(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-538129
(P2024-538129A)
(43)公表日　令和6年10月18日(2024.10.18)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	４Ｂ０６５
Ａ６１Ｋ	*35/17 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ａ６１Ｐ	*15/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/00	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全202頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-522503(P2024-522503)
(86)(22)出願日　令和4年10月14日(2022.10.14)
(85)翻訳文提出日　令和6年6月14日(2024.6.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/078161
(87)国際公開番号　WO2023/064930
(87)国際公開日　令和5年4月20日(2023.4.20)
(31)優先権主張番号　63/256,427
(32)優先日　令和3年10月15日(2021.10.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/327,286
(32)優先日　令和4年4月4日(2022.4.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　518344612
ビオンテック ユーエス インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９， ケンブリッジ， エリー ストリート ４０， スイート １１０
(71)出願人　517415872
スティヒティング・ヘット・ネーデルランズ・カンカー・インスティテュート－アントニ・ファン・レーウェンフック・ゼィークンホイス
ＳＴＩＣＨＴＩＮＧ ＨＥＴ ＮＥＤＥＲＬＡＮＤＳ ＫＡＮＫＥＲ ＩＮＳＴＩＴＵＵＴ－ＡＮＴＯＮＩ ＶＡＮ ＬＥＥＵＷＥＮＨＯＥＫ ＺＩＥＫＥＮＨＵＩＳ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｔ細胞製造組成物および方法

(57)【要約】
制御されたｅｘ ｖｉｖｏ誘導または増大化による抗原特異的Ｔ細胞の生成は、高度に特異的かつ有益なＴ細胞療法を提供することができる。本開示は、がんならびに他の状態、疾患および障害を有する対象を処置するために使用することができるＴ細胞製造方法および治療用Ｔ細胞組成物、ならびに個人用抗原特異的Ｔ細胞療法を提供する。腫瘍ワクチンは典型的に、腫瘍細胞を認識し溶解する抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）を誘導するように協力して作動する腫瘍抗原および免疫刺激分子（例えば、アジュバント、サイトカインまたはＴＬＲリガンド）で構成されている。

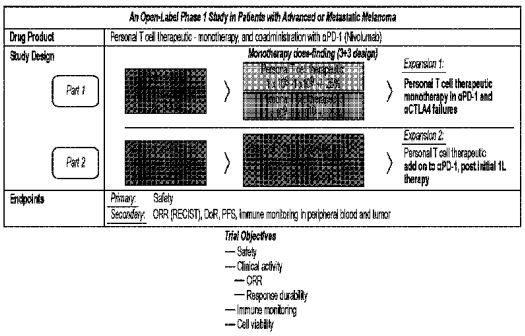


FIG. 82

【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するためのｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、
（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）の前記ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）前記刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）前記少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）の前記ヒト対象の前記がん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含み、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団の少なくとも３０％が、エフェクターメモリーＴ細胞であり、前記ヒト対象が、卵巣がんを有する、ステップと
を含む方法。
【請求項２】
卵巣がんの処置を必要とするヒト対象における卵巣がんを処置する方法であって、
（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）の前記ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）前記刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）前記少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）の前記ヒト対象の前記がん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、
（ｄ）（ｃ）の細胞の前記増大化された集団を前記ヒト対象に投与するステップと
を含む方法。
【請求項３】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するためのｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、
（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）の前記ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および

（ｉｉ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドをコードするｍＲＮＡ
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）前記刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）前記少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）の前記ヒト対象の前記がん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含み、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団の少なくとも３０％が、エフェクターメモリーＴ細胞であり、前記ヒト対象が、卵巣がんを有する、ステップと
を含む方法。
【請求項４】
卵巣がんの処置を必要とするヒト対象における卵巣がんを処置する方法であって、
（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）の前記ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドをコードするｍＲＮＡ
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）前記刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）前記少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）の前記ヒト対象の前記がん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、
（ｄ）（ｃ）の細胞の前記増大化された集団を前記ヒト対象に投与するステップと
を含む方法。
【請求項５】
（ｃ）の細胞の前記増大化された集団を前記ヒト対象に投与するステップをさらに含む、請求項１または３に記載の方法。
【請求項６】
ステップ（ｂ）および（ｃ）が、２８日間未満で行われる、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団の少なくとも３０％が、エフェクターメモリーＴ細胞である、請求項２および４～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも１５％である、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも２％である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＣ

Ｄ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．５％である、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも５％である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．１％である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
ナイーブＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、多くても１５％である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、少なくとも６０％である、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、
（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）の前記ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）の前記刺激されたＴ細胞を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）ステップ（ｂ）（ｉｉ）の前記少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）の前記ヒト対象の前記がん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、
（ｄ）（ｃ）の細胞の前記増大化された集団を前記ヒト対象に投与するステップであって、ステップ（ｃ）の細胞の前記増大化された集団が、０．７５×１０８～１．２５×１０９個の総細胞を含む、ステップと
を含む方法。
【請求項１６】
がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、
（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）の前記ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）前記ポリペプチドをコードするポ

リヌクレオチド
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）の前記刺激されたＴ細胞を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）ステップ（ｂ）（ｉｉ）の前記少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）の前記ヒト対象の前記がん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、
（ｄ）（ｃ）の細胞の前記増大化された集団を前記ヒト対象に投与するステップであって、ステップ（ｃ）の細胞の前記増大化された集団が、１．５×１０９～１．２５×１０１０個の総細胞を含む、ステップと
を含む方法。
【請求項１７】
がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、
（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）の前記ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）の前記刺激されたＴ細胞を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）ステップ（ｂ）（ｉｉ）の前記少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）の前記ヒト対象の前記がん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、
（ｄ）（ｃ）の細胞の前記増大化された集団を前記ヒト対象に投与するステップと、
（ｅ）免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与するステップと
を含む方法。
【請求項１８】
ステップ（ｃ）の細胞の前記増大化された集団が、０．７５×１０８～１．２５×１０１０個の総細胞を含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
投与されるステップ（ｃ）の細胞の前記増大化された集団が、
０．７５×１０８～１×１０９個の総細胞、
０．７５×１０８～０．７５×１０９個の総細胞、
１×１０８～１．２５×１０９個の総細胞、
１×１０８～１×１０９個の総細胞、
１×１０８～０．７５×１０９個の総細胞、
１．２５×１０８～１．２５×１０９個の総細胞、
１．２５×１０８～１×１０９個の総細胞または
１．２５×１０８～０．７５×１０９個の総細胞
を含む、請求項１５または１８に記載の方法。
【請求項２０】
投与されるステップ（ｃ）の細胞の前記増大化された集団が、
１．５×１０９～１×１０１０個の総細胞、

１．５×１０９～０．７５×１０１０個の総細胞、
２×１０９～１．２５×１０１０個の総細胞、
２×１０９～１×１０１０個の総細胞、
２×１０９～０．７５×１０１０個の総細胞、
２．５×１０９～１．２５×１０１０個の総細胞、
２．５×１０９～１×１０１０個の総細胞または
２．５×１０９～０．７５×１０１０個の総細胞
を含む、請求項１６または１８に記載の方法。
【請求項２１】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗ＰＤ１剤を含む、請求項１７～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗ＰＤ１抗体を含む、請求項１７～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、ペムブロリズマブまたはニボルマブを含む、請求項１７～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、ステップ（ｃ）の細胞の前記増大化された集団が投与された後に投与される、請求項１７～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、２００～４００ｍｇ、２ｍｇ／ｋｇ～４ｍｇ／ｋｇ、２００ｍｇ、２ｍｇ／ｋｇ、４００ｍｇまたは４ｍｇ／ｋｇの用量で投与される、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、Ｑ３ＷまたはＱ６Ｗで投与される、請求項２４または２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、Ｑ６Ｗで投与される、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、ステップ（ｃ）の細胞の前記増大化された集団が投与されてから最大３６週間または５２週間後までＱ６Ｗで投与される、請求項２４～２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、ステップ（ｃ）の細胞の前記増大化された集団が投与されてから３６週間または５２週間後に投与されない、請求項２４～２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３０】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗ＣＴＬＡ４剤をさらに含む、請求項２１～２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記抗ＣＴＬＡ４剤が、抗ＣＴＬＡ４抗体である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記抗ＣＴＬＡ４抗体が、イピリムマブを含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記ヒト対象が、
（ｉ）切除不能な黒色腫を有するか、
（ｉｉ）ＰＤ－１阻害剤もしくはＰＤ－Ｌ１阻害剤およびＣＴＬＡ－４阻害剤含有レジメンを以前に受けており、疾患進行を有するか、または
（ｉｉｉ）少なくとも３ヶ月間ＰＤ－１阻害剤もしくはＰＤ－Ｌ１阻害剤を受けたことが

あるもしくは現在受けており、安定病態もしくは無症候性進行性疾患を有する、請求項１５～３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
前記がんが、黒色腫である、請求項１５～３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記がんが、卵巣がんである、請求項１５～３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記がんが、非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）である、請求項１５～３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、ｍＲＮＡである、請求項１５～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記ｍＲＮＡによってコードされる前記ポリペプチドが、少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含む、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
ステップ（ｂ）が、ステップ（ａ）の前記ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、ＩＬ－２１の存在下でインキュベートすることを含む、請求項１～３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
ステップ（ｃ）が、前記刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を、ＩＬ－２１の存在下で増大化することを含む、請求項１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
前記免疫細胞の集団が、（ｂ）（ｉｉ）の前記ヒト対象由来の生体試料に由来する、請求項１～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
請求項１、３および５～４１のいずれか一項に記載の方法に従って産生された腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団を含む組成物。
【請求項４３】
卵巣がんの処置における使用のための組成物であって、請求項１、３および５～４１のいずれか一項に記載の方法に従って産生された腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団を含む、組成物。
【請求項４４】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を含む組成物であって、細胞の前記増大化された集団が、ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋細胞が枯渇されており、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および（ｉｉ）（Ａ）卵巣がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在下でインキュベートされた、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団に由来し、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）前記少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）卵巣がんを有する前記ヒト対象の前記がん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、組成物。
【請求項４５】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団の少なくとも３０％が、エフェクターメモリーＴ細胞である、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４６】
前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが、ｍＲＮＡである、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４７】

前記ｍＲＮＡによってコードされる前記ポリペプチドが、少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含む、請求項４６に記載の組成物。
【請求項４８】
細胞の前記増大化された集団が、０．７５×１０８～１．２５×１０^{10}個の総細胞を含む、請求項４４に記載の組成物。
【請求項４９】
細胞の前記増大化された集団が、０．７５×１０８～１．２５×１０９個の総細胞または１．５×１０９～１．２５×１０１０個の総細胞を含む、請求項４８に記載の組成物。
【請求項５０】
ａ）腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも１５％である、
ｂ）腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも２％である、
ｃ）腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．５％である、
ｄ）腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも５％である、
ｅ）腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、前記腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．１％である、
ｆ）ナイーブＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、多くても１５％である、および／または
ｇ）エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、少なくとも６０％である、
請求項４４に記載の組成物。
【請求項５１】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の前記増大化された集団が、（ａ）ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋細胞が枯渇されており、第１の期間にわたり、ＩＬ－２１の存在下でインキュベートされた、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団に由来する、ならびに／または（ｂ）ＩＬ－２１の存在下で増大化された、請求項４４に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０２１年１０月１５日に出願された米国特許仮出願第６３／２５６，４２７号および２０２２年４月４日に出願された米国特許仮出願第６３／３２７，２８６号の利益およびそれに基づく優先権を主張するものであり、その両方の全体を参照により本明細書に組み込む。
【背景技術】
【０００２】
背景
腫瘍ワクチンは典型的に、腫瘍細胞を認識し溶解する抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）を誘導するように協力して作動する腫瘍抗原および免疫刺激分子（例えば、アジュバント、サイトカインまたはＴＬＲリガンド）で構成されている。斯かるワクチンは、共有組織制限腫瘍抗原、または腫瘍細胞全体の調製物の形態の、共有抗原および患者特異的

抗原の混合物のいずれかを含有する。共有組織制限腫瘍抗原は、理想的には、多くの個体にわたって腫瘍において選択的に発現する免疫原性タンパク質であり、一般的に、合成ペプチドまたは組換えタンパク質として患者に送達される。対照的に、腫瘍細胞全体の調製物は、自家放射線照射細胞、細胞ライセート、細胞融合物、熱ショックタンパク質調製物または全ｍＲＮＡとして患者に送達される。腫瘍細胞全体は、自家患者から単離されるため、細胞は、共有腫瘍抗原と共に患者特異的腫瘍抗原を含むことができる。最後に、変更されたアミノ酸配列をもたらす腫瘍特異的突然変異（患者特異的であってもよく共有されていてもよい）を有するタンパク質からなる、ワクチンにおいてめったに使用されてこなかった、腫瘍抗原の第３のクラスであるネオ抗原が存在する。斯かる突然変異したタンパク質は、（ａ）腫瘍細胞に特有である（突然変異およびその対応するタンパク質は、腫瘍にのみ存在するため）；（ｂ）中枢性トレランスを回避する、したがって、免疫原性である可能性がより高い；（ｃ）液性および細胞性免疫の両方によるものを含む免疫認識のための優れた標的を提供する。

【０００３】

養子免疫療法または養子細胞療法（ＡＣＴ）は、疾患の治療法のための対象へのリンパ球の移入である。養子免疫療法が、がん、感染性疾患、自己免疫性疾患、炎症性疾患および免疫不全を含む多種多様な疾患を処置するためのその潜在力を実現するのは、未だこれからである。しかし、全てではないとしても殆どの養子免疫療法戦略は、臨床的に有効な、治療用量のＴ細胞を生成するためにＴ細胞活性化および増大化ステップを要求する。生細胞培養および患者間の可変性の固有の複雑さが原因で、操作されたＴ細胞を含む治療用量のＴ細胞を生成するための現在の技術は依然として、煩雑なＴ細胞製造プロセスによって限定されている。現存するＴ細胞製造プロセスは、容易にスケーラブルでも、繰り返し可能でも、信頼をおくことも、効率的でもなく、多くの場合、エフェクター免疫細胞機能の消耗および喪失の傾向がある場合がある劣ったＴ細胞産物を産生する。現在まで、操作されたＴ細胞養子免疫療法は、ごく限られた成功のみを収めており、可変的な臨床活動をルーチンに示す。したがって、斯かる治療法は、幅広い臨床使用に適していない。したがって、依然として、都合よい表現型および機能を有する抗原特異的Ｔ細胞の増大化および誘導のための組成物および方法を開発する必要がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００４】

概要

自家Ｔ細胞療法薬は、使用するのに安全であるが、いくつかの劇的な改善が、治療標準を満たすために必要であり、本分野における開発は、迅速でありかつ困難を伴った。腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するためのｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、（ｃ）刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含み、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団の少なくとも３０％が、エフェクターメモリーＴ細胞であり、ヒト対象が、卵巣がんを有する、ステップとを含む方法が本明細書に提供される。

【０００５】
卵巣がんの処置を必要とするヒト対象における卵巣がんを処置する方法であって、（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、（ｃ）刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、（ｄ）（ｃ）の細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップとを含む方法も本明細書に提供される。

【０００６】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するためのｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）および（ｉｉ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドをコードするｍＲＮＡの存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、（ｃ）刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含み、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団の少なくとも３０％が、エフェクターメモリーＴ細胞であり、ヒト対象が、卵巣がんを有する、ステップとを含む方法も本明細書に提供される。

【０００７】
卵巣がんの処置を必要とするヒト対象における卵巣がんを処置する方法であって、（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）および（ｉｉ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドをコードするｍＲＮＡの存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、（ｃ）刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、（ｄ）（ｃ）の細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップとを含む方法も本明細書に提供される。

【０００８】

一部の実施形態では、方法は、（ｃ）の細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップをさらに含む。

【０００９】

一部の実施形態では、ステップ（ｂ）および（ｃ）は、２８日間未満で行われる。

【００１０】

一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団の少なくとも３０％は、エフェクターメモリーＴ細胞である。

【００１１】

一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも１５％である。

【００１２】

一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも２％である。

【００１３】

一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．５％である。

【００１４】

一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも５％である。

【００１５】

一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．１％である。

【００１６】

一部の実施形態では、ナイーブＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても１５％である。

【００１７】

一部の実施形態では、エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、少なくとも６０％である。

【００１８】

がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）の刺激されたＴ細胞を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）ステップ（ｂ）（ｉｉ）の少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、（ｄ）（ｃ）の細胞の増大化さ

れた集団をヒト対象に投与するステップであって、ステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団が、０．７５×１０＾８～１．２５×１０＾９個の総細胞を含む、ステップとを含む方法。

【００１９】

がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）の刺激されたＴ細胞を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）ステップ（ｂ）（ｉｉ）の少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、（ｄ）（ｃ）の細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップであって、ステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団が、１．５×１０＾９～１．２５×１０＾１０個の総細胞を含む、ステップとを含む方法。

【００２０】

がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップと、（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）の刺激されたＴ細胞を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）ステップ（ｂ）（ｉｉ）の少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、（ｄ）（ｃ）の細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップと、（ｅ）免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与するステップとを含む方法。

【００２１】

一部の実施形態では、ステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団は、０．７５×１０＾８～１．２５×１０＾１０個の総細胞を含む。

【００２２】

一部の実施形態では、投与されるステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団は、０．７５×１０＾８～１×１０＾９個の総細胞、０．７５×１０＾８～０．７５×１０＾９個の総細胞、１×１０＾８～１．２５×１０＾９個の総細胞、１×１０＾８～１×１０＾９個の総細胞、１×１０＾８～０．７５×１０＾９個の総細胞、１．２５×１０＾８～１．２５×１０＾９個の総細胞、１．２５×１０＾８～１×１０＾９個の総細胞または１．２５×１０＾８～０．７５×１０＾９個の総細胞を含む。

【００２３】

一部の実施形態では、投与されるステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団は、１．５

×１０＾９～１×１０＾１０個の総細胞、１．５×１０＾９～０．７５×１０＾１０個の総細胞、２×１０＾９～１．２５×１０＾１０個の総細胞、２×１０＾９～１×１０＾１０個の総細胞、２×１０＾９～０．７５×１０＾１０個の総細胞、２．５×１０＾９～１．２５×１０＾１０個の総細胞、２．５×１０＾９～１×１０＾１０個の総細胞または２．５×１０＾９～０．７５×１０＾１０個の総細胞を含む。

【００２４】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ１剤を含む。

【００２５】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＰＤ１抗体を含む。

【００２６】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ペムブロリズマブまたはニボルマブを含む。

【００２７】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団が投与された後に投与される。

【００２８】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、２００～４００ｍｇ、２ｍｇ／ｋｇ～４ｍｇ／ｋｇ、２００ｍｇ、２ｍｇ／ｋｇ、４００ｍｇまたは４ｍｇ／ｋｇの用量で投与される。

【００２９】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、Ｑ３ＷまたはＱ６Ｗで投与される。

【００３０】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、Ｑ６Ｗで投与される。

【００３１】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団が投与されてから最大３６週間または５２週間後までＱ６Ｗで投与される。

【００３２】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団が投与されてから３６週間または５２週間後に投与されない。

【００３３】

一部の実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、抗ＣＴＬＡ４剤をさらに含む。

【００３４】

一部の実施形態では、抗ＣＴＬＡ４剤は、抗ＣＴＬＡ４抗体である。

【００３５】

一部の実施形態では、抗ＣＴＬＡ４抗体は、イピリムマブを含む。

【００３６】

一部の実施形態では、ヒト対象は、（ｉ）切除不能な黒色腫を有するか、（ｉｉ）ＰＤ－１阻害剤もしくはＰＤ－Ｌ１阻害剤およびＣＴＬＡ－４阻害剤含有レジメンを以前に受けており、疾患進行を有するか、または（ｉｉｉ）少なくとも３ヶ月間ＰＤ－１阻害剤もしくはＰＤ－Ｌ１阻害剤を受けたことがあるもしくは現在受けており、安定病態もしくは無症候性進行性疾患を有する。

【００３７】

一部の実施形態では、がんは、黒色腫である。

【００３８】

一部の実施形態では、がんは、卵巣がんである。

【００３９】

一部の実施形態では、がんは、非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）である。

【００４０】

一部の実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡである

。
【００４１】
一部の実施形態では、ｍＲＮＡによってコードされるポリペプチドは、少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含む。
【００４２】
一部の実施形態では、ステップ（ｂ）は、ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、ＩＬ－２１の存在下でインキュベートすることを含む。
【００４３】
一部の実施形態では、ステップ（ｃ）は、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を、ＩＬ－２１の存在下で増大化することを含む。
【００４４】
一部の実施形態では、免疫細胞の集団は、（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象由来の生体試料に由来する。
【００４５】
本明細書に開示されている方法に従って産生された腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を含む組成物。
【００４６】
卵巣がんの処置における使用のための組成物であって、本明細書に開示されている方法に従って産生された腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を含む組成物も本明細書に提供される。
【００４７】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を含む組成物であって、細胞の増大化された集団が、ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋細胞が枯渇されており、かつ、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および（ｉｉ）（Ａ）卵巣がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在下でインキュベートされた、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団に由来し、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）卵巣がんを有するヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、組成物も本明細書に提供される。
【００４８】
一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団の少なくとも３０％は、エフェクターメモリーＴ細胞である。
【００４９】
一部の実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡである。
【００５０】
一部の実施形態では、ｍＲＮＡによってコードされるポリペプチドは、少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含む。
【００５１】
一部の実施形態では、細胞の増大化された集団は、０．７５×１０＾８～１．２５×１０＾１０個の総細胞を含む。
【００５２】
一部の実施形態では、細胞の増大化された集団は、０．７５×１０＾８～１．２５×１０＾９個の総細胞または１．５×１０＾９～１．２５×１０＾１０個の総細胞を含む。
【００５３】
一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも１５％である；腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮ

γ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも２％である；腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．５％である；腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも５％である；腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージは、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．１％である；ナイーブＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても１５％である；および／またはエフェクターメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、少なくとも６０％である。

【００５４】

一部の実施形態では、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団は、（ａ）ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋細胞が枯渇されており、かつ、第１の期間にわたり、ＩＬ－２１の存在下でインキュベートされた、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団に由来する、ならびに／または（ｂ）ＩＬ－２１の存在下で増大化された。

【図面の簡単な説明】

【００５５】

【図１－１】図１Ａは、抗原特異的Ｔ細胞製造プロトコールの例示的概略図を示す。

【００５６】

【図１－２】図１Ｂは、抗原特異的Ｔ細胞製造プロトコールの例示的概略図を示す。

【００５７】

図１Ｃは、抗原特異的Ｔ細胞製造プロトコールの例示的代替的概略図を示す。

【００５８】

【図２】図２は、長いペプチドまたは短いペプチドによって誘導された抗原特異的ＣＤ８$^{+}$メモリーＴ細胞の割合を示す例示的結果を示す。「バルク」は、誘導に使用したＴ細胞を含有する試料が、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）全体であることを示す。「Ｔｒｅｇ$^{-}$」は、誘導に使用したＴ細胞を含有する試料が、ＣＤ２５発現細胞が枯渇されたＰＢＭＣであることを示す。

【００５９】

【図３】図３は、ＧＡＳ７ペプチドで誘導された抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ナイーブＴ細胞の割合を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。

【００６０】

【図４】図４は、ＨＩＶの短いペプチド、短い以前に同定されたネオ抗原（ＰＩＮ）、または長いＰＩＮのペプチドプールに対する抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を示す例示的結果を示す。「ＰＢＭＣ全体」は、誘導に使用したＴ細胞を含有する試料が、ＰＢＭＣ全体であることを示す。「ＣＤ２５$^{-}$ＰＢＭＣ」は、誘導に使用したＴ細胞を含有する試料から、ＣＤ２５$^{+}$細胞が枯渇されていることを示す。短い、短いペプチド、またはショートマー（ｓｈｏｒｔｍｅｒ）；長い、長いペプチド、またはロングマー（ｌｏｎｇｍｅｒ）。

【００６１】

【図５】図５Ａは、示された条件下での単一の以前に同定されたネオ抗原（ＰＩＮ）に対する抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ナイーブＴ細胞応答の例示的フローサイトメトリー分析を示す。

【００６２】

図５Ｂは、示された条件下での単一の以前に同定されたネオ抗原（ＰＩＮ）に対する抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ナイーブＴ細胞応答の例示的フローサイトメトリー分析を示す。

【００６３】

【図６】図６は、２人のヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用した、示されたペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を示す例示的結果を示す。

【００６４】
【図７】図７は、刺激の前および最大で３ラウンドの刺激の後の、健康なドナーにおける示された突然変異したエピトープに対する抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の例示的フローサイトメトリープロットを示す。
【００６５】
【図８Ａ】図８Ａは、ウイルス抗原に対する抗原特異的メモリーＣＤ８＋Ｔ細胞応答の結果を示す例示的棒グラフを示す。最大で３ラウンドの刺激の後、全てのＣＤ８＋Ｔ細胞のおよそ５０％は、示されたウイルスエピトープ（ＣＭＶ　ｐｐ６５、ＥＢＶ　ＹＶＬ、ＥＢＶ　ＢＭＬＦ１およびＭａｒｔ－１）に特異的であった。
【００６６】
【図８Ｂ】図８Ｂは、ペプチドがロードされた抗原提示細胞に対する、次いで、ウイルス抗原がロードされたおよびロードされていないＡＰＣと共にインキュベートした、抗原特異的メモリーＣＤ８＋Ｔ細胞応答のリコールアッセイの例示的結果を示す。示されたサイトカインを放出する、２つの時点からのＣＤ８＋Ｔ細胞の割合が、チャート中に示される。
【００６７】
【図９】図９は、誘導されたＴ細胞培養物が抗原発現腫瘍系を死滅させることができるかどうかを評価するために使用した細胞傷害アッセイの例示的結果を示す。総腫瘍細胞に対する生および死カスパーゼ３陽性腫瘍細胞の割合が示される。カスパーゼ３陽性の生きた腫瘍細胞は、初期細胞死を受けている細胞を示す。
【００６８】
【図１０】図１０は、ペプチドがロードされた抗原提示細胞に対する、次いで、ＰＩＮがロードされたおよびロードされていないＡＰＣと共にインキュベートした、抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の例示的フローサイトメトリー分析を示す。ＩＦＮγを放出するＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが示される。
【００６９】
【図１１】図１１は、突然変異体ペプチドまたは野生型ペプチドで再刺激された後の、ＩＦＮγを放出する抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージの例示的結果を示す。
【００７０】
【図１２】図１２は、短いＨＩＶ５ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８＋ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。短期誘導および長期誘導の両方が示される。
【００７１】
【図１３】図１３は、ヒトドナー由来のＰＢＭＣ全体試料を使用した、短いＭＥ１ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８＋ナイーブＴ細胞応答の割合を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。
【００７２】
【図１４】図１４は、ヒトドナー由来のＰＢＭＣ全体試料を使用した、短いＨＩＶ３ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８＋ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。
【００７３】
【図１５】図１５は、ヒトドナー由来のＰＢＭＣ全体試料を使用した、長いＣＳＮＫ１Ａ１ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８＋ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。
【００７４】
【図１６】図１６は、ＣＤ２５＋細胞が枯渇されたヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用した、長いＣＳＮＫ１Ａ１ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８＋ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。
【００７５】
【図１７】図１７は、ＣＤ２５＋細胞が枯渇されたヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用

した、短いＧＡＳ７ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。

【００７６】

【図１８】図１８は、ＣＤ２５$^+$細胞が枯渇されたヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用した、短いＡＣＴＮ４ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。

【００７７】

【図１９】図１９Ａは、ＣＤ２５$^+$細胞が枯渇されたヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用した、短いＡＣＴＮ４ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。短期誘導が示される。

【００７８】

図１９Ｂは、ＣＤ２５$^+$細胞が枯渇されたヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用した、短いＨＩＶ３ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。長期誘導が示される。

【００７９】

【図２０】図２０は、ヒトドナー由来のＰＢＭＣ全体試料を使用した、短いＨＩＶ５ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞応答の例示的フローサイトメトリー分析を示す。短期誘導および長期誘導の両方が示される。

【００８０】

【図２１】図２１は、ヒトドナー由来のＰＢＭＣ全体試料を使用した、短いＨＩＶ３ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。短期誘導が示される。

【００８１】

【図２２】図２２は、ＣＤ２５$^+$細胞が枯渇されたヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用した、短いＰＲＤＸ５ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。非常に短期および長期の両方の誘導が示される。

【００８２】

【図２３】図２３は、ＣＤ２５$^+$細胞タイド（ｔｉｄｅｓ）が枯渇されたヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用した、短いＨＩＶ５ペプチドに対する抗原特異的ＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞応答を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。短期誘導および長期誘導の両方が示される。

【００８３】

【図２４】図２４は、メモリーＴ細胞の増大化およびナイーブＴ細胞の誘導を含む、治療的Ｔ細胞組成物を生成するための方法の例の概略図を示す。

【００８４】

【図２５】図２５は、Ｔ細胞の機能性、表現型および／もしくは機能ならびに／またはＴ細胞応答を試験するための例示的な方法を示す。

【００８５】

【図２６】図２６は、Ｔ細胞の機能性、表現型および／もしくは機能ならびに／またはＴ細胞応答を試験するためのリコールアッセイの一例を示す。

【００８６】

【図２７Ａ】図２７Ａは、リコールアッセイにおける、別々にまたは混合物として獲得された標識された試料によって多重化した試料をデコンボリュートする能力を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。一意に標識された試料が、他のバーコードへの最小～全くない交差夾雑を伴って分解された。

【００８７】

【図２７Ｂ】図２７Ｂは、リコールアッセイにおける９つの一意に標識された試料の混合物のマルチマー染色による抗原特異的ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の検出を示す例示的フローサイトメトリー分析を示す。

【００８８】

【図２８Ａ】図２８Ａは、ロードされていないＤＣおよびネオ抗原がロードされたＤＣを用いてリコールした６つの一意にバーコード化された試料を使用するリコールアッセイの例示的フローサイトメトリー分析を示す。

【００８９】

【図２８Ｂ】図２８Ｂは、リコール応答アッセイにおける、示された濃度のペプチドがロードされたＤＣと共にインキュベートした機能の数を有するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のパーセントの例示的棒グラフを示す。ｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答を含有する２つの誘導された培養物の試料を、バーコード化なしに単独で、または無関係の試料と混合してのいずれかで分析した。バーコード化は、検出可能な機能性を変更させなかった。機能の数および細胞から惹起された応答の大きさは、試料バーコード化で有意に変化しなかった。

【００９０】

【図２９】図２９Ａは、ウイルス抗原に対する抗原特異的メモリーＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答の結果を示す例示的棒グラフを示す。ＣＭＶ　ｐｐ６５、ＭＡＲＴ－１ならびにＥＢＶ　ＢＲＬＦ１およびＢＭＬＦ１エピトープに対するＣＤ８$^{+}$メモリー応答は、健康なドナー出発材料中の０．２３％のＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞から、６０％超まで上昇され得る。

【００９１】

図２９Ｂは、ウイルス抗原に対する、次いで、ウイルス抗原がロードされたおよびロードされていないＤＣを用いてリコールした、抗原特異的メモリーＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答のリコールアッセイの例示的結果を示す。示されたサイトカインを放出する、２つの時点からのＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の割合が、チャート中に示される。

【００９２】

【図３０－１】図３０Ａは、同じ培養物における複数の特異性を有するｄｅ　ｎｏｖｏ誘導されたＣＤ４$^{+}$応答の検出および機能的特徴付けによるヒット同定の例示的結果を示す。示された例では、誘導は、ＨＩＶ陰性の健康なドナーにおけるナイーブ標的である１０個のＨＩＶ由来エピトープを標的化する４つの複製培養物において実施した。抗原特異的応答が、変動する大きさの応答で、４／４の生物学的複製において検出された。

【００９３】

図３０Ｂは、同じ培養物における複数の特異性を有するｄｅ　ｎｏｖｏ誘導されたＣＤ４$^{+}$応答の検出および機能的特徴付けによるプールデコンボリューションの例示的結果を示す。複数の応答が、試験した各複製において検出され、同じ２つのエピトープ（ＨＩＶ＃５およびＨＩＶ＃７）が、各場合において、最も高い大きさの応答を生じた。

【００９４】

【図３０－２】図３０Ｃは、同じ培養物における複数の特異性を有するｄｅ　ｎｏｖｏ誘導されたＣＤ４$^{+}$応答の検出および機能的特徴付けによる感受性決定の例示的結果を示す。類似の大きさが、プールデコンボリューションアッセイにおいて、各応答について観察された。ＨＩＶ＃５、ＨＩＶ＃６およびＨＩＶ＃４に対する応答は、それぞれ、０．４５μＭ、０．４３μＭおよび９．１μＭのＥＣ$_{50}$を実証した。

【００９５】

【図３１】図３１は、抗原特異的Ｔ細胞製造プロトコールの例示的概略図を示す。

【００９６】

【図３２】図３２は、Ｔ細胞誘導プロトコールの例示的概略図を示す。

【００９７】

【図３３】図３３は、樹状細胞生成プロトコールの例示的概略図を示す。

【００９８】

【図３４】図３４は、患者特異的エピトープ：ＳＲＳＦ１$_{E>K}$、ＡＲＡＰ１$_{Y>H}$およびＰＫＤＲＥＪ$_{G>R}$を標的化する黒色腫患者由来の白血球アフェレーシス材料、患者特異的エピトープ（ＡＡＳＤＨ　ｎｅｏＯＲＦならびに７つのモデルネオ抗原：ＡＣＴＮ４$_{K>N}$、ＣＳＮＫ１Ａ１$_{S>L}$、ＤＨＸ４０ｎｅｏＯＲＦ、ＧＬＩ３$_{P>L}$　ＱＡＲＳＲ$_{>W}$、ＦＡＭ１７８Ｂ$_{P>L}$およびＲＰＳ２６$_{P>L}$）を標的化する黒色腫患者由来の白血球アフェレーシス材料において誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞応答を示す例示的ｐＭＨＣマル

チマープロットを示す。第１および第２の列中の第１のパネルプロットは、メモリー応答を示し、残りのプロットは、ｄｅ　ｎｏｖｏ応答を示す。

【００９９】

【図３５】図３５は、ペプチド刺激の前および後のＳＲＳＦ１$_{E>K}$およびＡＲＡＰ１$_{γ>H}$のｐＭＨＣマルチマープロットの例示的データ（左パネル）を示し、円グラフは、ネオ抗原がロードされたＤＣでの再チャレンジの際のネオ抗原特異的Ｔ細胞の機能性を示す；ｐＭＨＣマルチマー$^{+}$ＣＤ８$^{+}$またはＣＤ４＋Ｔ細胞に対してゲートした。黒色腫を有する患者において誘導されたＣＤ８＋メモリー、ＣＤ８＋　ｄｅ　ｎｏｖｏおよびＣＤ４＋　ｄｅ　ｎｏｖｏ応答の多機能性プロファイルは、１、２または３つの機能の組合せによって示される（例えば、１つまたは複数の機能は、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＣＤ１０７ａおよび４－１ＢＢから選択される１つまたは複数の因子の産生である）。

【０１００】

【図３６】図３６は、突然変異したペプチドおよび野生型ペプチドに対して黒色腫を有する患者において誘導されたメモリーおよびｄｅ　ｎｏｖｏ応答の特異性を示す。ＳＲＳＦ１$_{E>K}$およびＡＲＡＰ１$_{γ>H}$特異的Ｔ細胞応答を、異なる濃度（Ｘ軸：０μＭ、０．０５μＭ、０．２μＭ、０．８μＭおよび３．２μＭ）の突然変異体または野生型ネオ抗原ペプチドがロードされたＤＣでチャレンジし、試料中の総ＣＤ８＋Ｔ細胞のＩＦＮ－γ＋および／またはＴＮＦα＋および／またはＣＤ１０７ａ＋（Ｙ軸）を測定した；両方の応答が、０μＭ濃度に対する有意差を示し、野生型ネオ抗原ペプチドに対しては応答性ではない。統計分析：調整済みｐ値についてのＦＤＲ、Ｐ値：＊≦０．０５、＊＊＊≦０．００１、＊＊＊＊≦０．０００１。

【０１０１】

【図３７Ａ】図３７Ａは、ＣＤ８$^{+}$ＣＤ１０７ａ$^{+}$Ｔ細胞の頻度によって定量化した、黒色腫を有する患者において誘導されたメモリー応答の細胞傷害プロファイルを示す。これは、ａＣＡＳ３＋腫瘍細胞の頻度によって定量化した、これらのＴ細胞応答による標的細胞死滅もまた示す。誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞応答の細胞傷害能を、突然変異体または野生型ネオ抗原で形質導入された腫瘍細胞で再チャレンジすることによって評価した。形質導入されていない腫瘍細胞（親Ａ３７５系）または２００ａａ構築物で形質導入された腫瘍細胞を使用した。構築物は、突然変異体または野生型配列のいずれか、中央の突然変異を含有した。ＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａおよび腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３の上方調節が、共培養の際に測定された。標的比：３．３：１（ＳＲＳＦ１$_{E>K}$）。

【０１０２】

【図３７Ｂ】図３７Ｂは、ＣＤ８$^{+}$ＣＤ１０７ａ$^{+}$Ｔ細胞の頻度によって定量化した、黒色腫を有する患者において誘導されたメモリー応答の細胞傷害プロファイルの別の例を示す。これは、ａＣＡＳ３＋腫瘍細胞の頻度によって定量化した、これらのＴ細胞応答による標的細胞死滅もまた示す。誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞応答の細胞傷害能を、突然変異体または野生型ネオ抗原で形質導入された腫瘍細胞で再チャレンジすることによって評価した。形質導入されていない腫瘍細胞（親Ａ３７５系）または２００ａａ構築物で形質導入された腫瘍細胞を使用した。構築物は、突然変異体または野生型配列のいずれか、中央の突然変異を含有した。ＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａおよび腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３の上方調節が、共培養の際に測定された。赤丸は、ｐＭＨＣ＋割合を強調する。エフェクター：標的比：５：１（ＳＲＳＦ１$_{E>K}$）。統計分析：対応のないＴ検定、Ｐ値＊＊≦０．０１、＊＊＊＊≦０．０００１。

【０１０３】

【図３７Ｃ】図３７Ｃは、ＣＤ８$^{+}$ＣＤ１０７ａ$^{+}$Ｔ細胞の頻度によって定量化した、黒色腫を有する患者において誘導されたｄｅ　ｎｏｖｏ応答の細胞傷害プロファイルを示す。これは、ａＣＡＳ３＋腫瘍細胞の頻度によって定量化した、これらのＴ細胞応答による標的細胞死滅もまた示す。誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞応答の細胞傷害能を、突然変異体または野生型ネオ抗原で形質導入された腫瘍細胞で再チャレンジすることによって評価した。形質導入されていない腫瘍細胞（親Ａ３７５系）または２００ａａ構築物で形質導入さ

れた腫瘍細胞を使用した。構築物は、突然変異体または野生型配列のいずれか、中央の突然変異を含有した。ＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａおよび腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３の上方調節が、共培養の際に測定された。丸は、ｐＭＨＣ＋割合を強調する。エフェクター：標的比：０．６６：１（ＡＲＡＰ１$_{Y>H}$）。統計分析：対応のないＴ検定、Ｐ値＊＊≦０．０１、＊＊＊＊≦０．０００１。

【０１０４】

【図３８Ａ】図３８Ａは、黒色腫患者におけるネオ抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の同定を示す。応答は、突然変異体ネオ抗原ペプチドがロードされたＤＣ（０．８μＭ）で再チャレンジした時のＩＦＮ－γおよびＴＮＦαの産生（Ｙ軸）に基づいて同定される。ＭＫＲＮ１$_{S>L}$、ＣＲＥＢＢＰ$_{S>L}$およびＴＰＣＮ１$_{K>E}$は、陽性応答として同定された。

【０１０５】

【図３８Ｂ】図３８Ｂは、示された突然変異したペプチドおよび野生型ペプチドに対する、図３８Ａに示されたＣＤ４＋Ｔ細胞応答の特異性を示す。確認研究において、図３８Ａに示されるＣＤ４　Ｔ細胞応答を、異なる濃度（Ｘ軸　－　０μＭ、０．０５μＭ、０．２μＭ、０．８μＭおよび３．２μＭ）の突然変異体および野生型ネオ抗原ペプチドでチャレンジし、試料中の総ＣＤ４＋のＩＦＮγ＋および／またはＴＮＦα＋（Ｙ軸）を測定した。ＣＤ４＋Ｔ細胞応答のうち２つ（ＭＫＲＮ１$_{S>L}$およびＣＲＥＥＢＰ$_{S>L}$）は、０μＭ濃度に対する有意差を示し、野生型ネオ抗原ペプチドに対しては応答性ではないが、ＴＰＣＮ１$_{K>E}$応答は、突然変異体および野生型の両方のネオ抗原ペプチドに対して反応性であった。統計分析：調整済みｐ値についてのＦＤＲ、Ｐ値＜０．０５。

【０１０６】

【図３８Ｃ】図３８Ｃは、１、２、３または４つの機能の組合せによって示される、これらのＣＤ４＋Ｔ細胞応答の多機能性プロファイルを示す（例えば、１つまたは複数の機能は、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＣＤ１０７ａおよび４－１ＢＢから選択される１つまたは複数の因子の産生である）。同定されたＣＤ４＋Ｔ細胞応答の多機能性を、突然変異体ネオ抗原ペプチドがロードされたＤＣ（０．８μｍ）での再チャレンジによって評価した。円グラフ中のパーセンテージは、パーセンテージ機能的ＣＤ４＋Ｔ細胞（１、２および／または３つの機能）を示す。示される代表的なデータは、患者において誘導された刺激後ＣＤ４＋Ｔ細胞応答から生成された。

【０１０７】

【図３９】図３９は、１、２または３つの機能の組合せによって示される、エパカドスタットの添加ありまたはなしの、２人の健康なドナーにおいて誘導されたメモリー応答の機能性を示す（例えば、１つまたは複数の機能は、ＩＦＮγ、ＴＮＦαおよびＣＤ１０７ａから選択される１つまたは複数の因子の産生である）。

【０１０８】

【図４０】図４０は、エパカドスタットの添加ありまたはなしの、６つの複製誘導におけるｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を誘導したパーセント（「ヒット率」、４人の健康なドナーで平均した）を示す。

【０１０９】

【図４１】図４１Ａは、ＰＤ－１遮断抗体の添加ありまたはなしの、本明細書で提供されるＴ細胞製造プロトコールによる誘導後の健康なドナー由来の抗原特異的細胞の絶対数を示す。

【０１１０】

図４１Ｂは、ＰＤ－１遮断抗体の添加ありまたはなしの、本明細書で提供されるＴ細胞製造プロトコールによる誘導後の健康なドナー由来の抗原特異的細胞の絶対数を示す。

【０１１１】

【図４２】図４２Ａは、ＩＬ－１２の添加ありまたはなしの、ｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８＋Ｔ細胞区画からのＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のパーセンテージとして、マルチマー陽性頻度を示す。

【０１１２】

図４２Ｂは、ＩＬ－１２の添加ありまたはなしの、ｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８＋Ｔ細胞区画からのＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージの例示的なグラフ表示を示す。

【０１１３】

【図４３】図４３は、健康なドナーに由来するＰＢＭＣを使用した異なる抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、ナイーブＣＤ８細胞が応答性である高度に免疫原性のおよび低い免疫原性の抗原についてのパーセントヒット率の例示的なグラフ表示を示す。Ｍａｒｔ－１ペプチドまたは高度に免疫原性のおよび低い免疫原性の抗原を使用する、健康なドナーに由来するＰＢＭＣを使用した異なる抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、抗原特異的細胞の絶対数の例示的なグラフ表示もまた示される。

【０１１４】

【図４４－１】図４４Ａは、３人の異なる健康なドナー由来のＰＢＭＣを使用した示された抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、ＣＤ１２３陽性細胞の例示的なフローサイトメトリー結果を示す。

【図４４－２】同上。

【０１１５】

【図４４－３】図４４Ｂは、健康なドナー由来のＰＢＭＣを使用した３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、示されたＣＤ１１ｃ＋細胞サブセットの絶対数の例示的なグラフ表示を示す。処置は以下である：ベースＦｌｔ３Ｌ，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ＣＤ１１ｂ，ＦＬＴ３Ｌ処置、およびＣＤ１１ｂ発現細胞の枯渇；ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇。

【０１１６】

【図４５】図４５は、健康なドナー由来のＰＢＭＣを使用した３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、ＣＤ８　Ｔ細胞の総数と示された細胞との比の例示的なグラフ表示を示す。処置は以下である：ベースＦｌｔ３Ｌ，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ＣＤ１１ｂ，ＦＬＴ３Ｌ処置、およびＣＤ１１ｂ発現細胞の枯渇；ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇。

【０１１７】

【図４６】図４６は、３人の異なる健康なドナー由来のＰＢＭＣを使用した示された抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、ＣＤ１１ｂ陽性細胞の例示的なフローサイトメトリー結果を示す。

【０１１８】

【図４７】図４７は、３人の異なる健康なドナー由来のＰＢＭＣを使用した示された抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、ＣＤ１９陽性細胞の例示的なフローサイトメトリー結果を示す。

【０１１９】

【図４８】図４８は、３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、細胞の増大化倍率の例示的なグラフ表示を示す。処置は以下である：ベースＦｌｔ３Ｌ，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ＣＤ１１ｂ，ＦＬＴ３Ｌ処置、およびＣＤ１１ｂ発現細胞の枯渇；ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇。

【０１２０】

【図４９Ａ】図４９Ａは、健康なドナーに由来するＰＢＭＣを使用した３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、ナイーブＣＤ８　Ｔ細胞が応答性である特異的抗原の数を示す例示的なデータを示す。結果は、３人の健康なドナーで平均した。処置は以下である：ベースＦｌｔ３Ｌ，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ＣＤ１１ｂ，ＦＬＴ３Ｌ処置、およびＣＤ１１ｂ発現細胞の枯渇；ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇。データの例示的

なグラフ表示は、下のグラフに示される。

【０１２１】

【図４９Ｂ】図４９Ｂは、健康なドナーに由来するＰＢＭＣを使用した３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、ナイーブＣＤ８細胞が応答性である高度に免疫原性の抗原（左）および低い免疫原性の抗原（右）についてのパーセントヒット率の例示的なグラフ表示を示す。結果は、３人の健康なドナーで平均した。処置は以下である：ベースＦｌｔ３Ｌ，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ＣＤ１１ｂ，ＦＬＴ３Ｌ処置、およびＣＤ１１ｂ発現細胞の枯渇；ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇。

【０１２２】

【図５０】図５０は、健康なドナーに由来するＰＢＭＣを使用した３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、Ｔ細胞が応答性である高度に免疫原性のおよび低い免疫原性の抗原によって活性化された細胞の集団中の抗原特異的細胞の数の例示的なグラフ表示を示す。処置は以下である：ベースＦｌｔ３Ｌ，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ＣＤ１１ｂ，ＦＬＴ３Ｌ処置、およびＣＤ１１ｂ発現細胞の枯渇；ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇。

【０１２３】

【図５１－１】図５１Ａは、健康なドナーに由来するＰＢＭＣを使用した３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、生細胞のパーセンテージの例示的なグラフ表示を示す。処置は以下である：ベース，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ベース＋ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇；＋ＡＰＣ，ベース＋ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－にさらなるＰＢＭＣ画分を添加、ここで、さらなる画分からは、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ２５およびＣＤ１４発現細胞を枯渇させた。

【０１２４】

図５１Ｂは、健康なドナーに由来するＰＢＭＣを使用した３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、生細胞のパーセンテージの例示的なグラフ表示を示す。処置は以下である：ベース，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ベース＋ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇；＋ＡＰＣ，ベース＋ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－にさらなるＰＢＭＣ画分を添加、ここで、さらなる画分からは、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ２５およびＣＤ１４発現細胞を枯渇させた。

【０１２５】

図５１Ｃは、健康なドナーに由来するＰＢＭＣを使用した３つの抗原提示細胞濃縮および抗原ローディングプロトコールを実施した後の、生細胞のパーセンテージの例示的なグラフ表示を示す。処置は以下である：ベース，ＦＬＴ３Ｌ処置単独；ベース＋ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－，ＦＬＴ３Ｌ処置、ならびにＣＤ１１ｂ発現細胞およびＣＤ１９発現細胞の枯渇；＋ＡＰＣ，ベース＋ＣＤ１１ｂ－／ＣＤ１９－にさらなるＰＢＭＣ画分を添加、ここで、さらなる画分からは、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ２５およびＣＤ１４発現細胞を枯渇させた。

【０１２６】

【図５１－２】図５１Ｄは、例示的な抗原提示細胞濃縮プロトコールを使用した、ドナー１人毎の、ＣＤ８細胞が応答性である特異的抗原の数を示す例示的なデータを示す。

【０１２７】

図５１Ｅは、３人の健康なドナーで平均した、ＣＤ８細胞が応答性である示されたペプチドについてのパーセントヒット率の例示的なグラフ表示を示す。

【０１２８】

【図５２－１】図５２Ａは、異なる時点で培養プロセスに添加される細胞の集団を、抗原がロードされたＡＰＣによる刺激の前に、膜透過性アミン反応性色素（例えば、カルボキ

シフルオレセインスクシンイミジルエステルまたはＴａｇＩＴ　Ｖｉｏｌｅｔ（商標））で標識した実験からの、例示的なフローサイトメトリー分析結果を示す。第２の刺激に適用される場合、既に１４日間培養した細胞の集団を、１つの色素で標識したが、抗原がロードされたＡＰＣおよびＴ細胞の新たな調製物を含有する細胞の別の集団は、別の色素で標識し、２つの集団を一緒に混合して、再刺激または増大化を実施した。これらの集団の各々の、抗原特異的Ｔ細胞プール全体への相対的寄与を、各色素の存在および希釈率によって示した。全ての例において、細胞の集団を、１４日間培養し（第１の刺激）、１つの色素で標識し、次いで、１日前（標準的なプロトコール）、４日前（５日早い開始）または６日前（７日早い開始）に抗原で刺激されている、別の色素で標識した細胞の別の集団に添加した。

【０１２９】

【図５２－２】図５２Ｂは、Ｔ細胞と接触させる２日前、５日前または７日前における抗原ローディングＡＰＣのための早い開始を含む２つの刺激を各々が有する、３つの異なるＴ細胞増大化プロトコールの例示的な概略図表示を示す。

【０１３０】

図５２Ｃは、図５２Ｂに示される３つの異なるＴ細胞増大化プロトコールを使用した、経時的な抗原特異的Ｔ細胞の数の例示的なグラフを示す。１，標準的なプロトコール；２，５日早い開始；３，７日早い開始。

【０１３１】

【図５３】図５３は、示されたネオ抗原ペプチド（ｐｅｐ）またはネオ抗原ＲＮＡで処置した培養物の増大化倍率の例示的なグラフを示す。ＣＤ３リンパ球を分離または除去した後に、ＣＤ１４／ＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣ細胞を、抗原（ペプチド、または抗原をコードするｍＲＮＡ）で刺激した。ＣＤ３リンパ球細胞を再導入し、１４日間刺激した。

【０１３２】

【図５４】図５４は、示されたネオ抗原ペプチド（ｐｅｐ）またはネオ抗原ＲＮＡでヌクレオフェクション処理した培養物中のマルチマー陽性抗原特異的細胞の数の例示的なグラフを示す。培養物を、Ｔ細胞の存在下またはＴ細胞の非存在下（－ＣＤ３）でヌクレオフェクション処理した。Ｉｒｒ，照射した。

【０１３３】

【図５５】図５５は、短期誘導プロトコールにおける、ウイルスペプチドまたはそのペプチドをコードするＲＮＡを使用した抗原特異的ＣＤ８＋メモリー応答、およびネオ抗原コードペプチドまたはＲＮＡを使用したナイーブ応答を示す、例示的なフローサイトメトリー分析を示す。

【０１３４】

【図５６Ａ】図５６Ａは、ネオ抗原をコードする配列を含むＲＮＡの生成のための、ＰＢＭＣにロードしＴ細胞を活性化するためにそれらを使用する、例示的なプロセスの概略図を示す。

【０１３５】

【図５６Ｂ】図５６Ｂは、ネオ抗原をコードする配列を含むＲＮＡの生成のための、ＰＢＭＣにロードしＴ細胞を活性化するためにそれらを使用する、例示的なプロセスの概略図を示す。

【０１３６】

【図５７】図５７Ａは、ネオ抗原のストリングをコードする例示的なＲＮＡコンカテマー構築物の概略図を示す。

【０１３７】

図５７Ｂは、図５７Ａに示される構築物内の５’－３’配向でのネオ抗原ストリングの例示的な配置の概略図を示す。

【０１３８】

【図５８】図５８Ａは、ＰＢＭＣにおける発現のための、連鎖状ネオ抗原ストリングをコードするｍＲＮＡ中に５’－ＣＡＰ構造を組み込むための例示的なｍＲＮＡ配列の概略図

を示す。ｍＲＮＡストリングにおける「Ａ」ヌクレオチドの付加を、ＣｌｅａｎＣａｐ（登録商標）Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙとの適合性のために使用した。

【０１３９】

図５８Ｂは、ＰＢＭＣにおいて異なる５’－ＣＡＰ構造を有する連鎖状ネオ抗原ストリングをコードするｍＲＮＡを発現させた２４時間後の、生細胞のパーセンテージの例示的なグラフ表示を示す。

【０１４０】

図５８Ｃは、ＰＢＭＣにおいて異なる５’－ＣＡＰ構造を有する連鎖状ネオ抗原ストリングをコードするｍＲＮＡを発現させた２４時間後の、ＧＦＰ陽性細胞の総数の例示的なグラフ表示を示す。

【０１４１】

【図５９－１】図５９Ａは、ｍＲＮＡを作製するために改変ヌクレオチドを使用することを示す例示的な結果を示す。ｍＲＮＡを、ｍＲＮＡ内のウリジン（Ｕ）およびシチジン（Ｃ）残基の全て（完全）または一部（部分）のいずれかを置換することによって改変した。例えば、部分Ｃセットは、メチルシチジンによって置き換えられた３０％のＣ残基を含有する。結果は、トランスフェクトされたＰＢＭＣ中のｍＲＮＡコードされるペプチドの発現に対する経時的な効果を示す。

【０１４２】

【図５９－２】図５９Ｂは、ｍＲＮＡがロードされたＰＢＭＣで刺激されたマルチマー特異的Ｔ細胞を生成することに対する、置換されたウリジンおよび／またはシチジンを含むｍＲＮＡの商業的および社内調製の影響を比較する例示的なデータを示す。

【０１４３】

図５９Ｃは、図５９Ｂに記載したように生成した刺激されたＴ細胞の増大化を比較する例示的なデータを示す。

【０１４４】

【図６０】図６０Ａは、細胞における発現のために使用したショートマー（９～１０アミノ酸、上）およびロングマー（２５アミノ酸、下）を使用するｍＲＮＡ構築物の例示的な概略図を示す。

【０１４５】

図６０Ｂは、総ＣＤ８＋細胞のパーセンテージとしてのマルチマー特異的ＣＤ８＋細胞の例示的なグラフを示す。マルチマーアッセイに使用した抗原が示される。

【０１４６】

図６０Ｃは、ショートマー（９～１０アミノ酸）およびロングマー（２５アミノ酸）ペプチドで刺激されたＡＰＣと、同じショートマー（９～１０アミノ酸）およびロングマー（２５アミノ酸）ペプチドをコードすることを含有するＡＰＣとを比較する、マルチマー陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞の検出の例示的なフローサイトメトリー分析を示す。

【０１４７】

【図６１－１】図６１Ａは、図６１Ｂ～６１Ｄ中に示される実験の細胞をトランスフェクトする例示的なＲＮＡ構築物の概略図を示す。

【０１４８】

図６１Ｂは、マルチマーアッセイからの結果の例示的なグラフ表示を示す。ＰＢＭＣ取り扱いの３つ全ての条件下で、ＲＮＡでトランスフェクトされたＰＢＭＣは、抗原特異的Ｔ細胞を生成するにあたり、ペプチドがロードされたＰＢＭＣよりも優れていた。Ｇｌｉ３抗原について、ペプチドがロードされたＰＢＭＣと比較して、マルチマー陽性細胞における１０倍よりも大きい増加が注目される。

【０１４９】

図６１Ｃは、ＣＤ３細胞の枯渇ありおよびなしの、各示されたセットにおけるＧｌｉ３マルチマー陽性Ｔ細胞の検出を示す例示的なフローサイトメトリーデータを示す。ＣＤ２５＋ＰＢＭＣのトランスフェクションは、ＣＤ１４およびＣＤ２５細胞を枯渇しているＰＢＭＣまたは凍結されたストックから解凍されたＰＢＭＣよりも増加したマルチマー陽性細

胞を、直接的に生じる。
【０１５０】
【図６１－２】図６１Ｄは、マルチマーアッセイからの結果の例示的なグラフ表示を示す。ＦＴＬ３Ｌ細胞で一晩処置したＰＢＭＣ、またはＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣを、２５アミノ酸の長さのネオ抗原配列（ロングマー）またはエピトープ長さのネオ抗原配列（ショートマー）のいずれかをコードするＲＮＡで電気穿孔した。培養物中のネオ抗原陽性細胞のパーセントを、マルチマー技術を使用してアッセイした。
【０１５１】
図６１Ｅは、図６１Ｄに記載した実験からの増大化倍率結果の例示的なグラフ表示を示す。ＦＴＬ３Ｌ細胞で一晩処置したＰＢＭＣ、またはＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣを、２５アミノ酸の長さのネオ抗原配列（ロングマー）またはエピトープ長さのネオ抗原配列（ショートマー）のいずれかをコードするＲＮＡで電気穿孔した。培養物中での、および２回の刺激の２６日後の細胞の増大化倍率が示される。
【０１５２】
【図６２Ａ】図６２Ａ（上）は、図６２Ａ～図６２Ｃ中に示される実験の細胞のトランスフェクトに用いられる、例示的なＲＮＡ構築物の概略図を描写する。
【０１５３】
図６２Ａ（下）は、Ｘ軸上の示された組合せによる成熟化後２６日目における、２名のドナー由来のＡＣＴＮ４およびＧｌｉ３応答性生Ｔ細胞の数の例示的なグラフ表示を描写する。
【０１５４】
【図６２Ｂ】図６２Ｂは、示された成熟化ミックスの存在下で成長させた生細胞からのＧｌｉ３応答性Ｔ細胞のパーセンテージの例示的なデータを描写する。
【０１５５】
【図６２Ｃ】図６２Ｃは、示された成熟化ミックスの存在下で成長させたＧｌｉ３マルチマー陽性Ｔ細胞の検出を示す例示的なフローサイトメトリーデータを描写する。
【０１５６】
【図６３Ａ】図６３Ａは、放射性同位体組込みを使用する、ＰＢＭＣによる示されたＧｌｉ３エピトープの提示の検出を示す代表的な質量分析データを示す。複数のエピトープ（Ｇｌｉ３エピトープを含む）をコードするｍＲＮＡでトランスフェクトされたＰＢＭＣ、およびペプチドの発現を、より重い同位体で標識した参照ペプチドを使用して検出する。
【０１５７】
【図６３Ｂ】図６３Ｂは、エピトープの各々をコードするｍＲＮＡによるＰＢＭＣのトランスフェクション後の、経時的な、ＨＬＡ－Ａ０２：０１による示されたエピトープの最大提示のパーセンテージの例示的なグラフ表示を示す。各同位体標識されたエピトープを、質量分析法（ｍａｓｓ　ｓｐｅｃｔｒｏｓｃｏｐｙ）によって検出した。最大表面提示は、トランスフェクションの６時間後に観察された。
【０１５８】
【図６４Ａ】図６４Ａは、ＡＰＣにロードするために使用される示されたペプチドの漸増濃度でチャレンジしたネオ抗原特異的ＣＤ８　Ｔ細胞からの、ＴＮＦαおよび／もしくはＩＦＮγ産生におけるパーセンテージ変化（左）またはＣＤ１０７ａ陽性細胞のパーセンテージ（右）の、リコールアッセイからの例示的なグラフ表示を示す。
【０１５９】
【図６４Ｂ】図６４Ｂは、ＡＰＣにロードするために使用される示されたペプチドの漸増濃度でチャレンジしたネオ抗原特異的ＣＤ８　Ｔ細胞からの、ＴＮＦαおよび／もしくはＩＦＮγ産生におけるパーセンテージ変化（左）またはＣＤ１０７ａ陽性細胞のパーセンテージ（右）の、マルチマーアッセイからの例示的なグラフ表示を示す。
【０１６０】
【図６５】図６５は、免疫原としてｍＲＮＡを使用する、最適な製品である個人用Ｔ細胞治療薬を生成するために考慮される基準の例示的なベン図を示す。

【０１６１】
【図６６】図６６は、患者特異的Ｔ細胞製品を調製するためのペプチド配列の選択のためのステップを示す例示的なフローダイヤグラムを示す。
【０１６２】
【図６７Ａ】図６７Ａおよび図６７Ｂは、図１Ａおよび図６７Ａに示されるプロセスによって製造されたＴ細胞を使用した臨床アプローチに有利である複数の側面を例証する。
【図６７Ｂ】同上。
【０１６３】
【図６８】図６８は、複数のエンジニアリングランによって調製された患者特異的Ｔ細胞製品の特徴付けを示す例示的な代表的なフローサイトメトリーデータを示す。生細胞の割合としてのＣＤ３＋（上パネル）ならびに生ＣＤ３＋Ｔ細胞の割合としてのＣＤ８＋およびＣＤ４＋（下パネル）が示される。
【０１６４】
【図６９】図６９Ａは、複数のエンジニアリングランによって調製された患者特異的Ｔ細胞製品の特徴付けを示すデータの例示的なグラフ表示を示す。マルチマー陽性ＣＤ８陽性細胞のパーセンテージが示される。
【０１６５】
図６９Ｂは、複数のエンジニアリングランによって調製された患者特異的Ｔ細胞製品の特徴付けを示す例示的な代表的なフローサイトメトリーデータを示す。示されたエピトープについて、マルチマーＡ陽性かつマルチマーＢ陽性ＣＤ８細胞のパーセンテージが示される。
【０１６６】
図６９Ｃは、ロードされていないＤＣと比較した、突然変異体ネオ抗原がロードされたＤＣでの再チャレンジの際の同定されたｐＭＨＣ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の多機能性を示す例示的な円グラフを示す。
【０１６７】
【図７０】図７０は、複数のエンジニアリングランによって調製された患者特異的Ｔ細胞製品のＣＤ４$^{+}$細胞によるＩＦＮγおよび／またはＴＮＦαの産生における変化を示す代表的なデータを示す。複数のエンジニアリングランによって調製された患者特異的Ｔ細胞製品中のＩＦＮγ^{+}および／またはＴＮＦα^{+}および／またはＣＤ１０７ａ$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞の特徴付けを示す例示的な代表的なデータもまた示される。
【０１６８】
【図７１】図７１は、複数のエンジニアリングランによって調製された患者特異的Ｔ細胞製品中の、セントラルメモリーＴ細胞（$Ｔ_{ｃｍ}$）、エフェクターメモリーＴ細胞（$Ｔ_{ｅｍ}$）、エフェクターＴ細胞（$Ｔ_{ｅｆｆ}$）およびナイーブＴ細胞（$Ｔ_{ナイーブ}$）の割合を示す例示的なグラフ表示を示す。セントラルメモリーＴ細胞（$Ｔ_{ｃｍ}$）：ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$、エフェクターメモリーＴ細胞（$Ｔ_{ｅｍ}$）：ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$、エフェクターＴ細胞（$Ｔ_{ｅｆｆ}$）：ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$、ナイーブＴ細胞（$Ｔ_{ナイーブ}$）：ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$。
【０１６９】
【図７２】図７２は、試料中の、種々の濃度の、ペプチドがロードされたＤＣでのチャレンジの際に測定された総ＣＤ８$^{+}$細胞（上パネル）または総ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（下パネル）のＩＦＮ－γ^{+}および／またはＴＮＦα^{+}および／またはＣＤ１０７ａ$^{+}$細胞のパーセンテージを示すマルチマーアッセイからのデータの例示的なグラフ表示を示す。グラフの各々に使用したペプチドが示される。
【０１７０】
【図７３】図７３は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａ（上列）および腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３（下列）の上方調節を示すデータの例示的なグラフ表示を示す。Ａ３７５腫瘍細胞系またはペプチドがロードされたもしくはロードされていないＡ３７５腫瘍細胞系における、形質導入されていないまたは２００アミノ酸の構築物で形質導入されたものと

の共培養後に、測定値を得た。

【０１７１】

【図７４】図７４は、誘導されたＴ細胞が抗原発現細胞を死滅させることができることを示すデータの例示的なグラフ表示を示す。ネオ抗原特異的Ｔ細胞が、自家腫瘍またはペプチドがロードされた自家腫瘍を認識するかどうか、リコール応答アッセイを介して試験した。読み出し：ｐＭＨＣ$^{+}$（ＣＤ８$^{+}$の％）およびｐＭＨＣ$^{-}$（ＣＤ８$^{+}$の％）Ｔ細胞のＩＦＮ－γ^{+}および／またはＴＮＦα^{+}および／またはＣＤ１０７ａ$^{+}$（Ｙ軸）。有意性を、一元配置ＡＮＯＶＡ、Ｐ＜０．０５を使用して割り当てた。

【０１７２】

【図７５】図７５は、臨床的研究（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１）における使用のためのコホートおよび用量の例示的な概略図を示す。

【０１７３】

【図７６Ａ】図７６Ａは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１製造プロセス概観の概略的表示を示す。

【０１７４】

【図７６Ｂ】図７６Ｂは、Ｔ細胞製品特徴を示す。

【０１７５】

【図７７－１】図７７Ａは、患者１由来の患者ＰＢＭＣを使用した、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐまたはＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスのいずれかの各プールにおけるマルチマー特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の頻度を示す。

【０１７６】

図７７Ｂは、患者２由来の患者ＰＢＭＣを使用した、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐまたはＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスのいずれかの各プールにおけるマルチマー特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の頻度を示す。

【０１７７】

図７７Ｃは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスによって分けられた、各患者における応答の概要を示す。分母は、Ｔ細胞応答の誘導に使用されたネオ抗原配列の総数を示す。

【０１７８】

図７７Ｄは、ＣＤ８＋集団におけるｐＭＨＣ$^{+}$Ｔ細胞の例示的なフローサイトメトリープロットを示す。

【０１７９】

【図７７－２】図７７Ｅは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１から生成されたマルチマー特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の頻度を示す。黒色の丸は、黒色腫患者試料においてラージスケールで行われたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐからのｐＭＨＣ$^{+}$特異的応答を表し；赤色の丸は、卵巣患者試料を使用してスモールスケールで行われたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐからのｐＭＨＣ$^{+}$特異的応答を表し、緑色の丸は、卵巣患者試料においてスモールスケールで行われたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡからのｐＭＨＣ$^{+}$特異的応答を表す。

【０１８０】

【図７８】図７８Ａは、卵巣患者試料からのネオ抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答が、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐセットからの多機能性代表的データであることを実証する結果を示す。ＤＭＳＯをロードされたＤＣによりチャレンジされたｐＭＨＣ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞と比較した、突然変異体ネオ抗原がロードされたＤＣによる再チャレンジ後の同定されたｐＭＨＣ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の機能性マーカー（ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－αおよびＣＤ１０７ａ）の発現を描写するデータ。棒グラフの上にあるパーセンテージは、試料中に存在するｐＭＨＣ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のパーセンテージを表す。

【０１８１】

図７８Ｂは、卵巣患者試料からのネオ抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答が、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡセットからの多機能性代表的データであることを実証する結果を示す。ＤＭＳＯをロードされたＤＣによりチャレンジされたｐＭＨＣ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞と比較した、突然変異体ネオ抗原がロードされたＤＣによる再チャレンジ後の同定されたｐＭＨＣ$^{+}$

ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の機能性マーカー（ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－αおよびＣＤ１０７ａ）の発現を描写するデータ。棒グラフの上にあるパーセンテージは、試料中に存在するｐＭＨＣ$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞のパーセンテージを表す。

【０１８２】

【図７９－１】図７９Ａは、閾値（樹状細胞のみと共培養された場合に産生されるＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α$^+$の量）を上回る、それらの同族ペプチドをロードされた樹状細胞と共培養された場合のＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α$^+$を産生するネオ抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞の頻度を示す。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐ処置卵巣患者試料１。

【０１８３】

図７９Ｂは、閾値（樹状細胞のみと共培養された場合に産生されるＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α$^+$の量）を上回る、それらの同族ペプチドをロードされた樹状細胞と共培養された場合のＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α$^+$を産生するネオ抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞の頻度を示す。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡ誘導卵巣患者試料１。

【０１８４】

図７９Ｃは、閾値（樹状細胞のみと共培養された場合に産生されるＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α$^+$および／またはＣＤ１０７ａの量）を上回る、それらの同族ペプチドをロードされた樹状細胞と共培養された場合のＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α$^+$を産生するネオ抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞の頻度を示す。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐ処置卵巣患者試料２。

【０１８５】

図７９Ｄは、閾値（樹状細胞のみと共培養された場合に産生されるＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α$^+$および／またはＣＤ１０７ａの量）を上回る、それらの同族ペプチドをロードされた樹状細胞と共培養された場合のＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α$^+$を産生するネオ抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞の頻度を示す。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡ誘導卵巣患者試料２。

【０１８６】

【図７９－２】図７９Ｅは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスによって分けられた、各患者におけるＣＤ４$^+$Ｔ細胞応答の総数である。データは、卵巣がん患者１および２由来の試料細胞からの、ペプチド刺激（左の欄）およびＲＮＡ媒介性抗原発現（右の欄）プロセスを使用して、製造された細胞において得られる応答の多様性を実証する。分母は、各プロセスにおける応答の誘導に使用されるネオ抗原の総数を表す。

【０１８７】

図７９Ｆは、ＤＭＳＯまたはそれらの同族ネオ抗原をロードされた樹状細胞による再刺激後のＣＤ４$^+$集団におけるＩＦＮ－γ$^+$細胞のフローサイトメトリープロットを示す。

【０１８８】

図７９Ｇは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１から生成された抗原特異的活性化（ＩＦＮ－γ$^+$および／またはＴＮＦ－α＋）ＣＤ４$^+$Ｔ細胞の頻度を示す。黒色の丸は、黒色腫患者試料においてラージスケールで行われたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐからのｐＭＨＣ$^+$特異的応答を表し；赤色の丸は、卵巣患者試料を使用してスモールスケールで行われたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐからのｐＭＨＣ$^+$特異的応答を表し、緑色の丸は、卵巣患者試料においてスモールスケールで行われたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡからのｐＭＨＣ$^+$特異的応答を表す。

【０１８９】

【図８０Ａ】図８０Ａは、卵巣患者試料からのネオ抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞応答が、多機能性であることを実証する結果を示す。ＤＭＳＯをロードされた樹状細胞と比較した、ネオ抗原がロードされたＤＣによる再チャレンジ後のＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスにおける抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞の多機能性。

【０１９０】

【図８０Ｂ】図８０Ｂは、卵巣患者試料からのネオ抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞応答が、多機能性であることを実証する結果を示す。ＤＭＳＯをロードされた樹状細胞と比較した、ネオ抗原がロードされたＤＣによる再チャレンジ後のＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスにおける抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞の多機能性。

【０１９１】

【図８１Ａ】図８１Ａは、Ｎｅｏ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスにおけるマルチマー応答性細胞集団のフローサイトメトリーゲーティングを示す。マルチマー陽性細胞の頻度を示すｐＭＨＣ＋プロット。

【０１９２】

【図８１Ｂ】図８１Ｂは、Ｎｅｏ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスにおけるバルクＣＤ４、バルクＣＤ８またはマルチマー陽性細胞に存在するナイーブ、セントラルメモリー（ＣＭ）、エフェクターメモリー（ＥＭ）またはエフェクターＴ細胞の頻度を示す。

【０１９３】

【図８１Ｃ】図８１Ｃは、Ｔ細胞を、突然変異体、野生型、無関係ペプチドまたはＤＭＳＯ（ペプチドなし）をロードされた腫瘍細胞系と共培養してから６時間後に測定された、ＣＤ１０７ａネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の上方調節を示す、Ｎｅｏ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスにおける細胞集団の代表的データを示す。

【０１９４】

【図８１Ｄ】図８１Ｄは、Ｎｅｏ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスにおけるマルチマー応答性細胞集団のフローサイトメトリーゲーティングを示す。マルチマー陽性細胞の頻度を示すｐＭＨＣ＋プロット。

【０１９５】

【図８１Ｅ】図８１Ｅは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスにおけるバルクＣＤ４、バルクＣＤ８またはマルチマー陽性細胞に存在するナイーブ、セントラルメモリー（ＣＭ）、エフェクターメモリー（ＥＭ）またはエフェクターＴ細胞の頻度を示す。

【０１９６】

【図８１Ｆ】図８１Ｆは、Ｔ細胞を、突然変異体、野生型、無関係ペプチドまたはＤＭＳＯ（ペプチドなし）をロードされた腫瘍細胞系と共培養してから６時間後に測定された、ＣＤ１０７ａネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の上方調節を示す、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスにおける細胞集団の代表的データを示す。

【０１９７】

【図８２】図８２は、個人用Ｔ細胞療法薬の安全性および活性の第１相オープンラベル用量設定および増大化研究の研究設計の概略的表示を示す。研究のパート１は、用量漸増による単独療法のために設計されており、それによると、抗ＰＤ－１療法において進行しており、抗ＣＴＬＡ４療法を受けた患者は、≧１×１０^{8}個の細胞～≦１×１０^{9}個の細胞、＋／－２５％（用量１）を受けるか、または２×１０^{9}個の細胞～≦１×１０^{10}個の細胞、＋／－２５％（用量２）を受けるであろう。次に、安全かつ許容できると思われる、最高用量コホートにおける患者における用量増大化が来るであろう。研究のパート２は、併用療法のために設計されており、それによると、抗ＰＤ－１療法（抗ＣＴＬＡ４療法ありまたはなし）において３ヶ月後に安定または無症候性進行者であると思われる患者は、パート１において安全であると決定された用量の個人用Ｔ細胞療法薬、プラス、抗ＰＤ－１療法（抗ＣＴＬＡ４ありまたはなし）を受けるであろう。患者は、治験への算入および自身の個人用Ｔ細胞療法薬の産生後に、抗ＰＤ１（＋／－抗ＣＴＬＡ４）療法を受け、経過観察期間全体にわたって抗ＰＤ１処置を続けるであろう（最大ＥＯＳまで）。研究のこのパートは、抗ＰＤ１と個人用Ｔ細胞療法薬との組合せの有効性を測定するであろう。

【０１９８】

【図８３】図８３は、図８２に記載されている研究のタイムラインの概略的表示を示す。描写されている通り、プレスクリーニングおよびスクリーニング相は、０日目の個人用Ｔ細胞療法薬の投与に相対的な、それぞれ－２０日目から－１６日目の間である。選択された対象は、－１２日目に白血球アフェレーシスに付され、細胞は、その後の期間のために

加工されて、個人用Ｔ細胞療法薬を生成する。－１日目に、対象は、個人用Ｔ細胞療法薬に先立ち、化学療法の最後の用量を投与される。個人用Ｔ細胞療法薬は、０日目に投与され、それに続いて、３６～５２週間の経過観察期間がある。対象は、抗ＰＤ－１療法薬（ニボルマブ）の用量を６週間に１回（Ｑ６Ｗ）投与されるであろう。

【０１９９】

【図８４】図８４（上部パネル）は、３種の卵巣がん（ＯＶＣ）患者試料において行われるスモールスケール誘導の概観を示す。患者試料（ＰＢＭＣ）は卵巣がんを有する対象から得られ、スモールスケール製造ＮＥＯＳＴＩＭプロセスが使用され、Ｔ細胞製品が生成され、これに、製品品質の解析が続いた。細胞を刺激するためにペプチド（ペプチドをロードされたＡＰＣ）や、ペプチドをコードするＲＮＡを発現するＡＰＣを使用するステップを含む、卵巣がん細胞からの抗原特異的Ｔ細胞生成のために、ＮＥＯ－ＳＴＩＭ製造プロセスに従い、結果を比較した。各患者から同定された患者特徴および突然変異した抗原（ネオ抗原）が、各ボックス内に表示される。下部パネル：ＣＤ８＋Ｔ細胞刺激およびＣＤ４＋Ｔ細胞刺激のためのプロセスのために使用される２種のＲＮＡ設計を示すグラフ表示が提供される。

【０２００】

【図８５】図８５は、ペプチド対ＲＮＡ媒介性刺激プロセスの比較および検証のためのアッセイおよび結果ハイライトの概観を示し、どちらのプロセスも、製造された製品品質要件を満たすのに適することを示す。

【０２０１】

【図８６】図８６は、ＮＥＯＳＴＩＭ製造プロセスにおけるペプチド対ＲＮＡ媒介性刺激プロセスの比較および検証のための方法のさらなる詳細を示す。

【０２０２】

【図８７Ａ】図８７Ａは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスの結果を示し、どちらも、ネオ抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の同様の頻度を生成することを示す（患者Ｎ１６ＮＥＯＮ－１７、ＯＶＣ＃１）。

【０２０３】

【図８７Ｂ】図８７Ｂは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスの結果を示し、どちらも、ネオ抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の同様の頻度を生成することを示す（患者Ｎ１６ＮＥＯＮ－１９、ＯＶＣ＃２）。

【０２０４】

【図８７Ｃ】図８７Ｃは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスの結果を示し、どちらも、ネオ抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の同様の頻度を生成することを示す（患者Ｎ１６ＮＥＯＮ－１８、ＯＶＣ＃３）。

【０２０５】

【図８８】図８８は、ネオ抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の同様の頻度を示すデータを示し、ペプチドおよびＲＮＡプロトコールは、エンジニアリングランにおける観察と合致する。

【０２０６】

【図８９】図８９は、２名のＯＶＣ患者におけるＣＤ４＋応答の生成の成功を示すデータを示す。頻度は、ペプチドなし対照からのＣＤ４陽性試料の（Δ）デルター変化を表す。

【０２０７】

【図９０】図９０は、ネオ抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の同様の頻度が、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロトコールの両方によりＯＶＣ患者試料において生成されることを示すデータを示す。

【０２０８】

【図９１】図９１は、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ペプチドプロトコールの優勢な表現型が、Ｔエフェクターメモリー細胞であることを示すデータを示す。

【０２０９】

【図９２】図９２は、ＮＥＯ－ＳＴＩＭにおけるＩＬ－２１の使用が、抗原特異的ＣＤ８

$^{+}$Ｔ細胞におけるセントラルメモリー表現型を増加させることを示すデータを示す。
【０２１０】
【図９３】図９３は、ＩＬ－２１添加が、ＮＥＯ－ＳＴＩＭ．ＲＮＡ培養物の増大化を改善することを示すデータを示す。
【０２１１】
【図９４】図９４は、ＩＬ－２１添加が、ＮＥＯ－ＳＴＩＭ．ＲＮＡ培養物における特異的Ｔ細胞のプライミングを改善することを示すデータを示す。
【０２１２】
【図９５】図９５は、ＩＬ－２１添加が、本出願人らのＮＥＯ－ＳＴＩＭ．ＲＮＡ培養物におけるＴｃｍ集団を増加させることを示すデータを示す。
【発明を実施するための形態】
【０２１３】
詳細な説明
Ｔ細胞療法薬は、相対的に安全かつ耐容性が良い養子Ｔ細胞産物であると予想される。しかし、産物に関連するリスクの評価に基づき、Ｔ細胞療法薬に関連する潜在的な毒性の、以下の３つの一般的なクラスが存在する：（ａ）リンパ球枯渇（ｌｙｍｐｈｏｄｅｐｌｅｔｉｏｎ）、細胞注入またはサイトカイン放出症候群による処置関連毒性；（ｂ）自己反応性クローンの増大化またはネオ抗原特異的Ｔ細胞の交差反応性による腫瘍外（ｏｆｆ－ｔｕｍｏｒ）オフターゲット毒性；および（ｃ）非腫瘍組織におけるネオ抗原の提示による腫瘍外オンターゲット（ｏｎ－ｔａｒｇｅｔ）毒性。個体の腫瘍に特有の突然変異事象から生じるネオ抗原の発見に基づく、新規免疫療法剤およびその使用が本明細書に記載されている。したがって、本明細書に記載されている本開示は、疾患の処置における使用のための、抗原特異的免疫細胞、例えば、Ｔ細胞を創出するための方法およびプロトコールを提供する。
【０２１４】
がん免疫療法のためのネオ抗原応答性Ｔ細胞の組成物が本明細書に提示される。養子Ｔ細胞療法は、がん治療法のための有望な新たなアプローチであるが、いくつかの改善を要求する。一般に、Ｔ細胞は、がん細胞に対して適切に細胞傷害性となる必要があり、身体における非がん細胞を温存する必要があり、腫瘍環境において免疫原性を失うべきではなく、長期保護を供するべきである。その上、ウイルスにより形質導入された細胞の使用それ自体が課題を抱える。したがって、健康な細胞を温存しつつがん細胞を特異的に標的とする治療上有効な組成物を達成するために適正なバランスを取ることは、疾患の進行を止め、軽快または少なくとも実質的な腫瘍退縮を引き起こし、がんの再発を予防し、複雑なプロセスのほぼ全てのステップにおけるいくつかの改善を要求する。
【０２１５】
本開示の理解を助けるために、いくつかの用語および語句を下に定義する。
【０２１６】
抗原は、免疫応答を誘導する、身体にとっての異物である。「ネオ抗原」は、タンパク質における腫瘍特異的変化から生じる腫瘍抗原のクラスを指す。ネオ抗原は、例えば、タンパク質配列における置換、フレームシフト突然変異、融合ポリペプチド、インフレーム欠失、挿入、および内在性レトロウイルスポリペプチドの発現から生じる腫瘍抗原を包含するがこれらに限定されない。
【０２１７】
「ネオエピトープ」は、非罹患細胞、例えば、非がん性細胞または生殖系列細胞等の参照には存在しないが、罹患細胞、例えば、がん細胞に見出されるエピトープを指す。これは、対応するエピトープが、正常非罹患細胞または生殖系列細胞に見出されるが、１個または複数の突然変異により、罹患細胞、例えば、がん細胞において、エピトープの配列が、ネオエピトープをもたらすように変化されている状況を含む。
【０２１８】
「突然変異」は、参照核酸と比較した核酸配列の変化または差（例えば、ヌクレオチド

置換、付加または欠失）を指す。「体細胞突然変異」は、胚細胞（精子および卵）を除いた身体の細胞のいずれかにおいて起こることができ、子供には伝わらない。このような変更は、がんまたは他の疾患を引き起こし得る（が必ずしも引き起こすとは限らない）。一部の実施形態では、突然変異は、非同義突然変異である。「非同義突然変異」は、翻訳産物におけるアミノ酸置換等のアミノ酸変化をもたらす突然変異（例えば、ヌクレオチド置換）を指す。「フレームシフト」は、突然変異が、遺伝子のコドン周期性（「読み枠」としても公知）の正常相を壊し、非ネイティブタンパク質配列の翻訳をもたらす場合に起こる。遺伝子における異なる突然変異が、同じ変更された読み枠を達成することが可能である。

【０２１９】

「抗原プロセシング」または「プロセシング」は、ポリペプチドまたは抗原から、前記ポリペプチドまたは抗原の断片であるプロセシング（ｐｒｏｃｅｓｓｉｏｎ）産物への分解（例えば、ポリペプチドからペプチドへの分解）、および特異的Ｔ細胞に向けた細胞、例えば、抗原提示細胞による提示のための、ＭＨＣ分子とこれらの断片のうち１個または複数との会合（例えば、結合による）を指す。

【０２２０】

「抗原提示細胞」（ＡＰＣ）は、その細胞表面にあるＭＨＣ分子と会合したタンパク質抗原のペプチド断片を提示する細胞を指す。この用語は、プロフェッショナル抗原提示細胞（例えば、Ｂリンパ球、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞）と共に他の抗原提示細胞（例えば、ケラチノサイト、内皮細胞、アストロサイト、線維芽細胞、オリゴデンドロサイト）を含む。

【０２２１】

用語「親和性」は、結合対の２つのメンバー（例えば、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）結合ペプチドおよびクラスＩもしくはＩＩ　ＨＬＡ、またはペプチド－ＨＬＡ複合体およびＴ細胞受容体（ＴＣＲ））の間の結合の強度の尺度を指す。K_Dは、結合対の２つのメンバーの間の解離定数を指し、モル濃度の単位を有する。K_Aは、結合対の２つのメンバーの間の親和性定数を指し、解離定数の逆数である。親和性は、実験的に、例えば、市販のＢｉａｃｏｒｅ　ＳＰＲユニットを使用して表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって決定することができる。K_{off}は、結合対の２つのメンバーのオフレート（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）定数（例えば、ＨＬＡ結合ペプチドおよびクラスＩもしくはＩＩ　ＨＬＡ、またはペプチド－ＨＬＡ複合体およびＴＣＲのオフレート定数）を指す。K_{on}は、結合対の２つのメンバーのオンレート（ｏｎ－ｒａｔｅ）定数（例えば、ＨＬＡ結合ペプチドおよびクラスＩもしくはＩＩ　ＨＬＡ、またはペプチド－ＨＬＡ複合体およびＴＣＲのオンレート定数）を指す。

【０２２２】

本開示を通して、「結合データ」結果は、「IC_{50}」単位で表現することができる。親和性は、阻害濃度５０（IC_{50}）、または結合対の第１のメンバー（例えば、ペプチド）の５０％が置き換わる濃度として表現することもできる。同様に、ｌｎ（IC_{50}）は、IC_{50}の自然対数を指す。例えば、IC_{50}は、標識された参照ペプチドの結合の５０％阻害が観察される、結合アッセイにおける被験ペプチドの濃度であり得る。アッセイが実行される条件を考慮すると（例えば、ＨＬＡタンパク質濃度および／または標識された参照ペプチド濃度を限定する）、これらの値は、K_D値を近似し得る。結合を決定するためのアッセイは、当技術分野で周知であり、例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９４／２０１２７およびＷＯ９４／０３２０５、ならびにＳｉｄｎｅｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１８．３．１　（１９９８）；Ｓｉｄｎｅｙ，　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１５４：２４７　（１９９５）；およびＳｅｔｔｅ，　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　３１：８１３　（１９９４）等の他の刊行物に詳細に記載されている。あるいは、結合は、参照標準ペプチドによる結合と比べて表現することができる。結合は、生細胞（例えば、Ｃｅｐｐｅｌｌｉｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３３９：３９２　（１９８９）；Ｃｈｒ

istnick et al., Nature 352:67 (1991);Busch et al., Int. Immunol. 2:443 (1990);Hill et al., J. Immunol. 147:189 (1991);del Guercio et al., J. Immunol. 154:685 (1995))、洗剤ライセートを使用した無細胞系（例えば、Cerundolo et al., J. Immunol. 21:2069 (1991)）、固定化された精製されたMHC（例えば、Hill et al., J. Immunol. 152, 2890 (1994);Marshall et al., J. Immunol. 152:4946 (1994)）、ELISA系（例えば、Reay et al., EMBO J. 11:2829 (1992)）、表面プラズモン共鳴（例えば、Khilko et al., J. Biol. Chem. 268:15425 (1993)）;ハイフラックス可溶性相アッセイ（Hammer et al., J. Exp. Med. 180:2353 (1994)）、およびクラスI MHC安定化またはアセンブリの測定（例えば、Ljunggren et al., Nature 346:476 (1990);Schumacher et al., Cell 62:563 (1990);Townsend et al., Cell 62:285 (1990);Parker et al., J. Immunol. 149:1896 (1992)）を使用したアッセイ系を含む他のアッセイ系を使用して決定することもできる。

【0223】

用語「派生された」は、エピトープを記述するために使用される場合、「調製された」の同義語である。派生されたエピトープは、天然の供給源から単離することができる、または当技術分野における標準プロトコールに従って合成することができる。合成エピトープは、シクロヘキシルアラニン等、天然に存在するLアミノ酸残基のD異性体または非天然アミノ酸残基等、人工アミノ酸残基「アミノ酸ミメティック」を含むことができる。派生または調製されたエピトープは、ネイティブエピトープのアナログであり得る。用語「に由来する」は、起源または供給源を指し、天然に存在する、組換えの、未精製の、精製されたまたは分化した分子または細胞を含むことができる。例えば、増大化または誘導された抗原特異的T細胞は、T細胞に由来することができる。例えば、増大化または誘導された抗原特異的T細胞は、生体試料における抗原特異的T細胞に由来することができる。例えば、成熟したAPC（例えば、プロフェッショナルAPC）は、成熟していないAPC（例えば、未成熟APC）に由来することができる。例えば、APCは、単球（例えば、CD14^{+}単球）に由来することができる。例えば、樹状細胞は、単球（例えば、CD14^{+}単球）に由来することができる。例えば、APCは、骨髄細胞に由来することができる。

