

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7260553号
(P7260553)

(45)発行日 令和5年4月18日(2023.4.18)

(24)登録日 令和5年4月10日(2023.4.10)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

Z N A

C 0 7 K 14/725 (2006.01)

C 0 7 K 14/725

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

C 1 2 N 5/078

C 0 7 K 7/06 (2006.01)

C 0 7 K 7/06

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/17

請求項の数 7 (全52頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-540688(P2020-540688)

(86)(22)出願日 平成30年10月5日(2018.10.5)

(65)公表番号 特表2021-502110(P2021-502110
A)

(43)公表日 令和3年1月28日(2021.1.28)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/054664

(87)国際公開番号 WO2019/071164

(87)国際公開日 平成31年4月11日(2019.4.11)

審査請求日 令和3年10月4日(2021.10.4)

(31)優先権主張番号 62/569,215

(32)優先日 平成29年10月6日(2017.10.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 399019892

ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ
THE UNIVERSITY OF C
HICAGO
アメリカ合衆国 6 0 6 3 7 イリノイ州シ
カゴ、サウス・エリス・アベニュー 5 8
0 1 番

(73)特許権者 502240113

オンコセラピー・サイエンス株式会社
神奈川県川崎市川崎区東田町 1 番地 2

(74)代理人 110000338

弁理士法人 HARAKENZO WOR
LD PATENT & TRADEMA
RK

(72)発明者 中村 祐輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がん特異的抗原に対する T リンパ球のスクリーニング

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変リンパ球を作製する方法であって、

(a) 候補抗原配列を含む刺激ペプチドで標的リンパ球をインビトロで刺激することと、

(b) 前記候補抗原配列に結合する T 細胞受容体 (T C R) で免疫活性化リンパ球を捕
捉することであって、前記捕捉することは、前記免疫活性化リンパ球を、前記候補抗原配
列を含む捕捉用ペプチドに結合した主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) を提示する捕捉
用試薬と接触させることを含む、前記捕捉することと、

(c) 前記捕捉した免疫活性化リンパ球の前記 T C R をシークエンスすることと、

(d) 以下の (i) ~ (i i i) の工程を行うことにより、前記捕捉した免疫活性化リ
ンパ球の前記 T C R の全てまたは一部を提示する改変リンパ球を作製することと、を含み、
前記 (i) ~ (i i i) は、(i) 前記捕捉した免疫活性化リンパ球の前記 T C R の前記一部をコードする核酸配列を
ベクターにクローニングする工程、

(i i) 前記ベクターを宿主リンパ球に導入する工程、及び

(i i i) 前記捕捉した免疫活性化リンパ球の前記 T C R の前記一部が前記改変リンパ球
上に発現及び提示されるような条件下で、前記宿主リンパ球を培養する工程、

であり、

前記 T C R の前記一部は、配列番号：4 5 ~ 1 3 2 からなる群から選択されるアミノ酸配
列を含み、

10

20

前記改変リンパ球は、配列番号 45 及び 46、47 及び 48、49 及び 50、51 及び 52、53 及び 54、55 及び 56、57 及び 58、59 及び 60、61 及び 62、63 及び 64、65 及び 66、67 及び 68、69 及び 70、71 及び 72、73 及び 74、75 及び 76、77 及び 78、79 及び 80、81 及び 82、83 及び 84、85 及び 86、87 及び 88、89 及び 90、91 及び 92、93 及び 94、95 及び 96、97 及び 98、99 及び 100、101 及び 102、103 及び 104、105 及び 106、107 及び 108、109 及び 110、111 及び 112、113 及び 114、115 及び 116、117 及び 118、119 及び 120、121 及び 122、123 及び 124、125 及び 126、127 及び 128、129 及び 130、及び、131 及び 132、からなる群から選択されるアミノ酸配列ペアを含む α 鎖及び β 鎖を含む TCR を提示し、前記改変リンパ球は、候補抗原配列を含むペプチドに結合した MHC を提示する抗原提示細胞を認識する、方法。

10

【請求項 2】

- (a) 前記標的リンパ球は健康ドナーから得られ、
- (b) 前記標的リンパ球は CD8 + 細胞傷害性リンパ球であり、
- (c) 前記捕捉用試薬は MHC 多量体であり、及び／または、
- (d) 前記シーケンスすることは次世代シーケンシング技術を含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

シーケンスした前記 TCR の前記一部は、

- (a) TCR - α 鎖及び／または TCR - β 鎖、
 - (b) 前記 TCR - α 鎖及び／または TCR - β 鎖の 1 つまたは複数の相補性決定領域 (CDR)、及び／または、
 - (c) 前記 TCR - α 鎖及び／または TCR - β 鎖の CDR3
- を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記標的リンパ球は標的リンパ球の集団であり、前記刺激ペプチドは、異なる候補抗原配列を含む刺激ペプチドの集団のうちの 1 つであり、

前記捕捉することは、免疫活性化リンパ球の前記集団を、前記候補抗原配列を含む捕捉用ペプチドの集団に結合した主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) を提示する捕捉用試薬と接触させることを含む、

請求項 1 から請求項 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記ベクターは、

- (a) 健康ドナー宿主、または
- (b) 前記改変リンパ球で治療されるがん患者

に由来する宿主リンパ球に導入される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

改変リンパ球であって、

前記改変リンパ球は、配列番号 45 及び 46、47 及び 48、49 及び 50、51 及び 52、53 及び 54、55 及び 56、57 及び 58、59 及び 60、61 及び 62、63 及び 64、65 及び 66、67 及び 68、69 及び 70、71 及び 72、73 及び 74、75 及び 76、77 及び 78、79 及び 80、81 及び 82、83 及び 84、85 及び 86、87 及び 88、89 及び 90、91 及び 92、93 及び 94、95 及び 96、97 及び 98、99 及び 100、101 及び 102、103 及び 104、105 及び 106、107 及び 108、109 及び 110、111 及び 112、113 及び 114、115 及び 116、117 及び 118、119 及び 120、121 及び 122、123 及び 124、125 及び 126、127 及び 128、129 及び 130、及び、131 及び 132、からなる群から選択されるアミノ酸配列ペアを含む α 鎖及び β 鎖を含む TCR を提示し、

40

50

前記改変リンパ球は、候補抗原配列を含むペプチドに結合したMHCを提示する抗原提示細胞を認識する、改変リンパ球。

【請求項7】

がんの治療に使用するための、請求項6に記載の改変リンパ球。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本発明は、2017年10月6日出願の米国仮特許出願62/569,215の優先権利益を主張するものであり、その全体は参照により組み込まれる。

【0002】

本明細書では、T細胞受容体認識がん特異的抗原、及び、抗原特異的細胞傷害活性を有するT細胞受容体改変T細胞、を同定するための方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

がん免疫療法は、患者自身の抗腫瘍免疫応答を増強することによってがんを治療する。とりわけ、免疫チェックポイント阻害薬の成功は、がん患者における抗がん免疫活性化の重要性を浮き彫りにした。とはいえ、抗免疫チェックポイント治療による臨床効果を示す患者は少数派であり、がん患者の70～80%は、このタイプの治療による効果を示していない、または、最小限の効果を示している。それゆえ、免疫療法に対する耐性のメカニズムを同定し、免疫応答を更に促進及び向上させるための方法を開発することが、重要かつ緊急である（参考文献1（その全体は参照により組み込まれる））。細胞傷害性Tリンパ球（CTL）はがん免疫療法において重要な役割を果たしているが、CTLのT細胞受容体（TCR）、ならびに、それらの標的であるがん特異的抗原の同定は、困難かつ時間を要するものである。

【発明の概要】

【0004】

本明細書では、TCR認識がん特異的抗原、及び、抗原特異的細胞傷害活性を有するTCR改変T細胞、を同定するための方法を提供する。

【0005】

本明細書の一部の実施形態では、（a）候補抗原配列を含む刺激ペプチドで標的リンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を刺激すること、（b）候補ペプチドに結合するT細胞受容体（TCR）で免疫活性化リンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を捕捉すること（上記捕捉することは、免疫活性化Tリンパ球を、候補抗原配列を含む捕捉用ペプチドに結合した主要組織適合遺伝子複合体（MHC）を提示する捕捉用試薬と接触させることを含む）、及び、（c）捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの全てまたは一部をシークエンスすること、を含む方法を提供する。

【0006】

一部の実施形態では、標的リンパ球は健康ドナーから得られる。一部の実施形態では、標的リンパ球はCD8+細胞傷害性Tリンパ球である。一部の実施形態では、刺激することはインビトロ（例えば、細胞培養液内）で実施される。

【0007】

一部の実施形態では、候補抗原配列を含むペプチドは、オンコアンチゲン及びネオアンチゲンの全てまたはフラグメントである。一部の実施形態では、候補抗原配列は、オンコアンチゲン及びネオアンチゲンの全てまたはフラグメントである。

【0008】

一部の実施形態では、捕捉用試薬はMHC多量体である。一部の実施形態では、MHC多量体はMHCデキストラマーである。

【0009】

一部の実施形態では、シークエンスすることは次世代シーケンシング法を含む。一部

10

20

30

40

50

の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部はTCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部は、TCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖の1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部は、TCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖のCDR3を含む。

【0010】

一部の実施形態では、標的リンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）は標的リンパ球の集団であり、刺激ペプチドは、異なる候補抗原配列を含む刺激ペプチドの集団のうちの1つであり、上記捕捉することは、免疫活性化Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）の集団を、候補抗原配列を含む捕捉用ペプチドの集団に結合した主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を提示する捕捉用試薬と接触させることを含む。

10

【0011】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法により同定されたTCR認識がん特異的抗原（例えば、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、など）を提供する。

20

【0012】

本明細書の一部の実施形態では、(a) 候補抗原配列を含む刺激ペプチドで標的リンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を刺激すること、(b) 候補ペプチドに結合するT細胞受容体(TCR)で免疫活性化Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を捕捉すること（上記捕捉することは、免疫活性化Tリンパ球を、候補抗原配列を含む捕捉用ペプチドに結合した主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を提示する捕捉用試薬と接触させることを含む）、及び、(c) 捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの全てまたは一部をシークエンスすること、を含み、(d) 捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの全てまたは一部を提示する改変Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を作製すること（改変Tリンパ球は、候補抗原配列を含むペプチドに結合したMHCを提示する抗原提示細胞を認識する）、を更に含む、方法を提供する。

30

【0013】

一部の実施形態では、改変Tリンパ球はCD8+細胞傷害性Tリンパ球である。

【0014】

一部の実施形態では、捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの全てまたは一部を提示する改変Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を作製することは、(i) 捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの一部をコードする核酸配列をベクターにクローニングすること、(ii) ベクターを宿主Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）に導入すること、及び、(iii) 捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの一部が改変Tリンパ球上に発現及び提示されるような条件下で培養すること、を含む。一部の実施形態では、TCRの一部はTCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖を含む。一部の実施形態では、TCRの一部は、TCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖の1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部は、TCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖のCDR3を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部は、配列番号：45～132からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、改変Tリンパ球は、配列番号45及び46、47及び48、49及び50、51及び52、53及び54、55及び56、57及び

40

50

58、59及び60、61及び62、63及び64、65及び66、67及び68、69及び70、71及び72、73及び74、75及び76、77及び78、79及び80、81及び82、83及び84、85及び86、87及び88、89及び90、91及び92、93及び94、95及び96、97及び98、99及び100、101及び102、103及び104、105及び106、107及び108、109及び110、111及び112、113及び114、115及び116、117及び118、119及び120、121及び122、123及び124、125及び126、127及び128、129及び130、及び、131及び132、からなる群から選択されるアミノ酸配列ペアを含むα鎖及びβ鎖（例えば、CDR3）を含むTCRを提示する。一部の実施形態では、ベクターは、健康ドナー宿主に由来する宿主Tリンパ球に導入される。一部の実施形態では、ベクターは、改変Tリンパ球で治療されるがん患者に由来する宿主Tリンパ球に導入される。

10

【0015】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法により作製された改変Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を提供する。一部の実施形態では、改変Tリンパ球はCD8+細胞傷害性Tリンパ球である。

【0016】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書に記載の改変Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を対象に投与することを含む、対象内におけるがんを治療するための方法を提供する。

20

【0017】

本明細書の一部の実施形態では、（a）候補抗原配列を含む刺激ペプチドで標的リンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を刺激すること、（b）候補ペプチドに結合するT細胞受容体（TCR）で免疫活性化Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を捕捉すること（上記捕捉することは、免疫活性化Tリンパ球を、候補抗原配列を含む捕捉用ペプチドに結合した主要組織適合遺伝子複合体（MHC）を提示する捕捉用試薬と接触させることを含む）、及び、（c）捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの全てまたは一部をシークエンスすること、を含み、（d）捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの配列の全てまたは一部を含む治療抗体を作製すること、を更に含む、方法を提供する。一部の実施形態では、TCRの一部はTCR-α鎖及び／またはTCR-β鎖を含む。一部の実施形態では、TCRの一部は、TCR-α鎖及び／またはTCR-β鎖の1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部は、TCR-α鎖及び／またはTCR-β鎖のCDR3を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部は、配列番号：45～132からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、治療抗体は、配列番号45及び46、47及び48、49及び50、51及び52、53及び54、55及び56、57及び58、59及び60、61及び62、63及び64、65及び66、67及び68、69及び70、71及び72、73及び74、75及び76、77及び78、79及び80、81及び82、83及び84、85及び86、87及び88、89及び90、91及び92、93及び94、95及び96、97及び98、99及び100、101及び102、103及び104、105及び106、107及び108、109及び110、111及び112、113及び114、115及び116、117及び118、119及び120、121及び122、123及び124、125及び126、127及び128、129及び130、及び、131及び132、からなる群から選択されるアミノ酸配列ペアを含むCDR3を含む。一部の実施形態では、抗体は抗体フラグメントである。

30

40

【0018】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法により作製された抗体を提供する。一部の実施形態では、抗体は抗体フラグメントである。

【0019】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体を対象に投与することを含む、

50

対象内におけるがんを治療するための方法を提供する。

【0020】

本明細書の実施形態は、CD8+細胞傷害性リンパ球を、標的細胞として、及び／または、改変CD8+細胞傷害性リンパ球を作製するために、利用することについて記載している。しかしながら、本明細書の範囲内であるその他の実施形態では、本明細書に記載の標的細胞及び／または改変リンパ球は、代わりに、CD4+ヘルパーリンパ球、NK細胞、NKT細胞、B細胞、樹状細胞を、標的細胞として含んでいてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1A】FOX M1由来ペプチド特異的CTL及びUBE2T由来ペプチド特異的CTLの誘導を示す図である。FOX M1特異的ペプチドまたはUBE2T特異的ペプチドで刺激したC1R-A24細胞で曝露した場合にのみ、FOX M1特異的CTL及びUBE2T特異的CTLによるIFN- γ 産生を確認した。R/S比率はキラー細胞(CTL)／刺激因子(C1R-A24細胞)比率を示している。

10

【図1B】作製したCTLの細胞傷害活性を示す図である。FOX M1特異的CTLは、HLA-A*24:02陽性SW480細胞に対する有意な細胞殺傷効果を発揮したが、HLA-A*24:02陰性HCC1143細胞またはBT549細胞に対してはそうではなかった。両方のCTL(2×10⁵の細胞／ウェル)をがん細胞(2×10⁴の細胞／ウェル)と5時間共培養した。

【図1C】作製したCTLの細胞傷害活性を示す図である。UBE2T特異的CTLは、HLA-A*24:02陽性SW480細胞に対する有意な細胞殺傷効果を発揮したが、HLA-A*24:02陰性HCC1143細胞またはBT549細胞に対してはそうではなかった。両方のCTL(2×10⁵の細胞／ウェル)をがん細胞(2×10⁴の細胞／ウェル)と5時間共培養した。

20

【図2A】FOX M1に対するTCR改変T細胞及びUBE2Tに対するTCR改変T細胞の作製を示す図である。FOX M1特異的CTL及びUBE2T特異的CTLにおけるTCRA CDR3クロノタイプ及びTCRB CDR3クロノタイプの分布について、CDR3配列の円グラフで示している。黒色は、読み取り頻度が1%未満であるCDR3クロノタイプの一部を示している。この集団には、TCRA及びTCRBに対する1つの支配的なクロノタイプのみが含まれていた。

30

【図2B】FOX M1に対するTCR改変T細胞及びUBE2Tに対するTCR改変T細胞の作製を示す図である。CD8とTCR $\nu\beta$ 8 (FOX M1 TCR改変T細胞)、または、CD8とTCR $\nu\beta$ 13 (UBE2T TCR改変T細胞)に対する染色により、形質導入効率を確認した。フローサイトメトリー図は、FOX M1 TCR改変T細胞またはUBE2T TCR改変T細胞を示している。

【図3A】FOX M1に対するTCR改変T細胞の細胞傷害活性を示す図である。FOX M1に対するTCR改変T細胞は、HLA-A*24:02陽性SW480細胞に対する有意な細胞殺傷効果を発揮したが、HLA-A*24:02陰性HCC1143細胞に対してはそうではなかった。

【図3B】UBE2Tに対するTCR改変T細胞の細胞傷害活性を示す図である。UBE2Tに対するTCR改変T細胞は、HLA-A*24:02陽性SW480細胞に対する有意な細胞殺傷効果を発揮したが、HLA-A*24:02陰性HCC1143細胞に対してはそうではなかった。

40

【図3C】FOX M1に対するTCR改変T細胞の細胞傷害活性を示す図である。FOX M1 TCR改変T細胞と共培養した際のがん細胞生存率の時間経過である。両方のソー

トTCR改変T細胞(4×10⁵の細胞／ウェル)をがん細胞(2×10⁴の細胞／ウェル)と20時間共培養した。

【図3D】UBE2Tに対するTCR改変T細胞の細胞傷害活性を示す図である。UBE2T TCR改変T細胞と共培養した際のがん細胞生存率の時間経過である。両方のソー

トTCR改変T細胞(4×10⁵の細胞／ウェル)をがん細胞(2×10⁴の細胞／ウェル)と20時間共培養した。

50

ル)と20時間共培養した。

【図3E】FOX M1に対するTCR改変T細胞の細胞傷害活性を示す図である。ELISPOTアッセイにおいて、FOX M1特異的ペプチドを負荷した場合またはしなかった場合における、C1R-A24細胞で刺激したFOX M1に対するTCR改変T細胞の認識である。ソートTCR改変T細胞(5×10⁴の細胞/ウェル)をペプチド負荷刺激細胞(2×10⁴の細胞/ウェル)と、96ウェルプレート内、37℃で20時間共培養した。

