瘍組織(TCGA)で得られたRNAseqデータをコンパイルすることによって調べた。腫瘍VGLL1転写物発現によって層別化したときのTCGAのがん患者の生存データから Kaplan-Meier 曲線を作成した。

40

【0171】

VGLL1特異的CD8 T細胞の単離および増大。腫瘍抗原特異的CTLを既報のとおりで作製した(Li et al., 2005)。HLA-A*0101陽性患者由来または健常ドナー由来のPBMCを、VGLL1₂₃₁₋₂₄₀ペプチドLSELETPGKY(SEQ ID NO:93)でパルス処理した自己由来樹状細胞(DC)を用いて2回刺激した。2回目のDC刺激後6日目、培養細胞をVGLL1₂₃₁₋₂₄₀ペプチド/HLA-A*0101-PEコンジュゲートカスタム四量体(Fred Hutchinson Cancer Research Center)で染色し、洗浄し、次いでAPCコンジュゲートCD8抗体で染色した。細胞を洗浄し、フローサイトメトリー(LSRFortessa X-20 An

50

alyzer)によって解析した。CD8と四量体の二重陽性細胞をARIA IIによって選別し、VGLL1特異的CD8 T細胞を、Rapid Expansion Protocol (REP)を使用し、PBMCおよびLCLフィーダー細胞を用いて増大させた。増大したCD8 T細胞のTCR Vレパー トリーを、IOTest Beta Mark TCR-V Repertoireキットを用いて評価した。

【0172】

細胞傷害性T細胞アッセイ。VGLL1特異的CD8+ T細胞による抗腫瘍殺作用を、標準的なクロム-51 (^{51}Cr)放出アッセイを用いて評価した。標的細胞を100 μL の ^{51}Cr で1時間標識し、次いで洗浄し、2,000個の標的細胞/ウェルで三連にてプレーティングした。VGLL1特異的CD8+ T細胞を標的細胞とともに、種々のエフェクター対標的 (E:T)細胞比で4時間インキュベートした。インキュベーション期間後、上清をウェルから採 10
集し、 ^{51}Cr をガンマ線カウンターで測定した。バックグラウンド ^{51}Cr 放出を補正し、Triton X-100に溶解させた標的細胞によって測定された最大 ^{51}Cr 放出に対する特異的標的細胞溶解のパーセンテージを計算した。

【0173】

統計解析。データ解析は、GraphPad Prismバージョン7.03を用いて行なった。正規分布データは、パラメトリック検定 (ANOVAまたは対応なしt検定)を用いて解析した。カプラン・マイヤー生存曲線は、ログランク検定によって解析した。検定における差は、 $P < 0.05$ である場合、統計学的に有意とみなした。

【0174】

実施例3 - T細胞受容体の開発および特徴決定

VGLL1 TCRをクローニングし、標的細胞の殺作用効率について特徴決定した。PBMCに、ペプチドでパルス処理されたMe1888HLAA1細胞を標的とするためのVGLL1 TCRを形質導入した。TCR発現T細胞は、ペプチドでパルス処理されたMe1888HLAA1細胞に効率的に殺作用を奏し得ることがわかった (図1)。また、クローニングされたVGLL1 TCRは、内因性発現抗原を認識することが示された (図2)。

【0175】

T細胞受容体をクローニングするため、全RNAをVGLL1特異的T細胞からRNeasyキット (QIAGEN、74104)によって単離し、cDNAを、5'-RACE手法 (cDNA末端の迅速増幅、Takara、634859)を用いて合成した。次いで、TCR鎖およびTCR鎖をPCRにより、TCRの定常領域またはTCRの定常領域のいずれかに特異的に結合する3'末端プライマーを用いて別々に増幅させた。共通配列を補完する5'末端プライマーをcDNA合成中に添加した。次いで、PCR産物をTOPOクローニングベクター (Invitrogen、450641)内にクローニングし、30個のDNAクローンをシーケンシングして鎖または鎖の各々を調べた。1つのTCRクローン (TRBV C1 5-6*01 J1-1)および主な4つのTCRクローン (TRAV19*01 J56*01、TRAV13-1*02 J10、TRAV13-1*02 J1301、TRAV23 J12)が、IMGTデータベースを用いた遺伝子アラインメント後に同定された。機能試験のため、4つのTCR / クローンを、TCRを異なるTCRとペアにすることによって設計し、各鎖と鎖をフーリンおよびP2A切断部位を含むリンカーによって連結した。完全長の遺伝子がTwist社によって合成され、次いで、TCR DNA断片をSalI部位およびNotI部位に挿入することによりいくつかの臨床試験で使用さ 40
れているpMSGV1ベクター内にクローニングされた。