【0224】

「エピトープ」は、別の分子（例えば、免疫グロブリン、T細胞受容体、HLA分子またはキメラ抗原受容体）によって認識される部位を一緒になって形成する、分子の集合的特色である（例えば、ペプチドの電荷、ならびに一次、二次および三次構造）。例えば、エピトープは、特定の免疫グロブリン;主要組織適合複合体（MHC）受容体による認識に関与するアミノ酸残基のセットであり得る;またはT細胞の文脈において、T細胞受容体タンパク質および／またはキメラ抗原受容体によって認識される残基であり得る。エピトープは、天然の供給源からの単離によって調製することができる、または当技術分野における標準プロトコールに従って合成することができる。合成エピトープは、人工アミノ酸残基、アミノ酸ミメティック（天然に存在するLアミノ酸残基のD異性体または天然に存在しないアミノ酸残基等）を含むことができる。本開示を通して、エピトープは、一部の場合では、ペプチドまたはペプチドエピトープと称することができる。ある特定の実施形態では、本開示のペプチドの長さには限定がある。長さが限定された実施形態は、本明細書に記載されているエピトープを含むタンパク質またはペプチドが、ネイティブ配列と100％同一性を有する領域（すなわち、近接した一連のアミノ酸残基）を含む場合に起

こる。例えば、エピトープの定義を天然分子全体における読み取りから回避するために、ネイティブペプチド配列と１００％同一性を有するいずれかの領域の長さには限定がある。よって、本明細書に記載されているエピトープと、ネイティブペプチド配列と１００％同一性を有する領域とを含むペプチドについては、ネイティブ配列に対して１００％同一性を有する領域は一般に、６００アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい、５００アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい、４００アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい、２５０アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい、１００アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい、８５アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい、７５アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい、６５アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい、および５０アミノ酸残基未満のまたはこれに等しい長さを有する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている「エピトープ」は、ネイティブペプチド配列に対して１００％同一性を有する５１アミノ酸残基未満を、５アミノ酸残基までのいずれかの増分で有する；例えば、５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１アミノ酸残基を有する、領域を有するペプチドによって構成される。

【０２２５】

「Ｔ細胞エピトープ」は、ペプチド－ＭＨＣ（ｐＭＨＣ）複合体の形態でＭＨＣ分子によって結合されるペプチド配列を指す。ペプチド－ＭＨＣ複合体は、Ｔ細胞（例えば、細胞傷害性Ｔリンパ球またはＴヘルパー細胞）のＴＣＲによって認識および結合され得る。

【０２２６】

「Ｔ細胞」は、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞を含む。Ｔ細胞という用語は、Ｔヘルパー１型Ｔ細胞およびＴヘルパー２型Ｔ細胞の両方も含む。Ｔ細胞は、臨床適用のために、本出願に記載されている方法によって生成することができる。臨床適用のための等、本明細書に（ｈｅｒｅ）参照されているＴ細胞または養子Ｔ細胞は、生物学的供給源から単離され、ｅｘ　ｖｉｖｏで操作および培養され、がん、例えば、黒色腫等の特異的治療法のための薬物候補へと調製された細胞である。薬物候補細胞が、臨床適用の適合度に関する特異的定性的および定量的判断基準に合格した場合、薬物候補は、薬物製品と命名することができる。一部の場合では、薬物製品は、多数の薬物候補から選択される。本出願の文脈において、薬物製品は、Ｔ細胞、より具体的には、Ｔ細胞の集団、またはより具体的には、不均一な特徴およびサブタイプを有するＴ細胞の集団である。例えば、本明細書に開示されている薬物製品は、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞を含むＴ細胞の集団を有することができ、ある特定のパーセンテージを少なくとも上回る細胞が、抗原特異性を示し、それぞれのある特定のパーセンテージは、とりわけメモリー表現型を示す。

【０２２７】

「免疫細胞」は、免疫応答における役割を果たす細胞を指す。免疫細胞は、造血起源のものであり、Ｂ細胞およびＴ細胞等のリンパ球；ナチュラルキラー細胞；単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球および顆粒球等の骨髄性細胞を含む。

【０２２８】

「免疫原性」ペプチドまたは「免疫原性」エピトープまたは「免疫原性」ペプチドエピトープは、ＨＬＡ分子に結合し、細胞媒介性または液性応答、例えば、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答、ヘルパーＴリンパ球（ＨＴＬ）応答および／またはＢリンパ球応答を誘導するペプチドである。本明細書に記載されている免疫原性ペプチドは、ＨＬＡ分子に結合し、その後、ペプチドに対する細胞媒介性または液性応答（例えば、ＣＴＬ（細胞傷害性）応答またはＨＴＬ応答）を誘導することができる。

【０２２９】

「防御免疫応答」または「治療的免疫応答」は、疾患症状、副作用または進行を何らかの仕方で予防または少なくとも部分的に停止する、病原性抗原（例えば、腫瘍抗原）に由来する抗原に対するＣＴＬおよび／またはＨＴＬ応答を指す。免疫応答は、ヘルパーＴ細

胞の刺激によって促された、抗体応答を含むこともできる。
【０２３０】
「Ｔ細胞受容体」（「ＴＣＲ」）は、天然のものであれ、部分的にまたは全体的に合成により産生されたものであれ、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）分子に結合された抗原を認識するＴリンパ球（Ｔ細胞）の表面に見出される分子を指す。様々な疾患（例えば、がん）または感染性生物に関連する抗原を認識するＴ細胞の能力は、アルファ（α）鎖およびベータ（β）鎖の両方またはガンマ（γ）およびデルタ（δ）鎖の両方で構成されている、そのＴＣＲによって付与される。これらの鎖を構成するタンパク質は、ＴＣＲの膨大な多様性を生成するための特有の機構を用いる、ＤＮＡによってコードされる。この多サブユニット免疫認識受容体は、ＣＤ３複合体と会合し、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面におけるＭＨＣクラスＩおよびＩＩタンパク質によって提示されるペプチドに結合する。ＡＰＣ表面のペプチドへのＴＣＲの結合は、Ｔ細胞活性化における中心的事象である。
【０２３１】
本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」または「ＣＡＲ」は、免疫グロブリン抗原結合ドメイン（例えば、免疫グロブリン可変ドメイン）およびＴ細胞受容体（ＴＣＲ）定常ドメインを含む抗原結合タンパク質を指す。本明細書で使用される場合、ＴＣＲポリペプチドの「定常ドメイン」は、膜近位ＴＣＲ定常ドメイン、ＴＣＲ膜貫通ドメインおよび／またはＴＣＲ細胞質ドメイン、またはこれらの断片を含む。例えば、一部の実施形態では、ＣＡＲは、ＴＣＲβ定常ドメインに連結された免疫グロブリン重鎖可変ドメインを含むポリペプチドを含む単量体である。一部の実施形態では、ＣＡＲは、ＴＣＲαまたはＴＣＲβ定常ドメインに連結された免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインを含む第１のポリペプチドと、ＴＣＲβまたはＴＣＲα定常ドメインに連結された免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメイン（例えば、κまたはλ可変ドメイン）を含む第２のポリペプチドとを含む二量体である。
【０２３２】
「主要組織適合複合体」または「ＭＨＣ」は、生理的免疫応答の原因となる細胞相互作用の制御における役割を果たす遺伝子のクラスターである。用語「主要組織適合複合体」および略語「ＭＨＣ」は、ＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩ分子等、ＭＨＣ分子のいずれかのクラスを含むことができ、全脊椎動物において生じる遺伝子の複合体に関する。ヒトにおいて、ＭＨＣ複合体は、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）複合体としても公知である。よって、「ヒト白血球抗原」または「ＨＬＡ」は、ヒト主要組織適合複合体（ＭＨＣ）タンパク質を指す（例えば、Ｓｔｉｔｅｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，８ＴＨ Ｅｄ．，Ｌａｎｇｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｌｏｓ Ａｌｔｏｓ，Ｃａｌｉｆ．（１９９４）を参照）。ＭＨＣおよびＨＬＡ複合体の詳細な説明については、Ｐａｕｌ，Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，３ｒｄ Ｅｄ．，Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）を参照されたい。
【０２３３】
ゲノムにおける主要組織適合複合体は、細胞表面に発現されたその遺伝子産物が、内在性および／または外来性抗原の結合および提示に、よって、免疫学的プロセスの調節に重要である遺伝的領域を含む。ＭＨＣタンパク質または分子は、免疫反応におけるリンパ球および抗原提示細胞または罹患細胞の間のシグナル伝達に重要である。ＭＨＣタンパク質または分子は、ペプチドに結合し、Ｔ細胞受容体による認識のためにこれを提示する。ＭＨＣによってコードされるタンパク質は、細胞の表面に発現され、Ｔ細胞に対して自己抗原（細胞それ自体由来のペプチド断片）および非自己抗原（例えば、侵入微生物の断片）の両方をディスプレイすることができる。ＭＨＣ結合ペプチドは、タンパク質抗原のタンパク質分解性切断に起因し、潜在的リンパ球エピトープ（例えば、Ｔ細胞エピトープおよびＢ細胞エピトープ）を表すことができる。ＭＨＣは、ペプチドを細胞表面に輸送し、そこで、細胞傷害性Ｔリンパ球、Ｔヘルパー細胞またはＢ細胞等の特異的細胞に対してペプチドを提示することができる。ＭＨＣ領域は、３種のサブグループ、クラスＩ、クラスＩＩおよびクラスＩＩＩに分けることができる。ＭＨＣクラスＩタンパク質は、α鎖および

β２ミクログロブリン（第１５染色体によってコードされるＭＨＣの一部ではない）を含有することができる。これは、細胞傷害性Ｔ細胞に対して抗原断片を提示することができる。ＭＨＣクラスＩＩタンパク質は、αおよびβ鎖を含有することができ、Ｔヘルパー細胞に対して抗原断片を提示することができる。ＭＨＣクラスＩＩＩ領域は、補体成分およびサイトカイン等、他の免疫成分をコードすることができる。ＭＨＣは、多遺伝子性（いくつかのＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩ遺伝子が存在する）および多型性（各遺伝子の複数の対立遺伝子が存在する）の両方であり得る。

【０２３４】

「受容体」は、リガンドに結合することができる生体分子または分子グループ分けを指す。受容体は、細胞、細胞形成または生物における情報を伝達するように機能することができる。受容体は、少なくとも１つの受容体単位を含み、例えば、各受容体単位は、タンパク質分子からなることができる。受容体は、リガンドの構造を補完する構造を有し、結合パートナーとしてリガンドと複合体形成することができる。情報は、特に、細胞の表面におけるリガンドとの複合体形成後の受容体の立体構造変化によって伝達される。一部の実施形態では、受容体は、特に、リガンド、特に、適した長さのペプチドまたはペプチド断片と受容体／リガンド複合体を形成することができるＭＨＣクラスＩおよびＩＩのタンパク質を意味するものと理解されたい。「リガンド」は、受容体の構造に相補的な構造を有する分子を指し、この受容体と複合体を形成することができる。一部の実施形態では、リガンドは、ペプチドまたはペプチド断片が、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩタンパク質等のＭＨＣタンパク質と複合体を形成することができるような、そのアミノ酸配列に適した長さおよび適した結合モチーフを有するペプチドまたはペプチド断片を意味するものと理解されたい。一部の実施形態では、「受容体／リガンド複合体」はまた、ＭＨＣクラスＩまたはＭＨＣクラスＩＩ分子等のペプチドまたはペプチド断片提示ＭＨＣ分子を含む「受容体／ペプチド複合体」または「受容体／ペプチド断片複合体」を意味するものと理解されたい。

【０２３５】

「ネイティブ」または「野生型」配列は、自然界に見出される配列を指す。用語「天然に存在する」は、本明細書で使用される場合、ある物を自然界に見出すことができるという事実を指す。例えば、生物（ウイルスを含む）に存在し、自然界の供給源から単離することができ、実験室で人間によって意図的に改変されていないペプチドまたは核酸は、天然に存在する。

【０２３６】

用語「ペプチド」および「ペプチドエピトープ」は、本明細書において「オリゴペプチド」と互換的に使用されて、典型的に、隣接するアミノ酸残基のα－アミノおよびカルボキシル基の間のペプチド結合によって次から次に接続された一連の残基を命名する。「合成ペプチド」は、非天然の供給源から得られる、例えば、人造のペプチドを指す。斯かるペプチドは、化学合成または組換えＤＮＡ技術等の方法を使用して産生することができる。「合成ペプチド」は、「融合タンパク質」を含む。

【０２３７】

用語「モチーフ」は、特定のＨＬＡ分子によって認識される、定義された長さのアミノ酸配列、例えば、約１５未満のアミノ酸残基の長さまたは約１３未満のアミノ酸残基の長さ、例えば、クラスＩ　ＨＬＡモチーフのための約８～約１３アミノ酸残基（例えば、８、９、１０、１１、１２または１３）、およびクラスＩＩ　ＨＬＡモチーフのための約６～約２５アミノ酸残基（例えば、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４または２５）のペプチドにおける残基のパターンを指す。モチーフは典型的に、所与のヒトＨＬＡ対立遺伝子によってコードされるＨＬＡタンパク質毎に異なる。これらのモチーフは、それらの一次および二次アンカー残基のパターンが異なる。一部の実施形態では、ＭＨＣクラスＩモチーフは、７、８、９、１０、１１、１２または１３アミノ酸残基の長さのペプチドを同定する。一部の実施形態では、ＭＨＣクラスＩＩモチーフは、１５、１６、１７、１８、１９、２０

、２１、２２、２３、２４、２５または２６アミノ酸残基の長さのペプチドを同定する。「交差反応性結合」ペプチドは、結合対メンバーのクラスの２つ以上のメンバーに結合するペプチド（例えば、クラスＩ　ＨＬＡ分子およびクラスＩＩ　ＨＬＡ分子の両方によって結合されるペプチド）を指す。

【０２３８】

用語「残基」は、アミド結合もしくはアミド結合ミメティックによってペプチドもしくはタンパク質に取り込まれた、または核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）によってコードされる、アミノ酸残基またはアミノ酸ミメティック残基を指す。ペプチドまたはタンパク質を表すために使用される命名法は、従来の慣例に従う。アミノ基は、各アミノ酸残基の左（アミノまたはＮ末端）に提示され、カルボキシル基は、右（カルボキシまたはＣ末端）に提示される。アミノ酸残基位置は、ペプチドエピトープにおいて参照される場合、アミノからカルボキシルへの方向でナンバリングされ、１番目の位置は、エピトープまたはエピトープが一部であり得るそのペプチドもしくはタンパク質のアミノ末端側に配置された残基となる。本発明の選択された特異的な実施形態を表す式において、アミノおよびカルボキシル末端基は、特に示されてはいないが、他に特に指定がなければ、生理的ｐＨ値において仮定される型である。アミノ酸構造式において、各残基は一般に、標準３文字または１文字命名によって表される。アミノ酸残基のＬ型は、大文字の１文字によってまたは１番目の文字が大文字の３文字記号によって表され、Ｄ型を有するアミノ酸残基のためのＤ型は、小文字の１文字または小文字の３文字記号によって表される。しかし、３文字記号またはフルネームが大文字なしで使用される場合、Ｌアミノ酸残基を指すことができる。グリシンは不斉炭素原子を持たず、単に「Ｇｌｙ」または「Ｇ」と称される。本明細書に表記されているペプチドのアミノ酸配列は一般に、標準１文字記号を使用して命名される（Ａ、アラニン；Ｃ、システイン；Ｄ、アスパラギン酸；Ｅ、グルタミン酸；Ｆ、フェニルアラニン；Ｇ、グリシン；Ｈ、ヒスチジン；Ｉ、イソロイシン；Ｋ、リシン；Ｌ、ロイシン；Ｍ、メチオニン；Ｎ、アスパラギン；Ｐ、プロリン；Ｑ、グルタミン；Ｒ、アルギニン；Ｓ、セリン；Ｔ、スレオニン；Ｖ、バリン；Ｗ、トリプトファン；およびＹ、チロシン）。

【０２３９】

「保存的アミノ酸置換」は、あるアミノ酸残基が、同様の側鎖を有する別のアミノ酸残基に置き換えられた置換である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されており、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベーター分枝状側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。例えば、チロシンに代えたフェニルアラニンへの置換は、保存的置換である。ペプチド機能を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸保存的置換を同定する方法は、当技術分野で周知である。

【０２４０】

「薬学的に許容される」は、一般に無毒性の、不活性の、および／または生理的に適合性の組成物または組成物の成分を指す。「医薬賦形剤」または「賦形剤」は、アジュバント、担体、ｐＨ調整剤および緩衝化剤、張度調整剤、湿潤剤、保存料その他等の材料を含む。「医薬賦形剤」は、薬学的に許容される賦形剤である。

【０２４１】

本開示において、用語「ワクチン」は、投与後に、病原体またはがん細胞等の罹患細胞を認識し攻撃する免疫応答、例えば、細胞性または液性免疫応答を誘導する、医薬調製物（医薬組成物）または製品に関する。ワクチンは、疾患の予防または処置に使用することができる。用語「個人に合わせたがんワクチン」または「個別化されたがんワクチン」、「個人用がんワクチン」は、特定のがん患者に関係し、がんワクチンが、個々のがん患者

の必要または特殊な状況に適応されていることを意味する。

【０２４２】

用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書で互換的に使用されており、いずれかの長さのヌクレオチドのポリマーを指し、ＤＮＡおよびＲＮＡ、例えば、ｍＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、改変ヌクレオチドもしくは塩基、および／もしくはそれらのアナログ、またはＤＮＡもしくはＲＮＡポリメラーゼによってポリマーに取り込まれ得るいずれかの基質であり得る。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドおよび核酸は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写されたｍＲＮＡであり得る。一部の実施形態では、本発明の方法を使用して投与されるポリヌクレオチドは、ｍＲＮＡである。

【０２４３】

用語「単離された」または「生物学的に純粋な」は、そのネイティブ状態で見出される際に正常であれば材料に付随する成分を実質的にまたは基本的に含まない材料を指す。よって、本明細書に記載されている単離されたペプチドは、そのｉｎ　ｓｉｔｕ環境において正常であればペプチドと会合する材料の一部または全てを含有しない。例えば、「単離された」エピトープは、エピトープが派生したタンパク質の配列全体を含まないエピトープであり得る。例えば、生きている動物に存在する天然に存在するポリヌクレオチドまたはペプチドは、単離されていないが、天然の系における共存する材料の一部または全てから分離された同じポリヌクレオチドまたはペプチドは、単離されている。斯かるポリヌクレオチドは、ベクターの一部であり得る、および／または斯かるポリヌクレオチドまたはペプチドは、組成物の一部であり得、斯かるベクターまたは組成物が、その天然環境の一部ではないという点において、依然として「単離されている」とすることができる。単離されたＲＮＡ分子は、本明細書に記載されているＤＮＡ分子のｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ＲＮＡ転写物を含み、合成により産生された斯かる分子をさらに含む。一部の実施形態では、単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、実質的に純粋である。用語「実質的に純粋」は、本明細書で使用される場合、少なくとも５０％純粋（すなわち、夾雑物を含まない）、少なくとも９０％純粋、少なくとも９５％純粋、少なくとも９８％純粋または少なくとも９９％純粋である材料を指す。

【０２４４】

２種またはそれよりも多い核酸またはポリペプチドの文脈における用語「同一」またはパーセント「同一性」は、配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮することなく最大の一致のために比較および整列されたときに（必要であればギャップを導入して）、同じである、または同じである指定のパーセンテージのヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する、２種またはそれよりも多い配列または部分配列を指す。パーセント同一性は、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用してまたは目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列の整列を得るために使用することができる様々なアルゴリズムおよびソフトウェアは、当技術分野で周知である。そのようなものは、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮ、Ｍｅｇａｌｉｇｎ、ＢｅｓｔＦｉｔ、ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ、およびこれらの変種を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、本明細書に記載されている２種の核酸またはポリペプチドは、実質的に同一であり、これは、両者が、配列比較アルゴリズムを使用してまたは目視検査によって測定される場合の最大の一致のために比較および整列されたときに、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％および一部の実施形態では、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％ヌクレオチドまたはアミノ酸残基同一性を有することを意味する。一部の実施形態では、同一性は、少なくとも約１０、少なくとも約２０、少なくとも約４０～６０残基、少なくとも約６０～８０残基の長さ、またはその間のいずれかの整数値である配列の領域にわたり存在する。一部の実施形態では、同一性は、少なくとも約８０～１００残基等、６０～８０残基よりも長い領域にわたり存在し、一部の実施形態では、配列は、ペプチドのアミノ酸配列

またはヌクレオチド配列のコード領域等、比較されている配列の全長にわたり実質的に同一である。

【０２４５】

用語「対象」は、特定の処置のレシピエントとなるべき、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、齧歯類その他を含むがこれらに限定されない、いずれかの動物（例えば、哺乳動物）を指す。典型的には、用語「対象」および「患者」は、ヒト対象を参照して、本明細書で互換的に使用されている。

【０２４６】

用語「有効量」または「治療有効量」または「治療効果」は、対象または哺乳動物における疾患または障害を「処置」するために有効な治療薬の量を指す。薬物の治療有効量は、治療効果を有し、したがって、疾患もしくは障害の発症を予防することができる；疾患もしくは障害の発症を減速させることができる；疾患もしくは障害の進行を減速させることができる；疾患もしくは障害に関連する症状のうち１種もしくは複数をある程度まで軽減することができる；罹患率および死亡率を低下させることができる；クオリティ・オブ・ライフを改善することができる；または斯かる効果の組合せを為すことができる。

【０２４７】

用語「処置すること」または「処置」または「処置する」または「緩和すること」または「緩和する」は、（１）診断された病的状態または障害の症状を治癒、減速、低減する、および／またはその進行を停止する治療尺度、ならびに（２）標的とされる病的状態または障害の発症を予防するまたは遅くする予防的または予防性尺度の両方を指す。よって、処置を必要とする者は、既に障害を有する者；障害を有する傾向がある者；および障害が予防されるべき者を含む。

【０２４８】

用語「枯渇された」は、細胞試料（例えば、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）試料）を表すために使用される場合、細胞の亜集団が除去または枯渇された細胞試料を指す。例えば、ＣＤ２５発現細胞が枯渇されている免疫細胞試料は、ＣＤ２５発現細胞が除去または枯渇された免疫細胞試料を指す。例えば、１種または複数の結合剤を使用して、試料から１種または複数の細胞または細胞型を除去または枯渇させることができる。例えば、ＣＤ１４$^{+}$細胞は、ＣＤ１４に結合する抗体を使用すること等により、ＰＢＭＣ試料から枯渇または除去することができる。

【０２４９】

「刺激」は、刺激分子とその同族リガンドとの結合によって誘導され、これにより、シグナルトランスダクション事象を媒介する応答を指す。例えば、Ｔ細胞の刺激は、ペプチド－ＭＨＣ複合体へのＴ細胞のＴＣＲの結合を指すことができる。例えば、Ｔ細胞の刺激は、ペプチドがロードされたＡＰＣと共にＰＢＭＣが培養されるプロトコール１またはプロトコール２内のステップを指すことができる。

【０２５０】

用語「濃縮された」は、目標の種の濃度が、濃縮なしで完成された産物における当該種の天然に存在するレベルよりも実質的に高くなるように、目標の種が部分的に精製された組成物または画分を指す。用語「誘導された細胞」は、細胞のタンパク質発現、遺伝子発現、分化状態、形状、形態、生存度その他に影響を与える誘導化合物、細胞または細胞の集団で処置された細胞を指す。

【０２５１】

「参照」は、罹患検体から本開示の方法において得られた結果を相関させるおよび／または比較するために使用することができる。典型的に、「参照」は、同じ種の個体等の個体または１つもしくは複数の異なる個体（例えば、健康な個体）のいずれかから得られる、１種または複数の正常検体、特に、疾患に罹っていない検体に基づいて得ることができる。「参照」は、十分に多数の正常検体を検査することにより経験的に決定することができる。

【０２５２】

本明細書で使用される場合、腫瘍は、他に言及がなければ、がん性腫瘍であり、がんおよび腫瘍という用語は、本文書を通して互換的に使用されている。腫瘍は、固形組織のがんであるが、本明細書に記載されている組成物および方法のうちいくつかは、原則として、血液のがんである白血病に適用可能である。

【０２５３】

Ｔ細胞療法の概観

Ｔ細胞（例えば、自家Ｔ細胞）の制御されたｅｘ　ｖｉｖｏ誘導または増大化による抗原特異的Ｔ細胞の生成は、高度に特異的かつ有益なＴ細胞療法（例えば、養子Ｔ細胞療法）を提供することができる。本開示は、がんならびに他の状態、疾患および障害を有する対象を処置するために使用することができる、Ｔ細胞製造方法および治療用Ｔ細胞組成物を提供する。目標は、都合よい表現型および機能を有する抗原特異的Ｔ細胞を増大化および誘導することである。本開示は、抗原特異的Ｔ細胞療法（例えば、個人用または個別化されたＴ細胞療法）に使用することができるＴ細胞を製造するための組成物および方法を提供する。本明細書に提供されるＴ細胞組成物は、個人用抗原特異的Ｔ細胞療法であり得る。図１は、Ｔ細胞療法に関するプロセスの概観をグラフィカルに表す：これは、一方では、ネオ抗原性ペプチドの産生をもたらす、がんを有する対象におけるがんおよびがん特異的抗原の同定を；他方では、免疫療法のための活性化された抗原特異的細胞の調製、および細胞産物の投与を含む。

【０２５４】

Ｔ細胞に基づく治療法のためのネオ抗原

伝統的な抗原標的化免疫療法は、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）、がん精巣抗原（腫瘍において異所的に発現される、典型的には生殖系列に制限される遺伝子産物）を含む抗原、または組織特異的発現を示す遺伝子に由来する抗原に着目していた。しかし、腫瘍は、ネオ抗原と呼ばれる突然変異した遺伝子のタンパク質産物もディスプレイする。突然変異の数および型は、次世代配列決定アプローチを使用して容易に定義することができ、単一アミノ酸ミスセンス突然変異、融合タンパク質、および１個から最大１００個またはそれよりも多いアミノ酸に長さが変動する新規オープンリーディングフレーム（ｎｅｏＯＲＦ）を含む。ネオ抗原は、エピトープに非サイレント突然変異を含む抗原であり、同じ抗原は、同じヒト身体内の非がん細胞において発現されない。突然変異に基づく抗原は、バイパスされた中枢性トレランス（自己反応性Ｔ細胞を除去する正常胸腺発生において起こるプロセス）を有し、精巧な腫瘍特異性を実証するため、特に役立つ。各非同義（すなわち、タンパク質コード）突然変異は、患者のＴ細胞によって認識され得るネオ抗原を生成する潜在力を有する。このようなネオ抗原を認識するＴ細胞は、直接的に腫瘍細胞を死滅させると共に、腫瘍に対するより幅広い免疫応答を触媒するように機能することができる。本明細書に記載されている方法は、患者特異的様式で斯かるネオ抗原反応性Ｔ細胞を誘導および増大化し、このような細胞を養子細胞療法のために利用することを目標とする。

【０２５５】

一部の実施形態では、本明細書で使用されるネオ抗原は、点突然変異を含む。

【０２５６】

一部の実施形態では、本明細書で使用されるネオ抗原は、フレームシフト突然変異を含む。

【０２５７】

一部の実施形態では、本明細書で使用されるネオ抗原は、クロスオーバー突然変異を含む。

【０２５８】

一部の実施形態では、本明細書で使用されるネオ抗原は、１個のまたは１個を超えるヌクレオチドの挿入に起因する挿入突然変異を含む。

【０２５９】

一部の実施形態では、本明細書で使用されるネオ抗原は、１個のまたは１個を超えるヌクレオチドの欠失に起因する欠失突然変異を含む。

【０２６０】
一部の実施形態では、ネオ抗原は、挿入欠失（インデル（ｉｎ－ｄｅｌ））突然変異に起因することができる。
【０２６１】
一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、ＨＬＡタンパク質（例えば、ＨＬＡクラスＩまたはＨＬＡクラスＩＩ）に結合する。特異的な実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、対応する野生型ペプチドよりも優れた親和性でＨＬＡタンパク質に結合する。特異的な実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、少なくとも５０００ｎＭ未満、少なくとも５００ｎＭ未満、少なくとも１００ｎＭ未満、少なくとも５０ｎＭ未満のまたはそれ未満のIC_{50}またはK_Dを有する。
【０２６２】
一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、約８～約５０アミノ酸残基の長さ、または約８～約３０、約８～約２０、約８～約１８、約８～約１５もしくは約８～約１２アミノ酸残基の長さであり得る。一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、約８～約５００アミノ酸残基の長さ、または約８～約４５０、約８～約４００、約８～約３５０、約８～約３００、約８～約２５０、約８～約２００、約８～約１５０、約８～約１００、約８～約５０もしくは約８～約３０アミノ酸残基の長さであり得る。
【０２６３】
一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、少なくとも８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０個またはそれよりも多いアミノ酸残基の長さであり得る。一部の実施形態では、ネオ抗原ペプチドは、少なくとも８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００個またはそれよりも多いアミノ酸残基の長さであり得る。一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、多くても８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０個またはそれ未満のアミノ酸残基の長さであり得る。一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、多くても８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５５、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００個またはそれ未満のアミノ酸残基の長さであり得る。
【０２６４】
一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも１５０、少なくとも２００、少なくとも２５０、少なくとも３００、少なくとも３５０、少なくとも４００、少なくとも４５０または少なくとも５００アミノ酸の全体の長さを有する。
【０２６５】

一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、多くても８、多くても９、多くても１０、多くても１１、多くても１２、多くても１３、多くても１４、多くても１５、多くても１６、多くても１７、多くても１８、多くても１９、多くても２０、多くても２１、多くても２２、多くても２３、多くても２４、多くても２５、多くても２６、多くても２７、多くても２８、多くても２９、多くても３０、多くても４０、多くても５０、多くても６０、多くても７０、多くても８０、多くても９０、多くても１００、多くても１５０、多くても２００、多くても２５０、多くても３００、多くても３５０、多くても４００、多くても４５０または多くても５００アミノ酸の総合的な長さを有する。一部の実施形態では、ペプチドの長さは、８～１５アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチドの長さは、ＣＤ８＋Ｔ細胞標的化のための８～１２アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチドの長さは、ＣＤ８＋Ｔ細胞標的化のための８～１１アミノ酸長である。一部の実施形態では、ペプチドの長さは、ＣＤ４＋Ｔ細胞標的化のための２５アミノ酸長である。

【０２６６】

一部の実施形態では、ネオ抗原ペプチドは、約０．５～約１２、約２～約１０または約４～約８のｐＩ値を有することができる。一部の実施形態では、ネオ抗原ペプチドは、少なくとも４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５またはそれよりも多いｐＩ値を有することができる。一部の実施形態では、ネオ抗原ペプチドは、多くても４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５またはそれ未満のｐＩ値を有することができる。

【０２６７】

一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、約１ｐＭ～約１ｍＭ、約１００ｐＭ～約５００μＭ、約５００ｐＭ～約１０μＭ、約１ｎＭ～約１μＭまたは約１０ｎＭ～約１μＭのＨＬＡ結合親和性を有することができる。一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、７００、８００、９００μＭまたはそれよりも多いＨＬＡ結合親和性を有することができる。一部の実施形態では、抗原またはネオ抗原ペプチドは、多くても２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、７００、８００、９００μＭのＨＬＡ結合親和性を有することができる。

【０２６８】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている抗原またはネオ抗原ペプチドは、当技術分野で周知のもの等の担体、例えば、サイログロブリン、ヒト血清アルブミン等のアルブミン、破傷風トキソイド、ポリＬ－リシン、ポリＬ－グルタミン酸等のポリアミノ酸残基、インフルエンザウイルスタンパク質、Ｂ型肝炎ウイルスコアタンパク質その他を含むことができる。

【０２６９】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている抗原またはネオ抗原ペプチドは、末端NH_2アシル化によって、例えば、アルカノイル（C_1～C_{20}）またはチオグリコリルアセチル化、末端カルボキシルアミド化、例えば、アンモニア、メチルアミン等によって改変することができる。一部の実施形態では、これらの改変は、支持体または他の分子に連結するための部位を提供することができる。

【０２７０】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている抗原またはネオ抗原ペプチドは、グリコシル化、側鎖酸化、ビオチン化、リン酸化、表面活性材料、例えば、脂質の付加等が挙げられるがこれらに限定されない、改変を含有することができる、または化学的に改変する、例えば、アセチル化等を為すことができる。さらに、ペプチドにおける結合は、ペプチド結合以外、例えば、共有結合による結合、エステルまたはエーテル結合、ジスルフィ

ド結合、水素結合、イオン性結合等であり得る。
【０２７１】
一部の実施形態では、本明細書に記載されている抗原またはネオ抗原ペプチドは、結果として生じるペプチドの物理的特性（例えば、安定性または溶解性）を改変する置換を含有することができる。例えば、抗原またはネオ抗原ペプチドは、α－アミノ酪酸（「Ｂ」）によるシステイン（Ｃ）の置換によって改変することができる。その化学的性質により、システインは、ジスルフィド架橋を形成し、結合能を低下させるように構造的にペプチドを十分に変更する傾向を有する。Ｃに代えたα－アミノ酪酸への置換は、この問題を緩和するのみならず、ある特定の例では、結合および交差結合能力を実際に改善する。α－アミノ酪酸によるシステインの置換は、抗原またはネオ抗原ペプチドのいずれかの残基において、例えば、エピトープもしくはペプチド内のアナログのアンカーもしくは非アンカー位置のいずれかにおいて、またはペプチドの他の位置において起こり得る。
【０２７２】
一部の実施形態では、本明細書に記載されている抗原ペプチドまたはネオ抗原ペプチドは、アミノ酸ミメティックまたは非天然アミノ酸残基、例えば、Ｄ－またはＬ－ナフチル（ｎａｐｈｔｙｌ）アラニン；Ｄ－またはＬ－フェニルグリシン；Ｄ－またはＬ－２－チエニル（ｔｈｉｅｎｅｙｌ）アラニン；Ｄ－またはＬ－１、２、３または４－ピレニル（ｐｙｒｅｎｅｙｌ）アラニン；Ｄ－またはＬ－３チエニルアラニン；Ｄ－またはＬ－（２－ピリジニル）－アラニン；Ｄ－またはＬ－（３－ピリジニル）－アラニン；Ｄ－またはＬ－（２－ピラジニル）－アラニン；Ｄ－またはＬ－（４－イソプロピル）－フェニルグリシン；Ｄ－（トリフルオロメチル）－フェニルグリシン；Ｄ－（トリフルオロ－メチル）－フェニルアラニン；Ｄ－ρ－フルオロフェニルアラニン；Ｄ－またはＬ－ρ－ビフェニル－フェニルアラニン；Ｄ－またはＬ－ρ－メトキシビフェニルフェニルアラニン；Ｄ－またはＬ－２－インドール（アリル）アラニン；およびＤ－またはＬ－アルキルアラニンを含むことができ、ここで、アルキル基は、置換されたまたは置換されていないメチル、エチル、プロピル、ヘキシル、ブチル、ペンチル、イソプロピル、イソ－ブチル、ｓｅｃ－イソチル（ｉｓｏｔｙｌ）、イソ－ペンチルまたは非酸性アミノ酸残基であり得る。非天然アミノ酸の芳香族環は、例えば、チアゾリル、チオフェニル、ピラゾリル、ベンズイミダゾリル、ナフチル、フラニル、ピロリルおよびピリジル芳香族環を含む。様々なアミノ酸ミメティックまたは非天然アミノ酸残基を有する改変されたペプチドは、ｉｎ　ｖｉｖｏで増加した安定性を顕在化する傾向があるため、特に有用である。斯かるペプチドは、改善された有効期間または製造特性を保有することもできる。
【０２７３】
一部の実施形態では、ペプチドを、免疫細胞に接触させて、細胞を活性化し、これを抗原応答性にする。
【０２７４】
一部の実施形態では、ペプチドは、ｅｘ　ｖｉｖｏで免疫細胞に接触させられる。
【０２７５】
一部の実施形態では、ペプチドは、生物系、例えば、人間において免疫細胞に接触させられる。
【０２７６】
一部の実施形態では、免疫細胞は、抗原提示細胞である。
【０２７７】
一部の実施形態では、免疫細胞は、Ｔ細胞である。
【０２７８】
本開示は、免疫原性抗原に特異的であるＴ細胞を製造するための方法に関する。
【０２７９】
本開示はまた、ＡＰＣで刺激された抗原特異的Ｔ細胞を含む組成物に関する。一部の実施形態では、１種または複数の抗原ペプチドを、ＡＰＣにロードし、次いで、ペプチドがロードされたＡＰＣを、Ｔ細胞の刺激に使用して、抗原特異的Ｔ細胞を産生する。一部の

実施形態では、抗原は、ネオ抗原である。一部の実施形態では、ペプチドローディングに使用されるＡＰＣは、樹状細胞である。

【０２８０】

一部の実施形態では、ペプチド配列は、対象の非がん細胞には存在しない突然変異を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、対象のがん細胞の遺伝子または発現された遺伝子によってコードされる。一部の実施形態では、ペプチド配列は、少なくとも８；９；１０；１１；１２；１３；１４；１５；１６；１７；１８；１９；２０；２１；２２；２３；２４；２５；２６；２７；２８；２９；３０；４０；５０；６０；７０；８０；９０；１００；１５０；２００；２５０；３００；３５０；４００；４５０；５００；６００；７００；８００；９００；１，０００；１，５００；２，０００；２，５００；３，０００；４，０００；５，０００；７，５００；もしくは１０，０００個またはそれよりも多い天然に存在するアミノ酸の長さを有する。

【０２８１】

一部の実施形態では、ペプチド配列は、クラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子によってコードされるタンパク質に結合し、８～１２個の天然に存在するアミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、ペプチド配列は、クラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子によってコードされるタンパク質に結合し、１６～２５個の天然に存在するアミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、ペプチド配列は、複数の抗原ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、複数の抗原ペプチド配列は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０または５００種の抗原ペプチド配列を含む。一部の実施形態では、抗原性ペプチド配列は、配列中のアミノ酸の間に改変されていないペプチド結合を含む。一部の実施形態では、複数の抗原ペプチド配列は、リンカーによって一体に連結されている。一部の実施形態では、リンカー配列は、ＧおよびＳアミノ酸、例えば、ＧＳＳ、ＧＳＳＳ、ＧＧＧＳを含む。一部の実施形態では、リンカーは、切断可能な配列を有する改変されたリンカーであり得る。例示的な切断可能な配列は、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ等の自己切断配列を含む。一部の実施形態では、抗原ペプチド配列は、改変を含むことができる、例えば、ＭＩＴＤ配列、またはＳＰ１シグナル伝達ドメインを含むことができる。

【０２８２】

一部の実施形態では、ＡＰＣは、１種または複数種の抗原ペプチド配列を含むペプチド配列をコードする核酸をトランスフェクトまたは形質導入される。ＡＰＣは、抗原ペプチド配列を発現し、ＭＨＣと会合した状態で抗原をＴ細胞に提示し、これにより、Ｔ細胞を活性化する。一部の実施形態では、核酸は、ＲＮＡである。一部の実施形態では、核酸は、ｍＲＮＡである。

【０２８３】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている抗原は、ネオ抗原である。候補免疫原性ネオ抗原配列は、当技術分野で公知のいずれか適した方法によって同定することができる。本開示の方法は、例えば、対象の疾患に特異的な治療法の産生に、または疾患に対するワクチンの産生に有用であり得る。候補免疫原性ネオ抗原は、以前に同定されたネオ抗原であり得る。一部の実施形態では、候補免疫原性ネオ抗原は、以前に同定されていなくてよい。本明細書に記載されている方法および組成物における使用のための候補免疫原性ネオ抗原は、ある対象に特異的であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されている方法および組成物における使用のための候補ネオ抗原は、複数の対象に特異的であり得る。

【０２８４】

動物およびヒトの両方において、突然変異したエピトープは、免疫応答の誘導またはＴ細胞の活性化において潜在的に有効であり得る。一実施形態では、ウイルス等、対象における感染病原体の潜在的に免疫原性のエピトープを決定することができる。一実施形態で

は、がん等の疾患を有する対象の潜在的に免疫原性の突然変異したエピトープを決定することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載されている方法における使用のための潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原は、それが生成された組織の型の腫瘍および細胞において発現された分化抗原であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されている方法における使用のための潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原は、別の分化した組織において発現されないがん／生殖系列抗原であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載されている方法における使用のための潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原は、突然変異した抗原であり得る。例えば、本明細書に記載されている方法における使用のための候補免疫原性抗原またはネオ抗原ペプチドは、ミスセンス点突然変異、または遺伝子セグメントの腫瘍特異的転座により生成された融合タンパク質の抗原もしくはネオ抗原を含むことができる。一部の実施形態では、本明細書に記載されている方法における使用のための潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原は、過剰発現された抗原であり得る。一部の実施形態では、潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原は、腫瘍に見出すことができる。例えば、本明細書に記載されている方法における使用のための潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原は、その発現が、分化した正常組織の細胞において厳密に調節されているタンパク質を含むことができる。

【０２８５】

潜在的に免疫原性の突然変異したエピトープは、次世代配列決定技術を使用した、がん患者由来の腫瘍組織および健康な組織のゲノムまたはエキソーム配列決定によって決定することができる。例えば、その突然変異頻度および抗原またはネオ抗原として作用する能力に基づき選択された遺伝子は、次世代配列決定技術を使用して配列決定することができる。一実施形態では、配列決定データを解析して、対象のＨＬＡ分子に結合することができる、潜在的に免疫原性の突然変異したペプチドを同定することができる。一実施形態では、データは、コンピュータを使用して解析することができる。別の実施形態では、配列データは、抗原またはネオ抗原ペプチドの存在について解析することができる。一実施形態では、潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原ペプチドは、ＭＨＣ分子に対するその親和性によって決定することができる。

【０２８６】

潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原ペプチドは、直接的なタンパク質配列決定によって決定することができる。例えば、多次元的質量分析技法（例えば、タンデム質量分析（ＭＳ／ＭＳ））を使用した、酵素によるタンパク質消化物のタンパク質配列決定を使用して、本明細書に記載されている方法における使用のための潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原ペプチドを同定することができる。

【０２８７】

未知のタンパク質のｄｅ　ｎｏｖｏ配列決定のためのハイスループット方法を使用して、潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原ペプチドを同定することができる。例えば、メタショットガンタンパク質配列決定等、未知のタンパク質のｄｅ　ｎｏｖｏ配列決定のためのハイスループット方法を使用して、対象の腫瘍のプロテオームを解析して、潜在的に免疫原性の発現されたネオ抗原を同定することができる。

【０２８８】

潜在的に免疫原性の抗原またはネオ抗原ペプチドを、ＭＨＣ多量体を使用して同定して、抗原特異的Ｔ細胞応答を同定することもできる。例えば、患者試料における抗原特異的Ｔ細胞応答のハイスループット解析は、ＭＨＣ四量体に基づくスクリーニング技法を使用して行うことができる。四量体に基づくスクリーニング技法は、潜在的に免疫原性の腫瘍特異的抗原の初期同定のために、あるいは、いかなる潜在的に免疫原性の抗原に患者が既に曝露されている可能性があるかについて評価するための二次スクリーニングプロトコールとして使用し、これにより、本明細書に記載されている方法における使用のための潜在的に免疫原性の抗原の選択を容易にすることができる。

【０２８９】

一部の実施形態では、特異的ネオ抗原は、免疫療法のために標的化される。一部の実施

形態では、ネオ抗原性ペプチドは、合成される。本明細書で使用されるネオ抗原性ペプチドは、各ペプチドが、ＨＬＡ抗原に特異的となり、高い結合親和性および特異性でＨＬＡ抗原に結合することができるように設計される。一部の実施形態では、本明細書で使用されるペプチドは、本発明者らによって作成された高性能ＨＬＡ結合予測モデルに基づき設計され、例えば、次の特許出願／公開：ＷＯ２０１１１４３６５６、ＷＯ２０１７１８４５９０ならびに米国特許仮出願第６２／７８３，９１４号および同第６２／８２６，８２７号；に記載されており、これらは全て参照により本明細書に組み込まれている。ＮｅｔＭＨＣＩＩｐａｎは、現在の予測標準であるとしても、間違いのないものとして考慮することはできない。３種のクラスＩＩ遺伝子座（ＤＲ、ＤＰおよびＤＱ）のうち、データは、ＨＬＡ－ＤＲのある特定の共通対立遺伝子のみについて存在することができる。簡潔に説明すると、新たに作成された予測モデルは、免疫原性抗原ペプチドの同定に役立ち、個別化された医薬物等の薬物の開発、ならびに抗原特異的Ｔ細胞の単離および特徴付けに使用することができ、機械学習ＨＬＡ－ペプチド提示予測モデルは、訓練データに少なくとも基づき同定された複数の予測変数を含み、訓練データは、細胞において発現されたＨＬＡタンパク質によって提示され、質量分析によって同定された、ペプチドの配列の配列情報と；アミノ酸位置情報を含む訓練ペプチド配列情報であって、細胞において発現されたＨＬＡタンパク質に関連する訓練ペプチド配列情報と；アミノ酸位置情報および予測変数に基づく、入力として受け取ったアミノ酸位置情報および出力として作成された提示見込みの間の関係を表す関数とを含む。ＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、抗腫瘍活性を有することができる。現存する予測方法において、高い率のＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、クラスＩＩ予測を使用することなく示され得る（例えば、ＮｅｏＶａｘ研究におけるＳＬＰエピトープの６０％（ＮＴ－００１における４９％）、およびＢｉｏＮＴｅｃｈ研究におけるｍＲＮＡエピトープの４８％）。これらのエピトープが典型的にネイティブに（腫瘍によってまたは食作用を有するＤＣによって）提示されるかについては明らかではない場合がある。したがって、天然に提示されるクラスＩＩエピトープの同定を改善することにより、高いＣＤ４＋Ｔ応答率を治療上の有効性へと橋渡しすることが望ましかった。遺伝子発現、酵素による切断および経路／局在バイアスの役割は、頑強に定量化されていない可能性がある。大部分の現存するＭＳデータは、オートファジーに由来すると推定され得るが、オートファジー（腫瘍細胞によるクラスＩＩ提示）またはファゴサイトーシス（ＡＰＣによる腫瘍エピトープのクラスＩＩ提示）のどちらが、より関連する経路であるかについては不明確であり得る。分野標準および提唱されるアプローチを含む、クラスＩＩ提示のルールを学習するための異なるデータ作成アプローチが存在し得る。分野標準は、ロースループットを提供し、放射性試薬を要求する、ＮｅｔＭＨＣＩＩｐａｎプレディクターのための基盤であり得る親和性測定を含むことができ、これは、プロセシングの役割を捉え損なっている。新たなアプローチは、質量分析を含み、細胞系／組織／腫瘍由来のデータは、オートファジーのためのプロセシングルールの決定に役立つことができ（このデータの多くは、既に発表されている）、単一対立遺伝子ＭＳは、対立遺伝子特異的結合ルールの決定を可能にすることができる（複対立遺伝子ＭＳデータは、効率的な学習には過度に複雑であると推定される）。新たに作成された予測方法は、機械学習ＨＬＡ－ペプチド提示予測モデルを訓練するステップを含み、訓練するステップは、コンピュータプロセッサーを使用して、ＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を発現する細胞由来の１種または複数のＨＬＡ－ペプチド複合体から単離されたＨＬＡ－ペプチドのアミノ酸位置情報シーケンスを、ＨＬＡ－ペプチド提示予測モデルに入力するステップを含み、機械学習ＨＬＡ－ペプチド提示予測モデルは、訓練データに少なくとも基づき同定された複数の予測変数を含み、訓練データは、細胞において発現されたＨＬＡタンパク質によって提示され、質量分析によって同定された、ペプチドの配列の配列情報と；訓練ペプチドのアミノ酸位置情報を含む訓練ペプチド配列情報であって、細胞において発現されたＨＬＡタンパク質に関連する訓練ペプチド配列情報と；アミノ酸位置情報および予測変数に基づく、入力として受け取ったアミノ酸位置情報および出力として作成された提示見込みの間の関係を表す関数とを含む。一部の実施形態では、提示モデルは、０．１％～１０％の再現率で、少なくとも０．２５の陽性的

中率を有する。一部の実施形態では、提示モデルは、０．１％～１０％の再現率で、少なくとも０．４の陽性的中率を有する。一部の実施形態では、提示モデルは、０．１％～１０％の再現率で、少なくとも０．６の陽性的中率を有する。一部の実施形態では、質量分析は、単一対立遺伝子質量分析である。一部の実施形態では、ペプチドは、オートファジーにより細胞において発現されたＨＬＡタンパク質によって提示される。一部の実施形態では、ペプチドは、ファゴサイトーシスにより細胞において発現されたＨＬＡタンパク質によって提示される。一部の実施形態では、訓練データの品質は、複数の品質測定基準を使用することにより増加する。一部の実施形態では、複数の品質測定基準は、共通夾雑物ペプチド除去、高いスコア化ピーク強度、高いスコアおよび高い質量精度を含む。一部の実施形態では、スコア化ピーク強度は、少なくとも５０％である。一部の実施形態では、スコア化ピーク強度は、少なくとも７０％である。一部の実施形態では、細胞において発現されたＨＬＡタンパク質によって提示されるペプチドは、細胞において発現された単一の免疫沈降されたＨＬＡタンパク質によって提示されるペプチドである。一部の実施形態では、複数の予測変数は、ペプチド－ＨＬＡ親和性予測変数を含む。一部の実施形態では、複数の予測変数は、供給源タンパク質発現レベル予測変数を含む。一部の実施形態では、複数の予測変数は、ペプチド切断可能性予測変数を含む。一部の実施形態では、ＨＬＡタンパク質によって提示されるペプチドは、逆向きデータベース検索戦略（ｒｅｖｅｒｓｅｄ－ｄａｔａｂａｓｅ　ｓｅａｒｃｈ　ｓｔｒａｔｅｇｙ）を使用してペプチドデータベースを検索することによって同定されるペプチドを含む。一部の実施形態では、ＨＬＡタンパク質は、ＨＬＡ－ＤＲ、およびＨＬＡ－ＤＰまたはＨＬＡ－ＤＱタンパク質である。一部の実施形態では、ＨＬＡタンパク質は、ＨＬＡ－ＤＲ、およびＨＬＡ－ＤＰまたはＨＬＡ－ＤＱタンパク質からなる群から選択されるＨＬＡ－ＤＲタンパク質である。一部の実施形態では、ＨＬＡタンパク質は、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０１：０１／ＨＬＡ－ＤＰＡ１＊０１：０３、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０２：０１／ＨＬＡ－ＤＰＡ１＊０１：０３、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０３：０１／ＨＬＡ－ＤＰＡ１＊０１：０３、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０４：０１／ＨＬＡ－ＤＰＡ１＊０１：０３、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０４：０２／ＨＬＡ－ＤＰＡ１＊０１：０３、ＨＬＡ－ＤＰＢ１＊０６：０１／ＨＬＡ－ＤＰＡ１＊０１：０３、ＨＬＡ－ＤＱＢ１＊０２：０１／ＨＬＡ－ＤＱＡ１＊０５：０１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１＊０２：０２／ＨＬＡ－ＤＱＡ１＊０２：０１、ＨＬＡ－ＤＱＢ１＊０６：０２／ＨＬＡ－ＤＱＡ１＊０１：０２、ＨＬＡ－ＤＱＢ１＊０６：０４／ＨＬＡ－ＤＱＡ１＊０１：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０１：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０３：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０３：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０４：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０４：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０４：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０４：０４、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０４：０５、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０４：０７、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０７：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０８：０４、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊０９：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１０：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１１：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１１：０４、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１２：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１２：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１３：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１３：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１３：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１４：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０３、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１６：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３＊０１：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ３＊０２：０２、ＨＬＡ－ＤＲＢ３＊０３：０１、ＨＬＡ－ＤＲＢ４＊０１：０１およびＨＬＡ－ＤＲＢ５＊０１：０１からなる群から選択されるＨＬＡ－ＤＲタンパク質である。一部の実施形態では、ＨＬＡタンパク質によって提示されるペプチドは、ＨＬＡ－ペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルを、ペプチドデータベースにおける１種または複数のＨＬＡ－ペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルと比較することによって同定されるペプチドを含む。

【０２９０】

一部の実施形態では、突然変異は、点突然変異、スプライス部位突然変異、フレームシフト突然変異、リードスルー突然変異および遺伝子融合突然変異からなる群から選択され

る。

【０２９１】

一部の実施形態では、ＨＬＡタンパク質によって提示されるペプチドは、１５～４０アミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、ＨＬＡタンパク質によって提示されるペプチドは、（ａ）単一のＨＬＡクラスＩＩ対立遺伝子を発現する細胞系から１種または複数のＨＬＡ複合体を単離すること；（ｂ）１種または複数の単離されたＨＬＡ複合体から１種または複数のＨＬＡ－ペプチドを単離すること；（ｃ）１種または複数の単離されたＨＬＡ－ペプチドについてのＭＳ／ＭＳスペクトルを得ること；および（ｄ）ペプチドデータベースから１種または複数の単離されたＨＬＡ－ペプチドのＭＳ／ＭＳスペクトルに対応するペプチド配列を得ることによって同定されるペプチドを含み、ステップ（ｄ）から得られる１種または複数の配列は、１種または複数の単離されたＨＬＡ－ペプチドの配列を同定する。

【０２９２】

様々な抗原ペプチドを使用して、Ｔ細胞を誘導または増大化することができる。様々な抗原ペプチドを使用して、抗原提示細胞（ＡＰＣ）を活性化することができ、次いで、抗原がロードされたＡＰＣとＴ細胞とを接触させることにより、ＡＰＣはＴ細胞を活性化することができる。

【０２９３】

一部の実施形態では、ペプチドは、（Ａ）点突然変異、（Ｂ）スプライス部位突然変異、（Ｃ）フレームシフト突然変異、（Ｄ）リードスルー突然変異、（Ｅ）遺伝子融合突然変異およびこれらの組合せから選択される突然変異を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、点突然変異を含み、対応する野生型ペプチドよりも優れた親和性で、対象のＨＬＡタンパク質に結合する。

【０２９４】

一部の実施形態では、ペプチドは、５００ｎＭ、２５０ｎＭ、１５０ｎＭ、１００ｎＭ、５０ｎＭ、２５ｎＭまたは１０ｎＭ未満のIC_{50}で、対象のＨＬＡタンパク質に結合する。一部の実施形態では、ペプチドは、５００ｎＭ、２５０ｎＭ、１５０ｎＭ、１００ｎＭ、５０ｎＭ、２５ｎＭまたは１０ｎＭ未満のIC_{50}またはK_Dで、対象のＨＬＡタンパク質に結合する。一部の実施形態では、各ペプチドは、対象によって発現されたＨＬＡ対立遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する。一部の実施形態では、誘導または増大化された抗原特異的Ｔ細胞のＴＣＲは、５００ｎＭ、２５０ｎＭ、１５０ｎＭ、１００ｎＭ、５０ｎＭ、２５ｎＭまたは１０ｎＭ未満のIC_{50}またはK_Dで、ペプチド－ＨＬＡ複合体に結合する。一部の実施形態では、ＴＣＲは、５００ｎＭ、２５０ｎＭ、１５０ｎＭ、１００ｎＭ、５０ｎＭ、２５ｎＭまたは１０ｎＭ未満のIC_{50}またはK_Dで、ペプチド－ＨＬＡ複合体に結合する。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原ペプチド配列のそれぞれは、対象の非がん細胞に存在しない突然変異を含む。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原ペプチド配列のそれぞれは、対象のがん細胞の遺伝子または発現された遺伝子によってコードされる。

【０２９５】

一部の実施形態では、ペプチドは、少なくとも８；９；１０；１１；１２；１３；１４；１５；１６；１７；１８；１９；２０；２１；２２；２３；２４；２５；２６；２７；２８；２９；３０；４０；５０；６０；７０；８０；９０；１００；１５０；２００；２５０；３００；３５０；４００；４５０；５００；６００；７００；８００；９００；１，０００；１，５００；２，０００；２，５００；３，０００；４，０００；５，０００；７，５００；もしくは１０，０００個またはそれよりも多い天然に存在するアミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、ペプチドは、クラスＩ　ＨＬＡ対立遺伝子によってコードされるタンパク質に結合し、８～１２個の天然に存在するアミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、ペプチドは、クラスＩＩ　ＨＬＡ対立遺伝子によってコードされるタンパク質に結合し、１６～２５個の天然に存在するアミノ酸の長さを有する。一部の実施形態では、ペプチドは、複数のペプチドを含む。一部の実施形態では、複数のペプチ

ドは、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０もしくは５００種またはそれよりも多い抗原ペプチドを含む。

【０２９６】

一部の態様では、本開示は、本明細書の上述に簡潔に記載されている方法を使用して同定されたペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する（例えば、腫瘍特異的突然変異を有するペプチド、ウイルスペプチド、または非がん性疾患に関連するペプチド）。

【０２９７】

一部の実施形態では、光学的方法が、免疫原性抗原の選択または同定に使用される。一部の実施形態では、バーコード化されたプローブが、免疫原性抗原の選択または同定に使用される。一部の実施形態では、標的特異的領域およびバーコード化された領域を含むバーコード化されたプローブが、免疫原性抗原の選択または同定に使用される。一部の実施形態では、標的特異的領域は、標的ポリヌクレオチドの核酸配列にハイブリダイズする、またはそれに対して少なくとも約９０％、９５％もしくは１００％配列相補性を有する、核酸配列を含む。

【０２９８】

活性化された抗原特異的Ｔ細胞の調製

Ｔ細胞を刺激するための方法が本明細書に提供される。例えば、本明細書に提供される方法を使用して、抗原特異的Ｔ細胞を刺激することができる。本明細書に提供される方法を使用して、Ｔ細胞を誘導または活性化することができる。例えば、本明細書に提供される方法を使用して、活性化Ｔ細胞を増大化することができる。例えば、本明細書に提供される方法を使用して、ナイーブＴ細胞を誘導することができる。例えば、本明細書に提供される方法を使用して、抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を増大化することができる。例えば、本明細書に提供される方法を使用して、抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を増大化することができる。例えば、本明細書に提供される方法を使用して、メモリー表現型を有する抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を増大化することができる。例えば、治療組成物は、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を含むことができる。例えば、治療組成物は、抗原特異的メモリーＴ細胞を含むことができる。

【０２９９】

Ｔ細胞は、ネオ抗原性ペプチドまたはネオ抗原性ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物によりｅｘ　ｖｉｖｏで活性化することができる。

【０３００】

Ｔ細胞は、抗原がロードされた抗原提示細胞を含む組成物によりｅｘ　ｖｉｖｏで活性化することができる。

【０３０１】

一部の実施形態では、ＡＰＣおよび／またはＴ細胞は、対象から得られる生体試料に由来する。

【０３０２】

一部の実施形態では、ＡＰＣおよび／またはＴ細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である生体試料に由来する。

【０３０３】

一部の実施形態では、対象は、ＡＰＣおよび／またはＴ細胞を調製するための生体試料を得るステップに先立ち、ＦＬＴ３Ｌを投与される。

【０３０４】

一部の実施形態では、ＡＰＣおよび／またはＴ細胞は、白血球アフェレーシス試料である生体試料に由来する。

【０３０５】

一部の実施形態では、抗原提示細胞は先ず、ｅｘ　ｖｉｖｏでネオ抗原性ペプチドをロードされ、ネオ抗原活性化Ｔ細胞の調製に使用される。一部の実施形態では、本明細書に提供される組成物は、抗原ペプチドを予めロードされたＡＰＣ等、ＡＰＣによって刺激されたＴ細胞を含む。組成物は、試料（例えば、生体試料）由来のＴ細胞を含む免疫細胞の集団を含むことができ、Ｔ細胞は、ＡＰＣに刺激されたＴ細胞を含む。一部の実施形態では、１種または複数のネオ抗原性ペプチドをコードするｍＲＮＡは、ネオ抗原性ペプチドの発現のためにＡＰＣに導入される。斯かるＡＰＣは、Ｔ細胞を刺激または活性化するために使用される。

【０３０６】

一部の実施形態では、生体試料は、少なくとも約０．００００１％、０．００００２％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％である組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージを含む。一部の実施形態では、生体試料は、末梢血または白血球アフェレーシスに由来する生体試料における総細胞計数の０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％未満または１０％未満の抗原活性化Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、生体試料は、末梢血または白血球アフェレーシスに由来する生体試料における総細胞計数の１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％未満の抗原活性化Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、生体試料は、抗原ナイーブＴ細胞を含む。一部の実施形態では、生体試料は、末梢血または白血球アフェレーシスに由来する生体試料における総細胞計数の約０．００００１％、０．００００２％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％超の抗原ナイーブ細胞を含む。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８$^+$Ｔ細胞のパーセンテージは、末梢血または白血球アフェレーシスに由来する生体試料における約０．００００１％、０．００００２％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％未満である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞のパーセンテージは、末梢血または白血球アフェレーシスに由来する生体試料における少なくとも約０．００００１％、０．００００２％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％である。一部の実施形態では、生体試料における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、総免疫細胞の多くても約０．００００１％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％または０．５％である。一部の実施形態では、生体試料における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８$^+$Ｔ細胞のパーセンテージは、総免疫細胞の多くても約０．００００１％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％または０．５％である。一部の実施形態では、生体試料における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞のパーセンテージは、総免疫細胞の多くても約０．００００１％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％または０．５％である。一部の実施形態では、生体試料における抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても約０．５％である。一部の実施形態では、生体試料におけるネオ抗原特異的ＣＤ８$^+$Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても約０．５％である。一部の実施形態では、生体試料における抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞のパーセンテージ

は、生体試料における多くても約０．５％である。
【０３０７】
ネオ抗原がロードされたＡＰＣの調製
一部の実施形態では、組成物は、ＡＰＣまたはＴ細胞の細胞表面受容体に結合するリガンド等、１種または複数のサイトカイン、増殖因子またはリガンドと共にインキュベートされた免疫細胞の集団を含む。斯かるサイトカイン、増殖因子およびリガンドの非限定的な例は、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＩＬ－７、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＩＬ－１５、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γ、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０およびポリＩ：Ｃを含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、組成物は、１種または複数のＡＰＣまたはＡＰＣ調製物と共にインキュベートされた免疫細胞の集団を含む。例えば、組成物は、１種もしくは複数のサイトカイン、増殖因子および／もしくはリガンドで刺激されたＡＰＣまたはサイトカイン、増殖因子および／もしくはリガンドで刺激されたＡＰＣ調製物と共にインキュベートされた免疫細胞の集団を含むことができる。例えば、組成物は、１種もしくは複数のサイトカインで刺激されたＡＰＣまたはサイトカインで刺激されたＡＰＣ調製物と共にインキュベートされた免疫細胞の集団を含むことができる。例えば、組成物は、１種もしくは複数の増殖因子で刺激されたＡＰＣまたは増殖因子で刺激されたＡＰＣ調製物と共にインキュベートされた免疫細胞の集団を含むことができる。例えば、組成物は、１種もしくは複数のリガンドで刺激されたＡＰＣまたはリガンドで刺激されたＡＰＣ調製物と共にインキュベートされた免疫細胞の集団を含むことができる。
【０３０８】
一部の実施形態では、ＡＰＣは、自家ＡＰＣ、同種異系ＡＰＣまたは人工ＡＰＣである。
【０３０９】
免疫細胞は、細胞表面分子によって特徴付けられる。一部の実施形態では、免疫細胞は、好ましくは、例えば、生体試料から、細胞表面受容体に結合することができる抗体を使用することによって、細胞表面マーカーに基づき選択される。一部の実施形態では、一部の細胞は、負に選択して、負に選択される細胞表面分子を発現しない１種または複数の細胞型を濃縮する。
【０３１０】
一部の実施形態では、抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、ＡＰＣまたは前駆体細胞から選択することによって生体試料から調製され、ＡＰＣまたは前駆体細胞をネオ抗原性ペプチドの存在下で培養して、ネオ抗原がロードされたＡＰＣを生成することができ、ネオ抗原がロードされたＡＰＣは、Ｔ細胞の活性化に使用される。細胞のセットを選択および／または濃縮するための関連細胞表面マーカーの一部について後述する。
【０３１１】
ＣＤ１（表面抗原分類１）は、様々なヒト抗原提示細胞の表面に発現される糖タンパク質のファミリーである。これは、クラスＩ　ＭＨＣ分子に関係し、Ｔ細胞に対する脂質抗原の提示に関与する。
【０３１２】
ＣＤ１１ｂまたはインテグリンアルファＭ（ＩＴＧＡＭ）は、マクロファージ－１抗原（Ｍａｃ－１）または補体受容体３（ＣＲ３）としても公知の、ヘテロ二量体インテグリンアルファ－Ｍベーター－２（$\alpha_M\beta_2$）分子を形成する１つのタンパク質サブユニットである。ＩＴＧＡＭは、ＣＲ３Ａおよび表面抗原分類分子１１ｂ（ＣＤ１１ｂ）としても公知である。$\alpha_M\beta_2$の第２の鎖は、ＣＤ１８として公知の共通インテグリンβ_2サブユニットであり、よって、インテグリン$\alpha_M\beta_2$は、β_2サブファミリー（または白血球）インテグリンに属する。$\alpha_M\beta_2$は、単球、顆粒球、マクロファージおよびナチュラルキラー細胞を含む自然免疫系に関与する多くの白血球の表面に発現される。これは、白血球接着および遊走を調節することにより炎症を媒介し、ファゴサイトーシス、細胞媒介性細胞傷害、走化性および細胞活性化等のいくつかの免疫プロセスに関係付けられてきた。これ

は、不活性化された補体成分３ｂ（ｉＣ３ｂ）に結合するその能力により、補体系に関与する。インテグリンαMβ2のＩＴＧＡＭ（アルファ）サブユニットは、細胞の接着および伝播を引き起こすことに直接関与するが、β２（ＣＤ１８）サブユニットの存在なしに細胞遊走を媒介することはできない。

【０３１３】

インテグリン、アルファＸ（補体成分３受容体４サブユニット）（ＩＴＧＡＸ）としても公知のＣＤ１１ｃは、ＣＤ１１ｃをコードする遺伝子である。ＣＤ１１ｃは、インテグリンアルファＸ鎖タンパク質である。インテグリンは、アルファ鎖およびベータ鎖で構成されているヘテロ二量体膜内在性タンパク質である。このタンパク質は、ベータ２鎖（ＩＴＧＢ２）と組み合わされて、不活性化されたＣ３ｂ（ｉＣ３ｂ）受容体４（ＣＲ４）と称される白血球特異的インテグリンを形成する。アルファＸベータ２複合体は、刺激された内皮細胞への好中球および単球の接着性において、ならびに補体コーティング粒子のファゴサイトーシスにおいて、アルファＭベータ２インテグリンの特性と重複すると思われる。ＣＤ１１ｃは、大部分のヒト樹状細胞表面に、ただし、単球、マクロファージ、好中球および一部のＢ細胞表面にも高レベルで見出されるＩ型膜貫通タンパク質であり、これは、細胞活性化を誘導し、好中球呼吸性バーストの誘発に役立ち；ヘアリー細胞白血病、急性非リンパ球性白血病および一部のＢ細胞慢性リンパ球性白血病において発現される。

【０３１４】

ＣＤ１４は、単球／マクロファージ表面に優先的に発現される表面抗原である。これは、他のタンパク質と協同して、細菌リポ多糖に対する自然免疫応答を媒介する。選択的スプライシングは、同じタンパク質をコードする複数の転写物バリアントをもたらす。ＣＤ１４は、２種の形態で存在し、一方は、グリコシルホスファチジルイノシトールテイルによって膜に繋留され（ｍＣＤ１４）、他方は、可溶性形態である（ｓＣＤ１４）。可溶性ＣＤ１４は、ｍＣＤ１４のシェディング後に出現するか（４８ｋＤａ）、または細胞内小胞から直接的に分泌される（５６ｋＤａ）。ＣＤ１４は、細菌リポ多糖（ＬＰＳ）の検出のために、共受容体として作用する（Ｔｏｌｌ様受容体ＴＬＲ４およびＭＤ－２と共に）。ＣＤ１４は、リポ多糖結合タンパク質（ＬＢＰ）の存在下でのみ、ＬＰＳに結合することができる。ＬＰＳは、その主要リガンドと考慮されるが、ＣＤ１４は、リポテイコ酸等の他の病原体関連分子パターンも認識する。

【０３１５】

ＣＤ２５は、刺激後に通常型Ｔ細胞によって発現され、ヒト末梢血において、$CD4^{+}CD25^{hi}$Ｔ細胞のみが「サプレッサー」であることが示された。

【０３１６】

一部の実施形態では、ＡＰＣは、樹状細胞（ＤＣ）を含む。一部の実施形態では、ＡＰＣは、$CD14^{+}$単球に由来する。一部の実施形態では、ＡＰＣは、皮膚、脾臓、骨髄、胸腺、リンパ節、末梢血または臍帯血から得ることができる。一部の実施形態では、$CD14^{+}$単球は、ＰＢＭＣを含む、対象由来の生体試料に由来する。例えば、$CD14^{+}$単球は、ＰＢＭＣを含む、対象由来の生体試料から単離、濃縮または精製され得る。一部の実施形態では、$CD14^{+}$単球は、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子で刺激される。一部の実施形態では、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子は、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＦＮ－γ、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０、ポリＩ：Ｃまたはこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、$CD14^{+}$単球は、ＰＢＭＣを含む第２の生体試料に由来する。

【０３１７】

一部の実施形態では、ＡＰＣの単離された集団は、濃縮または実質的に濃縮することができる。一部の実施形態では、ＡＰＣの単離された集団は、少なくとも３０％、少なくとも５０％、少なくとも７５％または少なくとも９０％均質である。一部の実施形態では、ＡＰＣの単離された集団は、少なくとも６０％、少なくとも７５％または少なくとも９０％均質である。ＡＰＣ等のＡＰＣは、例えば、培養において単球性樹状細胞前駆体から派

生したＡＰＣ、ならびに例えば、末梢血、臍帯血、皮膚、脾臓、骨髄、胸腺およびリンパ節等の組織に存在する内在的に派生したＡＰＣを含むことができる。

【０３１８】

ＡＰＣおよびＡＰＣが実質的に濃縮された細胞集団は、本発明によって同様に提供される方法によって単離することができる。この方法は一般に、ＡＰＣ前駆体を含む細胞の集団を得るステップと、ＡＰＣ前駆体から未成熟または成熟ＡＰＣへの分化とを含み、また、分化した未成熟または成熟ＡＰＣの集団からのＡＰＣの単離を含むこともできる。

【０３１９】

ＡＰＣ前駆体細胞は、当技術分野で公知の方法によって得ることができる。ＡＰＣ前駆体は、例えば、密度勾配分離、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）、免疫学的細胞分離技法、例えば、パニング、補体溶解、ロゼット形成（ｒｏｓｅｔｔｉｎｇ）、磁気細胞分離技法、ナイロンウール分離、および斯かる方法の組合せによって単離することができる。ＡＰＣを免疫選択するための方法は、例えば、基材にカップリングされた抗ＣＤ３４および／または抗ＣＤ１４抗体等、ＡＰＣ前駆体に関連する細胞表面マーカーに対する抗体を使用するステップを含む。

【０３２０】

ＡＰＣ前駆体の濃縮された集団を得ることもできる。斯かる濃縮された前駆体集団を得るための方法は、当技術分野で公知である。例えば、ＡＰＣ前駆体の濃縮された集団は、基材に接着する細胞の選択的除去によって組織供給源から単離することができる。例えば、骨髄または末梢血等の組織供給源を使用して、商業的に取り扱われるプラスチック基材（例えば、ビーズまたは磁気ビーズ）を使用して、細胞調製物から接着性単球を除去して、非接着性ＡＰＣ前駆体が濃縮された集団を得ることができる。

【０３２１】

単球ＡＰＣ前駆体は、ＡＰＣ前駆体接着基材を使用することにより、組織供給源から得ることもできる。例えば、白血球アフェレーシスによって単離された例えば末梢血白血球は、高い表面積対体積比を有する単球性ＡＰＣ前駆体接着基材と接触させられ、接着性単球性ＡＰＣ前駆体が分離される。追加的な実施形態では、カップリングされる基材は、例えば、マイクロビーズ、マイクロキャリアビーズ、ペレット、顆粒、粉末、毛細管、微絨毛膜その他等、高い表面対体積比を有する粒状または繊維状基材であり得る。さらに、粒状または繊維状基材は、ガラス、ポリスチレン、プラスチック、ガラスコーティングされたポリスチレンマイクロビーズその他であり得る。

【０３２２】

ＡＰＣ前駆体は、分化および／または増大化のためにｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することもできる。ＡＰＣ前駆体の分化／増大化のための方法は、当技術分野で公知である。一般に、増大化は、ＡＰＣ（例えば、樹状細胞）分化／増殖を誘導する少なくとも１種のサイトカインの存在下で前駆体を培養することにより達成することができる。典型的に、そのようなサイトカインは、顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）または顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）である。加えて、他の薬剤を使用して、培養における非ＡＰＣ細胞型の増殖および／または成熟化を阻害し、これにより、ＡＰＣ前駆体の集団をさらに濃縮することができる。典型的に、斯かる薬剤は、例えば、ＩＬ－１３、ＩＬ－４またはＩＬ－１５その他等のサイトカインを含む。

【０３２３】

ＡＰＣ前駆体の単離された集団を培養し分化させて、未成熟または成熟ＡＰＣを得る。適した組織培養培地は、例えば、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）、ＲＰＭＩ　１６４０、ＤＭＥＭ、Ｘ－ＶＩＶＯその他を含むがこれらに限定されない。組織培養培地は典型的に、アミノ酸、ビタミン、二価カチオン、およびＡＰＣ表現型に向けた前駆体の分化を促進するためのサイトカインを補充されている。典型的には、分化促進性サイトカインは、ＧＭ－ＣＳＦおよび／またはＩＬ－４である。

【０３２４】

さらに、増大化、分化およびＡＰＣ表現型への成熟化の際のＡＰＣ前駆体の培養物は、

ＡＰＣの発生を促進するための血漿を含むことができる。典型的な血漿濃度は、約５％である。加えて、例えば、ＡＰＣ前駆体が、基材への接着性によって単離される場合、培養初期にＣＤ１４$^{+}$表現型を促進するために、接着性ステップの際の培養培地に血漿が含まれていてよい。接着の際の典型的な血漿濃度は、約１％またはそれよりも多い。

【０３２５】

単球性ＡＰＣ前駆体は、いずれか適した時間にわたり培養することができる。ある特定の実施形態では、前駆体から未成熟ＡＰＣへの分化に適した培養時間は、約１～約１０日間、例えば、約４～約７日間であり得る。前駆体からの未成熟ＡＰＣの分化は、細胞表面マーカー（例えば、ＣＤ１１ｃ$^{+}$、ＣＤ８３^{low}、ＣＤ８６$^{-/low}$、ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$）の存在または非存在による等、当業者にとって公知の方法によってモニターすることができる。未成熟ＡＰＣは、さらなる分化または抗原取込み、プロセシングおよび提示のための状態に未成熟ＡＰＣを維持するための適切な組織培養培地において培養することもできる。例えば、未成熟ＡＰＣは、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の存在下で維持することができる。

【０３２６】

一部の実施形態では、ＡＰＣ前駆体は、分化に先立ち単離することができる。一部の実施形態では、単離された集団は、ＡＰＣ前駆体について濃縮または実質的に濃縮することができる。一部の実施形態では、ＡＰＣ前駆体は、ＣＤ１４特異的プローブにより単離される。例示的な一実施形態では、ＣＤ１４発現細胞は、蛍光分子（例えば、ＦＩＴＣまたはＰＥ）に直接的にコンジュゲートされたＣＤ１４特異的プローブを使用した、またはＣＤ１４に特異的な標識されていない抗体およびこの第１の抗体に特異的な標識された第２の抗体による、ＦＡＣＳによって検出される。ＣＤ１４$^{+}$細胞は、ＦＡＣＳ選別によってＣＤ１４^{low}およびＣＤ１４$^{-}$細胞から分離することもできる。ＣＤ１４^{high}陽性のためのゲーティングは、例えば、ＰＢＭＣ由来単球におけるＣＤ１４染色を参照して決定することができる。典型的には、ＣＤ１４特異的結合剤は、例えば、抗ＣＤ１４抗体（例えば、モノクローナルまたはその抗原結合性断片）である。本発明における使用に適した多数の抗ＣＤ１４抗体は、当業者にとって周知であり、その多くは、商業的に購入することができる。未成熟ＡＰＣ（ＣＤ１４陰性）への分化は、単離後に行うことができる。

【０３２７】

別の実施形態では、ＣＤ１４特異的プローブが基材にカップリングされ、ＣＤ１４$^{+}$細胞は、親和性選択によって単離される。ＣＤ１４$^{+}$細胞を含む細胞の集団は、カップリングされた基材に曝露され、ＣＤ１４$^{+}$細胞は、特異的に接着させられる。次に、非接着ＣＤ１４$^{-}$細胞を、基材から洗浄除去し、次に、接着性細胞を溶出して、ＡＰＣ前駆体が実質的に濃縮された単離された細胞集団を得る。ＣＤ１４特異的プローブは、例えば、抗ＣＤ１４抗体であり得る。基材は、例えば、市販の組織培養プレートまたはビーズ（例えば、ガラスまたは磁気ビーズ）であり得る。表面マーカーに特異的な基材にカップリングした抗体を使用した細胞集団の親和性単離のための方法は一般に公知である。

【０３２８】

培養中に、未成熟ＡＰＣは、所定の抗原に必要に応じて曝露することができる。適した所定の抗原は、Ｔ細胞モジュレーションが所望されるいずれかの抗原を含むことができる。一実施形態では、未成熟ＡＰＣは、がん免疫療法および／または腫瘍成長阻害のために前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）の存在下で培養される。他の抗原は、例えば、細菌細胞、ウイルス、部分的に精製されたまたは精製された細菌またはウイルス抗原、腫瘍細胞、腫瘍特異的または腫瘍関連抗原（例えば、腫瘍細胞ライセート、腫瘍細胞膜調製物、腫瘍から単離された抗原、融合タンパク質、リポソームその他）、その表面に抗原を発現する組換え細胞、自己抗原、および他のいずれかの抗原を含むことができる。抗原のいずれかは、ペプチドまたは組換えにより産生されたタンパク質もしくはその部分として提示することもできる。抗原との接触後に、細胞は、いずれか適した時間にわたり培養して、抗原取込みおよびプロセシングを可能にして、抗原特異的ＡＰＣの集団の増大化その他を行うことができる。

【０３２９】
例えば、一実施形態では、未成熟ＡＰＣを抗原取込み後に培養して、未成熟ＡＰＣから、ＭＨＣ分子の文脈で抗原を提示する成熟ＡＰＣへの成熟化を促進することができる。ＡＰＣ成熟化のための方法は、公知である。斯かる成熟化は、例えば、サイトカイン（例えば、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１βまたはＣＤ４０リガンド）、細菌産物（例えば、ＬＰＳまたはＢＣＧ）その他等、公知の成熟化因子の存在下での培養によって行うことができる。未成熟ＡＰＣから成熟ＡＰＣへの成熟化は、例えば、細胞表面マーカーの存在または非存在（例えば、ＣＤ８３、ＣＤ８６およびＭＨＣ分子の上方調節）を測定すること、または例えば、オリゴヌクレオチドアレイを使用して成熟ＡＰＣ特異的ｍＲＮＡもしくはタンパク質の発現について検査することによる等、当技術分野で公知の方法によってモニターすることができる。

【０３３０】
必要に応じて、未成熟ＡＰＣを適切な組織培養培地において培養して、細胞集団を増大化する、および／またはさらなる分化もしくは抗原取込みのための状態に未成熟ＡＰＣを維持することができる。例えば、未成熟ＡＰＣは、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の存在下で維持および／または増大化することができる。また、未成熟ＡＰＣは、例えば、抗炎症性サイトカイン（例えば、ＩＬ－１０およびＴＧＦ－β）等、抗炎症性分子の存在下で培養して、未成熟ＡＰＣ成熟化を阻害することができる。

【０３３１】
別の態様では、ＡＰＣの単離された集団は、成熟ＡＰＣについて濃縮される。上述の成熟化因子（例えば、細菌産物および／または炎症促進性サイトカイン）の存在下で未成熟ＡＰＣの分化した集団を培養し、これにより、成熟化を誘導することにより、成熟ＡＰＣの単離された集団を得ることができる。未成熟ＡＰＣは、ＣＤ１４＋細胞を除去することにより単離することができる。

【０３３２】
本発明のさらに別の態様において、ＡＰＣは、適した抗原への曝露前または曝露後のいずれかに、例えば、凍結保存によって保存することができる。使用することができる凍結保存剤は、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、グリセロール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、アルブミン、デキストラン、スクロース、エチレングリコール、ｉ－エリスリトール、Ｄ－リビトール、Ｄ－マンニトール、Ｄ－ソルビトール、ｉ－イノシトール、Ｄ－ラクトース、塩化コリン、アミノ酸、メタノール、アセトアミド、グリセロールモノアセテートおよび無機塩を含むがこれらに限定されない。制御された緩徐な冷却速度が、重大な意味を持つことがある。異なる凍結保護剤および異なる細胞型は典型的に、異なる最適な冷却速度を有する。水が氷に変ずる融合相（ｆｕｓｉｏｎ　ｐｈａｓｅ）の熱は典型的に、最小となるべきである。例えば、プログラム可能な凍結デバイスまたはメタノール浴手順の使用により、冷却手順を実行することができる。プログラム可能な凍結装置は、最適な冷却速度の決定を可能にし、標準の再現性がある冷却を容易にする。ＣｒｙｏｍｅｄまたはＰｌａｎａｒ等、プログラム可能な速度制御されたフリーザーは、所望の冷却速度曲線への凍結レジメンの調整を可能にする。

【０３３３】
完全に凍結した後に、ＡＰＣは、長期低温貯蔵容器に迅速に移すことができる。典型的な実施形態では、試料は、液体窒素（－１９６℃）またはその蒸気（－１６５℃）において低温に貯蔵することができる。特に骨髄または末梢血に由来する造血幹細胞の操作、凍結保存および長期貯蔵についての検討事項および手順は、本発明のＡＰＣに大部分が適用可能である。

【０３３４】
凍結された細胞は、好ましくは、急速に解凍され（例えば、３７～４１℃に維持された水浴中で）、解凍後直ちに冷やされる。解凍後の細胞集塊を防止するために細胞を処置することが望ましい可能性がある。集塊を防止するために、ＤＮＡｓｅ、低分子量デキストランおよびクエン酸塩、ヒドロキシエチルデンプンその他の凍結前および／または後の添

加を含むがこれらに限定されない、様々な手順を使用することができる。凍結保護剤は、ヒトにおいて毒性がある場合、解凍されたＡＰＣの治療上の使用に先立ち除去するべきである。凍結保護剤を除去する仕方の１つは、重要でないほど低い濃度までの希釈による。凍結されたＡＰＣが、解凍され回復されたら、凍結されていないＡＰＣに関して本明細書に記載されているＴ細胞の活性化に使用することができる。

【０３３５】

一態様では、Ｔ細胞活性化のための組成物は、１種または複数の型の免疫細胞が枯渇された免疫細胞の集団を含む。例えば、組成物は、１種または複数の細胞表面受容体等、１種または複数のタンパク質を発現する１種または複数の型の免疫細胞が枯渇された免疫細胞の集団を含むことができる。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも１種の抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を含む生体試料由来の免疫細胞の集団を含み、集団におけるＣＤ１４および／またはＣＤ２５発現免疫細胞の量は、生体試料におけるＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する免疫細胞の量とは相対的に異なる。例えば、組成物は、少なくとも１種の抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を含む生体試料由来の免疫細胞の集団を含むことができ、集団におけるＣＤ１４発現免疫細胞の量は、生体試料におけるＣＤ１４を発現する免疫細胞の量とは相対的に異なる。例えば、組成物は、少なくとも１種の抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を含む生体試料由来の免疫細胞の集団を含むことができ、集団におけるＣＤ２５発現免疫細胞の量は、生体試料におけるＣＤ２５を発現する免疫細胞の量とは相対的に異なる。例えば、組成物は、少なくとも１種の抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を含む生体試料由来の免疫細胞の集団を含むことができ、集団におけるＣＤ１４およびＣＤ２５発現免疫細胞の量は、生体試料におけるＣＤ１４およびＣＤ２５を発現する免疫細胞の量とは相対的に異なる。例えば、組成物は、生体試料由来の免疫細胞の集団を含むことができ、集団におけるＣＤ１４およびＣＤ２５を発現する免疫細胞の量は、生体試料におけるＣＤ１４およびＣＤ２５を発現する免疫細胞の量よりも相対的に少ない。

【０３３６】

がん免疫療法のための細胞組成物を調製するための方法であって、Ｉ．抗原がロードされた抗原提示細胞（ＡＰＣ）を調製するステップであって、（ａ）ｆｍｓ様チロシンキナーゼ３リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）で前処置された対象から末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を得るステップと；（ｂ）（ｉ）がんネオ抗原ペプチドまたはその部分のそれぞれが、対象において発現されたＨＬＡ対立遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する、複数のがんネオ抗原ペプチド、または複数のがんネオ抗原ペプチドをコードする１種もしくは複数のポリヌクレオチド、（ｉｉ）細胞を活性化するための刺激薬、（ｉｉｉ）細胞集団を得るための、ｅｘ　ｖｉｖｏで細胞成長および維持を促進する薬剤、および（ｉｖ）ＣＤ１１ｂ^{low}またはＣＤ１１ｂが枯渇された抗原がロードされたＡＰＣを得るための、細胞集団からＣＤ１１ｂ＋細胞を低下または枯渇させるための薬剤と、ＰＢＭＣとをｅｘ　ｖｉｖｏで接触させるステップとを含むステップと；ＩＩ．ＣＤ１１ｂ^{low}またはＣＤ１１ｂが枯渇された抗原がロードされたＡＰＣと単離されたＴ細胞とをｅｘ　ｖｉｖｏで接触させるステップと；ＩＩＩ．がん免疫療法のための細胞組成物のための抗原でプライムされたＴ細胞を調製するステップとを含む方法が本明細書に提供される。

【０３３７】

ｅｘ　ｖｉｖｏで腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するための改善された方法が本明細書に提供され、方法は、（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップであって、免疫細胞の集団が、ヒト対象由来の生体試料に由来する、ステップと、（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および（ｉ

ｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）の刺激されたＴ細胞を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）ステップ（ｂ）（ｉｉ）の少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップとを含む。（ｃ）の細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップであって、ステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団が、1×10^{8}～1×10^{11}個の総細胞を含む、ステップを含む方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、ナイーブＴ細胞区画から活性化された、ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋Ｔ細胞を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法が本明細書に提供され；プロセスは、抗原刺激および増大化に先立ち、ＰＢＭＣから、ＣＤ１４＋細胞を枯渇させるステップ；またはＣＤ１４＋細胞およびＣＤ２５＋細胞、ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋およびＣＤ１１ｂ＋細胞を枯渇させるステップを含む。一部の実施形態では、ナイーブＴ細胞区画から活性化された、ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋Ｔ細胞を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法が本明細書に提供され；プロセスは、抗原刺激および増大化に先立ち、ＰＢＭＣから、ＣＤ２５＋細胞を枯渇させるステップ；またはＣＤ１４＋細胞およびＣＤ２５＋細胞、ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋およびＣＤ１１ｂ＋細胞を枯渇させるステップを含む。一部の実施形態では、ナイーブＴ細胞区画から活性化された、ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋Ｔ細胞を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法が本明細書に提供され；プロセスは、抗原刺激および増大化に先立ち、ＰＢＭＣから、ＣＤ１１ｂ＋細胞を枯渇させるステップ；またはＣＤ１４＋細胞およびＣＤ２５＋細胞、ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋およびＣＤ１１ｂ＋細胞を枯渇させるステップを含む。

【０３３８】

一部の実施形態では、対象は、ＰＢＭＣの単離または白血球アフェレーシスの少なくとも約１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、１２時間、１日、２日、３日、４日、５日、６日または１週間前に、ＦＬＴ３Ｌで前処置される。一部の実施形態では、対象は、ＰＢＭＣの単離または白血球アフェレーシスの少なくとも約１週間、２週間、３週間、４週間または５週間前に、ＦＬＴ３Ｌで前処置される。