【図3F】UBE2Tに対するTCR改変T細胞の細胞傷害活性を示す図である。ELISPOTアッセイにおいて、UBE2T特異的ペプチドを負荷した場合またはしなかった場合における、C1R-A24細胞で刺激したUBE2Tに対するTCR改変T細胞の認識である。ソートTCR改変T細胞(5×10⁴の細胞/ウェル)をペプチド負荷刺激細胞(2×10⁴の細胞/ウェル)と、96ウェルプレート内、37℃で20時間共培養した。

【図3G】FOX M1に対するTCR改変T細胞の細胞傷害活性を示す図である。がん細胞との共培養後0時間、2.5時間、及び、5時間における、オリジナルの特異的CTLまたはTCR改変T細胞から分泌されたグランザイムBのタンパク質レベル、及び、オリジナルの特異的CTLまたはTCR改変T細胞から分泌されたパーフォリンのタンパク質レベルである。

【図3H】UBE2Tに対するTCR改変T細胞の細胞傷害活性を示す図である。がん細胞との共培養後0時間、2.5時間、及び、5時間における、オリジナルの特異的CTLまたはTCR改変T細胞から分泌されたグランザイムBのタンパク質レベル、及び、オリジナルの特異的CTLまたはTCR改変T細胞から分泌されたパーフォリンのタンパク質レベルである。

【図4】がん細胞内におけるFOX M1タンパク質発現及びUBE2Tタンパク質発現を示す図である。HLA-A*24:02陽性または陰性がん細胞株内における内在性FOX M1タンパク質及び内在性UBE2Tタンパク質の発現について、ウェスタンブロット解析を用いて確認した。

【0022】

定義

本明細書で使用する専門用語は特定の実施形態を説明するためだけのものであり、本明細書に記載する実施形態の範囲を限定することを意図するものではない。特に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。しかしながら、矛盾が生じた場合には、本明細書(定義を含む)が優先される。それゆえ、本明細書に記載の実施形態に関しては以下の定義を適用する。

【0023】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈上特に明確に定めない限り、複数の指示対象を含む。それゆえ、例えば、「1つの 改変リンパ球」への言及は、1つまたは複数の改変リンパ球及び当業者に周知のその同等物などへの言及である。

【0024】

本明細書で使用する場合、用語「含む」及びその言語学上の変形形態は、追加の特徴(複数可)、要素(複数可)、方法の工程(複数可)などの存在を除外することなく、列挙した特徴(複数可)、要素(複数可)、方法の工程(複数可)などの存在を示す。逆に、用語「からなる」及びその言語学上の変形形態は、列挙した特徴(複数可)、要素(複数可)、方法の工程(複数可)などの存在を示し、通常は付随する不純物を除き、列挙していないあらゆる特徴(複数可)、要素(複数可)、方法の工程(複数可)などを除外する。語句「から本質的になる」は、列挙した特徴(複数可)、要素(複数可)、方法の工程(複数可)など、及び、本組成物、システムまたは方法の基本的な性質に実質的に影響を及ぼさない任意の追加の特徴(複数可)、要素(複数可)、方法の工程(複数可)などを

10

20

30

40

50

示す。本明細書の多くの実施形態はオープンな「含む」用語を使用して記載される。このような実施形態は、多数のクローズドな「からなる」及び／または「から本質的になる」実施形態を包含し、あるいは、このような用語を使用してクレームまたは記載され得る。

【0025】

本明細書で使用する場合、「免疫応答」とは、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、または、がん性もしくはその他の異常細胞への、選択的な標的化、結合、傷害、破壊、及び／または対象からの除去をもたらす、免疫系の細胞（例えば、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞、好中球など）と、これら細胞のいずれかまたは肝臓が産生する可溶性の巨大分子（抗体、サイトカイン及び補体を含む）の作用のことを意味する。本明細書の一部の実施形態は、対象内における免疫応答を引き起こしてがんを治療することを含む。

10

【0026】

本明細書で使用する場合、用語「免疫療法」とは、免疫応答を誘導、促進、抑制、または別の方法で調節することを含む方法により、疾患または症状を治療または予防することの意味する。本明細書の一部の実施形態は免疫療法を含む。

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「養子免疫療法」及び「養子細胞移入」とは、がんまたは感染症を治療するために免疫担当細胞（例えば、TCR改変Ｔ細胞）を移入することの意味する（June, C. H., ed., 2001, In: Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore; Vonderheide et al., 2003, Immun. Research 27: 1-15（その全体は参照により組み込まれる））。本明細書の一部の実施形態は養子免疫療法を含む。

20

【0028】

本明細書で使用する場合、用語「がんワクチン」とは、特定の免疫応答を誘発する組成物（例えば、腫瘍抗原）のことを意味する。応答は、がんワクチンを投与することにより、対象自身の免疫系によって誘発される。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「自然免疫細胞」とは、対象の免疫系に自然に存在する免疫細胞のことを意味する。例示としては、Ｔ細胞、NK細胞、NKT細胞、Ｂ細胞、及び、樹状細胞、が挙げられるがこれらに限定されない。本明細書の一部の実施形態は、本自然免疫細胞に対する対象内における応答を誘発することを含む。

30

【0030】

本明細書で使用する場合、用語「改変免疫細胞」とは、遺伝子組換えされた免疫細胞（例えば、Ｔ細胞、NK細胞、NKT細胞、Ｂ細胞、樹状細胞など）のことを意味する。本明細書の一部の実施形態は、改変免疫細胞を作製及び／または投与することを含む。

【0031】

本明細書で使用する場合、用語「Ｔ細胞受容体」（「TCR」）とは、抗原提示細胞の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）に結合した抗原フラグメントの認識を担う、Ｔ細胞（Ｔリンパ球）の表面上に存在する分子複合体のことを意味する。TCRと抗原ペプチドの間の結合は、比較的低い親和性の結合であり変性する、すなわち、多くのTCRが同一の抗原ペプチドを認識し、多くの抗原ペプチドが同一のTCRにより認識される。TCRは、２つの異なるタンパク質鎖で構成されるヘテロ二量体である。ヒトＴ細胞の９５％において、TCRは、アルファ（ α ）鎖とベータ（ β ）鎖（それぞれ、TRAとTRBがコードする）で構成されており、その一方で、Ｔ細胞の５％において、TCRは、ガンマ鎖とデルタ鎖（ γ/δ ）（それぞれ、TRGとTRDがコードする）で構成されている。TCRが抗原ペプチド及びMHCと結合すると、シグナル伝達を介してＴリンパ球が活性化される。本明細書の一部の実施形態は、改変TCRを作製すること、改変TCRを提示する細胞を調製すること、及び／または、がんを治療するために改変TCRを提示する細胞

40

50

を対象に投与すること、を含む。

【0032】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト白血球抗原」(「HLA」)とは、ヒトにおける主要組織適合遺伝子複合体(MHC)タンパク質、または、ヒトMHCタンパク質をコードする遺伝子複合体、のことを意味する。

【0033】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」とは、全抗体分子またはそのフラグメント(例えば、Fab、Fab'、及び、F(ab')₂などのフラグメント)のことを意味し、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などであってもよい。本明細書で使用する場合、抗体またはその他の要素が抗原またはエピトープを「特異的に認識する」またはそれらに「特異的に結合する」場合、抗体またはその他の要素は、タンパク質及び／または巨大分子の複合混合物内における抗原を優先的に認識し、抗原またはエピトープを提示しないその他の要素と比較して実質的により高い親和性で抗原またはエピトープに結合する。これに関連して、「実質的により高い親和性」とは、抗原またはエピトープの検出を可能とするのに十分に高い親和性のことを意味し、所望のアッセイまたは測定装置を使用した要素とは区別される。一般的には、少なくとも10⁷M⁻¹(例えば、>10⁷M⁻¹、>10⁸M⁻¹、>10⁹M⁻¹、>10¹⁰M⁻¹、>10¹¹M⁻¹、>10¹²M⁻¹、>10¹³M⁻¹など)の結合定数(K_a)を有する結合親和性のことを意味する。特定のこのような実施形態では、抗体は、異なる抗原がその特定のエピトープを含む限りにおいて異なる抗原に結合可能である。特定の例においては、例えば、異なる種由来の相同タンパク質は同一のエピトープを含んでいてもよい。本明細書の一部の実施形態は、オンコアンチゲン及び／またはネオアンチゲンに結合する抗体を作製及び／または投与することを含む。

【0034】

本明細書で使用する場合、用語「抗体フラグメント」とは、抗原結合領域または可変領域の少なくとも一部を含む、全長抗体の一部のことを意味する。抗体フラグメントとしては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、ディアボディ、及び、インタクト抗体の可変領域の少なくとも一部を保持するその他の抗体フラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134を参照されたい(その全体は参照により本明細書に組み込まれる)。特定の実施形態では、組換えDNA技術または化学的ポリペプチド合成で作製したインタクト抗体の酵素的または化学的な開裂(例えば、抗体のパパイン消化及びペプシン消化)により抗体フラグメントを作製する。例えば、「Fab」フラグメントは、1本の軽鎖ならびにCH1及び1本の重鎖の可変領域を含む。Fab分子の重鎖は別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。「Fab'」フラグメントは、1本の軽鎖、及び、CH1ドメインとCH2ドメインの間に延びる別の定常領域を含む1本の重鎖を含む。Fab'フラグメントの2本の重鎖間に鎖間ジスルフィド結合を形成して、「F(ab')₂」分子を形成してもよい。「Fv」フラグメントは重鎖と軽鎖の両方に由来する可変領域を含むが、定常領域を欠いている。一本鎖Fv(scFv)フラグメントは、フレキシブルリンカーにより連結して抗原結合領域を有する1本のポリペプチド鎖を形成する、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を含む。例示的な一本鎖抗体については、WO88/01649ならびに米国特許第4,946,778号及び第5,260,203号に詳細に記載されている(それら全体は参照により本明細書に組み込まれる)。特定の例においては、単一の可変領域(例えば、重鎖可変領域または軽鎖可変領域)は抗原を認識して結合する能力を有していてもよい。その他の抗体フラグメントについて当業者は理解している。本明細書の一部の実施形態は、オンコアンチゲン及び／またはネオアンチゲンに結合する抗体フラグメントを作製及び／または投与することを含む。

【0035】

本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」とは、同一エピトープに特異的に結合する抗体の実質的に均一な集団のメンバーである抗体のことを意味する。特定の实

施形態では、モノクローナル抗体はハイブリドーマにより分泌される。特定のこのような実施形態では、ハイブリドーマは、当業者に周知の特定の方法により作製される。例えば、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-499 (その全体は参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。特定の実施形態では、モノクローナル抗体は組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと)を使用して作製される。特定の実施形態では、モノクローナル抗体とは、ファージディスプレイライブラリから単離された抗体フラグメントのことを意味する。例えば、Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628;及びMarks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597 (それら全体は参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。修飾語「モノクローナル」とは、実質的に均一な抗体集団から得られた抗体の特性のことを示し、抗体を作製するための方法を特定の方法に限定するものではない。様々なその他のモノクローナル抗体作製技術については、例えば、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.) (その全体は参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。本明細書の一部の実施形態は、オンコアンチゲン及び／またはネオアンチゲンに結合するモノクローナル抗体を作製及び／または投与することを含む。

【0036】

用語「抗原結合部位」とは、抗原に特異的に結合可能な抗体の一部のことを意味する。特定の実施形態では、抗原結合部位は、1つまたは複数の抗体可変領域により提供される。

【0037】

用語「エピトープ」とは、免疫グロブリンまたはT細胞もしくはB細胞受容体に特異的に結合可能な任意のポリペプチド決定基のことを意味する。特定の実施形態では、エピトープとは、抗体が特異的に結合する抗原の領域のことである。特定の実施形態では、エピトープは、化学的に活性な表面分子群、例えば、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基またはスルホニル基などを含み得る。特定の実施形態では、エピトープは、特定の3次元構造特性(例えば、「立体構造」エピトープ)及び／または特定の荷電特性を有し得る。

【0038】

特定の抗体が両方のエピトープに特異的に結合する場合、エピトープは別のエピトープと「同一」と定義される。特定の実施形態では、異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドは、同一のエピトープを含み得る。特定の実施形態では、同一のエピトープは異なる一次アミノ酸配列を有し得る。異なる抗体が同一エピトープへの特異的結合において競合する場合、異なる抗体は同一エピトープに結合すると言われる。

【0039】

本明細書で使用する場合、用語「配列同一性」とは、2つのポリマー配列(例えば、ペプチド、ポリペプチド、核酸など)がモノマーサブユニットの同一配列組成を有する度合いのことを意味する。用語「配列類似性」とは、2つのポリマー配列(例えば、ペプチド、ポリペプチド、核酸など)が類似したポリマー配列を有する度合いのことを意味する。例えば、類似したアミノ酸とは、同一の生物物理特性を共有しファミリーに分類可能(上記を参照のこと)なアミノ酸のことである。「パーセント配列同一性」(または「パーセント配列類似性」)は、(1)比較窓(例えば、より長い配列の長さ、より短い配列の長さ、特定の窓など)にわたり2つの最適アライン配列を比較して、(2)同一(または類似)のモノマー(例えば、両方の配列に存在する同一のアミノ酸、両方の配列に存在する類似のアミノ酸)を含有する位置の数を同定してマッチ位置の数を得て、(3)マッチ位置の数を比較窓(例えば、より長い配列の長さ、より短い配列の長さ、特定の窓など)内における位置の総数で割り、(4)その結果に100を掛けてパーセント配列同一性またはパーセント配列類似性を得ること、により計算される。例えば、ペプチドAとBが両方とも20アミノ酸長であり、1つの位置以外全てにおいて同一アミノ酸を有する場合、ペプチドAとペプチドBは95%の配列同一性を有する。非同一位置におけるアミノ酸が同

10

20

30

40

50

一の生物物理特性を共有している（例えば、両方とも酸性である）場合、ペプチドAとペプチドBは100%の配列類似性を有する。別の例としては、ペプチドCが20アミノ酸長であり、ペプチドDが15アミノ酸長であり、ペプチドDにおける15のアミノ酸のうちの14がペプチドCの一部のアミノ酸と同一である場合、ペプチドCとDは70%の配列同一性を有するが、ペプチドDはペプチドCの最適比較窓に対して93.3%の配列同一性を有する。本明細書の「パーセント配列同一性」（または「パーセント配列類似性」）を計算する目的において、アライン配列における任意のギャップはその位置におけるミスマッチとして扱われる。一部の実施形態では、本明細書のペプチドまたはポリペプチドは、ベース配列に対する最低限の配列同一性を含む。

【0040】

用語「有効用量」または「有効量」とは、患者における症状の抑制をもたらす、または、所望の生物学的効果をもたらす、因子、例えば、抗体の量のことを意味する。特定の実施形態では、有効用量または有効量は、疾患または病態の症状を治療または抑制するのに十分である。

【0041】

本明細書で使用する場合、用語「投与」及び「投与すること」とは、対象、または、インビボ、インビトロもしくはエキスビボの細胞、組織及び器官に、薬物、プロドラッグもしくはその他の因子、または、治療薬を与える行為のことを意味する。人体への例示的な投与経路は、脳または脊髄のくも膜下の空間（硬膜内）、眼（点眼）、口腔（経口）、皮膚（局所または経皮）、鼻（経鼻）、肺（吸入）、口腔粘膜（頬側）、耳、直腸、膣、注射（例えば、静脈内、皮下、腫瘍内、腹腔内など）など、を介したものであってもよい。

【0042】

用語「治療」とは、特に明記しない限り、治療方法と予防（*prophylactic*）／予防（*preventative*）方法の両方を包含する。治療を必要とする個人としては、特定の症状を既に有している個人に加えて、特定の症状または疾患を被るリスクのある個人（例えば、年齢、性別、生活様式などに基づいた、遺伝的またはエピジェネティックな素因を有する個人）が挙げられるがこれらに限定されない。用語「治療すること」とは、治療目的及び／または予防／予防目的で薬剤を対象に投与することを意味する。

【0043】

「治療薬」とは、治療効果及び／または予防／予防効果をもたらすためにインビボで投与され得る薬剤のことを意味する。

【0044】

「治療抗体」とは、治療効果及び／または予防／予防効果をもたらすためにインビボで投与され得る抗体のことを意味する。

【0045】

本明細書で使用する場合、用語「同時投与」及び「同時投与すること」とは、少なくとも2種の薬剤（複数可）または治療薬を対象に投与することを意味する。一部の実施形態では、2種以上の薬剤または治療薬の同時投与は同時である。その他の実施形態では、第1の薬剤／治療薬は第2の薬剤／治療薬に先立って投与される。当業者は、使用する様々な薬剤または治療薬の配合及び／または投与経路が様々であり得るということを理解する。同時投与のための適切な用量については、当業者が容易に決定することができる。一部の実施形態では、薬剤または治療薬を同時投与する場合、それぞれの薬剤または治療薬は、それらを単独で投与する場合の適切な用量と比較してより少ない用量で投与される。それゆえ、同時投与は、薬剤または治療薬の同時投与が潜在的に有害（例えば、有毒）な薬剤（複数可）の必要な用量を低下させる実施形態、及び／または、2種以上の薬剤の同時投与が、薬剤のうちの一方の有益な効果がもう一方の薬剤の同時投与を介するように対象の感作をもたらす実施形態において、特に望ましい。

【0046】

本明細書で使用する場合、用語「医薬組成物」とは、活性剤（例えば、結合剤）と担体（不活性または活性）を組み合わせ、インビトロ、インビボまたはエキスビボにおける

10

20

30

40

50

診断用途または治療用途に特に好適な組成物を作製することを意味する。

【0047】

本明細書で使用する場合、用語「薬学的に許容される」または「薬理学的に許容される」とは、対象に投与する際に、有害反応、例えば、毒性反応、アレルギー性反応、または、免疫反応を実質的にもたらさない組成物のことを意味する。

