

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-516049

(P2021-516049A)

(43) 公表日 令和3年7月1日 (2021. 7. 1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z N A Z	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 N 15/86 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/861 (2006.01)	C 1 2 N 15/861 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 136 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-545519 (P2020-545519)
 (86) (22) 出願日 平成31年2月27日 (2019. 2. 27)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年10月27日 (2020. 10. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/019754
 (87) 国際公開番号 W02019/168923
 (87) 国際公開日 令和1年9月6日 (2019. 9. 6)
 (31) 優先権主張番号 62/637, 240
 (32) 優先日 平成30年3月1日 (2018. 3. 1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

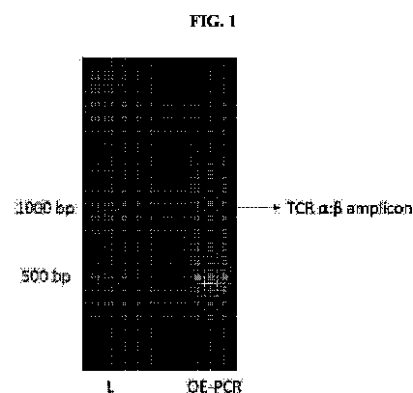
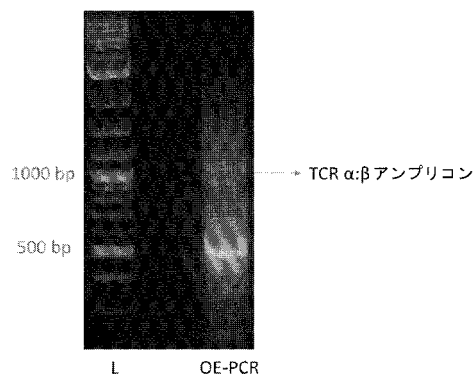
(71) 出願人 516385790
 ザ ユニバーシティ オブ カンザス
 アメリカ合衆国 66045 カンザス州
 ローレンス ジェイホーク プールバー
 ド 1450 ストロング ホール 24
 5
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えT細胞受容体遺伝子を用いて細胞ベースの治療薬を製造するための技法

(57) 【要約】

本技術は、概して、組換えT細胞受容体 (TCR) ライブラリーを作製するための組成物および方法、ならびにその治療的使用方法に関する。本技術の組成物および方法は、がんおよびウイルス感染症のための個別化標的療法としての、抗原特異的TCRレパートリーの迅速な単離に有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) ベクターバックボーン；ならびに

(b) (i) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または

(ii) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド

を含む、組換えT細胞受容体 (TCR) ライブラリーベクターであって、

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画に存在する単一の溶解されたT細胞から単離されたmRNAに由来している、前記ベクター。

10

【請求項 2】

前記単一の溶解されたT細胞のmRNAが、mRNA捕捉試薬または逆転写PCR (RT-PCR) を用いて単離される、請求項1記載のベクター。

【請求項 3】

第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとが、任意でリンカーポリヌクレオチドを介して、機能的に連結され、かつ任意で、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとが、T細胞mRNAの逆転写およびPCR増幅によって機能的に連結されている、請求項2記載のベクター。

【請求項 4】

20

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、TCR遺伝子において天然に見出される標的制限エンドヌクレアーゼ部位での切断によって、ベクターバックボーン中にクローニングされている、請求項1記載のベクター。

【請求項 5】

標的制限エンドヌクレアーゼ部位が、低頻度でTCR遺伝子中に存在している、請求項4記載のベクター。

【請求項 6】

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、表7または表8に記載される少なくとも1つの標的制限エンドヌクレアーゼ部位を組み込むように変更されている、請求項4記載のベクター。

30

【請求項 7】

前記標的制限エンドヌクレアーゼ部位が、サイレント変異を含む、請求項4記載のベクター。

【請求項 8】

前記mRNA捕捉試薬が、ポリ (dT) でコーティングされたビーズ、オリゴヌクレオチドでコーティングされたビーズ、ヒドロゲルビーズ、およびマイクロアレイウェルの表面上のプリントされたオリゴからなる群より選択される、請求項2記載のベクター。

【請求項 9】

前記区画が、エマルジョン滴またはウェルである、請求項1記載のベクター。

【請求項 10】

40

前記ウェルが、プリントされたポリマースライド、プラスチックプレート、マイクロタ イタープレート、またはゲルに位置する、請求項9記載のベクター。

【請求項 11】

前記区画が、5 nL以下の体積を有する、請求項1記載のベクター。

【請求項 12】

第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドに機能的に連結された発現調節エレメントをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1記載のベクター。

【請求項 13】

前記発現調節エレメントが、プロモーター、p2A配列、およびIRES配列からなる群より

50

選択される、請求項12記載のベクター。

【請求項14】

前記プロモーターが、EF1 α プロモーターまたはCMVプロモーターである、請求項13記載のベクター。

【請求項15】

前記発現調節エレメントをコードするポリヌクレオチドが、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとの間に位置する、請求項12記載のベクター。

【請求項16】

環状化されている、請求項1記載のベクター。

【請求項17】

前記発現調節エレメントのベクター中への組み込みの前に環状化されている、請求項12記載のベクター。

【請求項18】

前記発現調節エレメントのベクター中への組み込みの後に環状化されている、請求項12記載のベクター。

【請求項19】

前記発現調節エレメントが、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の近くに組み込まれている、請求項12記載のベクター。

【請求項20】

前記発現調節エレメントが、制限酵素またはTALENから選択されるDNA修飾酵素を用いて、ベクター中に組み込まれている、請求項12記載のベクター。

【請求項21】

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つに連結されたトランスポゾンにコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1記載のベクター。

【請求項22】

検出可能なマーカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1記載のベクター。

【請求項23】

選択可能なマーカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1記載のベクター。

【請求項24】

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの発現および/または活性化を調節するためのスイッチ機構をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1記載のベクター。

【請求項25】

Kozakコンセンサス配列またはエンハンサーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項1記載のベクター。

【請求項26】

前記ベクターバックボーンが、レトロウイルスベクターバックボーン、レンチウイルスベクターバックボーン、アデノウイルスベクターバックボーン、およびアデノ随伴ウイルスベクターバックボーンからなる群より選択される、請求項1記載のベクター。

【請求項27】

標的細胞または疾患抗原に対する結合特異性を有するTCRをコードする、請求項1記載のベクター。

【請求項28】

前記標的細胞が、がん細胞またはウイルスに感染した細胞であり、任意で、該標的細胞が対象から単離された、請求項27記載のベクター。

【請求項29】

前記疾患抗原が、ウイルス抗原または腫瘍抗原であり、任意で、該抗原が抗原:MHC複合

10

20

30

40

50

体中にロードされる、請求項27記載のベクター。

【請求項30】

前記疾患抗原が、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である、請求項29記載のベクター。

【請求項31】

前記疾患抗原が、CD45、グリピカン-3、IGF2B3、カリクレイン4、KIF20A、レングシン（Lengsin）、メロエ（Meloe）、ムチン5AC（MUC5AC）、サバイビン、サイクリン-A1、MAGE-A1、MAGE-C1、MAGE-C2、SSX2、XAGE1b/GAGED2A、CD19、CD20、CD22、CD52、上皮成長因子受容体（EGFR）、ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10a（TRAILR1）、核内因子κB活性化受容体リガンド（RANKL）、インスリン様増殖因子1受容体（IGF1R）、上皮細胞接着分子（EpCAM）、およびがん胎児性抗原（CEA）からなる群より選択される腫瘍抗原である、請求項29記載のベクター。

【請求項32】

請求項1～31のいずれか一項記載のベクターを含む、組換え細胞であって、任意で、細菌細胞、哺乳動物細胞、または酵母細胞である、前記組換え細胞。

【請求項33】

請求項1～31のいずれか一項記載の複数のベクターを含む、組換えTCRベクターライブラリー。

【請求項34】

前記複数のベクターが、TCRレパートリーを含む、請求項33記載の組換えTCRベクターライブラリー。

【請求項35】

前記複数のベクターにおける各ベクターが、TCRクローン優勢度、インビトロアッセイ由来のTCR濃縮特性、TCR結合特異性、TCR Vセグメント配列、TCR Dセグメント配列、TCR Jセグメント配列、TCR遺伝子モチーフ、および/またはCDR3遺伝子モチーフのうちの1つまたは複数の特性に基づいて選択されている、請求項33記載の組換えTCRベクターライブラリー。

【請求項36】

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの核酸シーケンシングによって特徴決定されている、請求項33記載の組換えTCRベクターライブラリー。

【請求項37】

請求項1～31のいずれか一項記載のベクターを含む、単離された免疫細胞。

【請求項38】

造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはナチュラルキラー（NK）細胞である、請求項37記載の単離された免疫細胞。

【請求項39】

請求項1～31のいずれか一項記載のベクターまたは請求項33～36のいずれか一項記載のベクターライブラリーを含む、細胞集団。

【請求項40】

造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、および/またはNK細胞を含む、請求項39記載の細胞

集団。

【請求項 4 1】

請求項33～36のいずれか一項記載のベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む、組換えTCRライブラリーを調製するための方法。

【請求項 4 2】

前記細胞が、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはNK細胞である、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

標的細胞に対する特異的結合についてライブラリーをスクリーニングする工程をさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項 4 4】

前記標的細胞が、がん細胞またはウイルスに感染した細胞であり、任意で、該細胞が対象から単離された、請求項43記載の方法。

【請求項 4 5】

抗原:MHC複合体に対する特異的結合についてライブラリーをスクリーニングする工程をさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項 4 6】

前記抗原:MHC複合体の抗原が、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である、請求項45記載の方法。

【請求項 4 7】

前記抗原:MHC複合体の抗原が、CD45、グリピカン-3、IGF2B3、カリクレイン4、KIF20A、レングシン、メロエ、ムチン5AC（MUC5AC）、サバイビン、サイクリン-A1、MAGE-A1、MAGE-C1、MAGE-C2、SSX2、XAGE1b/GAGED2A、CD19、CD20、CD22、CD52、EGFR、HER2、TRAIL R1、RANKL、IGF1R、EpCAM、およびCEAからなる群より選択される腫瘍抗原である、請求項45記載の方法。

【請求項 4 8】

T細胞表現型マーカーについてライブラリーをスクリーニングする工程をさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項 4 9】

共培養系における活性についてライブラリーをスクリーニングする工程であって、該共培養系が、

- (a) がん細胞株；
- (b) 公知のウイルスに感染した複数の細胞；
- (c) がん患者から単離された複数の腫瘍細胞；
- (d) 不死化細胞株；または
- (e) 患者組織生検に由来する複数の細胞

のうちの少なくとも1つを含む、前記工程をさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項 5 0】

形質転換された細胞の集団のインビトロ活性化をさらに含む、請求項41記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

前記インビトロ活性化が、抗CD3抗体、抗CD8抗体、抗CD27抗体、IL-2、IL-4、IL-21、抗PD1抗体、抗CTLA4抗体、腫瘍細胞溶解物、ウイルス感染細胞との細胞共培養、および腫瘍細胞株のうちの1つまたは複数の刺激物質を用いて行われる、請求項50記載の方法。

【請求項 5 2】

転写因子をコードするポリヌクレオチドで、細胞の集団を形質転換する工程をさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項 5 3】

前記転写因子が、FOXP3、BLIMP-1、Ikaro、Helios、およびTGF-βからなる群より選択される、請求項52記載の方法。

【請求項 5 4】

TCRクローン優勢度、インビトロアッセイ由来のTCR濃縮特性、TCR結合特異性、TCR Vセグメント配列、TCR Dセグメント配列、TCR Jセグメント配列、TCR遺伝子モチーフ、および/またはCDR3遺伝子モチーフのうちの1つまたは複数の特性に基づいて、組換えTCRライブラリーに含めるために個々のベクターを選択する工程をさらに含む、請求項41記載の方法。

【請求項 5 5】

前記選択が、合成に由来するTCRライブラリーを生成するために、定義された比で個々のベクターを混合することを含む、請求項54記載の方法。

【請求項 5 6】

請求項41記載の方法によって調製された、組換えTCRライブラリー。

【請求項 5 7】

請求項56記載の組換えTCRライブラリーと担体とを含む、組成物。

【請求項 5 8】

前記担体が、薬学的に許容される担体である、請求項57記載の組成物。

【請求項 5 9】

対象に対する請求項56記載の組換えTCRライブラリーまたは請求項57もしくは58記載の組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、処置の必要がある対象を処置する方法。

【請求項 6 0】

対象に対する請求項56記載の組換えTCRライブラリーまたは請求項57もしくは58記載の組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、がんの処置の必要がある対象においてがんを処置する方法。

【請求項 6 1】

前記がんが、急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髄性白血病（AML）；副腎皮質癌；AIDS関連がん；肛門がん；虫垂がん；星状細胞腫；非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脳腫瘍；皮膚の基底細胞癌；胆管がん；膀胱がん；骨がん；乳がん；気管支腫瘍；バーキットリンパ腫；カルチノイド腫瘍（胃腸）；胚細胞腫瘍；原発性CNSリンパ腫；子宮頸がん；胆管細胞癌；脊索腫；慢性リンパ球性白血病（CLL）；慢性骨髄性白血病（CML）；慢性骨髄増殖性新生物；大腸がん；頭蓋咽頭腫；皮膚T細胞リンパ腫；非浸潤性乳管癌（DCIS）；子宮内膜がん；上衣腫；食道がん；感覚神経芽腫；頭蓋外胚細胞腫瘍；性腺外胚細胞腫瘍；眼がん；眼球内黒色腫；網膜芽腫；卵管がん；悪性の骨の線維性組織球腫、および骨肉腫；胆嚢がん；胃（gastric）がん；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質腫瘍（GIST）；胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛性疾患；毛様細胞白血病；頭頸部がん；心臓腫瘍；肝細胞がん；ランゲルハンス細胞組織球症；ホジキンリンパ腫；下咽頭がん；眼球内黒色腫；膵島細胞腫瘍、膵神経内分泌腫瘍；腎臓がん；喉頭がん；白血病；口唇および口腔（oral cavity）がん；肝臓がん；肺がん；リンパ腫；男性乳がん；骨の悪性線維性組織球腫および骨肉腫；黒色腫；メルケル細胞癌；中皮腫；転移性がん；口腔（mouth）がん；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性骨髄腫/形質細胞新生物；菌状息肉腫；慢性の骨髄異形成症候群、骨髄増殖性新生物；鼻咽頭がん；神経芽腫；非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌；口腔（oral）がん、口咽頭がん；骨肉腫；卵巣がん；膵臓がん；膵神経内分泌腫瘍；乳

10

20

30

40

50

頭腫症；傍神経節腫；副鼻腔がん；副甲状腺がん；咽頭がん；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；胸膜肺芽腫；前立腺がん；直腸がん；再発がん；腎細胞がん；網膜芽腫；横紋筋肉腫；唾液腺がん；肉腫；ユーイング肉腫；カボジ肉腫；骨肉腫；子宮肉腫；セザリー症候群；皮膚がん；小細胞肺癌；小腸がん；軟部組織肉腫；皮膚の扁平上皮癌；頸部扁平上皮がん；胃（stomach）がん；T細胞リンパ腫；精巣がん；咽喉がん；鼻咽頭がん；下咽頭がん；胸腺癌；甲状腺がん；尿道がん；子宮がん；膣がん；血管腫瘍；外陰部がん；またはウィルムス腫瘍である、請求項60記載の方法。

【請求項 6 2】

対象に対する請求項56記載の組換えTCRライブラリーまたは請求項57もしくは58記載の組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、腫瘍成長の阻害の必要がある対象において腫瘍成長を阻害する方法。