【０３３９】

一部の実施形態では、細胞集団は、ＣＤ１１ｃ＋細胞について濃縮される。一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣは、樹状細胞（ＤＣ）を含む。一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣは、形質細胞様樹状細胞（ｐＤＣ）を含む。一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣは、ＣＤ１ｃ＋ＤＣを含む。一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣは、ＣＤ１４１＋ＤＣを含む。一部の実施形態では、細胞集団は、マクロファージを含む。一部の実施形態では、本方法は、ネオ抗原活性化Ｔ細胞を活性化または濃縮するために、細胞集団からＣＤ１９＋細胞を低下または枯渇させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、ネオ抗原活性化Ｔ細胞を活性化または濃縮するために、細胞集団からＣＤ１１ｂ＋およびＣＤ１９＋細胞の両方を低下または枯渇させるステップをさらに含む。

【０３４０】

一部の実施形態では、本方法は、抗原活性化Ｔ細胞を調製および濃縮するために、細胞集団からＣＤ１４＋細胞を低下または枯渇させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、抗原活性化Ｔ細胞を調製および濃縮するために、細胞集団からＣＤ２５＋細胞を低下または枯渇させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、ネオ抗原活性化Ｔ細胞を活性化または濃縮するために、細胞集団からＣＤ１９＋、ＣＤ１４＋、ＣＤ２５＋またはＣＤ１１ｂ＋細胞のうち１種または複数を低下または枯渇させるステップをさらに含む。

【０３４１】

一部の実施形態では、細胞を活性化するための刺激薬は、ＦＬ３ＴＬを含む。

【０３４２】

一部の実施形態では、ｅｘ　ｖｉｖｏで細胞成長および維持を促進する薬剤は、増殖因子、サイトカイン、アミノ酸、サプリメントまたはこれらの組合せを含む。

【０３４３】

一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣは、２、３、４、５、６または７日間にわたりＴ細胞を刺激することができる。

【０３４４】

一部の実施形態では、複数のがんネオ抗原ペプチドのそれぞれは、８～３０アミノ酸長である。

【０３４５】

一部の実施形態では、複数のネオ抗原性ペプチドのそれぞれは、ネオ抗原性エピトープを含む。一部の実施形態では、複数のがんネオ抗原ペプチドは、２、３、４、５、６、７または８種のネオ抗原性ペプチドを含み；複数のネオ抗原性ペプチドのそれぞれは、以前のセクションに記載されているネオ抗原性ペプチド特徴を有する。

【０３４６】

一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣの調製に使用されるネオ抗原性ペプチドは、少なくとも２０アミノ酸もしくは少なくとも３０アミノ酸もしくは少なくとも４０アミノ酸もしくは少なくとも５０アミノ酸、またはその間のいずれかの数のアミノ酸を含む長いペプチドである。一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣの調製に使用されるネオ抗原性ペプチドは、Ｔ細胞への提示率増加のためのネオ抗原性ペプチドの内在性プロセシングを容易にする、突然変異のいずれかの側に隣接するアミノ酸を含む。

【０３４７】

より長い免疫原性ペプチドをいくつかの仕方で設計することができる。一部の実施形態では、ＨＬＡ結合ペプチドが予測されるまたは公知である場合、より長い免疫原性ペプチドは、（１）各対応する遺伝子産物のＮおよびＣ末端に向けて２～５アミノ酸の伸長を有する個々の結合ペプチド；または（２）それぞれに対する伸長配列と結合ペプチドの一部または全てとのコンカテネーションからなることができる。他の実施形態では、配列決定が、腫瘍に存在する長い（＞１０残基）エピトープ配列、例えば、ネオエピトープを明らかにする場合（例えば、新規ペプチド配列をもたらすフレームシフト、リードスルーまたはイントロン包含による）、より長いネオ抗原ペプチドは、単一のより長いペプチドまたはいくつかの重複するより長いペプチドのいずれかとして、新規腫瘍特異的アミノ酸のストレッチ全体からなることができる。一部の実施形態では、より長いペプチドの使用は、患者細胞による内在性プロセシングを可能にすると推定され、より有効な抗原提示およびＴ細胞応答の誘導をもたらすことができる。一部の実施形態では、２種またはそれよりも多いペプチドを使用することができ、この場合、これらのペプチドは重複し、長いネオ抗原ペプチドにわたりタイルのように並んでいる。

【０３４８】

一部の実施形態では、複数のネオ抗原性ペプチドのそれぞれは、同じネオ抗原性エピトープを含む。一部の実施形態では、複数のネオ抗原性ペプチドは、２種以上のネオ抗原性エピトープを含む。

【０３４９】

一部の実施形態では、複数のがんネオ抗原ペプチドをコードする１種または複数のポリヌクレオチドは、ＤＮＡである。

【０３５０】

一部の実施形態では、複数のがんネオ抗原ペプチドをコードする１種または複数のポリヌクレオチドは、１種または複数の哺乳動物発現ベクターに挿入される。

【０３５１】

一部の実施形態では、複数のがんネオ抗原ペプチドをコードする１種または複数のポリヌクレオチドは、メッセンジャーＲＮＡである。

【０３５２】
一部の実施形態では、本発明は、改変ヌクレオシドを含むＲＮＡ、オリゴリボヌクレオチドおよびポリリボヌクレオチド分子を提供する。
【０３５３】
一部の実施形態では、本発明は、ＲＮＡ、オリゴリボヌクレオチドおよびポリリボヌクレオチドを含む遺伝子療法ベクターを提供する。
【０３５４】
一部の実施形態では、本発明は、前述のものを含む遺伝子治療方法および遺伝子転写サイレンシング方法を提供する。
【０３５５】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、単一のネオ抗原性ペプチドをコードする。
【０３５６】
一部の実施形態では、１種のポリヌクレオチドは、２種以上のネオ抗原性ペプチドをコードする。
【０３５７】
一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、メッセンジャーＲＮＡである。一部の実施形態では、各メッセンジャーＲＮＡは、２種またはそれよりも多いネオ抗原性ペプチドのコード配列をタンデムに含む。
【０３５８】
一部の実施形態では、各メッセンジャーＲＮＡは、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０種またはそれよりも多いネオ抗原性ペプチドのコード配列をタンデムに含む。典型的には、ｍＲＮＡは、５’－ＵＴＲ、タンパク質コード領域および３’－ＵＴＲを含む。ｍＲＮＡは、細胞およびｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて限られた半減期のみを保有する。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、自己増幅するｍＲＮＡである。本発明の文脈において、ｍＲＮＡは、ＤＮＡ鋳型からのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によって生成することができる。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写方法論は、当業者にとって公知である。例えば、市販の種々のｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写キットが存在する。
【０３５９】
ＲＮＡの安定性および翻訳効率を改変することができる。例えば、ＲＮＡの安定化効果を有するおよび／またはその翻訳効率を増加させる１種または複数の改変によって、ＲＮＡを安定化し、その翻訳を増加させることができる。斯かる改変は、例えば、参照により本明細書に組み込むＰＣＴ／ＥＰ２００６／００９４４８に記載されている。本発明に従って使用されるＲＮＡの発現を増加させるために、発現されるペプチドまたはタンパク質の配列を変更することなく、ＧＣ含量を増加させてｍＲＮＡ安定性を増加させ、コドン最適化を行い、よって、細胞における翻訳を増強することができるように、ＲＮＡは、コード領域、すなわち、発現されるペプチドまたはタンパク質をコードする配列内で改変することができる。
【０３６０】
一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、複数のネオ抗原性エピトープを含むことができる。一部の実施形態では、ｎｅｏ－ＯＲＦをコードすることができる長いポリリボヌクレオチド配列、例えば、ｎｅｏ－ＯＲＦをコードする突然変異したＧＡＴＡ３配列を使用することができる。一部の実施形態では（Ｉｎ　ｓｏｍｅ）、ネオ抗原性ペプチドをコードする配列を含む遺伝子の大部分またはさらにはそのコード領域全体のｍＲＮＡは、抗原の内在性プロセシングおよび提示のために免疫細胞に送達される。
【０３６１】
一部の実施形態では、ネオ抗原性ペプチド毎のコード配列は、２４～１２０ヌクレオチド長である。
【０３６２】
一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、５０～１０，０００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、１００～１０，０００ヌクレオチド長である。一部の実施形

態では、ｍＲＮＡは、２００～１０，０００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、５０～５，０００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、１００～５，０００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、１００～１，０００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、３００～８００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、４００～７００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、４５０～６００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、少なくとも２００ヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、２５０超のヌクレオチド、３００超のヌクレオチド、３５０超のヌクレオチド、４００超のヌクレオチド、４５０超のヌクレオチド、５００超のヌクレオチド、５５０超のヌクレオチド、６００超のヌクレオチド、６５０超のヌクレオチド、７００超のヌクレオチド、７５０超のヌクレオチド、８００超のヌクレオチド、８５０超のヌクレオチド長、９００超のヌクレオチド長、９５０超のヌクレオチド長、１０００超のヌクレオチド長、２０００超のヌクレオチド長、３０００超のヌクレオチド長、４０００超のヌクレオチド長または５０００超のヌクレオチド長である。

【０３６３】

一部の実施形態では、１種または複数のネオ抗原性ペプチドをコードするｍＲＮＡは改変され、改変は、５’－ＵＴＲに関する。一部の実施形態では、改変は、５’－ＵＴＲに５’－キャップまたは５’－キャップアナログを有するＲＮＡの提供に関する。用語「５’－キャップ」は、ｍＲＮＡ分子の５’末端に見出されるキャップ構造を指し、一般に、珍しい５’から５’への三リン酸連結を介してｍＲＮＡに接続されたグアノシンヌクレオチドからなる。一部の実施形態では、このグアノシンは、７位でメチル化されている。用語「従来の５’－キャップ」は、天然に存在するＲＮＡ５’－キャップ、７－メチルグアノシンキャップ（ｍＧ）を指す。本発明の文脈において、用語「５’－キャップ」は、ＲＮＡキャップ構造に似ており、ｉｎ　ｖｉｖｏでおよび／または細胞において、ＲＮＡに取り付けられた場合にＲＮＡを安定化するおよび／またはＲＮＡの翻訳を増強する能力を保有するように改変された、５’－キャップアナログを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、同時転写的にキャップ付加される。

【０３６４】

一部の実施形態では、１種または複数のネオ抗原性ペプチドをコードするｍＲＮＡは、ポリＡテイルを含む３’－ＵＴＲを含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１００～２００ｂｐ長である。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、２０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、５０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、６０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、７０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、８０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、９０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１００ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１１０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１３０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１４０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１５０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１６０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１７０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１８０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１９０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、２００ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、２１０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、２２０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、２３０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１００ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、２４０ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１００ヌクレオチドよりも長い。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、約２５０ヌクレオチドである。

【０３６５】
一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１００～２５０アデノシン単位を含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２０～１３０アデニン単位を含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２０アデニン単位を含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２１アデニン単位を含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２２アデニン単位を含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２３アデニン単位を含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２４アデニン単位を含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２５アデニン単位を含む。一部の実施形態では、ポリＡテイルは、１２９塩基である。
【０３６６】
一部の実施形態では、２種の連続したネオ抗原性ペプチドのコード配列は、スペーサーまたはリンカーによって隔てられる。
【０３６７】
一部の実施形態では、スペーサーまたはリンカーは、最大５０００ヌクレオチド残基を含む。例示的なスペーサー配列は、ＧＧＣＧＧＣＡＧＣＧＧＣＧＧＣＧＧＣＧＧＣＡＧＣＧＧＣＧＧＣである。別の例示的なスペーサー配列は、ＧＧＣＧＧＣＡＧＣＣＴＧＧＧＣＧＧＣＧＧＣＧＧＣＡＧＣＧＧＣである。別の例示的なスペーサー配列は、ＧＧＣＧＴＣＧＧＣＡＣＣである。別の例示的なスペーサー配列は、ＣＡＧＣＴＧＧＧＣＣＴＧである。別の例示的なスペーサーは、ＡＡＡまたはＡＡＧ等、リシンをコードする配列である。別の例示的なスペーサー配列は、ＣＡＡＣＴＧＧＧＡＴＴＧである。
【０３６８】
一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、ＡＰＣによる抗原エピトーププロセシングおよび提示を増強するための１種または複数の追加的な構造を含む。
【０３６９】
一部の実施形態では、リンカーまたはスペーサー領域は、切断部位を含有することができる。切断部位は、エピトープ配列のストリングを含むタンパク質産物の、提示のための別々のエピトープ配列への切断を確実にする。配列内のエピトープの偶発性の切断を回避するために、好まれる切断部位は、ある特定のエピトープに隣接して置かれる。一部の実施形態では、エピトープのストリングをコードするｍＲＮＡにおけるエピトープおよび切断領域の設計は、非ランダムである。
【０３７０】
ある特定の実施形態では、本発明のネオ抗原ペプチドをコードするｍＲＮＡは、それを必要とする対象に投与される。一部の実施形態では、投与されるべきｍＲＮＡは、少なくとも１個の改変ヌクレオシド－リン酸を含む。
【０３７１】
一部の実施形態では、Ｔ細胞は、人工抗原提示細胞によるネオ抗原性ペプチドにより活性化される。一部の実施形態では、人工足場を使用して、ネオ抗原性ペプチドによりＴ細胞を活性化し、人工足場に、ネオ抗原性ペプチドが高い親和性で結合し得るＭＨＣ抗原とカップリングされたネオ抗原性ペプチドをロードする。
【０３７２】
一部の実施形態では、追加的な構造は、ＭＩＴＤ、ＳＰ１および第１０フィブロネクチンドメイン：１０ＦｎＩＩＩからなる群から選択されるタンパク質由来の特異的ドメインをコードする構造を含む。
【０３７３】
一部の実施形態では、末梢血または白血球アフェレーシスに由来する細胞を、複数のがんネオ抗原ペプチド、または複数のがんネオ抗原ペプチドをコードする１種もしくは複数のポリヌクレオチドと１回または２回以上接触させて、抗原がロードされたＡＰＣを調製する。
【０３７４】
一部の実施形態では、本方法は、ＡＰＣ、またはＡＰＣ調製物のうち１種もしくは複数

を、少なくとも１種のサイトカインまたは増殖因子を含む第１の培地と共に、第１の期間にわたりインキュベートするステップを含む。

【０３７５】

一部の実施形態では、本方法は、ＡＰＣ調製物のうち１種または複数を、少なくとも１種のペプチドと共に、第２の期間にわたりインキュベートするステップを含む。

【０３７６】

一部の実施形態では、濃縮された細胞は、ＣＤ１ｃ＋細胞をさらに含む。

【０３７７】

一部の実施形態では、細胞集団は、ＣＤ１１ｃ＋およびＣＤ１４１＋細胞について濃縮される。

【０３７８】

一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣを含む細胞集団は、１％、２％、３％、４％、５％、６、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％もしくは９５％超のまたはそれよりも多いＣＤ１１ｃ＋細胞を含む。

【０３７９】

一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣを含む細胞集団は、９５％、９０％、８５％、８０％、７５％、７０％、６５％、６０％、５５％、５０％、４５％、４０％、３５％、３０％、２０％、１０％、８％、７％、６％、５％、４％未満のまたはそれよりも少ないＣＤ１１ｂ＋発現細胞を含む。

【０３８０】

一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣを含む細胞集団は、１％、２％、３％、４％、５％、６、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％超の、ＣＤ１１ｃ＋であるネオ抗原性ペプチド発現細胞を含む。

【０３８１】

一部の実施形態では、抗原がロードされたＡＰＣを含む細胞集団は、１％、２％、３％、４％、５％、６、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％超の、ＣＤ１１ｃ＋ＣＤ１ｃ＋またはＣＤ１４１＋細胞であるネオ抗原性ペプチド発現細胞を含む。

【０３８２】

一部の実施形態では、ネオ抗原がロードされたＡＰＣは、成熟ＡＰＣを含む。

【０３８３】

一部の実施形態では、本方法は、少なくとも１個のＡＰＣおよび少なくとも１個のＰＢＭＣまたは少なくとも１個の（ｏｎ）Ｔ細胞を含む、対象由来の生体試料を得るステップを含む。

【０３８４】

一部の実施形態では、本方法は、生体試料からＣＤ１４および／またはＣＤ２５および／またはＣＤ１９を発現する細胞を枯渇させ、これにより、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５および／またはＣＤ１９細胞枯渇試料を得るステップを含む。

【０３８５】

一部の実施形態では、本方法は、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５および／またはＣＤ１９細胞枯渇試料を、ＦＬＴ３Ｌと共に、第１の期間にわたりインキュベートするステップを含む。

【０３８６】

一部の実施形態では、本方法は、少なくとも１種のペプチドを、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５および／またはＣＤ１９細胞枯渇試料と共に、第２の期間にわたりインキュベートし、これにより、第１の成熟したＡＰＣペプチドロード試料を得るステップを含む。

【０３８７】

ネオ抗原がロードされたＡＰＣを使用したネオ抗原活性化Ｔ細胞の調製

一部の実施形態では、上述の方法によって調製されたネオ抗原がロードされたＡＰＣ（ＡＰＣ）を、Ｔ細胞と共にインキュベートして、抗原活性化Ｔ細胞を得る。本方法は、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を生成するステップを含むことができ、抗原は、ネオ抗原である。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を生成するステップは、複数の抗原特異的Ｔ細胞を生成するステップを含む。

【０３８８】

一部の実施形態では、Ｔ細胞は、対象由来の生体試料から得られる。

【０３８９】

一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＡＰＣが由来する同じ対象由来の生体試料から得られる。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＡＰＣが由来する対象とは異なる対象由来の生体試料から得られる。

【０３９０】

一部の実施形態では、ＡＰＣおよび／またはＴ細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）である生体試料に由来する。一部の実施形態では、ＡＰＣおよび／またはＴ細胞は、白血球アフェレーシス試料である生体試料に由来する。

【０３９１】

一部の実施形態では、ＡＰＣは、樹状細胞（ＤＣ）を含む。

【０３９２】

一部の実施形態では、ＡＰＣは、ＣＤ１４＋単球に由来する、またはＣＤ１４濃縮ＡＰＣである、またはＣＤ１４１濃縮ＡＰＣである。

【０３９３】

一部の実施形態では、ＣＤ１４＋単球は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む、対象由来の生体試料から濃縮される。

【０３９４】

一部の実施形態では、ＡＰＣは、ＰＢＭＣである。一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、新たに単離されたＰＢＭＣである。一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、凍結されたＰＢＭＣである。一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、対象または患者から単離された自家ＰＢＭＣである。

【０３９５】

一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、抗原をロードされ、抗原は、ペプチドもしくはポリペプチド、またはペプチドおよびポリペプチドをコードするｍＲＮＡ等のポリヌクレオチドであり得る。ＰＢＭＣ（単球、ＤＣ　貪食細胞）は、ファゴサイトーシスによって抗原を取り入れ、プロセシングし、それをＴ細胞活性化のために表面に提示することができる。ＰＢＭＣ上にロードされたペプチドまたはポリペプチドは、アジュバントを補充して、免疫原性を増加させることができる。一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、核酸抗原をロードされる。核酸抗原は、１種または複数の抗原をコードする配列を含むｍＲＮＡの形態であり得る。一部の実施形態では、例えば、ＲＮＡは、自己アジュバントとして作用することができるため、ｍＲＮＡ抗原ロードは、アジュバント補充を要求しない。一部の実施形態では、ＡＰＣは、２０～４０種の抗原をロードされる。一部の実施形態では、ＡＰＣは、２０～４０種の抗原を発現する。一部の実施形態では、抗原は、ネオ抗原である。一部の実施形態では、抗原の少なくとも大部分は、ネオ抗原である。一部の実施形態では、ＡＰＣ（またはＰＢＭＣ）は、ＣＤ８＋Ｔ細胞刺激のための短いペプチド（それぞれ８～１２アミノ酸長）をコードする核酸配列をロードされるかまたはそれを発現する。一部の実施形態では、ＡＰＣ（またはＰＢＭＣ）は、ＣＤ４＋Ｔ細胞刺激のための短いペプチド（それぞれ１６～２５アミノ酸長）をコードする核酸配列をロードされるかまたはそれを発現する。一部の実施形態では、ＡＰＣ（例えば、ＰＢＭＣ）は、短いおよび長い抗原性ペプチド配列の両方をロードすることができるか；またはＡＰＣは、短いおよび長い抗原性配列の両方を発現する。一部の実施形態では、ＡＰＣは、最大または約４０種の短い抗原ペプチド配列および最大または約２０種の長い抗原ペプチド配列をロードされる。一部の

実施形態では、ＡＰＣは、最大または約４０種の短い抗原ペプチド配列および最大または約２０種の長い抗原ペプチド配列を含む核酸を形質導入またはトランスフェクトされる。

【０３９６】

一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、直接単離される、または凍結された試料から解凍され、ネオ抗原、またはネオ抗原を含む組成物、または１種もしくは複数の抗原をコードする１種もしくは複数の核酸もしくはポリヌクレオチド等の１種または複数の抗原とのインキュベートに付される。一部の実施形態では、ＰＢＭＣ試料は、１種もしくは複数の抗原または１種もしくは複数の抗原をコードする核酸にＰＢＭＣを曝露する前に、ＰＢＭＣ内の１種または複数の細胞成分の分化のためにさらに培養されることも、またはそのさらなる成熟化に付されることもない（例えば、抗原提示細胞の成熟化、または単球から樹状細胞への分化）。一部の実施形態では、細胞を１種もしくは複数の抗原または１種もしくは複数の抗原をコードする核酸に曝露またはインキュベートする前に、１種または複数の細胞型は、新たに単離されたＰＢＭＣ細胞集団または新たに解凍されたＰＢＭＣ集団から枯渇または除去される。一部の実施形態では、ＣＤ１４＋細胞は、ＰＢＭＣから枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ２５＋細胞は、ＰＢＭＣから枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋細胞は、ＰＢＭＣから枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋細胞は、１種もしくは複数の抗原または１種もしくは複数の抗原をコードする１種もしくは複数の核酸とインキュベートする前に、ＰＢＭＣから枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋および／またはＣＤ１４＋および／またはＣＤ２５＋細胞は、ＰＢＭＣから枯渇される。一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、ヒト対象の末梢血における未成熟樹状細胞（ＤＣ）のパーセンテージとほぼ同じ、未成熟ＤＣのパーセンテージを含有するヒト対象由来のＰＢＭＣ試料からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させることにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するステップを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、ヒト対象の末梢血における成熟ＤＣのパーセンテージとほぼ同じ、成熟ＤＣのパーセンテージを含有するヒト対象由来のＰＢＭＣ試料からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させることにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するステップを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、ヒト対象の末梢血における未成熟ＤＣの成熟ＤＣに対する比とほぼ同じ、未成熟ＤＣの成熟ＤＣに対する比を含有するヒト対象由来のＰＢＭＣ試料からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させることにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するステップを含む。一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、未成熟ＤＣを成熟ＤＣに成熟化するステップに付されていないヒト対象由来のＰＢＭＣ試料からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させることにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するステップを含む。

【０３９７】

一部の実施形態では、ＣＤ１４＋単球は、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子で刺激される。

【０３９８】

一部の実施形態では、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子は、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＦＮ－γ、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０、ポリＩ：Ｃまたはこれらの組合せを含む。

【０３９９】

一部の実施形態では、ＣＤ１４＋単球は、ＰＢＭＣを含む第２の生体試料に由来する。

【０４００】

一部の実施形態では、第２の生体試料は、同じ対象に由来する。

【０４０１】

一部の実施形態では、生体試料は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む。

【０４０２】

一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、

インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ－１（ＩＤＯ）阻害剤、抗ＰＤ－１抗体、ＩＬ－１２またはこれらの組合せを含む培地において刺激される。

【０４０３】

一部の実施形態では、ＩＤＯ阻害剤は、エパカドスタット、ナボキシモド（ｎａｖｏｘｉｍｏｄ）、１－メチルトリプトファンまたはこれらの組合せである。

【０４０４】

一部の実施形態では、対象は、ＡＰＣおよび／またはＴ細胞を調製するための生体試料を得るステップに先立ち、ＦＬＴ３Ｌを投与される。

【０４０５】

一部の実施形態では、Ｔ細胞は、本開示の以前のセクションに記載されている対象由来の生体試料から得られる。

【０４０６】

一部の実施形態では、生体試料は、対象から新たに得られる、または凍結された試料である。

【０４０７】

一部の実施形態では、インキュベートするステップは、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＦＮ－γ、ＩＦＮ－α、ＩＬ－１５、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０、ポリＩ：Ｃまたはこれらのいずれかの組合せを含む少なくとも１種のサイトカインまたは増殖因子の存在下で為される。

【０４０８】

一部の実施形態では、方法は、ＩＬ－７、ＩＬ－１５またはこれらの組合せでＴ細胞を刺激するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ＩＤＯ阻害剤、ＰＤ－１抗体またはＩＬ－１２の存在下で、ＩＬ－７、ＩＬ－１５またはこれらの組合せでＴ細胞を刺激するステップを含む。一部の実施形態では、刺激されたＴ細胞は、１種もしくは複数の腫瘍抗原エピトープ配列、または１種もしくは複数の腫瘍抗原エピトープ配列をロードされたＡＰＣ、または１種もしくは複数の腫瘍抗原エピトープ配列をコードする核酸配列（ｍＲＮＡ配列等）をロードされた（例えば、これを発現する）ＡＰＣと、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、ＩＦＮ－γ、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０、ポリＩ：Ｃまたはこれらの組合せを含む１種または複数のサイトカインまたは増殖因子と、ＦＬＴ３Ｌの存在下、適したＴ細胞成長条件下、ｅｘ　ｖｉｖｏで増大化される。一部の実施形態では、本方法は、抗原特異的Ｔ細胞を対象に投与するステップをさらに含む。

【０４０９】

一部の実施形態では、本方法は、以前のセクションに記載されている通りに調製されたＡＰＣを、Ｔ細胞と共に、少なくとも１種のサイトカインまたは増殖因子を含む培地の存在下でインキュベートして、ネオ抗原活性化Ｔ細胞を生成するステップを含む。

【０４１０】

一部の実施形態では、インキュベートするステップは、ＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に（ｔｏ）、７日間を超えてインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、インキュベートされたＴ細胞は、ＡＰＣ調製物、サイトカインおよび増殖因子の存在下でｉｎ　ｖｉｔｒｏで７日間を超えて増大化する、刺激されたＴ細胞である。

【０４１１】

一部の実施形態では、インキュベートするステップは、ＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０日間を超えてインキュベートするステップを含む。

【０４１２】

一部の実施形態では、１種または複数の期間の第１の期間は、約１、２、３、４、５、６、７、８または９日間である。

【０４１３】
一部の実施形態では、別々の期間の総期間は、２８日間未満である。一部の実施形態では、別々の期間の総期間は、２０～２７日間である。一部の実施形態では、別々の期間の総期間は、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８または３９日間である。
【０４１４】
一部の実施形態では、方法は、ＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、７日間を超えてインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０日間を超えてインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、７～２０、８～２０、９～２０、１０～２０、１１～２０または１２～２０日間インキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、約１０～１５日間インキュベートするステップを含む。
【０４１５】
一部の実施形態では、方法は、ＡＰＣ調製物の第２のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、５～９日間インキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、方法は、ＡＰＣ調製物の第２のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、５、６、７、８または９日間インキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、第３の期間の後かつ第４の期間の開始前に、第２の培地の１種または複数のサイトカインまたは増殖因子を除去するステップをさらに含む。
【０４１６】
一部の実施形態では、方法は、ＡＰＣ調製物の第３のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、５～９日間インキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、ＡＰＣ調製物の第３のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、５、６、７、８または９日間インキュベートするステップを含む。
【０４１７】
一部の実施形態では、本方法は、ＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１または２２日間インキュベートするステップと、ＡＰＣ調製物の第２のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１または２２日間インキュベートするステップと、ＡＰＣ調製物の第３のＡＰＣ調製物をＴ細胞と共に、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１または２２日間インキュベートするステップとを含む。
【０４１８】
一部の実施形態では、本方法は、ｅｘ　ｖｉｖｏで行われる。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、サイトカインを含有する培地において培養される。一部の実施形態では、サイトカインの例は、ＩＬ－７を含む。一部の実施形態では、サイトカインの例は、ＩＬ－１５を含む。一部の実施形態では、サイトカインの例は、ＩＬ－７およびＩＬ－１５を含む。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＩＬ－７および／またはＩＬ－１５を含む培地において培養される。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養物または培地におけるサイトカインは、少なくとも０．０５ｎｇ／ｍＬ、０．１ｎｇ／ｍＬ、０．２ｎｇ／ｍＬ、０．３ｎｇ／ｍＬ、０．４ｎｇ／ｍＬ、０．５ｎｇ／ｍＬ、０．８ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、３ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、６ｎｇ／ｍＬ、７ｎｇ／ｍＬ、８ｎｇ／ｍＬ、９ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、１２ｎｇ／ｍＬ、１５ｎｇ／ｍＬ、１８ｎｇ／ｍＬまたは２０ｎｇ／ｍＬの最終濃度を有する。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養物または培地におけるＩＬ－７は、少なくとも０．０５ｎｇ／ｍＬ、０．１ｎｇ／ｍＬ、０．２ｎｇ／ｍＬ、０．３ｎｇ／ｍＬ、０．４ｎｇ／ｍＬ、０．５ｎｇ／ｍＬ、０．８ｎｇ／ｍ

Ｌ、１ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、３ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、６ｎｇ／ｍＬ、７ｎｇ／ｍＬ、８ｎｇ／ｍＬ、９ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、１２ｎｇ／ｍＬ、１５ｎｇ／ｍＬ、１８ｎｇ／ｍＬまたは２０ｎｇ／ｍＬの最終濃度を有する。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養物または培地におけるＩＬ－１５は、少なくとも０．０５ｎｇ／ｍＬ、０．１ｎｇ／ｍＬ、０．２ｎｇ／ｍＬ、０．３ｎｇ／ｍＬ、０．４ｎｇ／ｍＬ、０．５ｎｇ／ｍＬ、０．８ｎｇ／ｍＬ、１ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、３ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、６ｎｇ／ｍＬ、７ｎｇ／ｍＬ、８ｎｇ／ｍＬ、９ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、１２ｎｇ／ｍＬ、１５ｎｇ／ｍＬ、１８ｎｇ／ｍＬまたは２０ｎｇ／ｍＬの最終濃度を有する。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＦＬＴ３Ｌをさらに含有する培地において培養される。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養物または培地におけるＦＬＴ３Ｌは、少なくとも１ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ、３ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、６ｎｇ／ｍＬ、７ｎｇ／ｍＬ、８ｎｇ／ｍＬ、９ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、１２ｎｇ／ｍＬ、１５ｎｇ／ｍＬ、１８ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ、３０ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ、６０ｎｇ／ｍＬ、７０ｎｇ／ｍＬ、８０ｎｇ／ｍＬ、９０ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬまたは２００ｎｇ／ｍＬの最終濃度を有する。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＦＬＴ３Ｌを含有する培地において第１の期間（ｐｅｒｉｏｄ ｔｉｍｅ）にわたりインキュベート、誘導または刺激される。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、その上添加されたＦＬＴ３Ｌを含有する培地において第２の期間にわたりインキュベート、誘導または刺激される。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、追加的な添加されたＦＬＴ３Ｌを含有する培地において第３の期間にわたりインキュベート、誘導または刺激される。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、各期間において新たに添加されたＦＬＴ３Ｌを用いて、追加的な添加されたＦＬＴ３Ｌを含有する培地において第４の、第５のまたは第６の期間にわたりインキュベート、誘導または刺激される。

【０４１９】

一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ネオ抗原、例えば、ＡＰＣによって提示されたネオ抗原の存在下で培養され、培地は、高いカリウム［Ｋ］$^+$含量を含む。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＡＰＣまたはＴ細胞とのインキュベーションにおける少なくともある期間にわたり、培地において高い［Ｋ］$^+$含量の存在下で培養される。一部の実施形態では、培地における［Ｋ］$^+$含量は、ＡＰＣまたはＴ細胞とのインキュベーションにおける少なくともある期間にわたり変更される。一部の実施形態では、培地における含量は、Ｔ細胞ｅｘ ｖｉｖｏ培養の期間を通して一定に保たれる。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧５ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧６ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧７ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧８ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧９ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１０ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１１ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１２ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１３ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１４ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１５ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１６ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１７ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１８ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧１９ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧２０ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧２２ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧２５ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧３０ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］$^+$含量は、≧３５ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［

Ｋ］＋含量は、≧４０ｍＭである。一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］＋含量は、約４０ｍＭである。

【０４２０】

一部の実施形態では、Ｔ細胞培養培地における［Ｋ］＋含量は、ネオ抗原とＴ細胞とのインキュベーションにおける少なくともある期間にわたり約４０ｍＭである。一部の実施形態では、ネオ抗原は、ネオ抗原がロードされたＡＰＣによって提示され得る。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、［Ｋ］＋の存在下で、Ｔエフェクター機能、ＣＤ８＋細胞傷害、サイトカイン産生およびメモリー表現型について検査される。一部の実施形態では、高い［Ｋ］＋の存在下で育成されたＴ細胞は、エフェクターＴ細胞表現型を発現する。一部の実施形態では、高い［Ｋ］＋の存在下で育成されたＴ細胞は、メモリー細胞マーカーを発現する。一部の実施形態では、高い［Ｋ］＋の存在下で育成されたＴ細胞は、Ｔ細胞消耗マーカーを発現しない。

【０４２１】

一部の実施形態では、刺激されたＴ細胞は、ネオ抗原性ペプチド－ＭＨＣ複合体を含むＡＰＣにより刺激された活性化Ｔ細胞を含む免疫細胞の集団である。一部の実施形態では、方法は、生体試料由来の免疫細胞の集団を、ペプチド－ＭＨＣ複合体を含むＡＰＣと共にインキュベートし、これにより、刺激された免疫細胞試料を得るステップと、刺激された免疫細胞試料の少なくとも１種の免疫細胞の１種または複数の細胞マーカーの発現を決定するステップと、ペプチド－ＭＨＣ複合体への刺激された免疫細胞試料の少なくとも１種の免疫細胞の結合を決定するステップとを含むことができ、サイトカイン等、細胞内因子または放出された作用物質等、ある特定の細胞表面マーカーまたは他の決定因子マーカーの発現を決定するステップ、およびネオ抗原－ＭＨＣ複合体への結合を決定するステップは、同時に行われる。一部の実施形態では、１種または複数の細胞マーカーは、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、ＬＡＭＰ－１、４－１ＢＢ、ＩＬ－２、ＩＬ－１７Ａ、グランザイムＢ、ＰＤ－１、ＣＤ２５、ＣＤ６９、ＴＩＭ３、ＬＡＧ３、ＣＴＬＡ－４、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ４５ＲＡ、ＣＤ４５ＲＯ、ＦｏｘＰ３またはこれらのいずれかの組合せを含む。一部の実施形態では、１種または複数の細胞マーカーは、サイトカインを含む。一部の実施形態では、１種または複数の細胞マーカーは、脱顆粒マーカーを含む。一部の実施形態では、１種または複数の細胞マーカーは、細胞表面マーカーを含む。一部の実施形態では、１種または複数の細胞マーカーは、タンパク質を含む。一部の実施形態では、ペプチド－ＭＨＣ複合体への刺激された免疫細胞試料の少なくとも１種の免疫細胞の結合を決定するステップは、ペプチド－ＭＨＣ複合体のペプチドおよびＭＨＣを含むＭＨＣ四量体への刺激された免疫細胞試料の少なくとも１種の免疫細胞の結合を決定するステップを含む。一部の実施形態では、ＭＨＣは、クラスＩ　ＭＨＣまたはクラスＩＩ　ＭＨＣである。一部の実施形態では、ペプチド－ＭＨＣ複合体は、１種または複数の標識を含む。

【０４２２】

一部の実施形態では、Ｔ細胞の活性化は、活性化Ｔ細胞によるサイトカインの放出を検出することによって検証される。一部の実施形態では、サイトカインは、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γまたはＩＬ－２のうち１種または複数である。一部の実施形態では、Ｔ細胞の活性化は、その特異的抗原結合およびサイトカイン放出によって検証される。一部の実施形態では、Ｔ細胞の活性化は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで腫瘍細胞を死滅させるその能力によって検証される。活性化Ｔ細胞の試料を使用して、Ｔ細胞の活性化状態を検証することができる。一部の実施形態では、Ｔ細胞由来の試料をＴ細胞培養物から取り出して、フローサイトメトリーにより細胞組成および活性化状態を決定する。

【０４２３】

一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％ま

たは９５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約７％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約１０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約１２％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約１５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約２０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約２５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約３０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約４０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約５０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約６０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約７０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約８０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、約９０％である。

【０４２４】

一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総ＣＤ４＋Ｔ細胞、総ＣＤ８＋Ｔ細胞、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約７％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約１０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約１２％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約１５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約２０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約２５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約３０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約４０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約５０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、約６０％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総ＣＤ４＋Ｔ細胞、総ＣＤ８＋Ｔ細胞、総Ｔ細胞または総免疫細胞の約７０％である。

【０４２５】

一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総ＣＤ４＋Ｔ細胞、総ＣＤ８＋Ｔ細胞、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％である。

【０４２６】
一部の実施形態では、生体試料における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、総ＣＤ４＋Ｔ細胞、総ＣＤ８＋Ｔ細胞、総Ｔ細胞または総免疫細胞の多くても約０．００００１％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％または０．５％である。
【０４２７】
一部の実施形態では、生体試料における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総ＣＤ４＋Ｔ細胞、総ＣＤ８＋Ｔ細胞、総Ｔ細胞または総免疫細胞の多くても約０．００００１％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％または０．５％である。
【０４２８】
一部の実施形態では、生体試料における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総ＣＤ４＋Ｔ細胞、総ＣＤ８＋Ｔ細胞、総Ｔ細胞または総免疫細胞の多くても約０．００００１％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％または０．５％である。
【０４２９】
一部の実施形態では、抗原は、ネオ抗原、腫瘍関連抗原、過剰発現された抗原、ウイルス抗原、マイナー組織適合抗原またはこれらの組合せである。
【０４３０】
一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の数は、少なくとも約１×１０＾６、２×１０＾６、５×１０＾６、１×１０＾７、２×１０＾７、５×１０＾７、１×１０＾８、２×１０＾８または５×１０＾８個の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞である。
【０４３１】
一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞の数は、少なくとも約１×１０＾６、２×１０＾６、５×１０＾６、１×１０＾７、２×１０＾７、５×１０＾７、１×１０＾８、２×１０＾８または５×１０＾８個の抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞である。
【０４３２】
医薬組成物
免疫細胞の集団を含む組成物（例えば、医薬組成物）が本明細書に提供される。組成物は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を含むことができる。組成物は、少なくとも１種の抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を含むことができる。
【０４３３】
医薬組成物は、医薬品として使用され得る調製物へと活性薬剤を加工することを容易にする賦形剤および補助剤（ａｕｘｉｌｉａｒｙ）を含む１種または複数の生理的に許容される担体を使用して製剤化することができる。適切な製剤は、選ばれた投与経路に依存し得る。周知技法、担体および賦形剤のいずれかを、適したように、また、当技術分野で理解される通りに使用することができる。
【０４３４】
一部の場合では、医薬組成物は、細胞に基づく治療薬、例えば、Ｔ細胞療法薬として製剤化される。一部の実施形態では、医薬組成物は、ペプチドに基づく治療法、核酸に基づく治療法、抗体に基づく治療法および／または細胞に基づく治療法を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、ペプチドに基づく治療薬、またはポリペプチドをコードする核酸に基づく治療薬を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、ペプチドに基づく治療薬、またはポリペプチドをコードする核酸に基づく治療薬を含み、ペプチドに基づく治療薬または核酸に基づく治療薬は、細胞に含まれ、細胞は、Ｔ細胞である。一部の実施形態では、医薬組成物は、抗体に基づく治療薬を含む。組成物は、２種またはそれよりも多い免疫原性抗原またはネオ抗原ペプチドに特異的なＴ細胞を含むことができる。

【０４３５】
一態様では、（ａ）生体試料由来のＴ細胞を含む免疫細胞の集団であって、Ｔ細胞が、ＡＰＣに刺激されたＴ細胞であり、少なくとも１種の抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を含み、ＡＰＣが、ＦＬＴ３Ｌに刺激されたＡＰＣである、免疫細胞の集団と、（ｂ）薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が本明細書に提供される。
【０４３６】
一態様では、（ａ）少なくとも１種の抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞を含む生体試料由来の免疫細胞の集団と、（ｂ）薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物であって、集団におけるＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する免疫細胞の量が、生体試料におけるＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する免疫細胞の量とは相対的に異なる、医薬組成物が本明細書に提供される。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、少なくとも１個のＡＰＣに刺激されたＴ細胞を含む。一部の実施形態では、集団におけるＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する免疫細胞の量は、生体試料におけるＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する免疫細胞の量よりも相対的に少ない。一部の実施形態では、集団におけるＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する免疫細胞の量は、生体試料におけるＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する免疫細胞の量よりも相対的に多い。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、少なくとも１種のＣＤ４＋Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、少なくとも１種のＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、少なくとも１種のＣＤ４濃縮Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、少なくとも１種のＣＤ８濃縮Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、メモリーＴ細胞を含む。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、メモリーＣＤ４＋Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞は、メモリーＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％である。一部の実施形態では、組成物における少なくとも１種の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総ＣＤ４＋Ｔ細胞、総ＣＤ８＋Ｔ細胞、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％である。
【０４３７】
医薬組成物は、活性成分に加えて、当業者にとって周知の薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝液、安定剤または他の材料を含むことができる。斯かる材料は、無毒性となるべきであり、活性成分の有効性に干渉するべきではない。担体または他の材料の的確な性質は、投与経路に依存するであろう。
【０４３８】
許容される担体、賦形剤または安定剤は、用いられる投薬量および濃度でレシピエントにとって無毒性なものであり、リン酸、クエン酸および他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存料（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム塩化物；ヘキサメトニウム塩化物；ベンザルコニウム塩化物、ベンゼトニウム塩化物；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ－クレゾール等）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブ

ミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む単糖、二糖および他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；ならびに／またはＴＷＥＥＮ（登録商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標）もしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性物質を含む。

【０４３９】

許容される担体は、投与される患者にとって生理的に許容され、それと一緒に投与される／その中に入れて投与される化合物の治療特性を保持する。許容される担体およびその製剤は一般に、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ （１８th ｅｄ． Ａ． Ｇｅｎｎａｒｏ， Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．， Ｅａｓｔｏｎ， ＰＡ １９９０）に記載されている。担体の一例は、生理食塩水である。薬学的に許容される担体は、ある１つの臓器もしくは身体部分の投与部位から別の臓器もしくは身体部分への対象化合物の搬送もしくは輸送に関与する、またはｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイ系に関与する、液体または固体のフィラー、希釈剤、賦形剤、溶媒または封入材料等、薬学的に許容される材料、組成物または媒体である。許容される担体は、製剤の他の成分と適合性であり、それが投与される対象にとって有害ではない。そして、許容される担体は、ネオ抗原の特異的活性を変更するべきではない。

【０４４０】

一態様では、医薬品投与と適合性である、溶媒（水性または非水性）、溶液、エマルション、分散媒、コーティング、等張性および吸収促進または遅延剤を含む薬学的に許容されるまたは生理的に許容される組成物が本明細書に提供される。したがって、医薬組成物または医薬製剤は、対象における医薬品使用に適した組成物を指す。組成物は、特定の投与経路（すなわち、全身性または局所性）と適合性となるように製剤化することができる。よって、組成物は、様々な経路による投与に適した担体、希釈剤または賦形剤を含む。

【０４４１】

一部の実施形態では、組成物は、組成物における免疫細胞の安定性を改善するために、許容される添加物をさらに含むことができる。許容される添加物は、免疫細胞の特異的活性を変更させなくてよい。許容される添加物の例は、マンニトール、ソルビトール、グルコース、キシリトール、トレハロース、ソルボース、スクロース、ガラクトース、デキストラン、デキストロース、フルクトース、ラクトースおよびこれらの混合物等の糖を含むがこれらに限定されない。許容される添加物は、デキストロース等、許容される担体および／または賦形剤と組み合わせることができる。あるいは、許容される添加物の例は、ペプチドの安定性を増加させ、溶液のゲル化を減少させるために、ポリソルベート２０またはポリソルベート８０等の界面活性物質を含むがこれらに限定されない。界面活性物質は、溶液の０．０１％～５％の量で、組成物に添加することができる。斯かる許容される添加物の添加は、貯蔵中の組成物の安定性および半減期を増加させる。

【０４４２】

医薬組成物は、例えば、注射によって投与することができる。注射のための組成物は、水溶液（水溶性の場合）または分散物、および滅菌注射用溶液または分散物の即時調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与のため、適した担体は、生理食塩水、静菌水またはリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を含む。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールその他）およびこれらの適した混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。流動性は、例えば、レシチン等のコーティングの使用によって、分散物の場合は要求される粒径の維持によって、および界面活性物質の使用によって維持することができる。抗細菌および抗真菌剤は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸およびチメロサールを含む。等張性剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトール等の多価アルコール、お

よび塩化ナトリウムが、組成物に含まれてよい。結果として生じる溶液は、現状のままでの使用のために包装されても、凍結乾燥されてもよい；凍結乾燥された調製物は後に、投与に先立ち滅菌溶液と組み合わせることができる。静脈内注射または罹患部位における注射のため、活性成分は、発熱物質不含であり、適したｐＨ、等張性および安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形態となるであろう。当業者であれば容易に、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸リンゲル注射液等の等張性媒体を使用して、適した溶液を調製することができる。保存料、安定剤、緩衝液、抗酸化剤および／または他の添加物が必要に応じて含まれてよい。滅菌注射用溶液は、要求に応じて、上に列挙されている成分のうち１種または組合せと共に、適切な溶媒に要求される量で活性成分を取り込み、続いて濾過滅菌することにより調製することができる。一般に、分散物は、基礎分散媒および上に列挙されている成分に由来する要求される他の成分を含有する滅菌媒体に活性成分を取り込むことにより調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好まれる調製方法は、以前に滅菌濾過されたその溶液から活性成分プラスいずれか追加的な所望の成分の粉末を生じる真空乾燥およびフリーズドライであり得る。

【０４４３】

組成物は従来、例えば、単位用量の注射による等、静脈内投与することができる。注射のため、活性成分は、実質的に発熱物質不含であり、適したｐＨ、等張性および安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形態であり得る。例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸リンゲル注射液等の等張性媒体を使用して、適した溶液を調製することができる。保存料、安定剤、緩衝液、抗酸化剤および／または他の添加物が、要求に応じて含まれてよい。その上、組成物は、エアロゾル化により投与することができる。

【０４４４】

組成物が、医薬または本明細書に提供される方法のいずれかにおける使用に考慮される場合、組成物が、ヒト患者に投与されたときに炎症反応または危険なアレルギー反応を引き起こさないように、組成物は、発熱物質を実質的に含まなくてよいと企図される。発熱物質についての組成物の検査と、発熱物質を実質的に含まない組成物の調製は、当業者（ｏｎｅ ｏｒ ｏｒｄｉｎａｒｙ ｓｋｉｌｌ ｏｆ ｔｈｅ ａｒｔ）に十分に理解され、市販のキットを使用して達成することができる。

【０４４５】

許容される担体は、安定化剤として作用する、吸収を増加もしくは遅延させる、またはクリアランスを増加もしくは遅延させる化合物を含有することができる。斯かる化合物は、例えば、グルコース、スクロースまたはデキストラン等の炭水化物；低分子量タンパク質；ペプチドのクリアランスまたは加水分解を低下させる組成物；あるいは賦形剤または他の安定剤および／もしくは緩衝液を含む。吸収を遅延させる薬剤は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含む。リポソーム担体を含む、洗剤を使用して、医薬組成物の吸収を安定化する、または増加もしくは減少させることもできる。消化から保護するために、化合物を組成物と複合体形成させて、これを、酸性および酵素による加水分解に対して抵抗性にすることができる、またはリポソーム等の適切に抵抗性の担体中で化合物を複合体形成させることができる。消化から化合物を保護する手段は、当技術分野で公知である（例えば、Ｆｉｘ （１９９６） Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ． １３：１７６０ １７６４；Ｓａｍａｎｅｎ （１９９６） Ｊ． Ｐｈａｒｍ． Ｐｈａｒｍａｃｏｌ． ４８：１１９ １３５；および米国特許第５，３９１，３７７号）。

【０４４６】

組成物は、投薬製剤と適合性の様式で、治療有効量で投与することができる。投与されるべき含量は、処置されるべき対象、活性成分を利用する対象の免疫系の能力、および所望される結合能の程度に依存する。投与されることが要求される活性成分の的確な量は、医者の判断に依存し、各個体に特有のものである。初期投与およびブースターショットに適したレジメン（ｒｅｇｉｍｅ）も可変的であるが、初期投与に続いた、その後の注射または他の投与による１または複数の時間間隔での反復用量に代表される。あるいは、血液中の濃度の維持に十分な継続的静脈内注入が企図される。

【０４４７】
一部の実施形態では、本発明は、ネオ抗原特異的応答（例えば、液性または細胞媒介性免疫応答）を生じることができる、免疫原性組成物、例えば、医薬組成物を対象にする。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、腫瘍特異的抗原またはネオ抗原に対応する、本明細書に記載されているネオ抗原治療薬（例えば、ペプチド、ポリヌクレオチド、ＴＣＲ、ＣＡＲ、ＴＣＲまたはＣＡＲを含有する細胞、ポリペプチドを含有する樹状細胞、ポリヌクレオチドを含有する樹状細胞、抗体等）を含む。
【０４４８】
一部の実施形態では、本明細書に記載されている医薬組成物は、特異的細胞傷害性Ｔ細胞応答、特異的ヘルパーＴ細胞応答またはＢ細胞応答を生じることができる。
【０４４９】
一部の実施形態では、抗原ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、斯かるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含有する抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）として提供することができる。他の実施形態では、斯かる抗原提示細胞は、患者における使用のために、Ｔ細胞の刺激に使用される。一部の実施形態では、抗原提示細胞は、樹状細胞である。関連する実施形態では、樹状細胞は、ネオ抗原ペプチドまたは核酸をパルスされた自家樹状細胞である。ネオ抗原ペプチドは、適切なＴ細胞応答を生じるいずれか適したペプチドであり得る。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＴＬである。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＨＴＬである。よって、本開示の一実施形態は、本明細書に記載されている１種または複数のネオ抗原ポリペプチドまたはポリヌクレオチドをパルスまたはロードされた少なくとも１個の抗原提示細胞（例えば、樹状細胞）を含有する免疫原性組成物である。一部の実施形態では、斯かるＡＰＣは、自家（例えば、自家樹状細胞）である。あるいは、患者から単離された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、ｅｘ　ｖｉｖｏでネオ抗原ペプチドまたはポリヌクレオチドをロードされてよい。関連する実施形態では、斯かるＡＰＣまたはＰＢＭＣは、患者に注射して戻される。ポリヌクレオチドは、樹状細胞に形質導入し、よって、ネオ抗原ペプチドの提示および免疫の誘導をもたらすことができる、いずれか適したポリヌクレオチドであり得る。一部の実施形態では、斯かる抗原提示細胞（ＡＰＣ）（例えば、樹状細胞）または末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、Ｔ細胞（例えば、自家Ｔ細胞）の刺激に使用される。関連する実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＴＬである。他の関連する実施形態では、Ｔ細胞は、ＨＴＬである。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞である。一部の実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞である。斯かるＴ細胞は次いで、患者に注射される。
【０４５０】
一部の実施形態では、ＣＴＬは、患者に注射される。一部の実施形態では、ＨＴＬは、患者に注射される。一部の実施形態では、ＣＴＬおよびＨＴＬの両方が、患者に注射される。いずれかの治療薬投与は、同時にまたは逐次にいずれかの順序で行うことができる。
【０４５１】
一部の実施形態では、治療上の処置のための本明細書に記載されている医薬組成物（例えば、免疫原性組成物）は、非経口的、外用、経鼻、経口または局所性投与のために製剤化することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載されている医薬組成物は、非経口的に、例えば、静脈内、皮下、皮内または筋肉内に投与される。一部の実施形態では、組成物は、腫瘍内に投与することができる。組成物は、外科的切除の部位に投与して、腫瘍に対する局所性免疫応答を誘導することができる。一部の実施形態では、ネオ抗原ペプチドの溶液を含む、非経口的投与のための組成物が本明細書に記載されており、免疫原性組成物は、許容される担体、例えば、水性担体に溶解または懸濁される。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水、０．９％生理食塩水、０．３％グリシン、ヒアルロン酸その他を使用することができる。これらの組成物は、従来の周知滅菌技法によって滅菌することができる、または滅菌濾過することができる。結果として生じる水溶液は、現状のままでの使用のために包装することができる、または凍結乾燥することができ、凍結乾燥された調製物は、投与に先立ち滅菌溶液と組み合わされる。組成物は、ｐＨ調整および緩衝化剤

、張度調整剤、湿潤剤その他、例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート等、生理的条件に近似させるために要求に応じて薬学的に許容される補助物質を含有することができる。

【０４５２】

抗原に対する免疫応答を増加させるアジュバントの能力は典型的に、免疫媒介性反応の有意な増加または疾患症状の低下によって顕在化される。例えば、液性免疫の増加は、抗原に対して生じた抗体の力価の有意な増加によって顕在化され得、Ｔ細胞活性の増加は、増加した細胞増殖または細胞性細胞傷害またはサイトカイン分泌において顕在化され得る。アジュバントは、例えば、主に液性またはＴヘルパー２応答を主に細胞性またはＴヘルパー１応答へと変化させることにより、免疫応答を変更することもできる。

【０４５３】

適したアジュバントは、当技術分野で公知であり（ＷＯ２０１５／０９５８１１を参照）、ポリ（Ｉ：Ｃ）、ポリ－ＩＣＬＣ、ＳＴＩＮＧアゴニスト、１０１８　ＩＳＳ、アルミニウム塩、アンプリバックス（Ａｍｐｌｉｖａｘ）、ＡＳ１５、ＢＣＧ、ＣＰ－８７０，８９３、ＣｐＧ７９０９、ＣｙａＡ、ｄＳＬＩＭ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＣ３０、ＩＣ３１、イミキモド、ＩｍｕＦａｃｔ　ＩＭＰ３２１、ＩＳ　Ｐａｔｃｈ、ＩＳＳ、ＩＳＣＯＭＡＴＲＩＸ、ＪｕｖＩｍｍｕｎｅ、ＬｉｐｏＶａｃ、ＭＦ５９、モノホスホリルリピドＡ、モンタニド（Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ）ＩＭＳ　１３１２、モンタニドＩＳＡ　２０６、モンタニドＩＳＡ　５０Ｖ、モンタニドＩＳＡ－５１、ＯＫ－４３２、ＯＭ－１７４、ＯＭ－１９７－ＭＰ－ＥＣ、ＯＮＴＡＫ、ＰｅｐＴｅｌ（登録商標）ベクター系、ＰＬＧマイクロ粒子、レシキモド、ＳＲＬ１７２、ビロソームおよび他のウイルス様粒子、ＹＦ－１７Ｄ、ＶＥＧＦトラップ、Ｒ８４８、β－グルカン、Ｐａｍ３Ｃｙｓ、Ｐａｍ３ＣＳＫ４、サポニン、マイコバクテリア抽出物および合成細菌細胞壁ミミックに由来するＡｑｕｉｌａのＱＳ２１スティミュロン（ｓｔｉｍｕｌｏｎ）（Ａｑｕｉｌａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ、Ｍａｓｓ．、ＵＳＡ）、ならびにＲｉｂｉのＤｅｔｏｘ．ＱｕｉｌまたはＳｕｐｅｒｆｏｓ等の他の所有権で守られたアジュバントを含むがこれらに限定されない。樹状細胞およびその調製物に特異的ないくつかの免疫学的アジュバント（例えば、ＭＦ５９）について記載されている（Ｄｕｐｕｉｓ　Ｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１９９８；　１８６（１）：１８－２７；Ａｌｌｉｓｏｎ　Ａ　Ｃ；Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ　Ｓｔａｎｄ．　１９９８；　９２：３－１１）（Ｍｏｓｃａ　ｅｔ　ａｌ．　Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，　２００７；　１２：４０５０－４０６０）（Ｇａｍｖｒｅｌｌｉｓ　ｅｔ　ａｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ　＆　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．　２００４；　８２：　５０６－５１６）。また、サイトカインを使用することができる。いくつかのサイトカインは、リンパ系組織への樹状細胞遊走の影響（例えば、ＴＮＦ－α）、Ｔ－リンパ球のための効率的抗原提示細胞への樹状細胞の成熟化の加速（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ、ＰＧＥ１、ＰＧＥ２、ＩＬ－１、ＩＬ－１β、ＩＬ－４、ＩＬ－６およびＣＤ４０Ｌ）（その全体を参照により本明細書に組み込む米国特許第５，８４９，５８９号）およびイムノアジュバントとしての作用（例えば、ＩＬ－１２）（Ｇａｂｒｉｌｏｖｉｃｈ　Ｄ　Ｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ　Ｅｍｐｈａｓｉｓ　Ｔｕｍｏｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　１９９６　（６）：４１４－４１８）に直接関係付けられてきた。

【０４５４】

ＣｐＧ免疫刺激オリゴヌクレオチドも、治療状況においてアジュバントの効果を増強することが報告された。理論に制約されないが、ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）、主としてＴＬＲ９経由で自然（非適応）免疫系を活性化することにより作用する。ＣｐＧ誘発のＴＬＲ９活性化は、予防的および治療的免疫原性医薬組成物の両方における、ペプチドまたはタンパク質抗原、生きているまたは死滅したウイルス、樹状細胞免疫原性医薬組成物、自家細胞性免疫原性医薬組成物および多糖コンジュゲートを含む多種多様な抗原に対する抗原特異的液性および細胞性応答を増強する。重要なことに

、これは、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の助けがなくても、樹状細胞成熟化および分化を増強し、ＴＨ１細胞の増強された活性化および強い細胞傷害性Ｔ－リンパ球（ＣＴＬ）生成をもたらす。ＴＬＲ９刺激によって誘導されたＴＨ１バイアスは、通常であればＴＨ２バイアスを促進する、アラムまたはフロイント不完全アジュバント（ＩＦＡ）等のアジュバントの存在下であっても維持される。ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、他のアジュバントと共に、または抗原が相対的に弱い場合の強い応答の誘導に特に有用であるマイクロ粒子、ナノ粒子、脂質エマルションもしくは同様の製剤等の製剤において製剤化または同時投与されたときに、さらにより大きいアジュバント活性を示す。これは、免疫応答を加速することもでき、いくつかの実験において、ＣｐＧなしの全用量免疫原性医薬組成物に匹敵する抗体応答で、抗原用量を低下させることを可能にした（Ａｒｔｈｕｒ Ｍ．Ｋｒｉｅｇ，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ，Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ，５，Ｊｕｎｅ ２００６，４７１－４８４）。米国特許第６，４０６，７０５号は、抗原特異的免疫応答を誘導するための、ＣｐＧオリゴヌクレオチド、非核酸アジュバントおよび抗原の組み合わせた使用について記載する。市販のＣｐＧ ＴＬＲ９アンタゴニストは、本明細書に記載されている医薬組成物の成分である、Ｍｏｌｏｇｅｎ（Ｂｅｒｌｉｎ、ＤＥ）によるｄＳＬＩＭ（ダブルステムループイムノモジュレーター）である。ＴＬＲ７、ＴＬＲ８および／またはＴＬＲ９に結合するＲＮＡ等の他のＴＬＲ結合分子を使用することもできる。

【０４５５】

有用なアジュバントの他の例は、治療的におよび／またはアジュバントとして作用することができる、化学的に改変されたＣｐＧ（例えば、ＣｐＲ、Ｉｄｅｒａ）、ポリ（Ｉおよび／またはポリＣ）（例えば、ポリＩ：ＣＩ２Ｕ）、非ＣｐＧ細菌ＤＮＡまたはＲＮＡ、ＴＬＲ８のためのｓｓＲＮＡ４０、ならびにシクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、セレブレックス（ｃｅｌｅｂｒｅｘ）、ＮＣＸ－４０１６、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフィニブ（ｓｏｒａｆｉｎｉｂ）、ＸＬ－９９９、ＣＰ－５４７６３２、パゾパニブ、ＺＤ２１７１、ＡＺＤ２１７１、イピリムマブ、トレメリムマブおよびＳＣ５８１７５等の免疫活性小分子および抗体を含むがこれらに限定されない。本発明の文脈において有用なアジュバントおよび添加物の量および濃度は、当業者であれば、過度の実験法を用いずに容易に決定することができる。追加的なアジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ、サルグラモスチム）等のコロニー刺激因子を含む。

【０４５６】

一部の実施形態では、本開示に係る免疫原性組成物は、２種以上の異なるアジュバントを含むことができる。さらに、本発明は、上述またはそれらの組合せのいずれかを含むいずれかのアジュバント物質を含む医薬組成物を包含する。一部の実施形態では、免疫原性組成物は、ネオ抗原治療薬（例えば、ペプチド、ポリヌクレオチド、ＴＣＲ、ＣＡＲ、ＴＣＲまたはＣＡＲを含有する細胞、ポリペプチドを含有する樹状細胞、ポリヌクレオチドを含有する樹状細胞、抗体等）を含み、アジュバントは、別々にいずれか適切な順番で投与することができる。

【０４５７】

脂質化は、Ｎ－ミリストイル化、パルミトイル化、ＧＰＩ－アンカー付加、プレニル化、およびいくつかの追加的な型の改変等、いくつかの異なる型へと分類することができる。Ｎ－ミリストイル化は、Ｃ１４飽和酸であるミリスチン酸の、グリシン残基への共有結合による取付けである。パルミトイル化は、長鎖脂肪酸（Ｃ１６）の、システイン残基へのチオエステル連結である。ＧＰＩ－アンカー付加は、アミド結合によるグリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）連結である。プレニル化は、イソプレノイド脂質（例えば、ファルネシル（Ｃ－１５）、ゲラニルゲラニル（Ｃ－２０））の、システイン残基へのチオエーテル連結である。追加的な型の改変は、システインの硫黄原子によるＳ－ジアシルグリセロールの取付け、セリンまたはスレオニン残基を介したＯ－オクタノイルコンジュゲーション、システイン残基へのＳ－アーキオール（ａｒｃｈａｅｏｌ）コンジュゲーション、およびコレステロール取付けを含むことができる。

【０４５８】
脂質化ペプチドを生成するための脂肪酸は、Ｃ２～Ｃ３０飽和、一不飽和または多価不飽和脂肪酸アシル基を含むことができる。例示的な脂肪酸は、パルミトイル、ミリストイル、ステアロイルおよびデカノイル基を含むことができる。一部の例では、アジュバント特性を有する脂質部分を、目的のポリペプチドに取り付けて、外因性アジュバントの非存在下で免疫原性を誘発または増強する。脂質化ペプチドまたはリポペプチドは、自己アジュバントリポペプチドと称され得る。本明細書の上述および他の箇所に記載されている脂肪酸のいずれかは、目的のポリペプチドの免疫原性を誘発または増強することができる。免疫原性を誘発または増強することができる脂肪酸は、パルミトイル、ミリストイル、ステアロイル、ラウロイル、オクタノイルおよびデカノイル基を含むことができる。

【０４５９】
ネイキッドペプチドまたは脂質化ペプチド等のポリペプチドを、リポソームに取り込むことができる。場合により、脂質化ペプチドを、リポソームに取り込むことができる。例えば、脂質化ペプチドの脂質部分は、リポソームの脂質二重層に自発的に統合することができる。よって、リポペプチドは、リポソームの「表面」に提示され得る。製剤への取込みに適した例示的なリポソームは、多重層小胞（ＭＬＶ）、少数層（ｏｌｉｇｏｌａｍｅｌｌａｒ）小胞（ＯＬＶ）、単層小胞（ＵＶ）、小型単層小胞（ＳＵＶ）、中間サイズの単層小胞（ＭＵＶ）、大型単層小胞（ＬＵＶ）、巨大単層小胞（ＧＵＶ）、多胞性小胞（ＭＶＶ）、逆相蒸発方法によって作製された単一または少数層小胞（ＲＥＶ）、逆相蒸発方法によって作製された多重層小胞（ＭＬＶ－ＲＥＶ）、安定した複数層（ｐｌｕｒｉｌａｍｅｌｌａｒ）小胞（ＳＰＬＶ）、凍結融解されたＭＬＶ（ＦＡＴＭＬＶ）、押出方法によって調製された小胞（ＶＥＴ）、フレンチプレスによって調製された小胞（ＦＰＶ）、融合によって調製された小胞（ＦＵＶ）、脱水－再水分補給小胞（ＤＲＶ）、およびバブルソーム（ｂｕｂｂｌｅｓｏｍｅ）（ＢＳＶ）を含み、これらに限定されない。

【０４６０】
調製方法に依存して、リポソームは、単層または多重層であり得、サイズは、変動することができ、直径は、約０．０２μＭ～約１０μｍ超に及ぶ。リポソームは、多くの型の細胞に吸着し、取り込まれた薬剤（例えば、本明細書に記載されているペプチド）を放出することができる。一部の場合では、リポソームは、標的細胞と融合し、それによって次に、リポソームの内容物が、標的細胞内に出される。リポソームは、食作用を有する細胞によってエンドサイトーシスされ得る。エンドサイトーシスに続いて、リポソーム脂質のリソソーム内分解および封入された薬剤の放出が為され得る。

【０４６１】
本明細書に提供されるリポソームは、担体脂質を含むことができる。一部の実施形態では、担体脂質は、リン脂質である。リポソームを形成することができる担体脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ホスファチジルコリン（ＰＣ；レシチン）、ホスファチジン酸（ＰＡ）、ホスファチジルグリセロール（ＰＧ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、ホスファチジルセリン（ＰＳ）を含むがこれらに限定されない。他の適したリン脂質は、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジミリストイルホスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジル（ｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙ）グリセロール（ＤＰＰＧ）、ジステアロイルホスファチジルグリセロール（ＤＳＰＧ）、ジミリストイルホスファチジルグリセロール（ＤＭＰＧ）、ジパルミトイルホスファチジン酸（ＤＰＰＡ）；ジミリストイルホスファチジン酸（ＤＭＰＡ）、ジステアロイルホスファチジン酸（ＤＳＰＡ）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（ＤＰＰＳ）、ジミリストイルホスファチジルセリン（ＤＭＰＳ）、ジステアロイルホスファチジルセリン（ＤＳＰＳ）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）その他またはこれらの組合せをさらに含む。一部の実施形態では、リポソームは、リポソーム形成をモジュレートするステロール（例えば、コレステロール）をさらに含む。担体脂質は、いずれか公知の非リン酸極性脂質であ

り得る。

【０４６２】

医薬組成物は、周知技術を使用して、リポソーム内に封入することができる。生分解性マイクロスフェアを本発明の医薬組成物の担体として用いることもできる。

【０４６３】

医薬組成物は、リポソームまたはマイクロスフェア（またはマイクロ粒子）において投与することができる。患者への投与のためのリポソームおよびマイクロスフェアを調製するための方法は、当業者にとって周知である。基本的に、材料を水溶液に溶解し、適切なリン脂質および脂質を、要求される場合は界面活性物質と共に添加し、必要に応じて材料を透析または超音波処理する。

【０４６４】

ポリマーまたはタンパク質から形成されたマイクロスフェアは、当業者にとって周知であり、胃腸管を通過して直接血流中に入れるために調節することができる。あるいは、化合物を取り込み、マイクロスフェアまたはマイクロスフェアの複合物を、数日間～数ヶ月間に及ぶ期間にわたる緩徐な放出のために植え込むことができる。

【０４６５】

細胞に基づく免疫原性医薬組成物を対象に投与することもできる。例えば、抗原提示細胞（ＡＰＣ）に基づく免疫原性医薬組成物は、適宜および当技術分野で理解される通り、周知技法、担体および賦形剤のいずれかを使用して製剤化することができる。ＡＰＣは、単球、単球由来細胞、マクロファージおよび樹状細胞を含む。場合により、ＡＰＣに基づく免疫原性医薬組成物は、樹状細胞に基づく免疫原性医薬組成物であり得る。

【０４６６】

樹状細胞に基づく免疫原性医薬組成物は、当技術分野で周知のいずれかの方法によって調製することができる。一部の場合では、樹状細胞に基づく免疫原性医薬組成物は、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ方法により調製することができる。ｅｘ　ｖｉｖｏ方法は、患者への投与に先立ちＤＣを活性化またはロードするために、本明細書に記載されているポリペプチドをｅｘ　ｖｉｖｏでパルスされた自家ＤＣの使用を含むことができる。ｉｎ　ｖｉｖｏ方法は、本明細書に記載されているポリペプチドとカップリングされた抗体を使用して、特異的ＤＣ受容体を標的化するステップを含むことができる。ＤＣに基づく免疫原性医薬組成物は、ＴＬＲ３、ＴＬＲ－７－８およびＣＤ４０アゴニスト等、ＤＣ活性化因子をさらに含むことができる。ＤＣに基づく免疫原性医薬組成物は、アジュバントおよび薬学的に許容される担体をさらに含むことができる。

【０４６７】

アジュバントを使用して、免疫原性医薬組成物を受けている患者において誘発された免疫応答（液性および／または細胞性）を増強することができる。場合により、アジュバントは、Ｔｈ１型応答を誘発することができる。他の場合、アジュバントは、Ｔｈ２型応答を誘発することができる。ＩＬ－４、ＩＬ－５およびＩＬ－１０等のサイトカインの産生によって特徴付けることができるＴｈ２型応答とは対照的に、Ｔｈ１型応答は、ＩＦＮ－γ等のサイトカインの産生によって特徴付けることができる。

【０４６８】

一部の態様では、ＭＰＬＡおよびＭＤＰ等の脂質に基づくアジュバントは、本明細書に開示されている免疫原性医薬組成物と共に使用することができる。モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬＡ）は、例えば、特異的Ｔリンパ球へのリポソーム抗原の提示増加を引き起こすアジュバントである。加えて、ムラミルジペプチド（ＭＤＰ）を、本明細書に記載されている免疫原性医薬製剤と併せて、適したアジュバントとして使用することもできる。

【０４６９】

アジュバントは、サイトカイン等の刺激分子を含むこともできる。サイトカインの非限定的な例は、ＣＣＬ２０、α－インターフェロン（ＩＦＮα）、β－インターフェロン（ＩＦＮβ）、γ－インターフェロン（ＩＦＮγ）、血小板由来増殖因子（ＰＤＧＦ）、ＴＮＦα、ＧＭ－ＣＳＦ、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、皮膚Ｔ細胞誘引性ケモカイン（ＣＴＡ

ＣＫ）、上皮胸腺発現ケモカイン（ＴＥＣＫ）、粘膜関連上皮ケモカイン（ＭＥＣ）、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－２８、ＭＨＣ、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＬ－１８、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－ｌａ、ＭＩＰ－１－、ＩＬ－８、Ｌ－セレクチン、Ｐ－セレクチン、Ｅ－セレクチン、ＣＤ３４、ＧｌｙＣＡＭ－１、ＭａｄＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１、ＶＬＡ－１、Ｍａｃ－１、ｐｌ５０．９５、ＰＥＣＡＭ、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－２、ＩＣＡＭ－３、ＣＤ２、ＬＦＡ－３、Ｍ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、突然変異体形態のＩＬ－１８、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、血管増殖因子、線維芽細胞増殖因子、ＩＬ－７、神経増殖因子、血管内皮増殖因子、Ｆａｓ、ＴＮＦ受容体、Ｆｉｔ、Ａｐｏ－１、ｐ５５、ＷＳＬ－１、ＤＲ３、ＴＲＡＭＰ、Ａｐｏ－３、ＡＩＲ、ＬＡＲＤ、ＮＧＲＦ、ＤＲ４、ＤＲＳ、ＫＩＬＬＥＲ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＩＣＫ２、ＤＲ６、カスパーゼＩＣＥ、Ｆｏｓ、ｃ－ｊｕｎ、Ｓｐ－１、Ａｐ－１、Ａｐ－２、ｐ３８、ｐ６５Ｒｅｌ、ＭｙＤ８８、ＩＲＡＫ、ＴＲＡＦ６、ＩκＢ、不活性ＮＩＫ、ＳＡＰ　Ｋ、ＳＡＰ－Ｉ、ＪＮＫ、インターフェロン応答遺伝子、ＮＦκＢ、Ｂａｘ、ＴＲＡＩＬ、ＴＲＡＩＬｒｅｃ、ＴＲＡＩＬｒｅｃＤＲＣ５、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４、ＲＡＮＫ、ＲＡＮＫリガンド、Ｏｘ４０、Ｏｘ４０リガンド、ＮＫＧ２Ｄ、ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｆ、ＴＡＰＩおよびＴＡＰ２を含む。

【０４７０】

追加的なアジュバントは、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－ｌａ、ＭＩＰ－ｌｐ、ＩＬ－８、ＲＡＮＴＥＳ、Ｌ－セレクチン、Ｐ－セレクチン、Ｅ－セレクチン、ＣＤ３４、ＧｌｙＣＡＭ－１、ＭａｄＣＡＭ－１、ＬＦＡ－１、ＶＬＡ－１、Ｍａｃ－１、ｐｌ５０．９５、ＰＥＣＡＭ、ＩＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－２、ＩＣＡＭ－３、ＣＤ２、ＬＦＡ－３、Ｍ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、突然変異体形態のＩＬ－１８、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、血管増殖因子、線維芽細胞増殖因子、ＩＬ－７、ＩＬ－２２、神経増殖因子、血管内皮増殖因子、Ｆａｓ、ＴＮＦ受容体、Ｆｉｔ、Ａｐｏ－１、ｐ５５、ＷＳＬ－１、ＤＲ３、ＴＲＡＭＰ、Ａｐｏ－３、ＡＩＲ、ＬＡＲＤ、ＮＧＲＦ、ＤＲ４、ＤＲ５、ＫＩＬＬＥＲ、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＩＣＫ２、ＤＲ６、カスパーゼＩＣＥ、Ｆｏｓ、ｃ－ｊｕｎ、Ｓｐ－１、Ａｐ－１、Ａｐ－２、ｐ３８、ｐ６５Ｒｅｌ、ＭｙＤ８８、ＩＲＡＫ、ＴＲＡＦ６、ＩκＢ、不活性ＮＩＫ、ＳＡＰ　Ｋ、ＳＡＰ－１、ＪＮＫ、インターフェロン応答遺伝子、ＮＦκＢ、Ｂａｘ、ＴＲＡＩＬ、ＴＲＡＩＬｒｅｃ、ＴＲＡＩＬｒｅｃＤＲＣ５、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ４、ＲＡＮＫ、ＲＡＮＫリガンド、Ｏｘ４０、Ｏｘ４０リガンド、ＮＫＧ２Ｄ、ＭＩＣＡ、ＭＩＣＢ、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｆ、ＴＡＰ１、ＴＡＰ２、およびこれらの機能的断片を含む。

【０４７１】

一部の態様では、アジュバントは、ｔｏｌｌ様受容体のモジュレーターであり得る。ｔｏｌｌ様受容体のモジュレーターの例は、ＴＬＲ９アゴニストを含み、イミキモド等のｔｏｌｌ様受容体の小分子モジュレーターには限定されない。場合により、アジュバントは、細菌トキソイド、ポリオキシプロピレン－ポリオキシエチレンブロックポリマー、アルミニウム塩、リポソーム、ＣｐＧポリマー、水中油型エマルションまたはこれらの組合せから選択される。場合により、アジュバントは、水中油型エマルションである。水中油型エマルションは、少なくとも１種の油および少なくとも１種の界面活性物質を含むことができ、油（複数可）および界面活性物質（複数可）は、生分解性（代謝可能）かつ生体適合性である。エマルション中の油滴は、５μｍ未満の直径であり得、さらには、サブミクロン直径を有することができ、このような小さいサイズは、マイクロ流体装置（ｍｉｃｒｏｆｌｕｉｄｉｓｅｒ）により達成されて、安定したエマルションが提供される。２２０ｎｍ未満のサイズを有する液滴は、濾過滅菌に付すことができる。

【０４７２】

一部の例では、免疫原性医薬組成物は、担体および賦形剤（緩衝液、炭水化物、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、またはグリシン等のアミノ酸、抗酸化剤、静菌薬、キレート剤、懸濁剤、増粘剤および／または保存料を含むがこれらに限定されない）、水

、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱物油、ゴマ油その他等の石油、動物、植物または合成起源のものを含む油、生理食塩水溶液、水性デキストロースおよびグリセロール溶液、矯味矯臭剤、着色剤、粘着低減剤（ｄｅｔａｃｋｉｆｉｅｒ）および他の許容される添加物、アジュバントまたは結合剤、要求に応じて、ｐＨ緩衝化剤、張度調整剤、乳化剤、湿潤剤その他等の生理的条件に近似させるための他の薬学的に許容される補助物質を含むことができる。賦形剤の例は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、イネ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールその他を含む。別の例では、医薬調製物は、保存料を実質的に含まない。他の例では、医薬調製物は、少なくとも１種の保存料を含有することができる。当業者に公知のいずれか適した担体を用いて、本明細書に記載されている医薬組成物を投与することができるが、担体の型は、投与機序に依存して変動するであろうことが認識されるであろう。

【０４７３】

免疫原性医薬組成物は、チオメルサールまたは２－フェノキシエタノール等の保存料を含むことができる。一部の例では、免疫原性医薬組成物は、水銀材料を実質的に含まない（例えば、＜１０μｇ／ｍＬ）、例えば、チオメルサール不含である。水銀化合物の代替としてα－トコフェロールコハク酸エステルを使用することができる。

【０４７４】

張度を制御するために、ナトリウム塩等の生理的な塩が、免疫原性医薬組成物に含まれてよい。他の塩は、塩化カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸二ナトリウム（ｄｉｓｏｄｉｕｍ　ｐｈｏｓｐｈａｔｅ）および／または塩化マグネシウムその他を含むことができる。

【０４７５】

免疫原性医薬組成物は、２００ｍＯｓｍ／ｋｇ～４００ｍＯｓｍ／ｋｇの間、２４０～３６０ｍＯｓｍ／ｋｇの間、または２９０～３１０ｍＯｓｍ／ｋｇの範囲内の重量オスモル濃度を有することができる。

【０４７６】

免疫原性医薬組成物は、Ｔｒｉｓ緩衝液；ホウ酸緩衝液；コハク酸緩衝液；ヒスチジン緩衝液（特に水酸化アルミニウムアジュバントと共に）；またはクエン酸緩衝液等、１種または複数の緩衝液を含むことができる。緩衝液は、一部の場合では、５～２０または１０～５０ｍＭ範囲で含まれる。

【０４７７】

免疫原性医薬組成物のｐＨは、約５．０～約８．５の間、約６．０～約８．０の間、約６．５～約７．５の間または約７．０～約７．８の間であり得る。

【０４７８】

免疫原性医薬組成物は、滅菌されてよい。免疫原性医薬組成物は、例えば、用量当たり＜１ＥＵ（エンドトキシン単位、標準尺度）を含有する発熱物質なしであり得、用量当たり＜０．１ＥＵであり得る。組成物は、グルテン不含であり得る。

【０４７９】

免疫原性医薬組成物は、洗剤、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性物質（「Ｔｗｅｅｎ（登録商標）類」として公知）またはオクトキシノール（オクトキシノール－９（Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００）またはｔ－オクチルフェノキシポリエトキシエタノール等）を含むことができる。洗剤は、ごく微量で存在することができる。免疫原性医薬組成物は、１ｍｇ／ｍＬ未満のオクトキシノール－１０およびポリソルベート８０のそれぞれを含むことができる。微量で存在する他の残渣成分は、抗生物質（例えば、ネオマイシン、カナマイシン、ポリミキシンＢ）であり得る。

【０４８０】

免疫原性医薬組成物は、当技術分野で周知の適した媒体における滅菌溶液または懸濁物として製剤化することができる。医薬組成物は、従来の周知滅菌技法によって滅菌するこ

とができる、または滅菌濾過することができる。結果として生じる水溶液は、現状のままでの使用のために包装することができる、または凍結乾燥することができ、凍結乾燥された調製物は、投与に先立ち滅菌溶液と組み合わされる。

【０４８１】

例えば、本明細書に開示されている免疫細胞等の活性薬剤を１種または複数のアジュバントと組み合わせたものを含む医薬組成物は、ある特定のモル比を含むように製剤化することができる。例えば、本明細書に記載されている免疫細胞等の活性薬剤を１種または複数のアジュバントと組み合わせたものの約９９：１～約１：９９のモル比を使用することができる。一部の例では、本明細書に記載されている免疫細胞等の活性薬剤を１種または複数のアジュバントと組み合わせたもののモル比の範囲は、約８０：２０～約２０：８０；約７５：２５～約２５：７５、約７０：３０～約３０：７０、約６６：３３～約３３：６６、約６０：４０～約４０：６０；約５０：５０；および約９０：１０～約１０：９０から選択することができる。本明細書に記載されている免疫細胞等の活性薬剤を１種または複数のアジュバントと組み合わせたもののモル比は、約１：９であり得、一部の場合では、約１：１であり得る。本明細書に記載されている免疫細胞等の活性薬剤を１種または複数のアジュバントと組み合わせたものは、同じ投薬単位、例えば、１個のバイアル、坐薬、錠剤、カプセル、エアロゾルスプレーにおいて一緒に製剤化することができる；または各薬剤、形態および／または化合物は、別々の単位、例えば、２個のバイアル、坐薬、錠剤、２個のカプセル、錠剤およびバイアル、エアロゾルスプレーその他において製剤化することができる。

【０４８２】

一部の例では、免疫原性医薬組成物は、追加的な薬剤と共に投与することができる。追加的な薬剤の選択は、少なくとも一部には、処置されている状態に依存することができる。追加的な薬剤は、例えば、抗ＰＤ１、抗ＣＴＬＡ４、抗ＰＤ－Ｌ１、抗ＣＤ４０または抗ＴＩＭ３薬剤（例えば、抗ＰＤ１、抗ＣＴＬＡ４、抗ＰＤ－Ｌ１、抗ＣＤ４０または抗ＴＩＭ３抗体）等のチェックポイント阻害剤の薬剤；または例えば、ＮＳＡＩＤ、例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、アセトアミノフェン、ケトプロフェンまたはアスピリン等の炎症性状態の処置に使用される薬物を含む、病原体感染（例えば、ウイルス感染）に対して治療効果を有するいずれかの薬剤を含むことができる。例えば、チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ（ＯＮＯ－４５３８／ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＤＸ１　１０６、ＯＰＤＩＶＯ）、ペムブロリズマブ（ＭＫ－３４７５、ＫＥＹＴＲＵＤＡ）、ピディリズマブ（ＣＴ－０１１）およびＭＰＤＬ３２８ＯＡ（ＲＯＣＨＥ）からなる群から選択されるＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１アンタゴニストであり得る。別の例として、製剤はその上、ビタミンＣ、Ｅまたは他の抗酸化剤等の１種または複数のサプリメントを含有することができる。

【０４８３】

本明細書に記載されている免疫細胞等の活性薬剤を１種または複数のアジュバントと組み合わせたものを含む医薬組成物は、例えば、投与され得る調製物へと活性薬剤を加工することを容易にする賦形剤、希釈剤および／または補助剤を含む１種または複数の生理的に許容される担体を使用して、従来の様式で製剤化することができる。適切な製剤は、少なくとも一部には、選ばれた投与経路に依存することができる。本明細書に記載されている薬剤（複数可）は、経口、頬側、外用、直腸、経皮、経粘膜、皮下、静脈内および筋肉内適用ならびに吸入によるものを含む多数の投与経路または機序を使用して、患者に送達することができる。

【０４８４】

活性薬剤は、非経口的投与（例えば、注射、例えば、ボーラス注射または継続的注入による）のために製剤化することができ、アンプル、予め充填されたシリンジ、少体積注入における単位用量形態で、または複数用量容器において保存料を添加して提示することができる。組成物は、油性または水性媒体における懸濁物、溶液またはエマルション、例えば、水性ポリエチレングリコールにおける溶液等の形態を取ることができる。

【０４８５】
一部の実施形態では、医薬組成物は、保存料または安定剤を含む。一部の実施形態では、保存料または安定剤は、サイトカイン、増殖因子またはアジュバントまたは化学物質から選択される。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも１サイクルの凍結・融解を経た細胞生存度の保存に役立つ少なくとも１種の薬剤を含む。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも２サイクル以上の凍結・融解を経た細胞生存度の保存に役立つ少なくとも１種の薬剤を含む。
【０４８６】
注射用製剤のため、媒体は、水溶液もしくは油懸濁物、またはゴマ油、トウモロコシ油、綿実油もしくはピーナッツ油によるエマルション、ならびにエリキシル剤、マンニトール、デキストロースまたは滅菌水溶液および同様の医薬品媒体を含む、適していることが当技術分野で公知の媒体から選択することができる。製剤は、ポリ（乳酸－ｃｏ－グリコール）酸等、生体適合性、生分解性であるポリマー組成物を含むこともできる。これらの材料は、薬物をロードされ、優れた徐放性能を提供するためにさらにコーティングまたは誘導体化されたマイクロまたはナノスフェアへと作製することができる。眼周囲または眼内注射に適した媒体は、例えば、注射グレードの水における治療剤の懸濁物、リポソーム、および親油性物質に適した媒体を含む。眼周囲または眼内注射のための他の媒体は、当技術分野で周知である。
【０４８７】
一部の例では、医薬組成物は、人間への静脈内投与に適応された医薬組成物としてルーチン手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張性水性緩衝液における溶液である。必要であれば、組成物は、可溶化剤、および注射部位における疼痛を和らげるためのリドカイン等の局所性麻酔薬を含むことができる。一般に、成分は、別々に、または単位剤形において一緒に混合して、例えば、活性薬剤の含量を示すアンプルまたは小袋（ｓａｃｈｅｔｔｅ）等の密閉シール容器における乾いた凍結乾燥粉末または水不含濃縮物として供給される。組成物が、注入によって投与されるべきである場合、滅菌医薬品グレードの水または生理食塩水を含有する注入ボトルで調剤することができる。組成物が、注射によって投与される場合、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルは、投与に先立ち成分を混合することができるように提供することができる。
【０４８８】
製造する方法：
抗原特異的Ｔ細胞製造のための方法が本明細書に提供される。治療的Ｔ細胞組成物などのＴ細胞組成物を調製する方法が本明細書に提供される。例えば、方法は、抗原特異的Ｔ細胞を増大化させるステップまたは誘導するステップを含み得る。Ｔ細胞を調製すること（例えば、誘導することまたは増大化させること）は、Ｔ細胞を製造することもまた指し得、任意の型のＴ細胞（例えば、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）を単離、刺激、培養、誘導および／または増大化するための手順を広く包含する。一態様では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法であって、ＡＰＣを、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する細胞が枯渇された生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップを含む方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、本方法は、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製するステップを含み、本方法は、ＡＰＣを、ＣＤ１１ｂおよび／またはＣＤ１９を発現する細胞が枯渇された生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、ＡＰＣを、任意のＣＤ１１ｂおよび／もしくはＣＤ１９ならびに／またはＣＤ１４および／もしくはＣＤ２５あるいはそれらの任意の組合せを発現する細胞が枯渇された生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップを含む。
【０４８９】
第２の態様では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ

）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法であって、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）に刺激されたＡＰＣを、生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップを含む方法が本明細書に提供される。

【０４９０】

第３の態様では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を含む医薬組成物を調製する方法であって、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）を、第１の期間にわたり、生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップと、その後、生体試料の少なくとも１つのＴ細胞をＡＰＣと共にインキュベートするステップとを含む方法が本明細書に提供される。

【０４９１】

第４の態様では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法であって、生体試料由来の免疫細胞の集団を、免疫細胞の集団を１つまたは複数のＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物と共にインキュベートしてから２８日間未満の１つまたは複数の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートするステップであって、少なくとも１つの抗原特異的メモリーＴ細胞が増大化される、または少なくとも１つの抗原特異的ナイーブＴ細胞が誘導される、ステップを含む方法が本明細書に提供される。

【０４９２】

第５の態様では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法であって、生体試料由来の免疫細胞の集団を、３つまたはそれ未満の別々の期間にわたり、３つまたはそれ未満のＡＰＣ調製物と共にインキュベートするステップであって、少なくとも１つの抗原特異的メモリーＴ細胞が増大化される、または少なくとも１つの抗原特異的ナイーブＴ細胞が誘導される、ステップを含む方法が本明細書に提供される。