【0176】

TCR形質導入のためのレトロウイルス粒子の作製:4つの異なるVGLL1特異的TCRをコードしているpMSGV1ベースのレトロウイルスベクターを、パッケージング細胞株293 GPを使用し、T細胞の形質導入効率を向上させるためにエンベロープタンパク質としてRT114を用いてレトロウイルス粒子を作製するために使用した。MD Anderson血液バンクから得た正常PBMCは形質導入され、5日間、連続培養した。次いで、VGLL1ペプチド四量体とCD8の二重陽性T細胞をフローサイトメトリーによって選別した。このようなT細胞を、選別後の細胞の数に応じて細胞傷害性アッセイにおいて直接使用するか、またはT細胞複製に供するかのいずれかとした。

10

20

30

40

50

【0177】

VGLL1-TCR発現によりCTL細胞傷害性が媒介される:黒色腫細胞株mel888は内在性HLAA1を発現するが、検出可能なレベルのVGLL1タンパク質を発現しない。Mel888を10マイクログラムのペプチドでパルス処理し、TCR形質導入エフェクターT細胞とともに異なる比率で共培養した。T細胞媒介性標的細胞死を、クロム-51放出に基づいて測定した。TCRクローン番号1および3を発現しているエフェクターT細胞は、インキュベーションの4時間以内に1.25:1という低いエフェクター:標的比で20~30%の標的腫瘍細胞を、および40:1の比で70~80%の標的細胞を溶解させることができた。VGLL1 TCRクローン番号2および4はわずかに弱いようであったが、4つのすべてのTCRクローン間の差は劇的ではない(図16)。

10

【0178】

VGLL1-TCRが、内在性VGLL1を発現している腫瘍細胞を認識して溶解させる効率をさらに調べた。このアッセイでは、mel888細胞株およびHLAA1とVGLL1の両方を発現している膵臓細胞株を、TCR-4形質導入T細胞とともに40:1および5:1の比で異なる時点で共培養した。3.5時間のインキュベーション後、30%の膵臓細胞が溶解し、5時間後、50%が殺作用を受けた(図17)。したがって、VGLL1-TCR発現は、形質導入されたT細胞の細胞傷害活性を媒介する。

【0179】

本明細書において開示し、請求項に記載した方法はすべて、必要以上に実験を行なうことなく本開示に鑑みて作製および実行することができる。本開示の組成物および方法は好ましい態様に関して説明しているが、本明細書に記載の方法に対して、および前記方法の工程または工程順において本発明の思想、趣旨および範囲から逸脱することなく変形が適用され得ることは当業者に明らかであろう。より具体的には、化学的かつ生理学的に関連している特定の作用物質が本明細書に記載の作用物質の代わりに使用され得るが同じまたは同様の結果が得られるであろうことは明らかであろう。当業者に明らかになる同様の置き換えおよび修正はすべて、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の趣旨、範囲、および思想の範囲内であるとみなす。

20

【0180】

参照文献

以下の参照文献は、本明細書に示すものに対する補足となる例示的な手順の詳細または他の詳細が提供される程度に、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

30

40

50

- Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.
- Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, NY, 1994.
- Bradley *et al.*, *Cancer Immunol Res* 3, 602-609, doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0030, 2015.
- Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.
- Camacho *et al.* (2004) *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505, 2004.
- Chothia *et al.*, *EMBO J.* 7:3745, 1988.
- Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998. 10
- Cohen *et al.* *J Immunol.* 175:5799-5808, 2005.
- Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
- Davila *et al.* *PLoS ONE* 8(4): e61338, 2013.
- European Patent Application No. EP2537416
- Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013.
- Janeway *et al.*, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current
- Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998. 20
- Heemskerk *et al.* *Hum Gene Ther.* 19:496-510, 2008.
- Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Hurwitz *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.
- International Patent Publication No. WO 00/37504
- International Patent Publication No. WO1995001994
- International Patent Publication No. WO1998042752 30
- International Patent Publication No. WO2000037504
- International Patent Publication No. WO200014257
- International Patent Publication No. WO2001014424
- International Patent Publication No. WO2010/027827
- International Patent Publication No. WO2011/066342
- International Patent Publication No. WO2012/129514