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「薬学的に許容される担体」とは、リン酸緩衝生理食塩水、水、エマルジョン剤（例えば、油／水または水／油のエマルジョン剤など）、及び、様々なタイプの湿潤剤、全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、ラウリル硫酸ナトリウム、等張化剤及び吸収遅延剤、崩壊剤（例えば、ポテトスターチまたはデンプングリコール酸ナトリウム）などを含むがこれらに限定されない標準的な医薬品担体のうちのいずれかのことを意味する。組成物はまた、安定化剤及び防腐剤を含んでいてもよい。担体、安定化剤及び補助剤の例については、例えば、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975)（その全体は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0049】

本明細書で使用する場合、用語「健康ドナー」とは、任意の形態のがんを患っていない、及び／または、本明細書の実施形態に使用するその細胞／組織のがんの任意の徴候（例えば、がん形態、がんバイオマーカーなど）を示していないヒトなどの哺乳動物のことを意味する。

【発明を実施するための形態】

【0050】

本明細書では、TCR認識がん特異的抗原、及び、抗原特異的細胞傷害活性を有するTCR改変T細胞、を同定するための方法を提供する。

【0051】

腫瘍または血液循環中のがん特異的抗原（オンコアンチゲン及びネオアンチゲン）を認識する既存の細胞傷害性Tリンパ球（CTL）は、がん免疫療法に対する有益な臨床効果を得るために重要な役割を果たしている。例えば、体細胞変異の数が多くなるほど、高い細胞溶解活性を有するリンパ球が認識可能なより多数の免疫原性ネオアンチゲンが生成される可能性が高くなり得、リンパ球は免疫チェックポイント阻害薬により更に開放され得る（参照文献2～5（それら全体は参照により組み込まれる））。加えて、T細胞におけるプログラム死1（PD-1）と相互作用するプログラム死リガンド1（PD-L1）のがん細胞におけるより高い発現レベルが上方制御されるが、そのPD-L1は良好な臨床効果のためのバイオマーカーである（参照文献4、6～8（それら全体は参照により組み込まれる））。更に、養子腫瘍浸潤リンパ球（TIL）移入療法に反応を示す患者内におけるTILとしては、ネオアンチゲンとオンコアンチゲンの両方（共通抗原）を標的とするCTLが挙げられる（参照文献9（その全体は参照により組み込まれる））。

【0052】

CTL介在性抗腫瘍免疫応答を増強してがん免疫療法の臨床効果を更に向上させるために、本明細書の実施形態では、がん特異的抗原（オンコアンチゲン及びネオアンチゲン）をワクチンとして利用してがん患者内における抗原特異的CTLを活性化させる。オンコアンチゲンは、がん細胞内において高発現しているが正常器官（精巣または胎児器官を除く）内においては発現していない発がんタンパク質に由来する免疫原性ペプチドである（参照文献10（その全体は参照により組み込まれる））。オンコアンチゲンに由来する免疫原性ペプチドエピトープがオンコアンチゲン特異的CTLを誘導してがん患者の予後を改善するということが考えられている（参照文献11～13（それら全体は参照により組み込まれる））。ネオアンチゲンは、がん細胞内における非同義変異に由来する免疫原性ペプチドである（参照文献10（その全体は参照により組み込まれる））。ネオアンチゲン特異的T細胞が良好な臨床効果を示した一部のエビデンス（参照文献14～15（それ

ら全体は参照により組み込まれる))を考慮すると、ネオアンチゲンワクチンは、患者内における抗がん免疫応答を更に活性化させるための選択肢を提供する。しかしながら、ワクチン療法による十分な数の抗腫瘍T細胞の誘導が多くの場合非常に段階的にもたらされ数ヶ月間を要することから、このワクチンアプローチは、腫瘍負荷量の多い患者には役立たない。それゆえ、がん抗原特異的T細胞受容体(TCR)の同定、自家Tリンパ球を用いたTCR改変T細胞の作製、及び、このような遺伝子組換えT細胞の注入(抗免疫チェックポイント抗体を伴う／伴わない)は、通常は宿主免疫系が著しく抑制されている進行腫瘍を有する患者に魅力的な選択肢を提供する。オンコアンチゲン／ネオアンチゲン特異的TCR改変T細胞が大きなサイズの固形がんにおいても有効であるという有望な結果を、前臨床研究及び最近の臨床試験が示している(参照文献16～18(それら全体は参照により組み込まれる))。本明細書では、ネオアンチゲンを認識するTCR配列を同定するための迅速なスクリーニング法、及び、その方法による個別化TCR改変T細胞治療薬の迅速な調製を提供する。

【0053】

本明細書の実施形態の開発中に実験を実施して、オンコアンチゲン／ネオアンチゲン特異的TCRを検出するための迅速なスクリーニング法を確立した。候補ペプチドで健康ドナー由来CD8+Tリンパ球のインビトロ刺激を行った後、それぞれのペプチドを含むHLAクラスIデキストラマーを使用してCD8+T細胞をソートし、これらの細胞のTCR配列を同定した。エピトープペプチドの刺激により固有T細胞のモノクローン性増殖またはオリゴクローン性増殖を達成した。TCR cDNAをクローニングしてTCR改変T細胞を作製した。このアプローチにより2種の抗原特異的CD8+T細胞クローンを作製したが、FOX M1とUBE2Tに由来するオンコアンチゲンを認識する2種のT細胞クローンにより、標的タンパク質を発現するHLAマッチがん細胞に対する(HLA非マッチがん細胞に対してではなく)強い細胞傷害活性が明らかとなった。本明細書に記載の方法は、抗原ペプチドの取得後におけるTCR認識がん特異的抗原の迅速な同定を可能とする。本アプローチは、がんを治療するための個別化T細胞免疫療法薬の迅速な開発を可能とする。本明細書では、T細胞のインビトロネオアンチゲン刺激とデキストラマーソーティングを一元化することによってTCR認識がん特異的抗原を同定するためのパイプラインに加え、抗原特異的細胞傷害活性を有するTCR改変T細胞を作製するための次世代シーケンサーを使用したTCRシーケンスを提供する。

【0054】

推定上のオンコアンチゲン／ネオアンチゲン由来ペプチドをスクリーニングして健康ドナーの末梢血単核球(PBMC)から特定のT細胞を誘導することによってパイプラインを開発するための実験を本明細書の実施形態の開発中に実施し、抗原特異的TCR改変T細胞についても作製した。このパイプラインにより、免疫原性オンコアンチゲン／ネオアンチゲン由来ペプチドががんワクチンに有用であると同定され、HLAマッチがん細胞に対する細胞傷害活性を観察するための抗原特異的TCR改変T細胞の作製につながる、オンコアンチゲン／ネオアンチゲン特異的TCRが同定された。

【0055】

CTLががん患者のPBMCに由来する異なるT細胞レパートリーを有することから、健康ドナー由来のPBMCは、PBMCの供給源として、オンコアンチゲン／ネオアンチゲン特異的CTLの候補の検出を可能とする。健康ドナーから得られたT細胞は、ネオアンチゲン特異的T細胞の反応性を広げ、患者自身の免疫系が認識してこなかったネオアンチゲンの標的化を可能とする(参照文献30(その全体は参照により組み込まれる))。一部の実施形態では、TCR認識がん特異的抗原の同定後、患者由来の自家T細胞からTCR改変T細胞を作製して養子細胞移入療法薬として注入する。

【0056】

本明細書に記載の方法を使用して、HLA-A*24:02陽性健康ドナーに由来するPBMCを使用して作製されたTCR改変T細胞は、HLA-A*24:02拘束性ペプチドのみを認識し、HLA-A*24:02マッチがん細胞に対する有意な細胞傷害活性

10

20

30

40

50

を示した。自家PBM Cを使用したHLA-A*02:01拘束性NY-ESO-1由来ペプチドを標的とするTCR改変T細胞が、骨髄腫患者における有望な臨床効果を示したこと（参照文献21（その全体は参照により組み込まれる））を考慮すると、本明細書の健康ドナーに由来するTCR改変T細胞がまた、HLA-Aマッチがん細胞に対する細胞傷害活性を発揮することは注目に値する。これらの結果は、例えば、患者由来の自家T細胞を得ることが不可能な状況において、健康ドナーに由来するTCR改変T細胞を調製する可能性を示している。

【0057】

本明細書に記載のパイプラインは、オンコアンチゲンとネオアンチゲンの両方に対応した個別化免疫療法薬を提供する。多くのタイプのがんにおいて一部のオンコアンチゲンが頻繁に過剰発現していることを考慮すると、オンコアンチゲンを標的とするTCR改変T細胞治療薬は、特異的なオンコアンチゲンを認識する同定TCRが同一HLA遺伝子型を有する患者に対する広範な有用性を有していることから、合理的である。例えば、腫瘍組織内におけるFOX M1またはUBE2 Tの高発現は、乳癌、結腸癌、及び、前立腺癌を有する患者の低生存率と相関していた（参照文献31～34（その全体は参照により組み込まれる））。それゆえ、一部の実施形態では、本明細書に記載のFOX M1特異的TCR改変T細胞及びUBE2 T特異的TCR改変T細胞は、養子移入療法に有用である。キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法及びTCR改変T細胞療法の臨床効果が現時点で血液悪性腫瘍に限定されていること（参照文献35～36（それら全体は参照により組み込まれる））を考慮すると、オンコアンチゲン特異的TCR改変T細胞用に本明細書で提供するパイプラインは、固形腫瘍用の別の養子細胞移入療法薬を提供する。対照的に、ネオアンチゲンは、がん細胞により特異的であり、ネオアンチゲンの提示ががん細胞の体細胞変異に依存してはいるが、魅力的な免疫標的とみなされている。ネオアンチゲン特異的TILの移入療法が既に、黒色腫だけではなく固形腫瘍に対する有望な臨床結果を示していること（参照文献14～15（それら全体は参照により組み込まれる））を考慮すると、本明細書に記載のネオアンチゲン用TCR改変T細胞は、臨床現場における治療薬を提供する。

【0058】

本明細書の一部の実施形態では、候補抗原配列を含む刺激ペプチドで標的リンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を刺激することを含む、免疫活性化TCRの配列を同定するための方法を提供する。一部の実施形態では、刺激ペプチドは、がん及び／または腫瘍細胞上に発現しているタンパク質のフラグメントである。一部の実施形態では、刺激ペプチドは、がん特異的抗原及び／または腫瘍特異的抗原のフラグメントである。一部の実施形態では、標的Tリンパ球は、任意の好適な供給源（例えば、ドナー、細胞培養液など）から得られる。一部の実施形態では、標的Tリンパ球は健康ドナーから得られる。一部の実施形態では、標的Tリンパ球はCD8+細胞傷害性Tリンパ球である。一部の実施形態では、刺激することはインビトロ（例えば、細胞培養液内）で実施される。一部の実施形態では、細胞培養液のタイプは、標的Tリンパ球のタイプに応じて決定される。Tリンパ球を培養するための好適な条件及び方法、ならびに、刺激ペプチドでTリンパ球を刺激するための好適な条件及び方法については、当分野において理解されている。

【0059】

一部の実施形態では、標的Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）は標的Tリンパ球の集団であり、刺激ペプチドは、異なる候補抗原配列を含む刺激ペプチドの集団のうちの1つであり、上記捕捉することは、免疫活性化Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）の集団を、候補抗原配列を含む捕捉用ペプチドの集団に結合した主要組織適合遺伝子複合体（MHC）を提示する捕捉用試薬と接触させることを含む。

【0060】

一部の実施形態では、標的リンパ球は、CD8+細胞傷害性リンパ球、CD4+ヘルパーリンパ球、NK細胞、NKT細胞、B細胞、樹状細胞などである。

【0061】

一部の実施形態では、候補抗原配列を含む刺激ペプチドは、オンコアンチゲン及びネオアンチゲンの全てまたはフラグメントである。一部の実施形態では、候補抗原配列は、オンコアンチゲン及びネオアンチゲンの全てまたはフラグメントである。一部の実施形態では、刺激ペプチドはランダムアミノ酸配列を含み、本明細書の方法は、免疫応答を誘発可能なペプチドの同定を可能とする。一部の実施形態では、刺激ペプチドは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：19、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34、配列番号：35、配列番号：36、配列番号：37、配列番号：38、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41、配列番号：42、配列番号：43、配列番号：44、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0062】

一部の実施形態では、刺激ペプチドで標的Tリンパ球を刺激した後、刺激ペプチドに結合するT細胞受容体（TCR）で免疫活性化Tリンパ球（例えば、CD8+細胞傷害性Tリンパ球）を捕捉する。一部の実施形態では、捕捉することは、免疫活性化Tリンパ球を、候補抗原配列を含む捕捉用ペプチドに結合した主要組織適合遺伝子複合体（MHC）を提示する捕捉用試薬と接触させることを含む。一部の実施形態では、捕捉用試薬は、1つまたは複数の刺激ペプチドの配列を含むペプチドを提示する。一部の実施形態では、ペプチドは、MHC I 複合体に結合した形態でTリンパ球に付加される。一部の実施形態では、捕捉用試薬はMHC多量体である。一部の実施形態では、MHC多量体はMHCデキストラマーである。例えば、ペプチドは、MHCデキストラマーに結合したTリンパ球に提示されていてもよい。一部の実施形態では、MHCデキストラマーは、デキストロース主鎖に結合した蛍光標識MHC多量体である。多重結合MHC構造体の使用には、多数のペプチド複製を提示することにより捕捉潜在能を向上させるという利点がある。

【0063】

一部の実施形態では、免疫活性化Tリンパ球の捕捉後、捕捉した免疫活性化Tリンパ球のTCRの全てまたは一部をシークエンスする。一部の実施形態では、シークエンスすることは次世代シーケンシング法を含む。次世代シーケンシング法については以下でより詳細に説明する。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部はTCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部は、TCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖の1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたTCRの一部は、TCR- α 鎖及び／またはTCR- β 鎖のCDR3を含む。

【0064】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書に記載の方法により同定されたTCR認識がん特異的抗原（例えば、配列番号：1、配列番号：2など）を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法により同定されたがん特異的抗原は、治療薬、例えば、がんワクチンなどとして採用される。がんワクチンの送達システムとしては、例えば、リポソーム、コレステロール、コレステロールヘミサクシネートもしくは α -トコフェロール（例えば、ビタミンE）から作製されたシステム、または、改変または合成ネオアンチゲンを結合または挿入可能なその他の両親媒性分子、を挙げてもよい。一部の実施形態では、がんワクチンは、本明細書に記載の方法の変形例により同定されたがん特異的抗原を含む。一部の実施形態では、がん特異的抗原は融合ペプチドとして提供される。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法により同定された多数の配列を組み込む。一部の実施形態では、がんワクチンに使用されるペプチドは、10～80アミノ酸長（例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、または、それらの間の範囲）である。

【0065】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書に記載の T C R 認識がん特異的抗原に結合する治療抗体を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載の治療抗体は抗体フラグメントである。がんの治療に使用する抗体及び抗体フラグメントについては、当分野において十分に理解されている。一部の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗体はヒト化抗体である。一部の実施形態では、治療抗体は、配列番号：1～44からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む抗原に結合する。一部の実施形態では、治療抗体は、配列番号：45及び46、47及び48、49及び50、51及び52、53及び54、55及び56、57及び58、59及び60、61及び62、63及び64、65及び66、67及び68、69及び70、71及び72、73及び74、75及び76、77及び78、79及び80、81及び82、83及び84、85及び86、87及び88、89及び90、91及び92、93及び94、95及び96、97及び98、99及び100、101及び102、103及び104、105及び106、107及び108、109及び110、111及び112、113及び114、115及び116、117及び118、119及び120、121及び122、123及び124、125及び126、127及び128、129及び130、及び、131及び132、からなる群から選択されるアミノ酸配列のペアを含む C D R 3 配列を含む。

【0066】

本明細書の一部の実施形態では、捕捉した免疫活性化 T リンパ球の T C R の全てまたは一部を提示する改変 T リンパ球（例えば、C D 8 + 細胞傷害性 T リンパ球）を作製するための方法（改変 T リンパ球は、候補抗原配列を含むペプチドに結合した M H C を提示する抗原提示細胞を認識する）を提供する。一部の実施形態では、改変リンパ球は、C D 8 + 細胞傷害性リンパ球、C D 4 + ヘルパーリンパ球、N K 細胞、N K T 細胞、B 細胞、樹状細胞などである。一部の実施形態では、免疫活性化 T リンパ球の T C R 配列を使用して、標的オンコアンチゲンまたはネオアンチゲンを認識する T C R をコードする核酸及び／またはベクターを調製する。一部の実施形態では、このような核酸及び／またはベクターを、T リンパ球に形質転換、トランスフェクション、及び／または、別の方法で配置して、改変 T リンパ球を作製する。このような目的のための核酸、ベクター、及び、方法は当分野において周知であり、本明細書に記載されている。一部の実施形態では、改変 T リンパ球は C D 8 + 細胞傷害性 T リンパ球である。一部の実施形態では、捕捉した免疫活性化 T リンパ球の T C R の全てまたは一部を提示する改変 T リンパ球（例えば、C D 8 + 細胞傷害性 T リンパ球）を作製することは、（i）捕捉した免疫活性化 T リンパ球の T C R の一部をコードする核酸配列をベクターにクローニングすること、（i i）ベクターを宿主 T リンパ球（例えば、C D 8 + 細胞傷害性 T リンパ球）に導入すること、及び、（i i i）捕捉した免疫活性化 T リンパ球の T C R の一部が改変 T リンパ球上に発現及び提示されるような条件下で培養すること、を含む。一部の実施形態では、T C R の一部は T C R - α 鎖及び／または T C R - β 鎖を含む。一部の実施形態では、T C R の一部は、T C R - α 鎖及び／または T C R - β 鎖の1つまたは複数の相補性決定領域（C D R）を含む。一部の実施形態では、シークエンスした T C R の一部は、T C R - α 鎖及び／または T C R - β 鎖の C D R 3 を含む。一部の実施形態では、シークエンスした T C R の一部は、配列番号：45～132からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、改変 T リンパ球は、配列番号：45及び46、47及び48、49及び50、51及び52、53及び54、55及び56、57及び58、59及び60、61及び62、63及び64、65及び66、67及び68、69及び70、71及び72、73及び74、75及び76、77及び78、79及び80、81及び82、83及び84、85及び86、87及び88、89及び90、91及び92、93及び94、95及び96、97及び98、99及び100、101及び102、103及び104、105及び106、107及び108、109及び110、111及び112、113及び114、115及び116、117及び118、119及び120、121及び122、123及び124、125及び126、127及び128、129及び130、及び、131及び132、からなる群から選択されるアミノ酸配列ペアを含む α 鎖と β 鎖を含む T C R を提示する。一部