【０４９３】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、生体試料由来の免疫細胞の集団を、１つまたは複数の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートし、これにより、Ｔ細胞を刺激して抗原特異的Ｔ細胞にするステップであって、抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージが、総ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、総ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約０．０００００１％、０．０００００２％、０．０００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％である、ステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、生体試料由来の免疫細胞の集団を、３つまたはそれ未満の別々の期間にわたり、３つまたはそれ未満のＡＰＣ調製物と共にインキュベートし、これにより、Ｔ細胞を刺激して抗原特異的Ｔ細胞にするステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、生体試料由来の免疫細胞の集団を、２つまたはそれ未満の別々の期間にわたり、２つまたはそれ未満のＡＰＣ調製物と共にインキュベートし、これにより、Ｔ細胞を刺激して抗原特異的Ｔ細胞にするステップを含む。

【０４９４】

一部の実施形態では、生体試料由来の免疫細胞の集団を、１つまたは複数の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートし、これにより、Ｔ細胞を刺激して抗原特異的Ｔ細胞にするステップを含む方法であって、ＡＰＣ調製物が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に１つまたは複数の細胞表面マーカーを発現する細胞が枯渇

されたＰＢＭＣ細胞集団である、方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、ＣＤ１４＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ２５＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１９＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ３＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ２５＋細胞およびＣＤ１４＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋およびＣＤ２５＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋およびＣＤ１４＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋およびＣＤ１９＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１９＋およびＣＤ２５＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１４＋、ＣＤ１９＋およびＣＤ２５＋細胞が、ＡＰＣ集団の抗原ローディング前に枯渇される。一部の実施形態では、本方法は、上記枯渇されたＡＰＣ集団のいずれかに、ＣＤ３＋細胞が枯渇されたＡＰＣ濃縮細胞ＰＢＭＣ由来集団を添加するステップを含む。一部の実施形態では、ＡＰＣ濃縮細胞ＰＢＭＣ由来集団からは、ＣＤ３＋が枯渇され、かかる集団は、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１４＋、ＣＤ１９＋またはＣＤ２５＋のうちいずれか１つまたは複数が枯渇された細胞である。

【０４９５】

一部の実施形態では、生体試料は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を含む。一部の実施形態では、本方法は、ＰＢＭＣ試料に、１つもしくは複数の抗原性ペプチドまたはそれをコードする核酸を含む組成物を添加し、これにより、ＰＢＭＣ内のＡＰＣに、ＰＢＭＣ中のＴ細胞に対する抗原提示のために抗原をロードするステップを含む。

【０４９６】

一部の実施形態では、方法は、（ａ）少なくとも１つの抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む、対象由来の生体試料を得るステップと、（ｂ）生体試料から、ＣＤ１１ｃを発現する細胞を濃縮し、これにより、ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞が濃縮された試料を得るステップと、（ｃ）ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞が濃縮された試料を、第１の期間にわたり、少なくとも１種のサイトカインまたは増殖因子と共にインキュベートするステップと、（ｄ）少なくとも１つのペプチドを、第２の期間にわたり、（ｃ）のＣＤ１１ｃ$^{+}$が濃縮された試料と共にインキュベートし、これにより、ＡＰＣペプチドロード試料を得るステップと、（ｅ）ＡＰＣペプチドロード試料を、第３の期間にわたり、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子と共にインキュベートし、これにより、成熟したＡＰＣ試料を得るステップと、（ｆ）成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣを、第４の期間にわたり、ＰＢＭＣを含むＣＤ１１ｂおよび／またはＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された試料と共にインキュベートするステップと、（ｇ）ＰＢＭＣを、第５の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートするステップと、（ｈ）ＰＢＭＣを、第６の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートするステップと、（ｉ）ＰＢＭＣの少なくとも１つのＴ細胞を、それを必要とする対象に投与するステップとを含む。

【０４９７】

一部の実施形態では、方法は、（ａ）少なくとも１つの抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む、対象由来の生体試料を得るステップと、（ｂ）ＣＤ１４を発現する細胞を、生体試料から濃縮し、これにより、ＣＤ１４$^{+}$細胞が濃縮された試料を得るステップと、（ｃ）ＣＤ１４$^{+}$細胞が濃縮された試料を、第１の期間にわたり、少なくとも１種のサイトカインまたは増殖因子と共にインキュベートするステップと、（ｄ）少なくとも１つのペプチドを、第２の期間にわたり、（ｃ）のＣＤ１４$^{+}$が濃縮された試料と共にインキュベートし、これにより、ＡＰＣペプチドロード試料を得るステップと、（ｅ）ＡＰＣペプチドロード試料を、第３の期間にわたり、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子と共にイン

キュベートし、これにより、成熟したＡＰＣ試料を得るステップと、（ｆ）成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣを、第４の期間にわたり、ＰＢＭＣを含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された試料と共にインキュベートするステップと、（ｇ）ＰＢＭＣを、第５の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートするステップと、（ｈ）ＰＢＭＣを、第６の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートするステップと、（ｉ）ＰＢＭＣの少なくとも１つのＴ細胞を、それを必要とする対象に投与するステップとを含む。

【０４９８】

一部の実施形態では、方法は、（ａ）少なくとも１つのＡＰＣおよび少なくとも１つのＰＢＭＣを含む、対象由来の生体試料を得るステップと、（ｂ）ＣＤ１１ｂおよび／またはＣＤ１９を発現する細胞を、生体試料から枯渇させ、これにより、ＣＤ１１ｂおよび／またはＣＤ１９細胞が枯渇された試料を得るステップと、（ｃ）ＣＤ１１ｂおよび／またはＣＤ１９細胞が枯渇された試料を、第１の期間にわたり、ＦＬＴ３Ｌと共にインキュベートするステップと、（ｄ）少なくとも１つのペプチドを、第２の期間にわたり、（ｃ）のＣＤ１１ｂおよび／またはＣＤ１９細胞が枯渇された試料と共にインキュベートし、これにより、ＡＰＣペプチドロード試料を得るステップと、（ｅ）ＡＰＣペプチドロード試料を、第３の期間にわたり、少なくとも１つのＰＢＭＣと共にインキュベートし、これにより、第１の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｆ）第１の刺激されたＰＢＭＣ試料のＰＢＭＣを、第４の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートし、これにより、第２の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｇ）第２の刺激されたＰＢＭＣ試料のＰＢＭＣを、第５の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートし、これにより、第３の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｈ）第３の刺激されたＰＢＭＣ試料の少なくとも１つのＴ細胞を、それを必要とする対象に投与するステップとを含む。

【０４９９】

一部の実施形態では、方法は、（ａ）少なくとも１つのＡＰＣおよび少なくとも１つのＰＢＭＣを含む、対象由来の生体試料を得るステップと、（ｂ）ＣＤ１１ｂおよび／もしくはＣＤ１９ならびに／またはＣＤ１４および／もしくはＣＤ２５を発現する細胞を、生体試料から枯渇させ、これにより、ＣＤ１１ｂおよび／またはＣＤ１９細胞が枯渇された試料を得るステップと、（ｃ）ＣＤ１１ｂおよび／もしくはＣＤ１９ならびに／またはＣＤ１４および／もしくはＣＤ２５細胞が枯渇された試料を、第１の期間にわたり、ＦＬＴ３Ｌと共にインキュベートするステップと、（ｄ）少なくとも１つのペプチドを、第２の期間にわたり、（ｃ）のＣＤ１１ｂおよび／もしくはＣＤ１９ならびに／またはＣＤ１４および／もしくはＣＤ２５細胞が枯渇された試料と共にインキュベートし、これにより、ＡＰＣペプチドロード試料を得るステップと、（ｅ）ＡＰＣペプチドロード試料を、第３の期間にわたり、少なくとも１つのＰＢＭＣと共にインキュベートし、これにより、第１の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｆ）第１の刺激されたＰＢＭＣ試料のＰＢＭＣを、第４の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートし、これにより、第２の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｇ）第２の刺激されたＰＢＭＣ試料のＰＢＭＣを、第５の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートし、これにより、第３の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｈ）第３の刺激されたＰＢＭＣ試料の少なくとも１つのＴ細胞を、それを必要とする対象に投与するステップとを含む。

【０５００】

一部の実施形態では、方法は、（ａ）少なくとも１つのＡＰＣおよび少なくとも１つのＰＢＭＣを含む、対象由来の生体試料を得るステップと、（ｂ）生体試料から、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する細胞を枯渇させ、これにより、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５細胞が枯渇された試料を得るステップと、（ｃ）ＣＤ１４および／またはＣＤ２５細胞が枯渇された試料を、第１の期間にわたり、ＦＬＴ３Ｌと共にインキュベートするステップと、（ｄ）少なくとも１つのペプチドを、第２の期間にわたり、（ｃ）のＣＤ

１４および／またはＣＤ２５細胞が枯渇された試料と共にインキュベートし、これにより、ＡＰＣペプチドロード試料を得るステップと、（ｅ）ＡＰＣペプチドロード試料を、第３の期間にわたり、少なくとも１つのＰＢＭＣと共にインキュベートし、これにより、第１の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｆ）第１の刺激されたＰＢＭＣ試料のＰＢＭＣを、第４の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートし、これにより、第２の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｇ）第２の刺激されたＰＢＭＣ試料のＰＢＭＣを、第５の期間にわたり、成熟したＡＰＣ試料のＡＰＣと共にインキュベートし、これにより、第３の刺激されたＰＢＭＣ試料を得るステップと、（ｈ）第３の刺激されたＰＢＭＣ試料の少なくとも１つのＴ細胞を、それを必要とする対象に投与するステップとを含む。

【０５０１】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、ＡＰＣを、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５を発現する細胞が枯渇された生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップを含む。

【０５０２】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法であって、生体試料由来の免疫細胞の集団を、免疫細胞の集団を１つまたは複数のＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物と共にインキュベートしてから２８日間未満の１つまたは複数の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートするステップであって、少なくとも１つの抗原特異的メモリーＴ細胞が増大化される、または少なくとも１つの抗原特異的ナイーブＴ細胞が誘導される、ステップを含む方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法であって、生体試料由来の免疫細胞の集団を、３つまたはそれ未満の別々の期間にわたり、３つまたはそれ未満のＡＰＣ調製物と共にインキュベートするステップであって、少なくとも１つの抗原特異的メモリーＴ細胞が増大化される、または少なくとも１つの抗原特異的ナイーブＴ細胞が誘導される、ステップを含む方法が本明細書に提供される。

【０５０３】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、免疫細胞（例えば、ＰＢＭＣ）の集団をＡＰＣと接触させるステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、免疫細胞（例えば、ＰＢＭＣ）の集団を、一定期間にわたり、ＡＰＣと共にインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、免疫細胞の集団は、生体試料由来である。一部の実施形態では、免疫細胞の集団は、ＣＤ１４発現細胞が枯渇された試料（例えば、生体試料）由来である。一部の実施形態では、免疫細胞の集団は、ＣＤ２５発現細胞が枯渇された試料（例えば、生体試料）由来である。一部の実施形態では、免疫細胞の集団は、ＣＤ１４発現細胞およびＣＤ２５発現細胞が枯渇された試料（例えば、生体試料）由来である。

【０５０４】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）に刺激されたＡＰＣを、生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を含む医薬組成物を調製する方法であって、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）を、第１の期間にわたり、生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップと、その後、生体試料の少なくとも１つのＴ細胞をＡＰＣと

共にインキュベートするステップとを含む方法が本明細書に提供される。

【０５０５】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、試料（例えば、生体試料）由来の免疫細胞の集団を、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）と接触させるステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、試料（例えば、生体試料）由来の免疫細胞の集団を、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）に刺激されたＡＰＣと接触させるステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、試料（例えば、生体試料）由来の免疫細胞の集団を、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）に刺激されたＡＰＣと共にインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を含む医薬組成物を調製する方法は、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）を、（例えば、一定期間にわたり）生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップと、次いで、生体試料のＴ細胞をＡＰＣと接触させるステップとを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、試料（例えば、生体試料）由来の免疫細胞の集団を、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と接触させるステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、試料（例えば、生体試料）由来の免疫細胞の集団を、１つまたは複数の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、試料（例えば、生体試料）由来の免疫細胞の集団を、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０個の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、１つまたは複数の別々の期間は、免疫細胞の集団を１つまたは複数のＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物と共にインキュベートしてから計算して２８日間未満である。

【０５０６】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、免疫細胞の集団を、一定期間にわたり、ＡＰＣと共にインキュベートするステップであって、免疫細胞の集団が、ＰＢＭＣを含む生体試料由来である、ステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、免疫細胞の集団を、一定期間にわたり、ＡＰＣと共にインキュベートするステップであって、免疫細胞の集団が、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５発現細胞が枯渇された生体試料由来である、ステップを含む。

【０５０７】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、生体試料由来の免疫細胞の集団を、一定期間にわたり、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）に刺激されたＡＰＣと共にインキュベートするステップを含む。

【０５０８】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を含む医薬組成物を調製する方法は、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）を、生体試料由来の免疫細胞の集団と共にインキュベートするステップと、次いで、生体試料のＴ細胞をＡＰＣと接触させるステップとを

含む。

【０５０９】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、生体試料由来の免疫細胞の集団を、１つまたは複数の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートし、これにより、抗原特異的Ｔ細胞を誘導または増大化させるステップであって、１つまたは複数の別々の期間が、免疫細胞の集団を１つまたは複数のＡＰＣ調製物の第１のＡＰＣ調製物と共にインキュベートしてから計算して２８日間未満である、ステップを含む。一部の実施形態では、生体試料由来の免疫細胞の集団を、１つまたは複数の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートするステップは、ＩＬ－７、ＩＬ－１５、またはそれらの組合せを含有する培地中で実施される。一部の実施形態では、培地は、インドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼ－１（ＩＤＯ）阻害剤、抗ＰＤ－１抗体、ＩＬ－１２、またはそれらの組合せをさらに含む。ＩＤＯ阻害剤は、エパカドスタット、ナボキシモド（ｎａｖｏｘｉｍｏｄ）、１－メチルトリプトファン、またはそれらの組合せであり得る。一部の実施形態では、ＩＤＯ阻害剤は、抗原特異的ＣＤ８$^+$細胞の数を増加させ得る。一部の実施形態では、ＩＤＯ阻害剤は、メモリーＣＤ８$^+$Ｔ細胞応答の機能的プロファイルを維持し得る。ＰＤ－１抗体は、抗原特異的メモリーＣＤ８＋Ｔ細胞応答の絶対数を増加させ得る。ＰＤ－１抗体は、かかる抗体で処置した細胞の増殖速度を増加させ得る。ＩＬ－１２の添加は、抗原特異的細胞の増加および／またはＣＤ８$^+$Ｔ細胞の頻度の増加を生じ得る。

【０５１０】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、生体試料由来の免疫細胞の集団を、１つまたは複数の別々の期間にわたり、１つまたは複数のＡＰＣ調製物と共にインキュベートし、これにより、抗原特異的Ｔ細胞を増大化または誘導するステップであって、抗原特異的Ｔ細胞、抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞または抗原特異的ＣＤ８$^+$Ｔ細胞のパーセンテージが、総Ｔ細胞、総ＣＤ４$^+$Ｔ細胞、総ＣＤ８$^+$Ｔ細胞、総免疫細胞または総細胞の少なくとも約０．００００１％、０．００００２％、０．００００５％、０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％または９５％である、ステップを含む。

【０５１１】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列に特異的なＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む抗原特異的Ｔ細胞を調製する方法は、生体試料由来の免疫細胞の集団を、３つまたはそれ未満の別々の期間にわたり、３つまたはそれ未満のＡＰＣ調製物と共にインキュベートし、これにより、Ｔ細胞を刺激して抗原特異的Ｔ細胞にするステップを含む。

【０５１２】

一部の実施形態では、免疫細胞の集団は、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５発現細胞が枯渇された生体試料由来である。一部の実施形態では、ＡＰＣは、ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）に刺激されたＡＰＣである。一部の実施形態では、ＡＰＣは、１つまたは複数のＡＰＣ調製物を構成する。一部の実施形態では、ＡＰＣ調製物は、３つまたはそれ未満のＡＰＣ調製物を含む。一部の実施形態では、ＡＰＣ調製物は、１つまたは複数の別々の期間内で、免疫細胞と共に逐次的にインキュベートされる。

【０５１３】

一部の実施形態では、生体試料は、対象由来である。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。例えば、対象は、患者またはドナーであり得る。一部の実施形態では、対象は、疾患または障害を有する。一部の実施形態では、疾患または障害は、がんである。一部の実施形態では、抗原特異的Ｔ細胞は、ＣＤ４$^+$および／またはＣＤ８$^+$Ｔ細胞を含む。

一部の実施形態では、抗原特異的Ｔ細胞は、ＣＤ４が濃縮されたＴ細胞および／またはＣＤ８が濃縮されたＴ細胞を含む。例えば、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞および／またはＣＤ８$^+$Ｔ細胞は、ＰＢＭＣを含む、対象由来の生体試料から単離、濃縮または精製され得る。一部の実施形態では、抗原特異的Ｔ細胞は、ナイーブＣＤ４$^+$および／またはナイーブＣＤ８$^+$Ｔ細胞である。一部の実施形態では、抗原特異的Ｔ細胞は、メモリーＣＤ４$^+$および／またはメモリーＣＤ８$^+$Ｔ細胞である。

【０５１４】

一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列は、（Ａ）がん抗原ペプチドが、５００ｎＭ未満のＩＣ$_{50}$で、かつ対応する野生型ペプチドよりも高い親和性で、対象のＨＬＡタンパク質に結合する点突然変異、（Ｂ）スプライス部位突然変異、（Ｃ）フレームシフト突然変異、（Ｄ）リードスルー突然変異、（Ｅ）遺伝子融合突然変異、およびそれらの組合せから選択される突然変異を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列の各々は、対象によって発現されるＨＬＡ対立遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列の各々は、対象の非がん細胞には存在しない突然変異を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列の各々は、対象のがん細胞の発現された遺伝子によってコードされる。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列のうち１つまたは複数は、８～５０の長さの天然に存在するアミノ酸を有する。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原ペプチド配列は、複数の抗原ペプチド配列を構成する。一部の実施形態では、複数の抗原ペプチド配列は、２～５０、３～５０、４～５０、５～５－、６～５０、７～５０、８～５０、９～５０または１０～５０個の抗原ペプチド配列を含む。

【０５１５】

一部の実施形態では、ＡＰＣは、少なくとも１つの抗原ペプチド配列のうち１つまたは複数を含む１つまたは複数の抗原ペプチドがロードされたＡＰＣを含む。一部の実施形態では、ＡＰＣは、自家ＡＰＣまたは同種ＡＰＣである。一部の実施形態では、ＡＰＣは、樹状細胞（ＤＣ）を含む。

【０５１６】

一部の実施形態では、方法は、ＣＤ１４および／またはＣＤ２５発現細胞を生体試料から枯渇させるステップを含む。一部の実施形態では、ＣＤ１４$^+$細胞を枯渇させるステップは、ＣＤ１４結合剤をＡＰＣと接触させるステップを含む。一部の実施形態では、ＡＰＣは、ＣＤ１４$^+$単球に由来する。一部の実施形態では、ＡＰＣは、生体試料から濃縮される。例えば、ＡＰＣは、ＰＢＭＣを含む、対象由来の生体試料から単離、濃縮または精製され得る。

【０５１７】

一部の実施形態では、ＡＰＣは、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子で刺激される。一部の実施形態では、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子は、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子は、ＩＬ－４、ＩＦＮ－γ、ＬＰＳ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７またはそれらの組合せを含む。

【０５１８】

一部の実施形態では、ＡＰＣは、第２の生体試料由来である。一部の実施形態では、第２の生体試料は、同じ対象由来である。

【０５１９】

一部の実施形態では、本方法における抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、本方法における抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の約０．１％～約５％、約５％～１０％、約１０％～１５％、約１５％～２０％、約２０％～２５％、約２５％～３０％、約３０％～３５

％、約３５％～約４０％、約４０％～約４５％、約４５％～約５０％、約５０％～約５５％、約５５％～約６０％、約６０％～６５％または約６５％～約７０％である。一部の実施形態では、本方法における抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、本方法における抗原特異的ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、本方法における抗原特異的メモリーＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、本方法における抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、本方法における抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、総Ｔ細胞または総免疫細胞の少なくとも約１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、生体試料中の抗原特異的Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、生体試料中の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、生体試料中の抗原特異的ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、生体試料中の抗原特異的メモリーＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。一部の実施形態では、生体試料中の抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージは、多くても約０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％または２０％である。

【０５２０】

一部の実施形態では、生体試料は、対象から新たに得られる、または凍結された試料である。

【０５２１】

一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数のＡＰＣ調製物を、第１の期間にわたり、少なくとも１種のサイトカインまたは増殖因子を含む第１の培地と共にインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、第１の期間は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６または１７または１８日間である。一部の実施形態では、第１の期間は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７または１８日間以下である。一部の実施形態では、第１の期間は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８または９日間である。一部の実施形態では、第１の期間は、３、４、５、６、７、８、９または１０日間以下である。一部の実施形態では、少なくとも１種のサイトカインまたは増殖因子は、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＦＮ－γ、ＬＰＳ、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０、ポリＩ

：Ｃ、またはそれらの任意の組合せを含む。
【０５２２】
一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数のＡＰＣ調製物を、第２の期間にわたり、少なくとも１つのペプチドと共にインキュベートするステップを含む。一部の実施形態では、第２の期間は、１時間以下である。
【０５２３】
一部の実施形態では、方法は、１つまたは複数のＡＰＣ調製物を、第３の期間にわたり、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子を含む第２の培地と共にインキュベートし、これにより、成熟したＡＰＣを得るステップを含む。一部の実施形態では、１種または複数のサイトカインまたは増殖因子は、ＧＭ－ＣＳＦ（顆粒細胞マクロファージコロニー刺激因子）、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＩＦＮ－γ、ＬＰＳ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８（レシキモド）、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０、ポリＩ：Ｃ、ＣｐＧ、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、第３の期間は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７または１８日間以下である。一部の実施形態では、第３の期間は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６または１７日間である。一部の実施形態では、第３の期間は、２、３、４または５日間以下である。一部の実施形態では、第３の期間は、少なくとも１、２、３または４日間である。
【０５２４】
一部の実施形態では、本方法は、第３の期間の後かつ第４の期間の開始前に、第２の培地の１種または複数のサイトカインまたは増殖因子を除去するステップをさらに含む。
【０５２５】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＴ細胞誘導のための抗原がロードされたＰＢＭＣ
一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、ＰＢＭＣをヒト血液試料から単離するステップと、ＰＢＭＣに抗原を直接ロードするステップとを含む。抗原と直接接触されるＰＢＭＣは、ファゴサイトーシスによって抗原を容易に取り入れることができ、培養物中に存在し得るまたは培養物に添加され得るＴ細胞に抗原を提示することができる。一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、ＰＢＭＣをヒト血液試料から単離するステップと、ポリヌクレオチド、例えば、１つまたは複数の抗原をコードするｍＲＮＡを、ＰＢＭＣ中にヌクレオフェクション処理または電気穿孔するステップとを含む。一部の実施形態では、ＰＢＭＣに送達される抗原は、ＤＣに成熟する抗原提示細胞の代わりに、時間および製造効率の観点から、大きい利点を提供する。ＰＢＭＣからは、１つまたは複数の細胞型がさらに枯渇され得る。一部の実施形態では、ＰＢＭＣからは、抗原ローディングの初期期間の間、ＣＤ３＋細胞が枯渇され得、ＣＤ３＋細胞は、ＰＢＭＣがＣＤ３＋Ｔ細胞を刺激するために、培養物に戻され得る。一部の実施形態では、ＰＢＭＣからは、ＣＤ２５＋細胞が枯渇され得る。一部の実施形態では、ＰＢＭＣからは、ＣＤ１４＋細胞が枯渇され得る。一部の実施形態では、ＰＢＭＣからは、ＣＤ１９＋細胞が枯渇され得る。一部の実施形態では、ＰＢＭＣからは、ＣＤ１４発現細胞およびＣＤ２５発現細胞の両方が枯渇され得る。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋細胞が、抗原ローディング前に、ＰＢＭＣ試料から枯渇される。一部の実施形態では、ＣＤ１１ｂ＋およびＣＤ２５＋細胞が、抗原ローディング前に、ＰＢＭＣ試料から枯渇される。
【０５２６】
一部の実施形態では、ヒト血液試料から単離されたＰＢＭＣは、抗原でのローディング前に、可能な限り最小限に取り扱われ得る。ＰＢＭＣの増加した取り扱い、例えば、細胞を凍結および解凍するステップ、複数回の細胞枯渇ステップなどは、細胞の健康および生存度を損ない得る。
【０５２７】
一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、治療法の対象にとって同種である。一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、抗原特異的Ｔ細胞を用いた養子細胞療法の対象にとって同種である。

【０５２８】
一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、治療法の対象とＨＬＡが一致している。一部の実施形態では、ＰＢＭＣは、同種であり、かつ対象のＨＬＡサブタイプと一致しているが、ＣＤ３＋Ｔ細胞は自家である。ＰＢＭＣには、抗原特異的Ｔ細胞を刺激するために、それぞれの抗原（例えば、ＲＥＣＯＮなどのペプチド提示分析プラットフォームの分析に由来する）がロードされ、Ｔ細胞を含む対象のＰＢＭＣと共に共培養される。
【０５２９】
一部の実施形態では、ｍＲＮＡが、取り込みおよび抗原提示のための免疫原として使用される。ＰＢＭＣにロードするためにｍＲＮＡを使用することの、ペプチド抗原に優る１つの利点は、ＲＮＡが自己アジュバント性であり、さらなるアジュバントを要求しないことである。ｍＲＮＡを使用する別の利点は、ペプチドが内因性にプロセシングされ、提示されることである。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、エピトープを構成する９～１０アミノ酸のペプチドをコードするショートマー構築物を含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、約２５アミノ酸のペプチドをコードするロングマー構築物を含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、複数のエピトープのコンカテネーションを含む。一部の実施形態では、コンカテマーは、同じ抗原性タンパク質由来の１つまたは複数のエピトープを含み得る。一部の実施形態では、コンカテマーは、いくつかの異なる抗原性タンパク質由来の１つまたは複数のエピトープを含み得る。いくつかの実施形態は、実施例のセクションに記載されている。抗原ローディングによるＰＢＭＣの抗原ローディングは、ＰＢＭＣ中への核酸の送達および組込みの種々の機構を含み得る。一部の実施形態では、送達または組込み機構には、トランスフェクション、電気穿孔、ヌクレオフェクション、化学的送達、例えば、脂質封入されたまたはリポソーム媒介性の送達が含まれる。
【０５３０】
Ｔ細胞を刺激するための抗原がロードされたＰＢＭＣの使用は、Ｔ細胞刺激の前にＰＢＭＣ試料からＤＣを生成する方法において要求される成熟化時間を節約する。一部の実施形態では、抗原がロードされたＰＢＭＣ、例えば、ｍＲＮＡがロードされたＰＢＭＣの、ＡＰＣとしての使用は、総製造時間を１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０日間低減させる。一部の実施形態では、抗原がロードされたＰＢＭＣの、ＡＰＣとしての使用は、総製造時間を３日間低減させる。一部の実施形態では、抗原がロードされたＰＢＭＣの、ＡＰＣとしての使用は、総製造時間を４日間低減させる。一部の実施形態では、抗原がロードされたＰＢＭＣの、ＡＰＣとしての使用は、総製造時間を５日間低減させる。一部の実施形態では、抗原がロードされたＰＢＭＣの、ＡＰＣとしての使用は、総製造時間を６日間低減させる。一部の実施形態では、抗原がロードされたＰＢＭＣの、ＡＰＣとしての使用は、総製造時間を７日間低減させる。
【０５３１】
一部の実施形態では、核酸を設計および製造し、ＰＢＭＣをトランスフェクトすることは容易であるので、ｍＲＮＡの、抗原としての使用が好まれ得る。一部の実施形態では、ｍＲＮＡがロードされたＰＢＭＣは、Ｔ細胞を刺激することができ、より高い抗原特異的Ｔ細胞を生成することができる。一部の実施形態では、ｍＲＮＡがロードされたＰＢＭＣは、Ｔ細胞を刺激することができ、より高い収量の抗原特異的Ｔ細胞を生成することができる。一部の実施形態では、ｍＲＮＡがロードされたＰＢＭＣは、Ｔ細胞を刺激することができ、より多くの入力物抗原を表現する、すなわち、多様な抗原に対して反応性の抗原特異的Ｔ細胞を生成することができる。一部の実施形態では、ｍＲＮＡがロードされたＰＢＭＣは、増大化された細胞のプールにおいて、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多くの抗原反応性を有するＴ細胞を刺激することができる。一部の実施形態では、ｍＲＮＡがロードされたＰＢＭＣは、従来の抗原がロードされたＡＰＣ（例えば、ペプチドがロードされたＤＣ）よりも、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれよりも多くの抗原反応性を有するＴ細胞を刺激することができる。
処置する方法

【０５３２】
対象におけるがんを処置するための方法であって、Ｉ．がんネオ抗原がロードされた抗原提示細胞（ＡＰＣ）を、単離されたＴ細胞とｅｘ　ｖｉｖｏで接触させるステップであって、がんネオ抗原がロードされた抗原提示細胞（ＡＰＣ）が、ＣＤ１１ｂ枯渇されている、ステップと、ＩＩ．がん免疫療法のための細胞性組成物のためのがんネオ抗原プライムされたＴ細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで調製するステップと、ＩＩＩ．がん免疫療法のための細胞性組成物を対象に投与するステップであって、がんに関連する少なくとも１つまたは複数の状態または症状が、投与するステップによって低減または軽快されるステップとを含み、これにより、対象を処置する方法であって、がんネオ抗原がロードされたＡＰＣおよびがんネオ抗原プライムされたＴ細胞が各々、対象において発現されるＨＬＡ対立遺伝子によってコードされる、ネオ抗原が特異的に結合することができるタンパク質を発現する、方法が本明細書に提供される。

【０５３３】
一部の実施形態では、本方法は、少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞のうち１つまたは複数を対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、Ｔ細胞を含む治療組成物は、注射によって投与される。一部の実施形態では、Ｔ細胞を含む治療組成物は、注入によって投与される。投与が注射による場合、活性薬剤は、水溶液、具体的には、生理的に適合性の緩衝液、例えば、ハンクス溶液、リンゲル溶液または生理的食塩水緩衝液中で、製剤化され得る。溶液は、製剤化剤（ｆｏｒｍｕｌａｔｏｒ　ａｇｅｎｔ）、例えば、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤を含有し得る。別の実施形態では、医薬組成物は、ペプチドによって刺激された免疫応答を増強するために添加されるアジュバントもいずれの他の物質も含まない。一部の実施形態では、本方法は、少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞のうち１つまたは複数を、本明細書に記載される医薬組成物として対象に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、保存料または安定剤を含む。一部の実施形態では、保存料または安定剤は、サイトカイン、増殖因子もしくはアジュバントまたは化学物質から選択される。一部の実施形態では、少なくとも１つの抗原特異的Ｔ細胞は、対象からＰＢＭＣ試料を採集してから２８日以内に対象に投与される。

【０５３４】
以前に記載された製剤に加えて、活性薬剤は、デポー調製物としても製剤化され得る。かかる長時間作用性製剤は、植え込みもしくは経皮的送達（例えば、皮下または筋肉内）、筋肉内注射、または経皮パッチの使用によって投与され得る。したがって、例えば、薬剤は、適切なポリマー性もしくは疎水性材料（例えば、許容される油中でのエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂を用いて、あるいは難溶性誘導体として、例えば、難溶性塩として、製剤化され得る。

【０５３５】
疾患、障害または状態を有する対象を処置する方法もまた、本明細書に提供される。処置の方法は、本明細書で開示される組成物または医薬組成物を、疾患、障害または状態を有する対象に投与するステップを含み得る。

【０５３６】
本開示は、免疫原性療法を含む処置の方法を提供する。疾患（例えば、がんまたはウイルス感染）に対する処置の方法が提供される。方法は、免疫原性抗原特異的Ｔ細胞を含む組成物の有効量を、本明細書に提供される方法に従って対象に投与するステップを含み得る。一部の実施形態では、抗原は、ウイルス抗原を含む。一部の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原を含む。

【０５３７】
調製され得る治療薬の非限定的な例としては、ペプチドベースの治療法、核酸ベースの治療法、抗体ベースの治療法、Ｔ細胞ベースの治療法および抗原提示細胞ベースの治療法が挙げられる。

【０５３８】
一部の他の態様では、治療法における使用のための医薬の製造のための組成物または医

薬組成物の使用が本明細書に提供される。一部の実施形態では、処置の方法は、免疫原性ネオ抗原ペプチドを特異的に認識するＴ細胞の有効量を対象に投与するステップを含む。一部の実施形態では、処置の方法は、免疫原性ネオ抗原ペプチドを特異的に認識するＴＣＲ、例えば、Ｔ細胞において発現されるＴＣＲの有効量を対象に投与するステップを含む。

【０５３９】

一部の実施形態では、がんは、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、白血病、扁平上皮細胞がん、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜のがん、肝細胞がん、胃（ｇａｓｔｒｉｃ）または胃（ｓｔｏｍａｃｈ）がん（胃腸がんを含む）、膵がん、神経膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、ヘパトーマ、乳房がん、結腸がん、黒色腫、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓または腎がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝癌、頭頸部がん、結腸直腸がん、直腸がん、軟部組織肉腫、カポジ肉腫、Ｂ細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、小リンパ球性（ＳＬ）ＮＨＬ、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、中悪性度びまん性ＮＨＬ、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非切れ込み核細胞性ＮＨＬ、巨大腫瘤病変ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、ＡＩＤＳ関連リンパ腫およびワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、骨髄腫、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病（ｍｙｅｌｏｂｌａｓｔｓ　ｌｅｕｋｅｍｉａ）、および移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ）、母斑症に関連する異常な血管増殖、浮腫、メグズ症候群、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される。

【０５４０】

本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される方法に従って同定された免疫原性ネオ抗原ペプチドが、同じ個体のための治療薬（例えば、ワクチンまたは治療抗体）を開発するために使用される、個別化された薬の文脈において特に有用である。したがって、対象における疾患を処置する方法は、本明細書に記載される方法に従って、対象において免疫原性ネオ抗原ペプチドを同定するステップと、ペプチド（またはその前駆体、例えば、ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ））を合成するステップと、同定されたネオ抗原に特異的なＴ細胞を製造するステップと、ネオ抗原特異的Ｔ細胞を対象に投与するステップとを含み得る。一部の実施形態では、対象における疾患を処置する方法は、本明細書に記載される方法に従って、対象において免疫原性ネオ抗原ペプチドを同定するステップと、ポリヌクレオチド、例えば、免疫原性ネオ抗原ペプチドまたはその前駆体をコードするｍＲＮＡを合成するステップと、同定されたネオ抗原に特異的なＴ細胞を製造するステップと、ネオ抗原特異的Ｔ細胞を対象に投与するステップとを含み得る。

【０５４１】

本明細書に提供される薬剤および組成物は、単独で、または従来の治療的レジメン、例えば、手術、照射、化学療法および／もしくは骨髄移植（自家、同系、同種または無関係）と組み合わせて、使用され得る。腫瘍抗原のセットは、本明細書に記載される方法を使用して同定され得、例えば、がん患者の大部分において有用である。

【０５４２】

一部の実施形態では、少なくとも１つまたは複数の化学療法剤が、免疫原性療法を構成する組成物に加えて投与され得る。一部の実施形態では、１つまたは複数の化学療法剤は、異なるクラスの化学療法剤に属していてもよい。

【０５４３】

本明細書に提供される処置または使用の方法を実施する際に、治療有効量の治療剤が、疾患または状態を有する対象に投与され得る。治療有効量は、疾患の重症度、対象の年齢および相対的健康、使用される化合物のポテンシー、ならびに他の因子に依存して、広く変動し得る。

【０５４４】

対象は、例えば、哺乳動物、ヒト、妊娠中の女性、高齢者、成人、青年、青年前、小児、幼児、乳児、新生児（ｎｅｗｂｏｒｎ）または新生児（ｎｅｏｎａｔｅ）であり得る。対象は、患者であり得る。一部の例では、対象は、ヒトであり得る。一部の例では、対象は、小児（すなわち、思春期の年齢よりも若いヒト）であり得る。一部の例では、対象は、乳児であり得る。一部の例では、対象は、人工栄養乳児であり得る。一部の例では、対象は、臨床研究に登録された個体であり得る。一部の例では、対象は、実験動物、例えば、哺乳動物、またはげっ歯類であり得る。一部の例では、対象は、マウスであり得る。一部の例では、対象は、肥満または過体重対象であり得る。

【０５４５】

一部の実施形態では、対象は、１つまたは複数の異なるがん処置モダリティで以前に処置されたことがある。一部の実施形態では、対象は、放射線療法、化学療法または免疫療法のうち１つまたは複数で以前に処置されたことがある。一部の実施形態では、対象は、１、２、３、４または５つのラインの以前の療法で処置されたことがある。一部の実施形態では、以前の療法は、細胞傷害性療法である。

【０５４６】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法で処置され得る疾患または状態は、がんである。がんは、制御されない方法で増殖する傾向があり、一部の例では、転移する（広がる）傾向がある、細胞の異常な成長である。腫瘍は、がん性または良性であり得る。良性腫瘍は、腫瘍が成長できるが広がらないことを意味する。がん性腫瘍は悪性であり、これは、腫瘍が成長でき、身体の他の部分に広がることができることを意味する。がんが広がる（転移する）場合、新たな腫瘍は、元の（原発性）腫瘍と同じ名称を有する。

【０５４７】

本開示の方法は、当技術分野で公知の任意の型のがんを処置するために使用され得る。本開示の方法によって処置されるがんの非限定的な例としては、黒色腫（例えば、転移性悪性黒色腫）、腎がん（例えば、明細胞癌）、前立腺がん（例えば、ホルモン不応性前立腺腺癌）、膵腺癌、乳房がん、結腸がん、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、食道がん、頭頸部の扁平上皮細胞癌、肝臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、甲状腺がん、神経膠芽腫、神経膠腫、白血病、リンパ腫および他の新生物性悪性疾患が挙げられ得る。

【０５４８】

さらに、本明細書に提供される疾患または状態には、本開示の処置の方法を使用してその成長が阻害され得る不応性または再発性の悪性疾患が含まれる。一部の実施形態では、本開示の処置の方法によって処置されるがんは、癌腫、扁平上皮癌、腺癌、肉腫、子宮内膜がん、乳房がん、卵巣がん、子宮頸がん、ファロピウス管がん、原発性腹膜がん、結腸がん、結腸直腸がん、肛門生殖器領域の扁平上皮細胞癌、黒色腫、腎細胞癌、肺がん、非小細胞肺がん、肺の扁平上皮細胞癌、胃がん、膀胱がん、胆嚢がん、肝臓がん、甲状腺がん、喉頭がん、唾液腺がん、食道がん、頭頸部がん、神経膠芽腫、神経膠腫、頭頸部の扁平上皮細胞癌、前立腺がん、膵がん、中皮腫、肉腫、血液がん、白血病、リンパ腫、神経腫、およびそれらの組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、本開示の方法によって処置されるがんには、例えば、癌腫、扁平上皮癌（例えば、子宮頸管、眼瞼、結膜、膣、肺、口腔、皮膚、膀胱、舌、喉頭および食道）および腺癌（例えば、前立腺、小腸、子宮内膜、子宮頸管、大腸、肺、膵臓、食道、直腸、子宮、胃、乳腺および卵巣）が含まれる。一部の実施形態では、本開示の方法によって処置されるがんには、肉腫（例えば、筋原性肉腫）、白血症、神経腫、黒色腫およびリンパ腫がさらに含まれる。一部の実施形態では、本開示の方法によって処置されるがんは、乳房がんである。一部の実施形態では、本開示の処置の方法によって処置されるがんは、三重陰性乳房がん（ＴＮＢＣ）である。一部の実施形態では、本開示の処置の方法によって処置されるがんは、卵巣がんである。一部の実施形態では、本開示の処置の方法によって処置されるがんは、結腸直腸がんである。

【０５４９】

一部の実施形態では、本開示の医薬組成物で処置される患者または患者の集団は、固形

腫瘍を有する。一部の実施形態では、固形腫瘍は、黒色腫、腎細胞癌、肺がん、膀胱がん、乳房がん、子宮頸がん、結腸がん、胆嚢がん、喉頭がん、肝臓がん、甲状腺がん、胃がん、唾液腺がん、前立腺がん、膵がんまたはメルケル細胞癌である。一部の実施形態では、本開示の医薬組成物で処置される患者または患者の集団は、血液がんを有する。一部の実施形態では、患者は、血液がん、例えば、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（「ＤＬＢＣＬ」）、ホジキンリンパ腫（「ＨＬ」）、非ホジキンリンパ腫（「ＮＨＬ」）、濾胞性リンパ腫（「ＦＬ」）、急性骨髄性白血病（「ＡＭＬ」）または多発性骨髄腫（「ＭＭ」）を有する。一部の実施形態では、処置される患者または患者の集団は、卵巣がん、肺がんおよび黒色腫からなる群から選択されるがんを有する。

【０５５０】

本開示に従って予防および／または処置され得るがんの具体的な例としては、これらに限定されないが、以下が挙げられる：腎がん、腎臓がん、多形神経膠芽腫、転移性乳房がん；乳房癌；乳房肉腫；神経線維腫；神経線維腫症；小児腫瘍；神経芽細胞腫；悪性黒色腫；表皮の癌腫；急性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、例えば、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病白血病および骨髄異形成症候群（ｍｙｃｌｏｄｙｓｐｌａｓｔｉｃ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、例えば慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ球性白血病、ヘアリー細胞白血病であるがこれらに限定されない慢性白血病などであるがこれらに限定されない白血病；真性赤血球増加症；ホジキン病、非ホジキン病などであるがこれらに限定されないリンパ腫；くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌型骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫および髄外性形質細胞腫などであるがこれらに限定されない多発性骨髄腫；ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症；意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症；良性単クローン性ガンマグロブリン血症；重鎖病；骨の肉腫、骨髄腫骨疾患、多発性骨髄腫、真珠腫誘導された骨の骨肉腫、骨ページェット病、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫瘍、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟部組織肉腫、血管肉腫（ａｎｇｉｏｓａｒｃｏｍａ）（血管肉腫（ｈｅｍａｎｇｉｏｓａｒｃｏｍａ））、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫および滑膜肉腫などであるがこれらに限定されない骨がんおよび結合組織肉腫；神経膠腫、星細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起神経膠腫、非グリア腫瘍、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽腫および原発性脳リンパ腫などであるがこれらに限定されない脳腫瘍；腺癌、小葉（小細胞）癌、乳管癌、髄様乳房がん、粘液性乳房がん、管状乳房がん、乳頭状乳房がん、ページェット病（若年性ページェット病を含む）および炎症性乳房がんが含まれるがこれらに限定されない乳房がん；褐色細胞腫および副腎皮質癌などであるがこれらに限定されない副腎がん；乳頭状または濾胞性甲状腺がん、髄様甲状腺がんおよび未分化甲状腺がんなどであるがこれらに限定されない甲状腺がん；インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ビポーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍、およびカルチノイドまたは島細胞腫瘍などであるがこれらに限定されない膵がん；クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端巨大症および尿崩症（ｄｉａｂｅｔｅｓ ｉｎｓｉｐｉｕｓ）などであるがこれらに限定されない下垂体がん；眼黒色腫、例えば、虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫および毛様体黒色腫（ｃｉｌｌｉａｒｙ ｂｏｄｙ ｍｅｌａｎｏｍａ）、ならびに網膜芽細胞腫などであるがこれらに限定されない眼がん；膣がん、例えば、扁平上皮細胞癌、腺癌および黒色腫；外陰部がん、例えば、扁平上皮細胞癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫およびページェット病；扁平上皮細胞癌および腺癌などであるがこれらに限定されない子宮頸がん；子宮内膜癌および子宮肉腫などであるがこれらに限定されない子宮がん；卵巣上皮癌、境界腫瘍、胚細胞腫瘍および間質腫瘍などであるがこれらに限定されない卵巣がん；子宮頸癌；扁平上皮がん、腺癌、腺様嚢胞癌（ａｄｅｎｏｉｄ ｃｙｃｔｉｃ ｃａｒｃｉｎｏｍａ）、粘表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、疣状癌および燕麦細胞（小細胞）癌などであるがこれらに限定されない食道がん；腺癌、菌状（ポリポイド）、潰瘍性、表在拡大型、びまん性拡大型、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫および癌肉腫などであるがこれらに限定されない胃がん；結腸がん；結腸直腸がん、ＫＲＡＳ突然変異した

結腸直腸がん；結腸癌；直腸がん；肝細胞癌および肝芽腫などであるがこれらに限定されない肝臓がん、胆嚢がん、例えば、腺癌；乳頭状（ｐａｐｐｉｌｌａｒｙ）、結節性およびびまん性などであるがこれらに限定されない胆管細胞癌；肺がん、例えば、ＫＲＡＳ突然変異した非小細胞肺がん、非小細胞肺がん、扁平上皮細胞癌（類表皮癌）、腺癌、大細胞癌および小細胞肺がん；肺癌；胚腫瘍、セミノーマ、未分化、古典的（典型的）、精母細胞性、非セミノーマ、胚性癌、奇形腫癌、絨毛癌（卵黄嚢腫瘍）などであるがこれらに限定されない精巣がん、アンドロゲン非依存性前立腺がん、アンドロゲン依存性前立腺がん、腺癌、平滑筋肉腫および横紋筋肉腫などであるがこれらに限定されない前立腺がん；陰茎（ｐｅｎａｌ）がん；扁平上皮細胞癌などであるがこれに限定されない口腔がん；基底がん；腺癌、粘表皮癌および腺様嚢胞癌などであるがこれらに限定されない唾液腺がん；扁平上皮細胞がんおよび疣状などであるがこれらに限定されない咽頭がん；基底細胞癌、扁平上皮細胞癌および黒色腫、表在拡大型黒色腫、結節性黒色腫、悪性黒子由来黒色腫、末端黒子型黒色腫などであるがこれらに限定されない皮膚がん；腎細胞がん、腺癌、グラヴィッツ腫瘍、線維肉腫、移行上皮がん（腎盂および／または尿管）などであるがこれらに限定されない腎臓がん；腎癌；ウィルムス腫瘍；移行上皮癌、扁平上皮細胞がん、腺癌、癌肉腫などであるがこれらに限定されない膀胱がん。さらに、がんには、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫（ｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｓａｒｃｏｍａ）、リンパ血管内皮肉腫（ｌｙｍｐｈａｎｇｉｏｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｓａｒｃｏｍａ）、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支原性癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌および乳頭状腺癌が含まれる。

【０５５１】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法によって生成された養子Ｔ細胞による処置は、特定の患者集団の処置に関する。一部の実施形態では、養子Ｔ細胞は、ある特定の治療法に対して不応性である患者の集団の処置に関する。例えば、Ｔ細胞は、抗チェックポイント阻害剤療法に対して不応性である患者の集団の処置に関する。一部の実施形態では、患者は、黒色腫患者である。一部の実施形態では、患者は、転移性黒色腫患者である。一部の実施形態では、切除不能な黒色腫患者を処置する方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、切除不能な黒色腫患者は、本明細書に記載されるＴ細胞療法（例えば、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１）のために選択される。切除不能な黒色腫対象は、腫瘍浸潤リンパ球による治療法の候補でなくてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法によって生成された養子Ｔ細胞による処置は、転移性（ｍｅｔａｓｔａｔｉｃ）および切除不能な黒色腫患者の処置に関する。一部の実施形態では、患者は、抗ＰＤ１療法に対して不応性である。一部の実施形態では、患者は、抗ＣＴＬＡ－４療法に対して不応性である。一部の実施形態では、患者は、抗ＰＤ１療法および抗ＣＴＬＡ－４療法の両方に対して不応性である。一部の実施形態では、治療法は、静脈内投与される。一部の実施形態では、治療法は、注射または注入によって投与される。一部の実施形態では、治療法は、単一の用量、または２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０個の用量を介して投与される。一部の実施形態では、治療組成物または医薬組成物は、約10^{9}個またはそれよりも高い、１用量当たりの細胞の総数を含む。一部の実施形態では、治療組成物または医薬組成物は、10^{10}個またはそれよりも高い、１用量当たりの細胞の総数を含む。一部の実施形態では、治療組成物または医薬組成物は、10^{11}個またはそれよりも高い、１用量当たりの細胞の総数を含む。一部の実施形態では、治療組成物または医薬組成物は、10^{12}個またはそれよりも高い、１用量当たりの細胞の総数を含む。一部の実施形態では、対象には、１用量当たり約10^{10}～約10^{11}個の総細胞を有する本明細書に記載される治療組成物が投与され、細胞は、品質について検証されており、出荷基準に合格している。

【０５５２】

一部の実施形態では、治療用量で黒色腫がん抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞集団を含む医薬組成物をヒト対象に投与することにより、ヒト対象を処置する方法であって、細胞が、対象から得られ、本明細書に記載されているプロセス、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１またはその

一部によってｅｘ　ｖｉｖｏで増大化され、黒色腫がん抗原が、対象のがん細胞によって発現され、がん抗原が、がんネオ抗原を含み、対象が、黒色腫を有する、方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、対象は、転移性黒色腫を有する。一部の実施形態では、対象は、転移性黒色腫を有し、チェックポイント阻害剤による以前の処置に対して不応性である。一部の実施形態では、患者は、抗ＰＤ１および抗ＣＴＬＡ４療法の両方に対して不応性である。

【０５５３】

一部の実施形態では、治療用量で卵巣がん抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞集団を含む医薬組成物をヒト対象に投与することにより、ヒト対象を処置する方法であって、細胞が、対象から得られ、本明細書に記載されているプロセス、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１またはその一部によってｅｘ　ｖｉｖｏで増大化され、卵巣がん抗原が、対象のがん細胞によって発現され、がん抗原が、がんネオ抗原を含み、対象が、卵巣がんを有する、方法が本明細書に提供される。一部の実施形態では、対象は、転移性がんを有する。一部の実施形態では、対象は、転移性卵巣を有し、チェックポイント阻害剤による以前の処置に対して不応性である。一部の実施形態では、患者は、抗ＰＤ１および抗ＣＴＬＡ４療法の両方に対して不応性である。一部の実施形態では、対象は、以前の処置を受けていなくてよい。

【０５５４】

キット

本明細書に記載される方法および組成物は、投与のための使用説明書と一緒に、キット形態で提供され得る。典型的には、キットは、単位剤形でのコンテナ中の所望のネオ抗原治療組成物、および投与のための使用説明書を含み得る。さらなる治療薬、例えば、サイトカイン、リンホカイン、チェックポイント阻害剤、抗体もまた、キット中に含まれ得る。これもまた望まれ得る他のキット成分には、例えば、無菌シリンジ、ブースター投薬量および他の所望の賦形剤が含まれる。

【０５５５】

本明細書に記載される１つまたは複数の方法との使用のためのキットおよび製造品もまた、本明細書に提供される。キットは、１つまたは複数の型の免疫細胞を含有し得る。キットは、本明細書に記載される抗原特異的免疫細胞（例えば、ネオ抗原特異的Ｔ細胞）産生に有用な試薬、ペプチドおよび／または細胞もまた含有し得る。キットは、抗原特異的免疫細胞の作製および送達に必要なアジュバント、試薬および緩衝液をさらに含有し得る。

【０５５６】

キットは、１つまたは複数のコンテナ、例えば、バイアル、管などを受容するように区画化された担体、パッケージまたはコンテナもまた含み得、コンテナの各々は、本明細書に記載される方法において使用される別々のエレメント、例えば、ポリペプチドおよびアジュバントのうち１つを含む。適切なコンテナには、例えば、瓶、バイアル、シリンジおよび試験管が含まれる。コンテナは、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成され得る。

【０５５７】

本明細書に提供される製造品は、包装材料を含有する。医薬品包装材料の例としては、これらに限定されないが、ブリスターパック、瓶、管、バッグ、コンテナ、瓶、ならびに選択された製剤ならびに投与および処置の意図した様式に適切な任意の包装材料が挙げられる。キットは、典型的には、内容物を列挙するラベル、および／または使用のための使用説明書、使用のための使用説明書を含む添付文書を含む。使用説明書のセットもまた含まれ得る。

【０５５８】

実施形態の列挙

１．がんの処置を必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、

（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団

を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップであって、免疫細胞の集団が、ヒト対象由来の生体試料に由来する、ステップと、
（ｂ）ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）ステップ（ｂ）の刺激されたＴ細胞を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）ステップ（ｂ）（ｉｉ）の少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと、
（ｄ）（ｃ）の細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップであって、ステップ（ｃ）の細胞の増大化された集団が、１×１０８～１×１０１１個の総細胞を含む、ステップと
を含む方法。
２．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するための改善されたｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、
実施形態１のステップ（ａ）～（ｃ）と、
（ｄ）腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップであって、ヒト対象が、
（ｉ）切除不能な黒色腫を有するか、
（ｉｉ）ＰＤ－１阻害剤もしくはＰＤ－Ｌ１阻害剤およびＣＴＬＡ－４阻害剤含有レジメンを以前に受けており、疾患進行を有するか、または
（ｉｉｉ）少なくとも３ヶ月間ＰＤ－１阻害剤もしくはＰＤ－Ｌ１阻害剤を受けたことがあるもしくは現在受けており、安定病態もしくは無症候性進行性疾患を有する、ステップと
を含む方法。
３．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するための改善されたｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、
実施形態１のステップ（ａ）と、
（ｂ）ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも２種の異なる腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドをコードするｍＲＮＡ
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
実施形態１のステップ（ｃ）に従って増大化するステップと
を含む方法。
４．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するための改善されたｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、
（ａ）ヒト対象由来の洗浄および／または凍結保存された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）試料から直接的にＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させるステップであって、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＰＢＭＣのＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された集団を形成するステップと、
（ｂ）実施形態１のステップ（ｂ）に従ってインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと
（ｃ）実施形態１のステップ（ｃ）に従って増大化するステップと
を含む方法。
５．（ｂ）が、ポリペプチドまたはｍＲＮＡをコードするポリヌクレオチドを、ステップ

（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団のＡＰＣに導入するステップを含む、実施形態１～４のいずれか１つに記載の方法。
６．導入するステップが、電気穿孔またはヌクレオフェクション処理することを含む、実施形態５に記載の方法。
７．電気穿孔またはヌクレオフェクション処理することが、ステップ（ａ）のＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団のＡＰＣからＴ細胞を分離することなく実行される、実施形態６に記載の方法。
８．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団をヒト対象に投与するステップをさらに含む、実施形態１および３～７のいずれか１つに記載の方法。
９．インキュベートするステップが、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を、第１の期間にわたり、（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）および（ｉｉ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも２種の異なる腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドをコードするｍＲＮＡの存在下でインキュベートすることを含む、実施形態１、２および４～８のいずれか１つに記載の方法。
１０．ｍＲＮＡが、５’キャップを含む、実施形態３または９に記載の方法。
１１．５’キャップが、キャップ－１である、実施形態１０に記載の方法。
１２．ｍＲＮＡが、３’ポリＡテイルを含む、実施形態３または９に記載の方法。
１３．ポリＡテイルが、１２０～１３５ヌクレオチドの長さである、実施形態１２に記載の方法。
１４．少なくとも２種の異なる腫瘍抗原エピトープ配列の第１の腫瘍抗原エピトープ配列が、リンカー配列を介して、少なくとも２種の異なる腫瘍抗原エピトープ配列の第２の腫瘍抗原エピトープ配列に接続されている、実施形態３および９～１３のいずれか１つに記載の方法。
１５．５’キャップが、リンカー配列を介して、少なくとも２種の異なる腫瘍抗原エピトープ配列の腫瘍抗原エピトープ配列に作動可能に連結されている、実施形態１０～１４のいずれか１つに記載の方法。
１６．少なくとも２種の異なる腫瘍抗原エピトープ配列が、単一のポリペプチド鎖として発現される、実施形態３および９～１４のいずれか１つに記載の方法。
１７．インキュベートするステップが、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４および／またはＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を、ＬＰＳおよびＩＦＮγの存在下でインキュベートすることを含む、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の方法。
１８．少なくとも２種の異なる腫瘍抗原エピトープ配列がそれぞれ、８～１２アミノ酸の長さである、実施形態３および９～１７のいずれか１つに記載の方法。
１９．少なくとも２種の異なる腫瘍抗原エピトープ配列がそれぞれ、１５～２５アミノ酸の長さである、実施形態３および９～１７のいずれか１つに記載の方法。
２０．ポリペプチドが、がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０種またはそれよりも多い異なる腫瘍抗原エピトープ配列を含む、実施形態１～１９のいずれか１つに記載の方法。
２１．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団が、１×１０８～１×１０１１個の総細胞を含む、実施形態２～２０のいずれか１つに記載の方法。
２２．ヒト対象が、切除不能な黒色腫を有する、実施形態１～２１のいずれか１つに記載の方法。
２３．ヒト対象が、ＰＤ－１阻害剤またはＰＤ－Ｌ１阻害剤およびＣＴＬＡ－４阻害剤含有レジメンを以前に受けており、疾患進行を有する、実施形態１～２２のいずれか１つに記載の方法。
２４．ヒト対象が、少なくとも３ヶ月間ＰＤ－１阻害剤またはＰＤ－Ｌ１阻害剤を受けたことがあるまたは現在受けており、安定病態　無症候性進行性疾患を有する、実施形態１～２２のいずれか１つに記載の方法。
２５．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ３＋細胞のパー

センテージが、総細胞集団の少なくとも４０％、少なくとも５０％または少なくとも６０％である、実施形態１～２４のいずれか１つに記載の方法。
２６．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも１０％である、実施形態１～２５のいずれか１つに記載の方法。
２７．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも５％である、実施形態１～２６のいずれか１つに記載の方法。
２８．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも１５％である、実施形態１～２７のいずれか１つに記載の方法。
２９．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも２％である、実施形態１～２８のいずれか１つに記載の方法。
３０．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．５％である、実施形態１～２９のいずれか１つに記載の方法。
３１．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも５％である、実施形態１～３０のいずれか１つに記載の方法。
３２．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．１％である、実施形態１～３１のいずれか１つに記載の方法。
３３．ナイーブＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、多くても１５％である、実施形態１～３２のいずれか１つに記載の方法。
３４．エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、少なくとも６０％である、実施形態１～３３のいずれか１つに記載の方法。
３５．エフェクターＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、多くても５％である、実施形態１～３４のいずれか１つに記載の方法。
３６．セントラルメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、少なくとも１０％である、実施形態１～３５のいずれか１つに記載の方法。
３７．ナイーブＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージが、多くても２５％である、実施形態１～３６のいずれか１つに記載の方法。
３８．エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージが、少なくとも６０％である、実施形態１～３７のいずれか１つに記載の方法。
３９．エフェクターＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージが、多くても１０％である、実施形態１～３８のいずれか１つに記載の方法。
４０．セントラルメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージが、少なくとも１５％である、実施形態１～３９のいずれか１つに記載の方法。
４１．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団が、標的細胞の認識後に、サイトカインを産生し、脱顆粒を引き起こす、実施形態１～４０のいずれか１つに記載の方法。

４２．ヒト対象が、抗チェックポイント阻害剤療法に対して不応性である、実施形態１～４１のいずれか１つに記載の方法。
４３．ヒト対象が、１８～７５歳である、実施形態１～４１のいずれか１つに記載の方法。
４４．ヒト対象が、ＢＲＡＦ遺伝子に突然変異を有し、Ｂ－ｒａｆ阻害剤またはＢ－ｒａｆ／ＭＥＫ併用療法を以前に受けている、実施形態１～４３のいずれか１つに記載の方法。
４５．枯渇させるステップが、成熟樹状細胞（ＤＣ）への単球成熟化のステップに付されたことがないヒト対象由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）試料からＣＤ１４＋細胞およびＣＤ２５＋細胞を枯渇させることを含む、実施形態１～４４のいずれか１つに記載の方法。
４６．枯渇させるステップが、成熟樹状細胞（ＤＣ）への単球成熟化のステップに付されたことがないヒト対象由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）試料からＣＤ１１ｂ＋細胞を枯渇させることをさらに含む、実施形態１～４５のいずれか１つに記載の方法。
４７．ステップ（ｂ）および（ｃ）が、２８日間未満で行われる、実施形態１～４６のいずれか１つに記載の方法。
４８．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ８＋Ｔ細胞の総数のＣＤ８＋腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の割合が、生体試料におけるＣＤ８＋Ｔ細胞の総数のＣＤ８＋腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の割合よりも少なくとも２倍高い、実施形態１～４７のいずれか１つに記載の方法。
４９．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞の総数のＣＤ４＋腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の割合が、生体試料におけるＣＤ４＋Ｔ細胞の総数のＣＤ４＋腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の割合よりも少なくとも２倍高い、実施形態１～４８のいずれか１つに記載の方法。
５０．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ８＋Ｔ細胞の少なくとも０．１％が、ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞に由来するＣＤ８＋腫瘍抗原特異的Ｔ細胞である、実施形態１～４９のいずれか１つに記載の方法。
５１．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞の少なくとも０．１％が、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞に由来するＣＤ４＋腫瘍抗原特異的Ｔ細胞である、実施形態１～５０のいずれか１つに記載の方法。
５２．増大化するステップが、（Ａ）刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を、成熟ＡＰＣの第２の集団と接触させることであって、成熟ＡＰＣの第２の集団が、（ｉ）ＦＬＴ３Ｌとインキュベートされており、（ｉｉ）少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を提示する、ことと、（Ｂ）刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を、第２の期間にわたり増大化し、これにより、Ｔ細胞の増大化された集団を形成することとを含む、実施形態１～５１のいずれか１つに記載の方法。
５３．刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を成熟ＡＰＣの第２の集団と接触させるステップに先立ち、成熟ＡＰＣの第２の集団が、ＦＬＴ３Ｌと共に少なくとも１日間インキュベートされている、実施形態５２に記載の方法。
５４．生体試料が、末梢血試料、白血球アフェレーシス試料またはアフェレーシス試料である、実施形態１～５３のいずれか１つに記載の方法。
５５．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を収集するステップ、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を凍結保存するステップ、または腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を含有する医薬組成物を調製するステップをさらに含む、実施形態１～５４のいずれか１つに記載の方法。
５６．インキュベートするステップが、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１４／ＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を、第１の期間にわたり、ＦＬＴ３ＬおよびポリペプチドをコードするＲＮＡの存在下でインキュベートすることを含む、実施形態１～５５のいずれか１つに記載の方法。
５７．がんを有するヒト対象が、生体試料が得られたヒト対象である、実施形態１～５６

のいずれか１つに記載の方法。
５８．ポリペプチドが、８～５０アミノ酸の長さである、実施形態１～５７のいずれか１つに記載の方法。
５９．ポリペプチドが、がんを有するヒト対象のがん細胞によってそれぞれ発現される少なくとも２種の腫瘍抗原エピトープ配列を含む、実施形態１～５８のいずれか１つに記載の方法。
６０．ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させるステップが、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団を、ＣＤ１４結合剤および／またはＣＤ２５結合剤と接触させることを含む、実施形態１～５９のいずれか１つに記載の方法。
６１．枯渇させるステップが、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団からＣＤ１９＋細胞を枯渇させることをさらに含む、実施形態１～６０のいずれか１つに記載の方法。
６２．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するためのｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、
（ａ）抗原提示細胞（ＡＰＣ）およびＴ細胞を含む免疫細胞の集団からＣＤ１１ｂ＋細胞を枯渇させ、これにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１１ｂが枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップであって、免疫細胞の集団が、ヒト対象由来の生体試料に由来する、ステップと、
（ｂ）ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含むＣＤ１１ｂが枯渇された免疫細胞の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、
（ｃ）刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含む、ステップと
を含む方法。
６３．ステップ（ａ）において免疫細胞の集団からＣＤ１４およびＣＤ２５細胞を枯渇させ、これにより、ＣＤ１１ｂ／ＣＤ１４／ＣＤ２５が枯渇された免疫細胞の集団を形成するステップをさらに含む、実施形態６２に記載の方法。
６４．実施形態１～６２のいずれか１つによって産生された腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。
６５．対象の腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を調製するためのｅｘ　ｖｉｖｏ方法であって、
（ａ）ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団を、ＣＤ１４結合剤および／またはＣＤ２５結合剤と接触させることにより、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む対象由来の免疫細胞の集団からＣＤ１４＋細胞および／またはＣＤ２５＋細胞を枯渇させるステップと、
（ｂ）ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋細胞が枯渇されており、ＡＰＣおよびＴ細胞の第１の集団を含む免疫細胞の集団を、第１の期間にわたり、
（ｉ）ＦＭＳ様チロシンキナーゼ３受容体リガンド（ＦＬＴ３Ｌ）、および
（ｉｉ）（Ａ）がんを有するヒト対象のがん細胞によって発現される少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列を含むポリペプチドまたは（Ｂ）ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
の存在下でインキュベートし、これにより、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を形成するステップと、

（ｃ）刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化し、これにより、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団を形成するステップであって、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞が、（ｉ）少なくとも１種の腫瘍抗原エピトープ配列および（ｉｉ）（ｂ）（ｉｉ）のヒト対象のがん細胞またはＡＰＣによって発現されるＭＨＣタンパク質を含む複合体に特異的であるＴ細胞を含み、ｅｘ　ｖｉｖｏで増大化された抗原特異的Ｔ細胞の少なくとも３０％が、エフェクターメモリーＴ細胞を含み、対象が、卵巣がんを有する、ステップと
を含む方法。
６６．ステップ（ｂ）および（ｃ）が、２８日間未満で行われる、実施形態６５に記載の方法。
６７．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも１５％である、実施形態６５または６６に記載の方法。
６８．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも２％である、実施形態６５～６７のいずれか１つに記載の方法。
６９．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．５％である、実施形態６５～６８のいずれか１つに記載の方法。
７０．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも５％である、実施形態６５～６９のいずれか１つに記載の方法。
７１．腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＴＮＦα＋およびＩＦＮγ＋およびＣＤ１０７ａ＋細胞のパーセンテージが、腫瘍抗原特異的Ｔ細胞集団の少なくとも０．１％である、実施形態６５～７０のいずれか１つに記載の方法。
７２．ナイーブＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ＋およびＣＤ４５ＲＡ＋）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、多くても１５％である、実施形態６５～７１のいずれか１つに記載の方法。
７３．エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＤ６２Ｌ－およびＣＤ４５ＲＡ－）である腫瘍抗原特異的Ｔ細胞を含む細胞の増大化された集団におけるＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージが、少なくとも６０％である、実施形態６５～７２のいずれか１つに記載の方法。
７４．Ｔ細胞のｅｘ　ｖｉｖｏで増大化された集団を対象に投与するステップをさらに含む、実施形態６５～７３のいずれか１つに記載の方法。
７５．卵巣がんを有する対象を処置するための方法であって、実施形態６５～７４に記載の方法のいずれか１つによって、刺激されたＴ細胞を含む細胞の集団を増大化するステップと、Ｔ細胞の増大化された集団由来の治療有効数の刺激されたＴ細胞を対象に投与するステップとを含む方法。
７６．卵巣がんを処置するための、実施形態６５～７５に記載の方法のいずれか１つによってｅｘ　ｖｉｖｏで増大化された刺激されたＴ細胞を含む医薬組成物。
【実施例】
【０５５９】
本開示は、以下の具体的な実施例によってより詳細に記載される。以下の実施例は、例示目的のために提供されているのであって、本発明をいずれの様式でも限定することは意図しない。当業者は、本発明に従う代替的実施形態を得るために変更または改変され得る種々の重要でないパラメーターを容易に認識する。本明細書に列挙される全ての特許、特許出願および刊行物は、それらの全体が本明細書に参照により組み込まれる。
実施例の概要：
【０５６０】
以下の実施例１および２は、Ｔ細胞製造プロトコール（プロトコール１およびプロトコール２）の例である。例示的プロトコールの概略図は、図１Ｂおよび図１Ｃに示される。実施例２１～２３は、ＡＰＣを調製するための、これら２つのプロトコールのステップを

示す。実施例１２および１４～１６ならびに表２～５は、プロトコール１および２から得られた結果を要約する。実施例１３は、試験されるプロトコールのパラメーターを記載する。

【０５６１】

実施例３～７および２０は、プロトコール１およびプロトコール２を使用するＣＤ４$^{+}$メモリーＴ細胞増大化およびＣＤ８$^{+}$ナイーブＴ細胞誘導の結果の例である。フローサイトメトリー分析結果は、図２Ｂ、図５ＡおよびＢ、図７、図１０、ならびに図１２～２３に示される。

【０５６２】

実施例８～１１および１６～１９は、本明細書に記載される方法を使用して増大化または誘導されたＴ細胞の特異性、表現型および／または機能を評価するために使用したアッセイの結果の例である。図２５は、Ｔ細胞製造プロセスの一般的概観、ならびにＴ細胞の特異性、表現型および／または機能についてのこれらのアッセイの使用を示す。

（実施例１）

Ｔ細胞製造プロトコール１

【０５６３】

この実施例は、図１ＢおよびＣに例示されるＴ細胞製造プロトコール１の例を提供する。

材料：

ＤＣ培地（ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ）

ＣＤ１４マイクロビーズ、ヒト、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　＃１３０－０５０－２０１

サイトカインおよび／または増殖因子

Ｔ細胞培地（ＡＩＭ　Ｖ＋ＲＰＭＩ　１６４０　ｇｌｕｔａｍａｘ＋血清＋ＰｅｎＳｔｒｅｐ）

ペプチドストック　－　ペプチド（ＨＩＶ　Ａ０２　－　５～１０ペプチド、ＨＩＶ　Ｂ０７　－　５～１０ペプチド、ＤＯＭ　－　４～８ペプチド、ＰＩＮ　－　６～１２ペプチド）１つにつき１ｍＭ

手順：

ステップ１：ＤＣ調製のための単球単離

１．　各ドナーについて期待されるＤＣ収量に基づいて、解凍するＰＢＭＣの近似の数を計算する。

２．　ＰＢＭＣを解凍し、ＤＣ培地中に約１×１０^{6}～１×１０^{8}個の細胞／ｍＬで再懸濁する。

３．　ベンゾナーゼ（ｂｅｎｚｏｎａｓｅ）（１：１０００希釈）を添加し、キャップを緩めてインキュベーター中に置く。

４．　製造業者のプロトコールに従ってＣＤ１４$^{+}$単球濃縮を実施する。

５．　ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０およびポリＩ：Ｃから選択される１種または複数のサイトカインおよび／または増殖因子を含むＤＣ培地中に、１ウェル当たり１×１０^{5}～１×１０^{7}で、濃縮された細胞を６ウェルプレート中にプレーティングする。

ステップ２：ペプチドローディングおよび成熟化

１．　ＤＣを計数し、実験条件に従って１５ｍＬ管中に細胞を分割する；１つの条件につき０．０１～１百万個の細胞。

２．　１２００ｒｐｍで５分間スピンし、５０～４００μＬのＤＣ培地中に再懸濁する。ペプチドを添加し、キャップを緩めてインキュベーター中に０．５～３時間置く。体積を、ペプチド１つにつき１ｍＭの濃度で、ペプチドプールについて計算した。１ウェル当たりＡ０２（５ペプチド）およびＢ０７（５ペプチド）の各別々のプールの体積を、ペプチド１つにつき０．００１～１００μＭの最終濃度になるように添加した。

３．　０．５～３時間後、成熟化ミックスを含有するＤＣ培地２００μＬ～１．５ｍ

Ｌを添加し、細胞を２４ウェルプレートに移す。成熟化ミックスは、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０およびポリＩ：Ｃから選択される１種または複数のサイトカインを含有する。

ステップ３：長期刺激（ＬＴＳ）実験のセットアップ

１．　ＤＣプレートのウェルから全ての培地を注意深く除去し、各ウェルを、２４ウェルディープウェルブロック中の別々のウェルに移す。

２．　０．５～３ｍＬのＴ細胞培地で各ウェルを洗浄し、ディープウェルブロック中でＤＣ培地と合わせる。

３．　１００μＬ～２ｍＬのＴ細胞培地を各ウェルに添加する。

４．　ＤＣを１２００ｒｐｍで５分間スピンダウンする。

５．　全ての上清を除去し、ＤＣを１００μＬ～２ｍＬのＴ細胞培地中に再懸濁し、正しいウェルに戻し移す。

６．　ＰＢＭＣをＴ細胞培地中で解凍し、ＩＬ－７およびＩＬ－１５を含むＴ細胞培地中に0.5×10^{6}～4×10^{6}個の細胞／ｍＬで再懸濁する。

７．　０．５～３ｍＬの調製されたＰＢＭＣを各ウェルに添加する。

ステップ４：ＬＴＳを供給する

培地が黄色いかどうかをグルコースメーターでチェックする。グルコースが高いままの場合、ＩＬ－７およびＩＬ－１５を含む培養物をウェルに供給する。グルコースが低い場合、細胞を６ウェルプレートに増大化させ（４ｍＬ／ウェル）、ＩＬ－１５およびＩＬ－７を補充する。グルコースが非常に低い場合、６ウェルプレート中で６ｍＬ／ウェルに増大化させる。

ステップ５：ＬＴＳを供給する

１～４日毎に培養物を供給し、グルコース濃度が低くなるときは、新鮮なＩＬ－１５／ＩＬ－７を添加し、必要に応じて培養物体積を増大化させる。

ステップ６：再刺激

Ｔ細胞を計数し、ペプチドがロードされたＤＣの新たなバッチに対してステップ３から反復する。残った細胞を分析のために凍結させる。

ステップ７：ＬＴＳを供給する

約１～５日毎に培養物を供給する。

ステップ８：再刺激

Ｔ細胞を計数し、ペプチドがロードされたＤＣの新たなバッチに対してステップ３から反復する。残った細胞を分析のために凍結させる。

ステップ９：ＬＴＳを供給する

１～５日毎に培養物を供給する。

ステップ１０

Ｔ細胞を計数し、分析のために凍結させる。

（実施例２）

Ｔ細胞製造プロトコール２

【０５６４】

このプロトコールは、実施例１に記載されるプロトコールの代替法であり得る。

実施例２は、図１に例示される例示的Ｔ細胞製造プロトコール（プロトコール２）を提供する。

材料：

ＡＩＭ　Ｖ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）

培地１（ＲＰＭＩ　１６４０　ｇｌｕｔａｍａｘ＋血清＋ＰｅｎＳｔｒｅｐ）

培地２（ＡＩＭ Ｖ＋ＲＰＭＩ １６４０ ｇｌｕｔａｍａｘ＋血清＋ＰｅｎＳｔｒｅｐ）

手順：

ステップ１：培地２中の１種または複数のサイトカインを含む２４ウェルプレートの各ウェル中に、４百万個のＰＢＭＣをプレーティングする。１種または複数のサイトカイン

は、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０およびポリＩ：Ｃから選択される。

ステップ２：培地２中でのペプチドローディングおよび成熟化

１．　それぞれのウェル中に、ショートマーについては０．００１～１００μＭ、ロングマーについては０．００１～１００μＭの最終濃度で、目的のストックペプチドプールを作製し（ペプチドなし条件を除く）、混合する。

２．　０．５～３時間インキュベートする。

３．　ストック成熟化カクテルを作製し、インキュベーション後に各ウェルに添加し、混合する。成熟化カクテルは、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－４、ＦＬＴ３Ｌ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＦＮ－α、Ｒ８４８、ＬＰＳ、ｓｓ－ｒｎａ４０およびポリＩ：Ｃから選択される１種または複数のサイトカインを含有する。

ステップ３：ヒト血清を各ウェルに２．５～２０体積％の最終濃度で添加し、混合する。

ステップ４：培地の５０～９０％を、各々０．００５～５００ｎｇ／ｍＬの最終濃度になるようにＩＬ－７およびＩＬ－１５を補充した新鮮な培地１で注意深く置き換える。

ステップ５：培地の５０～９０％を、各々０．００５～５００ｎｇ／ｍＬの最終濃度になるようにＩＬ－７およびＩＬ－１５を補充した新鮮な培地１で、１～５日毎に注意深く置き換える。

ウェルが非供給日にオレンジ色から黄色に変わる場合（透明な培地の場合、グルコース読み出し）、既存の培地の２５～７５％を、新鮮な培地１およびＩＬ－７／ＩＬ－１５と取り換える。

ステップ６：計数および凍結（またはＴ細胞シミュレーションをプロトコール１のステップ８および／もしくはステップ１０に進めるために、以下のステップに進む）。

ステップ１～ステップ６の培養するステップの間に、ペプチドがロードされたＤＣは、プロトコール１「ステップ１」および「ステップ２」中の手順に従って、並行して調製され得る。

Ｔ細胞を計数し、Ｔ細胞を、ペプチドがロードされたＤＣの新たなバッチで刺激する。残った細胞を分析のために凍結させる。Ｔ細胞刺激手順は、プロトコール１「ステップ３」中の手順に従って実施され得る。

ステップ７：Ｔ細胞を計数し、プロトコール１「ステップ３」のＴ細胞刺激手順を、ペプチドがロードされたＤＣの新たなバッチに対して反復する。残った細胞を分析のために凍結させる。

ステップ８：Ｔ細胞を計数し、分析のために凍結させる。

（実施例３）

ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞誘導

【０５６５】

ヒトドナー由来のＰＢＭＣ試料を使用して、プロトコール１またはプロトコール２に従って抗原特異的Ｔ細胞誘導を実施した。ＣＤ８$^{+}$メモリーおよびナイーブＴ細胞誘導を、異なるプロトコールを使用してＴ細胞を製造した後に分析した。細胞試料は、分析のために異なる時点で取り出され得る。ｐＭＨＣマルチマーを、誘導培養物中の抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の割合をモニタリングするために使用し、コンビナトリアルコーディングを使用することによって複数のＴ細胞応答を並行して検出するために使用した。図２は、プロトコール１（ｐｒｏｔ．１）およびプロトコール２（ｐｒｏｔ．２）を使用して長いペプチドまたは短いペプチドで誘導された抗原特異的ＣＤ８$^{+}$メモリーＴ細胞の割合を示す例示的な結果を示す。「バルク」は、誘導に使用したＴ細胞を含有する試料が、ＰＢＭＣ全体であることを示す。「Ｔｒｅｇ$^{-}$」は、誘導に使用したＴ細胞を含有する試料が、ＣＤ２５発現細胞が枯渇されたＰＢＭＣであることを示す。図３は、ショートマー（短い）刺激またはロングマー（長い）による誘導後にフローサイトメトリーによって分析した、ＧＡＳ７ペプチドに対して応答した抗原特異的ＣＤ８$^{+}$ナイーブＴ細胞の割合を示すＴ細胞

応答アッセイの例示的な結果を示す。抗原特異的メモリーＴ細胞およびナイーブＰＩＮ特異的Ｔ細胞の割合における増加が、短期刺激後に観察され得る。「長い」または「ロングマー」は、免疫原として使用される、約１６～２５アミノ酸の長さのペプチドである。「短い」または「ショートマー」は、免疫原として使用される、約８～１２アミノ酸の長さのペプチドである。

（実施例４）

ＣＤ８＋Ｔ細胞誘導

【０５６６】

ＣＤ８＋Ｔ細胞誘導を、異なるプロトコールを使用してＴ細胞を製造した後に分析した。誘導されたＴ細胞を、試験ウェル中で異なる抗原ペプチドと共にインキュベートし、ペプチドに応答したＴ細胞の割合を、フローサイトメトリーによって分析した。ｐＭＨＣマルチマーを、誘導培養物中の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の割合をモニタリングするために使用し、コンビナトリアルコーディングを使用することによって複数のＴ細胞応答を並行して検出するために使用した。ヒット率は、Ｔ細胞が抗原ペプチドに対してどの程度応答性であるかを示すために使用され得る。ヒット率は、試験ウェルの総数で除算した、陽性応答試験ウェルの数として定義される。実験を二連で実施し、ヒット率を二連のウェルで確認した。図４は、プロトコール１（ｐｒｏｔ．１）およびプロトコール２（ｐｒｏｔ．２）を使用する誘導後の、ＨＩＶの短いペプチド、以前に同定されたネオ抗原（ＰＩＮ）の短いペプチド、またはＰＩＮの長いペプチドで誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞の割合を示す結果の例を示す。「ＰＢＭＣ全体」は、誘導に使用したＴ細胞を含有する試料が、ＰＢＭＣ全体であることを示す。「ＣＤ２５－ＰＢＭＣ」は、誘導に使用したＴ細胞を含有する試料から、ＣＤ２５＋細胞が枯渇されていることを示す。長いおよび短い誘導が示される。図６は、２人のヒトドナー由来の、示された長いおよび短い誘導によって誘導されたマルチマー陽性ＣＤ８　Ｔ細胞である細胞の割合を示す例示的な結果を示す。

（実施例５）

ＣＤ４＋Ｔ細胞応答

【０５６７】

以前に同定されたネオ抗原（ＰＩＮ）に対するＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、ｅｘ　ｖｉｖｏ誘導プロトコール、例えば、上記プロトコール１または２を使用して誘導され得る。この実施例では、ＣＤ４＋Ｔ細胞応答を、プロトコール１を使用して抗原特異的様式のＩＦＮγ産生をモニタリングすることによって同定した。図１０は、かかるフローサイトメトリー分析の代表的な例を示す。最後に、野生型ではなく突然変異体ペプチドに対するＣＤ４＋Ｔ細胞応答の特異性を、誘導されたＴ細胞集団を、突然変異体または野生型ペプチドのいずれかで刺激することによって示した（図１１）。

（実施例６）

ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞誘導

【０５６８】

ナイーブＣＤ８＋Ｔ細胞誘導を、プロトコール１またはプロトコール２を使用するＴ細胞製造後にフローサイトメトリーによって分析した。ＰＢＭＣ試料は、ヒトドナー１またはヒトドナー２由来であり、ＰＢＭＣ全体またはＣＤ２５－の枯渇されたＰＢＭＣのいずれかであった。細胞試料を、図１のプロトコールに従って、短いまたは長い誘導後に分析した。異なるペプチドに対する、誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞のナイーブＣＤ８＋応答を分析し、図１２～２３にプロットした。

（実施例７）

ＣＤ８＋ナイーブＴ細胞応答

【０５６９】

実施例１のＴ細胞製造プロトコールは、ナイーブ区画からＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するために首尾よく使用され得る。図７は、２ラウンドの刺激後に健康なドナーにおいて突然変異したエピトープに対して生成された２つのＣＤ８＋Ｔ細胞応答の代表的なフロープロットを示す。さらに、メモリー区画からのＣＤ８＋Ｔ細胞応答は、高い数に増大化され

得る。図８Ａに示される代表的な例では、最大で３ラウンドの刺激後に、全てのＣＤ８$^+$Ｔ細胞のおよそ５０％は、免疫優性エピトープ、ＣＭＶ　ｐｐ６５、ＥＢＶ　ＹＶＬ、ＥＢＶ　ＢＭＬＦ１およびＭａｒｔ－１に特異的であった。誘導されたＣＤ８$^+$メモリー応答は、ペプチドリコールアッセイにおいて多機能性を実証する（脱顆粒およびサイトカイン放出、図８Ｂ）。

（実施例８）

Ｔ細胞のフローサイトメトリー分析

【０５７０】

図５Ａは、プロトコール２を使用して図中に示された条件下で誘導されたＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞のＭＥ－１応答の例示的なフローサイトメトリー分析を示す。図５Ｂは、図中に示されたロングマー誘導下で誘導されたＣＤ８$^+$ナイーブＴ細胞のＭＥ－１応答のフローサイトメトリー分析の例を示す。ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の１２．６％は、長い誘導後に、ＭＥ－１に特異的であることが観察された。

（実施例９）

誘導されたＴ細胞の細胞傷害アッセイ

【０５７１】

細胞傷害アッセイを使用して、誘導されたＴ細胞培養物が抗原発現腫瘍系を死滅させることができるかどうかを評価した。この実施例では、生きている腫瘍細胞および死んだ腫瘍細胞上での活性カスパーゼ３の発現を測定して、早期細胞死および死んだ腫瘍細胞を定量化した。図９では、誘導されたＣＤ８$^+$メモリー応答は、抗原発現腫瘍標的を死滅させることが可能であった。

（実施例１０）

生成されたＣＤ８$^+$Ｔ細胞の表現型分析

【０５７２】

表現型発現を分析するために、１×１０^4～１×１０^{6}個のＴ細胞の各培養物を、０．１～１０％ＦＢＳおよび０．１％アジ化ナトリウムを含有するＰＢＳ（ＦＢＳ－ＰＢＳ）中で洗浄し、１：１００希釈の蛍光色素標識された抗体（ＣＤ４５ＲＡおよびＣＤ６２Ｌ）を含有するＦＢＳ－ＰＢＳ中に再懸濁した。氷上でのインキュベーション後、細胞を洗浄し、フローサイトメトリー分析のために固定した。選択されたＣＤ８$^+$Ｔ細胞培養物が、ＣＤ６２Ｌを発現するがＣＤ４５ＲＡは発現しない場合、種々のペプチドに対するそれらの反応性にかかわらず、選択されたＴ細胞培養物が、ＣＤ８$^+$メモリーＴ細胞サブセットに属することが示され得る。

（実施例１１）

ＣＤ８$^+$Ｔ細胞のサイトカイン産生

【０５７３】

ＣＤ８$^+$Ｔ細胞培養物のサイトカインプロファイルが分析され得る。Ｔ細胞培養物を、抗原ペプチドでパルスした自家ＡＰＣで最初にチャレンジする。サイトカインプロファイルを、ＥＬＩＳＡキット（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆ．）を使用して、定量的に決定した。マイクロタイタープレート（９６ウェル、ＮＵＮＣ　Ｍａｘｉｓｏｒｐ）を、ヒトサイトカイン（ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ）に対する精製されたマウス捕捉モノクローナル抗体（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）０．２～４μｇ／ウェルで、４℃で一晩コーティングした。プレートを洗浄し、非特異的結合部位を、１０％（ｗ／ｖ）胎仔ウシ血清（ＦＢＳ）で０．５～３時間飽和させ、引き続いて洗浄する。上清およびサイトカイン標準を、ＰＢＳで希釈し、二連のウェルに添加する。プレートを、３７℃で１～３時間インキュベートし、ＰＢＳ－Ｔで引き続いて洗浄する。一致したビオチン化された検出抗体を、各ウェルに添加し、室温で１～３時間インキュベートする。洗浄後、アビジンコンジュゲートされた西洋わさびペルオキシダーゼを添加し、０．５～３時間インキュベートした。３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ、Ｓｉｇｍａ）を、発色基質として使用した。光学密度を、ＥＬＩＳＡリーダー（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、Ｃａｌｉｆ．）を使用し

て４５０ｎｍで測定し、サイトカイン濃度を、二重８ポイント検量線を使用するＭｉｃｒｏｐｌａｔｅコンピュータソフトウェア（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）によって定量化した。

（実施例１２）

プロトコール１およびプロトコール２：概要

【０５７４】

この実施例では、プロトコール１およびプロトコール２の刺激プロトコールからの結果の概要が、以下の表に提供される。

【表１】

表１－ プロトコール１および２の結果の概要

		プロトコール１		プロトコール２			
		CD14 枯渇 / CD25 枯渇		CD25 枯渇		CD14 枯渇 CD25 枯渇	FLT3L x3
		LTS 37	LTS 38	LTS 37	LTS 38	LTS 38	LTS 38
CD8 メモリー	バルク増大化倍率	30−1200	20−5000	20−100	5−100	5−100	5−100
	絶対数	1−50x10^6	20−1000x10^6	0.1−1x10^6	2−10x10^6	2−20x10^6	0.5−10x10^6
	機能性	*刺激３で減少*	*刺激３で減少*	*刺激３で維持*	*刺激３で維持*	*刺激３で維持*	*刺激３で維持*
CD8 ナイーブ	ウェル当たりのヒット率	20−40%	0−40%	20−30%	0−20%	10%	0−10%
	ペプチド当たりのヒット率	11 のうち 1〜3	11 のうち 0〜4	11 のうち 2	11 のうち 1	11 のうち 1〜3	11 のうち 1〜2
	絶対数	0.1−1x10^6	−	0.01−0.5x10^6	−	−	−
	機能性	TBD*	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
CD4 ナイーブ	ヒット率/ウェル	78−100%	56%	10−100%	50%	70%	TBD
	ヒット率/ペプチド	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
	絶対数	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD	TBD
	機能性	*優良*	*優良*	*優良*	TBD	TBD	TBD