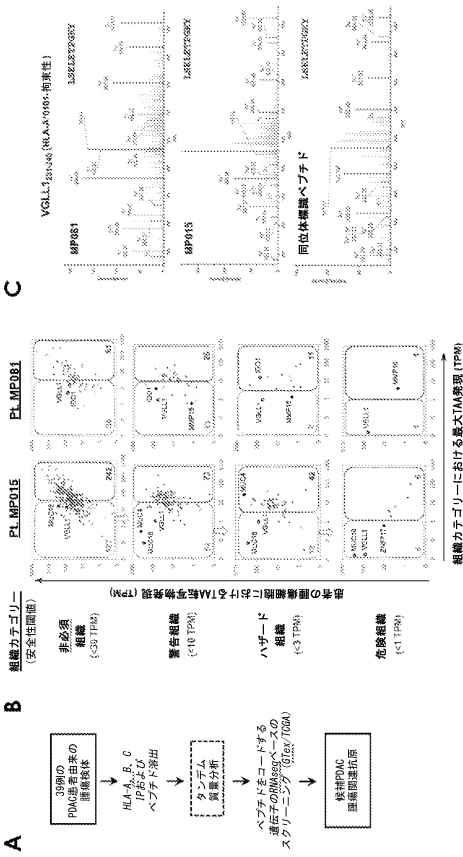
International Patent Publication No. WO2013/071154	
International Patent Publication No. WO2013/123061	
International Patent Publication No. WO2013/166321	
International Patent Publication No. WO2013126726	
International Patent Publication No. WO2014/055668	
International Patent Publication No. WO2014031687	
International Patent Publication No. WO2015016718	
International Patent Publication No. WO2018/067869	10
Johnson <i>et al.</i> <i>Blood</i> 114:535-46, 2009.	
Jores <i>et al.</i> , <i>PNAS U.S.A.</i> 87:9138, 1990.	
Lefranc <i>et al.</i> , <i>Dev. Comp. Immunol.</i> 27:55, 2003.	
Li <i>et al.</i> , <i>J Immunol</i> 175, 2261-2269, 2005.	
Mokyr <i>et al.</i> <i>Cancer Res</i> 58:5301-5304, 1998.	
Pardoll, <i>Nature Rev Cancer</i> 12:252-264, 2012.	
Parkhurst <i>et al.</i> <i>Clin Cancer Res.</i> 15: 169-180, 2009.	
Qin <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 95(24):14411-14416, 1998.	20
Rizvi <i>et al.</i> , <i>Science</i> 348, 124-128, doi:10.1126/science.aaa1348, 2015.	
Sadelain <i>et al.</i> , <i>Cancer Discov.</i> 3(4): 388-398, 2013.	
Sambrook <i>et al.</i> , <i>Molecular Cloning: A Laboratory Manual</i> , 3 rd ed., Cold Spring Harbor Press,	
Strobel <i>et al.</i> , <i>Nat Rev Clin Oncol</i> 16, 11-26, doi:10.1038/s41571-018-0112-1, 2019.	
Terakura <i>et al.</i> <i>Blood</i> .1:72- 82, 2012.	
Turtle <i>et al.</i> , <i>Curr. Opin. Immunol.</i> , 24(5): 633-39, 2012.	
U.S. Patent No. 4,870,287	
U.S. Patent No. 5,739,169	
U.S. Patent No. 5,760,395	30
U.S. Patent No. 5,801,005	
U.S. Patent No. 5,824,311	
U.S. Patent No. 5,830,880	
U.S. Patent No. 5,844,905	
U.S. Patent No. 5,846,945	
U.S. Patent No. 5,885,796	
U.S. Patent No. 6,207,156	
U.S. Patent No. 6,410,319	
U.S. Patent No. 6,451,995	40

U.S. Patent No. 7,070,995
U.S. Patent No. 7,265,209
U.S. Patent No. 7,354,762
U.S. Patent No. 7,446,179
U.S. Patent No. 7,446,190
U.S. Patent No. 7,446,191
U.S. Patent No. 8,008,449 10
U.S. Patent No. 8,017,114
U.S. Patent No. 8,119,129
U.S. Patent No. 8,252,592
U.S. Patent No. 8,324,353
U.S. Patent No. 8,329,867
U.S. Patent No. 8,339,645
U.S. Patent No. 8,354,509
U.S. Patent No. 8,398,282 20
U.S. Patent No. 8,479,118
U.S. Patent No. 8,735,553
U.S. Patent Publication No. 2002/131960
U.S. Patent Publication No. 2011/0008369
U.S. Patent Publication No. 2013/0149337
U.S. Patent Publication No. 2013/287748
U.S. Patent Publication No. 2014/022021 30
U.S. Patent Publication No. 2014/0294898
Varela-Rohena *et al.* *Nat Med.* 14: 1390-1395, 2008.
Wang *et al.* *J Immunother.* 35(9):689-701, 2012.
Wu *et al.*, *Cancer*, 18(2): 160-75, 2012.
Yarchoan *et al.*, *N Engl J Med* 377, 2500-2501, doi:10.1056/NEJMc1713444, 2017.
Young *et al.*, *Ther Adv Med Oncol* 10, 1758835918816281, doi:10.1177/1758835918816281, 2018.