10

【請求項 6 3】

前記腫瘍が固形腫瘍である、請求項62記載の方法。

【請求項 6 4】

対象に対する請求項56記載の組換えTCRライブラリーまたは請求項57もしくは58記載の組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、ウイルス感染症の処置の必要がある対象においてウイルス感染症を処置する方法。

【請求項 6 5】

前記ウイルス感染症が、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘带状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスによって引き起こされる、請求項64記載の方法。

20

【請求項 6 6】

請求項56記載の組換えTCRライブラリーまたは請求項57もしくは58記載の組成物の第2の用量を、対象に投与する工程をさらに含む、請求項59～65のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 6 7】

前記組換えTCRライブラリーが、処置される対象にとって自己由来または同種異系である細胞を含む、請求項59～66のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 8】

前記対象が、ヒト、動物、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ヒツジ、マウス、ウマ、またはウシである、請求項59～67のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 9】

前記対象がヒトである、請求項68記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年3月1日に出願された米国特許仮出願第62/637,240号の恩典および優先権を主張し、その内容は、全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

米国政府の支援

本発明は、National Institutes of Healthによって授与されたGM103418の下で、政府の支援で行われた。政府は、本発明においてある一定の権利を有する。

50

【0003】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出されており、かつその全体が参照により本明細書に組み入れられる、配列表を含有している。2019年2月25日に作成された該ASCIIコピーは、104434-0179_SL.txtという名称であり、サイズが206,931バイトである。

【0004】

技術の分野

本技術は、概して、細胞治療としてのT細胞受容体をコードする単一T細胞からの遺伝子のハイスループットの単離および操作の方法、T細胞ライブラリーの組成物、ならびにその治療的使用の方法に関する。

【背景技術】

【0005】

背景

以下の説明は、読者の理解を補助するために提供される。提供される情報または引用される参考文献のいずれも、本方法に対する先行技術であると認められない。

【0006】

ヒトは、適応免疫系の主要な構成要素を提供する何千ものT細胞受容体を有し、T細胞受容体応答は、ウイルス感染症、がん、および自己免疫を含む疾患からの防御に対して重要な貢献を提供することが実証されている。しかし、T細胞受容体応答を処置にトランスレートする (translate) ための方法が、トランスレーショナル療法に実用的である規模で完全には解明されていないため、分子的に定義されたT細胞受容体療法は、臨床ケアに対して限られた影響を与えている。現在の方法は、ロースループットのT細胞受容体同定技術、T細胞受容体のクローニングのための煩雑な実践、およびT細胞ライブラリーの細胞状態を指示する限定された能力に依拠している。

【0007】

特にがんの処置のために、細胞治療用の薬としてのT細胞受容体応答の迅速な技術移転のための方法を確立することが、必要である。本技術は、一部、がんの臨床的処置または予防のために適応免疫に対するTCRレパートリーの寄与を活用することによって、この必要に対処する。

【発明の概要】

【0008】

概要

本技術は、概して、組換えTCRライブラリーを作製するための新規の組成物および方法、ならびにその治療的使用の方法に関する。本技術の組成物および方法は、がんおよびウイルス感染症のための個別化標的療法の開発用の、抗原特異的TCRレパートリーの迅速な単離に有用である。

【0009】

したがって、1つの局面において、本技術は、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む、組換えT細胞受容体 (TCR) ライブラリーベクターであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画に存在する単一の溶解されたT細胞から単離されたmRNAに由来している、前記ベクターを提供する。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬または逆転写PCR (RT-PCR) を用いて単離される。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル (例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル) または小滴である。

【0010】

ベクターのいくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとは、任意でリンカーポリヌクレオチドを介して、機能的に連結されている。ベクターのいくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとは、捕捉されたT細胞mRNAの逆転写およびPCR増幅によって、機能的に連結されている。ベクターのいくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは、TCR遺伝子において天然に見出される標的制限エンドヌクレアーゼ部位での切断によって、ベクターバックボーン中にクローニングされている。ある特定の態様において、標的制限エンドヌクレアーゼ部位は、低頻度でTCR遺伝子中に存在している。いくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドは、表7または表8に記載される少なくとも1つの標的制限エンドヌクレアーゼ部位を組み込むように変更されている。ある特定の態様において、標的制限エンドヌクレアーゼ部位は、サイレント変異を含む。

10

【0011】

ベクターのある特定の態様において、mRNA捕捉試薬は、ポリ(dT)でコーティングされたビーズ、オリゴヌクレオチドでコーティングされたビーズ、ヒドロゲルビーズ、およびマイクロアレイウェルの表面上のプリントされたオリゴからなる群より選択される。いくつかの態様において、区画は、エマルジョン滴またはウェルである。ある特定の態様において、ウェルは、プリントされたポリマースライド、プラスチックプレート、マイクロタイタープレート、またはゲルに位置する。いくつかの態様において、区画の体積は、5 nL以下である。

【0012】

20

ベクターのある特定の態様において、ベクターは、第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドに機能的に連結された発現調節エレメントをコードする、少なくとも1つのポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、プロモーター、p2a配列、およびIRES配列からなる群より選択される。特定の態様において、プロモーターは、EF1 α プロモーターまたはCMVプロモーターである。ある特定の態様において、発現調節エレメントをコードするポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとの間に位置する。

【0013】

ベクターのいくつかの態様において、ベクターは環状化されている。いくつかの態様において、ベクターは、発現調節エレメントのベクター中への組み込みの前に環状化されている。他の態様において、ベクターは、発現調節エレメントのベクター中への組み込みの後に環状化されている。いくつかの態様において、ベクターは、直鎖状である（例えば、環状化されていない）。

30

【0014】

ベクターのある特定の態様において、発現調節エレメントは、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の近くに組み込まれている。他の態様において、発現調節エレメントは、制限酵素またはTALENから選択されるDNA修飾酵素を用いて、ベクター中に組み込まれている。他の態様において、ベクターは、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つに機能的に連結されたトランスポゾンにコードする、1つまたは複数のポリヌクレオチドをさらに含む。

40

【0015】

ベクターのいくつかの態様において、ベクターは、検出可能なマーカーをコードするポリヌクレオチド、選択可能なマーカーをコードするポリヌクレオチド、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの発現および/または活性化を調節するためのスイッチ機構をコードするポリヌクレオチド、ならびにKozakコンセンサス配列またはエンハンサーをコードするポリヌクレオチドのうちの1つまたは複数を含む。

【0016】

ベクターのある特定の態様において、ベクターバックボーンは、レトロウイルスベクターバックボーン、レンチウイルスベクターバックボーン、アデノウイルスベクターバックボーン、およびアデノ随伴ウイルスベクターバックボーンからなる群より選択される。あ

50

る特定の態様において、ベクターは、CRISPR/Cas9組込みのための直鎖状DNAを含んでもよい。ある特定の態様において、ベクターは、リコンビナーゼ酵素を用いて宿主中に組み込まれ得るDNAを含んでもよい。いくつかの態様において、ベクターは、トランスポザーゼ酵素を用いて宿主中に組み込まれ得るDNAを含んでもよい。

【0017】

ベクターのいくつかの態様において、コードされるT細胞受容体（例えば、TCR α β または TCR γ δ ）は、疾患抗原または標的細胞に対して反応性である。ある特定の態様において、疾患抗原は、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、 Dengue ウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である。他の態様において、疾患抗原は、CD45、グリピカン-3、IGF2B3、カリクレイン4、KIF20A、レングシン（Lengsin）、メロエ（Meloe）、ムチン5AC（MUC5AC）、サバイビン、サイクリン-A1、MAGE-A1、MAGE-C1、MAGE-C2、SSX2、XAGE1b/GAGED2A、CD19、CD20、CD22、CD52、上皮成長因子受容体（EGFR）、ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10a（TRAILR1）、核内因子 κ B 活性化受容体リガンド（RANKL）、インスリン様増殖因子1受容体（IGF1R）、上皮細胞接着分子（EpCAM）、およびがん胎児性抗原（CEA）からなる群より選択される腫瘍抗原である。

【0018】

別の局面において、本技術は、ベクターを含む組換え細胞であって、該ベクターが、（a）ベクターバックボーン；ならびに（b）TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または（b）TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含み；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記組換え細胞を提供する。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離され、任意で、組換え細胞は、細菌細胞、哺乳動物細胞、または酵母細胞である。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。

【0019】

1つの局面において、本技術は、（a）ベクターバックボーン；ならびに（b）TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または（b）TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含む、組換えTCRベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画においてmRNA捕捉試薬によって捕捉された単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記組換えTCRベクターライブラリーを提供する。いくつかの態様において、複数のベクターは、TCRレパートリーを含む。いくつかの態様において、TCRベクターライブラリーにおける個々のベクターは、TCRクローン優勢度、インビトロア

ッセイ由来のTCR濃縮特性、TCR結合特異性、TCR Vセグメント配列、TCR Dセグメント配列、TCR Jセグメント配列、TCR遺伝子モチーフ、および/またはCDR3遺伝子モチーフのうちの1つまたは複数の特性に基づいて、TCRライブラリーに含めるために選択された。いくつかの態様において、ライブラリーにおける個々のベクターは、合成に由来するTCRライブラリーを生成するために、定義された比で混合される。

【0020】

別の局面において、本技術は、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む、単離された免疫細胞であって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画においてmRNA捕捉試薬によって捕捉された単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記単離された免疫細胞を提供する。いくつかの態様において、免疫細胞は、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはナチュラルキラー（NK）細胞である。

【0021】

1つの局面において、本技術は、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含む、組換えTCRベクターライブラリーを含む細胞集団であって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記細胞集団を提供する。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、集団は、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはNK細胞を含む。

【0022】

別の局面において、また、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含む、ベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む、組換えTCRライブラリーを調製するための方法も、本明細書において提供される。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、集団は、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはNK細胞を含む。いくつかの態様において、複数のベクターは、方法のある特定の段階で環状化され、他の段階で直線化される。

【0023】

方法のいくつかの態様において、ライブラリーは、標的細胞に対する特異的結合についてスクリーニングされる。ある特定の態様において、細胞は、がん細胞またはウイルスに

感染した細胞である。いくつかの態様において、標的細胞は、対象から単離された。

【0024】

方法の他の態様において、ライブラリーは、抗原:MHC複合体に対する特異的結合についてスクリーニングされる。いくつかの態様において、抗原:MHC複体の抗原は、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス (EBV)、エンテロウイルス71 (EV71)、エボラウイルス、A型肝炎 (HAV)、B型肝炎 (HBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、C型肝炎 (HCV)、D型肝炎 (HDV)、E型肝炎 (HEV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、単純ヘルペスウイルス (HSV)、ヒトTリンパ球向性ウイルス (HTLV)、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎 (TBEV)、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス (TEV)、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である。他の態様において、抗原:MHC複体の抗原は、CD45、グリピカン-3、IGF2B3、カリクレイン4、KIF20A、レングシン、メロエ、ムチン5AC (MUC5AC)、サバイビン、サイクリン-A1、MAGE-A1、MAGE-C1、MAGE-C2、SSX2、XAGE1b/GAGE2A、CD19、CD20、CD22、CD52、EGFR、HER2、TRAILR1、RANKL、IGF1R、EpCAM、およびCEAからなる群より選択される腫瘍抗原である。

10

【0025】

方法のいくつかの態様において、ライブラリーは、T細胞表現型マーカーについてスクリーニングされる。方法の他の態様において、ライブラリーは、造血幹細胞表現型マーカーについてスクリーニングされる。方法の他の態様において、ライブラリーは、ナチュラルキラー細胞表現型マーカーについてスクリーニングされる。

20

【0026】

方法のある特定の態様において、ライブラリーは、共培養系における活性についてスクリーニングされ、該共培養系は、(a) がん細胞株；(b) 公知のウイルスに感染した複数の細胞；(c) がん患者から単離された複数の腫瘍細胞；(d) 不死化細胞株；または(e) 患者組織生検に由来する複数の細胞、のうちの少なくとも1つを含む。

【0027】

方法のいくつかの態様において、形質転換された細胞は、インビトロで活性化される。特定の態様において、活性化は、抗CD3抗体、抗CD8抗体、抗CD27抗体、IL-2、IL-4、IL-21、抗PD1抗体、抗CTLA4抗体、腫瘍細胞溶解物、ウイルス感染細胞との細胞共培養、および腫瘍細胞株のうちの1つまたは複数の刺激物質を用いて行われる。

30

【0028】

方法のある特定の態様において、細胞の集団は、転写因子で形質転換される。転写因子は、形質転換された細胞の挙動または表現型に影響を及ぼし得る。いくつかの態様において、転写因子は、FOXP3、BLIMP-1、Helios、Ikaros、およびTGF- β からなる群より選択される。

【0029】

別の局面において、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された組換えTCRライブラリーが、本明細書において提供される。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペ

40

50

プチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、集団は、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはNK細胞を含む。

【0030】

1つの局面において、本技術は、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された組換えTCRライブラリーと、担体とを含む組成物を提供する。いくつかの態様において、担体は、薬学的に許容される担体である。いくつかの担体において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。

【0031】

1つの局面において、組換えTCRライブラリーまたは組換えTCRライブラリーを含む組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、その必要がある対象を処置する方法が、本明細書において提供され、ここで、該組換えTCRライブラリーは、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。

【0032】

別の局面において、組換えTCRライブラリーまたは組換えTCRライブラリーを含む組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、その必要がある対象においてがんを処置する方法が、本明細書において提供され、ここで、該組換えTCRライブラリーは、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは

、mRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。

【0033】

いくつかの態様において、がんは、急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髄性白血病（AML）；副腎皮質癌；AIDS関連がん；肛門がん；虫垂がん；星状細胞腫；非定型奇形腫瘍/ラプドイド腫瘍、脳腫瘍；皮膚の基底細胞癌；胆管がん；膀胱がん；骨がん；乳がん；気管支腫瘍；バーキットリンパ腫；カルチノイド腫瘍（胃腸）；胚細胞腫瘍；原発性CNSリンパ腫；子宮頸がん；胆管細胞癌；脊索腫；慢性リンパ球性白血病（CLL）；慢性骨髄性白血病（CML）；慢性骨髄増殖性新生物；大腸がん；頭蓋咽頭腫；皮膚T細胞リンパ腫；非浸潤性乳管癌（DCIS）；子宮内膜がん；上衣腫；食道がん；感覚神経芽腫；頭蓋外胚細胞腫瘍；性腺外胚細胞腫瘍；眼がん；眼球内黒色腫；網膜芽腫；卵管がん；悪性の骨の線維性組織球腫、および骨肉腫；胆嚢がん；胃（gastric）がん；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質腫瘍（GIST）；胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛性疾患；毛様細胞白血病；頭頸部がん；心臓腫瘍；肝細胞がん；ランゲルハンス細胞組織球症；ホジキンリンパ腫；下咽頭がん；眼球内黒色腫；膵島細胞腫瘍、膵神経内分泌腫瘍；腎臓がん；喉頭がん；白血病；口唇および口腔（oral cavity）がん；肝臓がん；肺がん；リンパ腫；男性乳がん；骨の悪性線維性組織球腫および骨肉腫；黒色腫；メルケル細胞癌；中皮腫；転移性がん；口腔（mouth）がん；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性骨髄腫/形質細胞新生物；菌状息肉腫；慢性の骨髄異形成症候群、骨髄増殖性新生物；鼻咽頭がん；神経芽腫；非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌；口腔（oral）がん、口咽頭がん；骨肉腫；卵巣がん；膵臓がん；膵神経内分泌腫瘍；乳頭腫症；傍神経節腫；副鼻腔がん；副甲状腺がん；咽頭がん；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；胸膜肺芽腫；前立腺がん；直腸がん；再発がん；腎細胞がん；網膜芽腫；横紋筋肉腫；唾液腺がん；肉腫；ユーイング肉腫；カボジ肉腫；骨肉腫；子宮肉腫；セザリー症候群；皮膚がん；小細胞肺癌；小腸がん；軟部組織肉腫；皮膚の扁平上皮癌；頸部扁平上皮がん；胃（stomach）がん；T細胞リンパ腫；精巣がん；咽喉がん；鼻咽頭がん；下咽頭がん；胸腺癌；甲状腺がん；尿道がん；子宮がん；膣がん；血管腫瘍；外陰部がん；またはウィルムス腫瘍である。