TBD* = 未定

（実施例１３）

プロトコール１および２のパラメーター試験

【０５７５】
プロトコールのパラメーターを試験するための例示的実験は、小規模で患者試料においてプロトコール１を試験することであり得る。プロトコールのパラメーターを試験するための別の例示的実験は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の機能性を試験すること、および抗原特異的細胞を選別すること、および単一細胞ＲＮＡｓｅｑによって特徴付けすることを含む、以前のバッチにおいて生成されたＴ細胞製品を特徴付けることであり得る。プロトコールのパラメーターを試験するための実験の別の例は、ＤＣ調製の間のポリＩＣＬＣ／ａＣＤ４０Ｌの添加を試験すること、およびＴ細胞濃縮を定量化することであり得る。プロトコールのパラメーターを試験するための別の例示的実験は、死滅アッセイにおいて抗原特異的細胞傷害を評価すること、分化および消耗を測定するためにより広いフローパネルを用いてペプチドリコールアッセイを実施すること、ヒットのサブセットについて感受性（ペプチド滴定）および特異性（ＷＴ　対　突然変異体、プールデコンボリューション）を決定すること、ならびに抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞からのバイスタンダー効果の可能性を除去するためにＣＤ８$^{+}$について濃縮することを含む、誘導されたＣＤ８$^{+}$ナイーブＴ細胞応答の機能性を試験することであり得る。プロトコールのパラメーターを試験するための別の例示的実験は、機能性を調べること、ヒットのサブセットについて感受性（ペプチド滴定）および特異性（ＷＴ　対　突然変異体、プールデコンボリューション）を決定すること、表現型をよりよく理解するために分化および消耗フローパネルを用いてリコールアッセイを実施することであり得る。異なる誘導の表現型を比較すること、異なる区画からの誘導の表現型を比較すること、速度論を試験することを含む、プロトコールのパラメーターを試験するための別の例示的実験は、抗原特異的Ｔ細胞（ＣＤ８$^{+}$メモリー、ＣＤ８$^{+}$ナイーブ、ＣＤ４$^{+}$ナイーブ）を選別すること、および単一細胞ＲＮＡｓｅｑによってプロファイリングすることであり得る。

（実施例１４）
ＣＤ１４および／またはＣＤ２５発現細胞が枯渇されたＴ細胞入力物は、ＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$ナイーブＴ細胞の誘導を改善する

【０５７６】
以下の表２は、ＣＤ１４$^{-}$／ＣＤ２５$^{-}$枯渇が、ＣＤ８$^{+}$ナイーブヒット率を増加させ得、一貫したＣＤ４$^{+}$ヒット率を有し得ることを実証する、プロトコール１のＴ細胞調製方法からの結果を示す。

【表２】

表２－CD14^{-}/CD25^{-}枯渇結果

LTS#33		CD14^{-}	CD25^{-}	CD14^{-}/CD25^{-}
CD8 ナイーブヒット率%	HD34	20	30	50
	HD35	0	0	10
	平均	10	15	30
CD4 ナイーブヒット率%	HD34	100	80	90
	HD35	100	100	100
	平均	100	90	95

（実施例１５）
プロトコール２の使用で有意に改善したＣＤ８$^{+}$ナイーブ誘導

【０５７７】
以下の表３Ａおよび３Ｂは、本明細書に記載されるプロトコール１およびプロトコール２の両方のＴ細胞調製方法からの結果を示す。試験した２人のヒトドナーでは、ＣＤ８$^{+}$ナイーブ誘導は、ＣＤ１４発現細胞の枯渇を使用することと比較して、ＣＤ２５発現細胞の枯渇またはＣＤ２５およびＣＤ１４発現細胞の枯渇を使用して有意に改善した。ＣＤ８$^{+}$ナイーブ誘導は、ＦＬＴ３Ｌ刺激を使用しても有意に改善した。

【表３Ａ－１】

表 3A－HD35 の $CD8^+$ナイーブ誘導結果

	HD35	プロトコール 1(CD25 が枯渇) 1/13 が確認された 7.5%成功率				プロトコール 2(バルク) 3/13 が確認された 23%成功率				プロトコール 2(CD25 が枯渇) 5/13 が確認された 39%成功率			
		19 日目		26 日目		19 日目		26 日目		19 日目		26 日目	
		初期	確認	初期	確認	初期	確認	初期	確認	初期	確認	初期	確認
短いペプチドで誘導	HIV 複製 1												
	HIV 複製 2												
	HIV 複製 3												
	HIV 複製 4											HIV−3 0.226%	HIV−3 0.0203%
	HIV 複製 5	HIV−5＊ 0.0327%	HIV−5＊ 0.0691%	HIV−5	HIV−5	HIV−3 0.496%	HIV−3 0.215%	HIV−3 0.33%	HIV−3 0.0722%				
	PIN 複製 1												
	PIN 複製 2					CSNK1A1 0.135%	CSNK1A1 0.0747%	CSNK1A1 0.219%	CSNK1A1 0.193%				
	PIN 複製 3												
	PIN 複製 4					ME−1 4.15%	ME−1 0.927%	ME−1 12.6%	ME−1 2.34%	GAS7/ACTN4 0.012/0.284%	GAS7/ACTN4 0.076/0.156%	GAS7/ACTN4 0.241/0.376%	GAS7/ACTN4 0.669/0.095%
	PIN 複製 5									ACTN4 0.101%	ACTN4 0.032%		
長い	PIN 長い複製 1									CSNK1A1 0.0342%	CSNK1A1 0.0482%	CSNK1A1 0.0156%	CSNK1A1 0.0265%

【表３Ａ－２】

	PIN長い複製2												
	PIN長い複製3												

【表３Ｂ】

表 3B – HD34 の CD8⁺ナイーブ誘導結果

	HD34	プロトコール 1 0/13 が確認された 0%成功率				プロトコール 2 バルク入力物 2/13 が確認された 15%成功率				プロトコール 2 CD25 枯渇入力物 2/13 が確認された 15%成功率			
		19 日目		26 日目		19 日目		26 日目		19 日目		26 日目	
		初期	確認	初期	確認	初期	確認	初期	確認	初期	確認	初期	確認
短いペプチドで誘導	HIV 複製 1									HIV-5 0.358%	HIV-5 0.789%	HIV-5 1.93%	HIV-5 3.61%
	HIV 複製 2					HIV-3 && HIV-5 0.017/0.098%	HIV-3 && HIV-5 0.013/0.279%	HIV-5 0.05%	HIV-5 0.173%				
	HIV 複製 3												
	HIV 複製 4												
	HIV 複製 5												
	PIN 複製 1									PRDX5 0.33%	PRDX5 0.119%	PRDX5 1.58%	PRDX5 0.549%
	PIN 複製 2												
	PIN 複製 3												
	PIN 複製 4												
	PIN 複製 5												

（実施例１６）

ｐＭＨＣ特異的試薬へのＵＶ媒介性ペプチド交換アッセイ。

【０５７８】

抗原特異的ｐＭＨＣマルチマーを、ＨＬＡ特異的モノマーのＵＶ媒介性ペプチド交換および引き続くマルチマー化を介して生成する。これらを、抗原特異的Ｔ細胞を検出するために使用した。

【０５７９】

条件付きリガンドのＵＶ媒介性切断は、時間依存的であり得る。以下に記載されるセットアップを用いて、ペプチド切断は、１分後に検出され得、およそ１５分後に本質的に完

了し得る。３０～６０分間のインキュベーション時間が、条件付きリガンドと目的のペプチドとの最適な交換を確実にするために、通常使用され得る。ニトロフェニル部分および反応産物の両方が長波長のＵＶ光を吸収するので、タンパク質濃度は、ＵＶ媒介性切断の速度に影響し得る。さらに、路長が、反応スピードに影響を与え得る。ＵＶ曝露の際に形成される空のペプチド受容性ＭＨＣ分子は、目的のＭＨＣリガンドの存在下でＵＶ媒介性切断を実施することによってレスキューされ得る。ほとんどの実験では、ＭＨＣに対して１００倍モル過剰のペプチドが使用される。ＵＶ誘導されたペプチド交換は、２５μｇ／ｍＬのＵＶ感受性ＭＨＣクラスＩ複合体を使用して慣用的に実施される。しかし、ペプチド交換反応は、最大で１００～２００μｇ／ｍＬのＭＨＣクラスＩ濃度で実施され得る。

材料：

【０５８０】

９６ウェルプレート（カタログ番号：６５１２０１ポリプロピレンマイクロプレート９６ウェルＶ型、Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ－ｏｎｅ）

ＵＶランプ長波ＵＶ、３６６ｎｍ、２×８Ｗ（カタログ番号：０２２．９１１５、ＣＡＭＡＧ）またはＵｖｉｔｅｃチューブライト、２×１５Ｗ、３６５ｎｍブラックライトブルーチューブ（モデル　－　ＬＩ２１５ＢＬＢ　サイズＬ×Ｗ×Ｈ　５０５×１４０×１１７ｍｍ）が装着されたＵＶランプ３６６ｎｍ　ＣＡＭＡＧ　ＵＶ　Ｃａｂｉｎｅｔ　３（カタログ番号：０２２．９０７０、ＣＡＭＡＧ）

マイクロタイタープレート用のローター付き遠心分離機。

手順：

１．　９６ウェルプレートにおいて、表４に示されるように、以下の試薬を各ウェルに添加する：

【表４】

表4

試薬	量	最終濃度
PBS	100 μL	適用されない
10×交換ペプチド（PBS中500μM）	12.5 μL	50 μM
10×UV感受性MHCクラスI分子（250μg／mL：ほぼ5μM）	12.5 μL	25 μg/mL（およそ0.5 μM）

２．　ＵＶランプと試料との間の距離およそ５ｃｍで、９６ウェルプレートをＵＶランプ（３６６ｎｍ）下に１時間置く。

３．　プレートを３，３００ｇで５分間スピンする。１００μＬの上清（いずれのペレットを移すことも回避するために、ある角度でプレートを維持する）を、下流の適用のために、新たな９６ウェルプレートに移す。

（実施例１７）

蛍光色素コンジュゲートされたｐＭＨＣマルチマーをアセンブルする

【０５８１】

ＭＨＣクラスＩ複合体は、Ｔ細胞分析のためのＭＨＣクラスＩテトラマーを形成するように、フルオロフォア標識されたストレプトアビジンを用いて複合体化され得る。一般に使用されるフルオロフォアには、アロフィコシアニンおよびフィコエリトリンが含まれ、これらのコンジュゲートを用いたＭＨＣマルチマーの形成は、以下に記載される。しかし、ストレプトアビジンコーティングされた量子ドットまたは任意のストレプトアビジンカップリングされたフルオロフォアもまた、Ｔ細胞検出のためのＭＨＣマルチマーを調製す

るために使用され得る。
材料：
【０５８２】
ＰＥ－ストレプトアビジン溶液１ｍｇ／ｍＬ（カタログ番号：Ｓ８６６、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）またはＡＰＣストレプトアビジン溶液１ｍｇ／ｍＬ（カタログ番号：Ｓ８６８、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）
１００μＬ／ウェル中に２５μｇ／ｍＬのｐＭＨＣを含有する、交換されたＭＨＣクラスＩ複合体を含むマイクロタイタープレート。これは、１ウェル当たり２．５μｇまたは０．０５ｎｍｏｌのＭＨＣクラスＩに対応する。
手順：
１．　ＰＢＳ中２７μｇ／ｍＬのストレプトアビジン－ＰＥの希釈またはＰＢＳ中１４．６μｇ／ｍＬのストレプトアビジン－ＡＰＣの希釈を生成し、ＭＨＣクラスＩの各ウェルについて１００μＬを調製する。
２．　ストレプトアビジン－ＰＥまたは－ＡＰＣを、１０分間隔での２５μＬの４回の逐次的添加によって、ＭＨＣクラスＩに添加する。
（実施例１８）
ＭＨＣマルチマーのコンビナトリアルコーディング
【０５８３】
ＵＶ媒介性ＭＨＣペプチド交換
１．　ビオチン化されたｐ＊ＭＨＣ複合体のストック溶液を氷上で解凍する。
２．　目的のビオチン化されたｐ＊ＭＨＣ複合体をＰＢＳ中に希釈して、２００μｇ／ｍＬにする。６０μＬの体積が、１回の交換反応に必要である。ｐＭＨＣ複合体がＱｄｏｔ５８５にコンジュゲートされるためには、８０μＬが、１回の交換反応に必要である。
３．　ペプチドストックをＰＢＳ中に希釈して４００μＭにする。ペプチド１つにつき最低７０μＬを調製する；ｐＭＨＣ複合体をＱｄｏｔ５８５にコンジュゲートさせるために使用されるペプチドについては、ペプチド１つにつき最低９０μＬを調製する。
４．　Ｖ底を有する９６ウェルポリプロピレンマイクロプレートにおいて、１ウェル当たり６０μＬの、２００μｇ／ｍＬの選択された対立遺伝子のｐ＊ＭＨＣおよび６０μＬの４００μＭペプチド溶液（最終濃度：１００μｇ／ｍＬ　ｐ＊ＭＨＣおよび２００μＭペプチド）を混合する。ｐＭＨＣ複合体がＱｄｏｔ５８５にコンジュゲートされるために、８０μＬの２００μｇ／ｍＬ　ｐ＊ＭＨＣおよび８０μＬの４００μＭペプチド溶液を混合する。
５．　９６ウェルマイクロプレートをＲＴで１時間、ＵＶ光（約３６６ｎｍ）に曝露させる。ＵＶランプまでの距離は、２～５ｃｍとすべきである。
６．　プレートをＲＴで３，３００ｇで５分間遠心分離する。
７．　一時停止点が含まれた場合には、ステップ６を反復し、２×５０μＬの上清を、Ｖ底を有する２つの新鮮な９６ウェルポリプロピレンマイクロプレートに移し、それらを氷上で維持する。ｐＭＨＣ複合体がＱｄｏｔ５８５にコンジュゲートされるために、２×７０μＬを移す。凝集体を移すことは、最終ＭＨＣマルチマー染色の背景を潜在的に増加させるので、底のペレット（目に見えない場合が多い）を移さないように注意する。
８．　ｐＭＨＣモノマーを、蛍光色素－ストレプトアビジンコンジュゲートへのコンジュゲーションによってマルチマー化させる。差次的コンジュゲーションは、以下に記載される：Ｑｄｏｔ６０５－、６２５－、６５５－または７０５－ストレプトアビジンへのコンジュゲーションのためのオプションＡ；Ｑｄｏｔ５８５－ストレプトアビジンへのコンジュゲーションのためのオプションＢ；およびＰＥ－、ＡＰＣ－またはＰＥ－Ｃｙ７－ストレプトアビジンへのコンジュゲーションのためのオプションＣ。
（Ａ）Ｑｄｏｔ６０５－、６２５－、６５５－または７０５－ストレプトアビジンへのコンジュゲーション：（ｉ）５０μＬのｐＭＨＣモノマー当たり、３．５μＬのＱｄｏｔ－ストレプトアビジンコンジュゲート（ストック濃度１μＭ）を添加する（６６ｎＭ

の最終濃度になるように）。

（Ｂ）Ｑｄｏｔ５８５－ストレプトアビジンへのコンジュゲーション：（ｉ）７０μＬのｐＭＨＣモノマー当たり、４．９μＬのＱｄｏｔ５８５－ストレプトアビジンコンジュゲート（ストック濃度１μＭ）を添加する（６６ｎＭの最終濃度になるように）。

（Ｃ）ＰＥ－、ＡＰＣ－またはＰＥ－Ｃｙ７－ストレプトアビジンへのコンジュゲーション：（ｉ）５０μＬのｐＭＨＣモノマー当たり、４．６μＬのＰＥ－、ＡＰＣ－またはＰＥ－Ｃｙ７－ストレプトアビジンコンジュゲート（ストック濃度２００μｇ／ｍＬ）を添加する（１６．８μｇ／ｍＬの最終濃度になるように）。

９．　十分に混合し、氷上で３０分間コンジュゲートさせる。

１０．　Ｄ－ビオチンおよびNaN_3を、２５μＭ　Ｄ－ビオチンおよび０．０２％（重量／体積）NaN_3の最終濃度になるように添加する。２．５μＬの２０倍ストック溶液（０．４％（重量／体積）NaN_3を含む５００μＭ　Ｄ－ビオチン）を各ウェルに添加することによってこれを実施する；Ｑｄｏｔ５８５にコンジュゲートされたＭＨＣマルチマーについては、３．５μＬを各ウェルに添加する。十分に混合し、氷上で２０分間インキュベートする。

１１．　２５μＭ　Ｄ－ビオチンおよび０．０２％（重量／体積）NaN_3を含有する５０μＬのＰＢＳを、ＰＥ、ＡＰＣまたはＰＥ－Ｃｙ７にコンジュゲートされたＭＨＣマルチマーに添加する（２倍希釈）。

１２．　異なる複合体を混合する。混合する場合、Ｑｄｏｔ５８５の、全ての他の色の複合体に対する２：１の比を使用する。全ての他の色の複合体を、１：１の比で混合する。

ＭＨＣマルチマーによるＴ細胞染色

１３．　２７色全ての組合せのために、ＭＨＣマルチマーを混合して、１つのすぐに使用できる試料を得、それを４℃で３，３００ｇで５分間遠心分離し、上清を移す。合計で５４μＬの上清が、各Ｔ細胞染色に要求される（すなわち、各個々のｐＭＨＣ複合体について２μＬが、ミックス中に存在する）。

１４．　ＰＢＭＣ試料（または他の関連するＴ細胞試料）を解凍し、それらをＲＰＭＩで２回洗浄する。解凍する際には、細胞の凝固を低減させるために、ＤＮアーゼで処置することが推奨される（例えば、０．０２５ｍｇ／ｍＬ　Ｐｕｌｍｏｚｙｍｅおよび２．５ｍＭ　$MgCl_2$を含有する培地中で細胞を解凍することによる）。

１５．　２％（体積／体積）ＦＢＳを含むＰＢＳ（ＦＡＣＳ緩衝液）中に細胞を再懸濁し、２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液中に１ウェル当たり3×10^6個の細胞になるまで、それらを９６ウェルポリスチレンＵ底マイクロプレートに分配する。

１６．　プレートをＲＴで４９０ｇで５分間スピンする。

１７．　プレートをひっくり返すことによって緩衝液を捨てる　－　細胞は、ウェルの底にペレットとして残る。

１８．　ステップ１３からの５４μＬのＭＨＣマルチマーを添加し、十分に混合する。

１９．　３７℃で１５分間インキュベートする。

２０．　プレートを氷上に動かし、５×ストックからの２０μＬの抗体ミックスを添加する。

２１．　近ＩＲ死細胞染料の４０倍希釈４μＬを添加し、十分に混合する。

２２．　氷上で３０分間インキュベートする。

２３．　プレートを４℃で４９０ｇで５分間スピンする。

２４．　プレートをひっくり返すことによって上清を捨てる。

２５．　２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄する（４℃で４９０ｇで５分間、２回遠心分離し、各スピンの後に、プレートをひっくり返して上清を除去する）。

２６．　５０～１００μＬのＦＡＣＳ緩衝液中にペレットを再懸濁し、それを１．４ｍＬまたは５ｍＬのＦＡＣＳ管に移す。試料はこのとき、フローサイトメーター上での獲得の準備ができている。

単色補償対照

２７．　１００μＬのＦＡＣＳ緩衝液および一滴の陰性補償ビーズを１１個のＦＡＣＳ管（番号１～１１）に添加する。

２８．　一滴の抗マウスＩｇ－κ補償ビーズを、ステップ２７からの管１～１０に添加し、一滴のＡｒＣアミン反応性ビーズを新たな管（番号１２）に添加する。

２９．　５μＬの１ｍｇ／ｍＬ抗ＣＤ８－ビオチンを管１～８に添加し、混合する。

３０．　管１～８を氷上で２０分間インキュベートする。

３１．　管１～８を２ｍＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄する（４℃で４９０ｇで５分間遠心分離する）。

３２．　１μＬの近ＩＲ死細胞染料を管１２（ステップ２８から）に添加する；混合し、ＲＴで３０分間暗中でインキュベートする。

３３．　ストレプトアビジン－蛍光色素コンジュゲートを１０倍希釈し（Ｑｄｏｔ５８５を除く）、各々５μＬを管１～７に添加し、１μＬの未希釈のＱｄｏｔ５８５－ストレプトアビジンを管８に添加し、次いで、氷上で２０分間暗中でインキュベートする。

３４．　５μＬのＦＩＴＣ抗体（ダンプチャネル抗体のうち１つを使用する）または５μＬのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　７００　抗ＣＤ８ａ抗体を管９および１０（ステップ２８から）に添加する；氷上で２０分間暗中でインキュベートする。

３５．　管１～１１を２ｍＬのＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、管１２を２ｍＬのＰＢＳで２回洗浄する（４℃で４９０ｇで５分間遠心分離する）。

３６．　１５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液中に全ての管を再懸濁する。一滴のＡｒＣ陰性ビーズを管１２に添加し、混合する。補償対照は、フローサイトメーター上での獲得の準備ができている。

ゲーティング戦略

３７．　リンパ球に対して最初にゲートし、単一の細胞（ＦＳＣ－α、ＦＳＣ－Ｗ）、生細胞、ダンプチャネル陰性細胞およびＣＤ８$^{+}$細胞に対して引き続いてゲートする。

３８．　８つの異なるＭＨＣマルチマーチャネルにおいて陽性事象を定義する別々のゲートを描く。

３９．　８つのＭＨＣマルチマー陽性ゲートを反転させて、各ＭＨＣマルチマーチャネルについてＣＤ８$^{+}$かつＭＨＣマルチマー陰性の細胞を選択する８つのゲートを得る。

４０．　２つのＭＨＣマルチマー陽性集団についてのゲートを、他の６つのＭＨＣマルチマー集団の各々についての反転させたゲートと交差させる。ゲートのこの組合せは、２つのＭＨＣマルチマーチャネルおよび２つのＭＨＣマルチマーチャネルのみにおいて陽性であるＣＤ８$^{+}$細胞について選択する（すなわち、細胞が１つのまたは３つもしくはそれよりも多くのＭＨＣマルチマーチャネルにおいて陽性である場合、それはゲートアウトされる）。かかるゲートの例は、ＰＥ$^{+}$およびＡＰＣ$^{+}$およびＰＥ－Ｃｙ７$^{-}$およびＱｄｏｔ５８５$^{-}$およびＱｄｏｔ６０５$^{-}$およびＱｄｏｔ６２５$^{-}$およびＱｄｏｔ６５５$^{-}$およびＱｄｏｔ７０５$^{-}$である。

４１．　これらの交差させたゲート（ステップ４０に記載される）を、ＭＨＣマルチマーの２８全ての可能な二色組合せについて作製する。

４２．　ステップ４１からの２８全てのゲート（例えば、ゲート１またはゲート２または…またはゲート２８）を連結する。

４３．　ステップ３９からの８つの反転させたゲート（ＰＥ$^{-}$およびＡＰＣ$^{-}$およびＰＥ－Ｃｙ７$^{-}$およびＱｄｏｔ５８５$^{-}$およびＱｄｏｔ６０５$^{-}$およびＱｄｏｔ６２５$^{-}$およびＱｄｏｔ６５５$^{-}$およびＱｄｏｔ７０５$^{-}$）を交差させる。

４４．　ステップ４２および４３からの２つのゲートを連結する。

４５．　ステップ４４においてゲートされた事象を示す、全ての可能な二色コードを用いて２８のドットプロットを作製する。これらのプロットは、全てのＭＨＣマルチマーについて陰性であるまたは２つについて陽性であるＣＤ８$^{+}$細胞のみを示す；全ての背景事象は、ゲートアウトされる。

４６．　全てのＣＤ８$^{+}$細胞を示す、全ての可能な二色コードを用いて２８のドットプロットもまた作製する。これらのプロットは、試料中の背景レベルの良好な指標を提供

し、不適切な補償を明らかにするためにも使用され得る。背景から応答を分離する経験を積むために、これらの「非ゲート」プロットを、ゲートされたプロットと比較することが推奨される。これは、低強度集団のために特に重要であり得る。

（実施例１９）

蛍光細胞バーコード化

【０５８４】

細胞バーコード化が、フローサイトメトリーによる多重化した表現型および機能的分析を実施するために使用され得る。ホスホフロー（ｐｈｏｓｐｈｏ　ｆｌｏｗ）が、ＦＣＢ標識を含める僅かな改変を伴って実施され得る。ホルムアルデヒド固定後に、試料を、示された濃度のＡｌｅｘａ　ＦｌｕｏｒまたはＰａｃｉｆｉｃ　Ｂｌｕｅスクシンイミジルエステルを含有する１００％の２０～２５℃メタノール（典型的には、10^6個の細胞当たり５００μＬ）中に再懸濁し、各試料は、異なる濃度の蛍光色素を受ける。一部の例では、試料は、メタノール中に再懸濁され得、次いで、ＤＭＳＯ中に（典型的には１：５０希釈で）溶解させたＦＣＢフルオロフォアが添加される。これは、９６ウェルプレート実験に必要なＤＭＳＯ中でのＦＣＢ染色マトリックスの事前の調製および貯蔵を可能にするために実施され得る。２０～２５℃で１５分間標識した後、細胞を、染色培地（０．５％ＢＳＡおよび０．０２％アジ化ナトリウムを含有するリン酸緩衝食塩水（ｐＨ７．０））で２回洗浄する。４℃またはそれよりも低い温度での標識は、非常に低い標識強度を生じ得、ＦＣＢ染色レベルを増加させることなしに、メタノール染色溶液中で－８０℃での試料の貯蔵を可能にする。

【０５８５】

差次的に標識された試料を、１つのＦＡＣＳ管またはウェルへと合わせ、得られた体積が１００μＬよりも大きい場合、再度ペレット化する。合わせたバーコード化された試料（典型的には１００μＬ）を、リン酸化特異的および／または表面マーカー抗体で染色し、洗浄し、フローサイトメトリーによって分析する。フローサイトメトリーは、Ｃａｓｃａｄｅ　Ｙｅｌｌｏｗのための４０５ｎｍ八角形バンドパスフィルターを、Ｑｕａｎｔｕｍ　Ｄｏｔ　６０５の検出のための６１０／２０バンドパスフィルターで置き換えて、４０５ｎｍ、４８８ｎｍおよび６３３ｎｍのレーザー、ならびに製造業者のストックフィルターを備えたＢＤ　ＬＳＲ２フローサイトメーターで実施され得る。

（実施例２０）

ＣＤ４$^+$ナイーブ誘導

【０５８６】

プロトコール１および２を、ＰＩＮペプチドを使用して実施した。抗原特異的ＣＤ４$^+$ナイーブ誘導を評価した。結果は、以下の表５で見ることができる。「Ｙ」は、Ｔ細胞応答が観察されたことを示す。

【表５】

表５－ ドナー1 および 2 の $CD4^+$ナイーブ誘導結果

長期誘導読み出し		ドナー2			ドナー1		
LTS#35		プロトコール 1 ($CD25^-$)	プロトコール 2 PBMC 全体	プロトコール 2 $CD25^-$	プロトコール 1 ($CD25^-$)	プロトコール 2 PBMC 全体	プロトコール 2 $CD25^-$
長いペプチドで誘導	PIN 複製 1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	PIN 複製 2	Y	Y	Y	Y	–	–
	PIN 複製 3	–	Y	Y	Y	Y	–
結果		2/3 66%	3/3 100%	3/3 100%	3/3 100%	2/3 66%	1/3 33%

（実施例２１）

製造プロセス：ＤＣ派生

【表６】

表６－ DC 派生のために準拠した例示的なプロトコール

ステップ 1	単球濃縮および DC 培養	自家細胞 アフェレーシスバッグ#1
ステップ 2		単球濃縮
ステップ 3		DC 培養
ステップ 4	ペプチドローディングおよび DC 成熟化	DC 収集、DC 培地における再懸濁
ステップ 5		患者特異的ペプチドの添加およびインキュベーション
ステップ 6		DC 成熟化

（実施例２２）

Ｔ細胞誘導プロトコール１

【表７Ａ】

表 7A－T 細胞誘導#1

ステップ 7	自家細胞 アフェレーシスバッグ#2
ステップ 8	$CD25^+$枯渇($^+$/– $CD14^+$枯渇)
ステップ 9	DC 洗浄および T 細胞培養培地における再懸濁
ステップ 10	T 細胞と成熟した DC(DC 派生由来)とのインキュベーション

【表７Ｂ】

表 7B－T 細胞誘導#2

ステップ 11	T 細胞洗浄および T 細胞培地における再懸濁
ステップ 12	T 細胞と成熟した DC(DC 派生由来)とのインキュベーション

【表７Ｃ】

表 7C – T 細胞誘導#3

ステップ 11	T 細胞洗浄および T 細胞培地における再懸濁
ステップ 12	T 細胞と成熟した DC(DC 派生由来)とのインキュベーション

【表７Ｄ】

表 7D – 収集&凍結保存

ステップ 15		T 細胞収集	リリース検査:マイコプラズマ
ステップ 16	原薬	洗浄および最終製剤における懸濁	リリース検査:無菌性、エンドトキシン、細胞表現型、TNC 計数、生存度、細胞濃度
ステップ 17	薬物製品	DS 充填および凍結保存 液体窒素の気相に貯蔵	

（実施例２３）

T 細胞誘導プロトコール２

【表８Ａ】

表 8A – T 細胞誘導#1

ステップ 7	自家細胞 アフェレーシスバッグ#2
ステップ 8	$CD25^{+}$枯渇($^{+}$/– $CD14^{+}$枯渇)
ステップ 8a	FLT3L を添加
ステップ 9	患者特異的ペプチドの添加およびインキュベーション
ステップ 10	枯渇された PMBC と FLT3L およびペプチドとのインキュベーション

【表８Ｂ】

表 8B – T 細胞誘導#2

ステップ 11	T 細胞洗浄および T 細胞培地における再懸濁
ステップ 12	T 細胞と成熟した DC(DC 派生由来)とのインキュベーション

【表８Ｃ】

表 8C – T 細胞誘導#3

ステップ 11	T 細胞洗浄および T 細胞培地における再懸濁
ステップ 12	T 細胞と成熟した DC(DC 派生由来)とのインキュベーション

【表９】

表９－ 収集&凍結保存

ステップ 15		Ｔ細胞収集	リリース検査:マイコプラズマ
ステップ 16	原薬	洗浄および最終製剤における懸濁	リリース検査:無菌性、エンドトキシン、細胞表現型、TNC 計数、生存度、細胞濃度
ステップ 17	薬物製品	原薬充填および凍結保存 液体窒素の気相に貯蔵	

（実施例２４）

多重化マルチパラメーターフローサイトメトリーを使用する、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋ネオ抗原特異的Ｔ細胞応答の同時検出および機能的特徴付け

【０５８７】

タンパク質コード遺伝子配列を変更する体細胞突然変異からがん細胞において生じるネオ抗原は、免疫療法のための魅力的な標的として浮上してきている。これらは、健康な組織とは対照的に腫瘍細胞上で特有に発現され、免疫系によって外来抗原として認識されて、免疫原性を増加させ得る。Ｔ細胞製造プロセスを開発して、複数ラウンドのｅｘ－ｖｉｖｏ Ｔ細胞刺激を介して、患者特異的ネオ抗原に対するメモリーならびにｄｅ ｎｏｖｏ ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞応答を生じさせて、養子細胞療法における使用のためのネオ抗原反応性Ｔ細胞製品を生成した。刺激されたＴ細胞製品の詳細な特徴付けは、これらのプロセスが利用する多くの潜在的変数を試験するために使用され得る。

【０５８８】

Ｔ細胞の機能性および／または特異性を探索するために、アッセイを開発して、抗原特異的Ｔ細胞応答を同時に検出し、それらの大きさおよび機能を特徴付けた。このアッセイは、以下のステップを用いた。第１のＴ細胞－ＡＰＣ共培養を使用して、抗原特異的Ｔ細胞における反応性を惹起した。必要に応じて、蛍光細胞バーコード化を使用する試料多重化を用いた。抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を同定するためおよびＴ細胞機能性を試験するために、ペプチド－ＭＨＣマルチマーの染色ならびにマルチパラメーター細胞内および／または細胞表面細胞マーカー染色を、ＦＡＣＳ分析を使用して同時に探索した。この無駄のないアッセイの結果は、健康なドナーから誘導されたＴ細胞応答を研究するためのその適用を実証した。ペプチドに対して誘導されたネオ抗原特異的Ｔ細胞応答が、健康なドナーにおいて同定された。誘導されたＴ細胞応答の大きさ、特異性および機能性もまた比較した。図２５および図２６は、Ｔ細胞試料の細胞マーカープロファイルおよびＭＨＣテトラマー染色の同時分析のための例示的なプロセスを示す。

【０５８９】

簡潔に述べると、異なるＴ細胞試料を、異なる濃度の異なる蛍光色素でバーコード化した（例えば、実施例１９を参照のこと）。各試料は、異なる濃度の蛍光色素、または異なる濃度の複数の色素の組合せを受けた。試料を、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）中に再懸濁し、次いで、ＤＭＳＯ中に（典型的には１：５０希釈で）溶解させたフルオロフォアを添加して、５μＭの最大最終濃度にした。３７℃で５分間標識した後、過剰な蛍光色素を、タンパク質含有培地（例えば、１０％のプールされたヒトＡＢ型血清を含有するＲＰＭＩ培地）の添加によってクエンチした。一意にバーコード化されたＴ細胞培養物を、上記のように抗原ペプチドでパルスした自家ＡＰＣでチャレンジした。

【０５９０】

差次的に標識された試料を、１つのＦＡＣＳ管またはウェルへと合わせ、得られた体積が１００μＬよりも大きい場合、再度ペレット化した。合わせたバーコード化された試料（典型的には１００μＬ）を、ＬＡＭＰ－１を含む表面マーカー抗体で染色し（例えば、

実施例１１を参照のこと）、アセンブルされた蛍光色素コンジュゲートされたペプチド－ＭＨＣマルチマーと共にインキュベートした（例えば、上記実施例１７および１８を参照のこと）。固定および透過処理の後、試料を、ＴＮＦ－αおよびＩＦＮ－γを標的化する抗体でさらに細胞内染色した。

【０５９１】

次いで、合わせたバーコード化されたＴ細胞試料の細胞マーカープロファイルおよびＭＨＣテトラマー染色を、フローサイトメーターでのフローサイトメトリーによって同時に分析した。Ｔ細胞試料の細胞マーカープロファイルおよびＭＨＣテトラマー染色を別々に分析する他の方法とは異なり、この実施例に記載されるＴ細胞試料の細胞マーカープロファイルおよびＭＨＣテトラマー染色の同時分析は、抗原特異的でありかつ増加した細胞マーカー染色を有するＴ細胞のパーセンテージについての情報を提供する。Ｔ細胞試料の細胞マーカープロファイルおよびＭＨＣテトラマー染色を分析する他の方法は、抗原特異的である試料のＴ細胞のパーセンテージを別々に決定し、増加した細胞マーカー染色を有するＴ細胞のパーセンテージを別々に決定し、これらの頻度の相関のみを可能にする。この実施例に記載されるＴ細胞試料の細胞マーカープロファイルおよびＭＨＣテトラマー染色の同時分析は、抗原特異的Ｔ細胞の頻度と増加した細胞マーカー染色を有するＴ細胞の頻度との相関には依存しない；むしろ、抗原特異的でありかつ増加した細胞マーカー染色を有するＴ細胞の頻度を提供する。この実施例に記載されるＴ細胞試料の細胞マーカープロファイルおよびＭＨＣテトラマー染色の同時分析は、単一細胞レベルでの決定を可能にし、それらの細胞は、抗原特異的でありかつ増加した細胞マーカー染色を有する。

【０５９２】

所与の誘導プロセスの成功を評価するために、リコール応答アッセイと、その後の多重化マルチパラメーターフローサイトメトリーパネル分析とを使用した。誘導培養物から採取した試料を、一意の二色蛍光細胞バーコードで標識した。標識された細胞を、抗原がロードされたＤＣまたはロードされていないＤＣ上で一晩インキュベートして、抗原特異的細胞における機能的応答を刺激した。次の日、一意に標識された細胞を、以下の表１０に従って、抗体およびマルチマー染色の前に合わせた。

【表１０】

表 10 – アッセイ標的(マーカー)、蛍光色素および目的

マーカー	蛍光色素	目的
CD19/CD16/CD14	BUV395	細胞排除
生/死	近赤外線	死細胞排除
CD3	BUV805	系列ゲーティング
CD4	Alexa Fluor 700	系列ゲーティング
CD8	PerCP-Cy5.5	系列ゲーティング
バーコード 1	CFSE	試料マルチプレックス化
バーコード 2	TagIT Violet	試料マルチプレックス化
マルチマー1	PE	CD8+抗原特異性
マルチマー2	BV650	CD8+抗原特異性
IFN γ	APC	機能性
TNF α	BV711	機能性
CD107a	BV786	細胞傷害
4-1BB	PE/Dazzle 594	活性化

【０５９３】

別々にまたは混合物として獲得された、標識によって多重化した試料を完全にデコンボリュートする能力を決定した（図２７Ａ）。一意に標識された試料を、他のバーコードへの最小～全くない交差夾雑を伴って完全に分解することができた。マルチマー染色による抗原特異的ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の検出は、試料多重化で維持された。ＣＭＶ　ｐｐ６５、ＥＢＶ　ＢＲＬＦ１、ＥＢＶ　ＢＭＬＦ１および／またはＭＡＲＴ－１に対する特異性を有する約２０％のＣＤ８$^+$Ｔ細胞を含有する誘導培養物の試料を、分割し、９つの一意の二色バーコードで標識し、次いで、同じ二色組合せ（ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　ｖｉｏｌｅｔ　６５０［ＢＶ６５０］およびフィコエリトリン［ＰＥ］）で４つ全ての特異性を標的化するテトラマーによる染色のために合わせた（図２７Ｂ）。９つ全てのバーコードが、匹敵するテトラマー染色パターンを生じ、テトラマー$^+$細胞の頻度を検出した。

【０５９４】

ｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ４$^+$Ｔ細胞応答を含有する２つの誘導された培養物の試料もまた、バーコード化なしに単独で、または無関係の試料と混合して、リコール応答アッセイにおいて分析した（図２８Ａおよび図２８Ｂ）。機能の数および細胞から惹起された応答の大きさは、試料バーコード化で有意に変化しなかった。

【０５９５】

誘導されたＣＤ８＋メモリー応答の特異性および機能性の同時分析は、ＣＭＶ　ｐｐ６５、ＭＡＲＴ－１ならびにＥＢＶ　ＢＲＬＦ１およびＢＭＬＦ１エピトープに対するＣＤ８$^+$メモリー応答が、健康なドナー出発材料中の０．２３％のＣＤ８$^+$Ｔ細胞から、６０％超まで上昇され得ることを実証した（図２９Ａ）。

【０５９６】

ＣＤ８$^+$マルチマー$^+$細胞に対して事前ゲーティングすることによって、抗原特異的Ｔ細胞の機能を、選択的に調べた（図２９Ｂ）。細胞は、抗原がロードされたＤＣへの曝露

の際に、細胞傷害性機能（ＣＤ１０７ａ表面曝露）およびＩＦＮγ分泌を示した。

【０５９７】

同じ培養物中の複数の特異性を有するｄｅ　ｎｏｖｏ誘導されたＣＤ４$^{+}$応答の検出および機能的特徴付けもまた実証された。抗原特異的機能性を利用して、誘導されたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答を同定した（図３０Ａ）。示された例では、誘導は、ＨＩＶ陰性の健康なドナーにおけるナイーブ標的である１０個のＨＩＶ由来エピトープを標的化する４つの複製培養物において実施した。抗原特異的応答が、４つ全ての生物学的複製において検出された。検出された応答のうち３つを、プールデコンボリューションによるさらなる追跡のために選択して、誘導された応答の特異性を同定した（図３０Ｂ）。複数の応答が、試験した各複製において検出され、同じ２つのエピトープ（ＨＩＶ＃５およびＨＩＶ＃７）が、各場合において、最も高い大きさの応答を誘導した。いずれの理論にも束縛されないが、これは、ＭＨＣクラスＩＩハプロタイプに起因したこのドナーにおけるこれらのエピトープのより高い免疫原性、またはナイーブレパートリー中の、これらのエピトープを標的化するＴ細胞のより高い前駆体頻度を反映し得る。抗原に対する感受性を、ＤＣローディングの間のペプチド滴定によって、３つの選択された応答について決定した（図３０Ｃ）。ＨＩＶ＃５、ＨＩＶ＃６およびＨＩＶ＃４に対する応答は、それぞれ０．４５μＭ、０．４３μＭおよび９．１μＭのＥＣ$_{50}$を実証した。

（実施例２５）

Ｔ細胞製造プロトコール３

材料：

ＡＩＭ　Ｖ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）

ヒトＦＬＴ３Ｌ、前臨床ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ　＃１４１５－０５０　ストック　５０ｎｇ／μＬ

ＴＮＦ－α、前臨床ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ　＃１４０６－０５０　ストック　１０ｎｇ／μＬ

ＩＬ－１β、前臨床ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ　＃１４１１－０５０　ストック　１０ｎｇ／μＬ

ＰＧＥ１またはアルプロスタジル　－　Ｃａｙｍａｎ、Ｃｚｅｃｈ　ｒｅｐｕｂｌｉｃ　ストック　０．５μｇ／μＬ

Ｒ１０培地　－　ＲＰＭＩ　１６４０　ｇｌｕｔａｍａｘ＋１０％ヒト血清＋１％ＰｅｎＳｔｒｅｐ

２０／８０培地　－　１８％ＡＩＭ　Ｖ＋７２％ＲＰＭＩ　１６４０　ｇｌｕｔａｍａｘ＋１０％ヒト血清＋１％ＰｅｎＳｔｒｅｐ

ＩＬ７　ストック　５ｎｇ／μＬ

ＩＬ１５　ストック　５ｎｇ／μＬ

手順：

ステップ１：２ｍＬのＡＩＭ　Ｖ培地中にＦＬＴ３Ｌを含む２４ウェルプレートの各ウェル中に、５百万個のＰＢＭＣ（または目的の細胞）をプレーティングする。

ステップ２：ＡＩＭＶ中でのペプチドローディングおよび成熟化

１．　目的のペプチドプール（ペプチドなし条件を除く）を、それぞれのウェル中でＰＢＭＣ（または目的の細胞）と混合する。

２．　０．５～４時間インキュベートする。

３．　インキュベーション後に、成熟化カクテル（ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１およびＩＬ－７を含む）を各ウェルに混合する。

ステップ３：ヒト血清を、１０体積％の最終濃度で各ウェルに添加し、混合する。

ステップ４：培地を、ＩＬ７＋ＩＬ１５を補充した新鮮なＲＰＭＩ＋１０％ＨＳ培地で置き換える。

ステップ５：培地を、インキュベーションの期間の間、１～６日毎に、ＩＬ７＋ＩＬ１５を補充した新鮮な２０／８０培地で置き換える。

ステップ６：２ｍｌのＡＩＭ　Ｖ培地中にＦＬＴ３Ｌを含む新たな６ウェルプレートの各ウェル中に、５百万個のＰＢＭＣ（または目的の細胞）をプレーティングする。

ステップ７：ペプチドローディングおよび再刺激のための成熟化－（新たなプレート）

１．　目的のペプチドプール（ペプチドなし条件を除く）を、それぞれのウェル中でＰＢＭＣ（または目的の細胞）と混合する。
２．　１時間インキュベートする。
３．　インキュベーション後に、成熟化カクテルを各ウェルに混合する。
ステップ８：再刺激：
１．　第１の刺激ＦＬＴ３Ｌ培養物を計数し、５百万個の培養細胞を、新たな再刺激プレートに添加する。
２．　培養物体積を５ｍＬにし（ＡＩＭ　Ｖ）、５００μＬのヒト血清（１０体積％）を添加する。
ステップ９：３ｍｌの培地を除去し、ＩＬ７＋ＩＬ１５を補充したＲＰＭＩ＋１０％ＨＳ培地６ｍｌを添加する。
ステップ１０：培地の７５％を、ＩＬ７＋ＩＬ１５を補充した新鮮な２０／８０培地で置き換える。
ステップ１１：必要に応じて、再刺激を反復する。
（実施例２６）
Ｔ細胞製造プロトコール３を使用した実験データ
【０５９８】
Ｔ細胞を、Ｔ細胞製造プロトコール３を使用して調製し、刺激されたＴ細胞を分析した。試料を、黒色腫を有する２人の患者から得た。Ｔ細胞を、実施例２４に記載されたものと類似のアッセイを使用して分析した。図３４は、黒色腫を有する２人の患者から誘導されたＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を定量化するｐＭＨＣマルチマープロットを示す。本明細書で使用される場合、ＮＥＯ－ＳＴＩＭは、Ｔ細胞製造プロトコールを指す。図３５は、１、２、３または４つの機能の組合せによって示される、黒色腫を有する患者において誘導されたメモリーおよびｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の多機能性プロファイルのデータを示す。１つまたは複数の機能は、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＣＤ１０７ａおよび４－１ＢＢから選択される１つまたは複数の因子の産生である。図３６は、突然変異したペプチドおよび野生型ペプチドに対する、黒色腫を有する患者において誘導されたメモリーおよびｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の特異性を示す。図３７Ａおよび３７Ｂおよび３７Ｃは、ＣＤ８$^{+}$ＣＤ１０７ａ$^{+}$Ｔ細胞の頻度によって定量化した、黒色腫を有する患者において誘導されたメモリーおよびｄｅ　ｎｏｖｏ応答の細胞傷害プロファイルを示す（上パネル）。図３７Ａおよび３７Ｂおよび３７Ｃの下パネルは、ａＣＡＳ３$^{+}$腫瘍細胞の頻度によって定量化した、これらのＴ細胞応答による標的細胞死滅を示す。図３８Ａは、黒色腫患者におけるネオ抗原特異的ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答の同定を示す。図３８Ｂは、突然変異したペプチドおよび野生型ペプチドに対する、図３８Ａで同定されたこれらのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答の特異性を示す。図３８Ｃは、１、２、３または４つの機能の組合せによって示される、これらのＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答の多機能性プロファイルを示す。１つまたは複数の機能は、ＩＦＮγ、ＴＮＦα、ＣＤ１０７ａおよび４－１ＢＢから選択される１つまたは複数の因子の産生である。
（実施例２７）
Ｔ細胞製造プロトコール１または２を使用した実験データ
【０５９９】
Ｔ細胞を、Ｔ細胞製造プロトコール１、または代替法としてのプロトコール２を使用して調製した。刺激されたＴ細胞を、実施例２４に記載されたものと類似のアッセイを使用して分析した。図３９は、１、２または３つの機能の組合せによって示される、エパカドスタットの添加ありまたはなしの、２人の健康なドナー（例えば、ＨＤ６６およびＨＤ６３）において誘導されたメモリー応答の機能性を示す（例えば、１つまたは複数の機能は、ＩＦＮγ、ＴＮＦαおよびＣＤ１０７ａから選択される１つまたは複数の因子の産生である）。図４０は、エパカドスタットの添加ありまたはなしの、６つの複製誘導におけるｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導したパーセント（「ヒット率」、４人の健康なドナーで平均した）を示す。図４１Ａは、ＰＤ－１遮断抗体の添加ありまたはなしの、

本明細書に提供されるＴ細胞製造プロトコールによる誘導後のドナーＨＤ５５由来の抗原特異的細胞の絶対数を示す。図４１Ｂは、ＰＤ－１遮断抗体の添加ありまたはなしの、本明細書に提供されるＴ細胞製造プロトコールによる誘導後のドナーＨＤ６７由来の抗原特異的細胞の絶対数を示す。図４２Ａは、ＩＬ－１２の添加ありまたはなしの、ｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８$^+$Ｔ細胞応答のｐＭＨＣ$^+$ＣＤ８$^+$Ｔ細胞の割合を示す。図４２Ｂは、ＩＬ－１２の添加ありまたはなしの、ｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８$^+$Ｔ細胞応答内のＣＤ８$^+$Ｔ細胞のパーセンテージを示す。

（実施例２８）

患者特異的ネオ抗原に対して誘導された免疫応答の詳細な特徴付け

【０６００】

患者特異的ネオ抗原を、バイオインフォマティクスエンジンを使用して予測した。予測されたネオ抗原をカバーする合成の長いペプチドを、刺激プロトコールにおいて免疫原として使用して、免疫原性能を評価した。刺激プロトコールには、これらのネオ抗原コーディングペプチドを患者由来ＡＰＣに供給し、これを次いで、患者由来Ｔ細胞と共に共培養して、ネオ抗原特異的Ｔ細胞をプライムすることが関与する。

【０６０１】

複数ラウンドの刺激を、刺激プロトコール中に組み込んで、メモリーおよびｄｅ　ｎｏｖｏ　Ｔ細胞応答をプライム、活性化および増大化させる。これらのネオ抗原特異的Ｔ細胞の特異性、表現型および機能性を、以下のアッセイを用いてこれらの応答を特徴付けることによって分析した：ｐＭＨＣマルチマーを使用するコンビナトリアルコーディング分析を使用して、複数のネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を検出した。多重化マルチパラメーターフローサイトメトリーを使用するリコール応答アッセイを使用して、ＣＤ４＋Ｔ細胞応答を同定および検証した。ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答の機能性を、ＩＦＮ－γおよびＴＮＦαを含む炎症促進性サイトカインの産生、ならびに脱顆粒のマーカーとしてのＣＤ１０７ａの上方調節を測定することによって評価した。ネオ抗原発現腫瘍系を使用する細胞傷害アッセイを使用して、天然にプロセシングされ提示された抗原に応答して標的細胞を認識および死滅させるＣＤ８＋Ｔ細胞応答の能力を理解した。細胞傷害を、Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａの細胞表面上方調節およびネオ抗原発現腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３の上方調節によって測定した。この研究では、黒色腫患者試料（ＮＶ６およびＮＶ１０）を、ＩＲＢ承認の下で得た。

【０６０２】

刺激プロトコールは、既存のＣＤ８＋Ｔ細胞応答の増大化、およびｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の誘導において上首尾であった（表１１）。

【表１１】

表11

患者	HUGO記号	完全遺伝子名	型
NV10	SR5F1	セリンおよびアルギニンリッチスプライシング因子1	CD8
	ARAP1	アンキリンリピートおよびPHドメイン	
	PKDREJ	卵ゼリーに対するポリシスチンファミリー受容体	
	MKRN1	マコリン(Makorin)リングフィンガータンパク質1	CD4
	CREBBP	CREB結合タンパク質	
	TPCN1	2ポアセグメントチャネル1	
NV6	AASDH	アミノアジピン酸ーセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ	CD8
	ACTN4	アクチニンアルファ4	
	CSNK1A1	カゼインキナーゼ1アルファ1	
	DHX40	DEAHーボックスヘリカーゼ40	
	GLI3	GLIファミリージンクフィンガー3	
	QARS	グルタミニルーtRNAシンテターゼ	
	FAM178B	配列類似性を有するファミリー178メンバーB	
	RPS26	リボゾームタンパク質S26	

【０６０３】

黒色腫患者ＮＶ１０由来のＰＢＭＣを使用して、ＣＤ８＋Ｔ細胞の４．５％からＣＤ８＋Ｔ細胞の７２．１％までの、既存のＣＤ８＋Ｔ細胞応答の増大化が観察された（ＳＲＳ

Ｆ１$_{E>K}$）。さらに、刺激プロトコールは、患者特異的ネオ抗原に対する２つの推定されたｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を誘導するのに有効であった（ＡＲＡＰ１$_{Y>H}$：ＣＤ８＋Ｔ細胞の６．５％、ＰＫＤＲＥＪ$_{G>R}$：ＣＤ８＋Ｔ細胞の１３．４％；刺激プロセス前に検出可能な細胞は存在しなかった）（図３４）。刺激プロトコールは、変動する大きさまで、別の黒色腫患者ＮＶ６由来のＰＢＭＣを使用する、以前に記載されたネオ抗原および新規のモデルネオ抗原の両方に対する７つのｄｅ　ｎｏｖｏ　ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を首尾よく誘導した（ＡＣＴＮ４$_{K>N}$　ＣＳＮＫ１Ａ１$_{S>L}$　ＤＨＸ４０ｎｅｏＯＲＦ　７、ＧＬＩ３$_{P>L}$、ＱＡＲＳ$_{R>W}$、ＦＡＭ１７８Ｂ$_{P>L}$およびＲＰＳ２６$_{P>L}$、範囲：ＣＤ８＋Ｔ細胞の０．２％からＣＤ８＋Ｔ細胞の５２％まで）。さらに、患者特異的ネオ抗原に対するＣＤ８＋メモリーＴ細胞応答が増大化された（ＡＡＳＤＨＮｅｏＯＲＦ、刺激後にＣＤ８＋Ｔ細胞の１３％まで）。

【０６０４】

患者ＮＶ１０由来の誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞を、より詳細に特徴付けた。突然変異体ペプチドがロードされたＤＣでの再チャレンジの際に、ネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞は、１、２および／または３つ全ての機能を示した（それぞれＳＲＳＦ１$_{E>K}$およびＡＲＡＰ１$_{Y>H}$について、１６．９％および６５．５％の機能的ＣＤ８＋ｐＭＨＣ＋Ｔ細胞）（図３５）。

【０６０５】

異なる濃度のネオ抗原ペプチドで再チャレンジした場合、誘導されたＣＤ８＋Ｔ細胞は、突然変異体ネオ抗原ペプチドに対して有意に応答したが、野生型ペプチドに対してはそうではなかった（図３６）。

【０６０６】

患者ＮＶ１０において、ＣＤ４＋Ｔ細胞応答を、突然変異体ネオ抗原がロードされたＤＣを用いたリコール応答アッセイを使用して同定した（図３８Ａ～３８Ｃ）。３つのＣＤ４＋Ｔ細胞応答が、突然変異体ネオ抗原ペプチドがロードされたＤＣに対する反応性に基づいて同定された（ＭＫＲＮ１$_{S>L}$、ＣＲＥＢＢＰ$_{S>L}$およびＴＰＣＮ１$_{K>E}$）。これらのＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、突然変異体ネオ抗原ペプチドで再チャレンジした場合、多機能性プロファイルもまた示した。ＣＤ４＋Ｔ細胞の３１．３％、３４．５％および４１．９％は、１、２および／または３つの機能を示した；それぞれ、ＭＫＲＮ１$_{S>L}$、ＣＲＥＢＢＰ$_{S>L}$およびＴＰＣＮ１$_{K>E}$応答。

【０６０７】

患者ＮＶ１０由来の誘導されたＣＤ８＋応答の細胞傷害能もまた評価した（図３７Ａ～３７Ｃ）。ＳＲＳＦ１$_{E>K}$およびＡＲＡＰ１$_{Y>H}$の両方の応答が、共培養後に、ＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａおよび突然変異体構築物で形質導入された腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３の有意な上方調節を示した。

【０６０８】

刺激プロトコールを使用して、予測された患者特異的ネオ抗原、およびモデルネオ抗原は、患者材料における複数のネオ抗原特異的ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答の誘導によって免疫原性であると確認された。多機能性かつ突然変異体特異的なＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答を誘導する能力は、高品質のネオ抗原を予測し、強力なＴ細胞応答を生成する能力を証明する。刺激プロセスの終了時の複数の濃縮されたネオ抗原特異的Ｔ細胞集団（メモリーおよびｄｅ　ｎｏｖｏ）の存在は、新たなＴ細胞応答を生じさせ、がん患者を処置するための有効ながん免疫療法を生成する能力を実証している。

（実施例２９）

細胞の選択的枯渇の影響

【０６０９】

この実施例では、細胞集団に対するＰＢＭＣ培養物からの非必須の細胞の選択的枯渇の影響、ｅｘ　ｖｉｖｏ細胞増大化の速度、および活性化されたＴ細胞の生成を調査した。枯渇研究の目的は、必須のＡＰＣ集団について（非必須のＰＢＭＣの枯渇を介して）濃縮することによって、ＣＤ８　Ｔ細胞プライミングを増強することであった。

【０６１０】
ＰＢＭＣを、ドナーＨＤ６６、ＨＤ６７、ＨＤ６９から単離した；細胞培養物を、Ｇ－Ｒｅｘ　２４ウェルプレートでセットアップした。細胞を、ペプチド濃度：０．４μＭ（０．４ｍＭペプチドストック）の存在下で培養した。ペプチドプール：２セットのペプチドを試験した：高度に免疫原性のおよび低い免疫原性のＨＩＶ３、ＡＣＴＮ４、ＣＳＮＫ１Ａ１ペプチド。さらに、ＭＡＲＴ－１を使用して、メモリーＴ細胞応答の場合と同様、高い前駆体頻度を有する細胞の増大化を評価した。ＰＢＭＣを、実験群について示された枯渇に最初に付し、次いで、Ｆｌｔ３Ｌで刺激した。この群は、ＣＤ１４／２５枯渇（ベースＦｌｔ３Ｌ）；ベースＦｌｔ３Ｌ＋ＣＤ１１ｂ枯渇（ＣＤ１１ｂビオチンＡＢを使用する）；ベースＦｌｔ３Ｌ＋ＣＤ１１ｂ／ＣＤ１９枯渇（ＣＤ１１ｂビオチンＡＢ、ＣＤ１９マイクロビーズを使用する）を含む。

【０６１１】
読み出し　－　以下のアッセイを、誘導後の１６日目に実施した：細胞の増大化倍率、マルチマー分析。細胞計数を、絶対数または総集団のパーセントとして表した。図４６～４７は、示された枯渇を実施した後０日目の得られた細胞を示す。図４８は、ＣＤ１１ｂおよびＣＤ１９細胞の枯渇が、増大化の倍の変化に対して影響を有さなかったことを示している。図４９Ａおよび図４９Ｂは、ＣＤ１１ｂ、またはＣＤ１１ｂおよびＣＤ１９の枯渇が、ペプチドがロードされたＤＣによってプライムされたナイーブＴ細胞のヒット率を実際に増加させることを示している。低いまたは高い免疫原性のいずれのペプチドを使用した場合にも、差異は観察されなかった。ＣＤ１１ｂおよびＣＤ１１ｂ／ＣＤ１９細胞の枯渇は、抗原がロードされたＡＰＣによる第１の刺激後に、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の優れた改善を示す。図５０に示されるように、ＭＡＲＴ－１ペプチドについて、単一の刺激後に、ＣＤ８＋抗原特異的Ｔ細胞における２倍よりも大きい増加が存在した（左）。類似の増加が、高いおよび低い免疫原性のペプチドで細胞を刺激した場合に見出される。複数の誘導を用いると、増加はさらに拡大された（データ示さず）。全体として、ｐＤＣおよびＣＤ１４１$^{+}$ＤＣの頻度の増加は、改善されたＴ細胞誘導と相関した。

【０６１２】
細胞集団に対するＰＢＭＣ培養物からのＣＤ３＋、ＣＤ１９＋、ＣＤ１１ｂ＋、ＣＤ１４＋およびＣＤ２５＋細胞の選択的枯渇による抗原提示細胞（ＡＰＣ）のさらなる濃縮、ｅｘ　ｖｉｖｏ細胞増大化の速度、ならびに活性化されたＴ細胞の生成を調査した。ＰＢＭＣを、ドナーＨＤ１０１、ＨＤ１１３、ＨＤ１１４から単離した；細胞培養物を、Ｇ－Ｒｅｘ　２４ウェルプレートでセットアップした。３セットの細胞を、以下のように枯渇させた：５×１０^{6}個の細胞を、ＣＤ１４／ＣＤ２５枯渇させた（ベース）；５×１０^{6}個の細胞を、ＣＤ１４／ＣＤ２５／ＣＤ１１ｂ／ＣＤ１９枯渇させた（ベース＋ＣＤ１１ｂ／ＣＤ１９）；５×１０^{5}個の細胞を、ＣＤ３／ＣＤ１９／ＣＤ１１ｂ／ＣＤ２５／ＣＤ１４枯渇させ、５×１０^{6}個のベース＋ＣＤ１１ｂ／ＣＤ２５細胞と混合し、このセットを、この実施例について記載された図面において、ＡＰＣとして指定した。種々の細胞集団を、以下のように、細胞表面マーカーによって同定した：ＣＤ１４１＋ＤＣを、ＣＤ１４１およびＣｌｅｃ９Ａ発現の検出によって同定した；ＣＤ１ｃ＋ＤＣを、ＣＤ１ｃ発現の検出によって同定した；形質細胞様ＤＣ（ｐＤＣ）を、ＣＤ３０３およびＣＤ１２３発現によって同定した。図５１Ａ～５１Ｃに示されるように、ｐＤＣは、濃縮セット内の最も過剰に存在する（ｏｖｅｒ－ｒｅｐｒｅｓｅｎｔｅｄ）ＡＰＣであった（ＡＰＣ）。第１の刺激の間のＡＰＣ濃縮は、ヒット率（抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞）を改善する（図５１Ｄおよび５１Ｅ）。

（実施例３０）
抗原応答性に対する初期または後期に刺激された細胞の寄与

【０６１３】
抗原応答性に対する初期または後期に添加された細胞集団の寄与を調査するために、細胞（Ｔ細胞を含む）を、抗原がロードされたＡＰＣによる刺激の前に膜透過性アミン反応性色素（例えば、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステルまたはＴａｇＩＴ

Ｖｉｏｌｅｔ（商標））で標識し、抗原特異的Ｔ細胞の増大化を、色素の存在および希釈率によって示した。第２の刺激に適用される場合、既に１４日間培養した細胞の集団を、１つの色素で標識したが、抗原がロードされたＡＰＣおよびＴ細胞の新たな調製物を含有する細胞の別の集団は、別の色素で標識し、２つの集団を一緒に混合して、再刺激または増大化を実施した。これらの集団の各々の、抗原特異的Ｔ細胞プール全体に対する相対的寄与を、各色素の存在および希釈率によって示した（図５２Ａ）。この実験設計を使用して、細胞の新たに調製された集団が、２１日目に抗原特異的Ｔ細胞を生じなかったことが示された。新たに調製されたＡＰＣに、１日前（標準的なプロトコール、図５２Ｂに示されるスキーマ）とは対照的に、既に培養された細胞を添加する４日前または６日前（それぞれ、５日早い開始または７日早い開始）のいずれかで抗原を事前ロードした場合、新たに調製されたＴ細胞が、抗原特異的な割合に実質的に寄与したことが示された。同時に、４日前または６日前のいずれかで事前ロードしたＡＰＣを使用して再刺激されると、既に培養されたＴ細胞の増殖速度は低減され、標準的なプロトコールと比較してより低い数の抗原特異的細胞を全体として生じることが示された（図５２Ｃ）。

（実施例３１）

ネオ抗原性ペプチドをコードするメッセンジャーＲＮＡを使用した免疫細胞の誘導

【０６１４】

この実施例では、ネオ抗原性ペプチドおよびネオ抗原性ペプチドをコードするメッセンジャーＲＮＡを用いた免疫細胞の誘導を比較する研究が比較される。

【０６１５】

材料：ＡＩＭ Ｖ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）；ＬＳカラム、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ ＃１３０－０４２－４０１、ＣＤ１４ ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ、ヒト、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ ＃１３０－０５０－２０１；ＣＤ２５ ＭｉｃｒｏＢｅａｄｓ ＩＩ、ヒト、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ ＃１３０－０９２－９８３；ＭＡＣＳ緩衝液：ａｕｔｏＭＡＣＳ Ｆｉｎｓｉｎｇ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ ＃１３０－０９１－２２）によるＭＡＣＳ ＢＳＡ Ｓｔｏｃｋ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（＃１３０－０９１－３７６）の１：２０希釈；ヒトＦＬＴ３Ｌ、前臨床ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ ＃１４１５－０５０ ストック ５０ｎｇ／μＬ；ＣＤ３ Ｍｉｃｒｏｂｅａｄｓ、ヒト、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ ＃１３０－０５０－１０１；ＴＮＦ－α、前臨床ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ ＃１４０６－０５０ ストック １０ｎｇ／μＬ；ＩＬ－１β、前臨床ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ ＃１４１１－０５０ ストック １０ｎｇ／μＬ；ＰＧＥ１またはアルプロスタジル － Ｃａｙｍａｎ、Ｃｚｅｃｈ ｒｅｐｕｂｌｉｃ ストック ０．５μｇ／μＬ；ＡＩＭＶ培地＋２、５、１０％ヒト血清＋１％ＰｅｎＳｔｒｅｐ；ＩＬ７ ストック ５ｎｇ／μＬ；ＩＬ１５ ストック ５ｎｇ／μＬ；２４ウェル Ｇ－Ｒｅｘプレート；ＩＶＴ ｍＲＮＡ（１μｇ／μＬ）；ＲＮアーゼｚａｐ；１００ｕｌキュベットを用いるＬｏｎｚａ Ｐ３ Ｎｕｃｅｌｏｆｅｃｔｉｏｎキットおよび緩衝液。

【０６１６】

手順：

０日目：ＰＢＭＣのＣＤ１４およびＣＤ２５枯渇ならびにＦＬＴ３Ｌによる処置

１． ＰＢＭＣを解凍し、１千万個の細胞／ｍＬでＡＩＭ Ｖ培地中で計数した。

２． 次いで、細胞を、３００×ｇで５分間の遠心分離によってペレット化し、ベンゾナーゼ（１ｕＬ／ｍＬ）を含有する温かい培地中で１時間再懸濁した。ベンゾナーゼ処置後、細胞を計数した。

３． ＭＡＣＳ ＬＳカラムを、３ｍＬの冷ＭＡＣＳ緩衝液で３回洗浄した。

４． 次いで、ＰＢＭＣを、３００×ｇで５分間スピンし、５０ｍＬ管中に10^7個の細胞につき６０ｕＬのＭＡＣＳ緩衝液中に再懸濁した。

５． 10^7個の細胞につき２０ｕｌのＣＤ２５ＩＩ Ｍｉｃｒｏｂｅａｄｓおよび２０ｕＬのＣＤ１４ Ｍｉｃｒｏｂｅａｄｓを、細胞プラスＭＡＣｓ緩衝液に添加し、４℃の冷蔵庫中または氷上で１５分間インキュベートした。

６．　インキュベーション後、細胞の総体積を、冷ＭＡＣＳ緩衝液を添加することによって５０ｍＬにし、細胞を、３００×ｇで１０分間スピンした。次いで、上清をデカントし、細胞を、２×１０^{8}個の細胞につき５００μＬ中に再懸濁した。

７．　細胞を、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　ＭｉｄｉＭＡＣＳカラムに取り付けたＬＳカラムを通過させた。次いで、カラムを、３ｍＬのＭＡＣＳ緩衝液で３回洗浄した。

８．　磁石を介して採集管中を通過する細胞を計数し、スピンダウンする。次いで、細胞を計数し、５０ｎｇ／ｍＬのＦＬＴ３Ｌを含む２ｍＬのＡＩＭ　Ｖ中５百万個の細胞を、２４ウェルプレートにプレーティングした。

１日目：ＦＬＴ３Ｌ処置したＰＢＭＣのヌクレオフェクション

１．　２ｍｌのＡＩＭ　Ｖ培地を、２４ウェルＧＲＥＸプレートのウェル中にプレーティングした。プレートを、インキュベーター中に置いて、１５ｍＬ円錐管中で別々の５ｍＬの培地で平衡化した。

２．　細胞リフターを使用して、ＦＬＴ３Ｌで一晩刺激した細胞を、ウェルから収集した。

３．　全ての細胞を、５０ｍＬ円錐管中に採集し、ウェルを、さらなる１ｍｌの冷培地で洗浄した。次いで、細胞を、３００×ｇで７分間スピンした。

４．　ＣＤ３単離を、製造業者のプロトコールに従って、ＦＬＴ３Ｌに刺激されたＰＢＭＣに対して実施した。磁石上に残されたＣＤ３単離された細胞を、カラムから放出させ、計数し、平衡化した２４ウェルプレートの適切なウェル中にプレーティングし、インキュベーター中に置いた。

５．　Ｍｉｌｔｅｎｙｉビーズ分離からのフロースルーとして採集された残りの細胞を、スピンダウンし（３００×ｇで７分間）、ペレットを氷上に置いた。

６．　１μｇ～１０μｇの適切なＲＮＡを、各ＡＭＡＸＡヌクレオキュベット（ｎｕｃｌｅｏｃｕｖｅｔｔｅ）容器に添加し、氷上に置いた（体積を１０μＬ未満に維持した；ＲＮＡを、必要に応じて、ＲＮアーゼを含まない水で希釈した）。

７．　細胞は、キュベット１つ当たり百万個の細胞につき１００ｕｌのＰ３緩衝液を使用してＰ３緩衝液中に再懸濁された細胞であった。

８．　１００ｕｌのＰ３緩衝液プラス細胞を、ヌクレオキュベット中でＲＮＡと混合し、適宜ＣＢ１５０、ＤＵ１００、ＥＡ１００、ＥＵ１００またはＣＵ１１０プロトコールを使用して、製造業者のプロトコールによってヌクレオフェクション処理した。

９．　次いで、キュベットを、氷上で１０分間インキュベートし、インキュベーション後、１００ｕｌの事前に温めた培地を添加した。

１０．　次いで、細胞を、２４ウェルプレートの適切なウェル中にプレーティングし、インキュベーター中に置いた。

２日目：細胞成熟化およびヒト血清の添加

１．　ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＰＧＥ１、ＩＬ－７を含有する成熟化カクテルを、ヌクレオフェクションの２～３時間後に添加した。次いで、プレートを、インキュベーターに戻した。８～１２時間後、ヒト血清を各ウェルに添加して、ヒト血清をウェル体積の１０％にした。次いで、プレートを、培養のためにインキュベーターに追加した。

５、８、１０および１２日目：培地置き換えならびにＩＬ－７およびＩＬ－１５の供給

１．　５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－７および５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５を補充した１０％ヒト血清を含有するＡＩＭＶを、培養物成長によって決定して、必要に応じて培養物に添加した。

１２～１４日目：培養されたＴ細胞の再刺激のための、０日目～２日目のプロトコールの反復

１４日目：培養されたＴ細胞の再刺激

１．　Ｔ細胞培養物を、収集し、計数し、誘導された培養物の、ヌクレオフェクション処理したＰＢＭＣに対する１：１の比で、新たなヌクレオフェクション処理した培養物と共に再プレーティングする。ヒト血清を培養物に添加し、ヒト血清の培養物体積を、ＡＩＭＶ中１０％とする。

１６および１９日目：培地置き換えならびにＩＬ－７およびＩＬ－１５の供給
１．　５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－７および５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５を補充した１０％ヒト血清を含有するＡＩＭＶを、培養物成長によって決定して、必要に応じて培養物に添加した。
１９～２１日目：培養されたＴ細胞の再刺激のための、０日目～２日目のプロトコールの反復
２１日目：培養されたＴ細胞の再刺激
１．　Ｔ細胞培養物を、収集し、計数し、誘導された培養物の、ヌクレオフェクション処理したＰＢＭＣに対する１：１の比で、新たなヌクレオフェクション処理した培養物と共に再プレーティングする。ヒト血清を培養物に添加し、ヒト血清の培養物体積を、ＡＩＭＶ中１０％とする。任意のさらなる細胞を、さらなる分析のために凍結して保存する。
２３および２６日目：培地置き換えならびにＩＬ－７およびＩＬ－１５の供給
１．　５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－７および５ｎｇ／ｍＬのＩＬ－１５を補充した１０％ヒト血清を含有するＡＩＭＶを、培養物成長によって決定して、必要に応じて培養物に添加した。
２８日目：誘導されたＴ細胞の収集
２．　Ｔ細胞培養物を収集し、計数し、さらなる分析のために凍結させる。

【０６１７】

結果：図５３は、上記研究からの例示的なデータを示す。増大化倍率を、ネオ抗原性ペプチド（優性ペプチド）もしくは事前に同定されたネオ抗原性ペプチドを使用した、またはこのペプチドをコードするｍＲＮＡもしくは無関係のｍＲＮＡ（ＧＦＰ）をコードするｍＲＮＡを用いた細胞の刺激から、研究の終了時に評価した。ｍＲＮＡ誘導された細胞は、倍の変化における驚くべき増加を示す。注目すべきことに、ＧＦＰ発現ｍＲＮＡセットについては１つの試料のみが存在したため、したがって、さらなる実験が、データを検証するために実施される予定である。それにもかかわらず、ｍＲＮＡ誘導された細胞の倍の変化における印象的な増加の傾向が示される。

【０６１８】

図５４は、優性ペプチド（ウイルスペプチドの混合物）の選択を使用した研究からの例示的なデータを示す。Ｉｒｒ　ＲＮＡ＝無関係のＲＮＡ。この実験では、ＣＤ３＋細胞を、ｍＲＮＡによる誘導前に、一部の試料において除去した（図面中で－ＣＤ３として指定される）。ＤＯＭ－ＲＮＡおよびＤＯＭ　ＲＮＡ－ＣＤ３試料（これらの細胞は同じｍＲＮＡで誘導されたが、ＤＯＭ　ＲＮＡ－ＣＤ３と指定されたセットからは、ＣＤ３細胞のみが最初に除去された）を比較すると、ＣＤ３の存在または非存在は、誘導プロファイルにおいて劇的な差異を生じなかったことがわかった。一般に、ネオ抗原性ペプチドをコードするｍＲＮＡによる刺激は、マルチマー陽性細胞によって示されるように、抗原特異的であるＴ細胞の高いレベルの誘導をもたらした。

【０６１９】

図５５は、刺激および増大化の終了時に得られたＣＤ８＋Ｔ細胞を、抗原特異的メモリーＴ細胞応答についてフローサイトメトリーによって評価した、例示的なデータを示す。ウイルスペプチドによって誘導された実験セットにおけるＣＤ８＋Ｔ細胞は、図５５上パネルに示され（ＥＢＶ　ＢＭＬＦペプチド、左；ＥＢＶ　ＢＭＬＦペプチドをコードするｍＲＮＡ、右）、これらは、類似の特異性プロファイルを示し、ＣＤ８＋Ｔ細胞のおよそ４６％が、マルチマーに特異的であった。図５５下パネル（事前に同定されたＭＥ－１ペプチド、左；ＭＥ－１ペプチドをコードするｍＲＮＡ、右）は、ｍＲＮＡによるＴ細胞のより高い誘導を示した。この研究は、低い免疫原性の抗原の場合、誘導のためにｍＲＮＡを使用することがさらにいっそう有益であり得ることを示している。

（実施例３２）

Ｔ細胞プライミング効率および抗原特異的Ｔ細胞収量を増加させるための方法

【０６２０】

この実施例では、Ｔ細胞プライミングの効率および抗原特異的Ｔ細胞の収量を増加させるために、ＰＢＭＣを、ＰＢＭＣ集団中への抗原をコードするｍＲＮＡのコード配列で直接電気穿孔する。このプロセスは、図５６Ａおよび５６Ｂの単純化されたワークフローによって示される。特定の対象のための個別化された抗原（例えば、ネオ抗原）は、対象のゲノムまたはエキソーム配列決定結果、および対象特異的ネオ抗原の同定に基づいて、信頼性のあるＭＨＣ－ペプチド結合プレディクタープラットフォームからも開発され得る。信頼性のあるＭＨＣ－ペプチド結合プレディクタープラットフォームは、国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１７８４９号およびＰＣＴ／ＵＳ２０１９／０６８０８４号に少なくとも一部開示されており、これらは、本明細書に参照により完全に組み込まれる。対象のＨＬＡレパートリーの決定後、がん型に特異的な潜在的抗原エピトープは、プレディクターにかけられ、上位の予測された結合因子が同定される。１つまたは複数のＲＮＡ構築物を生成する。各ＲＮＡ構築物は、同定されたエピトープを含む複数の抗原をコードする核酸を含む。ｍＲＮＡを、電気穿孔またはヌクレオフェクションによって、ＰＢＭＣ中に組み込む。ＰＢＭＣは、ＲＮＡコードされる抗原ペプチドを発現し、近接しているＴ細胞にそれを提示し、例えば、ここで、抗原提示細胞は、ＰＢＭＣ試料中などで、Ｔ細胞と共に共培養される（図５６Ａ）。

【０６２１】

ペプチドおよびｍＲＮＡ刺激の例示的な平行比較のために、ＰＢＭＣ試料から、ＣＤ１４およびＣＤ２５発現細胞を枯渇させ、図５６Ｂに示される基本的ワークフローを介して採取する。

抗原提示のためのＰＢＭＣ上での発現のための、複数の免疫原性エピトープをコードするポリヌクレオチドの送達のためのＲＮＡ構築物設計

【０６２２】

例示的なＲＮＡ構築物は、図５７Ａに示される。ＲＮＡ構築物は、ネオ抗原ストリングを含み、ここで、複数の抗原性エピトープをコードする複数のｍＲＮＡ配列をライゲーションさせて、５’－３’コンカテマー（ｃｏｎｃａｔａｍｅｒ）を生成する。ｍＲＮＡによってコードされる少なくとも１つの抗原は、ネオ抗原である。ｍＲＮＡは、５’－ＣＡＰ、３’ポリＡテイル、およびこの場合はＴ７プロモーターによって例示されるプロモーター配列に作動可能に連結した抗原の連鎖状ストリングをコードするポリヌクレオチド配列を含む。ＰＢＭＣにロードする際に使用される構築物は、ネオ抗原ストリングをコードする配列において広範囲に変動するが、それは、これがケースバイケースで変動するからである。構築物のネオ抗原ストリング部分の精緻な図は、図５７Ｂに示される。切断配列、例えば、ＱＬＧＬおよびＫは、注意深く最適化され、連鎖状ネオ抗原ストリング内の１つまたは複数の抗原をコードする配列間に置かれる。特定の配列、ならびに単一のｍＲＮＡ鎖における、抗原をコードする配列および切断配列の配置は、ＰＢＭＣによる優れたエピトープ提示を得るために個々に最適化され、次に、抗原応答性Ｔ細胞の収量を最大化する。例示的な抗原またはネオ抗原配列は、ＨＩＶ－３エピトープ、ＣＳＮＫ１Ａ１エピトープ、ｍＣＤＫ４エピトープ、ｍＭＥ１エピトープおよびＧｌｉ３エピトープから得られる。ある特定のエピトープコード配列に注意深く並置させた切断促進配列の設計および配置は、各エピトープがＰＢＭＣによる発現および提示のために示されるように、ｍＲＮＡがトランスフェクトされた場合に、コードされたエピトープが、エピトープ配列内で天然に不適切に切断されないことを確実にする。

５’－ＣＡＰおよびポリＡエレメント

【０６２３】

実験を、ｍＲＮＡ中に５’－ＣＡＰを含めておよび含めることなしに実施した。ＰＢＭＣを、５’ＣＡＰを有するｍＲＮＡ（Ｃａｐ１またはＣａｐ０）でトランスフェクトした。ＣＡＰ１構造が、有効なｍＲＮＡ送達および発現にとって重要であることが示された。図５８Ａは、Ｃａｐ１構造（ＣｌｅａｎＣａｐ）が転写に伴って組み込まれることに役立つように、アデノシンが５’－ＵＴＲ領域において組み込まれることを示している。図５８Ｂ～５８Ｃに示されるように、Ｃａｐ１組込みは、低減された細胞毒性（図５８Ｂ）お

よびｍＲＮＡによってコードされるＧＦＰのより高い発現（図５８Ｃ）に関して、Ｃａｐ０を超える大きい利点を有した。ポリＡテイルの長さを最適化した。約１２０ヌクレオチドのポリＡテイルは、ｍＲＮＡ発現のために有効であるとみなされた（データ示さず）。

ｍＲＮＡ内のヌクレオチド改変およびＴ細胞誘導に対する影響：

【０６２４】

ｍＲＮＡを、ｍＲＮＡの安定性および分解に対する抵抗性を増加させるために、シチジン（Ｃ）またはウリジン（Ｕ）残基を置き換えることによってさらに改変する。この実施例では、ＣＤ３、ＣＤ１４およびＣＤ２５発現細胞が選択的に枯渇されたＰＢＭＣを、全ての天然のウリジン三リン酸、全てのシトシン三リン酸、または部分的な量の両方のヌクレオシドが改変されているＧＦＰ　ｍＲＮＡでヌクレオフェクション処理し、ＧＦＰ発現を異なる時点で追跡した。フローサイトメトリーを、２４時間の時点で実施した（中央および下の列）。７２時間の時点で、ＧＦＰ陽性生細胞を、Ｉｎｕｃｙｔｅを使用して測定した（上の列）。ウリジン残基をプソイドウリジンに改変し、シチジンを５メチルシチジンに改変し、異なる実験セットにおけるパーセント改変は、表１３に示される。

【表１３】

表 13 – mRNA におけるウリジンおよびシチジン改変

試料	置換%(U/C)
部分 UTP	30/0
完全 UTP	100/0
部分 UTP/部分 CTP	30/30
完全 UTP/完全 CTP	100/100
完全 UTP/部分 CTP	100/30
標準	0/0

【０６２５】

図５９Ａ～５９Ｃに示されるデータは、プソイドウリジンおよび５メチルシチジンによるウリジンおよびシチジンの部分的および完全な置換がより良い翻訳に役立つこと、および部分的ＵＴＰ置換が、より高い数のネオ抗原特異的細胞を生じたこと（図５８Ｂ）を示している。

ペプチドをコードするｍＲＮＡでＡＰＣを刺激したときの高いＣＤ８ヒット率：

【０６２６】

ショートマー（９～１０アミノ酸）またはロングマー（２５アミノ酸）を、図６０Ａ中に図形として示されるように、連鎖状ネオ抗原ストリングの形態で構築した。上記のように、多抗原コードｍＲＮＡ構築物でヌクレオフェクション処理したＰＢＭＣを使用して、Ｔ細胞を刺激し、サイドバイサイド比較を、同じエピトープを含むペプチドを用いて実施した。短いおよび長いＲＮＡ配列は、マルチマーに対して応答性の、類似のＣＤ８＋Ｔ細胞を生じる（表１４）。特に、ロバストなＣＤ８応答が、ロングマー（およびショートマー）をコードするｍＲＮＡを使用して観察された。

【表１４】

表 14 – ペプチドおよび RNA ロングマーおよびショートマー媒介性活性化の比較

		CD8 ヒット率(%)	平均ネオ抗原+頻度(%CD8 細胞)	応答の多様性(6のうち)	CD4 応答
ドナー1	ペプチド短い	7	0.03%	1	N.A.
	ペプチド長い	19	0.09%	2	0
	RNA 短い	11	1.50%	2	N.A.
	RNA 長い	8	0.36%	2	0
ドナー2	ペプチド短い	11	0.03%	2	N.A.
	ペプチド長い	17	0.21%	3	1
	RNA 短い	19	0.39%	2	N.A.
	RNA 長い	20	0.05%	2	0

【０６２７】

図６０Ｂに示されるように、Ｇｌｉ３エピトープは、ペプチドおよびｍＲＮＡによって良好に表現および提示されるが、ｍＲＮＡコードされるＧｌｉ３ショートマーエピトープがロードされたＰＢＭＣは、より高いＧｌｉ３特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を生じた（マルチマーアッセイによって検出された通り）。マルチマーアッセイについての代表的なフローサイトメトリー結果は、図６０Ｃに示される。対照的に、本明細書で使用されるＨＩＶ－３またはＣＤＫ４エピトープは、ロングマー（ｌｏｎｇｅｒ）またはショートマー配列を含むｍＲＮＡ鎖によっては良好に表現されない。ペプチドショートマー配列は、より高い比率のＣＤＫ４特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を生成する；ペプチドロングマーは、ＨＩＶ－３特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を生成し、同じものをコードするｍＲＮＡ配列は、それぞれの抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を生成しない。

ＰＢＭＣの誘導によって増加したマルチマー陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞

【０６２８】

この実験では、ＰＢＭＣを、ある特定の集団の枯渇のために様々に処置し、それらの増大化およびマルチマー特異性を調査した。マルチマー特異的Ｔ細胞の収量を、３セットのＰＢＭＣ調製物をＲＮＡ構築物でヌクレオフェクション処理することによって試験した：（ｉ）ＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣ、（ｉｉ）ＣＤ１４およびＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣ、（ｉｉｉ）凍結されたＣＤ１４およびＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣ。調製物（ｉ）では、Ｔ細胞を、調製物（ｉｉ）および（ｉｉｉ）の場合のようにヌクレオフェクションの間にＡＰＣから分離されなかった。これらを、ペプチドがロードされたＰＢＭＣのセットと比較した。全ての細胞を、電気穿孔の前にＦＬＴ３Ｌで処理した。種々のｍＲＮＡ構築物を試験したが、代表が図６１Ａに示される。集合的に、ＲＮＡがロードされたＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣは、図６１Ｂに示されるように、優れたマルチマー特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を示した。ｍＲＮＡがロードされたＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣは、ＲＮＡを同様にロードした新鮮なまたは凍結されたＣＤ１４およびＣＤ２５が枯渇された細胞よりも優れており、全てのＲＮＡがロードされたＰＢＭＣは、マルチマーに対して応答性であるＣＤ８＋Ｔ細胞を生成することにおいて利点を有した。ＲＮＡローディングステップの前のＰＢＭＣの取り扱いが少ないことは、有利であった可能性があり得た。ＰＢＭＣ集団中の複数の細胞成分の枯渇は、細胞への取り扱いストレスに相当する、細胞集団を複数の抗体に付すステップ、洗浄するステップおよび回収するステップを要求した。

【０６２９】

ｍＲＮＡがロードされたＰＢＭＣは、図６１Ｂならびに以下の表１５Ａおよび表１５Ｂに示されるように、抗原表現においてより高い多様性を示した。ＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣは、検出可能なＧｌｉ３特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞、およびＭＥ１特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を有した。ＭＥ１特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞は、全ての他のセットにおいては無視できるものであった。図６１Ｃは、Ｇｌｉ３特異的細胞を示す代表的なフローサイトメトリーデータを示す。

【表１５Ａ】

表 15A - ドナー1

	IL-7 および IL-15						ヒット率 (%)	平均頻度	出発材料	免疫原
	1	2	3	4	5	6				
Gli3							83%	6.09%	PBMC (CD25-)	RNA (25μg/mL エレクトロポレーション)
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3							100%	0.52%	CD14-25- (凍結)	
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3							100%	0.98%	CD14-25- (ベースアーム)	
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							0%			
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			

【表１５Ｂ】

表15B - ドナー2

	IL-7およびIL-15						ヒット率（%）	平均頻度	出発材料	免疫原
	1	2	3	4	5	6				
Gli3							83%	2.68%	PBMC (CD25-)	RNA [ショートマー]（ベース）
HIV-3							0%			
CSNK1A1							0%			
ME-1							67%	2.97%		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3							67%	0.12%	CD14-25-（凍結）	
HIV-3							100%	0.02%		
CSNK1A1							0%			
ME-1							17%	0.01%		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			
Gli3							100%	0.79%	CD14-25-（ベースアーム）	
HIV-3							67%	0.01%		
CSNK1A1							0%			
ME-1							83%	0.01%		
ACTN-4							0%			
CDK4							0%			

【０６３０】

ＦＬＴ３Ｌで一晩処置したＰＢＭＣおよびＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣを、ショートマーまたはロングマーＲＮＡ構築物で電気穿孔し、抗原特異性（図６１Ｄ）および増大化倍率（図６１Ｄ）を、２回の刺激後２６日目に調査した。これらのデータは、コードされたエピトープの長さが、ペプチドロングマーおよびショートマー刺激を使用した場合の観察とは対照的に、ロバストなＣＤ８誘導を達成するために重要でないことを例示している。

異なる成熟化ミックスの影響

【０６３１】

ＰＢＭＣ刺激されたＴ細胞の増大化のためにＴ細胞培養培地中に含めるためのサイトカインおよび増殖因子のいくつかのカクテルを調査した。培地中の成分は、Ｔ細胞成熟化ミックスと集合的に呼ばれる。例示的なセットの実験では、２人のドナー由来のＰＢＭＣを、以前に示されたように、ｍＲＮＡ構築物でヌクレオフェクション処理し、Ｔ細胞増大化のための異なる成熟化ミックスを、各ドナーの細胞由来の試料セットにおいて試験した。試験した種々のサイトカインカクテルは、以下の表１５Ｃに列挙される。試験されるさらなるサイトカインカクテルは、ＩＦＮ－γ　ＬＰＳ、ポリＩおよびポリＣ、ならびにＣＤ４０；ならびにＴＬＲ－７／８およびＬＰＳを含む。

【表１５Ｃ】

表 15C. 成熟化ミックスにおける検査されたサイトカインおよび増殖因子カクテル

セット	成熟化ミックス
1	IFN-γ, LPS
2	TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE-2 [TIIP (IL6)]
3	TNF- α, IL-1β, IL-7, PGE-2 [TIIP (IL7)]