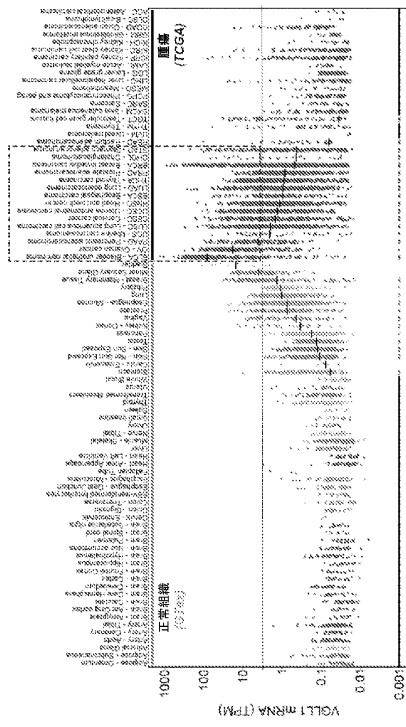
40

50

【 図 面 】
【 図 1 】



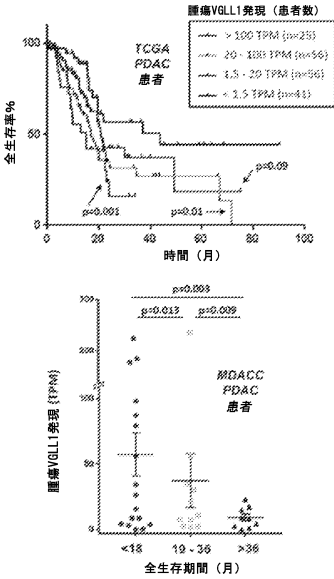
【 図 2 】



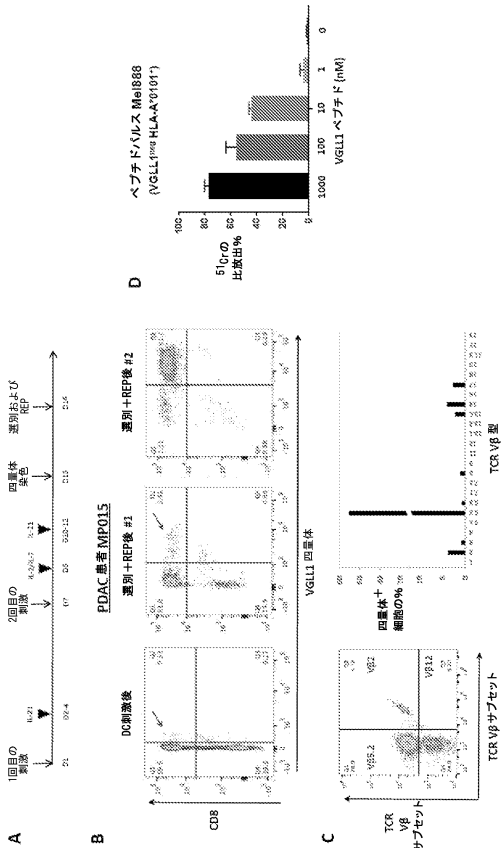
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