【0034】

1つの局面において、組換えTCRライブラリーまたは組換えTCRライブラリーを含む組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、その必要がある対象において腫瘍成長を阻害する方法が、本明細書において提供され、ここで、該組換えTCRライブラリーは、（a）ベクターバックボーン；ならびに（b）TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または（b）TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、腫瘍は固形腫瘍である。

【0035】

別の局面において、組換えTCRライブラリーまたは組換えTCRライブラリーを含む組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、その必要がある対象においてウイルス感染症を

処置する方法が、本明細書において提供され、ここで、該組換えTCRライブラリーは、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含む区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、ウイルス感染症は、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスによって引き起こされる。

【0036】

いくつかの態様において、本明細書において提供される処置の方法は、組換えTCRライブラリーまたは組成物の1つまたは複数の追加的な用量を、対象に投与する工程をさらに含む。

【0037】

いくつかの態様において、組換えTCRライブラリーは、処置される対象にとって自己由来または同種異系である細胞を含む。

【0038】

いくつかの態様において、対象は、ヒト、動物、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ヒツジ、マウス、ウマ、またはウシである。特定の態様において、対象はヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】完全長TCR α : β 可変領域を取得するための、オーバーラップ伸長（OE-PCR）のゲル画像を示す。OE-PCR後に、PCR産物を精製して、DNAゲル電気泳動によって解析した。TCR α : β アンプリコン（約1000 b.p.）が見られ、ネステッドPCRを用いてさらに濃縮した。DNAゲル電気泳動後に、ゲル抽出を行って、TCR α : β アンプリコンを取得した。5 ngの精製されたPCR産物を、半ネステッドPCRを行うための鋳型として用いた。

【図2】ネステッドPCR産物のゲル電気泳動を示す。DNA電気泳動後に、TCR α : β アンプリコンを切り出し、Zymoclean（商標）Gel DNA Recovery Kit（Zymo Research）を用いてゲル精製を行った。精製されたアンプリコンを、zero-blunt cloning（Thermo Fisher Scientific）に供して、TCR α : β アンプリコン配列を解析した。配列を、NCBI IGBLAST T細胞受容体遺伝子データベースによって同定した。

【図3】例示的なpLVX-CMV-TCR1-pTert-iCas9ベクターのベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV6-2リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV38-1、TRAV35、およびTRAC）

、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、tet誘導性プロモーターによって調節され、かつcHS4インスレーター配列が隣接したi-カスパーゼ9自殺スイッチ、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図4】pLVX-CMV-TCR2-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV5-8リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV40、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、tet誘導性プロモーターによって調節され、かつcHS4インスレーター配列が隣接したi-カスパーゼ9自殺スイッチ、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図5】pLVX-CMV-TCR3-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV10-3リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV13-2、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、tet誘導性プロモーターによって調節され、かつcHS4インスレーター配列が隣接したi-カスパーゼ9自殺スイッチ、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図6】pLVX-CMV-TCR4-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV28-1リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV38-1、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、tet誘導性プロモーターによって調節され、かつcHS4インスレーター配列が隣接したi-カスパーゼ9自殺スイッチ、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図7】pLVX-CMV-TCR5-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV24-1リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV38、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、tet誘導性プロモーターによって調節され、かつcHS4インスレーター配列が隣接したi-カスパーゼ9自殺スイッチ、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図8】pLVX-TCR1-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV6-2リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV38-1、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図9】pLVX-TCR2-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV5-8リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV40、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図10】pLVX-TCR3-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV10-3リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV13-2、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図11】pLVX-TCR4-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV28-1リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV38-1、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカー、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図12】pLVX-TCR5-pTert-iCas9のベクターマップを示す。ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子、5'および3' LTR、CMVプロモーター、TCR β 配列（TRBV24-1リーダーペプチド、TRBV25、TRBC）およびTCR α 配列（TRAV38、TRAV35、およびTRAC）、TCR β とTCR α との

間に挿入されたp2A配列、TCR α 配列後に挿入されたIRES配列、mCherry蛍光マーカ、ならびにWPREエンハンサーを含む。

【図 1 3】元のpLVX-EF1 α -IRES-mCherryベクターのベクターマップを示す。

【図 1 4】部位特異的変異誘発を行うことによって過剰なAgeI、SphI、NheI、およびMluI制限部位が排除されている、改変されたpLVX-EF1 α -IRES-mCherryベクターのベクターマップを示す。

【図 1 5】単一細胞エマルジョン化オーバーラップ伸長RT-PCR由来のT細胞受容体 (TCR) アンプリコン (α : β 鎖) のDNA電気泳動解析を示す。左のパネルは、ペアの α : β 鎖TCRアンプリコンのPCR増幅スキームを示す。右のパネルは、1回目の半ネステッドPCR、2回目の半ネステッドPCR、およびMi-seq PCRのDNA電気泳動結果を示す。T細胞受容体アンプリコンを、赤色の四角において強調した。Miseqプライマーは、TRBV遺伝子のFR3領域でアニーリングし、天然でペアのDNA配列解析について約550 bpのペアの α : β PCRアンプリコンを生じた。

10

【図 1 6】連結された α : β T細胞受容体遺伝子分布の概要を示す。ハイスループットシーケンシング後に、未加工のDNA配列を、品質でふるい分けし、NCBI IgBLASTおよびCDR3モチーフアルゴリズムを介してTCR遺伝子使用頻度について注釈をつけ、 α 鎖と β 鎖とをペアにして、TCRレパートリーにコンパイルした。

【図 1 7】変異体抗HIV-Nef-Rm9 TCRの発現およびpMHCに対するその結合親和性の評価を示し、ここで、これらの変異体TCRは、元の野生型抗HIV-Nef-Rm9リーダーペプチドとは異なるリーダーペプチドを含む。これらの非天然リーダーペプチドはすべて、制限酵素切断部位を含むように、サイレントDNA変異配列を有する (元のリーダーペプチドDNA配列および非サイレント変異体リーダーペプチドDNA配列、ならびに導入された制限切断部位を、表7~8に要約する)。

20

【図 1 8】変異体抗HIV-Nef-Rm9 TCRの発現およびpMHCに対するその結合親和性の評価を示す。これらの変異体TCRは、TCRクローニング用の制限切断部位の組み込みのために、TCR定常領域に1つの非サイレント変異または1つのサイレント変異を含む (表7におけるサイレント変異および表8における非サイレント変異をすべて参照されたい)。

【図 1 9】(a) は、ヒト化マウスモデルおよびがん患者の腫瘍特異的T細胞解析のためのヒトエフェクターT細胞の単離を示す。(b) は、単離され、RT-PCR増幅され、NGSを介して解析された31,718種類のヒトCD8+ TCRクラスターにおけるV α : V β 遺伝子使用頻度を示す。

30

【図 2 0】本技術のレンチウイルスTCR細胞ディスプレイプラットフォームを示す。p2aによって分離されたTCR α : β 遺伝子を、IRES TCR発現ベクターの多重クローニング部位 (MCS) 中に挿入した。パッケージングベクターおよびエンベロープベクターのHEK293T細胞へのコトランスフェクションにより、J.RT3/CD8細胞株に (細胞表面で発現する) TCR遺伝子およびmCherryレポーターを形質導入するレンチウイルス粒子が生成される。フロープロット: HIV Nef B*0702 RM9, RPQVPLRPM (SEQ ID NO: 1) で染色された、抗B*0702 NEF TM 9 TCRを有するJ.RT3/CD8。

【図 2 1】(a) は、免疫チェックポイント阻害剤で処置されたヒト化マウスにおけるRKO腫瘍サイズを示す。RKO細胞を標的とする抗原特異的TCRを発見するために、TCRスクリーニングを行う。(b) は、用いられるマウス結腸がんモデルにおける処置群が、抗原特異的免疫療法について同定されたTCRを評価することを示す。

40

【図 2 2】PDXマウスモデルにおいて、抗原特異的がん免疫療法を試験し、かつ最適化するためのワークフローを示す。(左) 患者の腫瘍を単離して、マウス異種移植片として培養し、LN2において凍結保存し、培養において増殖させた。(中央) TCR遺伝子を収集して、PDX細胞に対してスクリーニングした。(右) 抗腫瘍TCR遺伝子を、PDXモデルにおいて遺伝子治療として用いて、処置効力を試験し、かつ最適化した。

【発明を実施するための形態】

【0040】

詳細な説明

50

免疫チェックポイント阻害剤は、腫瘍成長の調節における免疫細胞、特にCD8+ T細胞の重要な役割を強調する、がん治療における素晴らしい進歩を引き起こしている。しかし、免疫受容体シーケンシングにおける最近の進歩により、適応免疫のクローンのランクに基づいた特徴に関する洞察が提供されているが、ペアのTCR α 鎖および β 鎖をシーケンシングし、かつ機能的にスクリーニングすることはできないことによって、腫瘍免疫抑制に関するより広い機能データの収集が妨げられ、かつ遺伝子治療用の抗がんT細胞受容体遺伝子の発見および迅速な治療的使用が複雑化している (Bonter, K. et al., *Regen. Med.* 12, 623-636 (2017); Malherbe, L., *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 103, 76-79 (2009); Ahmad, T. A. et al., *Vaccine Rep.* 6, 13-22 (2016); Maus, M. V. et al., *Annu. Rev. Immunol.* 32, 189-225 (2014); Yee, C. J. *Transl. Med.* 3, 17 (2005))。現在まで、腫瘍特異的T細胞のクローニングおよび機能解析は、実用的に、初代生存T細胞を選別する必要のために、試料当たり数種類の一般的なペプチド-MHCの組み合わせだけに限定されている (Malherbe, L., *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 103, 76-79 (2009); Ahmad, T. A. et al., *Vaccine Rep.* 6, 13-22 (2016); Sanchez-Trincado, J. L. et al., *Journal of Immunology Research* (2017))。各腫瘍試料は、体細胞変異のそれ自体の独自の景観を有するため、有効にスクリーニングすることができる少ない数のペプチド-MHCは、新生抗原発見のために反復スクリーニングが必要であるという事実によって、さらに複雑化される (Martincorena, I. & Campbell, P. J. *Science* 349, 1483-1489 (2015); Tran, E. et al., *Science* aad1253 (2015); Choudhury, N. J. et al., *Eur. Urol. Focus* 2, 445-452 (2016))。T細胞増殖およびELISPOTなどの代替法は、生きているT細胞に依拠し、これは、多くの患者試料において非常に限定されており、ならびに、細胞増殖率、細胞ベースの治療法としての応用のために必要とされる時間、適切なT細胞表現型の特異性および維持に関して限界を有する (Bonter, K. et al., *Regen. Med.* 12, 623-636 (2017); Maus, M. V. et al., *Annu. Rev. Immunol.* 32, 189-225 (2014); Yee, C. J. *Transl. Med.* 3, 17 (2005); Redeker, A. & Arens, R., *Front. Immunol.* 7, (2016))。

【0041】

本明細書に記載される方法および組成物は、これらの支障に直接対処し、患者におけるエピトープ特異的T細胞応答の第1の総合的な配列ベースおよび機能ベースの注釈を提供し、標的がん治療薬の開発を手引きする新しい分子規模での技術を提供する。本技術の組成物および方法は、概して、例えば、がんおよびウイルス感染症のための個別化標的療法としてスクリーニングし、改変し、かつ用いることができる抗原特異的TCRレパートリーの迅速な単離に有用である。本明細書に記載される標的療法は、現在利用可能な細胞ベースの治療法よりも迅速に（わずか5日～2週間で）開発し、かつ投与することができる。加えて、これらの治療法は、複数の別個のTCRを含み、これは、標的とされるエピトープまたは抗原の抑制によって標的細胞が免疫検出を逃れることができる機構である、免疫逃避を回避する、より大きな可能性を有する。

【0042】

さらに、本明細書に記載される方法および組成物の具体的な態様は、TCRライブラリーの作製に対して以前に記述されたアプローチを上回る以下の別個の利点を提供する：(1) いくつかの態様において、TCRライブラリーを細菌のコロニーとして成長させることができ、多数のコロニーを選択し、シーケンシングし、一緒に混合して、定義された生成物として再送達することができる方法が、本明細書に記載される；(2) いくつかの態様において、最終薬物製品に含まれ得るPCRエラーバリエーションの可能性を最小化し、それによって、最終治療用細胞組成物が、副作用を誘導し得る、特徴決定不可能な、かつ潜在的に非常に危険なバリエーションを含有するリスクを低減させる、分離および特徴決定の段階が、本明細書に記載される；(3) いくつかの態様において、合併症およびオフターゲット作用の事象において患者に害を及ぼすリスクを低減させるために、自殺スイッチを含めることが、本明細書に記載される；(4) いくつかの態様において、インビボで所望のTCR機能を達成するかまたは増強するために、細胞を、投与前にあらかじめ刺激する；(5) いくつかの態様において、方法は、強力な抗がん表現型へのT細胞の発生に影響を及ぼすため

に、細胞において転写因子を共発現できることを含む；(6) いくつかの態様において、インビトロ活性化技法は、治療施与に対する患者の特異的応答に依存して必要とされるように改変されてもよい；ならびに(7) いくつかの態様において、開示される方法は、疾患状態が存続するかまたは再発した場合には、患者に対して反復用量の細胞治療を提供するために用いることができる。

【0043】

本発明のある特定の局面、様式、態様、変形物、および特徴が、本技術の実質的な理解を提供するために、様々なレベルの詳細さで以下に説明されることが、認識されるべきである。

【0044】

本発明の実践において、分子生物学、タンパク質生化学、細胞生物学、免疫学、微生物学、および組換えDNAにおける多くの従来の技法が用いられる。例えば、Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition; Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*のシリーズ; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.)のシリーズ; MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; 米国特許第4,683,195号; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*; Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); および Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*を参照されたい。ポリペプチド遺伝子発現産物のレベル(すなわち、遺伝子翻訳レベル)を検出して測定する方法は、当技術分野において周知であり、抗体検出および定量技法などのポリペプチド検出法の使用を含む(Strachan & Read, *Human Molecular Genetics*, Second Edition. (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1999)もまた、参照されたい)。

【0045】

別段の定義がない限り、本明細書において用いられるすべての技術用語および科学用語は、概して、本技術が属する技術分野における当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈上明らかに別段の指図がない限り、複数の指示物を含む。例えば、「1つの細胞(a cell)」への言及は、2つ以上の細胞の組み合わせを含む、などである。概して、本明細書において用いられる命名法、ならびに細胞培養、分子遺伝学、有機化学、分析化学、および核酸化学、および下記のハイブリダイゼーションにおける実験手順は、当技術分野において周知であり、かつ一般的に使用されるものである。本明細書において引用されるすべての参考文献は、あたかも各個々の刊行物、特許、または特許出願が、すべての目的でその全体が参照により具体的にかつ個々に組み入れられるのと同じ程度まで、その全体がかつすべての目的で参照により本明細書に組み入れられる。