10

20

30

40

50

の実施形態では、ベクターは、健康ドナー宿主に由来する宿主Ｔリンパ球に導入される。一部の実施形態では、ベクターは、改変Ｔリンパ球で治療されるがん患者に由来する宿主Ｔリンパ球に導入される。

【００６７】

本明細書の一部の実施形態では、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）を含む改変Ｔリンパ球（例えば、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球）を作製するための方法（ＣＡＲは、候補抗原配列を含むペプチドに結合したＭＨＣを提示する抗原提示細胞を認識する）を提供する。特定の実施形態では、抗原結合ドメインは、所望の抗原に特異的に結合する重鎖可変領域と軽鎖可変領域（例えば、本明細書に記載の方法により同定された可変領域）を含有する一本鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）である。一部の実施形態では、ＣＡＲは、膜貫通ドメイン（例えば、Ｔ細胞膜貫通ドメイン（例えば、ＣＤ２８膜貫通ドメイン））、及び、１つまたは複数の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）を含むシグナル伝達ドメイン（例えば、Ｔ細胞受容体シグナル伝達ドメイン（例えば、ＴＣＲζ鎖））、を更に含む。一部の実施形態では、ＣＡＲは、１つまたは複数の共刺激ドメイン（例えば、Ｔ細胞活性化を刺激するための第２のシグナルをもたすドメイン）を含む。本発明はこのタイプの共刺激ドメインに限定されない。一部の実施形態では、改変リンパ球は、ＣＤ８＋細胞傷害性リンパ球、ＣＤ４＋ヘルパーリンパ球、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、樹状細胞などである。一部の実施形態では、免疫活性化Ｔリンパ球のＴＣＲ配列を使用して、標的オンコアンチゲンまたはネオアンチゲンを認識するＣＡＲを調製する。一部の実施形態では、このようなＣＡＲをコードする核酸及び／またはベクターを、Ｔ細胞に形質転換またはトランスフェクション、及び／または、ＣＡＲを別の方法でＴリンパ球に配置して、改変Ｔリンパ球を作製する。このような目的のための核酸、ベクター、及び、方法は当分野において周知であり、本明細書に記載されている。一部の実施形態では、改変Ｔリンパ球はＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球である。一部の実施形態では、ＣＡＲは、本明細書に記載の方法により同定されたＴＣＲ－α鎖及び／またはＴＣＲ－β鎖の配列を含む抗原結合領域を含む。一部の実施形態では、ＣＡＲは、ＴＣＲ－α鎖及び／またはＴＣＲ－β鎖の１つまたは複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたＴＣＲの一部は、ＴＣＲ－α鎖及び／またはＴＣＲ－β鎖のＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、シークエンスしたＴＣＲの一部は、配列番号：４５～１３２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、改変Ｔリンパ球は、配列番号：４５及び４６、４７及び４８、４９及び５０、５１及び５２、５３及び５４、５５及び５６、５７及び５８、５９及び６０、６１及び６２、６３及び６４、６５及び６６、６７及び６８、６９及び７０、７１及び７２、７３及び７４、７５及び７６、７７及び７８、７９及び８０、８１及び８２、８３及び８４、８５及び８６、８７及び８８、８９及び９０、９１及び９２、９３及び９４、９５及び９６、９７及び９８、９９及び１００、１０１及び１０２、１０３及び１０４、１０５及び１０６、１０７及び１０８、１０９及び１１０、１１１及び１１２、１１３及び１１４、１１５及び１１６、１１７及び１１８、１１９及び１２０、１２１及び１２２、１２３及び１２４、１２５及び１２６、１２７及び１２８、１２９及び１３０、及び、１３１及び１３２、からなる群から選択されるアミノ酸配列ペアを含むα鎖とβ鎖を含むＴＣＲを提示する。一部の実施形態では、ベクターは、健康ドナー宿主に由来する宿主Ｔリンパ球に導入される。一部の実施形態では、ベクターは、改変Ｔリンパ球で治療されるがん患者に由来する宿主Ｔリンパ球に導入される。

【００６８】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、改変リンパ球、例えば、ＣＤ４＋ヘルパーリンパ球、ＮＫ細胞、ＮＫＴ細胞、Ｂ細胞、樹状細胞などを作製することに適用できる。

【００６９】

一部の実施形態では、核酸（例えば、ＴＣＲ ｃＤＮＡ）をシークエンスする。多くの技術を用いて核酸分子を配列解析してもよい。解析により、核酸の全てまたは一部の配列

10

20

30

40

50

を同定してもよい。核酸シーケンシング法の例示的な非限定例としては、チェーンターミネーター（サンガー）シーケンシング法、及び、ダイターミネーターシーケンシング法、ならびに、「次世代」シーケンシング法、が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、シーケンシング前にRNAをcDNAに逆転写する。

【0070】

蛍光ベースのシーケンシング法を含む多くのDNAシーケンシング法は当該技術分野において周知である（例えば、Birren et al., Genome Analysis: Analyzing DNA, 1, Cold Spring Harbor, N. Y.（その全体は参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。一部の実施形態では、当該技術分野において理解されている自動化シーケンシング法を利用する。一部の実施形態では、本システム、デバイス及び方法は、分割したアンプリコンの並列シーケンシングを採用している（Kevin McKernan et al. のPCT公開第WO2006084132号（その全体は参照により本明細書に組み込まれる））。一部の実施形態では、DNAシーケンシングは並列オリゴヌクレオチド伸長により達成される（例えば、Macevicz et al. の米国特許第5,750,341号及びMacevicz et al. の米国特許第6,306,597号（その両方はそれら全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。シーケンシング技術の別の例としては、Church polony法（Mitra et al., 2003, Analytical Biochemistry 320, 55-65; Shendure et al., 2005 Science 309, 1728-1732; 米国特許第6,432,360号、米国特許第6,485,944号、米国特許第6,511,803号（それら全体は参照により本明細書に組み込まれる））、454ピコタイターパイロシーケンシング法（Margulies et al., 2005 Nature 437, 376-380; US20050130173（それら全体は参照により本明細書に組み込まれる））、Solexa一塩基付加法（Bennett et al., 2005, Pharmacogenomics, 6, 373-382; 米国特許第6,787,308号; 米国特許第6,833,246号（それら全体は参照により本明細書に組み込まれる））、Lynx超並列シグネチャーシーケンシング法（Brenner et al. (2000). Nat. Biotechnol. 18:630-634; 米国特許第5,695,934号; 米国特許第5,714,330号（それら全体は参照により本明細書に組み込まれる））、Adessi PCRコロニー法（Adessi et al. (2000). Nucleic Acid Res. 28, E87; WO00018957（その全体は参照により本明細書に組み込まれる））、及び、好適な組み合わせまたはその代替法、が挙げられる。

【0071】

「次世代シーケンシング」法と呼ばれる一式の方法は、サンガー及びダイターミネーターシーケンシング法（Voelkerding et al., Clinical Chem., 55:641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7:287-296（それぞれはそれら全体が参照により本明細書に組み込まれる））に代わる選択肢として登場した。次世代シーケンシング（NGS）法は、旧式のシーケンシング法と比較してより安価なコスト及びより速いスピードという目標において、超並列ハイスループット戦略の共通の特徴を共有している。NGS法は、鑄型増幅を必要とするNGS法とそれを必要としないNGS法に広く分類することができる。

【0072】

本明細書の実施形態に有用なシーケンシング法としては、例えば、Helicos True Single Molecule Sequencing (tSMS) (Harris T. D. et al. (2008) Science 320:106-109) が挙げられる。tSMS法では、約100~200ヌクレオチドのストランドへとDNA試料を切断し、それぞれのDNAストランドの3'末端にポリA配列を付加する。蛍光標識ア

デノシンヌクレオチドを付加することによりそれぞれのストランドを標識する。次に、DNAストランドをフローセルにハイブリダイズするが、そのフローセルは、フローセル表面に固定された数百万のオリゴ-T捕捉部位を含有している。鑄型の密度は約100百万鑄型/cm²であってもよい。次に、フローセルをシーケンサーに装填してから、フローセルの表面にレーザーを照射して、それぞれの鑄型の位置を明らかにする。フローセル表面上における鑄型の位置をCCDカメラでマッピングすることができる。次に、鑄型の蛍光標識を切断して洗浄除去する。シーケンシング反応は、DNAポリメラーゼと蛍光標識ヌクレオチドを導入することにより開始される。オリゴ-T核酸はプライマーとして機能する。ポリメラーゼにより、標識ヌクレオチドが鑄型直接的な方法でプライマーに組み込まれる。ポリメラーゼと非組み込みヌクレオチドを除去する。フローセル表面をイメージングすることにより、蛍光標識ヌクレオチドが直接組み込まれた鑄型を検出する。イメージング後、切断工程により蛍光標識を除去し、所望のリード長が得られるまで、その他の蛍光標識ヌクレオチドを用いてそのプロセスを繰り返す。それぞれのヌクレオチド添加工程において配列情報を収集する。tSMSの更なる記述については、例えば、Lapidus et al. (米国特許第7, 169, 560号), Lapidus et al. (米国特許出願第2009/0191565号), Quake et al. (米国特許第6, 818, 395号), Harris (米国特許第7, 282, 337号), Quake et al. (米国特許出願第2002/0164629号), 及びBraslavsky, et al., PNAS (USA), 100:3960-3964 (2003) (そのそれぞれはそれら全体が参照により組み込まれる) に示されている。

【0073】

本明細書の実施形態に有用なDNAシーケンシング法の別の例は454シーケンシング(Roche) (Margulies, M et al. 2005, Nature, 437, 376-380 (その全体は参照により組み込まれる)) である。454シーケンシングには2つの工程が含まれている。第1の工程では、約300~800塩基対のフラグメントへとDNAをせん断し、それらフラグメントを平滑末端にする。次に、オリゴヌクレオチドアダプターをフラグメントの末端にライゲートする。アダプターは、フラグメントの増幅及びシーケンシングのためのプライマーとして機能する。例えば、5'-ビオチンタグを含有するAdaptor Bを使用して、フラグメントを、DNA捕捉用ビーズ、例えば、ストレプトアビジン被覆ビーズに結合する。ビーズに結合したフラグメントを油-水エマルションの液滴中でPCR増幅する。その結果、それぞれのビーズ上にクローン増幅されたDNAフラグメントの多数の複製がもたらされる。第2の工程では、ウェル(ピコリットルサイズ)内でビーズを捕捉する。それぞれのDNAフラグメントに対して並列的にパイロシーケンシングを実施する。1種または複数種のヌクレオチドの添加により生成された光シグナルをシーケンシング機器内のCCDカメラで記録する。シグナル強度は組み込まれたヌクレオチドの数に比例する。パイロシーケンシングは、ヌクレオチド添加により放出されるピロリン酸塩(PPi)を利用している。PPiは、アデノシン5'-ホスホ硫酸の存在下でATPスルフィラーゼにより、ATPへと変換される。ルシフェラーゼはルシフェリンをオキシルシフェリンへと変換するためにATPを使用しており、この反応により光が生成され、その光を検出及び解析する。

【0074】

本明細書の実施形態に有用なDNAシーケンシング法の別の例はSOLID法(Applied Biosystems)である。SOLIDシーケンシングでは、フラグメントへとゲノムDNAをせん断してから、フラグメントの5'末端と3'末端にアダプターを結合して、フラグメントライブラリを作製する。あるいは、フラグメントの5'末端と3'末端にアダプターをライゲートしてから、フラグメントを環化し、環化フラグメントを消化して内部アダプターを生成し、得られたフラグメントの5'末端と3'末端にアダプターを結合してメイトペアライブラリを作製することにより、内部アダプターを導入してもよい。次に、ビーズ、プライマー、鑄型及びPCR成分を含有するマイクロリアクター内でクローンビーズ集団を調製する。PCRに続いて、鑄型を変性させてから、ビーズを濃

縮して、伸長鑄型を有するビーズを分離する。選択したビーズ上の鑄型に、スライドガラスへの結合を可能とする3'修飾を施す。特定の蛍光体により同定される中央決定塩基（または一対の塩基）を用いた、部分的にランダムなオリゴヌクレオチドの連続的なハイブリダイゼーションとライゲーションにより、配列を同定してもよい。色を記録した後、ライゲートオリゴヌクレオチドを切断して除去してから、このプロセスを繰り返す。

【0075】

本明細書の実施形態に有用なDNAシーケンシング法の別の例は、Ion Torrentシーケンシング（米国特許出願第2009/0026082号、第2009/0127589号、第2010/0035252号、第2010/0137143号、第2010/0188073号、第2010/0197507号、第2010/0282617号、第2010/0300559号、第2010/0300895号、第2010/0301398号、及び、第2010/0304982号（それら全体は参照により組み込まれる））である。Ion Torrentシーケンシングでは、約300~800塩基対のフラグメントへとDNAをせん断し、それらフラグメントを平滑末端にする。次に、オリゴヌクレオチドアダプターをフラグメントの末端にライゲートする。アダプターは、フラグメントの増幅及びシーケンシングのためのプライマーとして機能する。フラグメントを表面に結合させてもよく、フラグメントを個々に解像できるような解像度で結合させる。1種または複数種のヌクレオチドの添加によりプロトン（H⁺）が放出されるが、そのシグナルをシーケンシング機器で検出及び記録する。シグナル強度は組み込まれたヌクレオチドの数に比例する。

【0076】

本明細書の実施形態に有用なDNAシーケンシング法の別の例はIlluminaシーケンシングである。Illuminaシーケンシングは、フォールドバックPCR及びアンカープライマーを用いた固体表面上でのDNA増幅に基づいている。ゲノムDNAをフラグメント化し、そのフラグメントの5'末端及び3'末端にアダプターを付加する。フローセルチャネル表面上に結合させたDNAフラグメントを、伸長及びブリッジ増幅させる。フラグメントを二本鎖にし、その二本鎖分子を変性させる。複数サイクルの固相増幅に続いて変性を行うことにより、それぞれのフローセルチャネル内に、同一鑄型から複製した約1,000個の一本鎖DNA分子からなる数百万ものクラスターを形成することができる。プライマー、DNAポリメラーゼ、及び、4色蛍光標識した可逆ターミネーターヌクレオチドを用いて、連続シーケンシングを行う。ヌクレオチドに組み込んだ後、レーザーを用いて蛍光体を励起させてから画像をキャプチャし、第1の塩基の識別を記録する。3'末端及び蛍光体をそれぞれの組み込み塩基から除去し、組み込み、検出、及び、同定からなる工程を繰り返す。

【0077】

本明細書の実施形態に有用なDNAシーケンシング法の別の例は、Pacific Biosciencesの一分子リアルタイム（SMRT）法である。SMRTでは、4つのDNA塩基のそれぞれを、4つの異なる蛍光色素のうちの1つに結合させる。これらの色素はリン酸に結合している。単一DNAポリメラーゼを、ゼロモード導波路（ZMW）の底部の鑄型一本鎖DNAの単一分子に固定する。ZMWとは、ZMWの内外に急速に（マイクロ秒で）拡散する蛍光ヌクレオチドのバックグラウンドを背景とした、DNAポリメラーゼによる単一ヌクレオチドの組み込みの観察を可能とする閉じ込め構造体のことである。ヌクレオチドを伸長ストランドへと組み込むには数ミリ秒を要する。この期間中に蛍光標識を励起して蛍光シグナルを生成してから、蛍光タグを切断除去する。色素の対応する蛍光の検出は、どの塩基が組み込まれたかを示している。このプロセスを繰り返す。

【0078】

本明細書の実施形態に有用なDNAシーケンシング法の別の例は、ナノポアシーケンシング（SonigvandMellerA.（2007）ClinChem53：1996-2001（その全体は参照により組み込まれる））を含む。ナノポアとは直径1ナノメートル程度の小さな孔のことである。導電性液体中にナノポアを浸漬させ

てその全体に電位を印加すると、ナノポアを通るイオンの伝導によるわずかな電流が生じる。流れる電流の量はナノポアのサイズの影響を受けやすい。DNA分子がナノポアを通過する際、DNA分子上のそれぞれのヌクレオチドが異なる度合いでナノポアを塞ぐ。その結果、DNA分子がナノポアを通過する際にナノポアを通過する電流の変化が、DNA配列の読み取りを表すことになる。

【0079】

本明細書の実施形態に有用なDNAシーケンシング法の別の例は、化学反応性電界効果トランジスタ (chemFET) アレイを使用してDNAをシーケンスすることを含む (例えば、米国特許出願公開第20090026082号 (その全体は参照により組み込まれる) に記載のとおり)。本方法の一実施例では、DNA分子を反応チャンバー内に入れてもよく、鑄型分子を、ポリマーゼに結合したシーケンシングプライマーにハイブリダイズしてもよい。シーケンシングプライマーの3'末端における新しい核酸ストランドへの1つまたは複数の三リン酸の組み込みを、chemFETを用いた電流の変化により検出してもよい。アレイは複数のchemFETセンサーを有していてもよい。別の例では、単一の核酸をビーズに結合させてもよく、その核酸をそのビーズ上で増幅させてもよく、それぞれのチャンバーがchemFETセンサーを有するchemFETアレイ上の個々の反応チャンバーに個々のビーズを移してもよく、核酸をシーケンスしてもよい。

【0080】

一部の実施形態では、当分野において理解されているその他のシーケンシング法 (例えば、NGS法)、または、上記方法の代替法もしくは組み合わせは、本明細書の実施形態に有用である。

【0081】

本明細書の特定の実施形態は、1種または複数種のバイオマーカーの検出 (例えば、免疫応答を検出及び/または定量するためのサイトカイン (例えば、IFN- γ) の検出) を含む。本方法の一部の実施形態では、本方法は、生体試料またはインビトロ培養物から1種または複数種のバイオマーカー (例えば、免疫応答を検出及び/または定量するためのサイトカイン (例えば、IFN- γ) の検出) を単離することを更に含む。一部の実施形態では、バイオマーカーに結合する試薬を提供する。このような試薬は、抗体、抗体フラグメント、アプタマーなどから選択される。