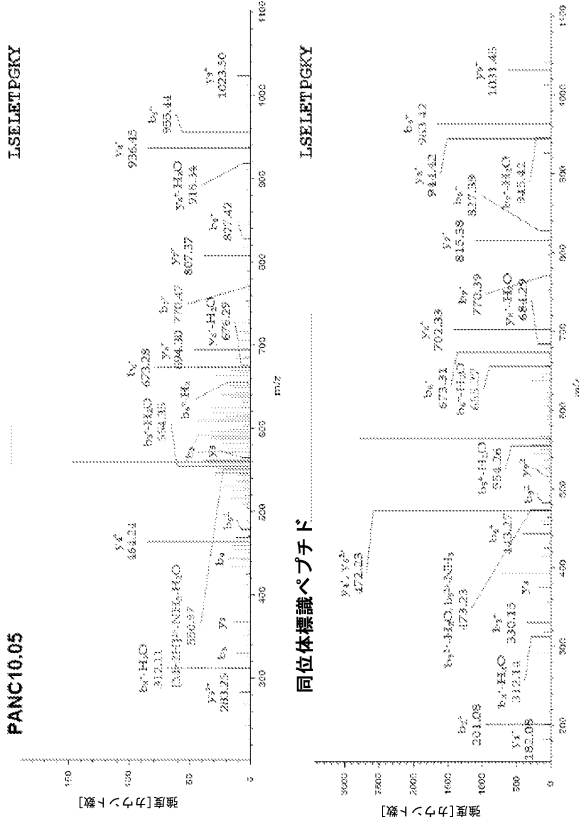


30

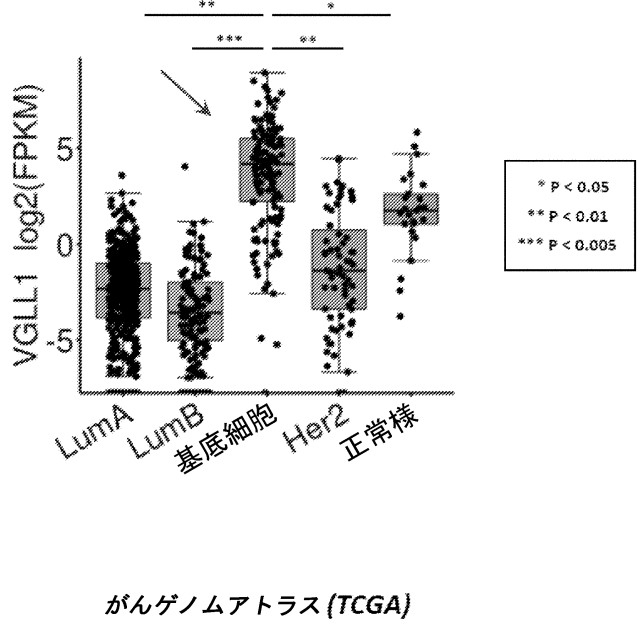
40

50

【 図 9 】



【 図 10 】

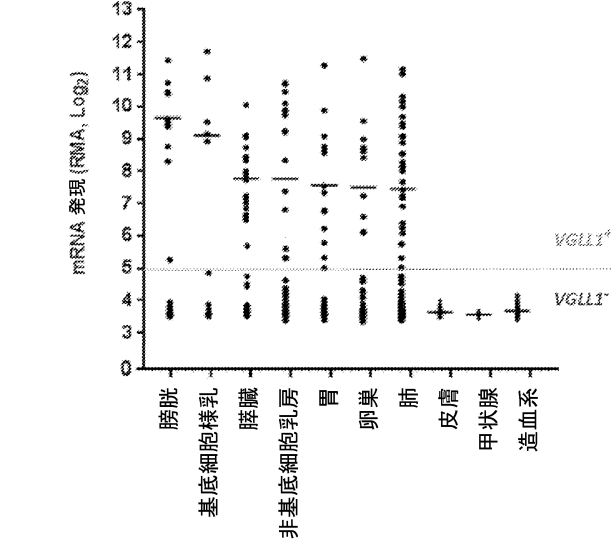


がんゲノムアトラス (TCGA)