【0046】

本明細書において用いられる場合、数に関する「約」という用語は、概して、特に明記されないかまたは別の方法で文脈から明らかではない限り、数のいずれかの方向で(それよりも大きいまたはそれよりも小さい)1%、5%、または10%の範囲内に入る数を含むように解釈される(そのような数が可能な値の0%未満であるかまたは100%を超える場合を除く)。

10

20

30

40

50

【0047】

本明細書において用いられる場合、作用物質または薬物の対象への「投与」は、その意図された機能を果たすように化合物を対象に導入するかまたは送達する任意の経路を含む。投与は、経口、鼻内、非経口（静脈内、筋肉内、腹腔内、もしくは皮下）、直腸、または局所を含む、任意の適している経路によって実施することができる。投与は、自己投与および他者による投与を含む。

【0048】

「アジュバント」とは、免疫系の刺激を引き起こす1つまたは複数の物質を指す。この文脈において、アジュバントは、1つまたは複数のワクチン抗原または抗体に対する免疫応答を増強するために用いられる。アジュバントは、ワクチンの投与の前に、それと組み合わせ、またはその後投与されてもよい。アジュバントとして用いられる化学化合物の例には、アルミニウム化合物、油、ブロックポリマー、免疫刺激複合体、ビタミンおよびミネラル（例えば、ビタミンE、ビタミンA、セレン、およびビタミンB12）、Quil A（サポニン）、細菌および真菌の細胞壁構成要素（例えば、リポ多糖類、リポタンパク質、および糖タンパク質）、ホルモン、サイトカイン、ならびに共刺激因子が含まれる。

【0049】

本明細書において用いられる場合、「抗体」という用語は、例としてかつ非限定的に、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、それらの組み合わせ、ならびに、任意の脊椎動物において、例えば、ヒト、ヤギ、ウサギ、およびマウスなどの哺乳動物、ならびに非哺乳動物種において免疫応答中に産生される類似した分子、例えばサメ免疫グロブリンを含む、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子を、集合的に指す。「抗体」という用語は、他の分子に対する結合を実質的に除外するように、関心対象の分子（または関心対象の非常に類似した分子の群）に特異的に結合するインタクトな免疫グロブリンおよび「抗体断片」または「抗原結合断片」（例えば、生物学的試料における他の分子に対する結合定数よりも少なくとも 10^3 M^{-1} 大きい、少なくとも 10^4 M^{-1} 大きい、または少なくとも 10^5 M^{-1} 大きい、関心対象の分子に対する結合定数を有する抗体および抗体断片）を含む。「抗体」という用語はまた、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異性抗体）などの遺伝子操作された形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997もまた、参照されたい。

【0050】

より詳細には、抗体は、抗原のエピトープを特異的に認識して結合する、少なくとも軽鎖免疫グロブリン可変領域または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンドを指す。抗体は、重鎖および軽鎖から構成され、その各々は、重鎖可変（ V_H ）領域および軽鎖可変（ V_L ）領域と呼ばれる可変領域を有する。共に、 V_H 領域および V_L 領域は、抗体によって認識される抗原への結合を担う。典型的には、免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続された重（H）鎖および軽（L）鎖を有する。2つのタイプの軽鎖、ラムダ（ λ ）およびカッパ（ κ ）がある。抗体分子の機能的活性を決定する5つの主な重鎖クラス（またはアイソタイプ）：IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEがある。各重鎖および軽鎖は、定常領域および可変領域を含有する（領域は「ドメイン」としても知られる）。組み合わせにおいて、重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、抗原に特異的に結合する。軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる3つの超可変領域によって分断されている「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびCDRの範囲は、定義されている（参照により本明細書に組み入れられる、Kab at et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照されたい）。Kabatデータベースは、現在オンラインで維持されている。様々な軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で相対的に保存されている。構成要素である軽鎖および重鎖の組み合わせられたフレーム領域である、抗体のフレームワーク領域は、主として、 β シートコンフォメーションを採り、CDRは、 β シート構造を接続し、いくつかの場合にはその一部を形成する、ループを形成す

る。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合性相互作用によってCDRを正しい配向に位置づけることを提供するスキャフォールドを形成するように作用する。

【0051】

本明細書において用いられる場合、「相補性決定領域」または「CDR」とは、抗原または抗原:MHC複合体のエピトープに対する結合を主として担う、抗体またはTCRの領域を指す。CDRはまた、超可変領域とも呼ばれる。各TCRまたは抗体鎖のCDRは、典型的には、N末端から開始して順次番号がつけられたCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれ、かつまた、典型的には、特定のCDRが位置する鎖によって同定される。異なる特異性（すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位）を有する抗体およびTCRは、異なるCDRを有する。CDR内の限定された数のアミノ酸位置のみが、抗原結合に直接関与している。CDR内のこれらの位置は、特異性決定残基（SDR）と呼ばれる。

10

【0052】

本明細書において用いられる場合、「抗原」とは、抗体が選択的に結合することができる分子を指す。標的抗原は、タンパク質（例えば、抗原ペプチド）、糖質、核酸、脂質、ハプテン、または他の天然に存在する化合物もしくは合成化合物であってもよい。標的抗原は、ポリペプチドまたはペプチド模倣物であってもよい。抗原はまた、動物において免疫応答を生成するために、動物に投与されてもよい。いくつかの態様において、抗原は、1つまたは複数のエピトープを含む。いくつかの態様において、抗原または抗原に由来するエピトープは、MHCクラスI複合体またはMHCクラスII複合体中にロードすることができる。

20

【0053】

本明細書において用いられる場合、細胞に関する「自己由来」という用語は、単離され、同じ対象（例えば、レシピエント、ドナー、または宿主）中に投与して戻される細胞を指す。「同種異系」とは、自己由来ではない細胞を指す。

【0054】

本明細書において用いられる場合、「結合親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原または抗原ペプチド）との間の非共有結合性相互作用全体の強度を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、概して、解離定数（ K_d ）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載されるものを含む、当技術分野において公知の標準的な方法によって測定することができる。低親和性複合体は、概して抗原から容易に解離する傾向がある抗体を含有するのに対して、高親和性複合体は、概してより長い持続期間にわたって抗原に結合したままである傾向がある抗体を含有する。

30

【0055】

本明細書において用いられる場合、「B細胞」という用語は、適応免疫系の液性免疫におけるリンパ球のタイプを指す。B細胞は、主に、抗原相互作用による活性化後に、抗体を作る、抗原提示細胞として働く、サイトカインを放出する、およびメモリーB細胞を発生するように機能する。B細胞は、細胞表面上のB細胞受容体の存在によって、T細胞などの他のリンパ球から区別される。B細胞は、単離されるか、または市販の供給源から得られるかのいずれかであってもよい。市販のB細胞株の非限定的な例には、株AHH-1（ATCC（登録商標） CRL-8146（商標））、BC-1（ATCC（登録商標） CRL-2230（商標））、BC-2（ATCC（登録商標） CRL-2231（商標））、BC-3（ATCC（登録商標） CRL-2277（商標））、CA46（ATCC（登録商標） CRL-1648（商標））、DG-75 [D.G.-75]（ATCC（登録商標） CRL-2625（商標））、DS-1（ATCC（登録商標） CRL-11102（商標））、EB-3 [EB3]（ATCC（登録商標） CCL-85（商標））、Z-138（ATCC #CRL-3001）、DB（ATCC CRL-2289）、Toledo（ATCC CRL-2631）、Pfiffer（ATCC CRL-2632）、SR（ATCC CRL-2262）、JM-1（ATCC CRL-10421）、NFS-5 C-1（ATCC CRL-1693）；NFS-70 C10（ATCC CRL-1694）、NFS-25 C-3（ATCC CRL-1695）、およびSUP-B15（ATCC CRL-1929）が含まれる。さらなる例には、未分化大細胞リンパ腫に由来する細胞株、例えば、DEL、DL-40、FE-PD、JB6、Karpas 299、Ki-JK、Mac-2A Ply1、SR-786、SU-DHL-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、および-16、DOHH

40

50

-2、NU-DHL-1、U-937、Granda 519、USC-DHL-1、RL；ホジキンリンパ腫に由来する細胞株、例えば、DEV、HD-70、HDL-2、HD-MyZ、HKB-1、KM-H2、L 428、L 540、L1236、SBH-1、SUP-HD1、SU/RH-HD-1が含まれるが、それらに限定されない。そのような市販の細胞株についての非限定的な例示的供給源には、American Type Culture Collection、すなわちATCC (www.atcc.org/) およびGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>) が含まれる。

【0056】

本明細書において用いられる場合、「同族」という用語は、2つの分子の間（例えば、受容体とそのリガンドとの間）の対応を表明する関係を指す。TCRの文脈において、「同族ペア」とは、単一T細胞に由来する2つの別個のTCRポリペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの関係（例えば、単一T細胞に由来するTCR α 鎖およびTCR β 鎖）を指す。「同族」はまた、TCRと、それが特異的に結合する対応する抗原:MHC複合体との間の関係も指し得る。

【0057】

本明細書において用いられる場合、「CRISPR」という用語は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）経路（CRISPR）に依拠する配列特異的遺伝子操作の技法を指す。CRISPRは、遺伝子編集および/または遺伝子制御を行うために、ならびに単にタンパク質を特異的なゲノム上の場所にターゲティングするために用いることができる。遺伝子編集とは、標的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、ポリヌクレオチド配列に対する欠失、挿入、または塩基置換の導入を通して変更される、遺伝子操作のタイプを指す。いくつかの局面において、CRISPR媒介性遺伝子編集は、編集を行うために非相同末端結合（NHEJ）または相同組換えの経路を利用する。遺伝子制御とは、タンパク質またはRNAなどの特定の遺伝子産物の産生を増加させることまたは減少させることを指す。

【0058】

本明細書において用いられる場合の「ガイドRNA」または「gRNA」という用語は、CRISPR複合体を、細胞のゲノムの特異的領域などの特異的なヌクレオチド配列にターゲティングするために用いられる、ガイドRNA配列を指す。標的特異性のためにgRNAおよびドナー治療用ポリヌクレオチドを設計する技法は、当技術分野において周知である。例えば、Dench, J., et al. Nature biotechnology 2014; 32(12):1262-7、Mohr, S. et al. (2016) FEBS Journal 283: 3232-38、およびGraham, D., et al. Genome Biol. 2015; 16: 260。gRNAは、CRISPR RNA (crRNA) およびトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) を含む融合ポリヌクレオチド；またはCRISPR RNA (crRNA) およびトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) を含むポリヌクレオチドを含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまださらにそれからなる。いくつかの局面において、gRNAは合成である（Kelley, M. et al. (2016) J of Biotechnology 233 (2016) 74-83）。

【0059】

本明細書において用いられる場合、「検出可能なマーカー」という用語は、直接または間接的に、検出可能なシグナルを生じることができる、少なくとも1つのマーカーを指す。例示的なマーカーの非網羅的なリストには、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの、例えば、比色法、蛍光、発光によって検出可能なシグナルを生じる酵素、蛍光、発光色素などの発色団、電子顕微鏡によって、もしくは伝導率、電流測定、ボルタンメトリー、インピーダンスなどのその電気的特性によって検出される電子密度を有する基、例えば、その分子が、その物理的特性および/もしくは化学的特性において検出可能な修飾を誘導するのに十分なサイズであり、そのような検出が、回折、表面プラズモン共鳴、表面変化、接触角変化などの光学的方法、もしくは原子間力分光法、トンネル効果などの物理的方法によって達成され得る検出可能な基、または、 ^{32}P 、 ^{35}S 、もしくは ^{125}I などの放射性分子が含まれる。

【0060】

本明細書において用いられる場合、「精製マーカー」という用語は、精製または同定に有用な少なくとも1つのマーカーを指す。このマーカーの非網羅的なリストには、His、lacZ、GST、マルトース結合タンパク質、NusA、BCCP、c-myc、CaM、FLAG、GFP、YFP、cherry、チオレドキシン、ポリ(NANP)、V5、Snap、HA、キチン結合タンパク質、Softag 1、Softag 3、Strep、またはSタンパク質が含まれる。適している直接蛍光マーカーまたは間接蛍光マーカーには、FLAG、GFP、YFP、RFP、dTomato、cherry、Cy3、Cy 5、Cy 5.5、Cy 7、DNP、AMCA、ビオチン、ジゴキシゲニン、Tamra、Texas Red、ローダミン、Alexa fluor s、FITC、TRITC、または任意の他の蛍光色素もしくはハプテンが含まれる。

【0061】

本明細書において用いられる場合、組成物の「有効量」または「治療的有效量」という用語は、所望の治療効果を達成するのに十分な量、例えば、処置されている疾患に関連する症状、例えば、がんまたはウイルス感染症に関連する疾患または医学的状态における減少を結果としてもたらす量である。対象に投与される本技術の組成物の量は、疾患のタイプおよび重篤度に、ならびに、全身の健康、年齢、性別、体重、および薬物に対する耐性などの個体の特性に依存するであろう。これはまた、疾患の程度、重篤度、およびタイプにも依存するであろう。当業者は、これらの要因および他の要因に依存して、適切な投与量を決定することができるであろう。本技術の組成物はまた、1つまたは複数の追加的な治療用化合物と組み合わせて投与することもできる。いくつかの態様において、有効量とは、がんまたはウイルス感染症の中和において部分的にまたは完全に有効である、本技術の細胞の量を指す。

【0062】

本明細書において用いられる場合、「エピトープ」という用語は、抗体またはTCRに特異的に結合することができるタンパク質決定基を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的活性表面グループ分けからなり、通常、特異的な三次元構造特性、および特異的な電荷特性を有する。コンフォメーションエピトープと非コンフォメーションエピトープとは、変性溶媒の存在下で、前者に対する結合は失われるが、後者に対する結合は失われない点で区別される。

【0063】

本明細書において用いられる場合、「発現」とは、以下のうちの1つまたは複数を含む：遺伝子の前駆mRNAへの転写；成熟mRNAを産生するための前駆mRNAのスプライシングおよび他のプロセッシング；mRNAの安定；成熟mRNAのタンパク質への翻訳（コドン使用頻度およびtRNA利用可能性を含む）；ならびに、妥当な発現および機能に必要とされる場合には、翻訳産物のグリコシル化および/または他の修飾。

【0064】

本明細書において用いられる場合、「発現の上昇」とは、対照または参照試料と比較した、遺伝子発現またはタンパク質発現における増加（例えば、対照または正常参照試料と比較した、少なくとも2倍、約2倍～約150倍、5倍～150倍、5倍～100倍、10倍～150倍、10倍～100倍、50倍～150倍、50倍～100倍、75倍～150倍、または75倍～100倍の増加）を指す。「発現の減少」とは、対照または参照試料と比較した、遺伝子発現またはタンパク質発現における全体的な低減（例えば、20%以上、50%以上、または75%、80%、85%、90%、95%、もしくはそれよりも高い）を指す。遺伝子発現またはタンパク質発現における増加または減少は、当技術分野において公知の、または本明細書に記載される任意の有用な方法（例えば、ELISA）を用いて測定することができる。治療応用のためには、「減少」とは、障害（例えば、タウオパチー、TBI、または卒中）に関連するポリペプチドまたはタンパク質のレベルの低減を指すことができる。診断応用またはモニタリング応用のためには、「減少」とは、診断アッセイまたはモニタリングアッセイによって検出されるタンパク質または核酸のレベルの減少を指すことができる。