【0082】

一部の実施形態では、検出方法は、バイオマーカーレベルに対応した検出可能なシグナルを生成する酵素/基質の組み合わせ (例えば、ELISA、ウェスタンブロット、等電点電気泳動の技術を使用して) を含む。一般的に、酵素は、分光分析法、蛍光、及び、化学発光を含む様々な方法を使用して測定することができる発色基質の化学変化を触媒する。好適な酵素としては、例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRPO)、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及び、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなど、が挙げられる。一部の実施形態では、検出方法は、蛍光、化学発光、放射性核種の組み合わせ、または、測定可能なシグナルを生成する酵素/基質の組み合わせである。一部の実施形態では、多峰性シグナル伝達は、バイオマーカーアッセイフォーマットにおいて固有で優れた特徴を有している。

【0083】

一部の実施形態では、以下で説明する、シングルプレックスアプタマーアッセイ、マルチプレックスアプタマーアッセイ、シングルプレックスまたはマルチプレックスのイムノアッセイ、発現プロファイリング、質量分析法、組織学/細胞学的方法など、を含む任意の解析法を使用して、バイオマーカーの存在/レベルを検出する。

【0084】

一部の実施形態では、好適なイムノアッセイを使用してバイオマーカー（例えば、免疫応答を検出及び／または定量するためのサイトカイン（例えば、 $IFN-\gamma$ ）の検出）を検出／定量する。イムノアッセイ法は、抗体の対応する標的または検体に対する抗体の反応に基づいており、特定のアッセイフォーマットに応じて試料中の検体を検出することができる。免疫反応に基づいたアッセイ法の特異度及び感度を向上させるためには、モノクローナル抗体及びそのフラグメントの特異的なエピトープ認識ゆえに、モノクローナル抗体及びそのフラグメントを使用する場合が多い。モノクローナル抗体と比較したポリクローナル抗体の標的に対する高い親和性ゆえに、ポリクローナル抗体もまた様々なイムノアッセイに成功裏に使用されている。イムノアッセイは、広範囲の生体試料マトリックスと共に使用するように設計されている。イムノアッセイフォーマットは、定性的、半定量的及び定量的な結果を提供するように設計されている。

10

【0085】

多数のイムノアッセイフォーマットが設計されている。ELISAまたはEIAは、検体の検出において定量的であり得る。この方法は、検体または抗体のいずれかへの標識の結合に依存しており、標識構成要素は、直接または間接的のいずれかで酵素を含む。検体の直接的検出、間接的検出、競合検出、または、サンドイッチ検出用に、ELISA試験をフォーマットしてもよい。その他の方法は、標識、例えば、放射性同位体（ I^{125} ）または蛍光などに依存している。別の方法としては、例えば、凝集、比濁分析、濁度測定、ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫細胞化学、免疫組織化学、フローサイトメトリー、Luminexアッセイ、及び、その他、が挙げられる（ImmunoAssay: A Practical Guide, edited by Brian Law, published by Taylor & Francis, Ltd., 2005 edition（その全体は参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと）。

20

【0086】

例示的なアッセイフォーマットとしては、酵素免疫測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ、蛍光、化学発光、及び、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法または時間分解-FRET（TR-FRET）法、が挙げられる。バイオマーカーを検出するための方法の例としては、サイズとペプチドレベルの識別を可能とする、バイオマーカー免疫沈降に続いて定量を行う方法、例えば、ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、平面電気クロマトグラフィーなどが挙げられる。

30

【0087】

検出可能標識またはシグナル生成物質を検出及び／または定量するための方法は、標識の性質に依存している。適切な酵素（検出可能標識が酵素である場合（上記を参照のこと））が触媒する反応の産物は、限定するわけではないが、蛍光、発光または放射性であってもよく、あるいは、産物は、可視光線または紫外線を吸収してもよい。このような検出可能標識を検出するのに適した検出器の例としては、X線フィルム、放射能計数器、シンチレーション計数器、分光光度計、比色計、蛍光光度計、照度計、及び、濃度計、が挙げられるがこれらに限定されない。

【0088】

検出用の方法のいずれかを、反応物質の任意の好適な調製、加工及び解析を可能とする任意のフォーマットで実施してもよい。これは、例えば、マルチウェルアッセイプレート（例えば、96ウェルまたは384ウェル）であってもよく、あるいは、任意の好適なアレイまたはマイクロアレイを使用したものであってもよい。様々な薬剤用の原液を手動または機械的に調製してもよく、それに続く全てのピペッティング、希釈、混合、分配、洗浄、インキュベート、試料読み取り、データ収集、及び、解析を、市販の解析ソフトウェア、ロボット、及び、検出可能標識を検出可能な検出装置を使用して、機械的に実施してもよい。

40

【0089】

一部の実施形態では、本明細書の実施形態に使用する抗原ペプチド及びその配列は、がんマーカーまたは腫瘍細胞マーカーに由来している。このようなマーカーは、上皮増殖因

50

子受容体 (EGFR、EGFR1、ErbB-1、HER1)、ErbB-2 (HER2/neu)、ErbB-3/HER3、ErbB-4/HER4、EGFRリガンドファミリー；インスリン様増殖因子受容体 (IGFR) ファミリー、IGF結合タンパク質 (IGFBP)、IGFRリガンドファミリー (IGF-1R)；血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) ファミリー、PDGFRリガンドファミリー；線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) ファミリー、FGFRリガンドファミリー、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) ファミリー、VEGFファミリー；HGF受容体ファミリー：TRK受容体ファミリー；エフリン (EPH) 受容体ファミリー：AXL受容体ファミリー；白血球チロシンキナーゼ (LTK) 受容体ファミリー；TIE受容体ファミリー、アンジオポエチン1、2；受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 (ROR) 受容体ファミリー；ジスコイジンドメイン受容体 (DDR) ファミリー；RET受容体ファミリー；KLG受容体ファミリー；RYK受容体ファミリー；MUSK受容体ファミリー；トランスフォーミング増殖因子 α (TGF- α)、TGF- α 受容体；トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、TGF- β 受容体；インターロイキン β 受容体 α 2鎖 (IL13R α 2)、インターロイキン-6 (IL-6)、IL-6受容体、インターロイキン-4、IL-4受容体、サイトカイン受容体、クラスI (ヘマトポイエチンファミリー) 及びクラスII (インターフェロン/IL-10ファミリー) 受容体、腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリー、TNF- α 、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体スーパーファミリー (TNTRSF)、細胞死受容体ファミリー、TRAIL受容体；がん-精巢 (CT) 抗原、系統特異的抗原、分化抗原、 α -アクトニン-4、ARTC1、切断点クラスター領域-エーベルソン (Bcr-abl) 融合産物、B-Raf、カスパーゼ-5 (CASP-5)、カスパーゼ-8 (CASP-8)、 β -カテニン (CTNNB1)、細胞分裂周期27 (CDC27)、サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、CDKN2A、COA-1、dekan融合タンパク質、EFTUD-2、伸長因子2 (ELF2)、Ets変異遺伝子6/急性骨髄性白血病1遺伝子ETS (ETC6-AML1) 融合タンパク質、フィブロネクチン (FN)、GPNMB、低密度脂質受容体/GDP-Lフコース： β -Dガラクトース2- α -Lフコシルトランスフェラーゼ (LDLR/FUT) 融合タンパク質、HLA-A2、MLA-A11、熱ショックタンパク質70-2変異 (HSP70-2M)、KIAA0205、MART2、黒色腫腫瘍抗原1、2、3 (MUM-1、2、3)、前立腺酸ホスファターゼ (PAP)、neo-PAP、ミオシンクラス1、NFYC、OGT、OS-9、pml-RAR α 融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、K-ras (KRAS2)、N-ras (NRAS)、HRAS、RBAF600、SIRT12、SNRPD1、SYT-SSX1または-SSX2融合タンパク質、トリオースリン酸イソメラーゼ、BAGE、BAGE-1、BAGE-2、3、4、5、GAGE-1、2、3、4、5、6、7、8、GnT-V (異所性N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV、MGAT5)、HERV-K MEL、KK-LC、KM-HN-1、LAGE、LAGE-1、黒色腫上のCTL認識抗原 (ラクダ)、MAGE-A1 (MAGE-1)、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-AS、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-3、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C1、MAGE-C2、ムチン1 (MUC1)、MART-1/MLan-A (MLANA)、gp100、gp100/Pme117 (S1LV)、チロシンキナーゼ (TYR)、TRP-1、HAGE、NA-88、NY-ESO-1、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-1、2、3、4、TRP2-1NT2、がん胎児性抗原 (CEA)、カリクレイン4、マンマグロビン-A、OA1、前立腺特異的抗原 (PSA)、前立腺特異的膜抗原、TRP-1/75、TRP-2アディポフィリン、黒色腫には存在しないインターフェロン誘導性タンパク質2 (AIM-2)、BING-4、CPSF、サイクリンD1、上皮細胞接着分子 (Epcam)、EpbA3、線維芽細胞増殖因子-5 (FGF-5)、糖タンパク質250 (gp250)、腸内カルボキシルエステラーゼ (iCE)、 α -フェトプロテイン (AFP)、M-

10

20

30

40

50

CSF、mdm-2、MUCI、p53 (TP53)、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RNF43、RU2AS、SOX10、STEAP1、サバイビン (BIRC5)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT)、テロメラーゼ、ウィルムス腫瘍遺伝子 (WT1)、SYCP1、BRDT、SPANX、XAGE、ADAM2、PAGE-5、LIP1、CTAGE-1、CSAGE、MMA1、CAGE、BORIS、HOM-TEX-85、AF15q14、HCA66I、LDHC、MORC、SGY-1、SPO11、TPX1、NY-SAR-35、FTHLI7、NXF2 TDRD1、TEX15、FATE、TPTE、免疫グロブリンイデオタイプ、ベンスジョーンズタンパク質、エストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR)、CD40、CD30、CD20、CD19、CD33、CD4、CD25、CD3、がん抗原72-4 (CA72-4)、がん抗原15-3 (CA15-3)、がん抗原27-29 (CA27-29)、がん抗原125 (CA125)、がん抗原19-9 (CA19-9)、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、1-2ミクログロブリン、扁平上皮癌抗原、ニューロン特異的エノラーゼ、熱ショックタンパク質gp96、GM2、サルグラモスチム、CTLA-4、707アラニンプロリン (707-AP)、T細胞が認識する腺癌抗原4 (ART-4)、がん胎児性抗原ペプチド-1 (CAP-1)、カルシウム活性化クロライドチャネル-2 (CLCA2)、シクロフィリンB (Cyp-B)、ヒト印環腫瘍-2 (HST-2) など、を含むがこれらに限定されない群から選択されてもよい。一部の実施形態では、本明細書の実施形態に使用する抗原ペプチド及びその配列は、がん／腫瘍細胞に特異的な細胞表面マーカー、または、主にがん／腫瘍細胞上に提示された細胞表面マーカー（例えば、抗体及び／または免疫細胞により認識可能な）に由来している。

【0090】

本明細書の一部の実施形態では、免疫活性化TCRを発現するように改変されたTリンパ球を提供する。本明細書の一部の実施形態では、免疫活性化CARを発現するように改変されたTリンパ球を提供する。改変細胞は当該技術分野における任意の好適な方法を用いて作製されてもよい。一部の実施形態では、Tリンパ球は、本明細書に記載の方法（例えば、刺激、捕捉、シークエンス）により得られた免疫活性化TCRを発現／提示するように改変される。一部の実施形態では、Tリンパ球は、本明細書に記載の方法（例えば、刺激、捕捉、シークエンス）により得られた免疫活性化CARを発現／提示するように改変される。

【0091】

本明細書の一部の実施形態では、上記の免疫活性化TCR（または免疫活性化CAR）をコードする核酸及び核酸配列、ならびに、このような核酸を有する細胞を提供する。一部の実施形態では、核酸分子は組換え核酸分子である。一部の実施形態では、核酸分子は合成である。免疫活性化TCR及びその一部をコードする核酸は、DNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）、及び、そのハイブリッドを含んでもよい。

【0092】

一部の実施形態では、免疫活性化TCR及びその一部をコードする核酸は、1つまたは複数の調節配列を含む。例えば、本開示のポリヌクレオチドの誘導発現を可能とするプロモーター、転写エンハンサー及び／または配列を採用してもよい。一部の実施形態では、核酸分子は、細胞内における核酸分子の転写を可能とするキメラ遺伝子を含む適切なベクターにより転写される。

【0093】

一部の実施形態では、核酸分子は、上記の核酸分子のいずれかを単独または組み合わせで含む、組換えで作製されたキメラ核酸分子である。一部の実施形態では、核酸分子はベクターの一部である。

【0094】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書に記載の核酸分子（例えば、免疫活性化TCR及びその一部をコードする）を含むベクターを提供する。多くの好適なベクターが分子生物学の当業者に知られており、それらの選択は望まれる機能に依存し得るが、それらと

しては、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、及び、遺伝子組換えにおいて通常用いられているその他のベクター、が挙げられる。当業者に周知の方法を使用して様々なプラスミド及びベクターを構築してもよいが、例えば、Sambrook et al. (1989) and Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989), (1994) (その全体は参照により組み込まれる)に記載の方法を参照されたい。あるいは、標的細胞への送達用のリボソーム内に本開示のポリヌクレオチド及びベクターを再構成する。クローニングベクターを使用してDNAの個々の配列を単離してもよい。特定ポリペプチドの発現が必要な発現ベクター内に適切な配列を導入してもよい。標準的なクローニングベクターとしては、pBluescript SK、pGEM、pUC9、pBR322、及び、pGBT9、が挙げられる。標準的な発現ベクターとしては、pTRE、pCAL-n-EK、pESP-1、pOP13CAT、が挙げられる。

【0095】

一部の実施形態では、ベクターは、免疫活性化TCR及びその一部をコードする核酸配列に機能的に連結する調節配列である核酸配列を含む。このような調節配列（制御エレメント）は当業者に周知であり、プロモーター、スプライシングカセット、翻訳開始コドン、インサートをベクターに導入するための挿入部位、を含んでいてもよい。特定の実施形態では、核酸分子は、真核細胞または原核細胞内における発現を可能とする上記の発現制御配列に機能的に連結する。

【0096】

一部の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レンチウイルスベクターまたはアデノウイルス随伴ベクターなどである。

【0097】

一部の実施形態では、核酸及び／またはベクターを細胞内で使用して、コードポリペプチド（例えば、免疫活性化TCR及びその一部など）を細胞内で発現させる。本明細書に記載の免疫活性化TCRのいずれかをコードするDNA配列（複数可）を含有する核酸分子またはベクターを細胞に導入し、次いで、ポリペプチド（複数可）を産生させる。細胞への直接導入用、または、リボソームまたはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）を介した導入用に、列挙した核酸分子及びベクターを設計してもよい。

【0098】

本明細書では、上記に従い、本明細書に記載のポリペプチド配列（例えば、免疫活性化TCR及びその一部）をコードする核酸分子を含む、遺伝子組換えにおいて通常用いられているベクター、とりわけ、プラスミド、コスミド、ウイルス及びバクテリオファージを誘導するための方法を提供する。一部の実施形態では、ベクターは、発現ベクター及び／または遺伝子導入もしくは標的化ベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、または、ウシパピローマウイルスなどのウイルスから誘導される発現ベクターを、ポリヌクレオチド及び／またはベクターを標的細胞集団内に送達するために使用してもよい。当業者に周知の方法を使用して組換えベクターを構築してもよい。周知の方法を用いてベクターを宿主細胞に導入するが、それらの方法は細胞宿主のタイプによって様々である。

【0099】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書の上記で定義したベクター（例えば、本明細書に記載の免疫活性化TCRをコードする）を用いて形質転換またはトランスフェクションした宿主細胞を含む細胞を提供する。上記のベクターのうちの少なくとも1つまたは上記の核酸分子のうちの少なくとも1つを宿主細胞に導入することにより、宿主細胞を作製してもよい。少なくとも1つのベクターまたは少なくとも1つの核酸分子の宿主内における存在により、上記の免疫活性化TCR及びその一部をコードする遺伝子の発現が媒介され得る。宿主細胞に導入された核酸分子またはベクターは、宿主のゲノムに組み込まれるか、または、染色体外に保持されるか、のいずれかであり得る。

【0100】

本明細書の一部の実施形態では、本明細書の上記で定義した宿主細胞を核酸及び／またはベクターの導入を可能とする条件下で培養することを含む方法を提供する。本明細書の一部の実施形態では、本明細書の上記で定義した宿主細胞を構築物（例えば、免疫活性化TCRまたはその一部を含む）の発現を可能とする条件下で培養することを含む方法を提供する。特定の実施形態では、培養細胞を対象（例えば、そこからオリジナルの細胞を得た対象、第2の対象、など）に提供する。発現構築物を有する細胞を培養するための条件は、当該技術分野において周知である。

【0101】

一部の実施形態では、本明細書の実施形態に従い組換えを行うためのリンパ球は、任意の好適な供給源に由来する。例えば、リンパ球の供給源は対象（例えば、治療する対象、健康な対象、など）である。リンパ球は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、及び腫瘍を含む多数の供給源から得ることができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の実施形態において望ましい特定のタイプのリンパ球（例えば、細胞傷害性T細胞）は、適切な方法により得られる。一部の実施形態では、特定のマーカーを発現するリンパ球は周知の方法（例えば、セルソーティング）により得られる。一部の実施形態では、細胞は単離後に培養される。一部の実施形態では、細胞は本明細書に記載の方法を使用して改変される。

10

【0102】

一部の実施形態では、本明細書の組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチン、核酸分子、ベクターなど）は、標準的な送達システム及び方法を使用して、単独または任意の組み合わせのいずれかで投与されるが、少なくとも一部の態様では、薬学的に許容される担体または賦形剤と共に投与される。核酸分子またはベクターの場合、それらは対象のゲノムに安定的に組み込まれてもよい。