10

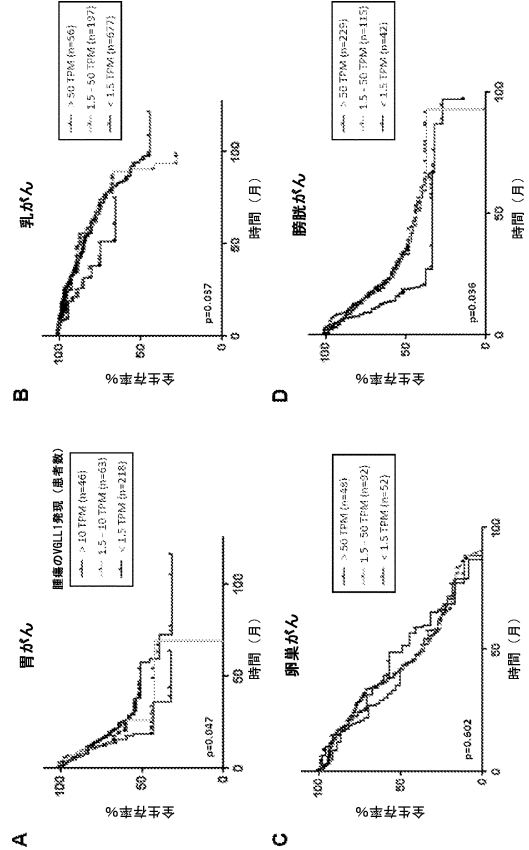
20

【 図 11 】



VGLL1 陽性%:	54	46	62	34	38	22	16	0	0	0
n =	27	13	44	46	40	54	191	62	12	190

【 図 12 】

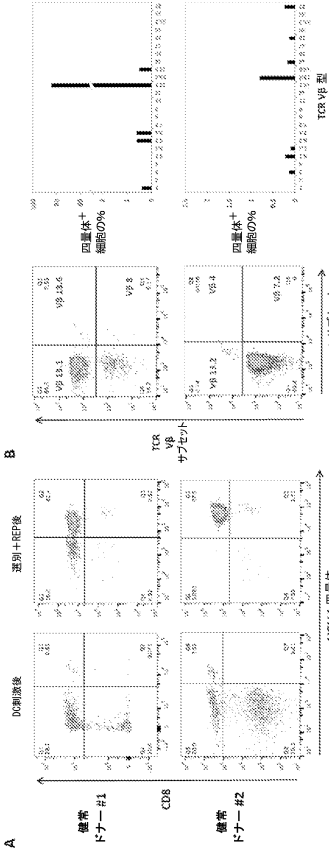


30

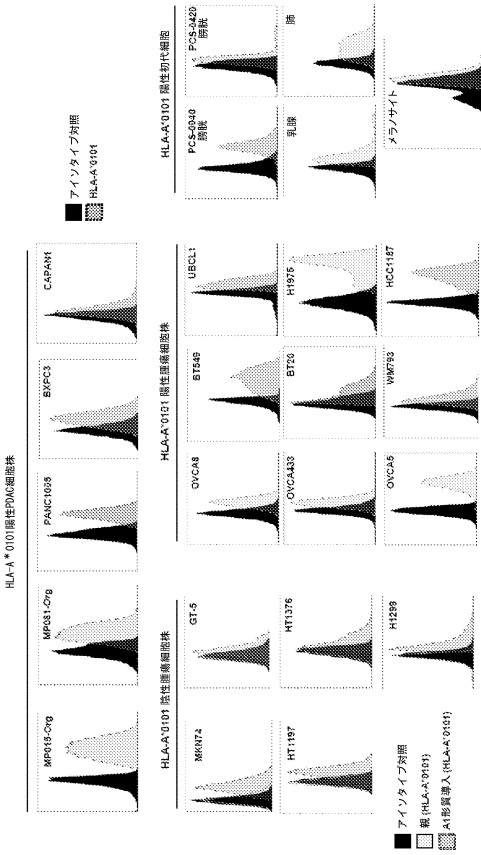
40

50

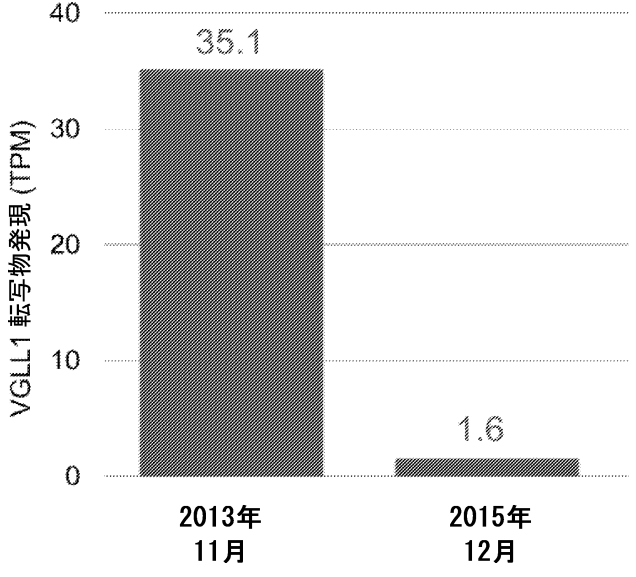
【図 1 3】



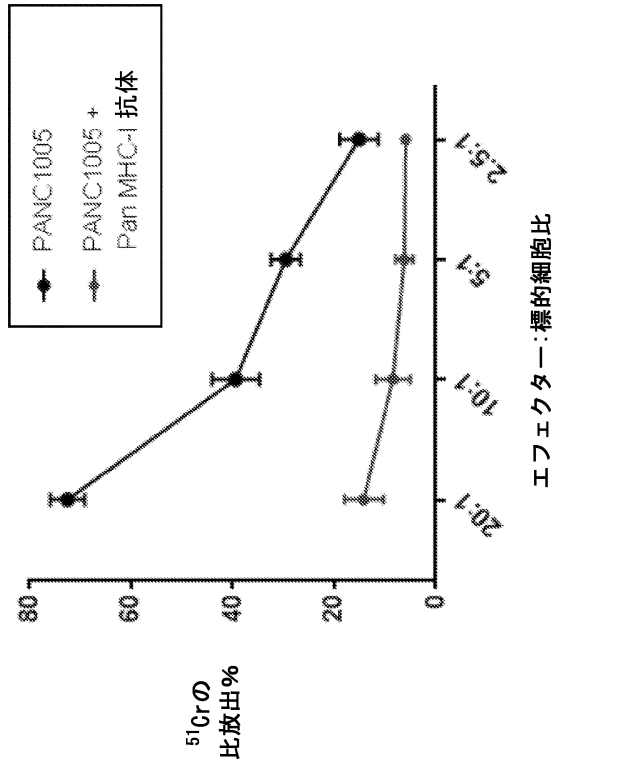
【図 1 5】



【図 1 4】



【図 1 6】



10

20

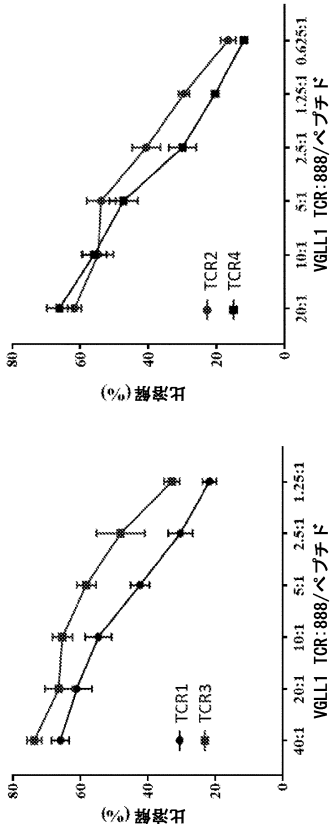
30

40

50

【 図 17 】

エフェクター:VGLL1 TCRを形質導入されたPBMC 標的:Me1888HLAA1/ペプチド

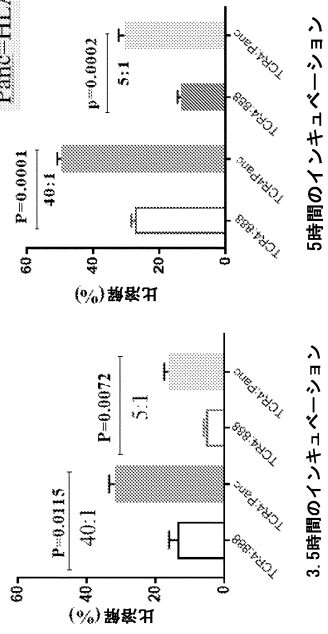


【 配列表 】

202352641600001.app

【 図 18 】

Me1888=HLAA1+VGLL1-
Panα=HLAA1+VGLL1+



10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2021/033619
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61P1/18	A61P35/00	C07K14/47 C07K14/725
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/040079 A1 (LIZÉE GREGORY [US] ET AL) 6 February 2020 (2020-02-06) paragraphs [0006] - [0008], [0014] - [0015], [0023], [0026] - [0029], [0125] - [0126], [0167] - [0175] example 1 figures 1, 4-7 ----- -/--	1-8, 30-79
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 8 October 2021	Date of mailing of the international search report 23/12/2021	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Surdej, Patrick	

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

10

20

30

40

50

International application No.

PCT/US2021/033619

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/033619

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

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

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

10

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

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

20

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

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

see additional sheet

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

30

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

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

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
2-8 (completely); 1, 30-79 (partially)

40

Remark on Protest

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

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

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/033619

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	<p>BRADLEY SHERILLE D. ET AL: "Vestigial-like 1 is a shared targetable cancer-placenta antigen expressed by pancreatic and basal-like breast cancers", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 11, no. 1, 21 October 2020 (2020-10-21), XP055848073, DOI: 10.1038/s41467-020-19141-w Retrieved from the Internet: URL: http://www.nature.com/articles/s41467-020-19141-w the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-8, 30-79</p>

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/033619

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2020040079 A1	06-02-2020	AU 2017338911 A1	02-05-2019
		CA 3039541 A1	12-04-2018
		CN 110352067 A	18-10-2019
		EP 3522909 A1	14-08-2019
		JP 2020503840 A	06-02-2020
		KR 20190057130 A	27-05-2019
		SG 11201903008Y A	30-05-2019
		US 2020040079 A1	06-02-2020
		WO 2018067869 A1	12-04-2018