【0065】

本明細書において用いられる場合、「遺伝子」という用語は、プロモーター、エクソン、イントロン、および発現を調節する他の非翻訳領域を含む、RNA産物の制御された生合

成のための情報をすべて含有する、DNAのセグメントを意味する。

【0066】

本明細書において用いられる場合、非ヒトタンパク質（例えば、マウスTCR）の「ヒト化」型という用語は、タンパク質の非ヒトホモログに由来する最小配列を含有する、キメラタンパク質である。大部分について、ヒト化タンパク質は、レシピエントの可変領域残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナーTCR）由来の可変領域残基によって置き換えられている、ヒトTCRである。

【0067】

本明細書において用いられる場合、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において用いられる際の「同一」またはパーセント「同一性」という用語は、下記のデフォルトパラメータでのBLASTもしくはBLAST 2.0配列比較アルゴリズムを用いて、または手動のアラインメントおよび目視検査、例えば、NCBIウェブサイトによって測定された際に同じであるか、または指定されたパーセンテージの同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチド（すなわち、比較ウィンドウまたは明示された領域にわたる最大の対応について比較され、アラインメントされた時に、指定された領域（例えば、本明細書に記載される抗体をコードするヌクレオチド配列、または本明細書に記載される抗体のアミノ酸配列）にわたる、約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれよりも高い同一性）を有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。そのような配列はその時、「実質的に同一」とであると言われる。この用語はまた、試験配列の相補を指すか、またはそれに適用することもできる。この用語はまた、欠失および/または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列も含む。いくつかの態様において、同一性は、少なくとも約25個のアミノ酸長もしくはヌクレオチド長、または50~100個のアミノ酸長もしくはヌクレオチド長である領域にわたって存在する。

【0068】

「Kozakコンセンサス配列」または「Kozak配列」とは、翻訳開始部位としてリボソームによって認識されるmRNA配列である。Kozak配列は、翻訳の開始のための開始コドン（イニシエーションコドンとしても公知である）および追加的な隣接ヌクレオチドを含む。開始コドンは、翻訳されるポリペプチドのN末端のメチオニンアミノ酸を特定する。脊椎動物のためのKozakコンセンサス配列は、当技術分野において公知である（例えば、Kozak, M. 1987 Nucleic Acids Res. 15(20): 8125-48）。いくつかの態様において、Kozak配列は、「強い」ように改変することができ、これは、ヌクレオチド配列が、特に第1番のヌクレオチドに比べて+4および-3のヌクレオチドで、コンセンサス配列に厳密に合致することを意味する。「適格の」Kozak配列は、これらの合致するヌクレオチドのうちの1つのみを有し、他方、「弱い」Kozak配列は、いずれの合致するヌクレオチドも有さない。Kozak配列の強度は、発現したmRNAから翻訳されるポリペプチドの量と直接相関する。概して、強いKozak配列は、発現したmRNAのより高い効率の翻訳を結果としてもたらし、他方、弱いKozak配列を有するmRNAからは、より少ないポリペプチドが転写される。

【0069】

本明細書において用いられる場合、「主要組織適合複合体」または「MHC」とは、抗原をT細胞に提示する、細胞表面タンパク質を指す。クラスI MHC分子は、CD8+ T細胞によって認識される。クラスII MHC分子は、CD4+ T細胞によって認識される。抗原またはそのエピトープがロードされたMHC分子は、抗原:MHC複合体と呼ばれる。

【0070】

本明細書において用いられる場合、ナチュラルキラー細胞としても公知の「NK細胞」という用語は、骨髄が起源であり、自然免疫系において重要な役割を果たす、リンパ球のタイプを指す。NK細胞は、抗体および細胞表面上の主要組織適合複合体の非存在下でさえも、ウイルス感染細胞、腫瘍細胞、または他のストレスを受けた細胞に対して迅速な免疫応答を提供する。NK細胞は、単離されるか、または市販の供給源から得られるかのいずれかであってもよい。市販のNK細胞株の非限定的な例には、株NK-92（ATCC（登録商標） CRL-

10

20

30

40

50

2407（商標））、NK-92MI（ATCC（登録商標） CRL-2408（商標））が含まれる。さらなる例には、NK株HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、NOI-90、およびYTが含まれるが、それらに限定されない。そのような市販の細胞株についての非限定的な例示的供給源には、American Type Culture Collection、すなわちATCC (<http://www.atcc.org/>) およびGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>) が含まれる。

【0071】

本明細書において用いられる場合、「機能的に連結される」という用語は、同じ核酸分子の一部として連結される2つ以上のポリヌクレオチドを指す。いくつかの態様において、連結されたポリヌクレオチドは、同じ発現調節エレメントから開始される転写のために、適切に位置づけられ、かつ配向される。いくつかの態様において、発現調節エレメント（例えば、プロモーター）に機能的に連結されたポリヌクレオチドの転写は、発現調節エレメントによって調節され、制御され、または影響を受ける。

10

【0072】

本明細書において用いられる場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的投与に適合性である、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌化合物および抗真菌化合物、等張化合物および吸収遅延化合物などを含むように意図される。薬学的に許容される担体およびその製剤は、当業者に知られており、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition, ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.)に記載されている。

【0073】

本明細書において用いられる場合、「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、修飾されていないかまたは修飾されたRNAまたはDNAであってもよい、任意のRNAまたはDNAを意味する。ポリヌクレオチドには、非限定的に、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるRNA、ならびに、一本鎖、またはより典型的には二本鎖、または一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であってもよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が含まれる。加えて、ポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む、三本鎖領域を指す。ポリヌクレオチドという用語はまた、1つまたは複数の修飾された塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性のためまたは他の理由のために修飾されたバックボーンを有するDNAまたはRNAも含む。

20

30

【0074】

本明細書において用いられる場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合によって互いに連結された2個以上のアミノ酸、すなわち、ペプチド同配体を含むポリマーを意味するように、本明細書において互換的に用いられる。ポリペプチドとは、ペプチド、グリコペプチド、またはオリゴマーと一般的に呼ばれる短い鎖、および、タンパク質と概して呼ばれる、より長い鎖の両方を指す。ポリペプチドは、20種類の遺伝子にコードされるアミノ酸以外のアミノ酸を含有してもよい。ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングなどの天然のプロセスによって、または当技術分野において周知である化学修飾技法によってのいずれかで修飾されたアミノ酸配列を含む。そのような修飾は、基本的なテキストに、およびより詳細な単行本に、ならびに多数の研究文献に、十分に記載されている。

40

【0075】

ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、または細胞を、他の細胞または細胞構成要素から取り出すために、物理的方法、機械的方法、または化学的方法が使用されている場合に、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、または細胞は、「単離されている」または「実質的に純粋である」と言われてもよい。単離されたポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、または細胞（例えば、単離された細胞）、「実質的に純粋な」または「実質的に純粋でありかつ単離された」ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、または細胞は、典型的には、それが天然で会合しているタンパク質および天然に存在する有機分子を、少なくとも60重量%含まない場合に、細胞構成要素から取り出され、実質的に

50

純粋であると考えられる。ポリペプチドは、重量で少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または99%純粋であり得る。実質的に純粋なポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、または細胞（例えば、実質的に純粋な抗体またはその断片）は、標準的な技法によって、例えば、ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって、またはポリペプチドを化学的に合成することによって、取得され得る。純度は、任意の適切な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミド電気泳動、またはHPLC解析によって、測定することができる。

【0076】

本明細書において用いられる場合、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関して用いられる際の「組換え」という用語は、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入、または天然の核酸もしくはタンパク質の変更によって改変されていること、または、物質が、そのように改変された細胞に由来することを示す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）型内には見出されない遺伝子を発現するか、または、さもなければ異常に発現しているか、不十分に発現しているか、もしくは全く発現していない天然の遺伝子を発現する。

【0077】

本明細書において用いられる場合、「別々の」治療的使用という用語は、少なくとも2つの活性成分の、同時の、または異なる経路による実質的に同時の投与を指す。

【0078】

本明細書において用いられる場合、「反復の」治療的使用という用語は、異なる時の、同一であるかまたは異なる投与経路での活性成分の投与を指す。より詳細には、順次使用とは、同じかまたは異なる活性成分の第2の投与が始まる前の、活性成分の全投与を指す。したがって、第2の投与の前に、活性成分のうちの1つを、数分、数時間、数日、数か月、または数年にわたって投与することが可能である。

【0079】

本明細書において用いられる場合、「対象」、「個体」、および「患者」という用語は、互換的に用いられ、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、家庭内の動物（例えば、イヌ、ネコなど）、農場の動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）、野生の動物（コウモリ、アライグマ、キツネ、スカンク、リス、シマリス、ネズミ、ウサギなど）、および実験動物（例えば、サル、ラット、マウス、ウサギ、モルモットなど）を指す。いくつかの態様において、対象は哺乳動物である。特定の態様において、対象はヒトである。

【0080】

本明細書において用いられる場合、「スイッチ」という用語は、組換えTCRまたは組換えTCRの構成要素の発現、活性化、または安定性が調節される機構（すなわち、TCRを「オン」または「オフ」にする機構）を指す。スイッチ機構には、活性化されるために1つよりも多い構築物の共発現を必要とするTCR発現系、自殺スイッチ、安全スイッチ、および活性化のために多量体化を必要とするTCRが含まれるが、それらに限定されない。いくつかの態様において、スイッチは誘導性である。

【0081】

本明細書において用いられる場合、「T細胞」という用語は、胸腺において成熟する、リンパ球のタイプを指す。T細胞は、細胞媒介性免疫において重要な役割を果たし、細胞表面上のT細胞受容体の存在によって、B細胞などの他のリンパ球から区別される。T細胞は、単離されるか、または市販の供給源から得られるかのいずれかであってもよい。「T細胞」には、ヘルパーT細胞（CD4+細胞）、細胞傷害性T細胞（CD8+細胞）、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞（Treg）、および γ δ T細胞を含む、CD3を発現する免疫細胞のすべてのタイプが含まれる。「細胞傷害性細胞」には、CD8+ T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、および好中球が含まれ、該細胞は、細胞傷害応答を媒介することができる。市販のT細胞株の非限定的な例には、株BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC (登録商標) CRL-2902 (商標))、BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC (登録商標) CRL-2900 (商標))、BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC (登録商標) CRL-2901 (商標))、BCL2 Jurkat (ATCC (登録商標) CRL-2899

10

20

30

40

50

(商標))、Neo Jurkat (ATCC (登録商標) CRL-2898 (商標))、TALL-104細胞傷害性ヒトT細胞株 (ATCC # CRL-11386) が含まれる。さらなる例には、成熟T細胞株、例えば、Deglis、EBT-8、HPB-MLp-W、HUT 78、HUT 102、Karpas 384、Ki 225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1、およびT34など；ならびに未熟T細胞株、例えば、ALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas 45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT 3、MOLT-4、MOLT 13、MOLT-16、MT-1、MT-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、RPMI-8402、ST-4、SUP-T1~T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1、-2、-3、および-4、CCRF-HSB-2 (CCL-120.1)、J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153)、J45.01 (ATCC CRL-1990)、J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063)、RS4;11 (ATCC CRL-1873)、CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119)；ならびに皮膚T細胞リンパ腫株、例えば、HuT78 (ATCC CRM-TIB-161)、MJ[G11] (ATCC CRL-8294)、HuT102 (ATCC TIB-162) が含まれるが、それらに限定されない。REH、NALL-1、KM-3、L92-221を含むがそれらに限定されない、ヌル白血病細胞株が、K562赤白血病、THP-1単球性白血病、U937リンパ腫、HEL赤白血病、HL60白血病、HMC-1白血病、KG-1白血病、U266骨髓腫などの他の白血病およびリンパ腫に由来する細胞株と同様に、別の市販の供給源の免疫細胞である。そのような市販の細胞株についての非限定的な例示的供給源には、American Type Culture Collection、すなわちATCC (<http://www.atcc.org/>) およびGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>) が含まれる。

【0082】

本明細書において用いられる場合、「T細胞受容体」または「TCR」という用語は、シグナル伝達の媒介に関与するCD3複合体の不変タンパク質と会合している免疫グロブリンスーパーファミリーのヘテロ二量体細胞表面タンパク質を指す。TCRは、2本の同族タンパク質鎖：アルファ (α) 鎖およびベータ (β) 鎖 (それぞれ、TRA (Entrez gene: 6955) およびTRB遺伝子 (Entrez gene: 6957) によってコードされる)、またはガンマ (γ) 鎖およびデルタ (δ) 鎖 (それぞれ、TRG (Entrez gene: 6965) およびTRD遺伝子 (Entrez gene: 6964) によってコードされる) から構成されている。各鎖は、2つの細胞外ドメイン：可変 (V) 領域および定常 (C) 領域から構成されている。定常領域は、細胞膜の近位であり、次に膜貫通領域および短い細胞質尾部が続く。他方、可変領域は、抗原:MHC複合体に結合する。TCRのα鎖およびβ鎖両方の可変ドメインは各々、3つの超可変領域または相補性決定領域 (CDR) を有する。通常は抗原と接触せず、したがってCDRとは考えられない、β鎖上の超可変性の追加的な区域 (HV4) もある。CDR3は、プロセシングされた抗原の認識を担う主なCDRであるが、α鎖のCDR1もまた、抗原ペプチドのN末端部分と相互作用することが示されており、それに対して、β鎖のCDR1は、ペプチドのC末端部分と相互作用する。CDR2は、MHCを認識すると考えられている。β鎖のCDR4は、抗原認識に関係すると考えられていないが、スーパー抗原と相互作用することが示されている。TCRの定常ドメインは、システイン残基が、2本の鎖の間の連結を形成するジスルフィド結合を形成する、短い接続配列からなる。

【0083】

対象におけるTCRの多様なレパートリーは、可変 (V)、連結 (J)、および多様性 (D) 遺伝子セグメントを再構成する体細胞組換え機構である、V(D)J組換えによって達成される。ヒトにおいて、TRA遺伝子座は、54個のTRAV (V) セグメント、61個のTRAJ (J) セグメント、および唯一の定常TRAC (C) セグメントを含む。TRB遺伝子座は、64~67個のTRBV (V) セグメント、2個のTRBD (D) セグメント、14個のTRBJ (J) セグメント、および2個のTRBC (C) セグメントを含む。TRG遺伝子座は、12~15個のTRGV (V) セグメント、5個のTRGJ (J) セグメント、および2個のTRGC (C) セグメントを含む。TRD遺伝子座は、TRA遺伝子座に埋め込まれており、8個のTRDVまたはTRAV/DV (V) セグメント、3個のTRDD (D) セグメント、4個のTRDJ (J) セグメント、および1個のTRDC (C) セグメントを含有する。TCRアミノ酸配列の非限定的な例は、当技術分野において公知であり、本明細書において提供される。

【 0 0 8 4 】

ヒトTCR (α) 鎖TRACセグメント :

PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMD
FKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQN
LSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO: 2)

【 0 0 8 5 】

ヒトTCR (β) 鎖TRBC1セグメント :

EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVS
TDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR
AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMA
MVKRKDF (SEQ ID NO: 3)

10

【 0 0 8 6 】

ヒトTCR (β) 鎖TRBC2セグメント :

DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVS
TDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR
AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMA
MVKRKDSRG (SEQ ID NO: 4)

20

【 0 0 8 7 】

ヒトTCR (γ) 鎖TRGC1セグメント :

DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKHWQEKKSNTILGSQE
GNTMKTNDTYMKFSWLTVPKSLDKEHRCIVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMD
PKDNCSKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKSVMYFAIITCCLLRRTAFCCNGEKS
(SEQ ID NO: 5)