20

【0103】

一部の実施形態では、有効量の本明細書の組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチン、核酸分子、ベクター、など）（本明細書において検討される及び／または本明細書において検討されるプロセスにより作製される）を必要とする対象にそれらを投与する工程を含む、がんの予防、治療または改善に関連する方法及び組成物を提供する。細胞を投与する場合、改変細胞は、治療部位に投与されるか、または、治療部位（例えば、細胞タイプ、組織タイプ、など）に局在化し得るか、のいずれかである。

30

【0104】

本明細書に記載の組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法を用いて治療可能ながんの非限定例としては、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房、結腸、食道、胃腸、歯肉、頭部、腎臓、肝臓、肺、上咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、精巣、舌、または、子宮、に由来するがん細胞が挙げられるがこれらに限定されない。加えて、がんはとりわけ、以下の組織学的タイプ、腫瘍（悪性）；がん腫；がん腫（未分化）；巨大紡錘形細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛質癌；移行上皮癌；乳頭移行上皮癌；腺癌；ガストリノーマ（悪性）；胆管癌；肝細胞癌；肝細胞癌と胆管癌の複合体；索状腺癌；腺様嚢胞癌；腺腫性ポリープ内腺癌；腺癌、家族性大腸ポリポーシス；固形がん；カルチノイド腫瘍（悪性）；細気管支肺胞腺癌；乳頭腺癌；非染色性がん；好酸性がん；好酸性腺癌；好塩基性がん；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞腺癌；乳頭濾胞腺癌；非被包性硬化性がん；副腎皮質癌；類内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳垢腺癌；粘液性類表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭状嚢胞腺癌；乳頭状漿液嚢胞腺癌；粘液嚢胞腺癌；粘液腺癌；印環細胞癌；浸潤性管癌；髄様がん；小葉癌；炎症性がん；パジェット病（乳房）；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平上皮化生を伴う腺癌；胸腺腫（悪性）；卵巣間質腫瘍（悪性）；莢膜細胞腫（悪性）；顆粒膜細胞腫瘍（悪性）；男性胚細胞腫（悪性）；セルトリ細胞癌；ライディッヒ細胞腫瘍（悪性）；脂質細胞腫瘍（悪性）；傍神経節腫（悪性）；乳房外傍神経節腫（悪性）；褐色細胞腫；グロムス血管肉腫；悪性黒色腫；メラニン欠乏性黒色腫；表在拡大型黒色腫；巨大色素性母斑内

40

50

悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；青色母斑（悪性）；肉腫；線維肉腫；線維性組織球腫（悪性）；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；肺胞横紋筋肉腫；間質肉腫；混合腫瘍（悪性）；ミューラー混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；がん肉腫；間葉腫（悪性）；ブレンナー腫瘍（悪性）；葉状腫瘍（悪性）；滑膜肉腫；中皮腫（悪性）；未分化胚細胞腫；胎児性がん；奇形腫（悪性）；卵巢甲状腺腫（悪性）；絨毛癌；中腎腫（悪性）；血管肉腫；血管内皮腫（悪性）；カポジ肉腫；血管周囲細胞腫（悪性）；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；軟骨芽細胞腫（悪性）；間葉性軟骨肉腫；骨巨細胞腫；ユーイング肉腫；歯源性腫瘍（悪性）；エナメル上皮歯牙肉腫；エナメル上皮腫（悪性）；エナメル上皮線維肉腫；松果体腫（悪性）；脊索腫；神経膠腫（悪性）；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；原線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；膠芽腫；希突起膠腫；希突起膠芽腫；原始神経外胚葉性；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽細胞腫；網膜芽細胞腫；嗅神経原性腫瘍；髄膜腫（悪性）；神経線維肉腫；神経鞘腫（悪性）；顆粒細胞腫瘍（悪性）；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキンリンパ腫；側肉芽腫；悪性リンパ腫（小リンパ球性）；悪性リンパ腫（大細胞びまん性）；悪性リンパ腫（濾胞性）；菌状息肉腫；その他特定の非ホジキンリンパ腫；悪性組織球症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞性白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞性白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞性白血病；巨核芽球性白血病；骨髄性肉腫；及び、毛様細胞性白血病、であり得るが、これらに限定されない。一部の実施形態では、がんは、黒色腫（例えば、転移性悪性黒色腫）、腎臓癌（例えば、明細胞癌）、前立腺癌（例えば、ホルモン不応性前立腺癌）、膵臓癌（例えば、腺癌）、乳癌、結腸癌、胆嚢癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、肝臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、甲状腺癌、膠芽腫、神経膠腫、白血病、リンパ腫、及び、その他の腫瘍性悪性腫瘍、である。一部の実施形態では、がんは固形腫瘍がんである。

【0105】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は、がんを治療するための1種または複数種の同時治療薬と共に採用されている。一部の実施形態では、1種または複数種の化学療法薬及び／または免疫療法薬は、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法と共に、同時適用される。一部の実施形態では、1種または複数種の化学療法薬及び／または免疫療法薬は、（既知の）相乗作用を伴ってまたは伴わずに、同時治療薬として提供される。

【0106】

本開示は、その他の化合物、例えば、免疫細胞を介して作用する標的化毒素またはその他の遮断性もしくは機能性抗体もしくは化合物との同時投与プロトコルを更に包含する。同時投与用の臨床レジメンは、その他の成分の投与と同時、その前、または、その後の同時投与を包含していてもよい。別々の組み合わせ療法としては、化学療法、放射線、外科手術、ホルモン療法、または、その他のタイプの免疫療法、が挙げられる。現在多くの化学療法が当該技術分野において周知であり、本発明の化合物と組み合わせて使用することができる。一部の実施形態では、化学療法薬は、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、挿入性抗生物質、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、生物学的応答調節物質、抗ホルモン、血管新生阻害剤、及び、抗アンドロゲン剤、からなる群から選択される。

【0107】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は、1種または複数種の化学療法薬と共に同時適用される。本明細書における同時投与用の化学療法薬としては、全ての部類の化学療法薬、例えば、アルキル化剤、代謝拮抗薬、植物アルカロイド、抗生物質、ホルモン剤、及び、種々雑多な抗がん薬物、などが挙げられる。具体的な薬剤としては、例えば、アブラキサン、アルトレタミン、ドセタキセル、ハーセプチン、メトトレキサート、ノバントロン、ゾラデックス、シス

10

20

30

40

50

プラチン（CDDP）、カルボプラチン、プロカルバジン、メクロレタミン、シクロホスファミド、カンプトテシン、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ブスルファン、ニトロソウレア、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリコマイシン、マイトマイシン、エトポシド（VP16）、タモキシフェン、ラロキシフェン、エストロゲン受容体結合剤、タキソール、ゲムシタビン、フルダラビン、ナベルピン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランスプラチン、5-フルオロウラシル、ビンクリスチン、及び、ビンブラスチン、または、上記の任意の類似もしくは誘導変異体、ならびに、更にこれらの組み合わせ、が挙げられる。一部の実施形態では、化学療法は、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）の投与及び方法の前、その間、及び／または、その後に用いられる。

10

【0108】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は放射線治療と共に同時適用されるが、その方法は当分野において理解されている。一部の実施形態では、放射線療法は、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）の投与及び方法の前、その間、及び／または、その後に用いられる。

【0109】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は、非免疫ベースの標的化療法薬、例えば、WNT、p53、及び／または、RB-シグナル伝達経路などのシグナル伝達経路を阻害する薬剤などと共に同時適用される。その他の例としては、チロシンキナーゼ、BRAF、STAT3、c-metを阻害する薬剤、遺伝子発現を制御する薬剤、細胞死を誘導する薬剤、または、血管形成を阻害する薬剤、が挙げられる。具体的な薬剤の例としては、メシル酸イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、ボスチニブ、ラパチニブ、ゲフィニチブ、エルロチニブ、テンシロリムス、エベロリムス、ベムラフェニブ、クリゾチニブ、ボリノスタット、ロミデプシン、ベキサロテン、アリトリオニン、トレチオニン、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、プララトレキサート、ソラフェニブ、スニチニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、または、カボザンチニブ、が挙げられる。一部の実施形態では、非免疫ベースの標的化療法は、改変リンパ球の投与の前、その間、及び／または、その後に用いられる。

20

【0110】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は、免疫療法と共に同時適用される。免疫療法は通常、がん細胞を標的としてそれらを破壊する免疫エフェクター細胞及び分子の使用に依存している。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞表面上の一部のマーカーに特異的な抗体であってもよい。抗体は単独で治療のエフェクターとして機能し得る、または、抗体は、実際に細胞の殺傷を行うその他の細胞をリクルートし得る。抗体はまた、がんの免疫逃避または免疫抑制を予防し得る。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）にコンジュゲートし得、また単に、標的化剤として機能し得る。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接的のいずれかで相互作用する表面分子を有するリンパ球であってもよい。一部の実施形態では、免疫療法は、改変リンパ球の投与の前、その間、及び／または、その後に用いられる。

30

40

【0111】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は、本明細書に記載の改変リンパ球の前、その後、または、それと同時に、治療用ポリヌクレオチドを投与する遺伝子治療と共に同時適用される。細胞増殖の誘導因子、細胞増殖の阻害因子、または、プログラム細胞死の制御因子、を含む、様々な発現産物が包含される。

【0112】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は、外科手術の前、その間、及び／または、その後に適用される。外科

50

手術としては、がん組織の全てまたは一部を物理的に除去、切除、及び／または破壊する切除術が挙げられる。腫瘍切除術とは、腫瘍の少なくとも一部を物理的に除去することを意味する。腫瘍切除術に加え、外科手術による治療としては、レーザー手術、凍結手術、電気手術、及び、顕微鏡でコントロールする手術（Mohs手術）、が挙げられる。表在性のがん、前がん、または、付随量の正常組織の除去と共に、本明細書の実施形態を使用してもよいということが更に考えられる。

【0113】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は、治療の治療効果を向上させるためのその他の薬剤と共に同時適用される。

10

【0114】

一部の実施形態では、同時投与される薬剤は、単回用量及び／または組成物へと製剤化される。一部の実施形態では、同時投与される薬剤は、独立した用量及び／または組成物である。独立した用量及び／または組成物を投与する一部の実施形態では、用量及び／または組成物は、同時に、連続的に、または、期間（例えば、＜30分間、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、もしくはそれ以上、または、それらの間の任意の好適な範囲）にわたる間隔を置いて、投与される。

【0115】

一部の実施形態では、本明細書の治療用組成物（例えば、改変リンパ球、抗体、ワクチンなど）及び方法は、1つまたは複数の別の構成要素、例えば、取扱説明書、投与用デバイス、別の治療薬、診断薬、研究薬などと共に、キットまたはシステムの一部として提供される。

20

【実施例】

【0116】

物質及び方法

ペプチド

標準的な固相合成法を使用することにより9マー及び10マーのペプチドを合成してから、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて精製を行った（表1a～eを参照のこと）。ペプチドの純度（＞90%）及び同一性を、それぞれ分析HPLCと質量分析法を用いて測定した。ペプチドを20mg/mlでジメチルスルホキシド中に溶解し、－80℃で保存した。

30

【0117】

表1. ペプチド特異的CTLを作製するためのペプチドアミノ酸配列

【0118】

40

50

【表 1】

表 1 a. ペプチド特異的CTLを作製するために使用するHLA-A*24:02拘束性ペプチドの一覧

ペプチドの名称	アミノ酸配列	配列番号
CDCA5-A24-10-232	EWAAAMNAEF	1
CDH3-A24-10-807	DYLNEWGSRF	2
FOXM1-A24-9-262	IYTWIEDHF	3
HJURP-A24-9-408	KWLISPVKI	4
INHBB-A24-9-180	LYLKLLPYV	5
KIF20A-A24-10-66	KVYLRVRPLL	6
MELK-A24-9-87_7N	EYCPGGNLF	7
NEIL3-A24-9-545	EWADLSFPF	8
RNF43-A24-9-721	NSQPVWLCL	9
SEMA5B-A24-10-290	AYDIGLFAYF	10
SMYD3-A24-9-197	QYCFECD CF	11
TOPK-A24-10-289	SYQKVIELFS	12
UBE2T-A24-9-60	RYPFEPPQI	13
VANGL1-A24-9-443	RYLSAGPTL	14
VEGFR1-A24-9-1084	SYGVLLWEI	15
VEGFR2-A24-9-169	RFVPDGNRI	16
WDHD1-A24-9-844	GYSNTATEW	17
WDRPUH-A24-9-314	IYRVSF TDF	18

【0119】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1 b. ペプチド特異的CTLを作製するために使用するHLA-A*02:01拘束性ペプチドの一覧

ペプチドの名称	アミノ酸配列	配列番号
C12orf48-A02-10-193	SIAGGQILSV	19
C18orf54-A02-9-507	SLQKALHHL	20
C6orf167-A02-10-622	TLLSIYIDGV	21
CDCA5-A02-9-183	VVCSKLTEV	22
DEPDC1v1-A02-10-302	ILVVCGYITV	23
ECT2-A02-9-34	LLIGSTSYV	24
KNTC2-A02-9-184	ALVWLIDCI	25
MELK-A02-9-138	LLFDEYHKL	26
MPHOSPH1-A02-10-282	YIYDLFVPVS	27
MYBL2-A02-9-144	RIICEAHKV	28
NEIL3-A02-9-416	FQNSPPASV	29
SMYD3-A02-9-335	RLAFDIMRV	30
TMEM22-A02-10-195	TTMWRATTTV	31
TOMM34-A02-9-30	ALYGRALRV	32
TTK-A02-9-593	ITDQYIYMV	33
TTLL4-A02-9-66	GLGPGLLGV	34
VANGL1-A02-9-484	KCLDFSLVV	35

【0120】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 1 c. ペプチド特異的CTLを作製するために使用するHLA-A*11:01拘束性ペプチドの一覧

ペプチドの名称	アミノ酸配列	配列番号
CDCA1-A11-9-219	KTKRLNELK	36
DEPDC1v1-A11-9-627	MSQNVDMPK	37
KIF20A-A11-9-45	VVSTSLEDK	38
MPHOSPH1-A11-10-1546	STSFEISRNK	39

10

【0121】

【表 4】

表 1 d. ペプチド特異的CTLを作製するために使用するHLA-A*33:03拘束性ペプチドの一覧

ペプチドの名称	アミノ酸配列	配列番号
CDCA1-A33-9-43	EVLHMIYMR	40
FOXMI-A33-9-308	WTIHPSANR	41
MPHOSPH1-A33-9-608	EFTQYWAQR	42
VEGFR2-A33-9-114	IYVYVQDYR	43

20

【0122】

【表 5】

表 1 e. ペプチド特異的CTLを作製するために使用するHLA-A*03:01拘束性ペプチドの一覧

ペプチドの名称	アミノ酸配列	配列番号
KOC1-A03-10-120	AVVNVITYSSK	44

30

【0123】

細胞株

TISI (HLA-A*24:02、Bリンパ芽球様細胞株) については、International Histocompatibility Working Group から購入した。T2 (HLA-A*02:01、Bリンパ芽球様細胞株)、EB-3 (HLA-A3/Aw32、Bリンパ芽球様細胞株)、Jiyoye (HLA-A32、Bリンパ芽球様細胞株)、SW480 (HLA-A*24:02、結腸腺癌)、HCC1143 (HLA-A*31:01、乳癌)、BT549 (HLA-A*02:01、乳癌)、及び、C1R (HLA-AとHLA-Bを欠く、Bリンパ芽球) については、American Type Culture Collection (Rockville, MD) から購入した。全ての細胞は、それらの対応する寄託者の推奨に基づいて培養された。

40

【0124】

HLAクラスIを安定的に発現するC1R細胞の作製

TISI及びT2に加えて、ヒト白血球抗原 (HLA) をトランスフェクションしたC

50

1 R細胞を刺激細胞として使用した。HLAクラスI (A*24:02、A*02:01、A*11:01、A*33:03、または、A*03:01) のオープンリーディングフレームをコードするcDNAをPCRを用いて増幅してから、発現ベクターに挿入した。HLAクラスI発現ベクターをC1R細胞にトランスフェクションしてから、G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) の存在下で14日間培養した。G418を補足した培地を含有する96ウェル細胞培養プレート (Corning, Inc., Corning, NY) にG418耐性単一細胞及びフィーダー細胞を播種してから、更に30日間培養した。トランスフェクションしたHLAクラスIのC1R細胞上における発現をフローサイトメトリー解析により確認した。

【0125】

インビトロCTL誘導

単球由来樹状細胞 (DC) を抗原提示細胞として使用して、HLAクラスI上に提示されるペプチドに反応を示す細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) を誘導した。DCをインビトロで作製した (参照文献37 (その全体は参照により組み込まれる))。Ficoll-Plus (GE Healthcare) を用いて健康なボランティアの血液から末梢血単核球 (PBMC) を単離した。2%加熱不活化ヒト血清を含有するAIM-V培地 (Invitrogen) (AIM-V/2%HS培地) 中の1000IU/mlの顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (R&D Systems, Minneapolis, MN) と1000IU/mlのインターロイキン (IL)-4 (R&D System) の存在下で、単球 (PBMC中の接着細胞) を培養して、DCを生じさせた。7日間の培養の後、3マイクロg/mlのβ2-ミクログロブリンの存在下、AIM-V培地中、37℃で3時間、単球由来DCに20マイクロg/mlの合成ペプチドを負荷した。X線照射 (20Gy) でこれらのペプチド負荷DCを不活化してから、CD8 Positive Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) を使用してPBMCから得た自家CD8+T細胞と1:20の比率で混合した。これらの培養液を48ウェル細胞培養プレート (Corning) 内に入れた。それぞれのウェルは、0.5mlのAIM-V/2%HS培地中の、1.5×10⁴のペプチド負荷DC、3×10⁵のCD8+T細胞、及び、10ng/mlのIL-7 (R&D System)、を含有していた。翌々日 (2日目)、20IU/mlの終濃度となるように培養液にIL-2 (Novartis) を加えた。7日目と14日目に、自家ペプチド負荷DCでCD8+T細胞を更に刺激した。DCは上記の同じ方法で毎回調製した。21日目にELISPOTアッセイでCD8+T細胞のペプチド特異的IFN-γ産生を試験した (参照文献38~39 (それら全体は参照により組み込まれる))。