10

20

30

40

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

10

1. claims: 2-8(completely); 1, 30-79(partially)

An engineered T cell receptor (TCR), wherein the TCR specifically binds Vestigial-like 1 (VGLL1) and comprises alpha chain CDR1 (SEQ ID NO: 10), CDR2 (SEQ ID NO: 11), and CDR3 (SEQ ID NO: 12) and beta chain CDR1 (SEQ ID NO:21), CDR2 (SEQ ID NO:22), and CDR3 (SEQ ID NO:23)

2. claims: 9-15(completely); 1, 30-79(partially)

An engineered T cell receptor (TCR), wherein the TCR specifically binds Vestigial-like 1 (VGLL1) and comprises alpha chain CDR1 (SEQ ID NO:33), CDR2 (SEQ ID NO:34), and CDR3 (SEQ ID NO:35) and beta chain CDR1 (SEQ ID NO:44), CDR2 (SEQ ID NO:45), and CDR3 (SEQ ID NO:46)

20

3. claims: 16-22(completely); 1, 30-79(partially)

An engineered T cell receptor (TCR), wherein the TCR specifically binds Vestigial-like 1 (VGLL1) and comprises alpha chain CDR1 (SEQ ID NO:56), CDR2 (SEQ ID NO:57), and CDR3 (SEQ ID NO:58) and beta chain CDR1 (SEQ ID NO:67), CDR2 (SEQ ID NO:68), and CDR3 (SEQ ID NO:69)

4. claims: 23-29(completely); 1, 30-79(partially)

An engineered T cell receptor (TCR), wherein the TCR specifically binds Vestigial-like 1 (VGLL1) and comprises alpha chain CDR1 (SEQ ID NO:79), CDR2 (SEQ ID NO:80), and CDR3 (SEQ ID NO:81) and beta chain CDR1 (SEQ ID NO:90), CDR2 (SEQ ID NO:91), and CDR3 (SEQ ID NO:92)

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/0783(2010.01)
 C 1 2 N 5/0775(2010.01)
 C 1 2 N 5/078(2010.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 P 43/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)
 A 6 1 K 35/545(2015.01)
 A 6 1 K 35/28 (2015.01)
 A 6 1 K 39/395(2006.01)
 A 6 1 K 9/127(2006.01)
 A 6 1 K 47/69 (2017.01)
 A 6 1 K 39/44 (2006.01)
 A 6 1 K 9/51 (2006.01)
 A 6 1 K 47/06 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 K 31/64 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7076(2006.01)
 A 6 1 K 35/51 (2015.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/0783
 C 1 2 N 5/0775
 C 1 2 N 5/078
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 43/00 1 2 1
 A 6 1 K 35/17
 A 6 1 K 35/545
 A 6 1 K 35/28
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 9/127
 A 6 1 K 47/69
 A 6 1 K 39/44
 A 6 1 K 9/51
 A 6 1 K 47/06
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 K 31/64
 A 6 1 K 31/7076
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 35/51
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 P 37/02

テーマコード (参考)

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396
弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 リゼー グレゴリー
アメリカ合衆国 77030 テキサス州 ヒューストン ホルコム プールバード 1515 ザ ユ
ニバーシティ オブ テキサス エムディー アンダーソン キャンサー センター内

(72)発明者 イー キャシアン
アメリカ合衆国 77030 テキサス州 ヒューストン ホルコム プールバード 1515 ザ ユ
ニバーシティ オブ テキサス エムディー アンダーソン キャンサー センター内

F ターム (参考) 4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C076 AA19 AA65 AA95 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB31 CC07
CC27 CC41 EE41 EE59 FF31 FF68
4C084 AA13 AA19 MA02 MA24 MA41 MA55 MA56 MA63 MA65 MA66
NA05 NA14 ZB071 ZB072 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751
4C085 AA13 AA14 CC22 CC23 DD62 EE03 EE05 GG01 GG02 GG03
GG04 GG06 GG10
4C086 AA01 AA02 DA21 EA18 MA02 MA03 MA04 MA05 MA24 MA41
MA55 MA56 MA63 MA65 MA66 NA05 NA10 NA13 ZB26 ZB27 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB43 BB59 BB65 MA02 MA24 MA41 MA55 MA56
MA63 MA65 MA66 NA05 NA10 NA14 ZB07 ZB26 ZB27 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 EA20