30

【 0 0 8 8 】

ヒトTCR (γ) 鎖TRGC2セグメント :

DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDIIKHWQEKKSNTILGSQE
GNTMKTNDTYMKFSWLTVPKSLDKEHRCIVRHENNKNGIDQEIIFFPIKTDVTTVDP
KDSYSKDANDVITMDPKDNWSKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKSVMYFAIIT
CCLLGRTAFCCNGEKS (SEQ ID NO: 6)

【 0 0 8 9 】

ヒトTCR (δ) 鎖TRDCセグメント :

SQPHTKPSVFMKNGTNVACLVEFYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAV
KLGKYEDSNSVTCSVQHDKNTVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSKCHKPK
AIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL (SEQ ID NO: 7)

40

【 0 0 9 0 】

本明細書において用いられる場合、「治療剤」という用語は、有効量で存在する時に、その必要がある対象に対して所望の治療効果を生じる、核酸、組換えTCR、ベクター、細胞、または細胞の集団を意味するように意図される。

【 0 0 9 1 】

本明細書に記載されるTCRのアミノ酸配列改変が、企図される。例えば、TCRの結合親和

50

性および/または他の生物学的特性を改善することが、望ましい場合がある。TCRのアミノ酸配列バリエーションは、適切なヌクレオチド変化をTCR核酸中に導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。そのような改変には、例えば、TCRのアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/またはその中への挿入、および/またはその置換が含まれる。得られたTCRが所望の特性を保有する限り、欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせが、関心対象のTCRを得るために行われる。改変にはまた、タンパク質のグリコシル化のパターンの変化も含まれる。置換変異誘発のための最も強い関心対象の部位には、超可変領域が含まれるが、FRの変更もまた企図される。「保存的置換」を、以下の表に示す。

【0092】

(表1) アミノ酸置換

元の残基	例示的置換	保存的置換
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys

10

20

元の残基	例示的置換	保存的置換
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser

10

20

30

40

元の残基	例示的置換	保存的置換
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

10

【0093】

本明細書において用いられる場合、「特異的に結合する」とは、別の分子（例えば、抗原:MHC複合体）を認識して結合するが、他の分子は実質的に認識して結合しない、分子（例えば、TCR）を指す。特定の分子（例えば、特定の細胞、抗原、エピトープ、または抗原:MHC複合体）への「特異的結合」、「に特異的に結合する」、または「に特異的」とあるという用語は、本明細書において用いられる場合、例えば、それが結合する分子について少なくとも約 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M、またはそれよりも大きい K_d を有する分子によって示され得る。「特異的に結合する」という用語はまた、分子（例えば、TCR）が、特定の細胞、抗原、エピトープ、または抗原:MHC複合体に、任意の他の細胞、抗原、エピトープ、または抗原:MHC複合体に実質的に結合することなく結合する結合も指し得る。例えば、TCRは、1つの抗原:MHC複合体に対して別の抗原:MHC複合体に対してよりも、例えば、少なくとも10～100倍高い親和性（例えば、 10^1 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍、 10^7 倍、 10^8 倍、 10^9 倍、または 10^{10} 倍高い親和性）を有し得る。

20

【0094】

本明細書において用いられる場合、「ベクター」という用語は、プラスミド、ウイルス、コスミド、ファージ、BAC、YACなどを含むがそれらに限定されない、様々な宿主間の移動のために設計された核酸構築物を指す。いくつかの態様において、プラスミドベクターは、市販のベクターから調製されてもよい。他の態様において、ウイルスベクターは、当技術分野において公知の技法に従って、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、AAVなどから作製されてもよい。1つの態様において、ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。

30

【0095】

本明細書において用いられる場合の「プロモーター」という用語は、遺伝子などのコード配列の発現を制御する任意の配列を指す。プロモーターは、例えば、構成的、誘導性、抑制性、または組織特異的であってもよい。「プロモーター」とは、転写の開始および速度が調節されるポリヌクレオチド配列の領域である、調節配列である。これは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの制御性タンパク質および分子がそこで結合し得る、遺伝子エレメントを含有し得る。プロモーターの非限定的な例には、p2A、CMV、およびE1 α が含まれる。

40

【0096】

組換え細胞の作製に適用される場合の「形質導入する」または「形質導入」という用語は、それによって外来ヌクレオチド配列が細胞中に導入されるプロセスを指す。いくつかの態様において、この形質導入は、ベクターを介して行われる。

【0097】

本明細書において用いられる場合の「処置すること」または「処置」は、ヒトなどの対象における、本明細書に記載される疾患または障害の処置に及び、(i) 疾患もしくは障

50

害を阻害すること、すなわち、その発生を停止すること；(ii) 疾患もしくは障害を軽減すること、すなわち、障害の退縮を引き起こすこと；(iii) 障害の進行を遅くすること；および/または(iv) 疾患もしくは障害の1つもしくは複数の症状を阻害すること、軽減すること、もしくはその進行を遅くすることを含む。「がんを処置すること」によっては、がんまたはがん細胞が、例えば、緩和される、低減する、治癒する、または寛解の状態に置かれることが意味される。「ウイルス感染症を処置すること」によっては、ウイルスまたはウイルス負荷が、例えば、緩和される、低減する、治癒する、または寛解の状態に置かれることが意味される。

【0098】

本明細書に記載されるようながんおよびウイルス感染症の処置の様々な様式は、全体を含むが、全体に満たない処置も含む、「実質的」を意味するように意図され、対象の寿命の延長などのいくつかの生物学的または医学的に関係がある結果が達成されることもまた、認識されるべきである。処置は、再発を阻止するための連続的な長期の処置、または急性処置のための数回の投与であってもよい。

【0099】

I. 本技術の組成物

1つの局面において、本技術は、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む、組換えT細胞受容体 (TCR) ライブラリーベクターであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画に存在する単一の溶解されたT細胞から単離されたmRNAに由来している、前記ベクターを提供する。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬または逆転写PCR (RT-PCR) を用いて単離される。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル (例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル) または小滴である。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、区画の内側で単離される。

【0100】

「ベクター」という用語は、分裂しない細胞および/またはゆっくり分裂する細胞に感染して形質導入し、標的細胞のゲノム中に組み込まれる能力を保持する、組換えベクターを意図する。いくつかの態様において、ベクターは、野生型ウイルスに由来するか、またはそれに基づく。さらなる態様において、ベクターは、野生型レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルスに由来するか、またはそれに基づく。そのようなものの例には、非限定的に、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ヒトTリンパ球向性ウイルス1型 (HTLV-1)、ヒトTリンパ球向性ウイルス2型 (HTLV-2)、ヒトアデノウイルス (HadV-1~57)、アデノ随伴ウイルス (AAV)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、サル免疫不全ウイルス (SIV) およびネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ならびにマウス白血病ウイルス (MLV) が含まれる。本開示によるウイルスベクターは、特定のウイルスの構成要素に限定される必要がないことが、明白であろう。ウイルスベクターは、2種類以上の異なるウイルスに由来する構成要素を含んでもよく、かつまた、合成構成要素を含んでもよい。

【0101】

ベクターのある特定の態様において、ベクターバックボーンは、レトロウイルスベクターバックボーン、レンチウイルスベクターバックボーン、アデノウイルスベクターバックボーン、およびアデノ随伴ウイルスベクターバックボーンからなる群より選択される。ベクターバックボーンのゲノムは、それが元々由来したウイルス由来の構成要素を含む。例えば、いくつかの態様において、ベクターバックボーンは、逆転写システムおよび組み込みシステムを含む、RNAゲノムと適合性の本質的なベクター構成要素を含有する。いくつか

の態様において、これらには、特定のレトロウイルスに由来するgagタンパク質およびpolタンパク質が含まれる。いくつかの態様において、ベクターバックボーンの構造構成要素は、所望の有用な特性を提供するために、遺伝学的にまたは別の方法で変更されている。例えば、ベクターに様々な標的特異性を与えるために、ベクター作製システムにおいて様々なenv遺伝子を用いることによって、ベクター宿主範囲および標的細胞型を変更することができる。

【0102】

特定の態様において、ベクターバックボーンは、レンチウイルスベクターバックボーン、例えば、pLVXである。レンチウイルスベクターは、オンコレトロウイルス（MLVを含有するレトロウイルスの亜群）およびレンチウイルス（HIVを含有するレトロウイルスの亜群）に基づくか、またはそれに由来する。非限定的な例には、ASLV、SNV、およびRSVが含まれ、そのすべては、レンチウイルスベクター粒子作製システムのためのパッケージング構成要素およびベクター構成要素に分けられている。本開示によるレンチウイルスベクター粒子は、特定のレトロウイルスの遺伝学的にまたは別の方法で（例えば、パッケージング細胞系の特異的選択によって）変更されたバージョンに基づいてもよい。

【0103】

非限定的な例示的ベクターバックボーンが、当技術分野において公知であり、例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,924,123号；同第7,056,699号；同第7,07,993号；同第7,419,829号；および同第7,442,551号、ならびに、InvitrogenのpLentiシリーズバージョン4、6、および6.2「ViraPower」システム、City of Hope Research Instituteによって研究室で生成され、用いられているpHIV-7-GFP；Clontechによって製造されている「Lenti-X」レンチウイルスベクターpLVX；Sigma-Aldrichによって製造されているpLK0.1-puro；Open Biosystemsによって製造されているpLemiR；および、Charite Medical School, Institute of Virology (CBF), Berlin, Germanyによって研究室で生成され、用いられているpLVを参照されたい。

【0104】

ある特定のレトロウイルス配列は、標的細胞ゲノム中への組込みを容易にする（例えば、米国特許第6,924,123号を参照されたい）。各レトロウイルスゲノムは、ビリオンタンパク質および酵素をコードする、gag、pol、およびenvと呼ばれる遺伝子を含む。これらの遺伝子には、末端反復配列（LTR）と呼ばれる領域が、両端に隣接している。LTRは、プロウイルスの組込みおよび転写を担う。それらはまた、ウイルス遺伝子の発現を調節することができるエンハンサー-プロモーター配列としても働く。レトロウイルスゲノムのカプシド形成は、ウイルスゲノムの5'端に位置するpsi配列によって起こる。LTR自体は、U3、R、およびU5と呼ばれる3つのエレメントに分けることができる、同一の配列である。U3は、RNAの3'端に特有の配列に由来している。Rは、RNAの両端で反復される配列に由来し、かつU5は、RNAの5'端に特有の配列に由来している。3つのエレメントのサイズは、異なるレトロウイルスの間でかなり変動し得る。U3は、プロウイルスの発現調節エレメントの大部分を含有し、これは、細胞のタンパク質および場合によってはウイルス転写アクチベータータンパク質に応答性の、プロモーターおよび複数のエンハンサー配列を含む。

【0105】

構造遺伝子gag、pol、およびenv自体に関しては、gagは、ウイルスの内部構造タンパク質をコードする。gagタンパク質は、タンパク質分解性にプロセシングされて、成熟タンパク質であるMA（マトリックス）、CA（カプシド）、およびNC（ヌクレオカプシド）になる。pol遺伝子は、逆転写酵素（RT）をコードし、これは、ゲノムの複製を媒介する、DNAポリメラーゼ、関連するRNアーゼH、およびインテグラーゼ（IN）を含有する。

【0106】

ウイルス粒子は、ベクターRNAゲノムを、それをコードするDNA構築物から宿主細胞において発現させることによって作製される。いくつかの態様において、ベクターバックボーンによってコードされないウイルス粒子の構成要素は、宿主細胞において発現される追加的な核酸配列（gag/pol遺伝子およびenv遺伝子のいずれかまたは両方を通常含む、「パッ

10

20

30

40

50

ケージングシステム」)によってトランスで提供される。いくつかの態様において、ウイルスベクター粒子の作製のために必要とされる配列のセットは、一過性トランスフェクションによって宿主中に導入されるか、または宿主細胞ゲノム中に組み込まれるか、またはパッケージング細胞株の使用を通して提供される。関与する技法は、当業者に知られている。

【0107】

いくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの誘導の方法またはプロセスは、当技術分野において公知の他のベクターおよび方法とは別個である、第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドにおける構造的特徴を結果としてもたらす。例えば、mRNA捕捉試薬と溶解されたT細胞についての個々の区画との使用により、TCRポリヌクレオチドの同族ペアの捕捉が可能である。構造的特徴の他の非限定的な例には、制限酵素認識部位、組み込まれるプライマー部位、およびmRNA捕捉試薬に由来する配列が含まれる。

10

【0108】

ベクターのいくつかの態様において、mRNA捕捉試薬は、ポリ(dT)でコーティングされたビーズ、オリゴヌクレオチドでコーティングされたビーズ、ヒドロゲルビーズ、およびマイクロアレイウェルの表面上のプリントされたオリゴからなる群より選択される。例えば、mRNA捕捉物質は、固定化されたオリゴヌクレオチド、またはデキストランおよびアガロースなどのポリマーネットワークを含む、ビーズなどの固体支持体であることができる。いくつかの態様において、ビーズは、シリカビーズまたは磁気ビーズである。いくつかの態様において、mRNA捕捉物質は、mRNAにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含む。例えば、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つのポリ(T)および/または関心対象の転写産物に特異的なプライマーを含んでもよい。ある特定の態様において、mRNA捕捉試薬のビーズは、単離されている個々の細胞(例えば、T細胞)よりも小さい。いくつかの態様において、mRNA捕捉物質との単一T細胞の隔離は、T細胞の溶解の前に行われる。他の態様において、mRNA捕捉物質との単一T細胞の隔離は、T細胞溶解と同時に行われる。したがって、いくつかの態様において、単一T細胞とmRNA捕捉物質とは、細胞溶解溶液の存在下でエマルジョンの個々の微小胞中に単離される。

20

【0109】

いくつかの態様において、個々の区画は、100 nL以下、50 nL以下、40 nL以下、30 nL以下、20 nL以下、10 nL以下、5 nL以下の体積を有する。特定の態様において、個々の区画は、5 nL以下の体積を有する。いくつかの態様において、個々の区画は、任意でエマルジョンの、小滴または微小胞である。いくつかの態様において、区画はウェルである。ある特定の態様において、ウェルは、プリントされたポリマースライド、プラスチックプレート、マイクロタイタープレート、またはゲルに位置する。いくつかの態様において、ウェルは、T細胞の溶解の前、またはRT-PCRを行う前に、透過膜で密封される。本明細書に記載されるような区画化された調製物により、ライブラリーの特徴決定が可能になり、かつ最終薬物製品に含まれ得るPCRエラーバリエーションの可能性が最小化される。これは、最終治療用細胞組成物が、副作用および/またはオフターゲットTCR結合特異性を誘導し得る、特徴決定不可能な、かつ潜在的に非常に危険なバリエーションを含有するリスクを低減させる。

30

40

【0110】

いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、当技術分野において公知の任意の方法を用いて、cDNAに逆転写される。例えば、いくつかの態様において、逆転写は、オーバーラップ伸長(OE)逆転写PCR(RT-PCR)を用いて行われる。OE-RT-PCRのための反応ミックスは、共有結合で互いに連結された関心対象の2つ以上の転写産物のcDNAを含む単一PCR産物を作製するために設計された、プライマーを含む。OE-RT-PCRのためのプライマー設定は、所与の細胞が発現するどの関心対象の転写産物(例えば、TCR遺伝子転写産物)が、互いに連結されるかを決定する。例えば、ある特定の態様において、同族ペアTCR鎖転写産物由来のそれぞれのcDNAが、共有結合で互いに連結されることを引き起こ