【0126】

増殖培養

限界希釈後、Rapid Expansion Method (参照文献40 (その全体は参照により組み込まれる)) を使用してCD8+T細胞を増殖させた。EB-3及びJiyoをマイトマイシンCで処理してフィーダー細胞として使用した。25mlのAIM-V/5%HS培地中のフィーダー細胞 (それぞれ5×10⁶の細胞) と40ng/mlの抗CD3抗体と共に、CD8+T細胞を培養した。翌日 (1日目)、3000IUのIL-2を培養液に加えた。5日目、8日目、及び、11日目に、半分の容積の培地を、60IU/mlのIL-2を含有する新鮮なAIM-V/5%HS培地に交換した。14日目から16日目の間にELISAでCD8+T細胞のペプチド特異的IFN-γ産生を試験した (参照文献38~39 (それら全体は参照により組み込まれる))。

【0127】

ペプチド特異的IFN-γの検出

CD8+T細胞のペプチド特異的IFN-γ産生を試験するために、ELISPOTアッセイまたはELISAを実施した。ペプチドを負荷した、T2、TISI、または、HLAクラスIを発現するC1R細胞 (1×10⁴の細胞) を刺激細胞として調製した。C

10

20

30

40

50

D8 + T細胞をキラー細胞として使用した。製造業者の手順 (BD Biosciences, San Jose, CA) に従いIFN- γ ELISPOTアッセイ及びIFN- γ ELISAを実施した。

【0128】

低速度撮影記録によるがん細胞に対するCTLの細胞傷害活性の評価

CTL及びTCR改変T細胞をIL-2 (100 U/mL) で16時間前処理した。実験の前に、標的細胞をIFN- γ (100 U/mL) で48時間前処理した。1 μ g/mLのCalcein AM (Dojindo, Kumamoto, Japan) と共に細胞を30分間インキュベートした。PBSによる3回の洗浄後、 2×10^4 の標的細胞を、 2×10^5 のFOXM1/UBE2T特異的CTLまたは 4×10^5 のTCR改変T細胞と混合して、Lab-Tek Chamber Slide Cover Glass Slide Sterile 16 Well (Thermo Scientific) に入れた。倒立顕微鏡Axio Vert. A1 TL (Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて低速度撮影記録を実施した。ImageJプログラム (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を使用して生細胞及び死細胞を定量した。

【0129】

T細胞受容体シーケンシング

TCR配列を同定した (参考文献41 (その全体は参照により組み込まれる))。増殖T細胞またはデキストラマー陽性T細胞からトータルRNAを抽出した。SMARTライブラリ構築キット (Clontech, Mountain View, CA) を使用して、一般的な5' - RACEアダプターを有するcDNAを合成した。SMARTアダプター配列に対応するフォワードプライマー、及び、TCRAまたはTCRBのそれぞれの定常領域に対応するリバースプライマーを使用して、フュージョンPCRを実施し、TCRA cDNAまたはTCRB cDNAを増幅した。Nextera Indexキット (Illumina, San Diego, CA) を使用してバーコードを含むIlluminaインデックス配列を付加した後、MiSeq (Illumina) 上で300bpペアエンドリードを用いて調製ライブラリをシーケンスした。Tcrpソフトウェアを使用して、得られたシーケンスリードを解析した (参考文献41 (その全体は参照により組み込まれる))。フュージョンPCR産物を雛形として使用したサンガーシーケンス (Thermo Scientific) により、配列も確認した。

【0130】

TCR改変T細胞

TCRA配列とTCRB配列の両方をコドン最適化してから、pMP71-PREにクローニングした (参考文献18、42 (それら全体は参照により組み込まれる))。TCR発現を最大化するために、改変マウスTCRA定常ドメイン及び改変マウスTCRB定常ドメインを使用した。一過性レトロウイルス上清を作製してから、ドナー由来のPBMCの形質導入を行った (参考文献18 (その全体は参照により組み込まれる))。抗ヒトTCR β V抗体を用いてTCRの発現を評価した。FOXM1に対するTCR改変T細胞及びUBE2Tに対するTCR改変T細胞用の適切な条件で、APCコンジュゲート抗マウスTCR β モノクローナル抗体 (H57-597, eBioscience, San Diego, CA) による染色を使用して、形質導入TCR改変T細胞のみを形質導入し、それに続いて、製造業者の取扱説明書に従い抗APCマイクロビーズ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) と共に培養した。抗体が占有していない所望のTCRを形質導入したT細胞の数を増加させるために、条件は、5つの異なる抗体希釈条件を比較することによるピーク蛍光強度及びソート細胞の数を基準とした。FOXM1に対するTCR改変T細胞とUBE2Tに対するTCR改変T細胞をソートするには、それぞれ1:2000 (0.1 μ g/mL) の比率と1:4000 (0.05 μ g/mL) の比率の抗体染色が適切であるということが明らかとなった。

【0131】

結果

ペプチド特異的CTL

表1a～eのHLA-A*24:02、HLA-A*02:01、HLA-A*11:01、HLA-A*33:03、または、HLA-A*03:01拘束性ペプチドに特異的なCTLクローンを誘導した。それぞれのペプチドを含むHLAデキストラマーを用いてCTLを捕捉し、これらの細胞のTCR配列を同定した（ペプチド特異的CTL内のTCRにおけるCDR3アミノ酸配列については表2a～eを参照のこと）。ペプチドを含むまたは含まないHLA発現細胞を使用して、44種のCTLクローンの全てにおけるペプチド特異的IFN- γ 産生についてELISAアッセイによる評価を行った。

10

【0132】

表2. ペプチド特異的CTL内のTCRのCDR3アミノ酸配列

【0133】

20

30

40

50

【表 6】

表 2 a. HLA-A*24:02 拘束性ペプチドに特異的な CTL クローン の主な CDR 3 配列の一覧

ペプチドの名称	TCR	アミノ酸配列	配列 番号
CDCA5-A24-10-2 32	α	CAALDSNYQLIW	45
	β	CASSKNGGSYKNEQFF	46
CDH3-A24-10-80 7	α	CAMREVLSSGGGADGLTF	47
	β	CASSPLIDTNQPQHF	48
FOXMI-A24-9-26 2	α	CACPIMWGSNYKLTF	49
	β	CASSLRVHEQYF	50
HJURP-A24-9-40 8	α	CAMREALSYNTDKLIF	51
	β	CASREYKNEQFF	52
INHBB-A24-9-18 0	α	CAPSGSGAGSYQLTF	53
	β	CASSFSIDTQYF	54
KIF20A-A24-10- 66	α	CAVIGGGSNYQLIW	55
	β	CASSPSPLDWETQYF	56
MELK-A24-9-87__ 7N	α	CAGRNSGTYKYIF	57
	β	CASSLGTPKETQYF	58
NEIL3-A24-9-54 5	α	CAARGYSGAGSYQLTF	59
	β	CASRQGGTPLHF	60
RNF43-A24-9-72 1	α	CAVRRGNQFYF	61
	β	CASSLALQGMVSTEAF	62
SEMA5B-A24-10- 290	α	CAVDMWSQGNLIF	63
	β	CASSLGTGDYEYF	64
SMYD3-A24-9-19 7	α	CAVRDIEAGGSYIPTF	65
	β	CASSVGWTSSYEYF	66

10

20

30

40

TOPK-A24-10-28 9	α	CAVEAGYSTLTF	67
	β	CASGAFF	68
UBE2T-A24-9-60	α	CAMREGRNFNKFYF	69
	β	CASSLSGGPNEQFF	70
VANGL1-A24-9-4 43	α	CAMREVTGNQFYF	71
	β	CASSQKSGPLKRQPQHF	72
VEGFR1-A24-9-1 084	α	CAVRAGAGNMLTF	73
	β	CASSIDGLAGEQYF	74
VEGFR2-A24-9-1 69	α	CAMSQYGNKLVF	75
	β	CASSEIRNAYEQYF	76
WDHD1-A24-9-84 4	α	CAVRGGSNYQLIW	77
	β	CASSSSSGTPWNEQFF	78
WDRPUH-A24-9-3 14	α	CATVNDYKLSF	79
	β	CASSLVLGRNTEAFF	80

10

20

【0134】

30

40

50

【表 7】

表 2 b. HLA-A*02:01 拘束性ペプチドに特異的な CTL クローン の主な CDR3 配列の一覧

ペプチドの名称	TCR	アミノ酸配列	配列番号
C12orf48-A02-1 0-193	α	CLVGDRQAGTALIF	81
	β	CSVEGSLGGRDEQFF	82
C18orf54-A02-9 -507	α	CAMRERSGGSYIPTF	83
	β	CASKGTGQKETQYF	84
C6orf167-A02-1 0-622	α	CAETDTSSTGYKYIF	85
	β	CASSLFAQSSYKNEQFF	86
CDCA5-A02-9-18 3	α	CAASAEGAGGTSYGKLTFF	87
	β	CASSLLKNTEAFF	88
DEPDC1v1-A02-1 0-302	α	CAVHDNYGQNFVF	89
	β	CASSLGTGNEQYF	90
ECT2-A02-9-34	α	CATIRKLTGNQFYF	91
	β	CASSRWKGQGLHTGELFF	92
KNTC2-A02-9-18 4	α	CAMREGQAGTALIF	93
	β	CASSLRQGRDTQYF	94
MELK-A02-9-138	α	CAASAGNYGQNFVF	95
	β	CASSSDRTAFF	96
MPHOSPH1-A02-1 0-282	α	CAVNEPYKLSF	97
	β	CASSFTKNEQYF	98
MYBL2-A02-9-14 4	α	CAMRTGGKLIF	99
	β	CAWSVGQGVRETQYF	100
NEIL3-A02-9-41 6	α	CAENLARGGNKLTFF	101
	β	CATSRDLFGDEQFF	102

10

20

30

40

50

SMYD3-A02-9-33 5	α	CAGCPFRDDK I I F	103
	β	CASSLAGEETQYF	104
TMEM22-A02-10- 195	α	CALNNAGNMLTF	105
	β	CASTLRGWSTGELFF	106
TOMM34-A02-9-3 0	α	CIVRAYYYGGATNKL I F	107
	β	CASSQARMGNGELFF	108
TTK-A02-9-593	α	CAESGYTGANNLFF	109
	β	CASSSARQGTDTQYF	110
TTLL4-A02-9-66	α	CATDFNAGNMLTF	111
	β	CASSPDRE I TDTQYF	112
VANGL1-A02-9-4 84	α	CAASGRAGANNLFF	113
	β	CSAGVAGGRPDTQYF	114

10

20

【0135】

【表8】

表2c. HLA-A*11:01拘束性ペプチドに特異的なCTLクローンの主なCDR3配列の一覧

ペプチドの名称	TCR	アミノ酸配列	配列番号
CDCA1-A11-9-21 9	α	CAVSESDSGYALNF	115
	β	CASSLGIDSGYGYTF	116
DEPDC1v1-A11-9- 627	α	CADVSRDDK I I F	117
	β	CSALAGGDPYEQYF	118
KIF20A-A11-9-4 5	α	CAMREGRSEV I F	119
	β	CASSSYNEQFF	120
MPHOSPH1-A11-1 0-1546	α	CAENQKGGKL I F	121
	β	CASSYSRGTNTGELFF	122

30

40

【0136】

50

【表 9】

表 2 d. HLA-A*33:03 拘束性ペプチドに特異的な CTL クロンの主な CDR 3 配列の一覧

ペプチドの名称	TCR	アミノ酸配列	配列番号
CDCA1-A33-9-43	α	CAGQDNNDMRF	123
	β	CASTAWGANTEAFF	124
FOX M1-A33-9-308	α	CAVNANTDKLIF	125
	β	CSAWERTSLFEQYF	126
MPHOSPH1-A33-9-608	α	CLVGRDNAGNMLTF	127
	β	CASGTDTDYQYF	128
VEGFR2-A33-9-114	α	CAGDPDSGNTPLVF	129
	β	CASSVGLTVTNTEAFF	130

10

【0137】

【表 10】

表 2 e. HLA-A*03:01 拘束性ペプチドに特異的な CTL クロンの主な CDR 3 配列の一覧

ペプチドの名称	TCR	アミノ酸配列	配列番号
KOC1-A03-10-120	α	CAMSATEGRDNYGQNFVF	131
	β	CASGFYTGVS TEAFF	132

20

【0138】

がん細胞に対する細胞傷害活性を有する、FOX M1 由来ペプチド特異的 CTL 及び UBE 2 T 由来ペプチド特異的 CTL の誘導

30

FOX M1 に由来するペプチドに特異的な CTL クロンの誘導及び UBE 2 T に由来するペプチドに特異的な CTL クロンの誘導した（参照文献 19～20（それら全体は参照により組み込まれる））。インターフェロン（IFN）- γ Enzyme-Linked Immuno Spot（ELISPOT）アッセイにより健康ドナーの PBMC から HLA-A*24:02 拘束性 CTL を誘導することができる、高免疫原性 FOX M1 由来ショートペプチド及び高免疫原性 UBE 2 T 由来ショートペプチドを同定した（例えば、それぞれ IYTWIEDHF（配列番号：3）及び RYPFEPPQI（配列番号：13））。限界希釈により CTL クロンの得た後、特定のペプチド負荷で刺激された HLA-A*24:02 を発現する抗原提示 C1R 細胞（C1R-A24 細胞）に曝露される際にこれら FOX M1 特異的 CTL 及び UBE 2 T 特異的 CTL が IFN- γ を産生する一方で、C1R-A24 細胞に対するペプチド刺激がない場合に IFN- γ 産生が検出されないまたは低い IFN- γ 産生が検出されることが確認されたが（図 1A）、このことは、作製した FOX M1 特異的 CTL 及び UBE 2 T 特異的 CTL が HLA-A*24:02 拘束性ペプチドを特異的に認識していることを示している。

40

【0139】

ウェスタンブロット解析によるがん細胞株内における FOX M1 と UBE 2 T のタンパク質レベルについての試験（図 4）を行った後、低速度撮影記録法による数種類のがん細胞株に対する FOX M1 特異的 CTL と UBE 2 T 特異的 CTL の細胞傷害活性についての試験を行った。FOX M1 特異的 CTL 及び UBE 2 T 特異的 CTL は、FOX M1 タンパク質と UBE 2 T タンパク質の両方に加えて高レベルの HLA-A24 を発現する S

50

W480細胞に対する非常に強力な細胞傷害活性を示した。HLA-A24陰性がん細胞株であるHCC1143細胞とBT549細胞に対する細胞傷害はほとんど認められなかった（図1B及び図1C）。結果は、抗原特異的T細胞のがん細胞に対するHLA拘束性細胞傷害活性を明確に示した。

【0140】

FOXM1特異的TCR改変T細胞及びUBE2T特異的TCR改変T細胞の作製

続いて、次世代シーケンシングを用いたTCRレパートリー解析により、これらFOXM1特異的CTL及びUBE2T特異的CTLのTCRA鎖及びTCRB鎖をシーケンシングした（図2A）。これらCTLクローンの両方は、単クローン性のTCRレパートリーを示した（図2A）。DNAシーケンシングにより、FOXM1-CTL（CACPI MWGSNYKLTTF（配列番号：49）及びCASSLRVHEQYF（配列番号：50））ならびにUBE2T-CTL（CAMREGRNFNKFYF（配列番号：69）及びCASSLSGGPNEQFF（配列番号：70））における、支配的なTCRACDR3クロノタイプ及びTCRBCDR3クロノタイプを同定した。cDNA情報を使用してTCR発現ベクターを構築してからレンチウイルスベクターにクローニングし、FOXM1を認識するTCR改変T細胞及びUBE2Tを認識するTCR改変T細胞を作製した。TCRVβ特異的抗体を用いて形質導入効率を測定した（代表的な染色データについては図2Bに示した）。アッセイ用に、TCR形質導入細胞のみを形質導入した。

【0141】

FOXM1特異的TCR改変T細胞及びUBE2T特異的TCR改変T細胞の細胞傷害活性

次に、TCR改変T細胞が、図1B及び図1Cに示すとおりオリジナルのCTLクローンと同様ながん細胞を殺傷するかどうかを評価した。FOXM1に対するTCR改変T細胞とUBE2Tに対するTCR改変T細胞は、最初の5時間の間にそれぞれ47.5%と39.3%の細胞生存率を低下させて、HLA-A24陽性SW480細胞に対する有意な殺傷効果を発揮したが、HLA-A24陰性HCC1143細胞に対してはそうではなかった（図3A～図3D）。TCR改変T細胞は、ELISPOTアッセイでそれぞれのペプチドを負荷したC1R-A24細胞と共培養した際に、ペプチド特異的IFN-γ産生を示した（図3E及び図3F）。

【0142】

参考文献

以下の参考文献について、それらの一部は上記において数字で引用しているが、それらの全体は参照により組み込まれる。

1. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2015; 33:1974-82.
2. Yarchoan M, Johnson BA 3rd, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17:209-222.
3. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmi B, Zappasodi R, Mada Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015; 348:124-8.
4. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinge

r SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2443-54.

5. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hachee N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell*. 2015;160:48-61.

6. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515:568-71.

7. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, Rimm DL. In situ tumor PD-L1 mRNA expression is associated with increased TILs and better outcome in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2014;20:2773-82.

8. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252-64.

9. Stevanovic S, Pasetto A, Helman SR, Gartner JJ, Prickett TD, Howie B, Robins HS, Robbins PF, Klebanoff CA, Rosenberg SA, Hinrichs CS. Landscape of immunogenic tumor antigens in successful immunotherapy of virally induced epithelial cancer. *Science*. 2017;356:200-205.

10. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:135-46.

11. Yoshitake Y, Fukuma D, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Tanaka T, Nagata M, Takamune Y, Kawahara K, Nakagawa Y, Yoshida R, Hirose A, Ogi H, Hiraki A, Jono H, Hamada A, Yoshida K, Nishimura Y, Nakamura Y, Shinohara M. Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer

10

20

30

40

50

r patients revealed induction of immune responses and improved OS. Clin Cancer Res. 2015;21:312-21.

12. Hazama S, Nakamura Y, Tanaka H, Hirakawa K, Tahara K, Shimizu R, Ozasa H, Etoh R, Sugiyama F, Okuno K, Furuya T, Nishimura T, Sakata K, Yoshimatsu K, Takenouchi H, Tsunedomi R, Inoue Y, Kanekiyo S, Shindo Y, Suzuki N, Yoshino S, Shinozaki H, Kamiya A, Furukawa H, Yamanaka T, Fujita T, Kawakami Y, Oka M. A phase II study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). J Transl Med. 2014;12:108.