【０６３２】

結果は、図６２Ａ～６２Ｃに示される。ＬＰＳ＋ＩＦＮ－γの添加は、２６日目におけるより高いマルチマー特異的細胞に関連する。エピトープの各々がＰＢＭＣによって経時的に発現されたかどうか、または１つもしくは複数の発現が損なわれたかどうかもまた試験した。

【０６３３】

ＣＤ２５が枯渇されたＰＢＭＣ細胞をＲＮＡ（図６０Ｃに示される）で電気穿孔し、２４時間の期間にわたって培養した。細胞を、示された時点で収集し、ペレット化し、急速凍結させた。ＨＬＡ－Ａ０２：０１－ペプチド複合体を、免疫沈降させ、次いで、ペプチドを溶出させ、ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによって分析した。電気穿孔した細胞から溶出させたペプチド（軽い）を、陽性同定のために、標識した重い標準ペプチド（重い）と比較した（図６３Ａ）。図６３Ｂは、ペプチド、Ｇｌｉ３、ＨＩＶ３、ｍＡＣＴＮ４、ｍＣＤＫ４およびｍＭＥ１の各々が、優性エピトープとして容易に発現されたことを示している。

【０６３４】

マルチマーアッセイに加えて、これらの増大化されたＴ細胞の機能性を評価した。この方法によって生成されたＣＤ８　Ｔ細胞は、特異的エピトープに対して免疫応答性であり、示される異なる用量においてＴＮＦ－αおよび／もしくはＩＦＮ－γまたはＣＤ１０７ａを放出した（図６４Ａ～６４Ｂ）。上記データに沿って、サイトカイン応答は、より少ない特異的Ｔ細胞を生成したペプチドと比較して、Ｇｌｉ３などの高度に免疫原性のペプチドについてより高かった。図６５は、最適な製品を生成するために考慮される基準を示す。

（実施例３３）

Ｔ細胞治療薬のための製造プロトコール

【０６３５】

Ｔ細胞治療的製品を、以下に要約したマルチステッププロセスで製造する（図６６）。製造プロセスは、以下のステップを含む：（Ａ）腫瘍生検：腫瘍生検を実施して、ＤＮＡおよびリボ核酸（ＲＮＡ）配列決定のための組織を提供する。患者由来の末梢血の試料は、「正常」組織対照として機能する。（Ｂ）配列決定およびバイオインフォマティクス：患者の腫瘍および正常試料の全エキソームＤＮＡ配列決定およびＲＮＡ配列決定ならびに腫瘍のＲＮＡ配列決定を使用して、突然変異を同定および検証する。免疫原性エピトープを予測し、優先順位を付け、引き続いて製造されるペプチドを設計するために使用する。バイオインフォマティクスプロセスは、公に入手可能なソフトウェアコンポーネントおよび独占所有権のあるソフトウェアコンポーネントの組合せを利用する。図６６は、試料採集で始まり、患者における突然変異の同定を介し、ペプチドの生成へと至る、段階的様式での機能のシーケンスを例示する。（Ｃ）選択された合成ペプチドの製造：２セットのペプチドを、１セット当たり最大３０～３５個のペプチドで製造する。セット１は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）に結合する直接的ＭＨＣクラスＩを介したＣＤ８＋細胞の生成を特異的に標的化するために８～１１アミノ酸（大部分は９～１０アミノ酸）であり、セット２は、ＡＰＣによる内在化および再提示の後にＣＤ４＋細胞の誘導を特異的に標的化するためにおよそ２５アミノ酸である。（Ｄ）細胞単離：アフェレーシスを実施して、Ｔ細胞治療

薬のための出発材料としての患者ＡＰＣおよびＴ細胞を提供する。（Ｅ）抗原提示細胞の単離：抗原自家ＣＤ１４＋樹状細胞（抗原提示細胞）を、アフェレーシス出発材料から単離する。これらの樹状細胞に、上記ネオ抗原ペプチドを引き続いてロードする。（Ｆ）Ｔ細胞増大化：アフェレーシス産物から単離されたＴ細胞を、ペプチドがロードされた樹状細胞と共に共インキュベートする。患者のネオ抗原特異的Ｔ細胞を誘導し、刺激し、増大化する。腫瘍細胞を直接的または間接的に認識し、破壊することが可能な得られた細胞製品を、リンパ枯渇化学療法後に、患者に再注入する。

【０６３６】

理論に束縛されることは望まないが、Ｔ細胞治療薬の作用様式は、患者自身のネオ抗原特異的エピトープを認識する自家ＣＤ３＋Ｔ細胞で患者を処置することに基づく。患者に投与されると、抗原特異的Ｔ細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏで増大化し、アポトーシス誘導性リガンドまたは溶解性顆粒の放出を介して、抗原を発現する腫瘍細胞を排除して、患者の腫瘍退縮および無進行生存をもたらすと期待される。

【０６３７】

出発材料：アフェレーシスを介して入手した患者自身の樹状細胞およびＴ細胞（アフェレーシス産物）。アフェレーシスを、最優良事例に従ってその地域で認可された標準的なプロトコールの下で、クリニックで実施する。表１６は、患者アフェレーシス産物についての例示的な受け入れ基準を示す。

【表１６】

表 16 – 患者アフェレーシス製品のための受け入れ基準

パラメータ	受け入れ基準
外観 – 細胞溶液	凝集が最小であるかまたは全くない
外観 – バッグ	漏れも、損傷もクラックもないバッグ
文書化およびラベル	特有の対象識別子マッチ書類(例えば、2 種の特有の識別子)
輸送条件	要求される輸送条件と一致する

【０６３８】

バイオインフォマティクスプロセスを使用して、引き続いて製造され、Ｔ細胞製品の製造において使用される患者特異的ペプチドの選択を生じる。バイオインフォマティクスソフトウェアは、ペプチドの製造のために突然変異を同定し配列を選択するために順番に使用される、本出願人による実施許諾を得た市販のおよび公に入手可能なソフトウェアと、独占所有権のあるアルゴリズムとの組合せからなる。バイオインフォマティクスプロセスは、標準的な配列決定技術からのデータで開始する。第１に、患者特異的突然変異の同定および選択のためのソフトウェアアルゴリズムが要求される。第２に、ペプチド－ＭＨＣ結合の予測が、標準的なアプローチを使用して全ての候補について実施される。これらの十分確立された技法を組み合わせることで、Ｔ細胞刺激のためのペプチドのランク付けおよび選択が可能になる。全てのソフトウェアは、第１相臨床試験をサポートするために意図した使用に適していることを実証するために評価されている。独占所有権のあるアルゴリズムを試験したところ、仕様通りに機能することが検証され、得られたエピトープ配列選択は、一貫して期待通りに得られた。

【０６３９】

重要な生材料：１セット当たり最大３０～３５個のペプチドで、２セットのペプチドを提供するように製造された合成ネオ抗原ペプチド。バイオインフォマティクスプロセスからの予測された患者特異的ネオ抗原配列に基づいて、セット１は、８～１１マー（ＣＤ８＋ネオ抗原特異的Ｔ細胞を誘導するために使用される）であり、セット２は、およそ２５マー（ＣＤ４＋ネオ抗原特異的Ｔ細胞を誘導するために使用される）である。

【０６４０】
合成ペプチドは、患者に送達される薬物製品の一部ではなく、したがって、出発材料を構成しない。これらは、少なくとも９０％純粋な精製された産物として得られ、使用される。ペプチドは、単球由来ＤＣの成熟化の前に添加され、引き続いて、患者腫瘍細胞を認識し、それを直接的または間接的に排除することが可能なネオ抗原特異的Ｔ細胞の誘導、刺激および増大化のために、患者のＴ細胞に添加される。ペプチドは、分解（３７℃で延長された期間にわたる水性条件下でのインキュベーション）、細胞洗浄および希釈的製造ユニット操作を介して除去される可能性が非常に高く、薬物製品出荷の一部として試験されることはない。
【０６４１】
２セットのペプチドを合成して、ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩの両方の対立遺伝子上でのペプチドの提示に基づいて、ＣＤ８＋およびＣＤ４＋の両方の細胞の刺激を確実にすることを助ける。
【０６４２】
非臨床的開発：今日までのｉｎ　ｖｉｔｒｏ薬理学研究からの結果は、以下を実証している：健康なドナー由来の細胞では、ネオ抗原特異的ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞は、ナイーブＴ細胞区画から誘導され得、それにより、目的の腫瘍を認識および排除できるＴ細胞のレパートリーを潜在的に広げる。既存のＣＤ８＋メモリーＴ細胞応答は、さらに増大化され得る。これは、ネオ抗原特異的メモリーＴ細胞応答と同じ様式で挙動すると期待される、共通のウイルスエピトープに対するＴ細胞応答の文脈で示されている。臨床的に有効な免疫応答に関連すると考えられる、刺激後の複数の炎症性サイトカインの分泌によって測定される複数のＴ細胞エフェクター機能、すなわち、ネオ抗原およびウイルス特異的Ｔ細胞の多機能性が実証されている。複数のグループからの研究が、エフェクターメモリーおよびセントラルメモリー表現型を保有するＴ細胞が、養子細胞療法のための最適な集団であることを実証している。これらの集団は、移入後に存続すること、およびまた、増殖し、細胞傷害性機能を維持する能力を保有することが示されている。一貫して、Ｔ細胞治療的製品中のネオ抗原誘導されたＴ細胞の７５％よりも多くが、培養物中でおよそ４週間の後に、エフェクターメモリー表現型（ＣＤ４５ＲＡ－／ＣＤ６２Ｌ－）のものである。
【０６４３】
交差反応性評価は、ナイーブ区画から誘導された、健康なドナー由来のネオ抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞が、ネオ抗原ペプチドプールおよびその野生型対応物の滴定でチャレンジした場合に、突然変異体に対して明確に応答するが、対応するネイティブペプチドに対してはそうではないことを実証している。これらの知見は、誘導されたＴ細胞製品が、突然変異した標的に高度に特異的であることを示している。腫瘍保有患者ドナー由来の細胞を使用すること、および目的のネオ抗原を発現する腫瘍保有患者ドナー由来の腫瘍細胞系（卵巣および非小細胞がん）の死滅に基づいた概念実証の実演を含む、さらなる研究が計画される。
【０６４４】
樹状細胞培養物の派生で開始して、薬物製品の製造の完了まで、製造プロセスは、連続している。したがって、表１７に示される製品出荷試験スキームを考慮して、薬物物質は、注入バッグ中に充填する直前の、冷凍保存培地中の再懸濁された細胞である。薬物製品は、その最終コンテナおよび閉鎖システム中の製剤化された薬物物質である。
【０６４５】
薬物物質は、冷凍保存培地中に再懸濁されたＴ細胞治療的自家ＣＤ３＋Ｔ細胞である。
【０６４６】
薬物製品は、冷凍保存培地中に再懸濁され、注入のための最終バッグ中に充填されたＴ細胞治療的自家ＣＤ３＋Ｔ細胞である。
出荷試験
外観試験

【０６４７】
外観試験を、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１薬物製品注入バッグの視覚的試験によって実施する。
ＣＤ３＋Ｔ細胞の同一性および純度
【０６４８】
フローサイトメトリーアッセイを使用して、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の同一性および純度を測定する。多色フローサイトメトリーは、不均一な細胞製品の分析を可能にし、細胞毎のマルチパラメトリック情報を提供する。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１試験に使用するフローサイトメトリー方法は、分析のためにパネル中に４つのマーカーを含有する；ＣＤ３、ＣＤ１４、ＣＤ２５および生／死。アッセイを、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１のＱＣクライオバイアルを解凍することによって実施する。細胞を９６ウェルプレートに添加し、抗ＣＤ３、抗ＣＤ１４、抗ＣＤ２５および生死染料で染色する。ＣＤ３は、Ｔ細胞のマーカーである。ＣＤ１４およびＣＤ２５を、プロセスのモニタリングのためにパネル中に含める。アッセイが報告した結果は、％生存ＣＤ３＋細胞である。
生存度
【０６４９】
ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１についての生存度試験を、ＥＰ２．７．２９に従ってトリパンブルー排除試験を使用して実施する。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１のＱＣクライオバイアルを解凍し、トリパンブルーと１：１の比で混合する。パーセント生存度を、以下の方程式を使用して決定する：
（（生存細胞）／（総細胞計数））×１００＝パーセント生存度。
細胞計数
【０６５０】
最終細胞計数を、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１のＱＣクライオバイアルを使用して実施する。細胞計数を、ＥＰ２．７．２９に従って血球計を使用して実施する。細胞濃度を、計数された細胞の数、試料希釈倍率、および分析のための試料の体積に基づいて決定する。生存細胞計数を、患者のための細胞用量を決定するために使用する。
内毒素
【０６５１】
内毒素試験を、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１のＱＣクライオバイアルを使用して、Ｅｎｄｏｓａｆｅ－Ｐｏｒｔａｂｌｅ　Ｔｅｓｔ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＰＴＳ）システム（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）を使用して実施する。Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステムは、試料中の内毒素濃度と直接関連する色強度を測定する分光光度計である。色は、試料と発色性リムルスアメボサイトライセート（ＬＡＬ）との反応（速度論的発色試験方法）によって発色させる。Ｅｎｄｏｓａｆｅ－ＰＴＳシステムは、ＥＰ２．６．１４の全ての要件を満たす。このシステムは、ＦＤＡ認可された使い捨てカートリッジを利用する。スパイク回収対照をアッセイにおいて使用して、試料マトリックスからの阻害／増強の非存在を確認する。
マイコプラズマ
【０６５２】
ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１についてのマイコプラズマ試験を、核酸増幅（ＮＡＴ）を使用して実施する。この方法では、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１細胞含有最終収集試料を、２つの型のブロス培地中に接種する。適切な陽性（５０コロニー形成単位（ＣＦＵ）のマイコプラズマでスパイクしたブロス）および陰性対照（食塩水でスパイクしたブロス）をアッセイに含める。接種した試料を、３５～３７℃で９６±４時間インキュベートする。インキュベーション期間の終了時に、ＤＮＡを各試料から抽出する。ＤＮＡを、ＳＹＢＲグリーンを蛍光色素として使用するｑＰＣＲ反応において、鋳型として使用する。この試験方法は、ＥＰ２．６．７に記載されるＮＡＴ技法を使用するマイコプラズマについての試験に適合する。スパイク回収対照をアッセイにおいて使用して、試料マトリックスが、マイコプラズマ夾雑を検出するこの試験方法の能力を妨害しないことを確認する。

無菌性

【０６５３】

ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１についての無菌性試験を、ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔ無菌性システム（ＢｉｏＭｅｒｉｅｕｘ）を使用して実施する。ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔシステムは、無菌性夾雑を同定するために微生物自体の代謝を利用する自動化された成長ベースのシステムである。微生物夾雑物は、ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔ瓶中に含有される成長培地を代謝して、副産物としてCO_2を産生する。各バイアルは、比色センサーを含有する。微生物によって産生されたCO_2をセンサーが吸収する際に、これは、不可逆的な色変化を生み出す。検出閾値に達すると、この機器は、試験バイアルを陽性とマークする。自動読み取りが、インキュベーション期間の間、１０分毎に行われる。ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔシステムは、進行中（１４日目の上清、各個々の容器）および最終の製剤化されたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１について使用される。ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔシステムの検証が完了するまで、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１最終製品についての無菌性試験を、ＥＰ２．６．２７およびＥＰ２．６．１に従って実施する。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１試験のための試料体積は、２つの培地型（嫌気的および好気的）間で分割された、総製品体積の１％以上である。ＢａｃＴ／Ａｌｅｒｔシステムを、製品特異的マトリックスＮＥＯ－ＰＴＣ－０１試験を使用して検証する。さらなる詳細は、セクション３．２．Ｐ．５．３に提供される。データは、１４日間未満である無菌性試験方法をサポートするために使用される。

ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１中の細胞型を評価するための特徴付け試験フローサイトメトリー

【０６５４】

フローサイトメトリーパネルは、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１（骨髄系譜の細胞、Ｂ細胞およびＮＫ細胞を含む）中のＣＤ３＋Ｔ細胞下位集団および非ＣＤ３＋細胞型を評価するために開発された。さらに、マーカーを使用して、製品の分化状態を定義する。マーカーには、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、Ｖγ９、ＣＤ５６、ＣＤ１４、ＣＤ１９、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１１ｂ、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ４５ＲＡが含まれる。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１中のＣＤ４＋およびＣＤ８＋下位集団のパーセンテージを、生存ＣＤ３＋陽性細胞のパーセントとして報告する。

ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１中の残留ＩＬ－７およびＩＬ－１５の評価

【０６５５】

一部の実施形態では、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１中の残留ＩＬ－７およびＩＬ－１５のレベルは、電気化学発光検出アッセイキット（ＭｅｓｏＳｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ）を用いたサンドイッチイムノアッセイを使用して決定され得る。

ｐＭＨＣマルチマーを使用したコンビナトリアルコーディング分析

【０６５６】

ペプチド－ＭＨＣ（ｐＭＨＣ）マルチマーを使用したコンビナトリアルコーディング分析を使用して、ネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の数および大きさを同定する。Ｔ細胞は、標的細胞の表面上に発現されたペプチドＭＨＣ複合体へのＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の結合によってそれらの標的を認識する。ｐＭＨＣ複合体を組換え産生し、これらをフルオロフォアにカップリングすることによって、これらは、フローサイトメトリーによって抗原特異的Ｔ細胞を検出するための試薬として使用され得る。ｐＭＨＣマルチマーを、ＮＥＯＰＴＣ－０１製造のために使用される患者特異的な短いペプチドの各々について生成する。これは、ネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の全割合の算出を可能にし、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１によって認識されるエピトープを同定する。アッセイを実施するために、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１を解凍し、洗浄し、ｐＭＨＣマルチマー、ならびにＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ１４、ＣＤ１６およびＣＤ１９を含む表面マーカーのパネルで染色する。ＣＤ４－／ＣＤ１４－／ＣＤ１６－／ＣＤ１９－、ＣＤ８＋、ｐＭＨＣ＋Ｔ細胞の割合を、フローサイトメトリーを使用して定量化する。ＣＤ４＋Ｔ細胞応答を同定するために利用可能なｐＭＨＣマルチマー試薬は存在しない。したがって、抗原リコールアッセイがこの分析のために使用される。

抗原リコールアッセイ

【０６５７】
２４時間リコールアッセイと組み合わせたフローサイトメトリーを使用して、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１におけるネオ抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の数および大きさ、ならびに誘導されたＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の多機能性プロファイルを評価する。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１を、患者特異的ペプチドがロードされたまたはロードされていない樹状細胞と共に共培養する。２４時間後、細胞製品を、２つのアッセイ出力物を使用して特徴付ける：フローサイトメトリーを使用して、陰性対照と比較した、標的抗原の存在下でのＣＤ４＋Ｔ細胞上のＩＦＮγおよび／またはＴＮＦαの増加した発現として定義されるネオ抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞集団を同定する。フローサイトメトリーを使用して、ネオ抗原特異的ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の多機能性プロファイルを評価する。多機能性プロファイルは、陰性対照と比較した、標的抗原の存在下でのＩＦＮγ、ＴＮＦαおよび／またはＣＤ１０７ａの増加した発現によって定義される。ＣＤ８＋反応性の文脈において、ネオ抗原特異的細胞を、ＣＤ８＋ｐＭＨＣ＋Ｔ細胞に対して事前にゲートし、その後、多機能性を評価する。

自家腫瘍の認識

【０６５８】
自家腫瘍細胞への曝露の際の機能的Ｔ細胞の検出を使用して、抗原特異的Ｔ細胞が存在し、腫瘍細胞表面上に提示された抗原のレベルに対して感受性であることを決定する。このアッセイは、患者に由来する自家腫瘍消化物を使用する。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１を、自家腫瘍細胞と共に４時間共培養する。陰性対照（ＮＥＯＰＴＣ－０１単独）と比較した、標的抗原の存在下でのＩＦＮγ、ＴＮＦαおよび／またはＣＤ１０７ａの増加した発現は、自家腫瘍を認識することが可能なＮＥＯ－ＰＴＣ－０１中のＴ細胞の同定を可能にする。

細胞傷害アッセイ

【０６５９】
ペプチドがロードされたまたは安定に形質導入された標的細胞を使用する細胞傷害アッセイは、抗原特異的Ｔ細胞が抗原認識の際に腫瘍細胞を死滅させることが可能であることを確立する。このアッセイは、目的の抗原および関連するヒト白血球抗原（ＨＬＡ）対立遺伝子を安定に発現するように操作され得る黒色腫腫瘍細胞系Ａ３７５を使用する。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１を、Ａ３７５腫瘍細胞と共に６時間共培養し、その後、細胞傷害を、ＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａの脱顆粒、および早期アポトーシスのマーカーである腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３の上方調節によって測定する。

【０６６０】
表１７は、例示的な出荷試験および仕様を示す。表１８は、製品の例示的な特徴付けを示す。

【表１７】

表 17 – リリース検査および明細

	検査	方法	明細
同一性および効力	総有核細胞計数	血球計数器	≧1.0×10^9 個の細胞
	CD3+細胞同一性	フローサイトメトリー	CD3+が陽性:総細胞集団の≧40%
	細胞生存度	トリパンブルー排除	≧70%
	CD3+細胞割合	フローサイトメトリー	定量的明細は、プロセス開発およびエンジニアリングランデータおよびアッセイ定性的(qualification)データに基づき確立されるであろう
純度および安全性	無菌性	Bact Alert	増殖なし
	エンドトキシン	Endosafe-Portable Test System (PTS)システム (Charles River)	≦1.0 EU/mL 70kg の平均対象体重に基づく明細。対象に投与されるエンドトキシンの最終用量は、1 時間当たり患者体重 1kg 当たり 5.0 EU を超えないであろう。
	マイコプラズマ [a]	核酸増幅(NAT)によるマイコプラズマ DNA の検出	検出なし(陰性)

a. マイコプラズマ試料は、細胞が最も長く培養下にあるが細胞洗浄に先立つ製造ステップである、T細胞誘導培養物の収集時に採取されるであろう。したがって、この製造ステージは、コンタミネーションを検出するリスクに関して最悪の事態を表す。

略語: DNA=デオキシリボ核酸; ELISA=酵素結合免疫吸着検定法; PCR=ポリメラーゼ連鎖反応

【０６６１】

充填された薬物製品注入バッグ中への夾雑の導入のリスクを低減させるために、出荷試験試料を、薬物物質製造プロセスステップから採取する（最終製剤中に再懸濁させたＣＤ３＋Ｔ細胞）。このアプローチの例外は、Ｔ細胞培養物の収集の時点で採取される、マイコプラズマ試験のために採取される試料である。これは、細胞が培養物中に最も長く存在していたが細胞洗浄の前である、製造するステップである。したがって、この製造する段階は、マイコプラズマ夾雑を検出するリスクに関して最悪のケースを示す。

【表１８－１】

表 18 – 特徴付け検査

プロセスステップ #	プロセスステップ	検査	目的
出発材料	アフェレーシス製品	体積	患者細胞調達の一貫性
		表現型	患者細胞亜集団の可変性を決定する(マーカーは、CD3、CD4、CD8、CD19、CD14、CD16、CD56、CD11c、生/死を含む)
		pMHC マルチマーおよび 24 時間リコールアッセイを使用して、既存の CD4+および CD8+メモリー応答の存在を決定する	増大化に先立つ既存のネオ抗原特異的 CD4+および CD8+T 細胞の%を決定する
		分化状態	増大化に先立つアフェレーシス製品の分化状態を評価する(CD3、CD4、CD8、CD45RA、CD62L)
薬物製品検査	最終製剤における再懸濁後	表現型	薬物製品細胞サブタイプ集団の可変性を決定する(マーカーは、CD3、CD4、CD8、CD19、CD14、CD16、CD56、CD11c、生/死を含む)
		pMHC マルチマーおよび 24 時間リコールアッセイを使用した、ナイーブ区画からの CD4+/CD8+細胞の誘導	患者間の、ナイーブ区画から誘導された%細胞集団の可変性および範囲を決定する
		pMHC マルチマーおよび 24 時間リコールアッセイを使用した、既存の CD4+および CD8+メモリー応答増大化	患者間の、%既存の CD4+および CD8+細胞増大化の可変性および範囲を決定する
		特異性	野生型エピトープではなく突然変異体に対する排他的または優先的反応性によるネオ抗原特異性の実証によって製品の一貫性を確立する

【表１８－２】

プロセスステップ#	プロセスステップ	検査	目的
		機能性	1)ペプチドがロードされた標的またはネオ抗原発現腫瘍系(IFNγ、TNFα、41B-B、CD107)に応答したCD4+およびCD8+ネオ抗原特異的T細胞応答の多機能性の実証によって製品の一貫性を確立する 2)操作された細胞系を使用した細胞死滅の実証によって製品の一貫性を確立する(アッセイが利用できる場合)

【表１９】

表19－T細胞療法薬の薬物製品安定性検査間隔および検査

時点	アッセイ
T初期	細胞計数、生存度、同一性、効力、無菌性、エンドトキシン、マイコプラズマ
T1 M	細胞計数、生存度、同一性、効力、無菌性、エンドトキシン
T3 M	細胞計数、生存度、同一性、効力
T6 M	細胞計数、生存度、同一性、効力、無菌性、エンドトキシン

（実施例３４）

卵巣がんを有する患者におけるＴ細胞療法（上で議論したＴ細胞治療薬）の使用のためのプロトコール

【０６６２】

この実施例は、白金感受性高悪性度漿液性卵巣癌を有する患者におけるネオ抗原で活性化されたＴ細胞療法（本明細書で以下「Ｔ細胞治療薬」）の、提案された非盲検単一アーム第Ｉ相研究を記載する。

【０６６３】

主目標：無症候性再発を経験している、白金感受性疾患を有する転移性卵巣がん患者における、Ｔ細胞治療薬の単一の治療薬注入の安全性を評価すること。副次的目標：（ｉ）Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｃｒｉｔｅｒｉａ ｉｎ Ｓｏｌｉｄ Ｔｕｍｏｒｓ（ＲＥＣＩＳＴ）ｖ１．１に基づいて無進行生存によって評価される抗腫瘍活性を決定すること。（ｉｉ）無化学療法期間、第１の引き続く療法までの時間、および全生存期間によって評価される抗腫瘍活性を決定すること。探索的目標には以下が含まれる：（ｉ）Ｔ細胞治療薬による処置の前、その間およびその後の、末梢血生検および腫瘍生検の両方における抗原特異的ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答を含む細胞性免疫応答の評価によって、免疫原性を特徴付けること。（ｉｉ）注入された細胞のクローン性増大化、存続および表現型を特徴付けること。（ｉｉｉ）患者応答を、探索性バイオマーカー、例えば、ＰＤ－Ｌ１発現、

体細胞突然変異負荷およびネオ抗原負荷と相関させること。
研究設計：用量評価：
【０６６４】
Ｔ細胞治療薬である、自家個別化ネオ抗原特異的養子Ｔ細胞療法を、１回以下の以前の白金ベースの療法で処置された、白金感受性高悪性度漿液性卵巣がんを有する患者に投与する。患者を、少なくとも１週間離れた２回の測定における、ベースラインレベルの少なくとも２倍の、ＣＡ１２５の報告された上昇後に登録する。１５人の患者が、処置を完了するように計画される。この研究は、1×10^{11}個のＣＤ３＋細胞の最大用量までの用量漸増形式で実施する。最小用量は定義されない。製品の個別化された性質の結果として、細胞用量は、患者毎に変動し得る。1×10^{11}個のＣＤ３＋細胞の最大用量は、ＴＩＬ療法などの匹敵する製品に基づく。ＴＩＬ療法を用いた既存の研究では、患者は、広範な細胞用量を受けており、細胞用量と臨床的利益との間には、いかなる明確な関連も存在していなかった。注入された細胞は、患者毎に可変的に増大化すると期待される。この増大化が患者体重に関連するという証拠も身体表面積に関連するという証拠も存在しないので、一律に固定された用量漸増スキームが用いられてきた。
処置：
【０６６５】
Ｔ細胞治療薬が患者への投与のために出荷される時点で、これらは、反復Ｘ線撮影評価を受け、２日間（－５日目および－４日目）のシクロホスファミド３０ｍｇ／ｋｇ／ｄおよび３日間（－３日目、－２日目および－１日目）のフルダラビン２５ｍｇ／m^2／ｄによるプレコンディショニングレジメンを開始する。０日目に、Ｔ細胞治療薬を、単一のＩＶ注入として投与する。1×10^{10}個のＣＤ３＋細胞の初期用量を、最初の３人の患者において評価する。この用量レベルでの患者の注入は、毒性について評価するために、最低２週間ずらす。この用量レベルでの注入が十分に耐容性であると示された場合、第２の用量レベル（３人の患者）は、1×10^{11}個のＣＤ３＋Ｔ細胞を受ける。このより高い用量での細胞注入もまた、毒性について評価するために、最低２週間ずらす。1×10^{11}個細胞の注入が、３人の患者によって十分に耐容性であると示された場合、全ての引き続く患者は、最大で1×10^{11}個の細胞を受ける。全ての処置を、入院患者設定で投与する。Ｔ細胞治療薬は、患者毎に製造され、製造された細胞の数において不均一であると期待される。製造された用量が、用量レベル１において1×10^{10}個のＣＤ３＋を上回る場合、または用量レベル２において1×10^{11}個のＣＤ３＋細胞を上回る場合、標的用量レベルを示す製造された用量の一部分のみが与えられる。製造された用量が、これらの標的化された用量レベルを下回る場合、その用量が与えられるが、患者は、ＤＬＴについて評価可能とはみなされず、３＋３設計を目的として置き換えられる。最大耐用量（ＭＴＤ）定義：許容される副作用を伴う注入された細胞の最も高い用量。
【表２０】

表 20－ 用量コホート

用量コホート	リンパ球枯渇	用量範囲 （単一の静脈内用量）
1	フルダラビン+シクロホスファミド	最大 1×10^{10} 個の総 CD3+細胞
2	フルダラビン+シクロホスファミド	最大 1×10^{11} 個の総 CD3+細胞

用量範囲：

【０６６６】

最小用量は定義されない。製品の個別化された性質の結果として、細胞用量は、患者毎に変動し得る。１×１０^{11}個のＣＤ３＋細胞の最大用量は、ＴＩＬ療法などの匹敵する製品に基づく。ＴＩＬ療法を用いた既存の研究では、患者は、広範な細胞用量を受けており、細胞用量と臨床的利益との間には、いかなる明確な関連も存在していなかった。注入された細胞は、患者毎に可変的に増大化すると期待される。この増大化が患者体重に関連するという証拠も身体表面積に関連するという証拠も存在しないので、一律に固定された用量漸増スキームが用いられてきた。１×１０^{10}個のＣＤ３＋細胞を、最初の３人の患者において評価する。この用量での注入が十分に耐容性であると示された場合、引き続く患者は、最大で１×１０^{11}個のＣＤ３＋細胞を受ける。

用量制限毒性（ＤＬＴ）：

【０６６７】

用量制限毒性の定義は、以下のとおりである：細胞注入後２４時間以内に生じるグレード３またはそれよりも高い毒性（細胞注入に関連する）。毒性は、２用量の１０００ｍｇの経口（ＰＯ）アセトアミノフェンまたは２用量の２ｍｇの経口（ＰＯ）クレマスチンを用いて８時間以内にグレード２未満またはそれと等しくなるまで可逆的であってはならない。グレード３の自己免疫。毒性は、１０日以内にグレード２未満またはそれと等しい自己免疫毒性まで消散されるべきでも逆転されるべきでもない。任意のグレード４の自己免疫毒性。任意のグレード３またはそれよりも高い非血液学的毒性。

【０６６８】

リンパ枯渇性化学療法レジメンまたは支持的薬物投与に起因する期待される毒性は、ＤＬＴとはみなさない。

サイトカイン放出症候群（ＣＲＳ）の定義および処置：

【０６６９】

サイトカイン放出症候群は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）で改変されたＴ細胞および二重特異的Ｔ細胞係合抗体で観察されてきた、免疫系の重症毒性である。これらの治療法は、ＣＲＳの注目すべき時折は重症の毒性を誘導もしつつ、印象的な臨床的有効性を生じている、超生理学的Ｔ細胞活性化によって特徴付けられる。ＣＲＳは、Ｔ細胞の係合および増殖に関連するサイトカイン上昇から生じる一連の炎症性症状である。ほとんどの症例では、これらの症状には、軽度の発熱および筋肉痛が含まれるが、これらは、血管漏出、低血圧、肺水腫および凝固障害を伴う重症炎症性症候群としても存在し得る。

【０６７０】

ＣＲＳのリスクは、いずれの免疫活性化療法についても存在するが、本出願人は、Ｔ細胞治療薬によるＣＲＳのリスクは極度に低いと考えている。Ｔ細胞治療的細胞製品は、遺伝子改変されておらず、Ｔ細胞は、超生理学的レベルで機能するように刺激も、活性化も操作もされていない。注目すべきことに、ＣＲＳは、ＴＩＬ療法では観察されてこなかった。

【０６７１】

ＣＡＲ－Ｔ細胞臨床的研究からのＣＲＳでの経験により、本出願人は、Ｔ細胞注入後の末梢血Ｃ反応性タンパク質、フェリチンおよびＩＬ－６の毎日の測定により、Ｔ細胞注入後のＣＲＳについてモニタリングする。重症サイトカイン放出症候群の迅速な逆転は、インターロイキン－６－受容体遮断抗体トシリズマブによる処置によって達成されており、トシリズマブを、この研究において重症ＣＲＳの管理に組み込む。

安全性審査委員会（ＳＲＣ）

【０６７２】

ＳＲＣは、現場の研究者、スポンサー医療モニター、研究開発のスポンサー代表、および適宜臨時メンバーから構成される。細胞注入の毒性、免疫学的効果および抗腫瘍有効性を確認するための注意深い評価を、継続的に実施する。

研究段階：

【０６７３】
（１）ＣＡ　１２５についての事前スクリーニング。白金感受性患者（６ヶ月よりも長いまたはそれと等しい期間にわたる第１選択の白金化学療法に対する臨床的応答として定義される）は、３ヶ月毎にＣＡ　１２５試験を受ける。ベースラインＣＡ　１２５レベルは、第１選択の白金化学療法の完了後最初の６ヶ月以内に報告された最下点値として定義される。
【０６７４】
無症候性ＣＡ　１２５上昇の際のスクリーニング。ベースラインレベルの少なくとも２倍の、ＣＡ　１２５の検出された上昇の際に、患者は、疾患負荷の程度を決定するためのＣＴスキャンを受ける；全てのスキャンは、地域で検査し、必要に応じて、中央での検査が行われる。測定可能な疾患の少なくとも１つの部位を有する患者は、適格性を決定するためのスクリーニングを受ける。スクリーニング手順は、以前のがん療法および関連の手術を含む完全な医療歴、併用薬物適用、完全な身体検査、Ｅａｓｔｅｒｎ　Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｇｒｏｕｐ（ＥＣＯＧ）パフォーマンスステータス（ＰＳ）、バイタルサイン、１２誘導心電図（ＥＣＧ）、ならびに臨床実験室評価（血液学、化学、尿検査、妊娠試験、甲状腺試験）からなる。
【０６７５】
生検およびアフェレーシスを含む事前処置。上記スクリーニング基準を満たす患者を、試験に登録する。登録後、患者は、スクリーニングから１４日以内に腫瘍生検または外科的切除を受けて、配列決定および個人に合わせた突然変異分析のための組織を得る。腫瘍生検は、ホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）でなければならず、病理学によって評価した場合に最低３０％の腫瘍細胞充実度を含有していなければならない。末梢血の試料を、「正常」組織対照として機能するように、ならびにヒト白血球抗原（ＨＬＡ）クラスＩおよびＩＩ分類のために、並行して得る。ＤＮＡを、腫瘍および正常の両方から生成し、患者の特有の突然変異ランドスケープを同定するために、全エキソーム配列決定にかける。腫瘍ＲＮＡを並行して配列決定して、遺伝子発現を特徴付ける。残りの腫瘍組織を、腫瘍マーカーおよび免疫細胞マーカーの免疫組織化学的分析にもかける。事前処置の間に、患者は、最低６血液体積のアフェレーシスもまた受ける。アフェレーシスから単離したＴ細胞および抗原提示細胞を、Ｔ細胞治療的薬物製品の生成のために使用する。
【０６７６】
Ｔ細胞治療薬産生。Ｔ細胞治療薬の産生は、腫瘍生検およびアフェレーシス後、１２～１６週間の期間にわたって行われる。自家の個別化されたネオ抗原特異的養子Ｔ細胞療法である製品は、各個々の患者の腫瘍に由来するネオ抗原ペプチドがロードされた自家抗原提示細胞を用いてｅｘ　ｖｉｖｏで増大化されたＣＤ３＋Ｔ細胞からなる。ネオ抗原ペプチドは、各患者の腫瘍における突然変異の配列分析に基づいて設計されるので、患者の腫瘍細胞に特異的でありかつ患者に特有である。
処置
【０６７７】
患者のＴ細胞製品が出荷される時点で、これらは、反復Ｘ線撮影評価を受け、２日間（－５日目および－４日目）のシクロホスファミド３０ｍｇ／ｋｇ／ｄおよび３日間（－３日目、－２日目および－１日目）のフルダラビン２５ｍｇ／ｍ^{2}／ｄによるプレコンディショニングレジメンを開始する。０日目に、Ｔ細胞治療薬を、ＩＶ注入によって投与する。１×１０^{10}個のＣＤ３＋細胞の初期標的用量を、最初の３人の患者において評価する。患者を、毒性について評価するために、１×１０^{10}個の細胞を受けている最初の３人の患者について、最低２週間ずらす。この用量レベルでの注入が十分に耐容性であると示された場合、第２の用量レベルの患者は、１×１０^{11}個のＣＤ３＋細胞を受ける。このより高い用量での細胞注入は、毒性について評価するために、１×１０^{11}個の細胞を受けている最初の３人の患者について、最低２週間ずらす。１×１０^{11}個の細胞の注入が、３人の患者によって十分に耐容性であると示された場合、全ての引き続く患者は、０日目に、最大で１×１０^{11}個の細胞のＴ細胞治療薬の単回注入を受ける。全ての処置を、

入院患者設定で投与する。Ｔ細胞治療薬は、患者毎に製造され、用量において不均一であると期待される。製造された用量が、用量コホート１において１×１０^{10}個のＣＤ３＋を上回る場合、または用量コホート２において１×１０^{11}個のＣＤ３＋細胞を上回る場合、用量標的レベルを示す製造された用量の一部分のみが与えられる。製造された用量が、これらの標的化された用量レベルを下回る場合、その用量が与えられ得るが、患者は、ＤＬＴについて評価可能とはみなされず、３＋３設計を目的として置き換えられる。１日目に開始して、フィルグラスチムを、５ｍｃｇ／ｋｇ／日（３００ｍｃｇ／日を超えない）の用量で皮下投与する。フィルグラスチム投与を、好中球計数＞１．０×１０^{9}個／Ｌ×３日間または＞５．０×１０^{9}個／Ｌになるまで、毎日継続する。１２～１６週間の産生段階の間、患者が、即時の治療法を要求する症候性進行を経験する場合、彼らは研究に残ってもよく、臨床的に適切な場合、ベースラインを上回るＣＡ　１２５の２×の上昇によって報告された第２の再燃の時点で、Ｔ細胞治療薬を受ける。

追跡

【０６７８】

この研究の一次処置期は、１週目～５２週目である。一次処置期の間に実施される安全性評価には、有害事象（ＡＥ）採集、症状指向性身体検査、バイタルサインの測定、ＥＣＯＧ　ＰＳ、および安全性実験室評価が含まれる。処置に対する応答を評価するためのＸ線撮影評価を、１２週目、２４週目および４８週目に実施する。フィルグラスチム投与のおよそ４～６週間後、患者は、完全な腫瘍評価ならびに毒性および免疫学的パラメーターの評価を受ける。患者は、このプロトコールを受けつつ他の実験的薬剤を受けることはない。包括的な免疫モニタリングのための末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、４時間、４日、１４日、１ヶ月の時点で、およびその後１ヶ月に１回、Ｔ細胞治療薬注入後に、８０～１２０ｃｃの末梢血採血から得る。処置前の生検に加えて、コアまたは外科的生検を、２０週目と２４週目との間および／または疾患進行の時点で、実施すべきである。

（実施例３５）

転移性黒色腫の養子細胞療法のための自家ネオ抗原特異的Ｔ細胞製品の開発

拡大縮小可能なプロセスエンジニアリング、Ｔ細胞製造、および品質管理

【０６７９】

この実施例では、転移性黒色腫患者由来の白血球アフェレーシスを使用した複数の上首尾なプロセスエンジニアリングランの結果が示される。ＮＥＯ－ＳＴＩＭは、独占所有権のあるｅｘ　ｖｉｖｏ誘導プロセスであり、各個々の患者の腫瘍由来の複数のネオ抗原を標的化する高度に特異的なＴ細胞応答を含有するネオ抗原特異的Ｔ細胞製品（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１）を生成した；これらのＴ細胞応答は、多機能性であり、自家腫瘍を認識することができる。臨床試験プログラムは、本明細書に記載されるプロセスを使用して開始する。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１に対する臨床プログラムのための汎用ワークフローは、図１Ａおよび６７中に図形として示される。このプログラムについて想定される利点は、図６７に概要が示される。

【０６８０】

複数のネオ抗原特異的Ｔ細胞応答をプライム、活性化および増大化させる誘導プロセスＮＥＯ－ＳＴＩＭ（商標）が記載される。薬物製品ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の特徴（特異性、機能性および表現型）は、臨床的利益を付与すると期待され、抗原逃避のリスクの低減、オフターゲット毒性のリスクの低減、存続および腫瘍細胞死滅を駆動するための最適なＴ細胞表現型の選択、固形腫瘍にわたる広い臨床的機会のカバー、ならびに毒性の限定的な期待を有する操作されていない細胞製品が生成されるという利点の使用が含まれるがこれらに限定されない、他の細胞療法モダリティが直面している課題を克服すると期待される。各個々の患者の腫瘍由来の複数のネオ抗原を標的化する高度に特異的なＴ細胞応答を含有するネオ抗原特異的Ｔ細胞製品（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１）を生成した；これらのＴ細胞応答は、多機能性であり、自家腫瘍を認識することができる。

【０６８１】

４つのプロセスエンジニアリングランは、ＩＲＢ承認の下で得た１人の健康なドナーお

よび３人の黒色腫患者の試料由来のＰＢＭＣを使用して、Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ Ｕｎｉｔ ｏｆ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ － Ａｎｔｏｎｉ ｖａｎ Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋ（ＮＫＩ－ＡＶＬ）が実施した（表２２）。

【０６８２】

黒色腫患者について、患者特異的ネオ抗原を、Ｔ細胞エピトープ予測プログラムを使用して予測した。ＨＤ１０８について、ドナーＨＬＡ対立遺伝子に拘束された、以前に同定されたネオ抗原およびモデル抗原を使用して、ＮＥＯ－ＳＴＩＭを実行した。８～２５ａａの長さの合成ペプチドを生成した。ＮＥＯ－ＳＴＩＭを使用して、容器１つ当たり最大で５０×１０^{6}個のＰＢＭＣを使用して、メモリーおよびｄｅ ｎｏｖｏ Ｔ細胞応答をプライム、活性化および増大化させた。

【０６８３】

これらのネオ抗原特異的Ｔ細胞の特異性、表現型および機能性を、以下のアッセイを用いてこれらの応答を特徴付けることによって分析した：

・ｐＭＨＣマルチマーを使用したコンビナトリアルコーディング分析。

・詳細なフロー特徴付け。マーカーには、これらに限定されないが、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＡおよびＣＤ６２Ｌが含まれた。

・ａ）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答を同定および検証するため、ｂ）ＣＤ８$^{+}$およびＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答の多機能性を評価するため、ならびにｃ）自家腫瘍を認識する能力を評価するための、多重化マルチパラメーターフローサイトメトリーを使用したリコール応答アッセイ。炎症促進性サイトカインＩＦＮ－γおよびＴＮＦα、ならびに脱顆粒のマーカーとしてのＣＤ１０７ａの上方調節を測定した。

・天然にプロセシングおよび提示されたまたは外因性にロードされた抗原に応答して標的細胞を認識しそれを死滅させるネオ抗原特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答の能力を理解するための、ネオ抗原発現腫瘍系を使用した細胞傷害アッセイ。

結果

【０６８４】

養子Ｔ細胞治療的製品ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の製造についての情報を与える前臨床開発活動は、１人の健康なドナーおよび３人の転移性黒色腫患者由来の白血球アフェレーシスを使用する４つのプロセスエンジニアリングランの実行を首尾よく生じた。

【０６８５】

生成された最終薬物製品は、４つ全てのプロセスエンジニアリングランについて出荷仕様を満たした（表２１）。

【表２１】

表 21 – 受け入れ基準を満たす薬物製品の結果

全ランについての NEO-PTC-01 のための受け入れ基準	
検査	結果
細胞計数	合格
生存度	合格
Ｔ細胞純度/同一性(CD3^{+}細胞)	合格
マイコプラズマ	合格
エンドトキシン	合格
無菌性	合格

【０６８６】
最終薬物製品の大部分は、ＣＤ３＋Ｔ細胞からなった（範囲：６７．４％～９０％）。Ｂ細胞、ＮＫ細胞およびＡＰＣが非ＣＤ３＋画分を構成した（図６８）。
【０６８７】
１９のＣＤ８＋Ｔ細胞応答および２５のＣＤ４＋Ｔ細胞応答が、ＰＢＭＣから誘導された（それぞれＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞について、患者１人につき範囲４～５および４～７、表２２、図６９Ａ～６９Ｃ）。黒色腫患者由来のＰＢＭＣにおいて誘導された全てのＴ細胞応答は、ｄｅ　ｎｏｖｏ　Ｔ細胞応答であると推定される；未操作の出発材料では、既存の応答は検出されなかった。これは、健康なドナー由来のＰＢＭＣについても当てはまった；しかし、同定された応答のうち１つは、ＭＡＲＴ１に対するものであり、これは、末梢血において高い前駆体頻度を有することが公知である。このように、このプロセスは、ナイーブ区画からＴ細胞応答を首尾よく誘導した。さらに、健康なドナーでは、高い前駆体頻度を有することが公知のＴ細胞応答が増大化され、これは、メモリーＴ細胞応答の増大化と似ている。
【表２２】

表 22 – エンジニアリングランの誘導のための設計

ラン ID *材料供給源*	誘導された CD8⁺応答	誘導された CD4⁺応答
パイロットラン *健康なドナー*	$REL_{G>R}$, $ZDBF2_{P>L}$, $KXD1_{S>F}$, MART1 & SNA70	$PRKDC_{E>K}$, $MERTK_{E>K}$, $CDK4_{R>C}$, $GAS7_{H>Y}$, $RQDC1_{P>L}$, HIV1 & HIV2
黒色腫患者 1	$ZNF226_{H>Y}$, $LRBA_{S>L}$, $DNM2_{D>V}$, $BBS4_{L>F}$, & $GTF2H3_{V>A}$	$PRKDC_{E>K}$, $MARCH7_{S>F}$, $TRAK2_{G>V}$, $RANBP9_{P>S}$, $DNM2_{D>V}$, $MERTK_{E>K}$, $OSBPL8_{L>S}$
黒色腫患者 2	$TENM3_{S>L}$(10mer), $CERK_{P>S}$, $ITPR3_{E>K}$, $TENM3_{S>L}$(9mer) & $ATP2C1_{E>K}$	$TENM3_{S>L}$, $ARID2_{S>L}$, $ATP2C1_{E>K}$, $CERK_{P>S}$, $ATP5G2_{S>F}$, $TNFRSF10B_{P>L}$, & $ALG13_{G>R}$
黒色腫患者 3	$REL_{G>R}$, $PDE8A_{P>S}$, $WWP2_{P>S}$ & $VANGL2_{S>F}$	$ACACA_{H>Y}$, $MYCBP2_{S>F}$, $ALS2_{A>T}$ & $TOR1AIP1_{T>I}$

【０６８８】
さらなる特徴付けを実施して、ＮＥＯ－ＳＴＩＭ誘導されたＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞の多機能性プロファイルおよび分化状態を評価した。突然変異体ペプチドがロードされたＤＣでの再チャレンジの際に、ネオ抗原特異的Ｔ細胞は、１、２および／または３つの機能を示した（ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答の多機能性プロファイルの例は、それぞれ、図６９Ｃおよび図７０下パネルに示される）。図７０上パネルは、代表的な誘導された応答におけるＩＦＮ－γおよび／またはＴＮＦ－αを発現するＣＤ４＋細胞の割合を示す代表的なデータを実証する。右上パネルは、ＩＦＮ－γ＋ＣＤ４＋Ｔ細胞の例示的なフローサイトメトリープロットを示す代表的なデータを示す。さらに、薬物製品の分化状態を評価した。ＮＥＯ－ＳＴＩＭ誘導されたＴ細胞の大部分は、エフェクターメモリー

およびセントラルメモリー表現型のものであった（図７１）。

【０６８９】

ＮＥＯ－ＳＴＩＭ誘導されたＴ細胞応答は、突然変異体エピトープに高度に特異的であることが示された。誘導されたＣＤ８$^{+}$およびＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞応答の特異性を評価し、以下の２つのカテゴリーに割り当てた（図７２）：（ｉ）突然変異体反応性および（ｉｉ）野生型交差反応性。突然変異体反応性のカテゴリーは、（ａ）突然変異体エピトープに対してはＩＦＮ－γおよび／もしくはＴＮＦαにおける有意な増加を示すが、野生型エピトープに対してはそうではない、突然変異体特異的である；ならびに／または（ｂ）突然変異体および野生型エピトープに対してＩＦＮ－γおよび／もしくはＴＮＦαにおける有意な増加を示す、突然変異体選択的である。しかし、突然変異体エピトープに対するシグナルは、野生型エピトープと比較して、有意に高い。野生型交差反応性のカテゴリーは、突然変異体および野生型エピトープに対してＩＦＮ－γおよび／またはＴＮＦαにおける有意な増加を示す。２つのシグナル間に有意差は存在しない。要約すると：ＣＤ４$^{+}$区画について、Ｔ細胞応答は、両方のカテゴリーで検出された；ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の８５％は、突然変異体反応性であり、１５％は、野生型エピトープと交差反応性であった。ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞区画について、全てのＴ細胞の１００％が、突然変異体反応性であった（表２３）。

【表２３】

表 23-全ての検査した応答、チューキー検定を使用して割り当てた有意性、$P<0.05$ の概要

パイロットラン、ENG-01&ENG-02			
	検査した応答	突然変異体反応性	野生型に対する交差反応性
CD4	13	85%	15%
CD8	3	100%	0%

【０６９０】

最後に、ＮＥＯ－ＳＴＩＭ誘導されたＴ細胞の細胞傷害能を、同定されたＴ細胞応答のサブセットについて評価した。ドナー特異的ＨＬＡ対立遺伝子および研究された突然変異を発現する、形質導入された腫瘍細胞系を、パイロットランおよびＥＮＧ－０１について生成した。ＥＮＧ－０２について、ドナー特異的ＨＬＡ対立遺伝子を発現するペプチドがロードされた腫瘍細胞を使用した（図７３）：

ｉ．　$REL_{G>R}$（パイロット）および$LRBA_{S>L}$（ＥＮＧ－０１）に対して指向されるＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答は、共培養後に、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａ、および突然変異体構築物で形質導入された腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３の有意な上方調節を示した。

ｉｉ．　$TENM3_{S>L}$および$ITPR3_{E>K}$（ＥＮＧ－０２）に対して指向されるＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答は、ペプチドがロードされた腫瘍標的との共培養後に、腫瘍細胞上の活性カスパーゼ３の有意な上方調節、および$TENM3_{S>L}$の場合には、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上のＣＤ１０７ａの上方調節を示した。

【０６９１】

重要なことに、ＥＮＧ－０１およびＥＮＧ－０２から生成されたＴ細胞を、入手可能な自家腫瘍消化物と共に共培養することで、誘導されたＴ細胞が、ネオ抗原特異的Ｔ細胞上のＩＦＮ－γ^{+}およびＣＤ１０７ａの上方調節に基づいて、自家腫瘍細胞を直接認識することが可能であったことが証明された（図７４）。

【０６９２】

この例示的な誘導プロセスを使用して、強力なＴ細胞製品が、治療的規模で黒色腫患者のＰＢＭＣから再現性良く生成され得る。誘導プロセスは、複数のＣＤ８＋およびＣＤ４

＋Ｔ細胞応答を誘導する。誘導されたＴ細胞応答は、突然変異体反応性であり、多機能性プロファイルを示し、セントラルおよびエフェクターメモリー表現型を有する。誘導されたＴ細胞応答は、抗原発現腫瘍細胞系の認識の際の細胞傷害性機能の上方調節によって示される、細胞傷害能を有する。重要なことに、誘導されたＴ細胞培養物は、自家腫瘍を直接認識することができる。

臨床的適用

【０６９３】

拡大縮小された製造されたＴ細胞の例示的な臨床的適用は、黒色腫、肺がん、膵がん、神経膠芽腫、卵巣がんに対する処置が含まれるがこれらに限定されない適用において開示された臨床的適用のいずれかであり得る。

【０６９４】

臨床試験を開始するためのプログラムにおけるさらに別の適用は、図７５に要約される。この適用では、患者は、２つのコホート中に含まれる。コホートＡ：抗ＰＤ１処置に対して不応性でありかつ抗ＣＴＬＡ－４療法を受けた患者。これらの患者を、２つの用量の上記薬物製品に付す。（ｉ）少数の患者に10^8～10^9個の細胞の単剤療法を与え、少数の患者に10^9～10^{10}個超の細胞を与える。コホートＢ：コホートＡで決定した用量での、抗ＣＴＬＡ４ありまたはなしでの抗ＰＤ１中の３ヶ月の時点で安定なまたは無症候性の進行者である患者を含める。

（実施例３６）

進行型または転移性黒色腫を有する患者におけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１のオープンラベル第Ｉ相研究

【０６９５】

本研究は、ｅｘ　ｖｉｖｏで製造され、腫瘍および腫瘍微小環境にディスプレイされるネオ抗原を標的化する、養子細胞療法のための自家個別化Ｔ細胞製品であるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１を調査することになる。ネオ抗原は、患者の主要組織適合複合体（ＭＨＣ）クラスＩおよびクラスＩＩ対立遺伝子の文脈で提示される、ＤＮＡにおける突然変異に由来する腫瘍特異的抗原である。ネオ抗原の標的化は、個性化アプローチを利用し、各細胞製品の組成物を調節して、患者毎に個別化Ｔ細胞製品を生成する機会を提供する。製品に由来する細胞は、セントラルまたはエフェクターメモリー表現型に由来し、複数の機能を行うことができる（見込まれる作用機構は、標的細胞の認識後のサイトカイン産生および脱顆粒を含む）ことが予想され、野生型エピトープと比較して高度に突然変異体特異的であることが予想される。このネオ抗原特異的養子Ｔ細胞療法の追加は、より耐久性のある抗腫瘍応答、症状管理および延長された腫瘍無増悪期間を含む、チェックポイント阻害剤ＳＯＣ療法を上回る有意な臨床利益を提供することができる。

【０６９６】

研究の目標

この研究の主目標は、切除不能なまたは転移性の黒色腫を有する患者におけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の安全性を評価することおよびその最も高い耐用量を決定することである。この研究の副次的目標は、１）Ｒｅｓｐｏｎｓｅ　Ｃｒｉｔｅｒｉａ　ｉｎ　Ｓｏｌｉｄ　Ｔｕｍｏｒｓ（ＲＥＣＩＳＴ）ｖ１．１（Ｅｉｓｅｎｈａｕｅｒ，　２００９）に基づいて無進行生存によって評価される抗腫瘍活性を決定すること、ならびに２）奏効率（ＯＲＲ）、奏効期間（ＤＯＲ）および臨床的有用率（ＣＢＲ）によって評価される抗腫瘍活性を決定することである。

研究設計

【０６９７】

研究ＮＴＣ－００１は、切除不能なまたは転移性の黒色腫を有する患者におけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の安全性および活性の第１相調査である。本研究は、２つのパートで行われることになる。研究のパート１は、用量漸増による単独療法のために設計されており、それによると、抗Ｐ－１療法において進行しており、抗ＣＴＬＡ４療法を受けた患者は、≧1×10^8個の細胞～≦1×10^9個の細胞、＋／－２５％（用量１）を受けること

になるか、または２×１０^{9}個の細胞～≦１×１０^{10}個の細胞、＋／－２５％（用量２）を受けることになる。次に、安全かつ許容できると思われる、最高用量コホートにおける患者における用量増大化が来るであろう（図８２）。研究のパート２は、併用療法のために設計されており、それによると、抗ＰＤ－１療法（抗ＣＴＬＡ４療法ありまたはなし）において３ヶ月後に安定または無症候性進行者であると思われる患者は、パート１において安全であると決定された用量の個人用Ｔ細胞療法薬、プラス、抗ＰＤ－１療法（抗ＣＴＬＡ４ありまたはなし）を受けることになる。患者は、治験への算入および自身の個人用Ｔ細胞療法薬の産生後に、抗ＰＤ１（＋／－抗ＣＴＬＡ４）療法を受け、経過観察期間全体にわたって抗ＰＤ１処置を続けるであろう（最大ＥＯＳまで）。研究のこのパートは、抗ＰＤ１と個人用Ｔ細胞療法薬との組合せの有効性を測定するであろう（図８２および図８３）。研究のパート２のためのプレスクリーニングおよびスクリーニング相は、０日目の個人用Ｔ細胞療法薬の投与に相対的に、それぞれ－２０日目から－１６日目の間に行われることになる。選択された対象は、－１２日目に白血球アフェレーシスに付され、細胞は、その後の期間のために加工されて、個人用Ｔ細胞療法薬を生成する。－１日目に、対象は、個人用Ｔ細胞療法薬に先立ち、化学療法の最後の用量を投与される。個人用Ｔ細胞療法薬は、０日目に投与され、それに続いて、３６～５２週間の経過観察期間がある。対象は、抗ＰＤ－１療法薬（ニボルマブ）の用量を６週間に１回（Ｑ６Ｗ）投与されるであろう（図８３）。

研究集団

【０６９８】

ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１阻害剤およびＣＴＬＡ－４阻害剤の両方で処置されながら進行した、切除不能なまたは転移性の黒色腫を有する成人男性および女性、年齢１８～７５歳（部分１）。

介入

【０６９９】

研究部分１の患者は、≧１×１０^{8}～≦１×１０^{9}個の細胞の用量で開始するＮＥＯ－ＰＴＣ－０１を受ける。研究部分２（増大化コホート）の患者は、部分１からの最も高い耐用量のＮＥＯ－ＰＴＣ－０１を受ける。

研究の主要研究パラメーター／転帰

【０７００】

研究の一次目標を次に示す：（ｉ）切除不能なまたは転移性の黒色腫を有する患者におけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の最も高い許容できる用量を決定すること；（ｉｉ）有害事象（ＡＥ）、重篤有害事象（ＳＡＥ）の発生率、ならびに安全性検査値、身体検査およびバイタルサインの変化に基づき安全性を評定すること。処置に対する臨床応答は、連続Ｘ線検査評定（コンピュータ断層撮影［ＣＴ］または磁気共鳴画像法［ＭＲＩ］）に従って評価されて、処置に対する応答および疾患の進行が決定されるであろう（ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１）。

研究の二次研究パラメーター／アウトカム

【０７０１】

二次目標は、無進行生存（ＰＦＳ）、全奏効率（ＯＲＲ）、奏効期間（ＤＯＲ）および臨床利益率（ＣＢＲ）によって評価される抗腫瘍活性を決定することを含む。

【０７０２】

処置に対する臨床的応答を、連続Ｘ線撮影評価（コンピュータ断層撮影［ＣＴ］または磁気共鳴画像法［ＭＲＩ］）に従って評価して、処置に対する応答および疾患の進行を決定する（ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１）。ＣＲまたは部分奏効（ＰＲ）を達成する患者の比率として定義される奏効率（ＯＲＲ）を決定する。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の第１の投薬の日付から第１の報告された進行性疾患（ＰＤ）または死亡の日付までの時間として定義されるＰＦＳ。確認された応答の第１の報告の日付から第１の報告されたＰＤの日付までとして定義されるＤＯＲ。ＲＥＣＩＳＴに基づいてＣＲ、ＰＲまたはＳＤを達成する患者の比率として定義される臨床的有用率（ＣＢＲ）。第１の投薬の日付から第１の引き続く療法

の開始の日付までの時間として定義される、第１の引き続く療法までの時間。参加、利益および群の関連性に関連する負荷およびリスクの性質および程度。

【０７０３】

ＮＴＣ－００１は、切除不能なまたは転移性の黒色腫を有する患者におけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の用量設定および安全性ファースト・イン・ヒューマン（ＦＩＨ）研究である。この研究の用量設定部分を、安全性評価の初期における研究薬物への曝露を制限する、３＋３用量漸増設計に従って構築する。さらなる安全性予防措置として、用量コホート内で、最初の３人の患者の登録は、最低２週間間隔でずらす。リスクの主要な領域には、リンパ枯渇の期間の間の感染、サイトカイン放出症候群（ＣＲＳ）の可能性、およびオフ腫瘍、オフターゲット毒性が含まれる。さらなる潜在的リスクは、腫瘍生検および白血球アフェレーシスを含む他の研究特異的手順に関連するリスクである。患者を、リンパ枯渇、Ｔ細胞製品注入および好中球回収の初期処置期の間、入院患者モニタリングのために入院させる。その後、毎週の臨床的検査および実験室モニタリングを、退院後１～４週目に外来患者設定で行い、その後、研究の残りにわたる６週間毎の来院で行う。安全性介入には、シクロホスファミド＋フルダラビンリンパ枯渇レジメン後のフィルグラスチム増殖因子支持、ならびにサイトカイン放出症候群（ＣＲＳ）のモニタリングおよび管理が含まれる。腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）ベースの治療法を用いた以前の研究が、最も関連する比較療法であり得る。これらの研究を、この研究のための出発用量および用量範囲を考案する際に考慮する。より低い出発用量は、患者における初期ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１試験のためのコア安全性検討事項として実行される。腫瘍生検からの評価は、この研究の論拠および設計にとって重要である。実行可能な場合はどこでも、この研究設計は、ベースライン腫瘍検体のためのアーカイブ試料の使用を可能にする。注入後腫瘍生検および白血球アフェレーシス試料が、このファースト・イン・ヒューマン研究における毒性および有効性との相関を含む、安全性および薬力学的効果を評価するために要求される。これらの手順は、院内モニタリング設定でプロトコールまたは施設の基準に従って実施する。これらのリスクは、切除不能なまたは転移性の黒色腫および疾患進行または以前の療法に対する最適未満の応答を有する患者（部分２）において、潜在的なＮＥＯ－ＰＴＣ－０１の臨床的利益と比べて考慮される。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１は、新規の個人に合わせた処置アプローチを示す；ネオ抗原特異的自家Ｔ細胞療法の追加は、チェックポイント阻害剤レジメンを超える著しい臨床的利益を提供し得る。

主な組入れ基準

１．　書面によるインフォームドコンセントを提出する意思があり、それができる成人（年齢１８～７５）男性および女性。

２．　組織学的に確認された切除不能なまたは転移性の黒色腫。

３．　部分１：

ａ．　ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１阻害剤（単剤としてまたは組合せでのいずれか）およびＣＴＬＡ－４阻害剤含有レジメン（単剤または組合せ）を以前に受けている。

ｂ．　彼らの最後の処置レジメン中に疾患進行を報告している。

４．　部分２：

ａ．　少なくとも３ヶ月にわたって、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１阻害剤（単剤として、またはＣＴＬＡ－４との組合せで）を受けていた／現在受けている。

ｂ．　ＲＥＣＩＳＴ　１．１による安定病態、または登録の３ヶ月以内に行われているべき最も直近のイメージング評価で臨床的に無症候性の進行性疾患を報告している。

ｃ．　ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１阻害剤療法を継続するのに医学的に適している。

ｄ．　研究者の意見では、Ｔ細胞ベースの治療法の追加から利益を得る。

５．　ＢＲＡＦ突然変異体患者について：患者は、標的化療法（Ｂ－ｒａｆ阻害剤またはＢ－ｒａｆ／ＭＥＫ併用療法）もまた、以前に受けていなければならない。

６．　患者は、臨床的に無症候性でなければならず、少なくとも１６週間にわたる抗新生物処置を要求する症状がないままであると期待される。

７．　ＲＥＣＩＳＴ　ｖ１．１による測定可能な疾患の少なくとも１つの部位を有す

る。

８．　疾患の少なくとも１つの部位が、腫瘍組織のための生検のためにアクセス可能でなければならない。処置前生検について、アーカイブ検体は、生検材料を登録から６ヶ月以内に採取した場合に使用してもよい。

９．　０または１のＥＣＯＧパフォーマンスステータスを有する。

１０．　安全性リスクとみなされない毒性（例えば、脱毛症）を除き、以前の処置に関連する全ての毒性から、許容されるベースライン状態（実験室毒性については、以下の組入れの制限を参照のこと）またはＮａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｃｏｍｍｏｎ　Ｔｅｒｍｉｎｏｌｏｇｙ　Ｃｒｉｔｅｒｉａ　ｆｏｒ　Ａｄｖｅｒｓｅ　Ｅｖｅｎｔｓ（ＮＣＩ　ＣＴＣＡＥ）バージョン５．０、０もしくは１のグレードへと回復した。

１１．　スクリーニング実験室値は、以下の基準を満たさなければならず、研究処置前２８日以内に取得すべきである：

ａ．　白血球（ＷＢＣ）計数３×１０^{3}個／μＬ以上

ｂ．　好中球絶対数（ＡＮＣ）１．５×１０^{3}個／μＬ以上

ｃ．　血小板計数１００×１０^{3}個／μＬ以上

ｄ．　ヘモグロビン９ｇ／ｄＬまたは６ｍｍｏｌ／Ｌ超

ｅ．　血清クレアチニン１．５×正常上限（ＵＬＮ）以下、またはコッククロフト・ゴールトによるクレアチニンクリアランス（ＣｒＣｌ）５０ｍＬ／分以上

ｆ．　アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ＡＬＴ）３×ＵＬＮ以下

ｇ．　総ビリルビン１．５×ＵＬＮ以下（ジルベール症候群を有する患者を除く。この場合、総ビリルビン３．０ｍｇ／ｄＬ未満が許容される）

ｈ．　プロトロンビン時間（ＰＴ）または活性化部分トロンボプラスチン時間（ａＰＴＴ）が、抗凝固剤の意図した使用の治療的範囲内にある限りにおいて、患者が抗凝固剤療法を受けている場合を除き、国際標準化比（ＩＮＲ）、ＰＴまたはａＰＴＴが１．５×ＵＬＮ以下。

主要排除基準

１．７５歳を超える年齢。

２．無病＞２年間またはｉｎ　ｓｉｔｕ悪性病変の場合を除いた、他の浸潤性悪性病変の病歴。

転移性疾患のための３種を超える以前の治療法を受けた。

３．　活動性自己免疫疾患または自己免疫疾患の履歴（既知のまたは疑われる）を有する。例外は、白斑、Ｉ型糖尿病、ホルモン補充のみを要求する自己免疫状態に起因する残留甲状腺機能低下症、全身性処置を要求しない乾癬、または外部誘因の非存在下では再発しないと期待される状態について許容される。

４．　既知の活動性中枢神経系（ＣＮＳ）転移および／または癌性髄膜炎を有する。以前に処置された脳転移を有する患者は、それらが安定しており、新たな脳転移の証拠も拡大中の脳転移の証拠も有さず、登録前に少なくとも７日間にわたってステロイドを使用していないということを条件として、参加してもよい。この例外は、臨床的安定性にかかわらず排除される癌性髄膜炎を含まない。

５．　静脈内抗微生物療法を要求する活動性全身性感染、凝固障害、またはポジティブ負荷タリウムもしくは匹敵する試験によって明らかな、心血管系、呼吸器系もしくは免疫系の他の活動性の主要な医学的疾病、心筋梗塞、臨床的に重大な不整脈、例えば、制御されない心房細動、心室頻拍、または第２度もしくは第３度心ブロック、および閉塞性または拘束性肺疾患。

６．　ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１注入前１４日以内のコルチコステロイド（１０ｍｇ超の一日プレドニゾン当量）または他の免疫抑制薬物適用のいずれかによる全身性処置を要求する状態を有する。吸入または外用ステロイドおよび副腎補充用量（５　１０ｍｇの一日プレドニゾン当量）が、活動性自己免疫疾患の非存在下で許容される。

７．　本研究者の意見ではこの研究への参加を妨害し得る、既知のヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）感染、活動性慢性Ｂ型もしくはＣ型肝炎、および／またはがんとは無関係の生命を脅かす疾病。

８．　本研究者の意見では研究への参加を妨害し得る、任意の根底にある医学的状態、精神状態、または社会的状況を有する。

９．　研究参加を妨害するまたは研究データを分析する能力を混乱させると期待される大手術が計画されている。

１０．　妊娠中もしくは授乳中である、またはスクリーニング来院で始まり、試験（Ｅ０１”）来院の終了後１２０日間の間に、試験の計画された持続時間内に妊娠するか子供の父親になるつもりである。この研究において投与される処置による母親の処置に対して二次的な、保育中の乳児におけるＡＥの未知ではあるが潜在的なリスクが存在するので、保育している女性はこの研究から排除する。

１１．次の状況を除いて、黒色腫は別として別の浸潤性悪性病変の病歴を有する：（ａ）患者は、少なくとも２年間無病であり、治験責任医師によって、当該悪性病変の再発について低リスクであると思われている。（ｂ）患者は、乳房、口腔または子宮頸部の上皮内癌、皮膚の基底細胞癌または扁平上皮癌のために全身性化学療法で処置されなかった。

【０７０４】

用量漸増パート１のための患者は、標準レジメン後に疾患進行を有し、標準処置には延期も逸脱もない。

（実施例３７）

転移性卵巣がんの養子細胞療法のための自家ネオ抗原特異的Ｔ細胞製品

【０７０５】

新たに得られているデータは、臨床的に有効ながん免疫療法における、突然変異体タンパク質産物、ネオ抗原に由来するエピトープのＴ細胞認識の重要性を示す。ネオ抗原は、有効な抗腫瘍免疫応答の誘発および方向付けにおいて重要な腫瘍特異的抗原である。これらの腫瘍特異的ネオ抗原は、中枢免疫寛容に曝されず、従って、共有される腫瘍関連抗原よりも潜在的に免疫原性がある。

【０７０６】

治療的に関連するネオ抗原の正確な予測および検証は、ネオ抗原を標的化するクリニックに免疫療法を進めるのに重要である。本出願人らのバイオインフォマティクスエンジンＲＥＣＯＮ（登録商標）を使用して高品質ネオ抗原標的を選択する出願人らの能力は、本出願人らが、患者特異的免疫療法を開発することを可能にする。

【０７０７】

本研究において、ＮＥＯ－ＳＴＩＭ　Ｔ細胞誘導プロトコールを使用して、特異的ネオ抗原標的の免疫原性を検査し、自家ネオ抗原特異的Ｔ細胞製品を開発した。本発明者らによって、ラージスケール個別化自家Ｔ細胞製品を産生するためのワークフローが、患者特異的黒色腫ＰＢＭＣおよび免疫原としての合成ペプチドを使用した場合に機能し得ることが以前に示された（上述の実施例３６）。そこで、第１の研究における卵巣がん患者試料におけるスモールスケールでの同じプロトコールの使用は、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐと命名され、第２の研究は、免疫原としてのＩＶＴ　ＲＮＡの使用を検査する（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡ）。

【０７０８】

材料と方法

【０７０９】

ＮＥＯ－ＳＴＩＭを、Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ－　Ａｎｔｏｎｉ　ｖａｎ　Ｌｅｅｕｗｅｎｈｏｅｋ（ＮＫＩ－ＡＶＬ）にて、ＩＲＢ承認の下で得た２種の卵巣患者白血球アフェレーシス試料（本明細書において、患者１および患者２と名付けた）において行った。

【０７１０】

出願人のインハウスのバイオインフォマティクスエンジン、ＲＥＣＯＮ（２０１８年２

月１２日に出願され、ＷＯ２０１８１４８６７１として公開された国際特許出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０１７８４９およびこれに基づく優先権を主張する出願；２０２１年１１月２３日に発行された米国特許第１１，１８３，２７２号およびこれに基づく優先権を主張する出願；ならびに２０１９年１２月２０日に出願され、ＷＯ２０２０１３２５８６として公開された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１９／６８０８４およびこれに基づく優先権を主張する出願に開示されている）を使用して、患者特異的ネオ抗原を予測した。ネオ抗原配列を、６種の異なる誘導プールと、患者のＨＬＡ型にマッチしたモデルネオ抗原を含有する追加の第７のプールへと組み込んだ。ペプチドプールに対する同族配列を含有する合成ペプチドまたはＩＶＴ　ＲＮＡストリングを生成し、ＮＥＯ－ＳＴＩＭに付加した。従った一般製造プロトコールは、図７６Ａに概説されている。一般特徴は、図７６Ｂ。ＮＥＯ－ＳＴＩＭを使用して、メモリーおよびｄｅ　ｎｏｖｏ　Ｔ細胞応答をプライム、活性化および増大化した

【０７１１】

このようなネオ抗原特異的Ｔ細胞の特異性、表現型および機能性を、次のアッセイによりこのような応答を特徴付けることにより解析した：

ｉ）ｐＭＨＣマルチマーを使用したコンビナトリアルコーディング解析。

ｉｉ）詳細なフロー特徴付け。マーカーは、表面抗原分類３（ＣＤ３）、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＡおよびＣＤ６２Ｌを含んだがこれらに限定されない。

ｉｉｉ）マルチプレックス化マルチパラメーターフローサイトメトリーを使用したリコール応答アッセイを使用して、ａ）ＣＤ４$^+$Ｔ細胞応答を同定および検証し、ｂ）ＣＤ８$^+$およびＣＤ４$^+$Ｔ細胞応答の多機能性を評価し、ｃ）突然変異体ペプチドに応答して認識および脱顆粒する能力を評価した。炎症促進性サイトカインＩＦＮ－γおよびＴＮＦ－α、ならびに脱顆粒のマーカーとしてのＣＤ１０７ａの上方調節を測定した。

【０７１２】

卵巣患者ＰＢＭＣにおけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１評定：

【０７１３】

本文書の他の箇所に記載されているプロトコールのスモールスケールプロセスを２種の卵巣患者ＰＢＭＣにおいて行った。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡの能力を、ＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$ネオ抗原特異的Ｔ細胞の誘導について比較した。両方のプロセスが共に、総計１９種の患者特異的ネオ抗原特異的ＣＤ８$^+$Ｔ細胞応答および２４種の患者特異的ネオ抗原特異的ＣＤ４$^+$Ｔ細胞応答の生成に成功した（表２４）。この表は、２種の卵巣患者試料（患者１および患者２由来の試料と名付けた）におけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセス後の誘導されたＣＤ８$^+$およびＣＤ４$^+$Ｔ細胞応答の概要を示す。

【０７１４】

【表２４】

表24. 2種の患者試料におけるNEO－PTC－01. pepおよびNEO－PTC－01. RNAプロセス後の誘導されたCD8$^+$およびCD4$^+$T細胞応答の概要

患者	プロセス	誘導されたCD8$^+$応答	誘導されたCD4$^+$応答
患者１	ペプチド	ACTN1$_{\text{c.}\cdots}$, ACSL1$_{\text{c.}\cdots}$	GCN1L1$_{\text{c.}\cdots}$, MAPK15$_{\text{c.}\cdots}$, ACTN1$_{\text{c.}\cdots}$, ZNF117$_{\text{c.}\cdots}$
	RNA	PPP1R3B$_{\text{c.}\cdots}$, CTNNA$_{\text{c.}\cdots}$, SLC2SA2$_{\text{c.}\cdots}$, ACTN1$_{\text{c.}\cdots}$, ACSL1$_{\text{c.}\cdots}$	ACTN1$_{\text{c.}\cdots}$, PEG10$_{\text{c.}\cdots}$, IBTK$_{\text{c.}\cdots}$, IL32$_{\text{c.}\cdots}$
患者２	ペプチド	CORO1B$_{\text{c.}\cdots}$, DALRD3$_{\text{c.}\cdots}$, GLRX3$_{\text{c.}\cdots}$, DALRD3$_{\text{c.}\cdots}$, ACTG1$_{\text{c.}\cdots}$, NFIX$_{\text{c.}\cdots}$, KIAA2018$_{\text{c.}\cdots}$, DALRD3$_{\text{c.}\cdots}$, TP53$_{\text{c.}\cdots}$	ANKFY1$_{\text{c.}\cdots}$, TFCP2$_{\text{c.}\cdots}$, PPP3CA$_{\text{c.}\cdots}$, PDE1A$_{\text{c.}\cdots}$, SLC39A6$_{\text{c.}\cdots}$, C7orf10$_{\text{c.}\cdots}$, LLGL2$_{\text{c.}\cdots}$, RENBP$_{\text{c.}\cdots}$, TP53$_{\text{c.}\cdots}$, EPRS$_{\text{c.}\cdots}$, BPTF$_{\text{c.}\cdots}$, ACTG1$_{\text{c.}\cdots}$, CERS5$_{\text{c.}\cdots}$
	RNA	DALRD3$_{\text{c.}\cdots}$, GLRX3$_{\text{c.}\cdots}$, DALRD3$_{\text{c.}\cdots}$, KIAA2018$_{\text{c.}\cdots}$, ATP8A$_{\text{c.}\cdots}$, C19orf44$_{\text{c.}\cdots}$, EPHA5$_{\text{c.}\cdots}$	TFCP2$_{\text{c.}\cdots}$, PDE1A$_{\text{c.}\cdots}$, RBMX$_{\text{c.}\cdots}$, GLRX3$_{\text{c.}\cdots}$, CORO1B$_{\text{c.}\cdots}$, TP53$_{\text{c.}\cdots}$, EPRS$_{\text{c.}\cdots}$, AGRN$_{\text{c.}\cdots}$, BPTF$_{\text{c.}\cdots}$, ACTG1$_{\text{c.}\cdots}$, CERS5$_{\text{c.}\cdots}$

【０７１５】
コンビナトリアルマルチマー技術を使用して、プール毎の基盤で複製ウェルにおけるネオ抗原陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の頻度を評価することが可能であった。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスは、患者１由来の材料を使用して、２種のネオ抗原陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を生じ、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスは、６種の総ネオ抗原陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を生じた（患者特異的ネオ抗原に特異的な５種の応答およびモデル抗原に特異的な１種の応答）（図７７Ａおよび図７７Ｃ）。患者２由来の試料材料を使用して、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐは、１２種の抗原陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を生じ（９種の患者特異的ネオ抗原陽性応答および３種のモデル抗原特異的応答）、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスは、９種の陽性ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を生じた（患者特異的ネオ抗原に対する７種およびモデル抗原に対する２種）（図７７Ｂおよび図７７Ｃ）。両方のドナーにおけるネオ抗原陽性応答の頻度は、ＣＤ８＋Ｔ細胞区画の０．０１％～２９．９％の範囲に及んだ。

【０７１６】
卵巣がん患者試料におけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１プロセスの有効性を、黒色腫患者において行われたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスのラージスケールランと、スモールスケールで比較した。卵巣がん患者由来のＰＢＭＣ試料は、黒色腫患者試料由来のＰＢＭＣにおけるプロセスランと、同様の数のネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答と共に、同様の範囲の頻度を生じた（図７７Ｅ）。

【０７１７】
さらなる特徴付けを行って、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１誘導性ＣＤ８＋Ｔ細胞の多機能性プロファイルを評価した。突然変異体ペプチドがロードされたＤＣによる再チャレンジ後に、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡの両方において産生されたネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞は、１、２および／または３種の機能を示した（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスの結果を示す図７８Ａ；およびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスの結果を示す図７８Ｂ）。

【０７１８】
閾値を上回るＩＦＮ－γ＋および／またはＴＮＦ－α＋の上方調節を使用して、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスの両方における抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞を決定した（図７９Ａ～図７９Ｄ）。両方のプロセスにおいて（図７９Ｅ）、患者１由来のＰＢＭＣにおいて４種のネオ抗原陽性ＣＤ４＋Ｔ細胞応答が生じた。患者２において、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐを使用して１３種のネオ抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞応答が誘導され、ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡを使用して１１種が誘導され、これらの応答は、変動する規模のものであった（図７９Ｆ）。

【０７１９】
ＣＤ４＋Ｔ細胞応答を生じる、卵巣がん患者試料におけるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１プロセスの能力を、黒色腫患者試料において行われたＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスのラージスケールランにおいて生じたそれと、スモールスケールで比較した[9]。卵巣がん患者由来のＰＢＭＣ試料は、黒色腫患者試料由来のＰＢＭＣにおけるプロセスランと、同様の数のネオ抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞応答と共に、同様の範囲の頻度を生じた（図７９Ｇ）。

【０７２０】
次に、誘導されたネオ抗原特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞応答の多機能性を検査した。ＣＤ４＋Ｔ細胞応答は、突然変異体ネオ抗原ペプチドをロードされたＤＣで再チャレンジされたときに多機能性プロファイルを示し、１、２および／または３種の機能を示した（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐプロセスの結果を示す図８０Ａ；およびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡプロセスの結果を示す図８０Ｂ）。

【０７２１】
最後に、誘導されたＣＤ８＋応答の表現型および細胞傷害潜在力を評価した（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐ（図８１Ａ、図８１Ｂおよび図８１Ｃ）およびＮＥＯ－ＰＴＣ－０

１．ＲＮＡ（図８１Ｄ、図８１Ｅおよび図８１Ｆ）の両方から生成されたネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答のデータの例が示される）：

【０７２２】

ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐおよびＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡから生成されたＴ細胞は主に、バルクＣＤ４＋、ＣＤ８＋およびネオ抗原特異的ＣＤ８＋（マルチマー＋）Ｔ細胞区画におけるＴエフェクターメモリー細胞である（図８１Ｂおよび図８１Ｅ）。

【０７２３】

重要なことに、患者Ｎ１６ＮＥＯＮ－１９から生成されたｐＭＨＣ特異的Ｔ細胞と、ネオ抗原特異的ペプチド（ＤＡＬＲＤ３（突然変異体））をパルスした腫瘍細胞系との共培養は、野生型または無関係ペプチドをパルスした細胞と比較して、マルチマー特異的細胞におけるＣＤ１０７ａレベルを上方調節した（図８１Ｃおよび図８１Ｆ）。

（実施例３８）

転移性黒色腫における製造されたＴ細胞製品の安全性および実現可能性解析

【０７２４】

上に記載されている前臨床データにより、本明細書において、ネオ抗原が、腫瘍逃避のリスクが低減された、精巧な複数の腫瘍特異的標的を提示することが確立される。その上、本明細書に開示されているデータにより記載および検証されているＮＥＯＳＴＩＭプロセスは、メモリーＴ細胞を増大化し、ナイーブ区画から誘導するシステマティックで再現性のあるアプローチである。出願人らは本明細書において、存続および腫瘍死滅を駆動することができる最適な表現型を達成するように努力する。出発材料としてのＰＢＭＣは、幅広い臨床的機会を提供し、ＰＢＭＣは、あらゆる腫瘍型を有する患者において容易に利用でき、消耗されない出発材料の供給源である。方法（本明細書に記載されているＮｅｏ－ＰＴＣ－０１プログラムのＮＥＯ－ＳＴＩＭ方法を含む）によって生成されたＴ細胞療法薬のための標的製品プロファイルは、表２５に概説されている。

【０７２５】

進行型または転移性黒色腫を有する患者におけるオープンラベル第１相研究は、図８２に記載されている２パート研究として設計された。図８３に記載されている例示的なプロトコールにおける研究進行および結果は、本セクションに提示される。

（実施例３９）

卵巣がんを有する対象由来の末梢血試料による前臨床研究

【０７２６】

卵巣がん試料において検査するための本明細書に記載されている方法を使用したスモールスケール誘導のため、３名の卵巣がん患者（ＯＶＣ＃１、２、３）から末梢血試料を得た。患者特徴は、図８４上部パネルに概説されている。活性化および増大化のためのＣＤ８　Ｔ細胞標的化のために複数の短いエピトープストリングをコードするｍＲＮＡを発現するＡＰＣを使用してＴ細胞を生成した（図８６下部パネル、例示的なｍＲＮＡの上グラフィックモデル）。ＣＤ４　Ｔ細胞誘導のため、ＭＨＣクラスＩＩ媒介性提示のためのエピトープを含む２５アミノ酸長配列を有する複数のエピトープをコードするｍＲＮＡを設計した（図８４の下グラフィックｍＲＮＡ）。各ｍＲＮＡは、構造エレメント、５’ＵＴＲ、５’キャップ、３’ＵＴＲおよびポリＡテイルを有する。エピトープ配列間に短いＧＳＳリンカーが存在する。特殊なＭＩＴＤ配列およびＳＰ１シグナル伝達エレメントが、効率的な抗原提示のために含まれる。

【０７２７】

ＮＥＯ－ＳＴＩＭを、研究拠点にて、ＩＲＢ承認の下で得た２種の卵巣患者白血球アフェレーシス試料（Ｎ１６ＮＥＯＮ－１７およびＮ１６ＮＥＯＮ－１９）において行った。本出願人らのバイオインフォマティクスエンジン、ＲＥＣＯＮを使用して、患者特異的ネオ抗原を予測した。ネオ抗原配列を、６種の異なる誘導プールと、患者のＨＬＡ型にマッチしたモデルネオ抗原を含有する追加の第７のプールへと組み込んだ。ペプチドプールに対する同族配列を含有する合成ペプチドまたはＩＶＴ　ＲＮＡストリングを生成し、ＮＥＯ－ＳＴＩＭに付加した。ＮＥＯ－ＳＴＩＭを使用して、メモリーおよびｄｅ　ｎｏｖｏ

Ｔ細胞応答をプライム、活性化および増大化した。このようなネオ抗原特異的Ｔ細胞の特異性、表現型および機能性を、次のアッセイによりこのような応答を特徴付けることにより解析した：

－　ｐＭＨＣマルチマーを使用したコンビナトリアルコーディング解析。４

－　詳細なフロー特徴付け。マーカーは、表面抗原分類３（ＣＤ３）、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ４５ＲＡおよびＣＤ６２Ｌを含んだがこれらに限定されない。

－　マルチプレックス化マルチパラメーターフローサイトメトリーを使用したリコール応答アッセイを使用して、ａ）ＣＤ４＋Ｔ細胞応答を同定および検証し、ｂ）ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答の多機能性を評価し、ｃ）突然変異体ペプチドに応答して認識および脱顆粒するネオ抗原特異的Ｔ細胞の能力を評価した。炎症促進性サイトカインＩＦＮ－γおよびＴＮＦ－α、ならびに脱顆粒のマーカーとしてのＣＤ１０７ａの上方調節を測定した。

（実施例４０）

卵巣がんモデルにおいてＮＥＯ－ＳＴＩＭペプチドプロセスと同様にＲＮＡによるＮＥＯ－ＳＴＩＭプロセスが機能する

【０７２８】

本セクションにおいて、患者試料から開始して、ネオ抗原をコードするＲＮＡ（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１　ＲＮＡ）、対、ネオ抗原性ペプチド（ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ｐｅｐ）で刺激することによるＴ細胞製品の製造のプロセスの比較の総説が行われる。図８５は、スナップショット概観を図解する。２種の誘導方法の有効性を比較および理解するために試みた解析の型は、図８５に例証されている。両方の方法が所望の製品特徴を満たしたことを示す研究概要は、チェックマークで示される。本明細書で使用される方法の検証に使用される応答の型を含む、図８６において例証される、患者誘導にわたってＮＥＯ－ＳＴＩＭ特徴付けを行った。

【０７２９】

【表２５－１】

表 25. 薬物製品のための標的製品プロファイル

プロファイル要素		ペプチドを用いた NEO-PTC	RNA を用いた NEO-PTC	以下を達成するための潜在的な標的
製品特徴	#ネオエピトープ	最小 20 種のショートマー+10 種のロングマー	NEO-PTC-01.PEP と同様であるが、設計は依然として最適化されている	臨床データからのさらなる学習および RECON 改善に基づくより少ないエピトープ
	免疫原フォーマット	ペプチド	電気穿孔により送達された従来の mRNA	リポプレックスまたは脂質ナノ粒子により送達された従来の mRNA
	ネオ抗原応答	メモリー+*de novo*		NEO-PTC-01 臨床データに基づき変化し得る
	#CD8 ネオ抗原ヒット率	3～5 応答		ショートマーエピトープの>20%
	#CD4 ネオ抗原ヒット率	3～5 応答		ロングマーエピトープの>20%
		大部分の/全ての応答が、多機能性プロファイルを表示するべきである		
		複数の応答が、内因性抗原認識を実証するべきである		
	応答の規模	バルク製品: 5 千万～5 億個のネオ抗原特異的 T 細胞		濃縮された製品: 約+++%ネオ抗原特異性
	T 細胞表現型	セントラルメモリー+エフェクターメモリー		CM+EM、さらに最適化される
	細胞用量	10^9～10^{10} 個の細胞	用量設定コホートに基づく	FIH 研究において決定されるべ