50

プライマーが、設計される。OE-RT-PCR反応条件の非限定的な例を、本明細書中の表3に提供する。連結されたTCR cDNAを取得する反応を行うのに適しているPCRプライマーの非限定的な例を、本明細書中の表4に提供する。OE RT-PCRの連結されたcDNA産物を回収し、関心対象の連結された転写産物を増幅するネステッドPCRのための鋳型として用いる。ネステッドPCRのための例示的な反応条件を、本明細書中の表5に提供する。いくつかの態様において、次いで、精製されたネステッドPCRの産物をシーケンシングして、ペアの情報を解析する。いくつかの態様において、関心対象の複数の転写産物のcDNAを連結するために、制限およびライゲーションが用いられてもよい。他の態様において、関心対象の複数の転写産物のcDNAを連結するために、組換えが用いられてもよい。

【0111】

いくつかの態様において、TCR α ポリペプチドは、少なくとも1つのTRAVセグメントおよびTRACセグメント、またはその各々の等価物を含む。いくつかの態様において、TCR α ポリペプチドは、少なくとも1つのTRAVセグメント、TRACセグメント、および少なくとも1つのTRADセグメントを含む。いくつかの態様において、TCR α ポリペプチドは、少なくとも1つのTRAVセグメント、TRACセグメント、少なくとも1つのTRADセグメント、および少なくとも1つのTRAJセグメントを含む。いくつかの態様において、TCR α ポリペプチドは、少なくとも1つのTRAVセグメント、TRACセグメント、および少なくとも1つのTRAJセグメントを含む。

【0112】

いくつかの態様において、TCR β ポリペプチドは、少なくとも1つのTRBVセグメントおよびTRBCセグメント、またはその各々の等価物を含む。いくつかの態様において、TCR β ポリペプチドは、少なくとも1つのTRBVセグメント、少なくとも1つのTRBCセグメント、および少なくとも1つのTRBDセグメントを含む。いくつかの態様において、TCR β ポリペプチドは、少なくとも1つのTRBVセグメント、少なくとも1つのTRBCセグメント、少なくとも1つのTRBDセグメント、および少なくとも1つのTRBJセグメントを含む。いくつかの態様において、TCR β ポリペプチドは、少なくとも1つのTRBVセグメント、少なくとも1つのTRBCセグメント、および少なくとも1つのTRBJセグメントを含む。

【0113】

いくつかの態様において、TCR γ ポリペプチドは、少なくとも1つのTRGVセグメントおよびTRGCセグメント、またはその各々の等価物を含む。いくつかの態様において、TCR γ ポリペプチドは、少なくとも1つのTRGVセグメント、少なくとも1つのTRGCセグメント、および少なくとも1つのTRGDセグメントを含む。いくつかの態様において、TCR γ ポリペプチドは、少なくとも1つのTRGVセグメント、少なくとも1つのTRGCセグメント、少なくとも1つのTRGDセグメント、および少なくとも1つのTRGJセグメントを含む。いくつかの態様において、TCR γ ポリペプチドは、少なくとも1つのTRGVセグメント、少なくとも1つのTRGCセグメント、および少なくとも1つのTRGJセグメントを含む。

【0114】

いくつかの態様において、TCR δ ポリペプチドは、少なくとも1つのTRDVセグメントおよびTRDCセグメント、またはその各々の等価物を含む。いくつかの態様において、TCR δ ポリペプチドは、少なくとも1つのTRDVセグメント、少なくとも1つのTRDCセグメント、および少なくとも1つのTRDDセグメントを含む。いくつかの態様において、TCR δ ポリペプチドは、少なくとも1つのTRDVセグメント、少なくとも1つのTRDCセグメント、少なくとも1つのTRDDセグメント、および少なくとも1つのTRDJセグメントを含む。いくつかの態様において、TCR δ ポリペプチドは、少なくとも1つのTRDVセグメント、少なくとも1つのTRDCセグメント、および少なくとも1つのTRDJセグメントを含む。

【0115】

ベクターのいくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとは、任意でリンカーポリヌクレオチドを介して、機能的に連結されている。いくつかの態様において、リンカーポリヌクレオチドは、リンカーポリペプチドをコードする。本明細書において用いられる場合、「リンカーポリペプチド」という用語は、1回から10回ま

10

20

30

40

50

で、または代替的に約8回まで、または代替的に約6回まで、または代替的に約5回、または4回、または代替的に3回、または代替的に2回反復されてもよい、1~10、または代替的に8アミノ酸、または代替的に6アミノ酸、または代替的に5アミノ酸を含む任意のアミノ酸配列に関する。例えば、リンカーは、3回反復されるペンタペプチドからなる最大で15アミノ酸残基を含んでもよい。1つの局面において、リンカー配列は、3コピーのgly-gly-gly-gly-ser (SEQ ID NO: 9) を含む(グリシン4セリン)3 (SEQ ID NO: 8) 可撓性ポリペプチドリンカー、またはその等価物である。リンカー配列の非限定的な例は、当技術分野において公知であり、例えば、

GGGGSGGGSGGGG (SEQ ID NO: 10)

(およびその等価物) ; トリペプチドEFM ; または

Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met (SEQ ID NO: 11)

、ならびにその各々の等価物である。ベクターのいくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとは、捕捉されたT細胞mRNAの逆転写およびPCR増幅によって機能的に連結されている。

【0116】

ベクターのいくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとは、TCR遺伝子において天然には見出されない標的制限エンドヌクレアーゼ部位で切断する制限酵素を用いて、連結されており、かつ/またはベクターバックボーン中にクロニングされている。ある特定の態様において、標的制限エンドヌクレアーゼ部位は、低頻度でTCR遺伝子中に存在している。「低頻度」とは、TCR遺伝子中に20回未満、15回未満、10回未満、5回未満、または2回未満存在している部位を指す。ある特定の態様において、標的制限エンドヌクレアーゼ部位は、発現されるTCRポリペプチド配列を変更しないサイレント変異を含む。制限エンドヌクレアーゼ認識部位の非限定的な例を、本明細書中の表6および7に提供する。いくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドは、表6または表7に記載される少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも5個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、または少なくとも10個の標的制限エンドヌクレアーゼ部位を組み込むように変更されている。

【0117】

ベクターのある特定の態様において、ベクターは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、または少なくとも4つの、発現調節エレメントをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。本明細書において用いられる場合、「発現調節エレメント」とは、ポリヌクレオチドの発現を直接または間接的に容易にする、促進する、制御する、または影響を及ぼすポリヌクレオチドを意図する。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、ポリヌクレオチドの発現を活性化する。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、ポリヌクレオチドの発現を維持する。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、ポリヌクレオチドの発現を増強する。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、ポリヌクレオチドの転写産物を安定化する。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、ポリヌクレオチドの発現を抑制する。いくつかの態様において、発現調節エレメントの活性は、誘導性である。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドに機能的に連結されている。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドの上流 (5') である。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドの下流 (3') である。ある特定の態様において、発現調節エレメントをコードするポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとの間に位置する。いくつかの態様において、発現調節エレメントは、プロモーター、p2A配列、エンハンサー、および内部リボソーム進入部位 (IRES) 配列からなる群より選択される。

【0118】

p2A配列は、同じmRNAから等モルレベルの複数の遺伝子を産生する、短いペプチド (約2

10

20

30

40

50

0アミノ酸)である。ペプチドは、リボソームに2AエレメントのC末端でペプチド結合の合成をスキップさせ、2A配列の末端と下流にある次のペプチドとの間の分離をもたらすことによって機能すると考えられている。結果として生じる「切断」は、C末端に見出されるグリシン残基とプロリン残基との間で起こり、これは、上流のシストロンが、末端に付加された数個の追加的な残基を有し、他方、下流のシストロンがプロリンで始まることを意味する。特定の態様において、p2A配列は、以下からなる群より選択される。

T2A: (GSG)EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 12)

P2A: (GSG)ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO: 13)

10

E2A: (GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 14)

F2A: (GSG)VKQTLNFDLLKLAGDVESNPG (SEQ ID NO: 15)

【0119】

プロモーターは、ポリヌクレオチドの制御された転写のための調節点を提供する、制御性ポリヌクレオチドである。いくつかの態様において、プロモーターは、CMV、EF1a、SV40、PGK1、UBC、MNDU3、ヒトβアクチン、CAG、TRE、UAS、Ac5、ポリヘドリン、CaMKIIa、GAL1、GAL10、GDS、ADH1、CaMV35S、Ubi、H1、およびU6からなる群より選択される。特定の態様において、プロモーターは、EF1αプロモーターまたはCMVプロモーターである。

20

【0120】

内部リボソーム進入部位は、タンパク質合成のより大きなプロセスの一部として、キャップ非依存的様式で翻訳開始を可能にする、RNAエレメントである。真核生物の翻訳においては、開始複合体のアセンブリーのために5'キャップ認識が必要とされるため、開始は、典型的には、mRNA分子の5'端で起こる。IRESエレメントの場所は、多くの場合は5'UTR中であるが、mRNA中の他の場所に存在することもできる。ある特定の態様において、IRESは、FMDV IRES配列またはEMCV IRES配列である。IRES配列(EMCV)をコードするポリヌクレオチドの非限定的な例を、本明細書において提供する。

TATGCTAGTACGTCTCTCAAGGATAAGTAAGTAATATTAAGGTACGGGAGGTATT
GGACAGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTTG
TGTGAATCGATAGTACTAACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAAC
AAACTAGCAAAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTC
TGGCCTAACTGGCCGGTACCTGAGCTCTAGTTTCACTTTCCCTAGTTTCACTTTCC
CTAGTTTCACTTTCCCTAGTTTCACTTTCCCTAGTTTCACTTTCCCTCGAGGATAT
CAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAG (SEQ ID NO: 16)

30

【0121】

エンハンサーは、特定の標的ポリヌクレオチドの転写が起こる可能性を増大させるために、タンパク質(例えば、転写因子)が結合することができるDNAの領域である。エンハンサーは、シス作用性である。いくつかの態様において、それらは、50~1500塩基対の長さである。いくつかの態様において、それらは、標的ポリヌクレオチドの上流、下流、その中に位置する。いくつかの態様において、エンハンサーは、CENTG2エンハンサー、GADD45Gエンハンサー、およびWPRESエンハンサーからなる群より選択される。特定の態様において、エンハンサーは、転写された時に、発現を増強する三次構造を作製するDNA配列である、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)転写後制御エレメント(WPRE)である。WPREは、γ構成要素、α構成要素、およびβ構成要素を有する、三要素制御エレメントである。いくつかの態様において、エンハンサーは、WPREのα構成要素のみを含む。他の態様において、エンハンサーは、完全三要素WPRE配列を含む。γWPRE構成要素およびβWPRE構成

40

50

要素を伴わずに単独で用いられる時、 α 構成要素は、完全三要素WPREの9%の活性を有するだけである。

【0122】

WPRE α 配列：

GCCACGGCGGAACATCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGG
CTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGT (SEQ ID NO: 17)

【0123】

完全三要素WPRE配列：

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATG
TTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATT
GCTTCCCGTATGGCTTTTCAATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTT
TATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTG
CTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGG
GACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCATCGCCGCCTGCCTTG
CCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTC
GGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTG
CGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTC
CCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGA
CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCCGCCTG (SEQ ID NO: 18)

【0124】

ベクターのいくつかの態様において、ベクターは環状化されている。いくつかの態様において、ベクターは、発現調節エレメントのベクター中への組み込みの前に、環状化されている。他の態様において、ベクターは、発現調節エレメントのベクター中への組み込みの後に、環状化されている。

【0125】

ベクターのある特定の態様において、発現調節エレメントは、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の近くに組み込まれている。これらの態様において、発現調節エレメントは、CRISPR/Cas媒介機構を介して、ベクター中に挿入される。他の態様において、発現調節エレメントは、制限酵素またはTALENから選択されるDNA修飾酵素を用いて、ベクター中に組み込まれている。

【0126】

ある特定の態様において、ベクターは、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つの標的細胞または宿主細胞中への組み込みを容易にするための、トランスポゾンコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドをさらに含む。Sleeping Beautyトランスポゾナーゼは、レシピエントDNA配列におけるTAジヌクレオチド塩基対中にトランスポゾンを挿入する。例えば、いくつかの態様において、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドに隣接するトランスポゾンは、TAジヌクレオチドでの組換え細胞ゲノムまたは免疫細胞ゲノム中への組み込みを容易にする。いくつかの態様において、ベクターバックボーンは、非ウイルスベクターに由来するか、またはそれを含む。非ウイルスベクターの利点には、患者集団全体に対処するのに必要とされる十分な量を作製する容易さおよび相対的に低い価格、保存中の安定性、および免疫原性の欠如が含まれる。本技術のベクターにおける使用に適しているトランスポゾンシステムの非限定的な例は、Sleeping Beautyトランスポゾンシステムである（例えば、参照により本明細書に組み入れられるKebriaei, P. et al. (2017) Trends in Genetics 33: 852-70を参照されたい）。Sleeping Beautyトランスポゾンシステムは、2つの構成要素：(i) 遺伝子発現カ

10

20

30

40

50

セットを含有するトランスポゾン、および(ii) トランスポザーゼ酵素の供給源からなる。発現カセットをプラスミドからゲノム中に転位することによって、導入遺伝子の持続性の転写を達成することができる。例示的なSleeping beautyトランスポザーゼベクターには、pSBbi (Kowarz, E. et al. Biotechnol J. 10(4):647-53、Addgeneから入手可能)、pCMV(CAT)T7-SB100 (Mates, L. et al. Nat Genet. 2009 Jun;41(6):753-61、Addgeneから入手可能)、およびpT2/LTR7 (Wang, J. et al. Nature. 2014 Dec 18;516(7531):405-9、Addgeneから入手可能)が含まれるが、それらに限定されない。

【0127】

ベクターのいくつかの態様において、ベクターは、検出可能なマーカーまたは精製マーカーをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドをさらに含む。特定の態様において、検出可能なマーカーは、GFP、YFP、RFP、dTomato、cherry、Cy3、Cy 5、Cy 5.5、Cy 7、DNP、AMCA、ビオチン、ジゴキシゲニン、Tamra、Texas Red、ローダミン、Alexafluors、FITC、およびTRITCからなる群より選択される蛍光タンパク質である。

10

【0128】

ベクターのいくつかの態様において、ベクターは、選択可能なマーカーをコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドをさらに含む。特定の態様において、選択可能なマーカー、例えば、ブラストサイジン (bsd遺伝子)、G418/Geneticin (neo遺伝子)、ハイグロマイシンB (hygB遺伝子)、ピューロマイシン (pac遺伝子)、またはzeocin (Sh bla遺伝子)は、真核細胞において陽性選択形質を付与する。いくつかの態様において、選択可能なマーカー、例えば、 β -ラクタマーゼ遺伝子は、細菌細胞において陽性選択形質を付与する。

20

【0129】

ベクターのいくつかの態様において、ベクターは、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの発現および/または活性化を調節するための、スイッチ機構をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドをさらに含む。ベクターの他の態様において、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドによってコードされる組換えTCRは、スイッチ機構を含む。特定の態様において、スイッチ機構は、TCRライブラリーを含む細胞のアポトーシスまたは死を引き起こすように活性化することができる安全機構である、自殺スイッチ、例えば、iカスパーゼ9である。