13. Kono K, Iinuma H, Akutsu Y, Tanaka H, Hayashi N, Uchikado Y, Noguchi T, Fujii H, Okinaka K, Fukushima R, Matsubara H, Ohira M, Baba H, Natsugoe S, Kitano S, Takeda K, Yoshida K, Tsunoda T, Nakamura Y. Multicenter, phase II clinical trial of cancer vaccination for advanced esophageal cancer with three peptides derived from novel cancer-testis antigens. J Transl Med. 2012;10:141.

14. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, Wunderlich JR, Somerville RP, Hogan K, Hinrichs CS, Parkhurst MR, Yang JC, Rosenberg SA. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. Science. 2014;344:641-5.

15. Tran E, Robbins PF, Lu YC, Prickett TD, Gartner JJ, Jia L, Pasetto A, Zheng Z, Ray S, Groh EM, Kriley IR, Rosenberg SA. T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. N Engl J Med. 2016;375:2255-2262.

16. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. Blood. 2009;114:535-46.

17. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Levy CL, Li YF, El-Gamil M, Schwarz SL, Laurencot C,

10

20

30

40

50

Rosenberg SA. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol*. 2011;29:917-24.

18. Leisegang M, Engels B, Schreiber K, Yew PY, Kiyotani K, Idel C, Arina A, Duraiswamy J, Weichselbaum RR, Uckert W, Nakamura Y, Schreiber H. Eradication of Large Solid Tumors by Gene Therapy with a T-Cell Receptor Targeting a Single Cancer-Specific Point Mutation. *Clin Cancer Res*. 2016;22:2734-43.

10

19. Osawa R, Tsunoda T, Yoshimura S, Watanabe T, Miyazawa M, Tani M, Takeda K, Nakagawa H, Nakamura Y, Yamaue H. Identification of HLA-A24-restricted novel T Cell epitope peptides derived from P-cadherin and kinesin family member 20A. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:848042.

20. Yoshimura S, Tsunoda T, Osawa R, Harada M, Watanabe T, Hikichi T, Katsuda M, Miyazawa M, Tani M, Iwahashi M, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Yamaue H. Identification of an HLA-A2-restricted epitope peptide derived from hypoxia-inducible protein 2 (HIG2). *PLoS One*. 2014;9:e85267.

20

21. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha SK, Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer JE, Bennett AD, Gerry AB, Pumphrey NJ, Williams D, Tayton-Martin HK, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel DL, Levine BL, Jakobsen BK, Kalos M, June CH. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med*. 2015;21:914-921.

30

22. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991;254:1643-7.

40

23. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11:3887-95.

24. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-

50

4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182:459–65.

25. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res*. 2013;119:421–75.

26. Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev*. 2014;257:56–71.

27. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002;298:850–4.

28. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE, Dudley ME. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17:4550–7.

29. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbeck C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urban WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:711–23.

30. Stronen E, Toebes M, Kelderman S, van Buuren MM, Yang W, van Rooij N, Donia M, Bosch ML, Lund-Johansen F, Olweus J, Schumacher TN. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires. *Science*. 2016;352:1337–41.

31. Bektas N, Haaf At, Veeck J, Wild PJ, Luscher-Firzlaff J, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E. Tight correlation between expression of the Forkhead transcription factor FOXM1 and HER2 in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:42.

32. Weng W, Okugawa Y, Toden S, Toiyama Y, Kusunoki M, Goel A. FOXM1 and FOXQ1 Are Promising Prognostic Biomarkers and Novel Targets of Tumor-Suppressive miR-342 in Human Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22:4947-4957.
33. Wen M, Kwon Y, Wang Y, Mao JH, Wei G. Elevated expression of UBE2T exhibits oncogenic properties in human prostate cancer. *Oncotarget.* 2015;6:25226-39.
34. Yu H, Xiang P, Pan Q, Huang Y, Xie N, Zhu W. Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2T is an Independent Prognostic Factor and Promotes Gastric Cancer Progression. *Tumour Biol.* 2016;37:11723-11732.
35. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371:1507-17.
36. Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13:370-83.
37. Uchida N, Tsunoda T, Wada S, Furukawa Y, Nakamura Y, Tahara H. Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8577-86.
38. Watanabe T, Suda T, Tsunoda T, Uchida N, Ura K, Kato T, Hasegawa S, Satoh S, Ohgi S, Tahara H, Furukawa Y, Nakamura Y. Identification of immunoglobulin superfamily 11 (IGSF11) as a novel target for cancer immunotherapy of gastrointestinal and hepatocellular carcinomas. *Cancer Sci.* 2005;96:498-506.
39. Suda T, Tsunoda T, Uchida N, Watanabe T, Hasegawa S, Satoh S, Ohgi S, Furukawa Y, Nakamura Y, Tahara H. Identification of secernin 1 as a novel immunotherapy target for gastric cancer using the expression profiles of cDNA microarray. *Cancer Sci.* 2006;97:411-9.
40. Riddell SR, Elliott M, Lewinsohn DA, Gilbert MJ, Wilson L, Manley SA, Lupton SD, Ovell RW, Reynolds TC, Corey L, Greenberg PD. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med.* 1996;2:216-23.

10

20

30

40

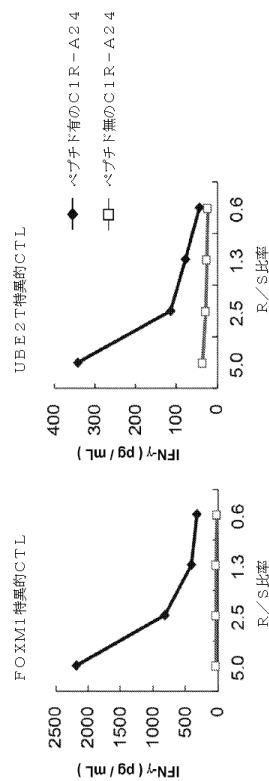
50

41. Fang H, Yamaguchi R, Liu X, Daigo Y, Yew PY, Tanikawa C, Matsuda K, Imoto S, Miyano S, Nakamura Y. Quantitative T cell repertoire analysis by deep cDNA sequencing of T cell receptor α and β chains using next-generation sequencing (NGS). *Oncoimmunology*. 2015; 3:e968467.

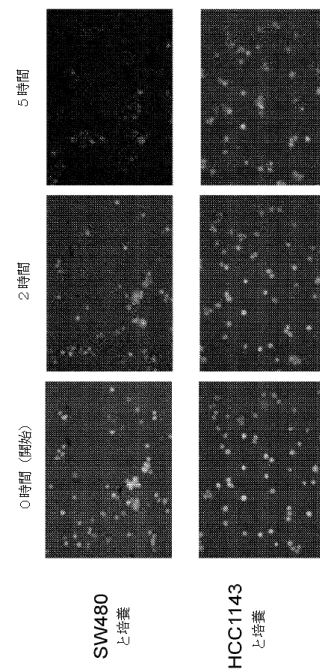
42. Engels B, Chervin AS, Sant AJ, Kranz DM, Schreiber H. Long-term persistence of CD4 (+) but rapid disappearance of CD8 (+) T cells expressing an MHC class I-restricted TCR of nanomolar affinity. *Mol Ther*. 2012; 20:652-60.

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

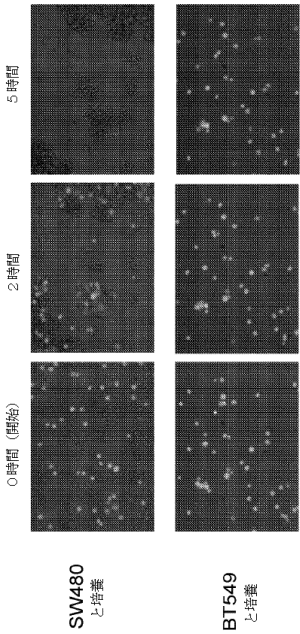
20

30

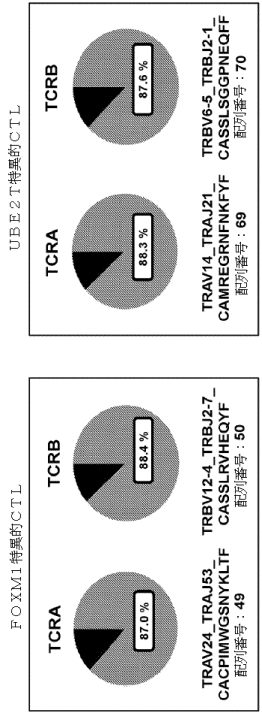
40

50

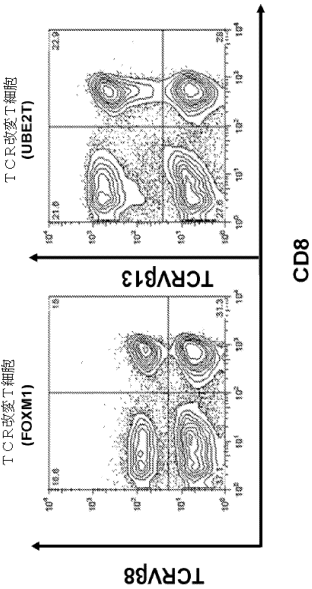
【図 1 C】



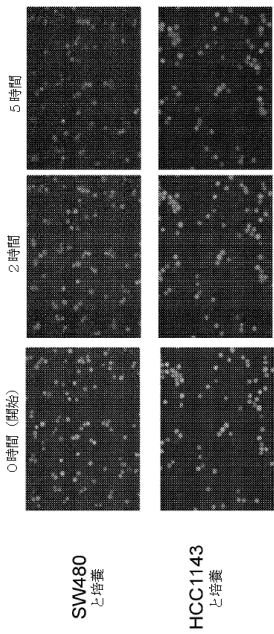
【図 2 A】



【図 2 B】



【図 3 A】



10

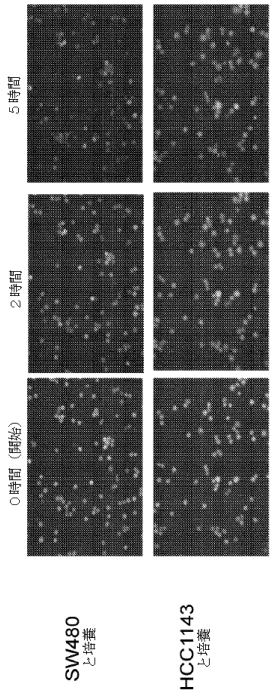
20

30

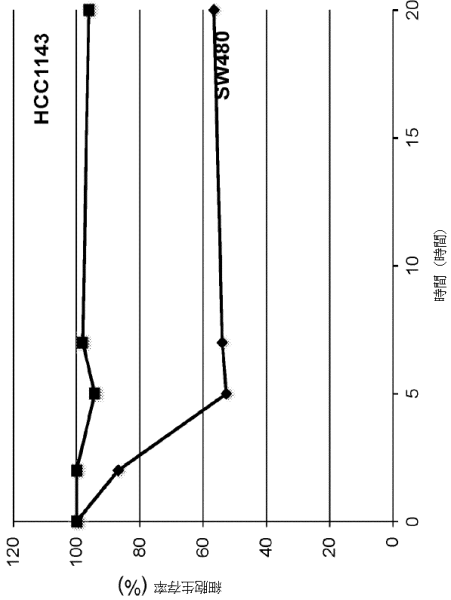
40

50

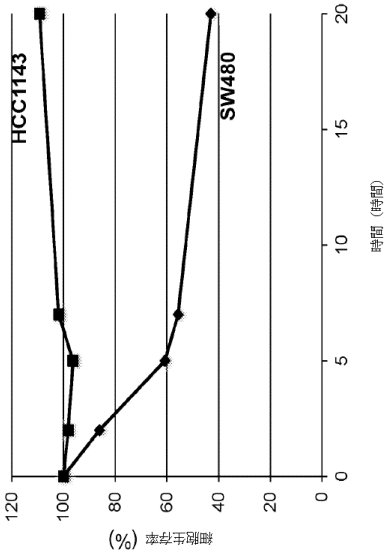
【図 3 B】



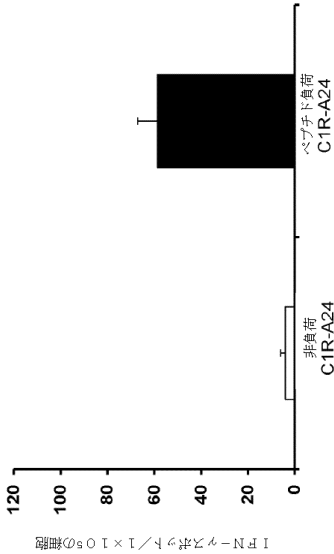
【図 3 C】



【図 3 D】



【図 3 E】



10

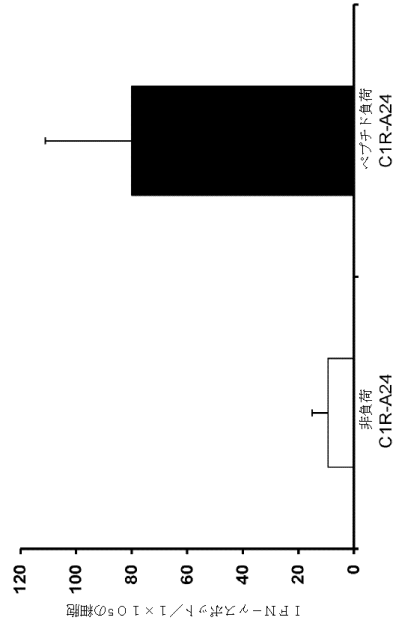
20

30

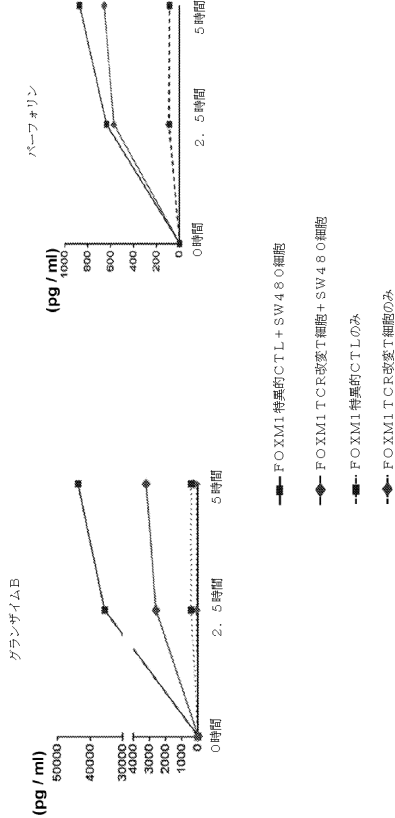
40

50

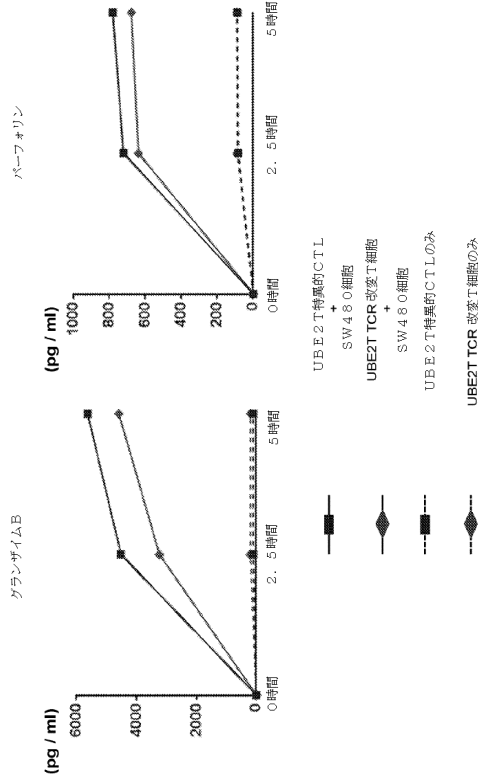
【図 3 F】



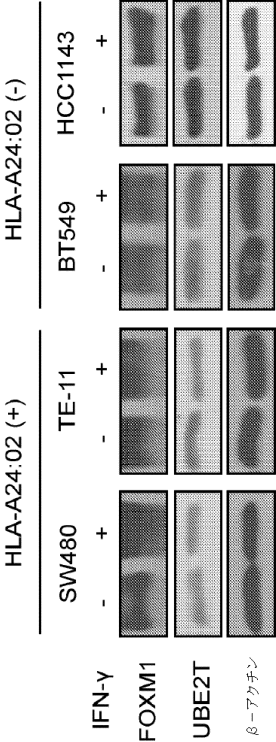
【図 3 G】



【図 3 H】



【図 4】



【配列表】
0007260553000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	14/82	(2006.01)	C 0 7 K	14/82	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
			A 6 1 K	39/395	E

アメリカ合衆国, 6 0 6 3 7 イリノイ州, シカゴ, サウス エリス アベニュー 5 8 0 1, シー
／オーザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ

(72)発明者 バク, ジェーヒュン

アメリカ合衆国, 6 0 2 0 8 イリノイ州, シカゴ, サウス エリス アベニュー 5 8 0 1, シー
／オーザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ

(72)発明者 吉村 様子

日本国, 2 1 3 - 0 0 1 2 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 - 2 - 1, かながわサイエンスパーク ア
ールアンドディー, ビルディング ディー, シー／オー オンコセラピー サイエンス, インコーポ
レイテッド

(72)発明者 引地 哲郎

日本国, 2 1 3 - 0 0 1 2 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 - 2 - 1, かながわサイエンスパーク ア
ールアンドディー, ビルディング ディー, シー／オー オンコセラピー サイエンス, インコーポ
レイテッド

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 6 1 0 9 2 (WO, A 1)

Cancer Res, 2017年, 77(13_Supplement):625

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8

C 0 7 K 1 4 / 8 2

C 0 7 K 1 6 / 3 2

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 6 3

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

C 0 7 K 1 4 / 4 7

C 0 7 K 7 / 0 6

A 6 1 K 3 5 / 1 7

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

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

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

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

S w i s s P r o t / G e n e S e q