【表２５－２】

プロファイル要素		ペプチドを用いたNEO-PTC	RNAを用いたNEO-PTC	以下を達成するための潜在的な標的
				き
製造プロセス	所要時間	生検、配列決定、RECON:4週間 ペプチド製造:6週間	生検、配列決定、RECON:4週間 RNA製造:3週間	標的50%低減 8～10週間
		NEO-STIM:4週間 迅速リリース:1週間		
	生産プロセス	再現性のある&頑強な;プロセス適切リスク戦略		完全にクローズドなプロセス、半自動または全自動
	免疫原送達	マニュアル	市販の電気穿孔装置	ナノ粒子送達
	DPフォーマット		凍結	

【０７３０】

ＲＮＡを使用してＮＥＯ－ＳＴＩＭプロトコールを改善するために、プロトコールへの追加としてＩＬ－２１を探索した。図９１に実証される通り、ＩＬ－２１が、持続性の好ましい表現型を促すことが分かった。データは、プロセスにおけるＩＬ２１の使用が、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるセントラルメモリー表現型を増加させることを示す。ＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡの文脈において、増加したヒット率、ネオ抗原特異的頻度および細胞増大化が、ＮＥＯ－ＳＴＩＭにおけるＩＬ－２１の文脈において観察されており、健康なドナー、１４日目読み出し由来のデータが示される。

【０７３１】

ＲＮＡによってコードされるエピトープを使用した、またはペプチド刺激による卵巣がん細胞の誘導におけるスモールスケール研究の比較は、卵巣がんを有する対象由来（ＯＶＣ＃１）（図８７Ａ）、ＯＶＣ＃２（図８７Ｂ）およびＯＶＣ＃３試料由来（図８７Ｃ）の試料に示される通り、同様の頻度のネオ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を生じた。

【０７３２】

図８８、図８９および図９０は、匹敵するＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞誘導を示し、これは、黒色腫研究由来のラージスケールエンジニアリングランに匹敵する。ＲＮＡまたはペプチドによる誘導の両方の顕著な特色は、ＯＶＣ試料からのＴエフェクターメモリー細胞の誘導があったことを示した（図９１）。

【０７３３】

本明細書に提供される表２６は、ネオ抗原ペプチドエピトープをロードされたまたはネオ抗原ペプチドエピトープをコードするＲＮＡを発現するＡＰＣで刺激された卵巣がん患者細胞由来の薬物製品特徴の概要である。

【表２６】

標的製品プロファイル	N16NEON19 NEO-PTC-01.pep	N16NEON19 NEO-PTC-01.RNA	N16NEON17 NEO-PTC-01.pep	N16NEON17 NEO-PTC-01.RNA	N16NEON18 NEO-PTC-01.pep	N16NEON18 NEO-PTC-01.RNA
患者特徴	OVC; 1回の以前のラウンドの治療法 TMB= 8.8		OVC; 以前の治療法なし TMB= 7.3		OVC; 以前の治療法なし TMB= 2.5	
ネオ抗原ヒット率 $CD8^+$のための40種の標的のうち理想的には3～5種の応答	10/30	8/30	2/37	5/37	5/20 (+ 4 TAAs)	7/20 (+ 2 TAAs)
ネオ抗原ヒット率 $CD4^+$のための20種の標的のうち理想的には3～5種の応答	13/20	11/20	4/20	4/20	0/20 {1 TAAヒットが同定される}	0/20
応答の機能性 多機能性であり、＞1種のエピトープのための内因性抗原認識を実証する 十分な規模の応答でのみ示される多機能性	プール1：検査した7種のうち7種が多機能性を示した	プール1：検査した5種のうち5種が多機能性を示した	TBD	TBD	TBD	多機能性応答
T細胞表現型 CM + EM	EM/CM	EM/CM	EM/CM	EM/CM	EM/CM	EM/CM

（実施例４１）

ネオ抗原性エピトープをコードするＲＮＡを発現するＡＰＣによるＴ細胞活性化のためのＮＥＯ－ＳＴＩＭ培養物におけるＩＬ－２１の使用

【０７３４】

ＲＮＡを使用したＮＥＯ－ＳＴＩＭプロトコールを改善するために、プロトコールへの追加としてのＩＬ－２１を探索した。図９２～図９５に実証される通り、ＩＬ－２１が、持続性の好ましい表現型を促すことが分かった。健康なドナーから示されるＮＥＯ－ＰＴＣ－０１．ＲＮＡデータの文脈において、１４日目読み出しは、ＮＥＯ－ＳＴＩＭにおけるＩＬ－２１の文脈において観察される増加したヒット率、ネオ抗原特異的頻度および細

胞増大化を示した（図９２）。ＮＥＯ－ＳＴＩＭにおけるＩＬ－２１の使用は、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるセントラルメモリー表現型を増加させる。

【０７３５】

データは、プロセスにおけるＩＬ－２１の使用が、ＲＮＡにコードされるネオ抗原性エピトープを使用してＮＥＯ－ＳＴＩＭプロセスにおいて培養されたＴ細胞の増大化を改善し（図９３）、ＮＥＯ－ＳＴＩＭ．ＲＮＡ培養物における特異的Ｔ細胞のプライミングを改善する（図９４）ことを示す。その上、図９５は、ＩＬ－２１追加が、抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるセントラルメモリー表現型を増加させることを示す。

【０７３６】

まとめると、全てのデータは、本明細書に記載されているプロセスを使用して、本出願人らが、プロセスが、免疫原としてペプチドまたはＲＮＡのいずれかを使用して、スモールスケールでＯＶＣ患者試料により強力なＴ細胞製品を再現性よく生成することができることを実証したことを示す。ペプチドおよびＲＮＡプロセスの両方が、黒色腫患者において以前に行われたプロセスと比較して、同様の頻度で複数のＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞応答を誘導する。誘導されたＴ細胞応答は、突然変異体特異的であり、多機能性プロファイルを示し、エフェクターメモリー表現型を有する。誘導されたＴ細胞応答は、ペプチドの野生型バージョンではなく、それらの同族ペプチドをパルスした腫瘍細胞系の存在下でＣＤ１０７ａの上方調節によって示される細胞傷害潜在力を有する。免疫原としてペプチドまたはＲＮＡのいずれかを使用したプロセスは、治療選択肢が限定されている転移性ＯＶＣを有する患者の処置に潜在的に使用され得る養子Ｔ細胞がん免疫療法の生成を可能にする。

【図面】

【図１－１】

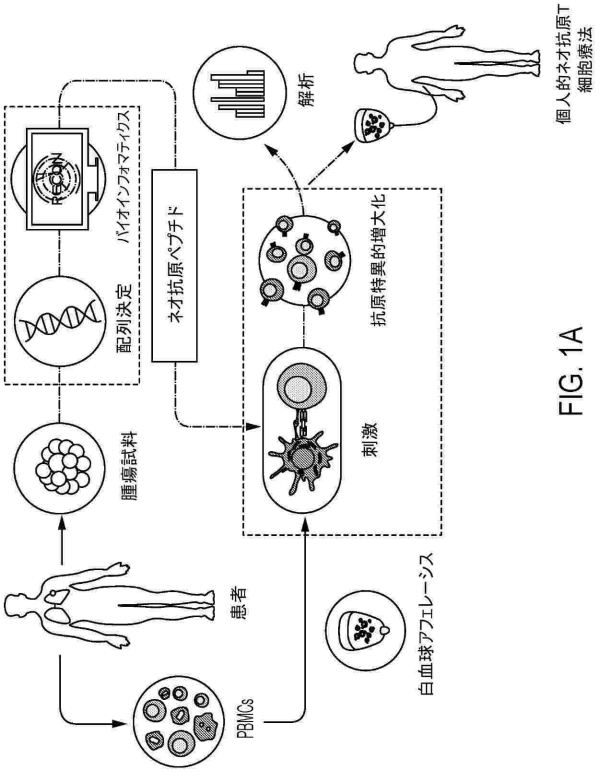


FIG. 1A

【図１－２】

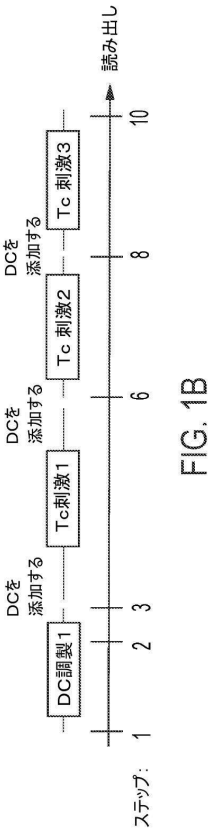


FIG. 1B

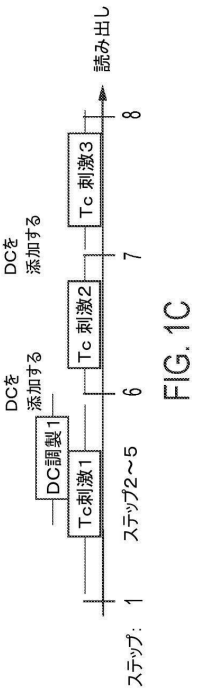


FIG. 1C

【図２】

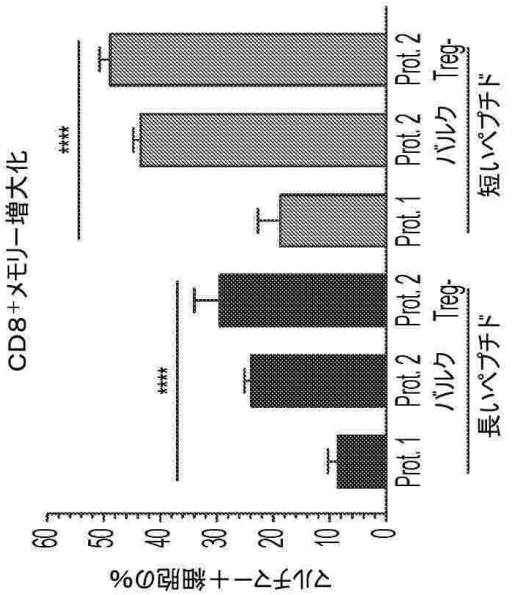


FIG. 2

【図３】

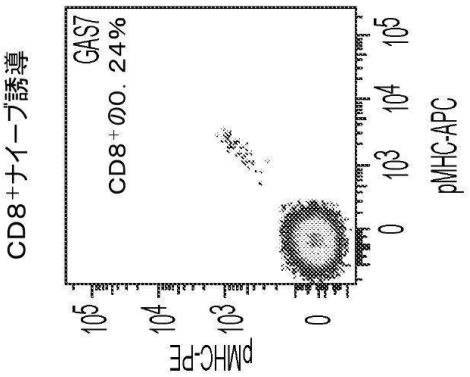


FIG. 3

【図４】

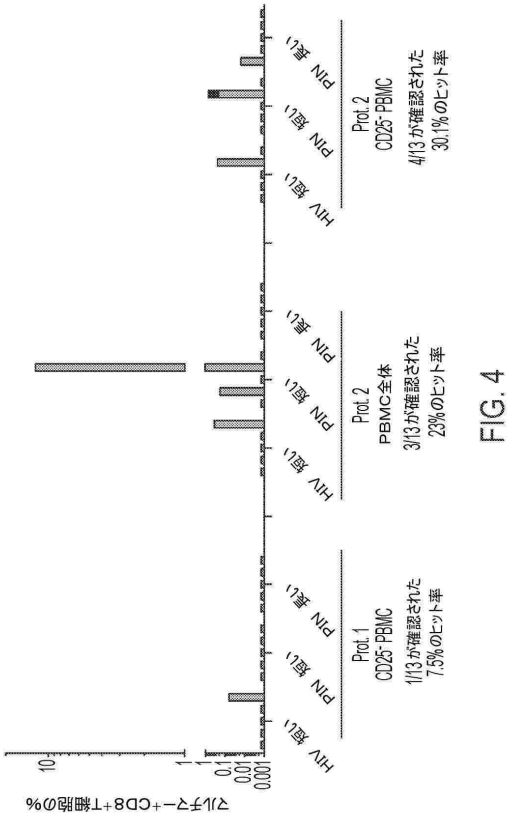


FIG. 4

【図５】

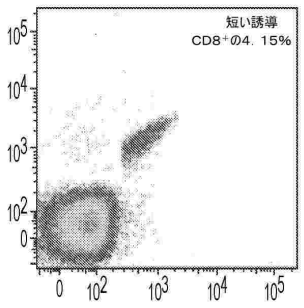


FIG. 5A

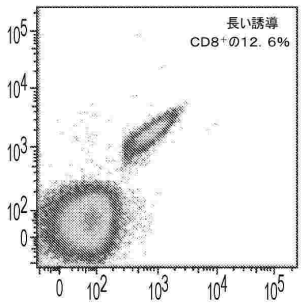


FIG. 5B

【図６】

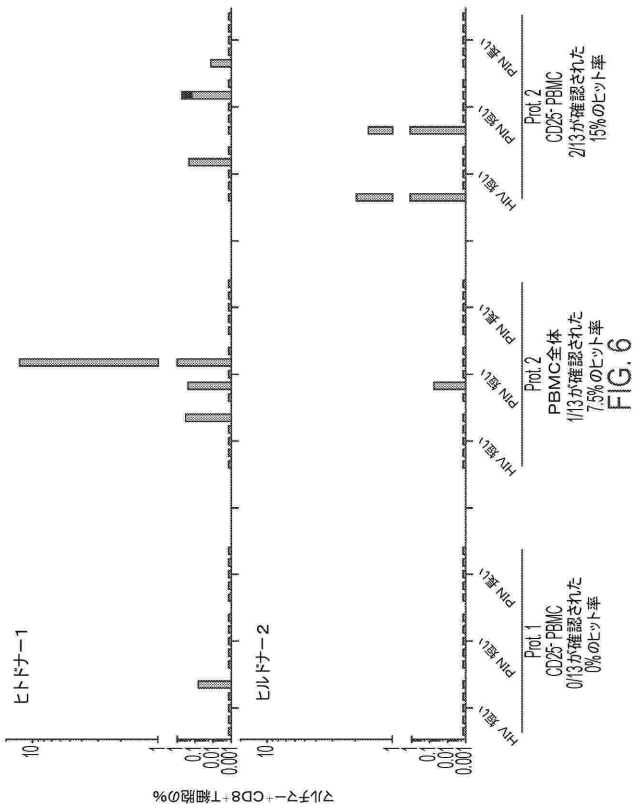


FIG. 6

【図７】

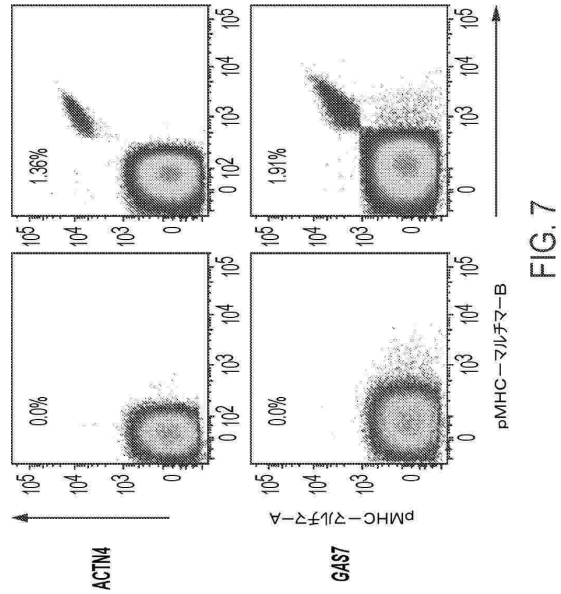


FIG. 7

【図８Ａ】

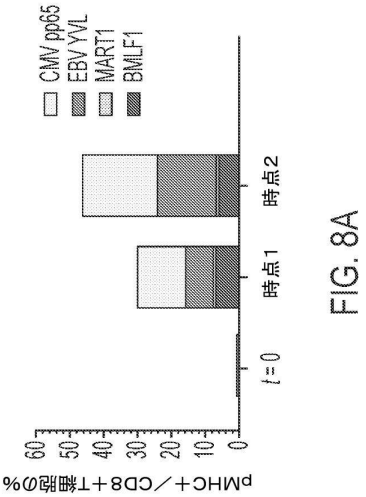


FIG. 8A

【図８Ｂ】

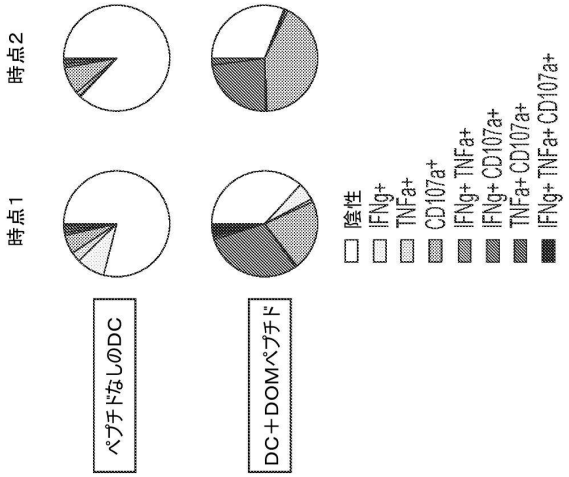


FIG. 8B

【図９】

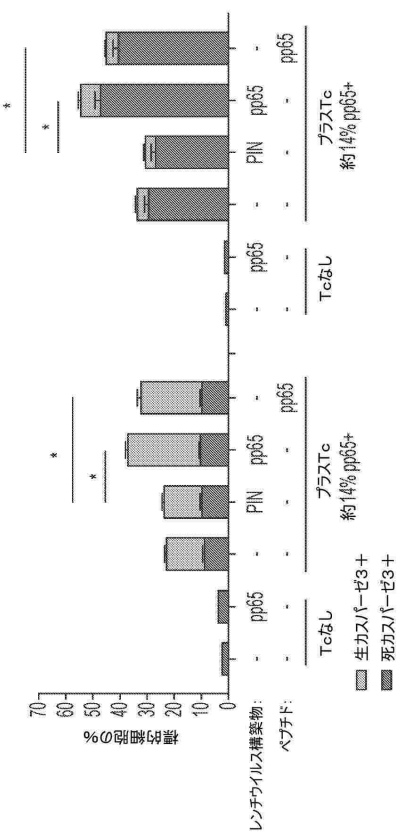


FIG. 9

【図１０】

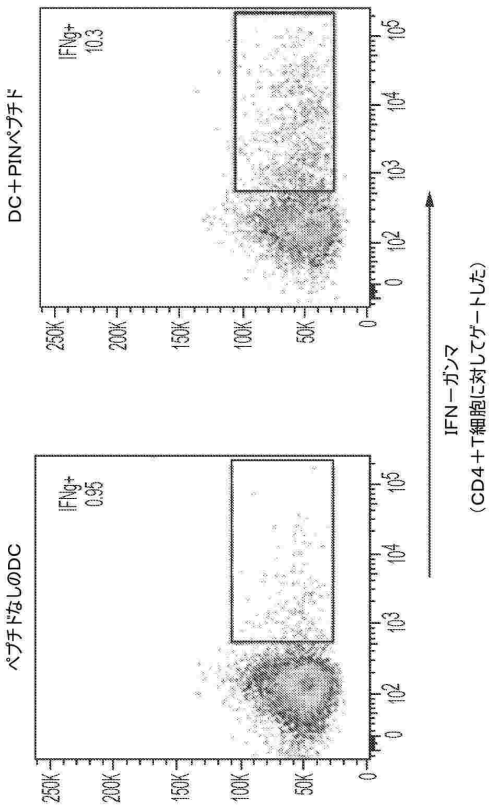


FIG. 10

【図１１】

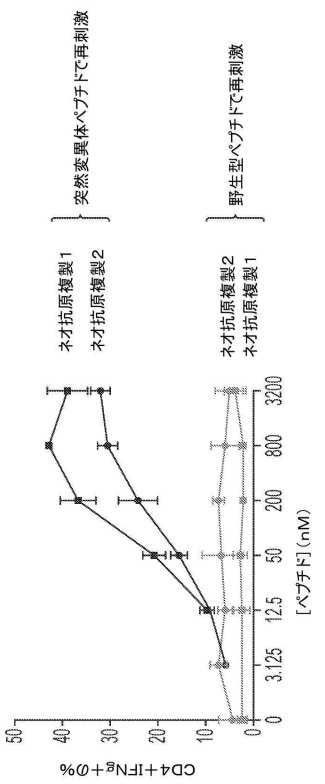


FIG. 11

【図１２】

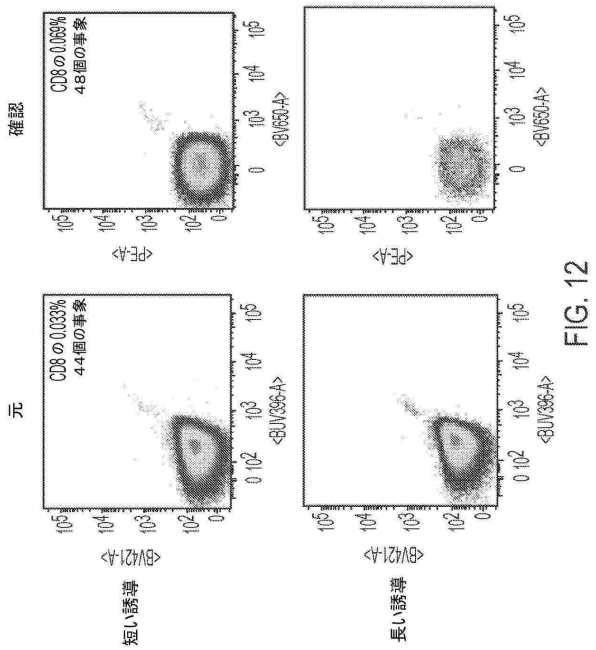


FIG. 12

【図１３】

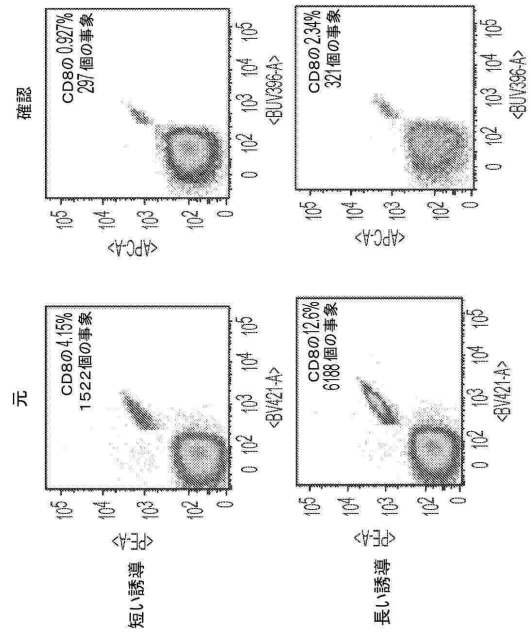


FIG. 13

【図１４】

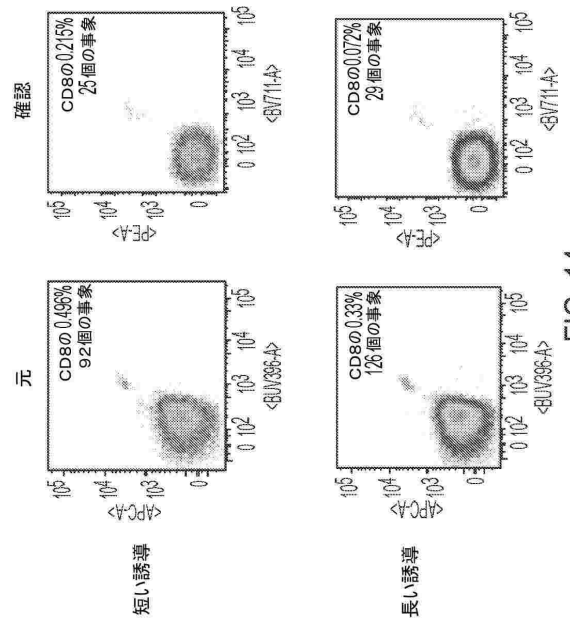


FIG. 14

【図１５】

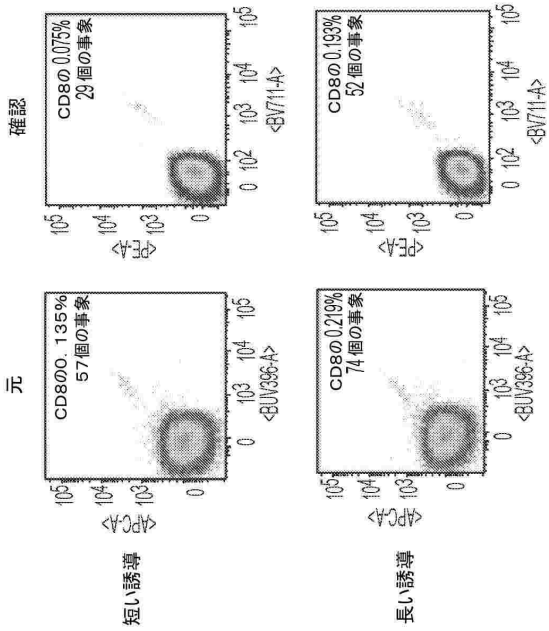


FIG. 15

【図１６】

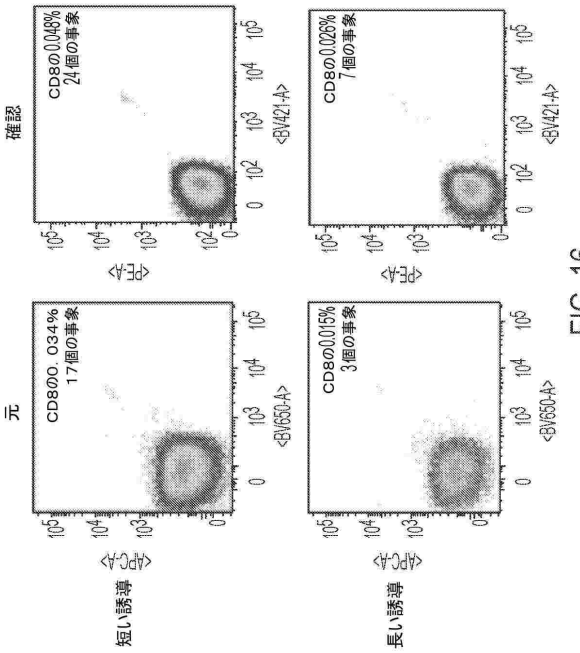


FIG. 16

【図１７】

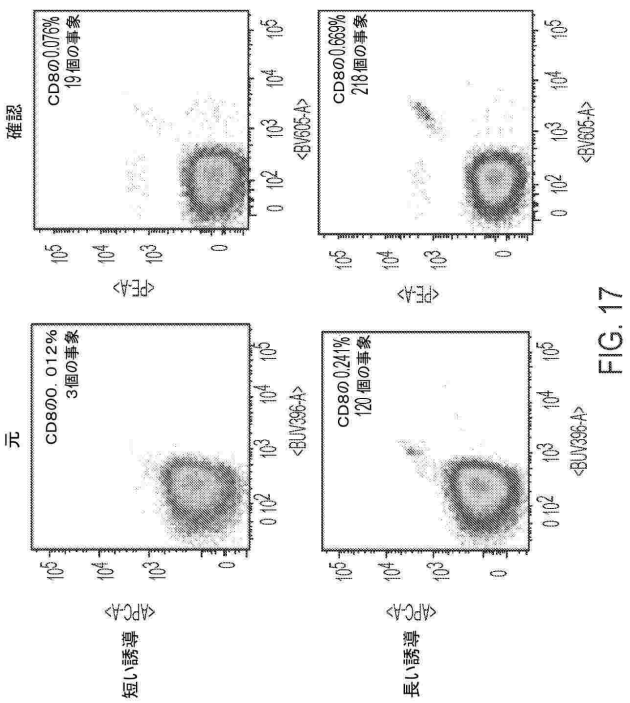


FIG. 17

【図１８】

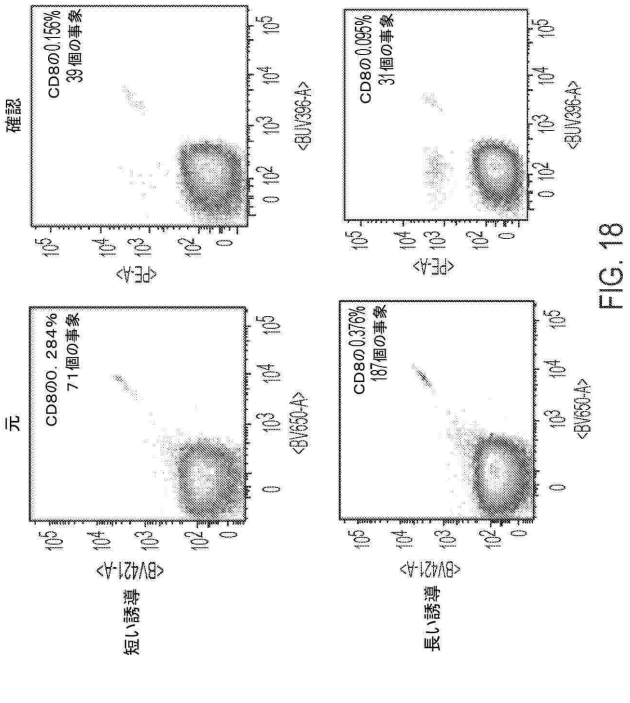


FIG. 18

【図１９】

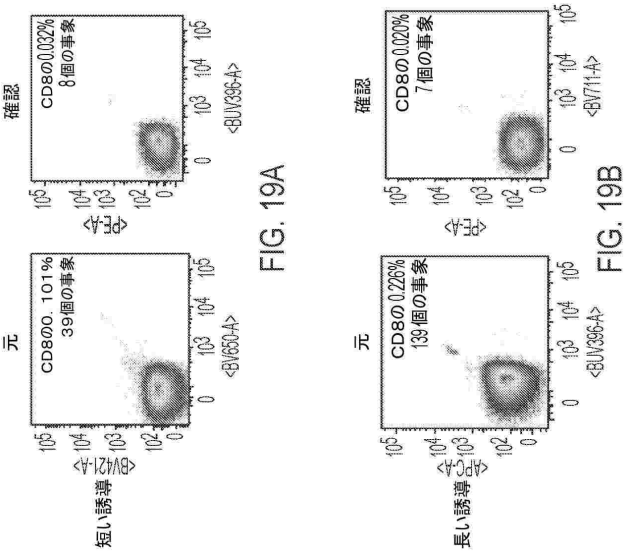


FIG. 19A

FIG. 19B

【図２０】

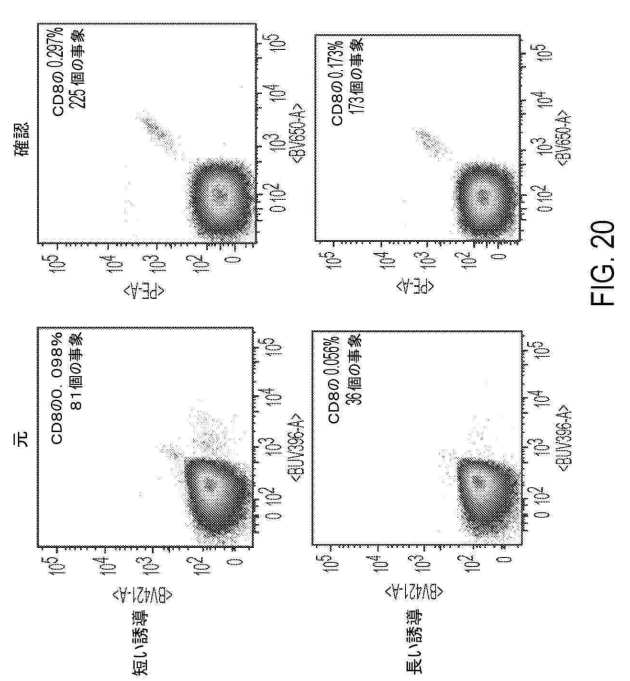


FIG. 20

【図２１】

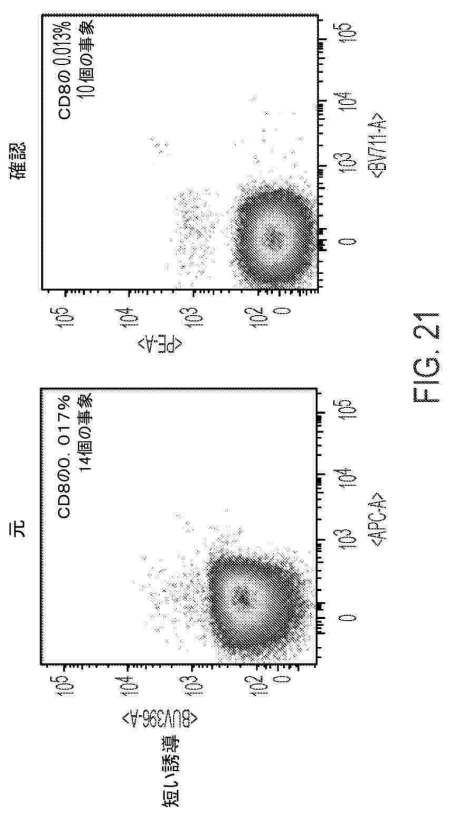


FIG. 21

【図２２】

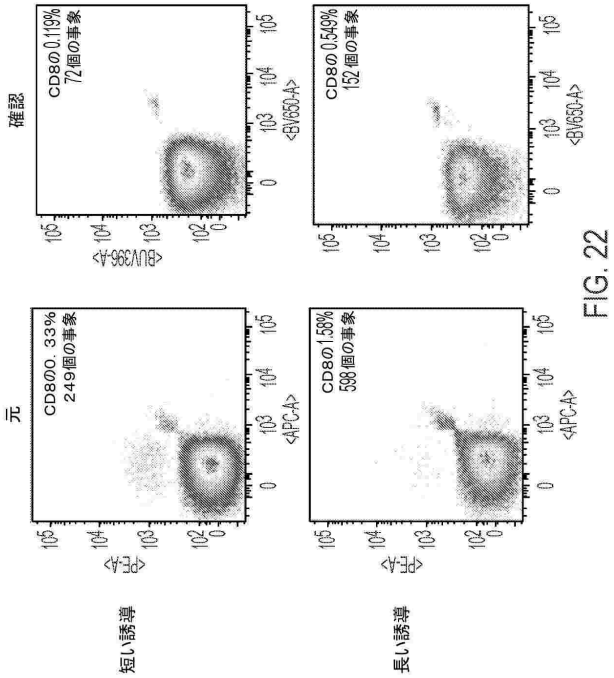


FIG. 22

【図２３】

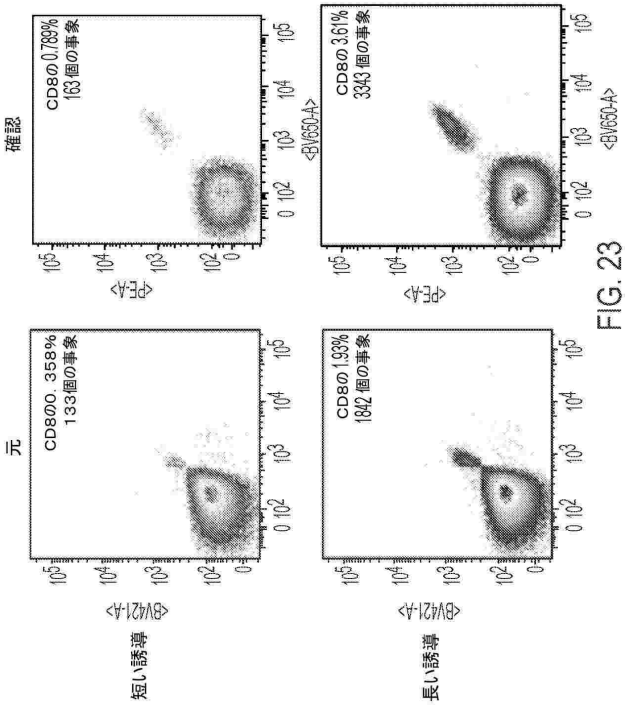


FIG. 23

【図２４】

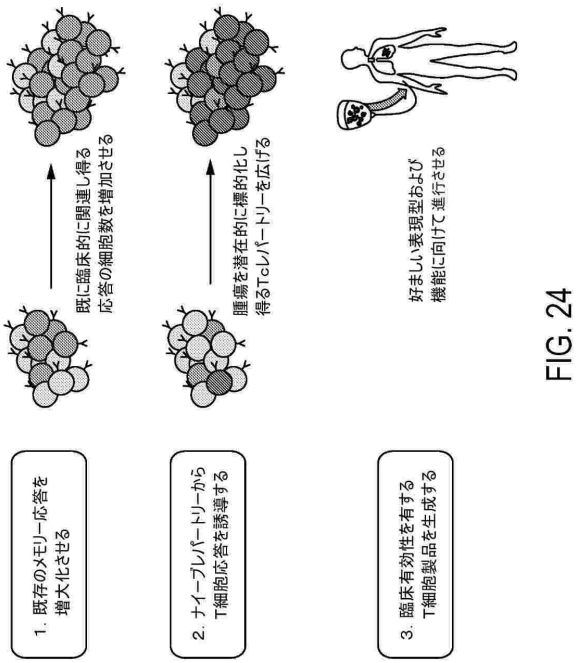


FIG. 24

【図２５】

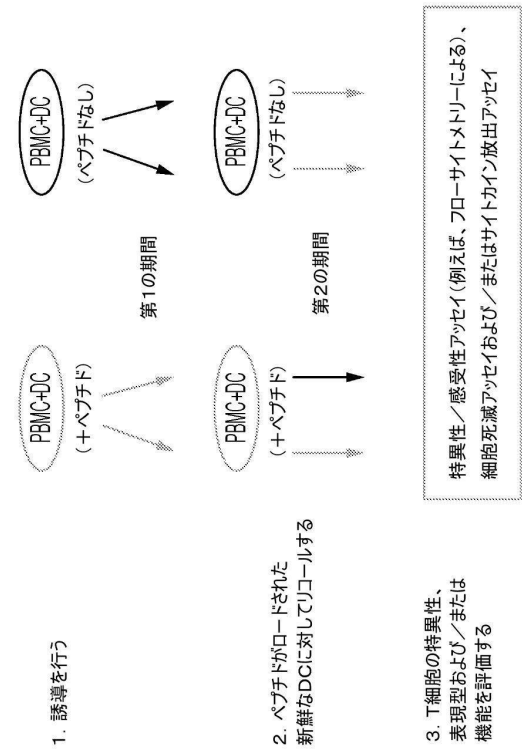


FIG. 25

【図２６】

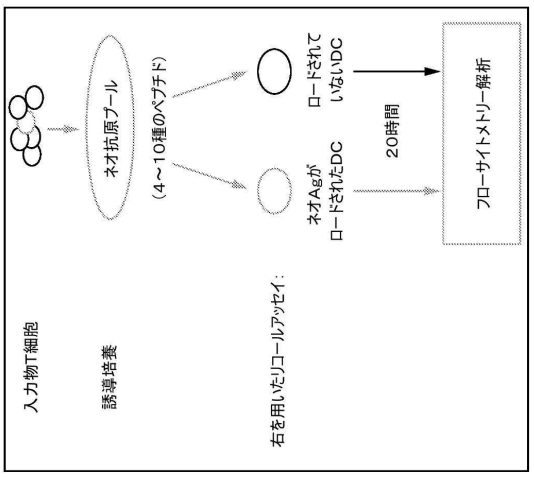


FIG. 26

【図２７Ａ】

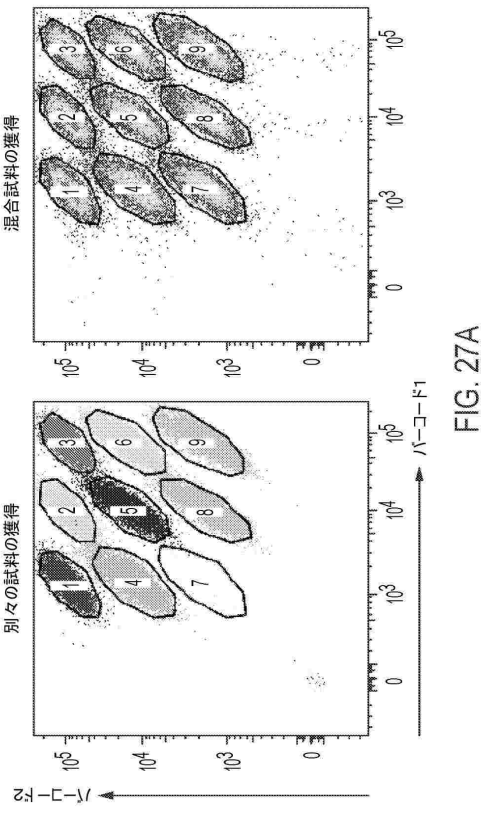


FIG. 27A

【図２７Ｂ】

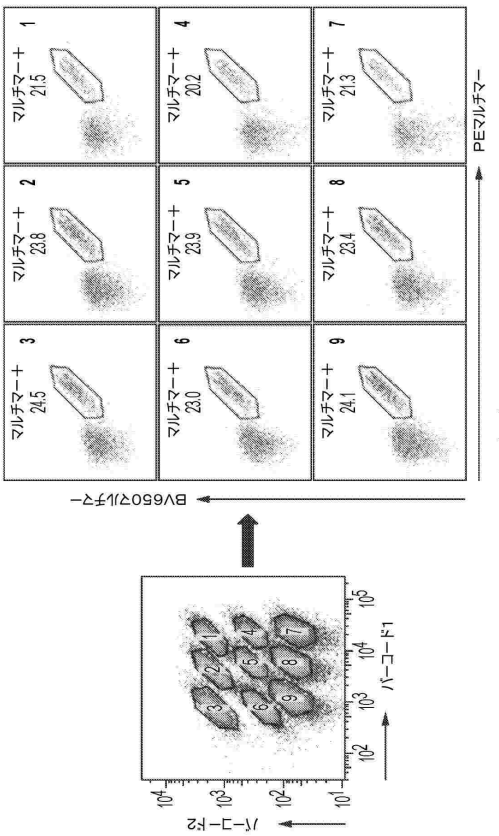


FIG. 27B

【図２８Ａ】

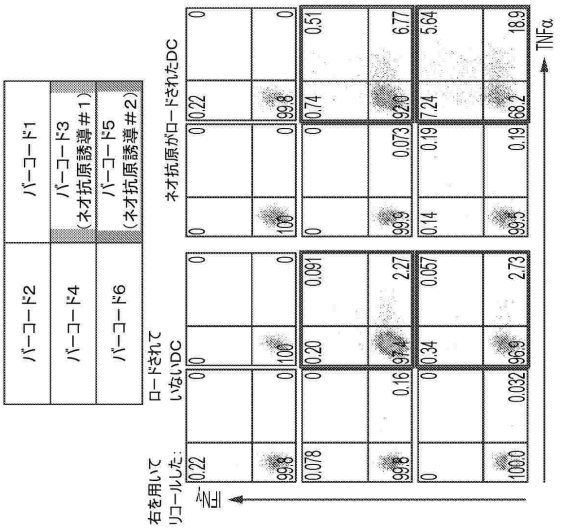


FIG. 28A

【図２８Ｂ】

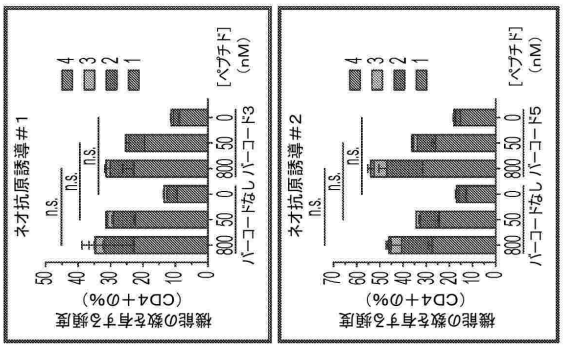


FIG. 28B

【図２９】

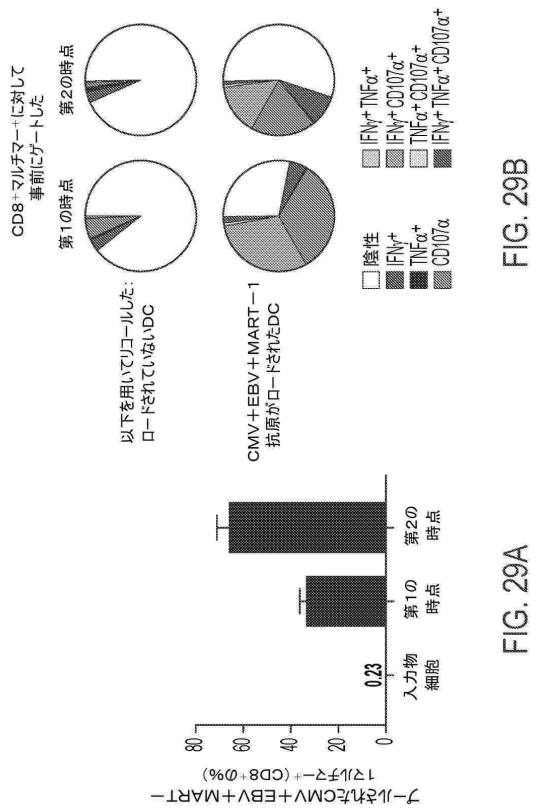


FIG. 29A

FIG. 29B

【図３０－１】

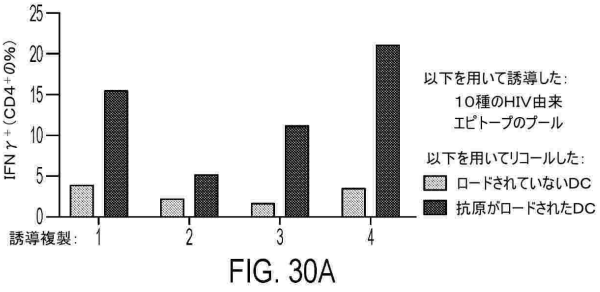


FIG. 30A

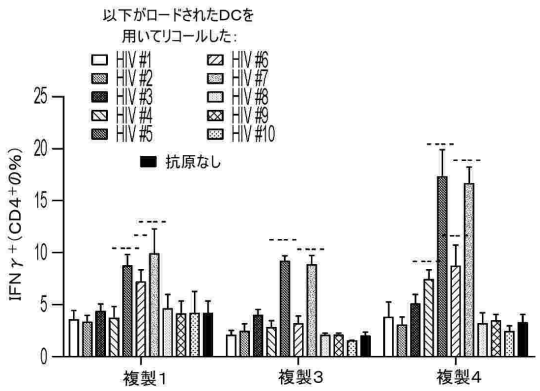


FIG. 30B

【図３０－２】

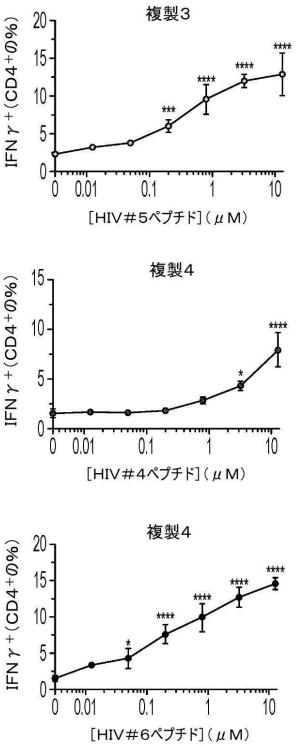


FIG. 30C

【図３１】

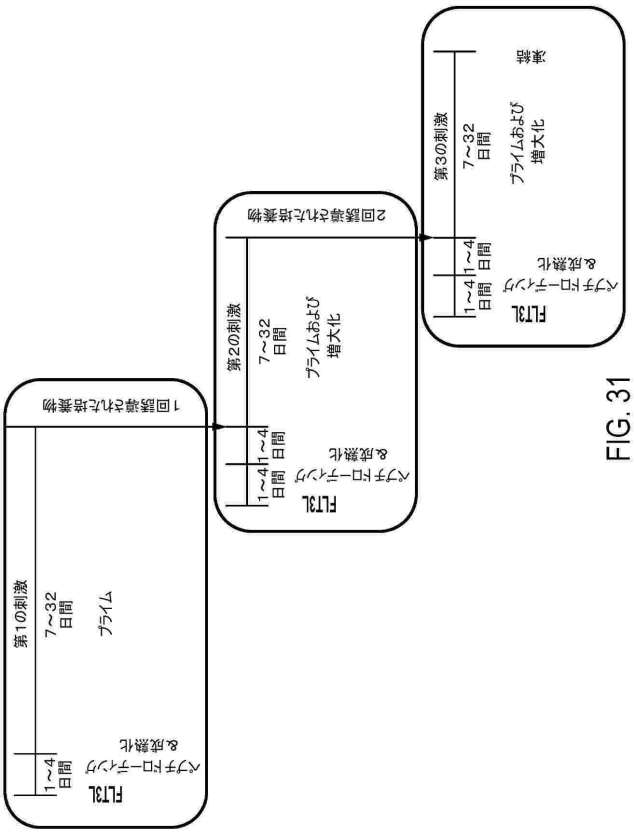


FIG. 31

【図３２】

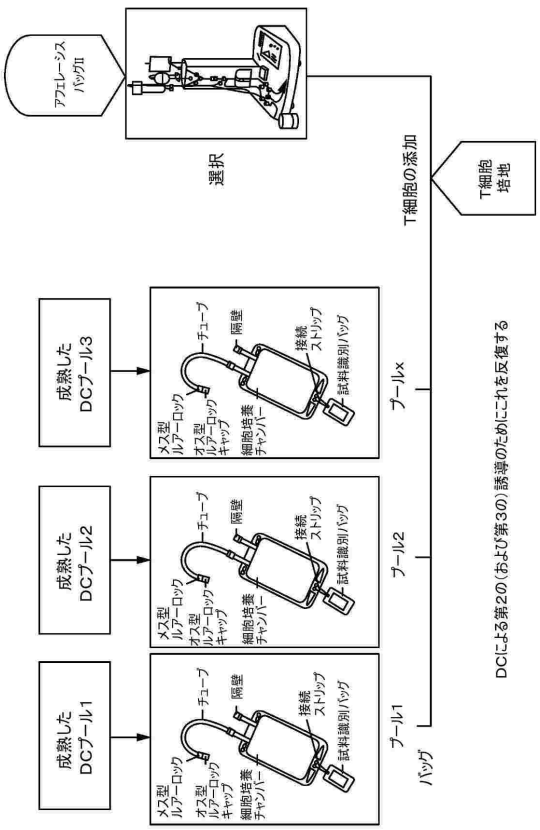


FIG. 32

【図３３】

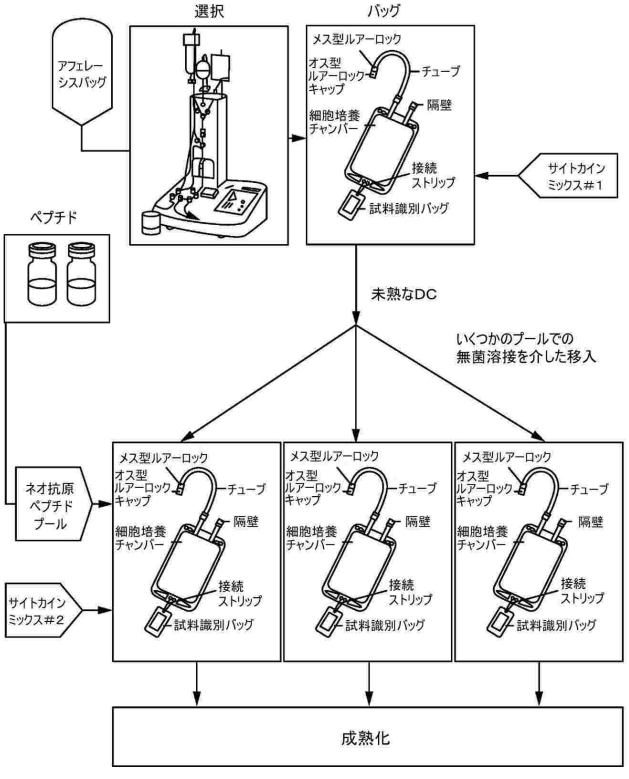


FIG. 33

【図３４】

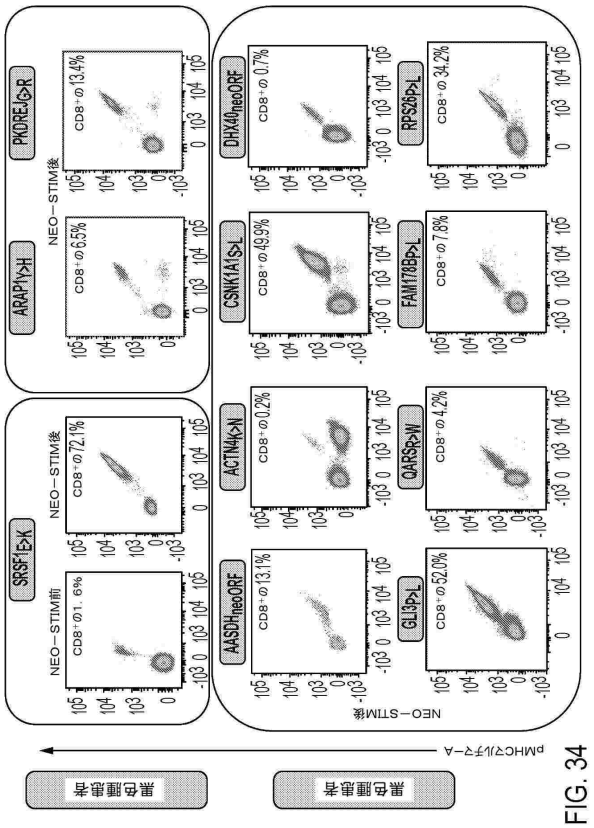


FIG. 34

【図３５】

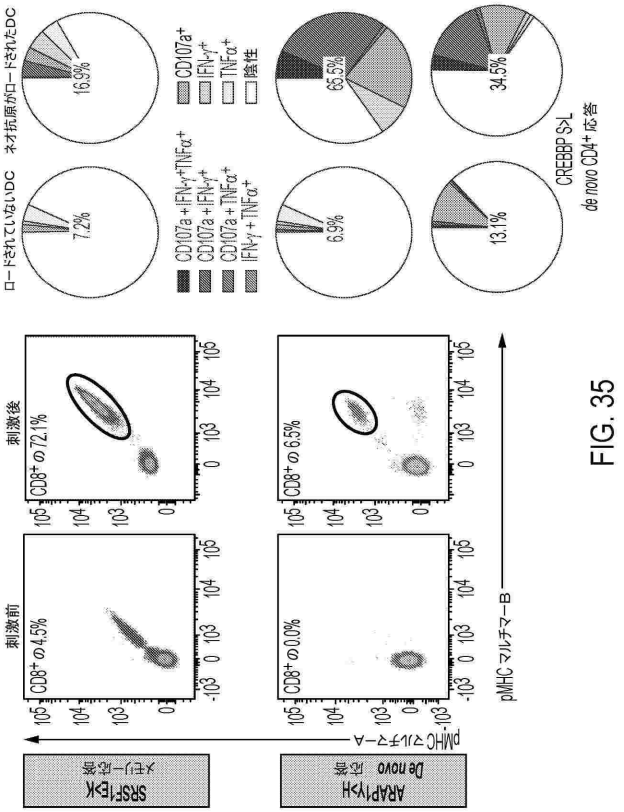


FIG. 35

【図３６】

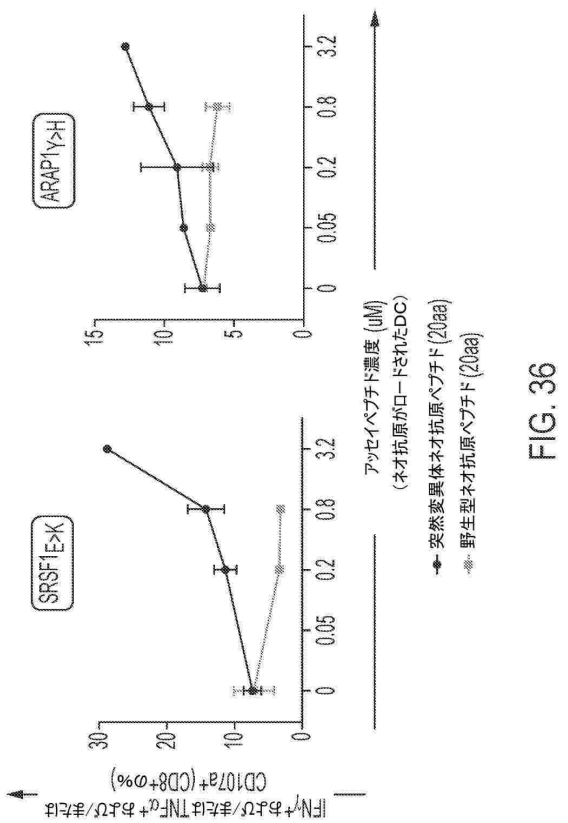


FIG. 36

【図３７Ａ】

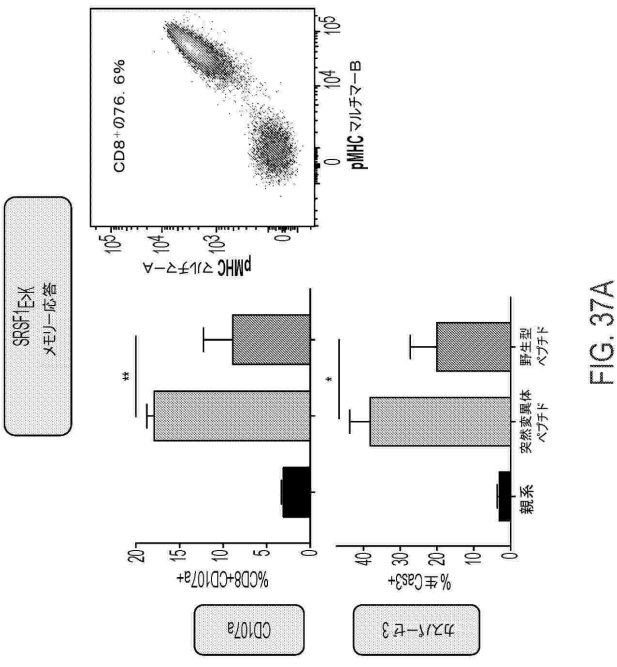


FIG. 37A

【図３７Ｂ】

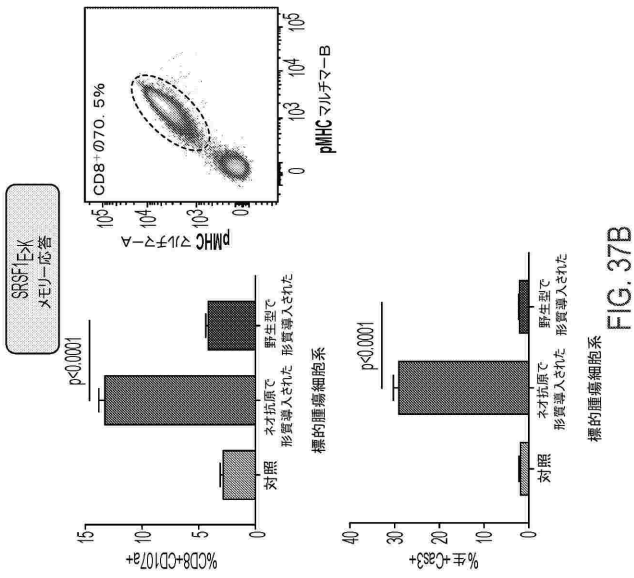


FIG. 37B

【図３７Ｃ】

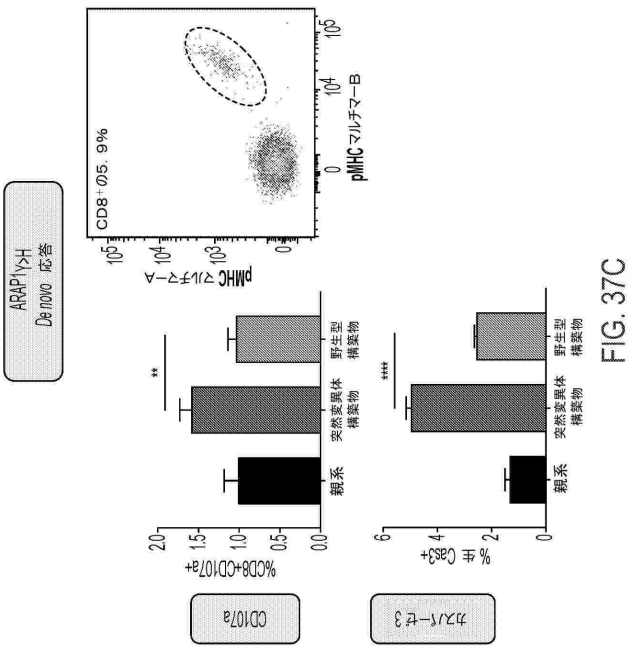


FIG. 37C

【図３８Ａ】

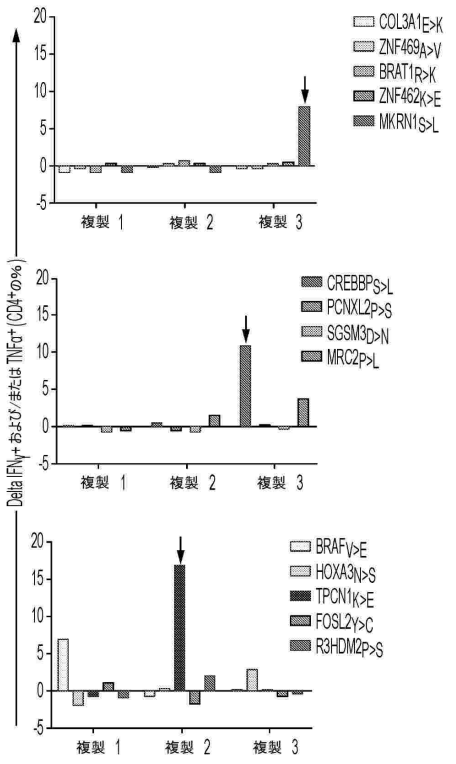


FIG. 38A

【図３８Ｂ】

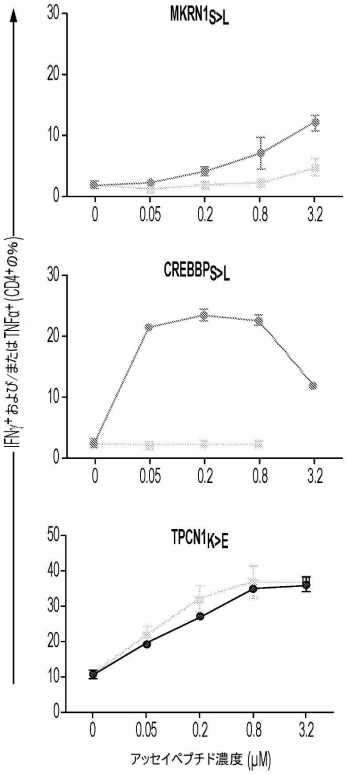


FIG. 38B

【図３８Ｃ】

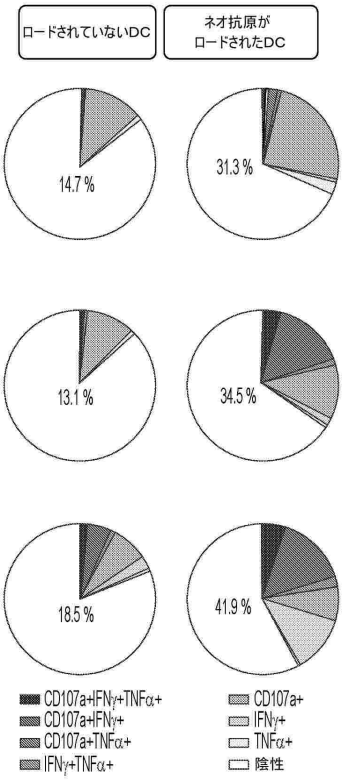


FIG. 38C

【図３９】

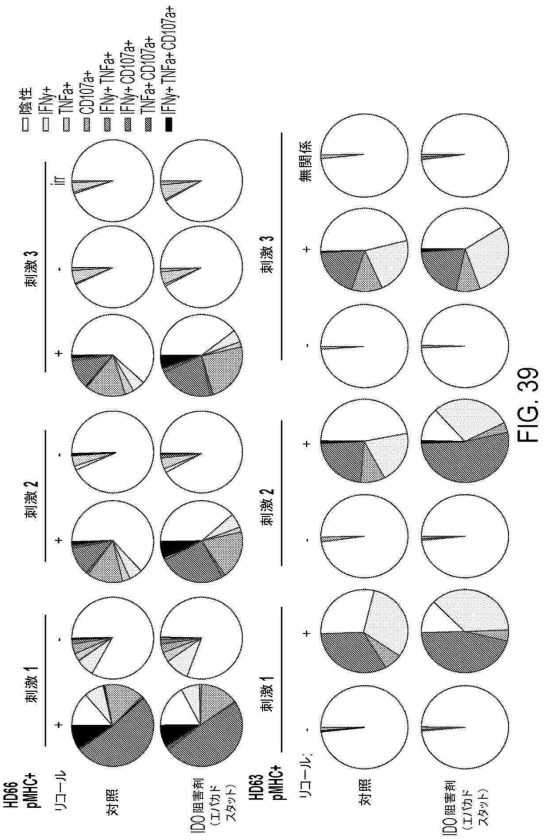


FIG. 39

【図４０】

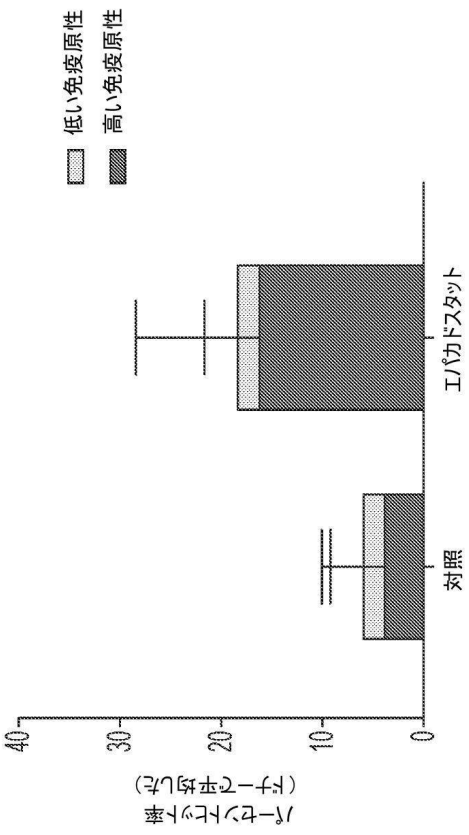


FIG. 40

【図４１】

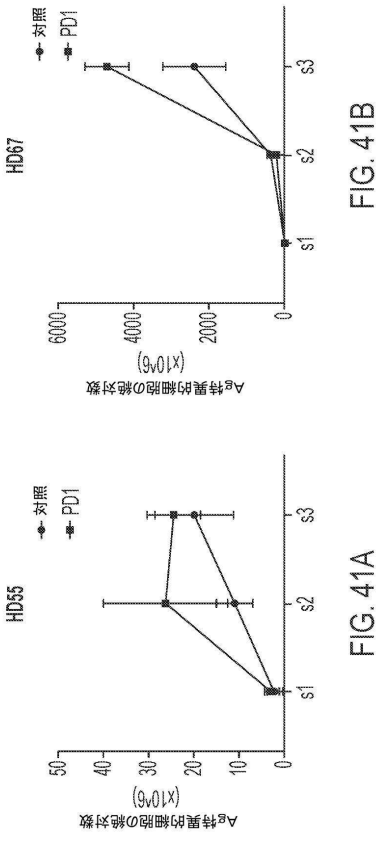


FIG. 41B

FIG. 41A

【図４２】

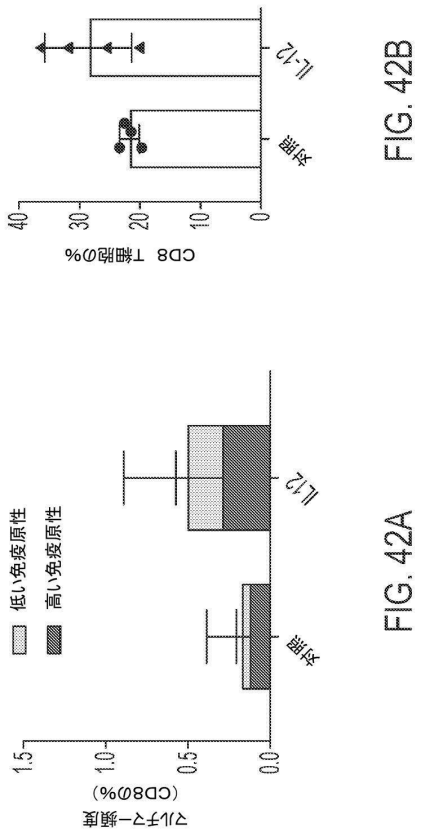


FIG. 42A

FIG. 42B

【図４３】

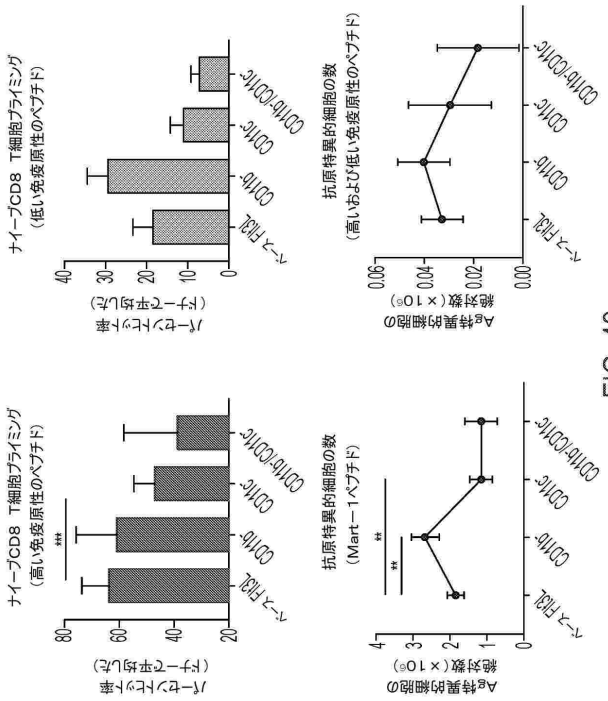


FIG. 43

【図４４－１】

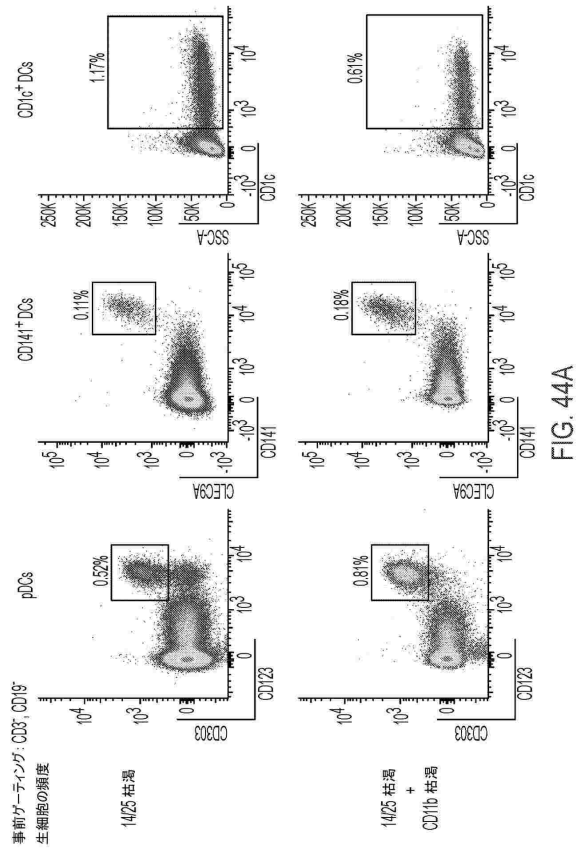


FIG. 44A

【図４４－２】

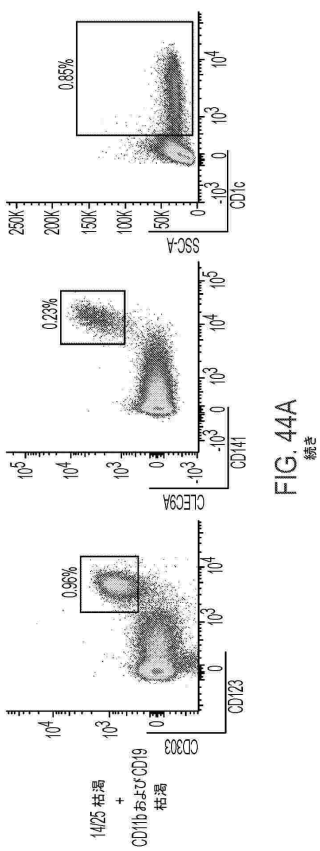


FIG. 44A
続き

【図４４－３】

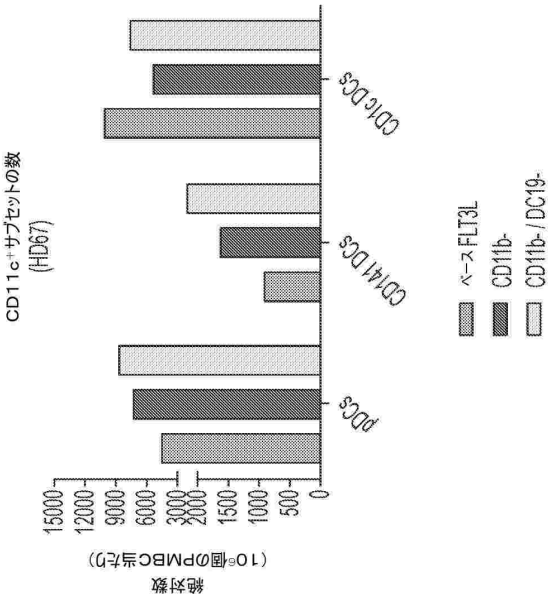


FIG. 44B

【図４５】

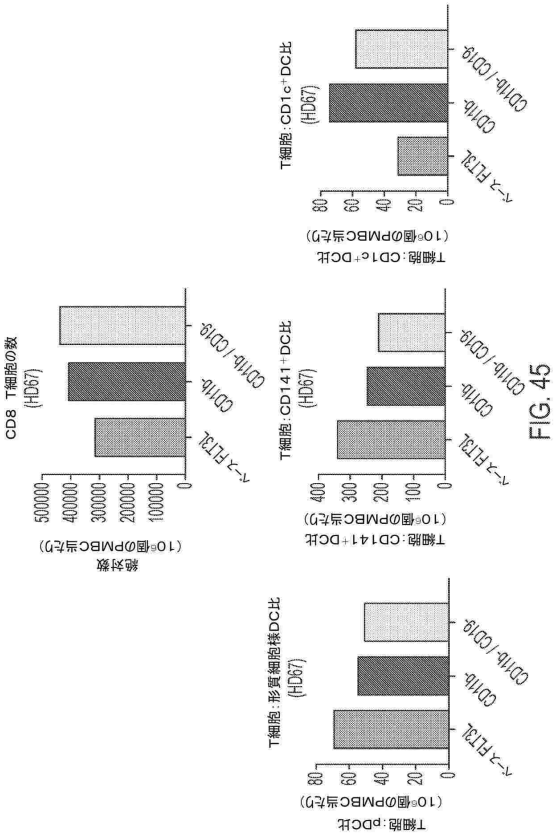


FIG. 45

【図４６】

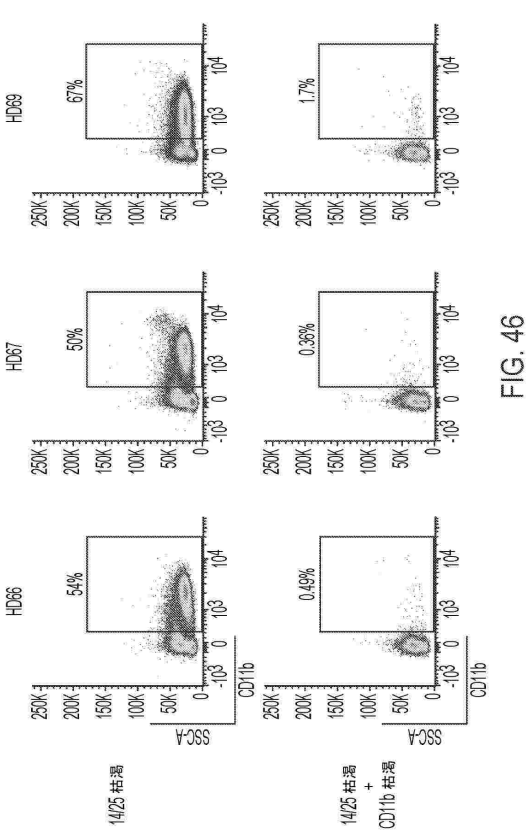


FIG. 46

【図４７】

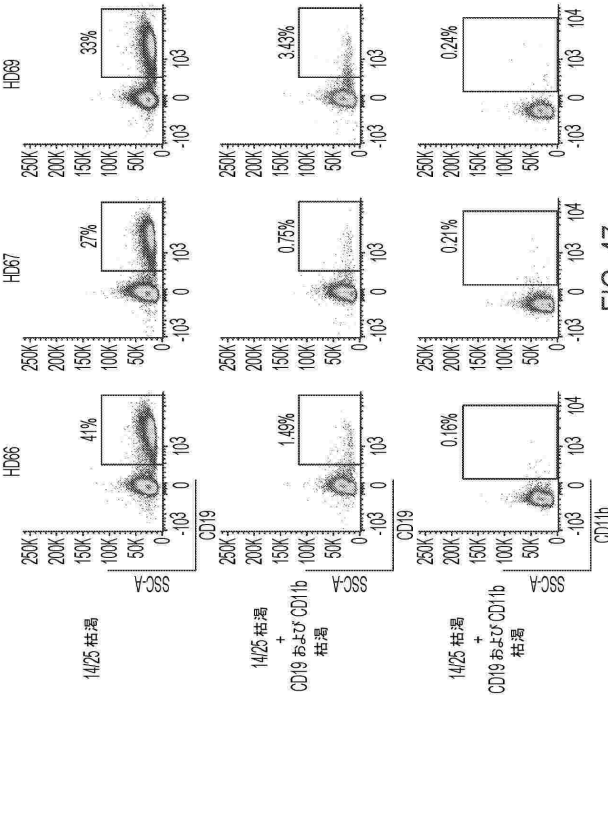


FIG. 47

【図４８】

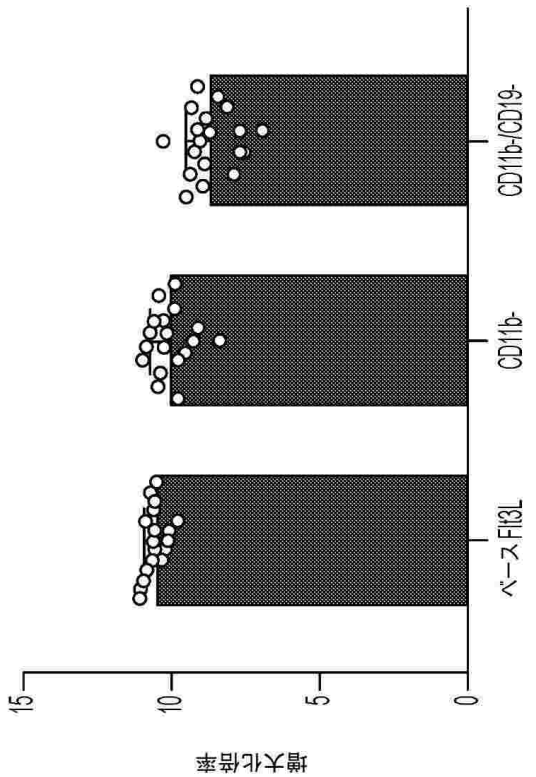
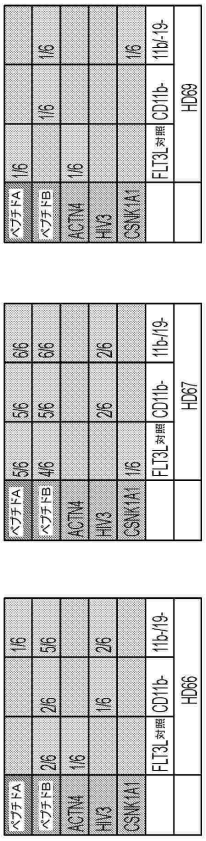


FIG. 48

【図４９Ａ】



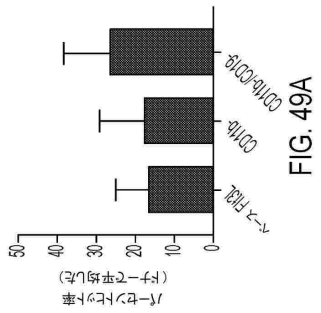


FIG. 49A

【図４９Ｂ】

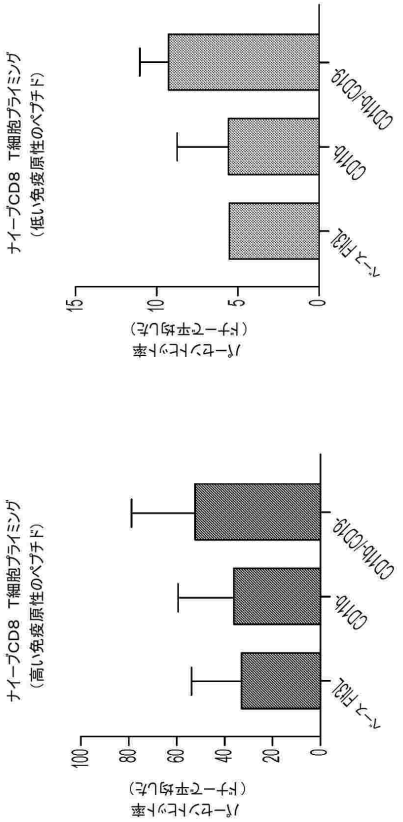


FIG. 49B

【図５０】

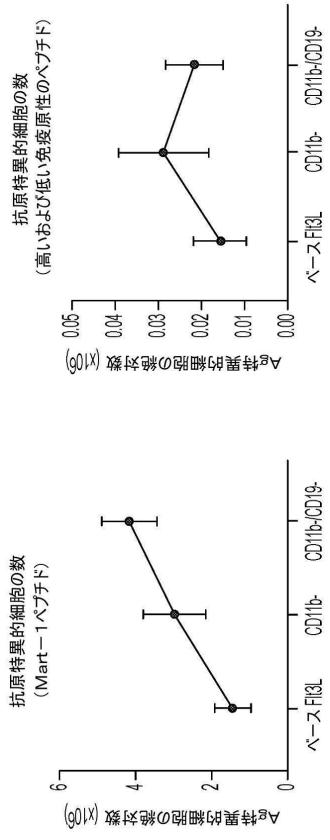


FIG. 50

【図５１－１】

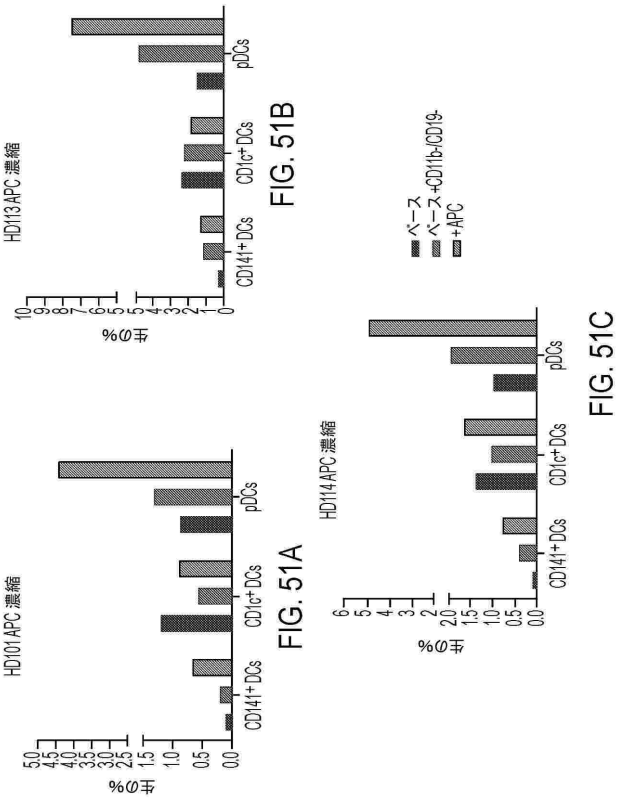


FIG. 51A
FIG. 51B
FIG. 51C

【図５１－２】

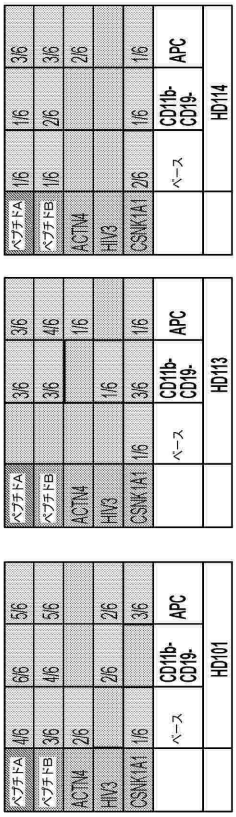


FIG. 51D

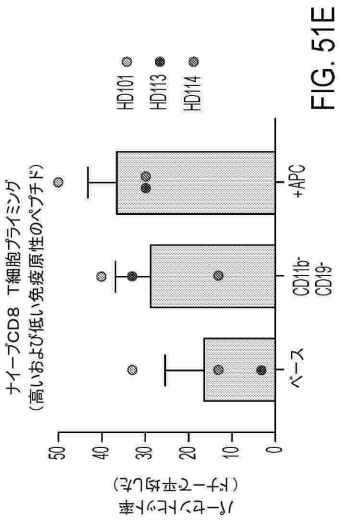


FIG. 51E

【図５２－１】

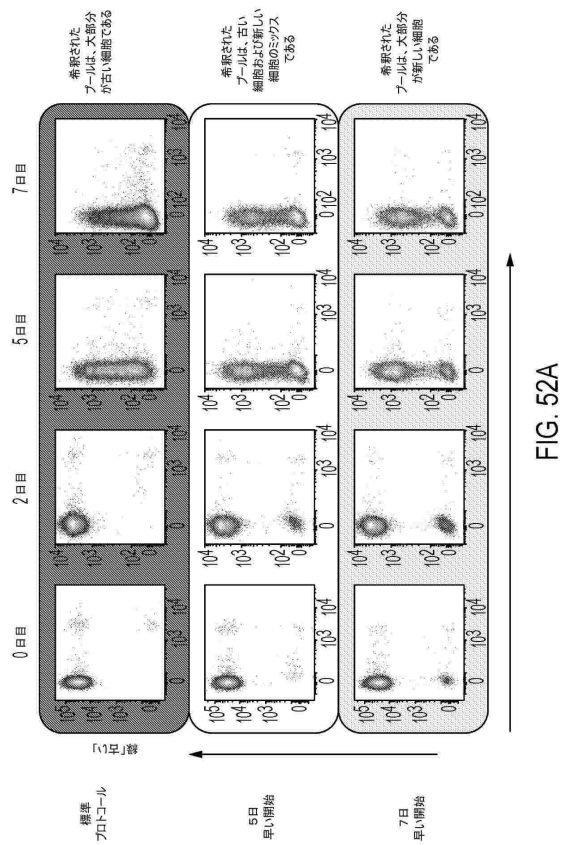


FIG. 52A

【図５２－２】

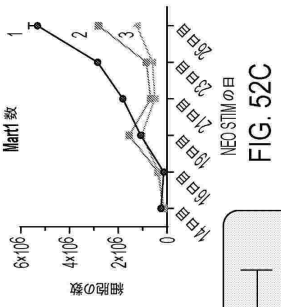


FIG. 52C

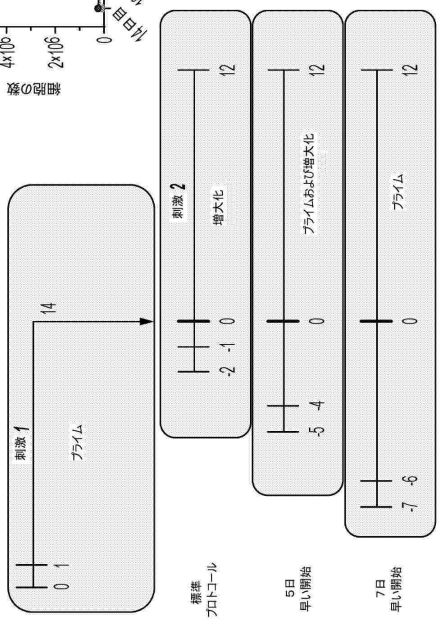


FIG. 52B

【図５３】

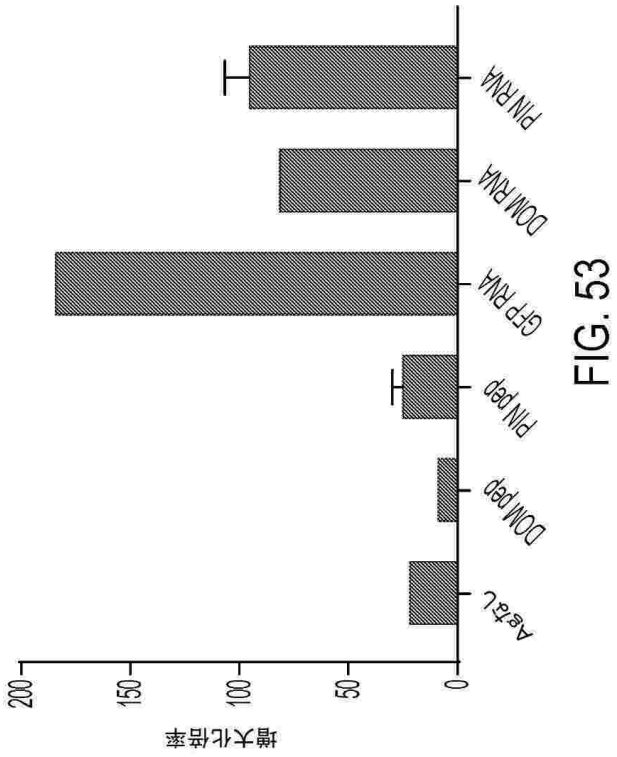


FIG. 53

【図５４】

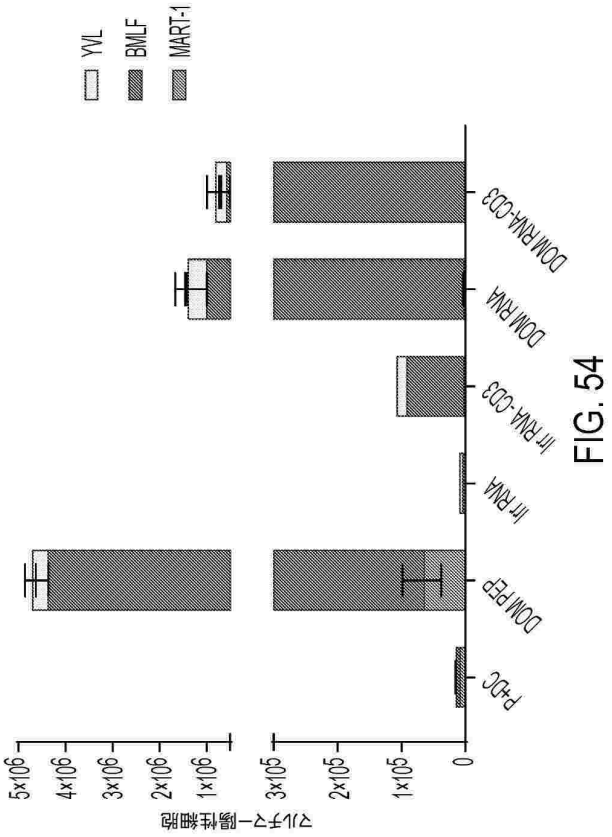


FIG. 54

【図５５】

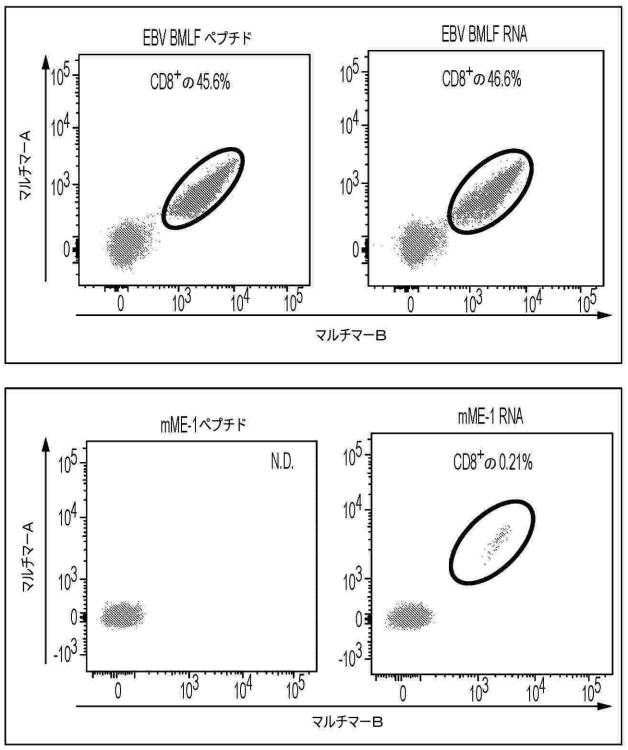


FIG. 55

【図５６Ａ】

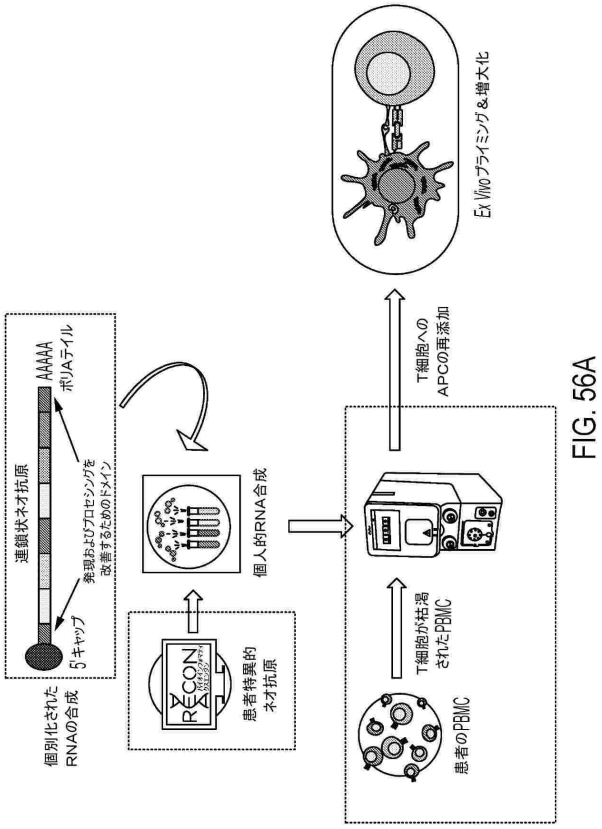


FIG. 56A

【図５６Ｂ】

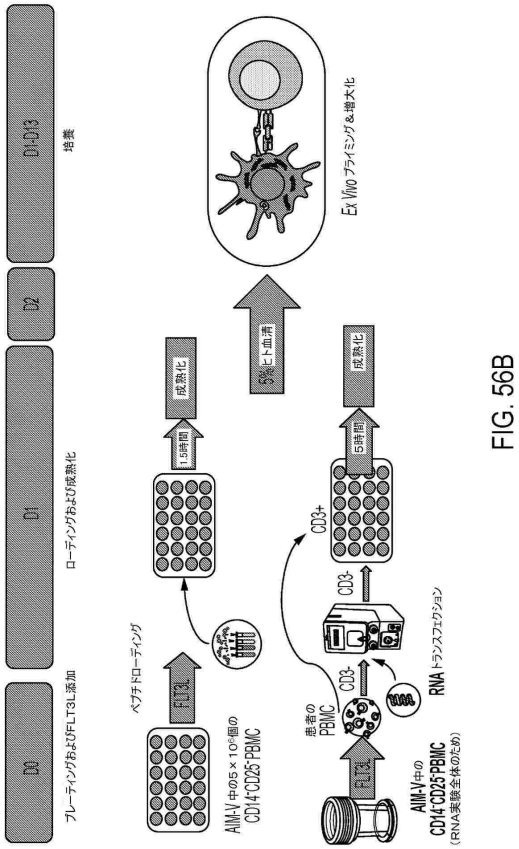


FIG. 56B

【図５７】

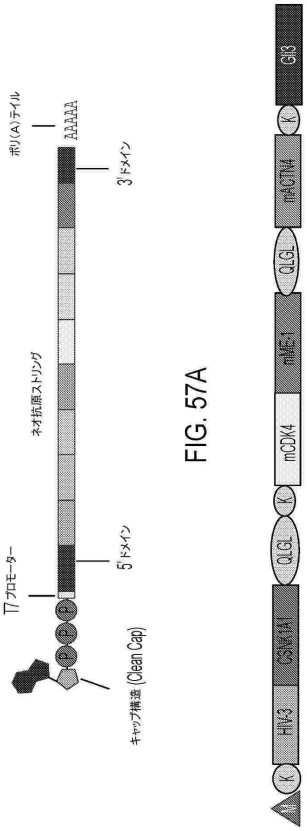


FIG. 57A

FIG. 57B

【図５８】



FIG. 58A

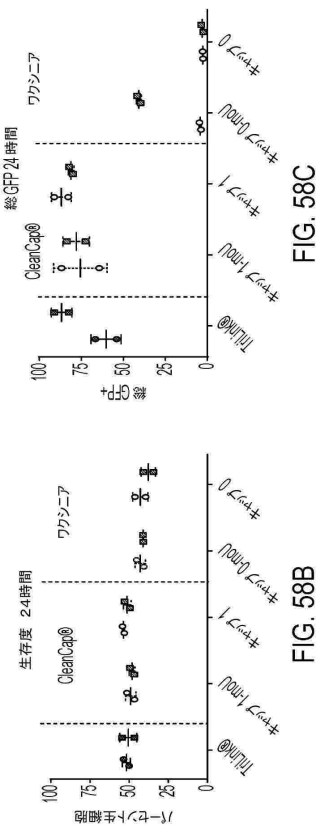


FIG. 58B

FIG. 58C

【図５９－１】

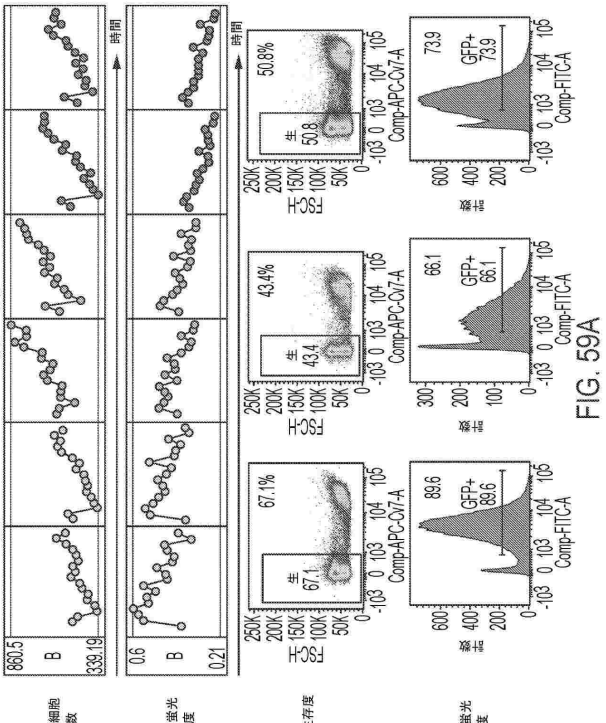


FIG. 59A

【図５９－２】

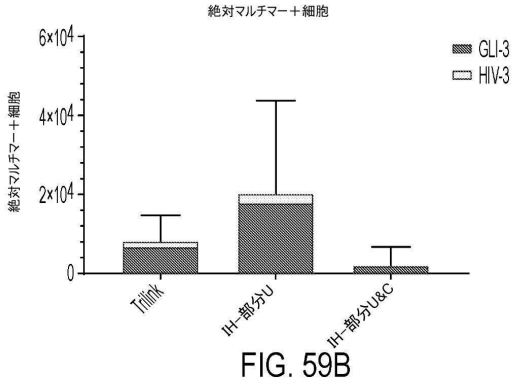


FIG. 59B

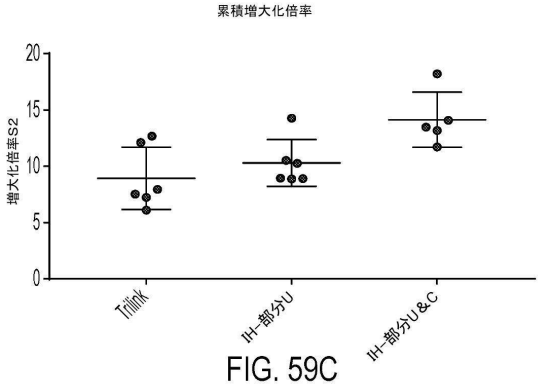


FIG. 59C

【図６０】

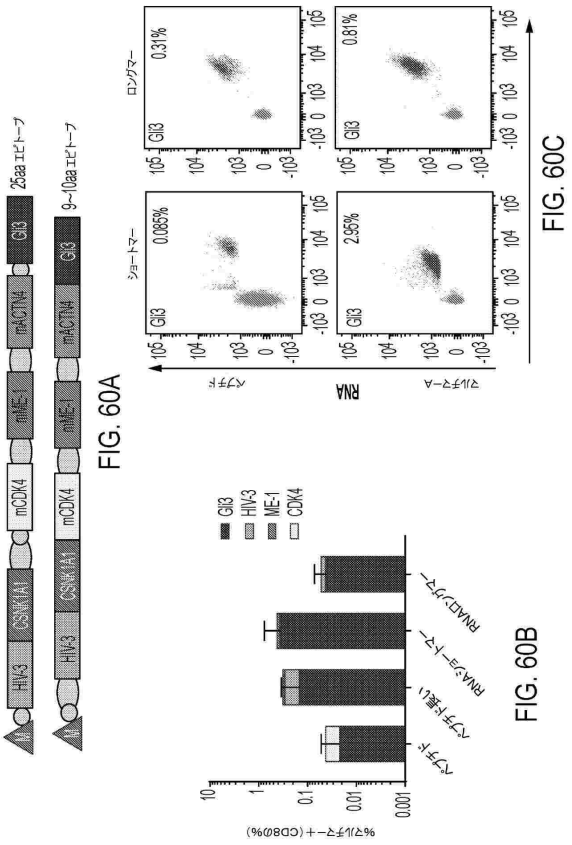


FIG. 60A

FIG. 60C

FIG. 60B

【図６１－１】

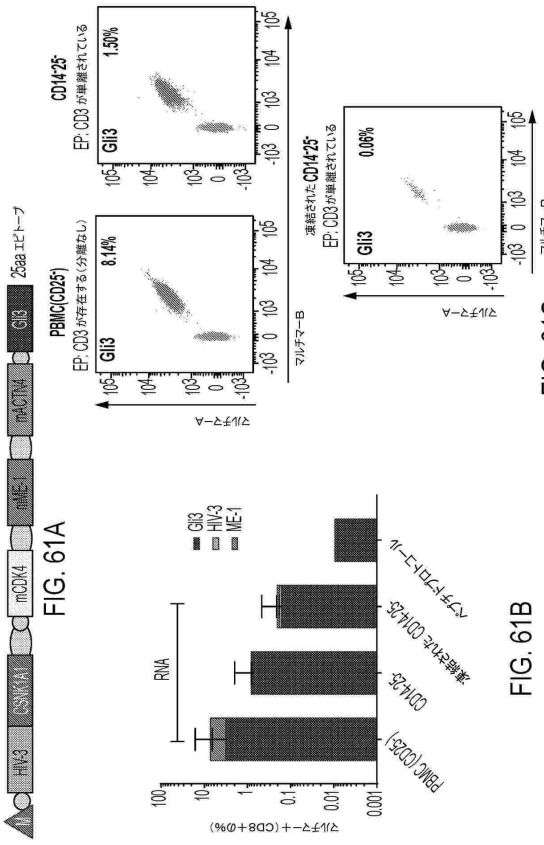


FIG. 61A

FIG. 61C

FIG. 61B

【図６１－２】

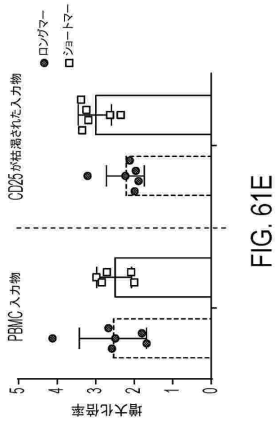


FIG. 61E

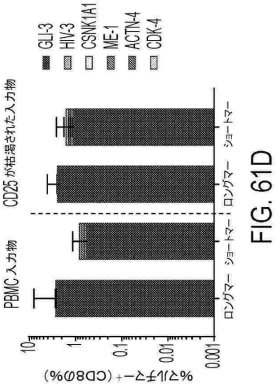


FIG. 61D

【図６２Ａ】

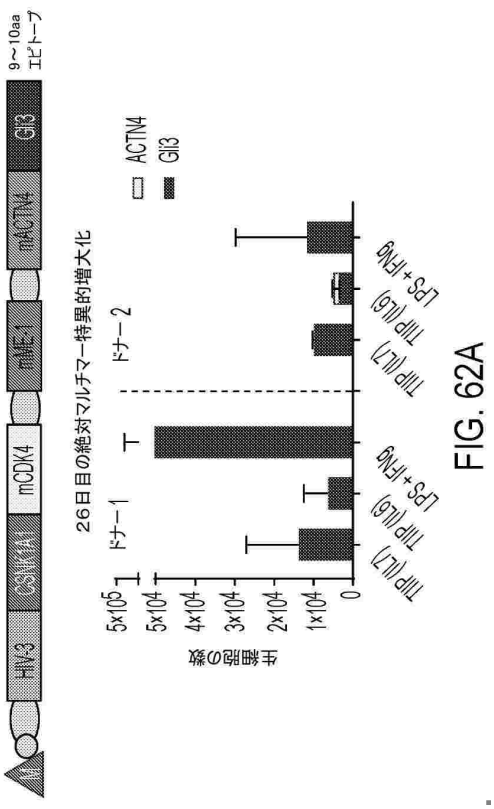


FIG. 62A

【図６２Ｂ】

Mat ミックス	ドナー1	ドナー2
TIIP(IL7)	100%	33%
TIIP(IL6)	100%	67%
LPS+IFNγ	100%	100%

Gli3 ヒット率

FIG. 62B

【図６２Ｃ】

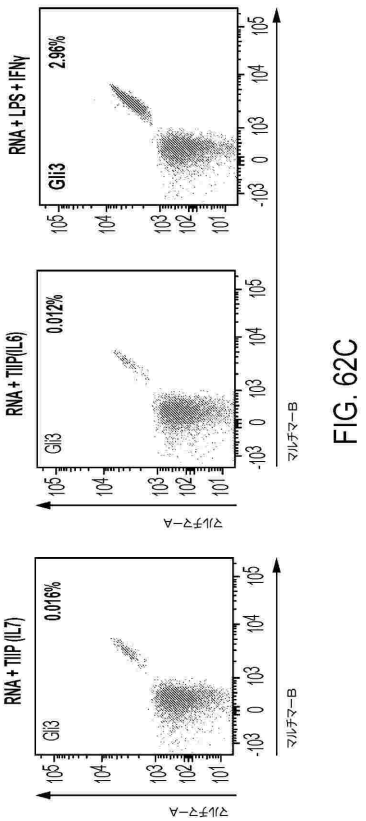


FIG. 62C

【図６３Ａ】

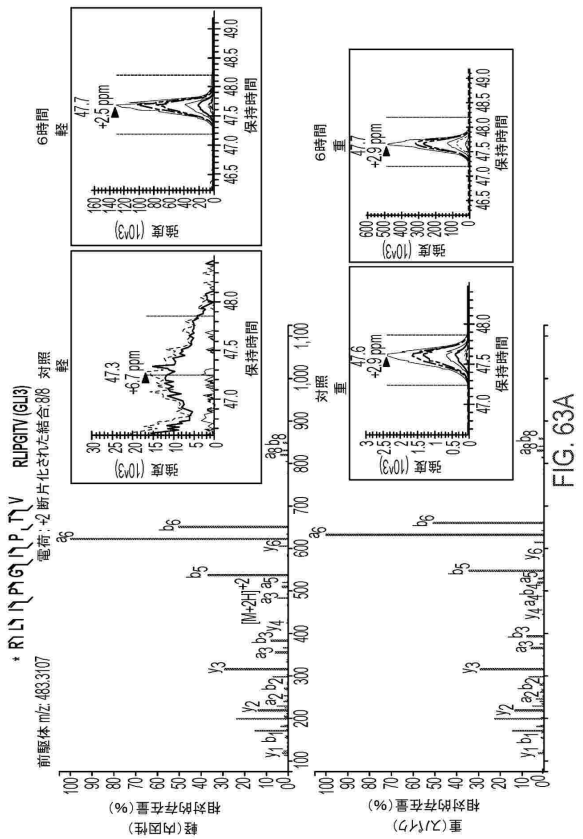


FIG. 63A

【図６３Ｂ】

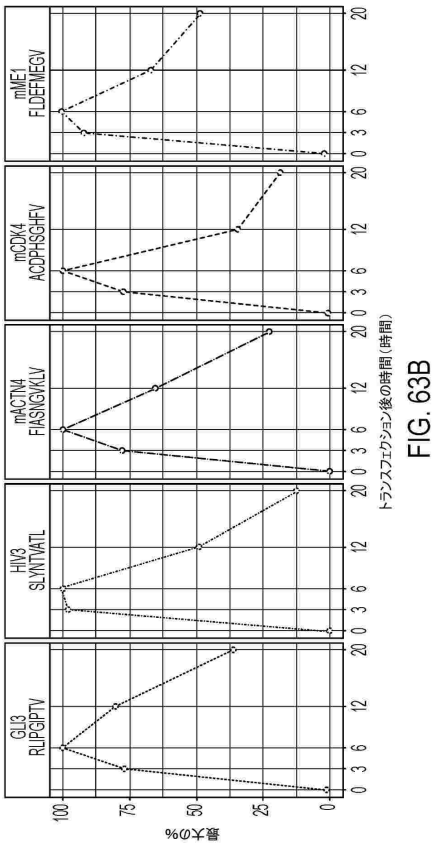


FIG. 63B

【図６４Ａ】

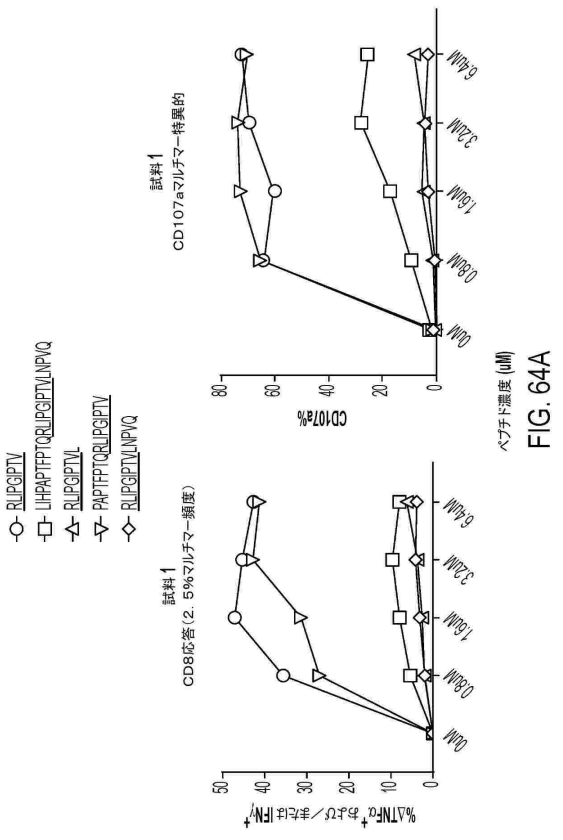


FIG. 64A

【図６４Ｂ】

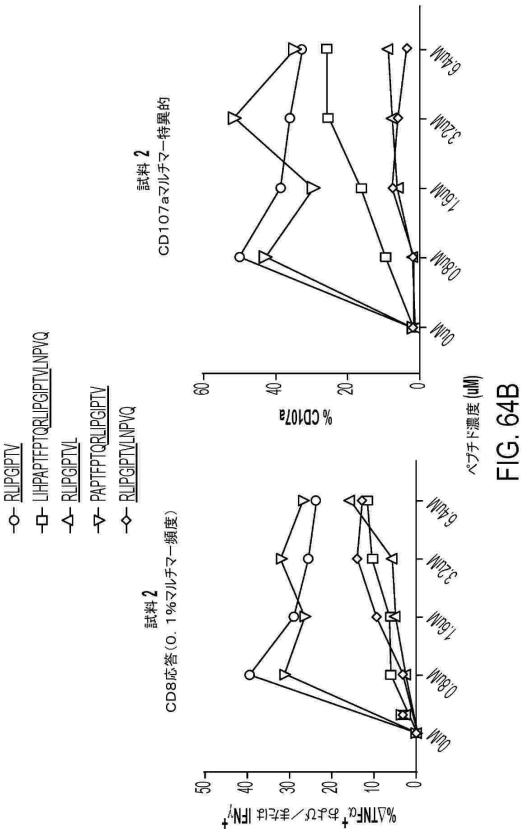


FIG. 64B

【図６５】

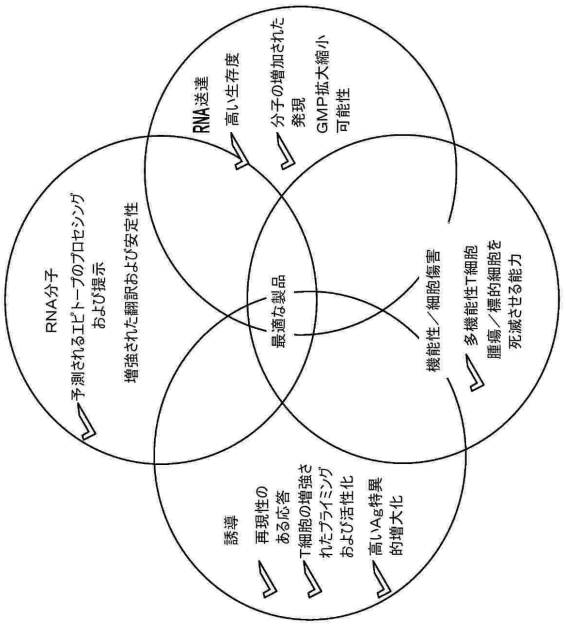


FIG. 65

【図６６】

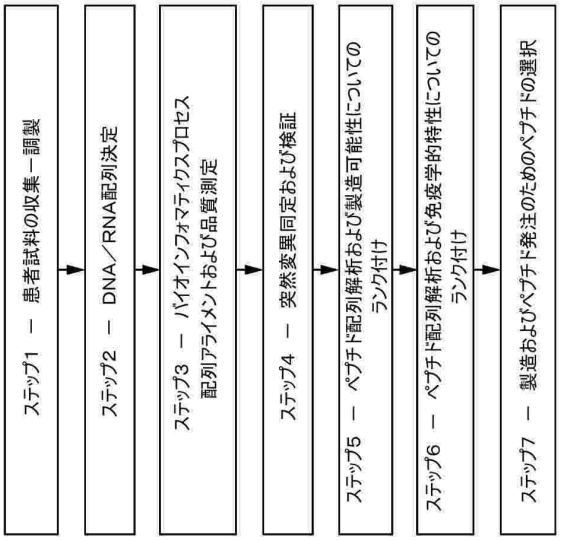


FIG. 66

【図６７Ａ】

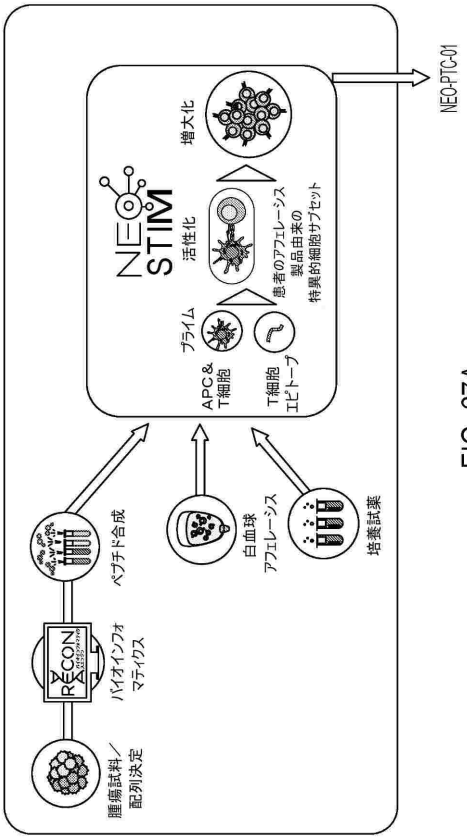


FIG. 67A

【図６７Ｂ】

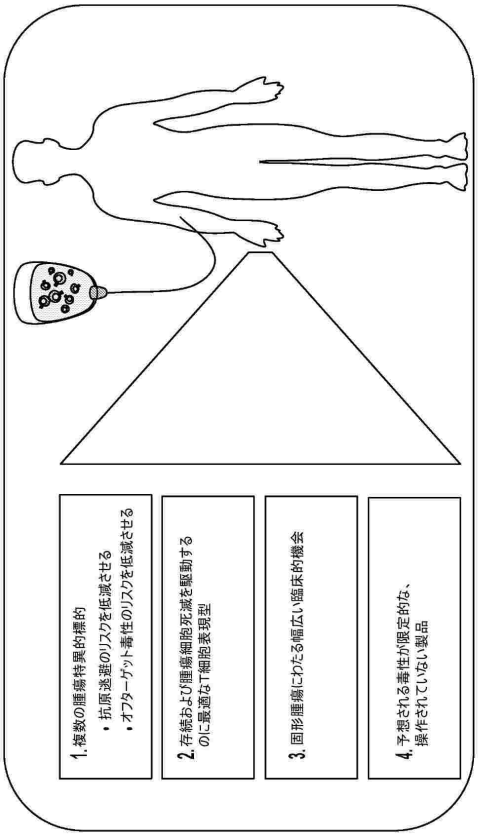


FIG. 67B

【図６８】

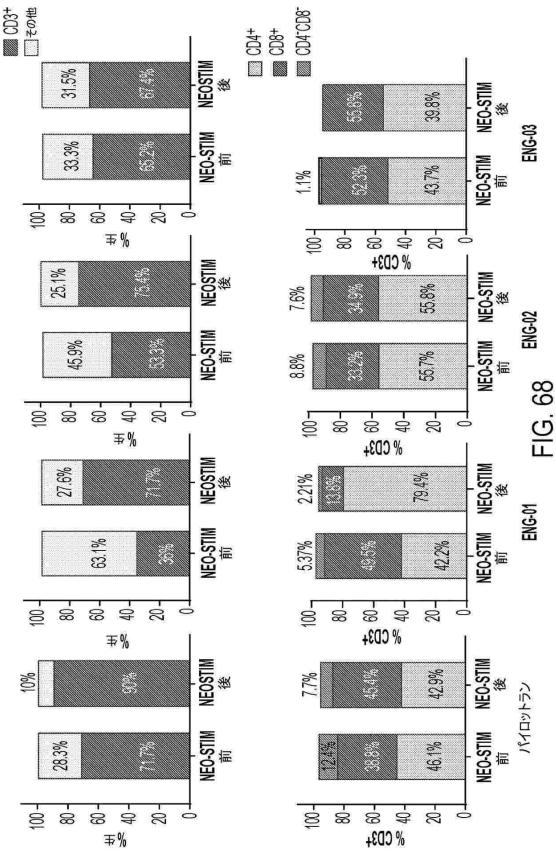


FIG. 68

【図６９】

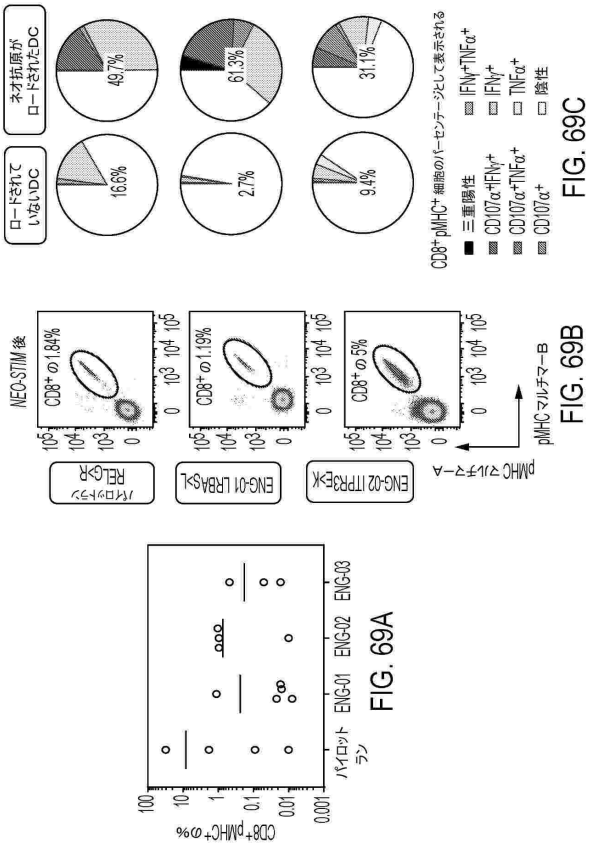


FIG. 69A

FIG. 69B

FIG. 69C

【図７０】

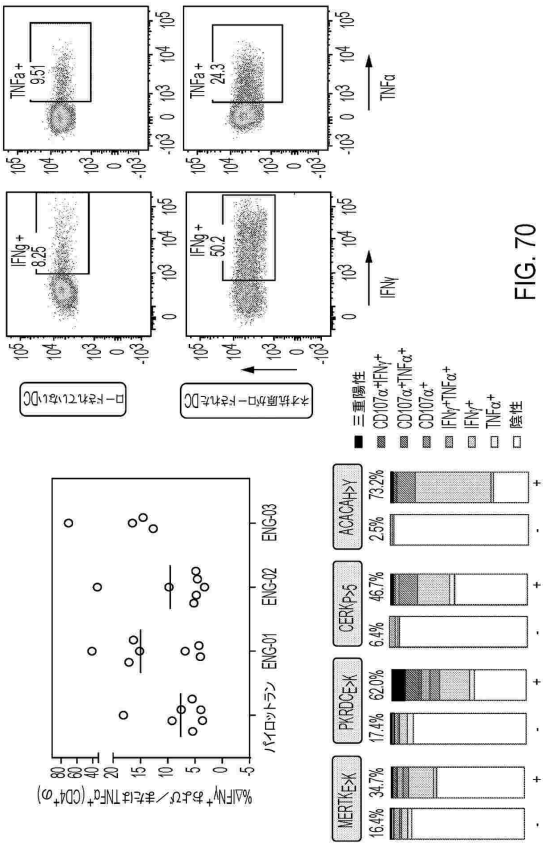


FIG. 70

【図７１】

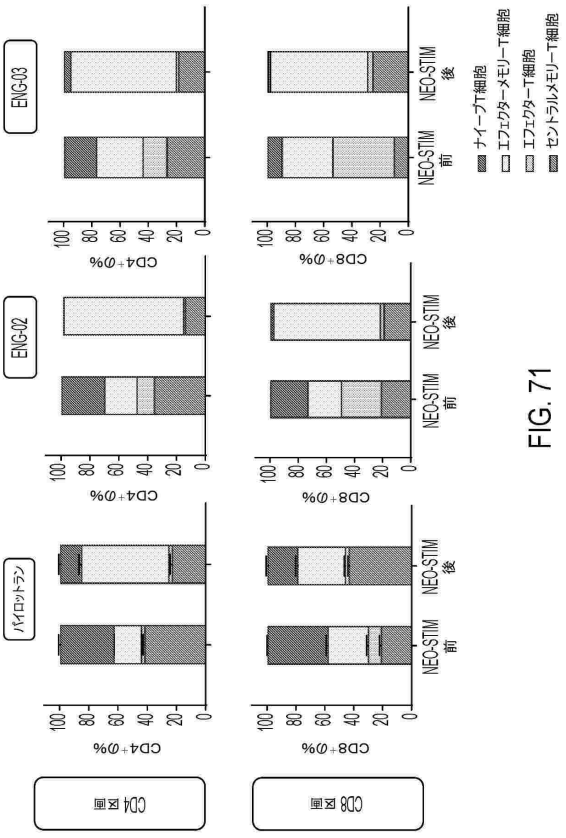


FIG. 71

【図７２】

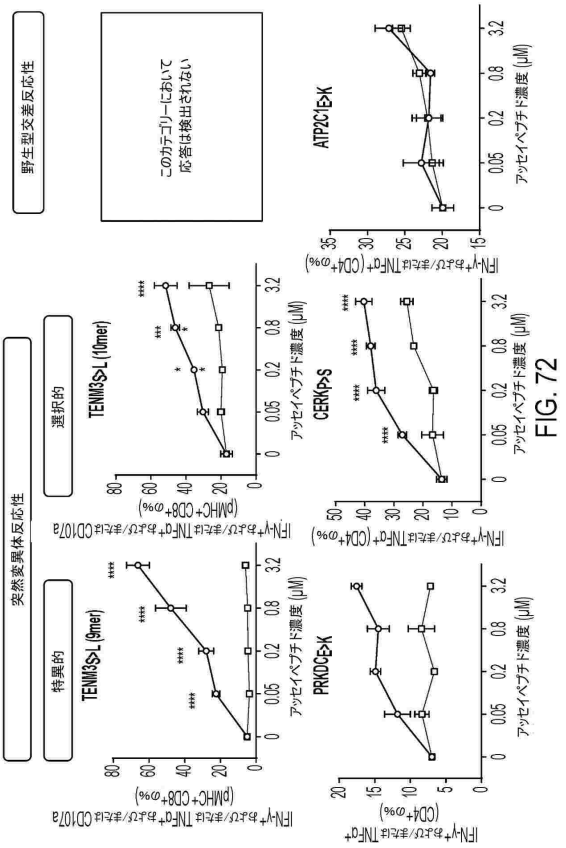


FIG. 72

【図７３】

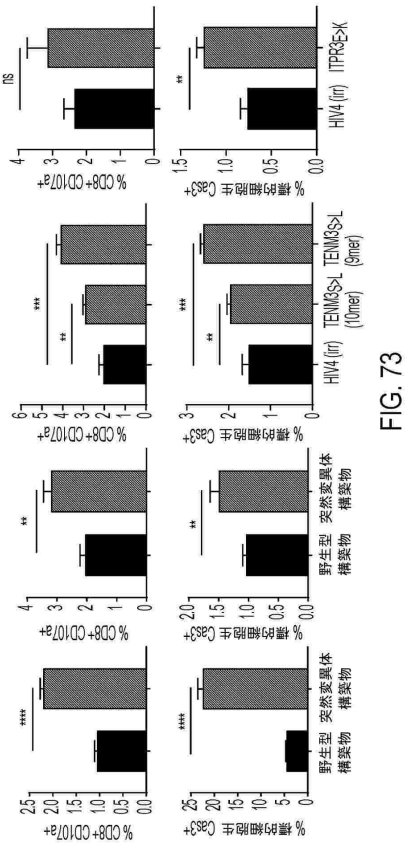


FIG. 73

【図７４】

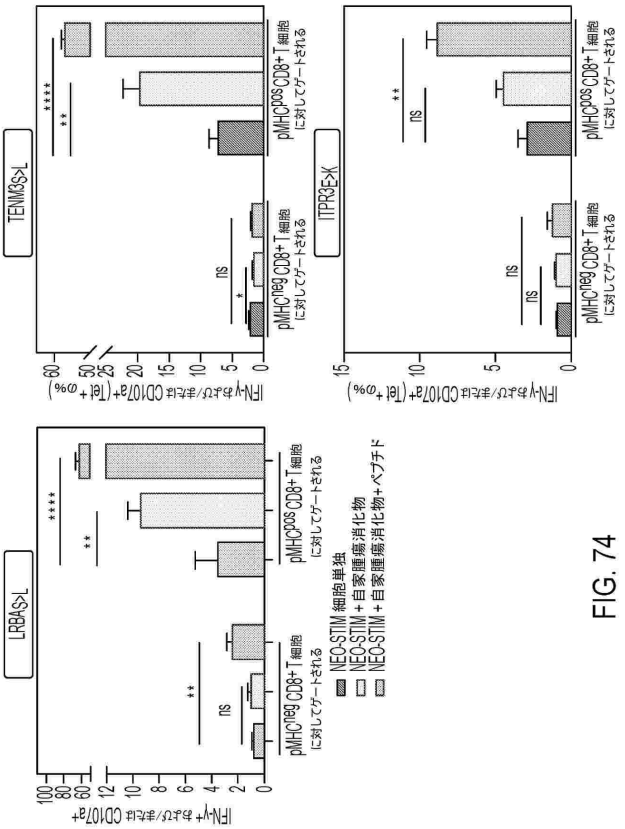


FIG. 74

【図７５】

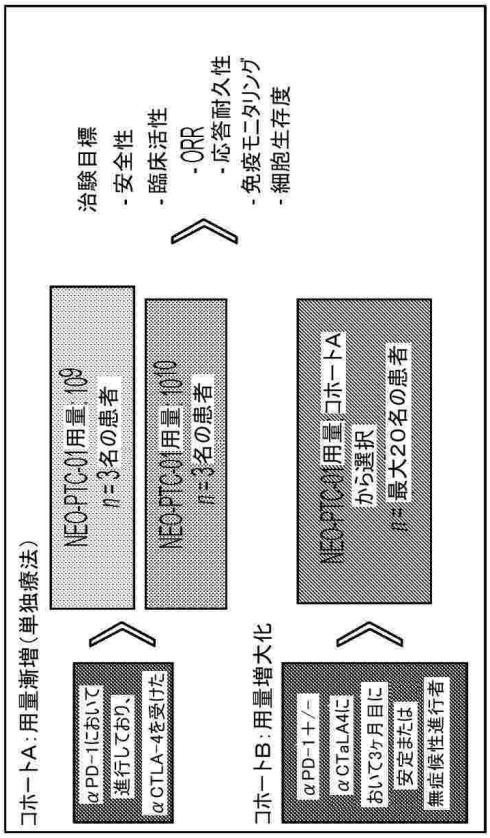


FIG. 75

【図７６Ａ】

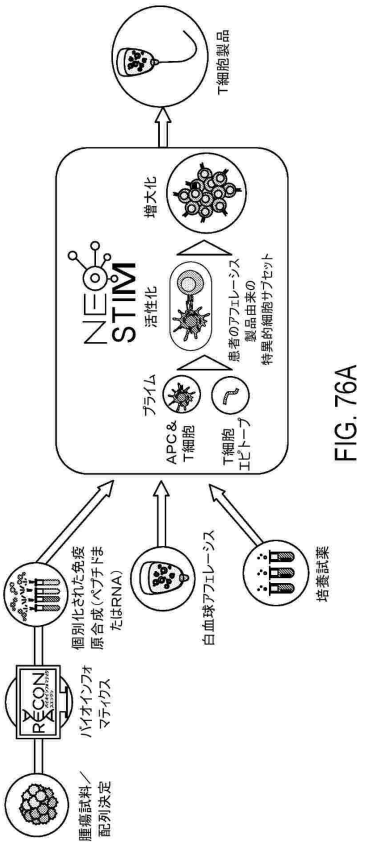
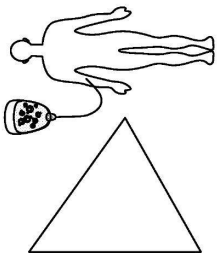


FIG. 76A

【図７６Ｂ】



1. 複数の腫瘍特異的標的
   - 抗原逃避のリスクを低減させる
   - オフターゲット毒性のリスクを低減させる
2. 存続および腫瘍細胞死滅を駆動するのに最適なT細胞表現型
3. 固形腫瘍にわたる幅広い臨床的機会
4. 操作されていない製品、毒性のリスク低減を予想

FIG. 76B

【図７７－１】

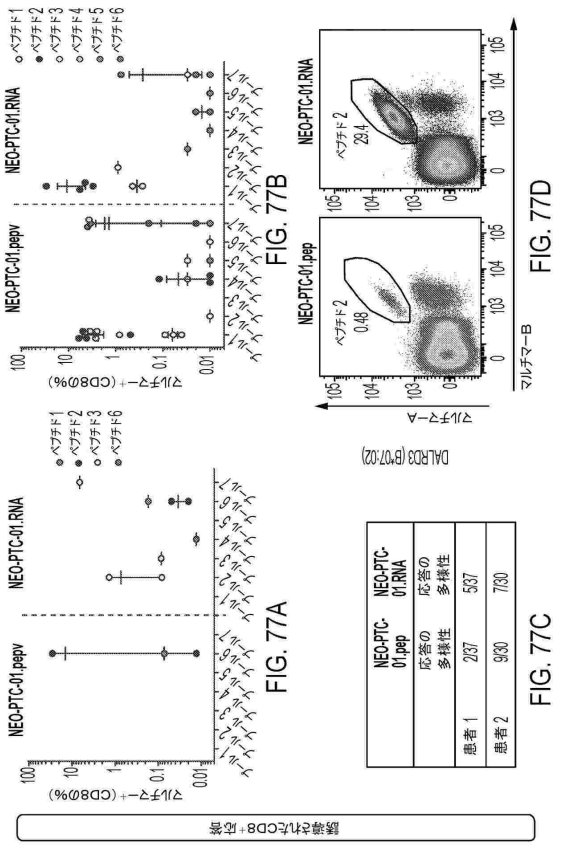


FIG. 77A

FIG. 77B

FIG. 77D

NEO-PTC-01.pep		NEO-PTC-01.RNA	
	応答の多様性		応答の多様性
患者 1	2/37	5/37	
患者 2	9/30	7/30	

FIG. 77C

【図７７－２】

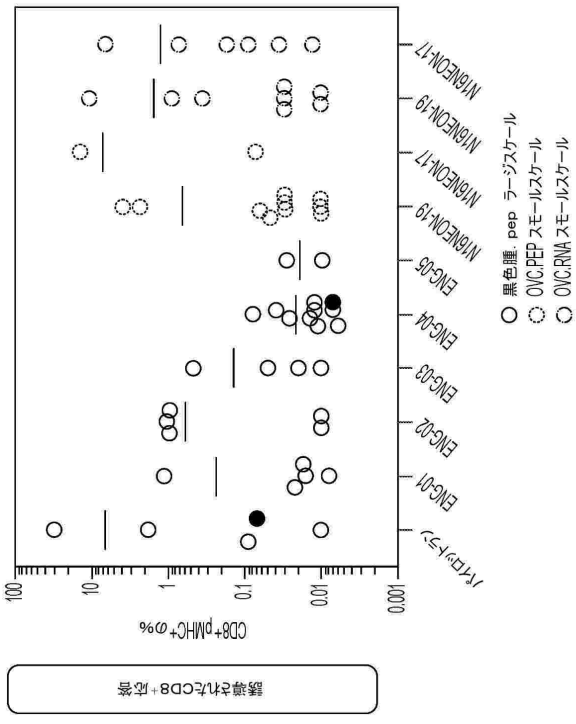


FIG. 77E

【図７８】

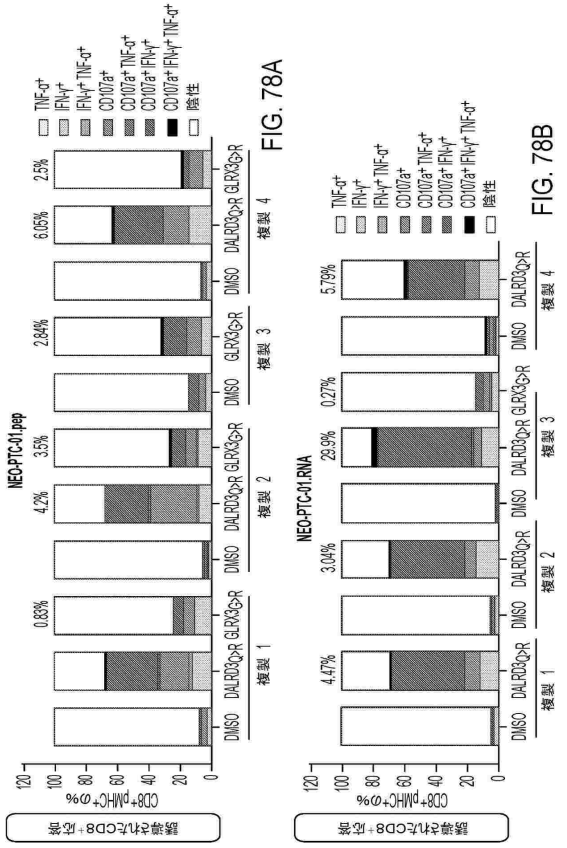


FIG. 78A

FIG. 78B

【図７９－１】

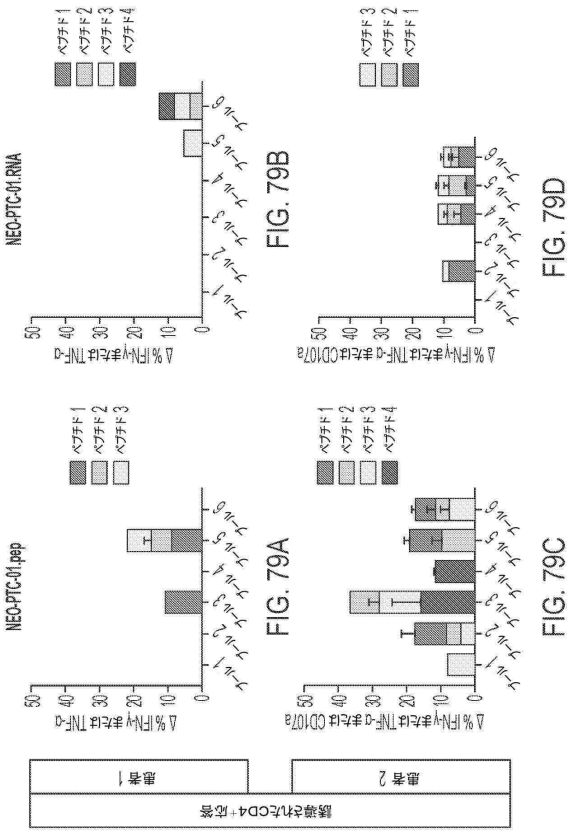


FIG. 79A

FIG. 79B

FIG. 79C

FIG. 79D

【図７９－２】

NEO-PTC-01.pep	NEO-PTC-01.RNA
応答の多様性	応答の多様性
患者 1 4/20	4/30
患者 2 13/20	11/20

FIG. 79E

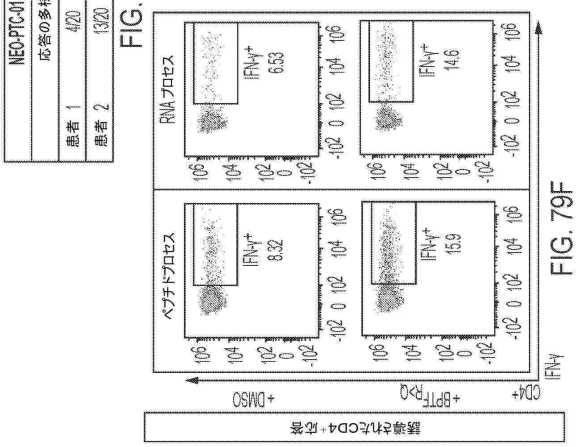


FIG. 79F

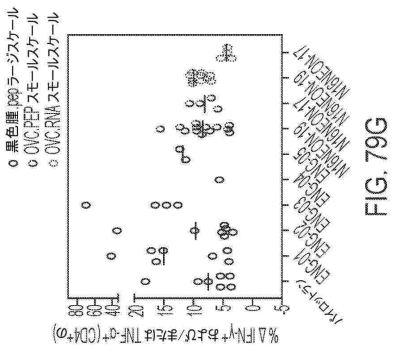


FIG. 79G

【図８０Ａ】

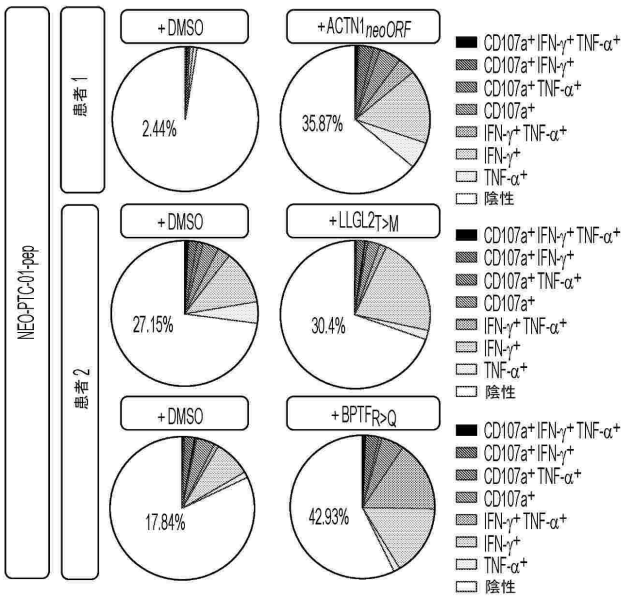


FIG. 80A

【図８０Ｂ】

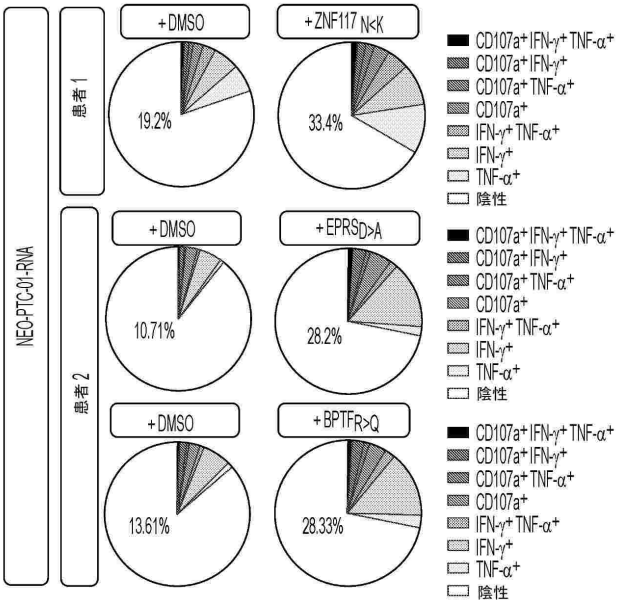


FIG. 80B

【図８１Ａ】

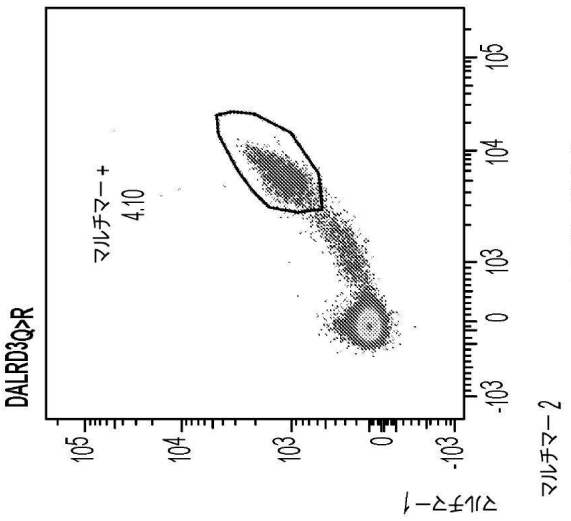


FIG. 81A

【図８１Ｂ】

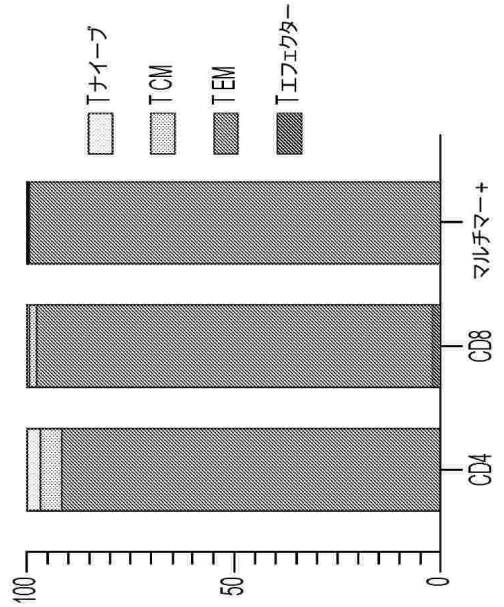


FIG. 81B

【図８１Ｃ】

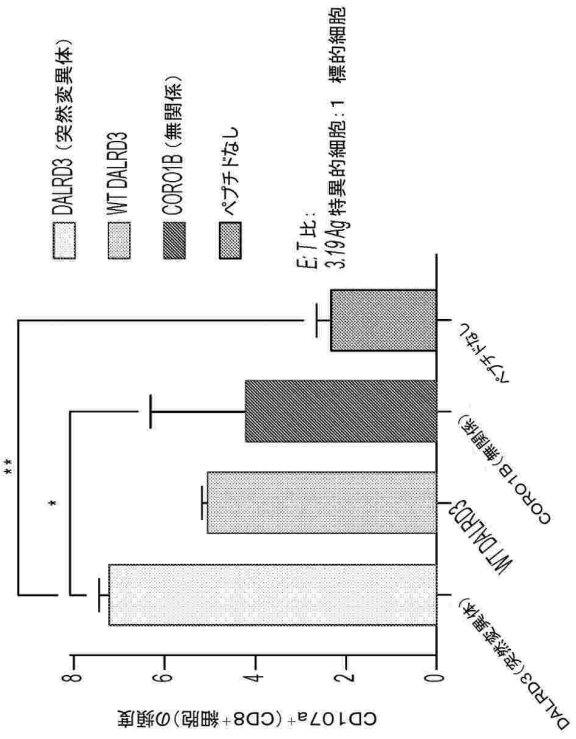


FIG. 81C

【図８１Ｄ】

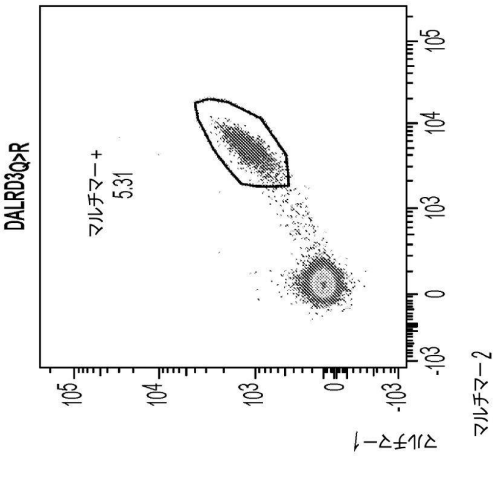


FIG. 81D

【図８１Ｅ】

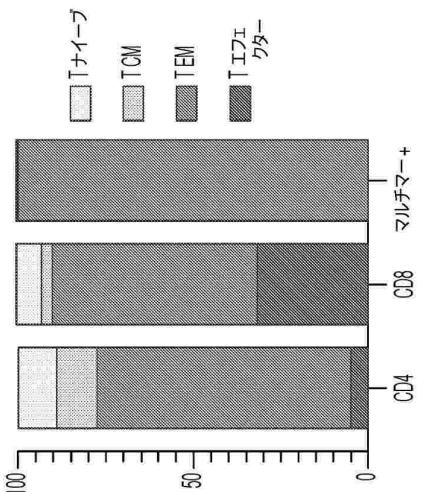


FIG. 81E

【図８１Ｆ】

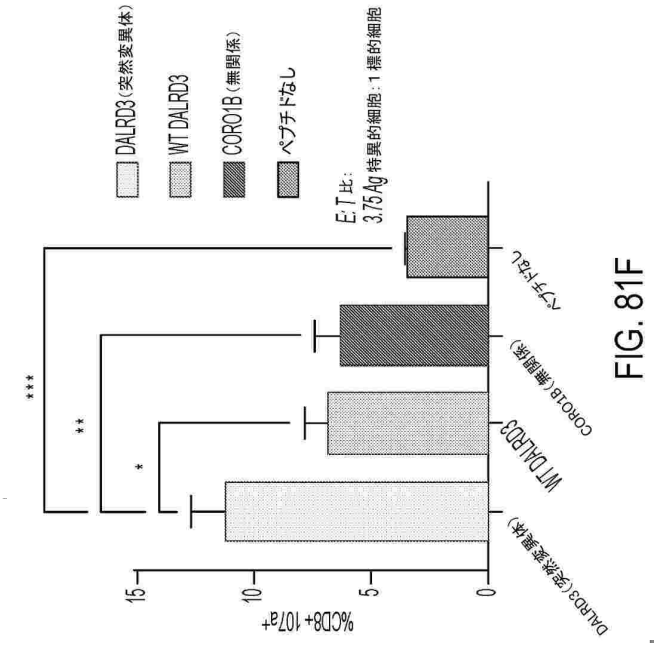


FIG. 81F

【図８２】

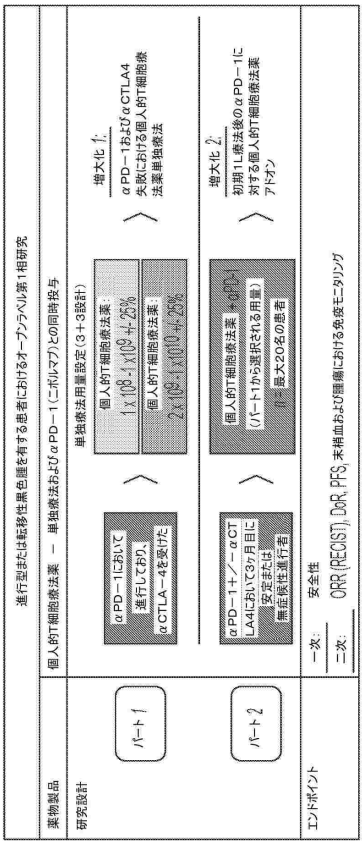


FIG. 82

【図８３】

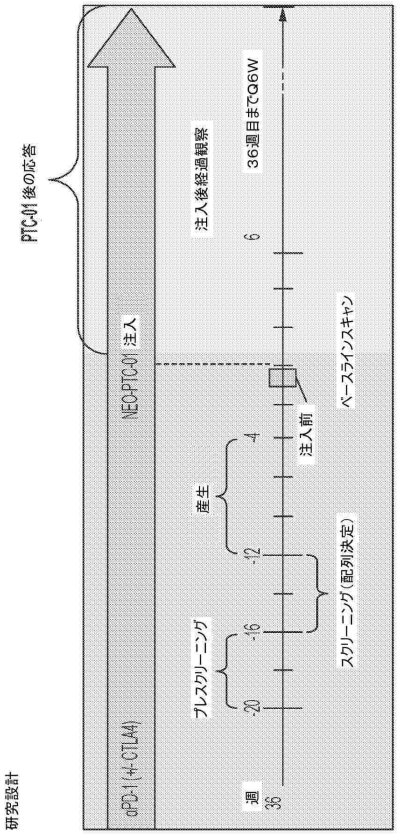


FIG. 83

【図８４】

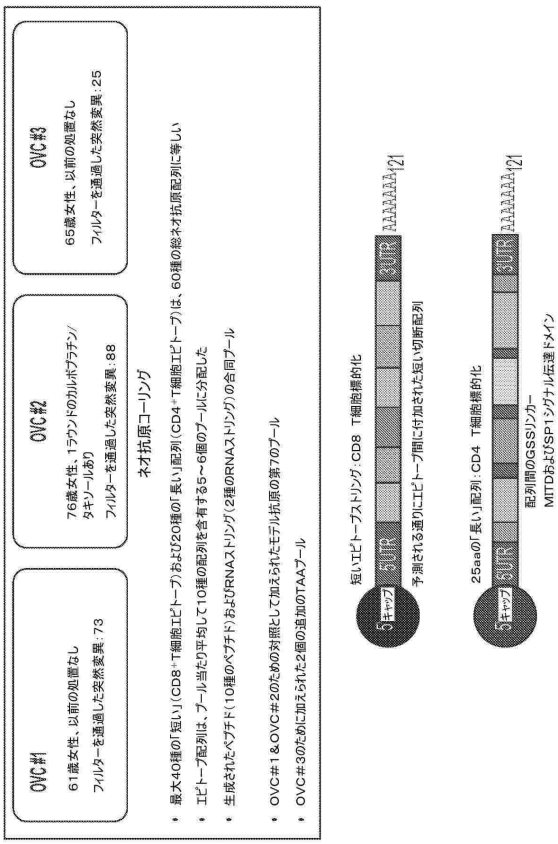


FIG. 84

【図８５】

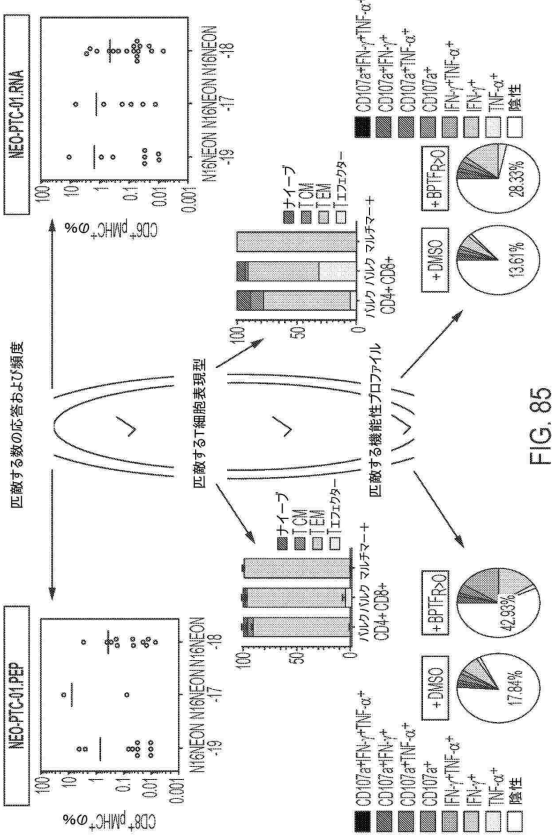


FIG. 85

【図８６】

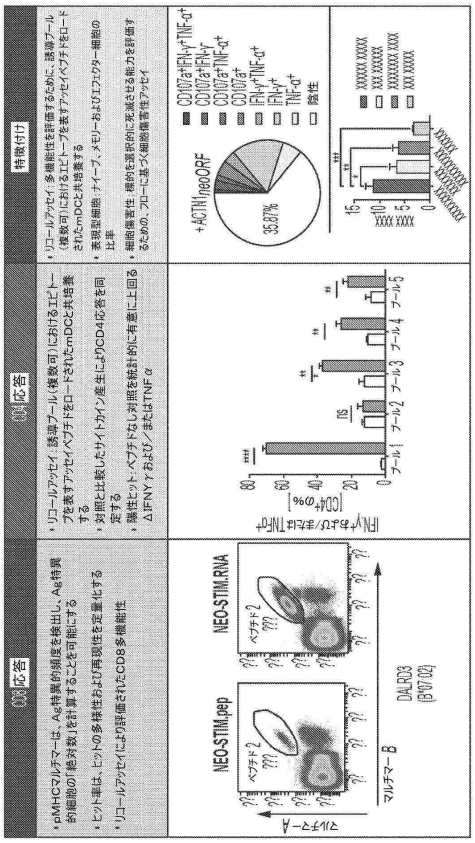
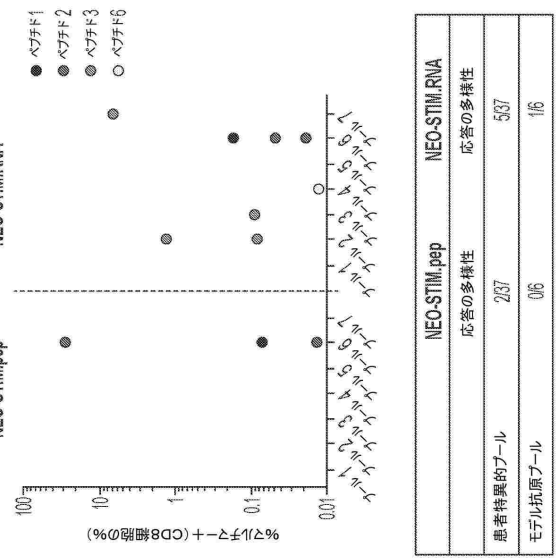


FIG. 86

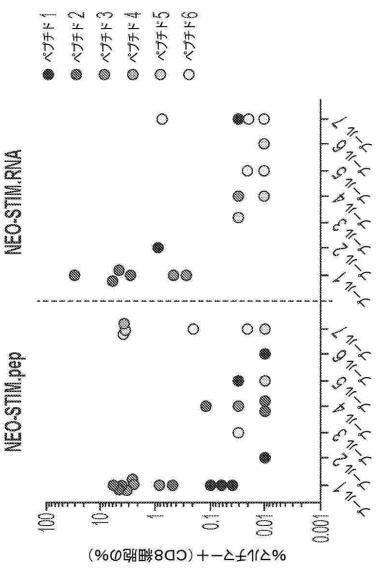
【図８７Ａ】



	NEO-STIM.pep	NEO-STIM.RNA
	応答の多様性	応答の多様性
患者特異的プール	2/37	5/37
モデル抗原プール	0/6	1/6

FIG. 87A

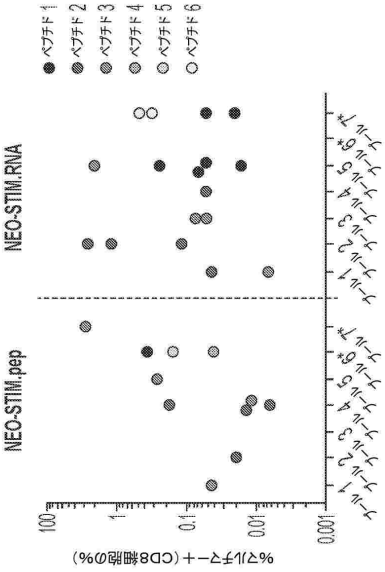
【図８７Ｂ】



NEO-STIM-01.pep	NEO-STIM.RNA
応答の多様性	応答の多様性
患者特異的プール 9/30	7/30
モデル抗原プール 3/7	2/7

FIG. 87B

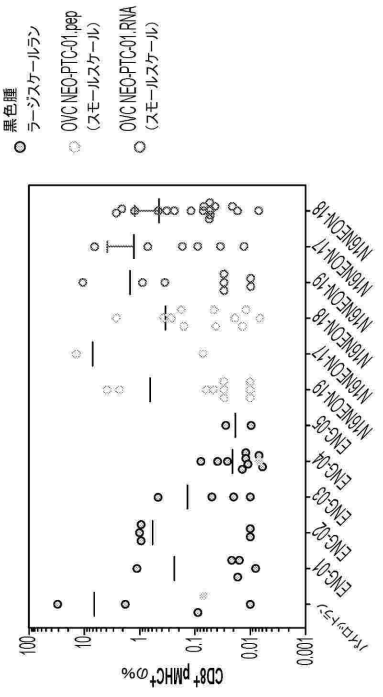
【図８７Ｃ】



NEO-STIM.pep	NEO-STIM.RNA
応答の多様性	応答の多様性
患者特異的プール 5/20	7/20
腫瘍関連抗原 4/12	2/12

FIG. 87C

【図８８】



研究スケール患者OVCラン

NEO-PTC-01.pep	NEO-PTC-01.RNA
応答の多様性	応答の多様性
N16NEON-17 2/37	5/37
N16NEON-19 9/30	7/30
N16NEON-18 5/20 (+4 TAAs)	7/20 (+2 TAAs)

FIG. 88

【図８９】

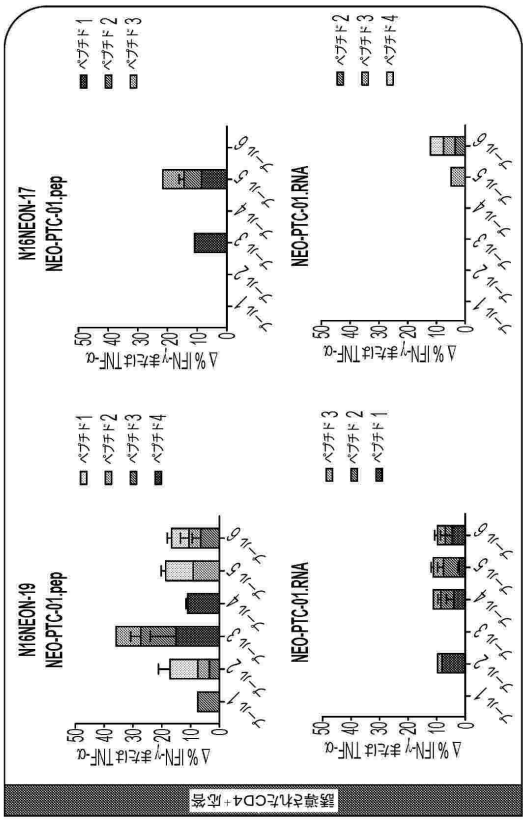
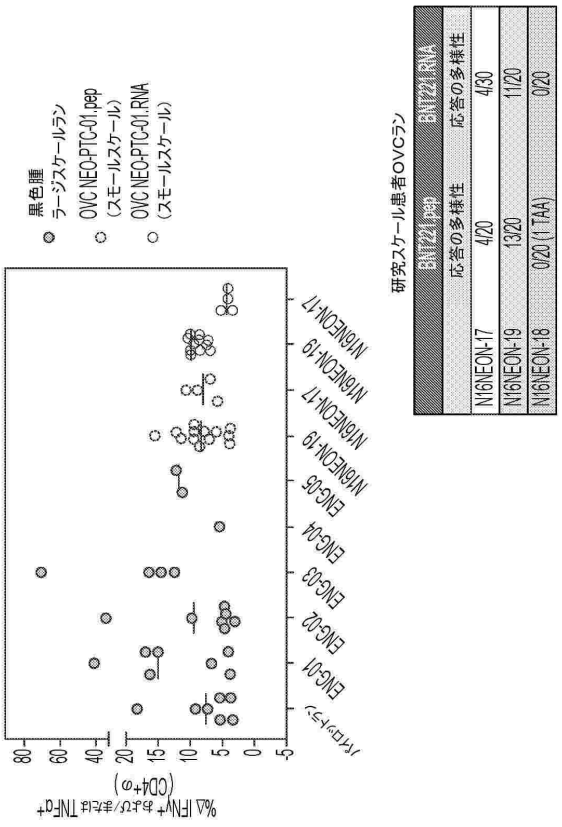


FIG. 89

【図９０】



研究スケール患者OVCラン

	BNT221.pep	BNT221.RNA
	応答の多様性	応答の多様性
N16NEON-17	4/20	4/30
N16NEON-19	13/20	11/20
N16NEON-18	0/20 (1 TAA)	0/20

FIG. 90

【図９１】

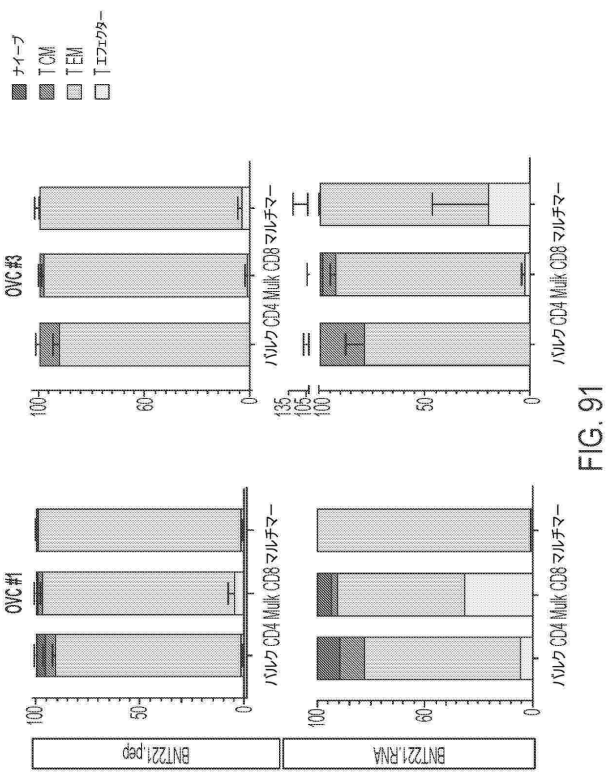


FIG. 91

【図９２】

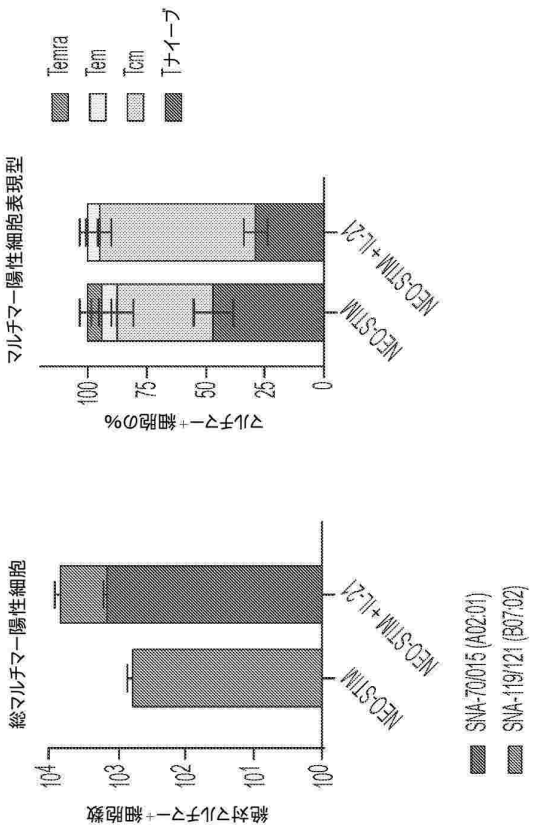


FIG. 92

【図９３】

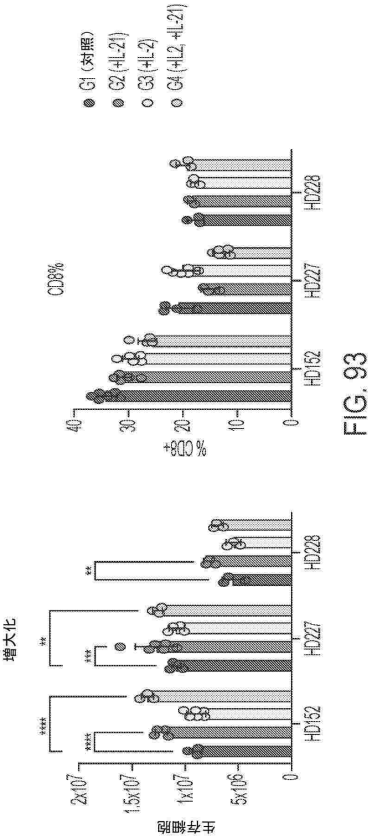


FIG. 93

【図９４】

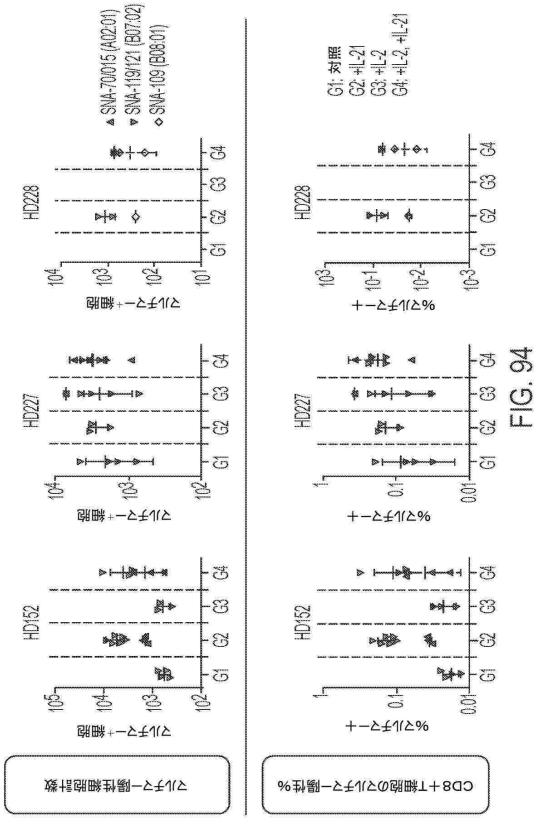


FIG. 94

【図９５】

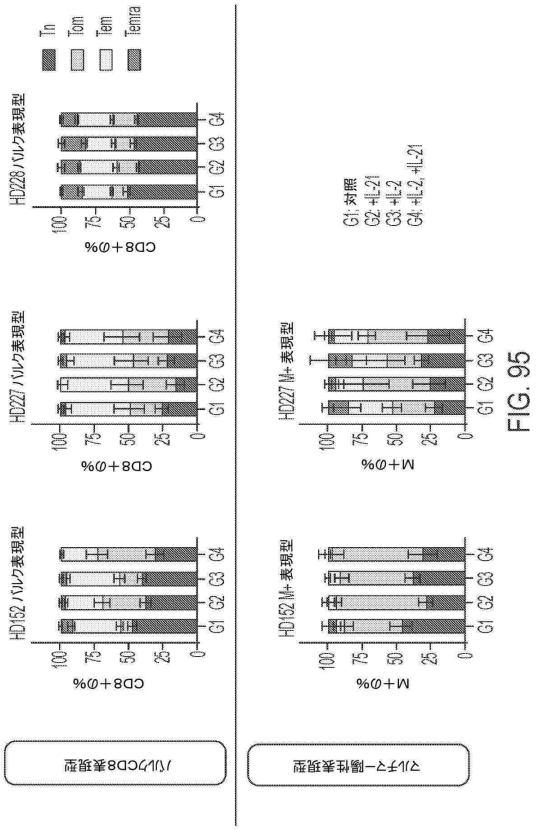


FIG. 95

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/78161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A61K 35/17, A61P 35/04 (2022.01)
ADD. A61P 37/04 (2022.01)
CPC - INV. C12N 5/0636
ADD. A61K 2039/5154, C12N 2501/599, A61K 2039/5158, A61K 2035/124
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)
See Search History document

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/227546 A1 (BIONTECH US INC. et al.) 12 November 2020 (12.11.2020); para [0005], [0028], [0548]; claim 1	1, 3, 5
A	WO 2019/094642 A1 (NEON THERAPEUTICS, INC.) 16 May 2019 (16.05.2019); entire document	1, 3, 5
X, P	US 11,162,072 B2 (NEON THERAPEUTICS, INC.) 02 November 2021 (02.11.2021); entire document	1, 3, 5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 December 2022	FEB 16 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Karl Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/78161

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 6-14 and 21-43
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
---See Supplemental Box ---

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

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying 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.:
1, 3 and 5

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/US 22/78161

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1, 3 and 5, directed to an ex vivo method for preparing tumor antigen-specific T cells.

Group II: Claims 2, 4 and 15-20, directed to a method of treating a cancer (e.g. ovarian cancer) in a subject in need thereof.

Group III: Claims 44-51, directed to a composition comprising an expanded a population of immune cells comprising antigen presenting cells (APCs) and T cells.

The inventions listed as Groups I though III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features
Group I requires a method of preparing an expanded population of cells wherein at least 30% of the expanded population of cells comprising tumor antigen-specific T cells are effector memory T cells, not required by group II and III.

Group II requires a method of treating cancer (e.g. ovarian cancer) in a human subject, not required by groups I and III.

Group III requires an isolated population of immune cells comprising APCs and T cells, not required by groups I and II.

Common Technical Features
The common technical feature shared by Groups I - III is a method comprising:
(a) depleting CD14+ cells and/or CD25+ cells from a population of immune cells comprising antigen presenting cells (APCs) and T cells, thereby forming a CD14 and/or CD25 depleted population of immune cells comprising a first population of APCs and T cells;
(b) incubating the first population of APCs and T cells from step (a) for a first time period in the presence of:
(i) FMS-like tyrosine kinase 3 receptor ligand (FLT3L), and
(ii) (A) a polypeptide comprising at least one tumor antigen epitope sequence expressed by cancer cells of a human subject with cancer, or (B) a polynucleotide encoding the polypeptide; thereby forming a population of cells comprising stimulated T cells; and
(c) expanding the population of cells comprising stimulated T cells, thereby forming an expanded population of cells comprising tumor antigen-specific T cells, wherein the tumor antigen-specific T cells comprise T cells that are specific to a complex comprising
(i) the at least one tumor antigen epitope sequence and
(ii) an MHC protein expressed by the cancer cells or APCs of the human subject of (b)(ii)

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by WO 2020/227546 A1 to Biontech US Inc. et al. (hereinafter "Biontech").

(a) depleting CD14+ cells and/or CD25+ cells from a population of immune cells comprising antigen presenting cells (APCs) and T cells, thereby forming a CD14 and/or CD25 depleted population of immune cells comprising a first population of APCs and T cells (claim 1 - "depleting CD 14+ cells and/or CD25+ cells from a population of immune cells comprising antigen presenting cells (APCs) and T cells, thereby forming a CD14 and/or CD25 depleted population of immune cells comprising a first population of APCs and T cells");
(b) incubating the first population of APCs and T cells from step (a) for a first time period in the presence of:
(i) FMS-like tyrosine kinase 3 receptor ligand (FLT3L) (claim 1 - "incubating the first population of APCs and T cells from step (a) for a first time period in the presence of: (i) FMS-like tyrosine kinase 3 receptor ligand (FLT3L)"), and
(ii) (A) a polypeptide comprising at least one tumor antigen epitope sequence expressed
by cancer cells of a human subject with cancer, or (B) a polynucleotide encoding the polypeptide; thereby forming a population of cells comprising stimulated T cells (claim 1 - "a polypeptide comprising at least one tumor antigen epitope sequence expressed by cancer cells of a human subject with cancer, or (B) a polynucleotide encoding the polypeptide; thereby forming a population of cells comprising stimulated T cells"); and
(c) expanding the population of cells comprising stimulated T cells, thereby forming an expanded population of cells comprising tumor antigen-specific T cells, wherein the tumor antigen-specific T cells comprise T cells that are specific to a complex comprising (i) the at least one tumor antigen epitope sequence and (ii) an MHC protein expressed by the cancer cells or APCs of the human subject of (b)(ii) (claim 1 - "expanding the stimulated T cells from step (b), thereby forming an expanded population of cells comprising tumor antigen-specific T cells, wherein the tumor antigen-specific T cells comprise T cells that are specific to a complex comprising (i) the at least one tumor antigen epitope sequence from step (b)(ii), and, (ii) an MHC protein expressed by the cancer cells, or APCs of the human subject of (b)(ii)").

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I-III therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4, continued: claims 6-14 and 21-43 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a) regarding multiply dependent claims.

Form PCT/ISA/210 (extra sheet) (July 2022)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｐ	*37/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		
Ｃ１２Ｎ	*15/12 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/12		

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

オランダ国、１０６６ セーイクス アムステルダム、プレスマンラーン １２１

(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 ファン ビューレン， マリト エム．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９， ケンブリッジ， エリー ストリート ４０， スイート １１０

(72)発明者 レンカラ， ディヴィヤ レディ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９， ケンブリッジ， エリー ストリート ４０， スイート １１０

(72)発明者 コーラー， ジェシカ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９， ケンブリッジ， エリー ストリート ４０， スイート １１０

(72)発明者 ククシン， クリスティーナ エム．
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９， ケンブリッジ， エリー ストリート ４０， スイート １１０

(72)発明者 ハーネン， ジョン ビー．
オランダ国 １０６６セーイクス アムステルダム， プレスマンラーン １２１

(72)発明者 デマリオ， マーク
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１３９， ケンブリッジ， エリー ストリート ４０， スイート １１０

Ｆターム（参考） 4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA13 AA17 MA02 MA66 NA05 NA14 ZA811 ZA812 ZB261 ZB262 ZC751
4C087 AA01 AA02 BB43 BB64 BB65 CA12 MA02 MA66 NA05 NA14 ZA81 ZB26 ZC75