【0130】

例えば、いくつかの態様において、TCRは、標的細胞上にまたは標的細胞によって発現される標的抗原以外の分子に特異的である標識、結合ドメイン、またはタグを含む、標的の特異的結合エレメントを有する細胞外ドメインを含み得る。そのような態様において、TCRの特異性は、標的抗原結合ドメインと、TCR上の標識、結合ドメイン、またはタグによって認識されるかまたはそれに結合するドメインとを含む、それからなる、または本質的にそれからなる第2の構築物によって提供される。例えば、WO 2013/044225、WO 2016/000304、WO 2015/057834、WO 2015/057852、WO 2016/070061、US 9,233,125、US 2016/0129109を参照されたい。このように、TCRを発現するT細胞を対象に投与することができるが、これは、抗原特異的結合ドメインを含む第2の組成物が投与されるまで、その標的抗原に結合することができない。

30

40

【0131】

他の態様において、TCRは、活性化されるために多量体化（例えば、US 2015/0368342、US 2016/0175359、US 2015/0368360を参照されたい）、および/または小分子薬物などの外因性シグナル（US 2016/0166613、Yung et al., Science, 2015）を必要とするように改変される。

【0132】

いくつかの態様において、ベクターは、処置後にベクター発現細胞の細胞死を誘導するために (Buddee et al., PLoS One, 2013)、または標的抗原に対する結合後にTCRの発現を下方制御するために (WO 2016/011210)、「自殺スイッチ」または「安全スイッチ」をコードするポリヌクレオチドを含む。例えば、ベクターは、TCR活性を停止させるために

50

投与することができる抗体またはプロドラッグに対する感受性を付与する自殺遺伝子を含むことができる。いくつかの態様において、抗体またはプロドラッグは、有害事象の発生時にTCRライブラリー療法を受けていた対象に投与される。例示的な自殺遺伝子には、細胞をガンシクロビルに対して感受性にする単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-TK）（Bonini et al. Science 276: 1719-1724 (1997)）、二量体化因子（dimerizer）薬物によって活性化された時に二量体化およびアポトーシスの活性化を可能にする誘導性カスパーゼ9（iカスパーゼ9）（Gargett et al., Front Pharmacol, 2014 5:235）、ならびに細胞をセツキシマブに対して感受性にする切断型EGFR（Wang et al. Blood 118: 1255-63 (2011)）が含まれるが、それらに限定されない。

【0133】

10

ベクターのいくつかの態様において、ベクターは、Kozakコンセンサス配列をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチド配列をさらに含む。いくつかの態様において、Kozakコンセンサス配列は、強い、適格であるか、または弱い。

【0134】

ベクターのいくつかの態様において、T細胞を、溶解の前に標的細胞または疾患抗原との反応性についてスクリーニングした。ベクターのある特定の態様において、ベクターによってコードされるTCRは、標的細胞または疾患抗原に対する結合特異性を有するか、またはそれによって活性化される。ある特定の態様において、標的細胞は、がん細胞、ウイルスに感染した細胞、ウイルスに感染した対象に由来する細胞、腫瘍細胞、またはウイルス感染症もしくはがんを有する疑いがある対象から単離された組織生検細胞である。いくつかの態様において、細胞は、対象から単離された。ベクターのいくつかの態様において、TCRは、疾患抗原:MHC複合体に対する特異的結合についてスクリーニングされる。

20

【0135】

ある特定の態様において、疾患抗原は、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である。

30

【0136】

他の態様において、疾患抗原は、CD45、グリピカン-3、IGF2B3、カリクレイン4、KIF20A、レングシン、メロエ、ムチン5AC（MUC5AC）、サバイビン、サイクリン-A1、MAGE-A1、MAGE-C1、MAGE-C2、SSX2、XAGE1b/GAGED2A、CD19、CD20、CD22、CD52、上皮成長因子受容体（EGFR）、ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10a（TRAILR1）、核内因子κB活性化受容体リガンド（RANKL）、インスリン様増殖因子1受容体（IGF1R）、上皮細胞接着分子（EpCAM）、およびがん胎児性抗原（CEA）からなる群より選択される腫瘍抗原である。

40

【0137】

単に例として、いくつかの態様において、元の目的クローニングベクター（例えば、pLVX-EF1α-IRES-mCherry）は、AgeI（2415）、SphI（2331）、NheI（8192）、およびMluI（6669）切断部位（数字は、これらの切断部位の場所を示す）などの、制限酵素のための多重認識部位を含有し得る。図13を参照されたい。いくつかの態様において、AgeI、SphI、NheI、およびMluIについての過剰な制限酵素部位は、部位特異的変異誘発を行うことによって排除されてもよい（図14を参照されたい）。いくつかの態様において、目的クローニングベクターから除去されるべき過剰な制限酵素部位は、表7または表8に列記されるも

50

のいずれかであってもよい。他の態様において、過剰な制限酵素部位は、直鎖状ベクター型式または環状化ベクター型式中へのT細胞受容体のペアの $\alpha:\beta$ のクローニングを可能にする、他の公知の制限酵素部位で置換されてもよい。

元のpLVX-EF1 α -IRES mcherryベクター配列

tggaagggttaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcctgattagcagaact

acacaccagggccagggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaaggagg

ccaataaaggagagaaacaccagcttggtacacccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggt
ttgacagccgcctagcattcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgctacaaggga
ctttccgctggggactttccaggaggcgtggcctgggaggactggggagtgaggagccctcagatcctgcatataagcagctgct
ttttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacccactgcttaagcctcaataa
agcttgcccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaa
aatctctagcagtgggcgcccgaacaggagctgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctga
agcgcgccacggcaagaggcgaggggcgggcactgggtgagtacgcaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
gtgagagagcgtcagtattagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaatata
aattaaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaa
atactgggacagctacaacatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacccctctattgtgtgcatc
aaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
cggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataataaagtagtaaaaatt
gaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgaggaaataggagctttgttct
tgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgacgctcaatgacgctgacggtagaggccagacaattattgtctgtatagtg
cagcagcagaacaatttctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggca
agaatcctggctgtggaaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttggggtgtctctggaaaactcatttgaccactgctgtg
ccttggaatgctagtgtggagtaataaatctctggaacagatttggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattac
acaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaag
tttgggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatatagtaggaggttggttaggttaagaatgttttg
ctgtactttctatagtgaaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggc
ccgaagggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgctttaa
agaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaa
acaaattacaaaaattcaaaatttccgggttattacagggacagcagagatccagttatcgatagtaattacatacaaaaggactcgcc
cctgccttggggaatcccagggacctgcttaaaactccactaacgtagaaccagagatcgctgcgttccccccccctacccgcc
cgctctcgatcactgaggtggagaagagcatgcgtgaggtccgggtcccgtcagtgaggcagagcgacatcgccacagtccc
cgagaagtgggggggaggggtcggaattgaaccgggtgcctagagaaggtggcggggtaaaactgggaaagtgtgtgtgtac
tggctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgctgaacgttcttttcgcaacgggttgccgcc
agaacacaggttaagtccgtgtgtgttcccggggcctggcctctttacgggttatggccttgctgccttgaaattacttcacggcc
ctggctgcagtagctgattctgatcccagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgctgcttaaggagcccttcgc
ctcgtgcttgagttgagggcctggcttggcgctggggccgcccgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctgcgtcttctgat
aagtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagcttgaatgcgggccaagatctgcacact

10

20

30

40

ggatatttcggtttttggggccgcgggcgggcgacggggcccggtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgc
ggccaccgagaatcgacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgctgtatgccccgccc
tgggcggaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccgccctgctgcaggagctcaaat
ggaggacgcgcgctcgggagagcggcggggtgagtcacccacacaaaggaaaaggcccttccgtcctcagccgtcgcttcatg
tgactccacggagtagcggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttgagtagctgctcttaggttggggggagggtt
ttatgcgtaggagttccccacactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgccttt
ttgagtttgatcttggtcatttcaagcctcagacagtggttcaaagtttttcttccatttcaggtgtcgtgaggatctattccggtgaat
tctcgagactagttctagagcggcgcggtatcccgccctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataa
ggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttccacatattgccgtcttttgcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttctgacg
agcattcctaggggtcttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaagggaagcagttcctctggaagcttctgaa
gacaaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcgggccaaaagccacgtgta
taagatacacctgcaaaggcggcacaacccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtaaatggctcacctcaagcg
tattcaacaaggggtgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtt
agtcgaggttaaaaaacgtctagggcccccgaaccacggggacgtggtttcttgaaaaaacacgatgataatatggtgagcaaggg
cgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagat
cgaggggcgagggcgagggcgccctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcg
cctgggacatcctgtccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactactgaagctgtcc
ttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggtggtgaccgtgaccaggactcctccctgcagga
cggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcgccaccaacttccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctggg
aggcctcctccgagcggatgtacccgaggacggcgccctgaaggggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggc
cactacgacgtgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgccctacaacgtcaacatcaagttgga
catcacctcccacaacgaggactacaccatcggtgaacagtagaacgcgcccagggcgccactccaccggcgcatggacga
gctgtacaagtgaacgcgtctggaacaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctcctttac
gctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgtattgcttcccgatggctttcattttctcctcctgtataaatcctggtgtgtctc
ttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttgctgacgcaacccccactggttggggcattgcca
ccacctgtcagctccttccgggactttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttcccgtgctgga
caggggctcggctgttgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttgccacct
ggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtccctcggccctcaatccagcggaccttccctcccgccgctgctgccggctctgcgg
cctcttccgctcttcgcttccctcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgctggaattaattctgcagtcgagacct
agaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggaggaggagg
tgggttttccagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaagagggg

10

20

30

40

actggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcctgattagcagaa
ctacacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttggatgggtctacaagctagtagtaccagttgagccagataaggtagaaga
ggccaataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtgga
ggtttgacagccgcttagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgctacaag
ggactttccgctggggactttccagggaggcgtggcctggcgaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagc
tgctttttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccactgcttaagcctca
ataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccctttagtcagtgtg
gaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagttagaggccttgaca
ttgctagcgtttaccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgtatccgctcacaattcca
cacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaataagtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcc
cgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggcgctct
tccgcttccctcgtcactgactcgtcgcgtcggctgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggttaatacggttatc
cacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacctgaaaaaggccgcgttgct
ggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaacccgacaggactata
aagataaccaggcggtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgccgcttaccggataacctgtccgcttttccct
tcgggaagcgtggcgcttttccatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaa
cccccggtcagcccgaccgctgcgccttatccgtaactatcgtcttgagtccaacccggttaagacacgacttatcgccactggcagc
agccactggtaacaggattagcagagcgagggtatgtaggcgggtgtacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactaga
agaacagtatttggatctgcgctctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaccaccgct
ggtagcgggtggttttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttagcttttctacggggctga
cgctcagtggaaacgaaaactcacgttaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaa
gttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagttaggcacctatctcagcgatctgtctattt
cgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccg
cgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaaagtggtcctgcaacttt
atccgcctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacggtgttgcattgcta
caggcatcgtgggtgtcacgctcgtcttgggtatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtt
gtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcact
gcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatggcg
accgagttgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacggttctc
ggggcgaaaaactctcaagatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactt
tcaccagcggtttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactc

10

20

30

40

atactcttccttttcaatattattgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaata
ggggttccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgtcgacggatcgggagatcaactgtttattgcagcttataatggttaca
ataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttctactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatatgtatcttatcatgt
ctggatcaactggataactcaagctaaccaaaatcatccaaaacttccaccccataccctattaccactgccaattacgtgtggttct
tactctaaacctgtgattcctctgaattattttcattttaaagaaattgtattgttaaataatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO:

19)

改変されたpLVX-EF1 α -IRES mcherryベクター配列

tggaagggttaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
acacaccaggggccaggggtcagatatccactgaccttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagagg
ccaataaaggagagaaacaccagctgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggagggt
ttgacagccgcctagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgctacaaggga
cttccgctggggactttccaggaggcggtggcctggcgggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgct
tttgcctgtactgggtctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataa
agcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaa
aatctctagcagtggtggcgccgaacagggaacttgaaagcgaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctga
agcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtgagtacgcaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
gtgagagagcgtcagtattaaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaattcggftaaggccaggggggaaagaaaaatata
aattaaaacatatagtagggcaagcaggagctagaacgattcgagftaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaa
atactgggacagctacaacctccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacctctattgtgtgcatc
aaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
cggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatataggggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaatt
gaaccattaggtagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgagggaataggagctttgttct
tgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtg
cagcagcagaacaatttctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggca
agaatcctggctgtggaaagatacctaaggaatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgtgtg
ccttggaaatgctagttggagtaataatctctggaacagatttggatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattac
acaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaag
tttgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgataagtaggaggcttggttaggttaagaatagttttg
ctgtactttctatagtgaaatagagtttaggcaggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggc
ccgaagggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgcccttaaa

10

20

30

40

agaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaa
acaaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacagggacagcagagatccagtttatcgatgagtaattacatacaaaaggactcgcc
cctgccttggggaatcccagggaccgtcgtaaaactcccactaacgtagaaccagagatcgctgcgttccgccccctcacccgcc
cgctctcgatcactgaggtggagaagagcaagcgtgaggctccggtgccgtcagtgggcagagcgacatcgccacagtccc
cgagaagtgggggggaggggtcggcaattgatccggagcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtac
tggctccgcctttttccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgaacgggtttgccgcc
agaacacaggtaagtgccgtgtgtgtgttcccgcgggcctggccttttacgggttatggccttgcgtgccttgaattactccacgccc
ctggctgcagtacgtgattcttgatcccagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgagggccttgcgttaaggagccccttcgc
ctcgtgcttgagttgagccctggcttggcgctggggccgcccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgat
aagtctctagccatttaaaattttgatgacctgctgcgacgttttttctggcaagatagcttgtaaatgcgggccaagatctgcacact
ggattttcggtttttggggccgcgggcgggcgacggggcccgtgcgtcccagcgacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgc
ggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcttgcgcgcctgtatcgccccgccc
tggggcggaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaat
ggaggacgcggcgctcgggagagcggggcggtgagtcacccacacaaaggaaaaggcctttcgtcctcagccgtcgcttcag
tgactccacggagtagccggcgccgtccaggcacctcgattagtctcgagcttttgagtagctcgtcttttaggttggggggaggggt
ttatgcatggagttttccacactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaaatttgccttt
ttgagttggatcttgggtcattctcaagcctcagacagtgggtcaaagtttttcttccatttcaggtgtcgtgaggatctatttccggtgaat
tcctcgagactagtctagagcggcgcggtacccgcccctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggataa
ggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttccacatattgccgtcttttgcaatgtgagggccggaaacctggccctgtcttctgacg
agcattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgatgtcgtgaagggaagcagttcctctggaagcttctgaa
gacaaacaacgtctgtagcgaccctttgcaggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcgggccaaaagccacgtgta
taagatacacctgcaaaggcggcacacccagtgccacgttgtagttggatagttgtggaaagagtc aaatggctcacctcaagcg
tattcaacaaggggtgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtt
agtcgaggttaaaaaacgtctagggcccccgaaaccacggggacgtggttttctttgaaaaacacgatgataatatggtgagcaagg
cgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagat
cgagggcgagggcgagggcgccctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggtggccccctgcccttcg
cctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtcc
ttccccgagggttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggtggtgaccgtgaccaggactcctccctgcagga
cggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctggg
aggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaaggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgcc
cactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgccctacaacgtcaacatcaagtggga

10

20

30

40

catcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgccactccaccggcgcatggacga
gctgtacaagtgaacccgtctggaacaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttac
gctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgatggctttcattttctctccttgataaatcctgggtgctgtctc
tttatgaggagtgtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgactgtgttgctgacgaacccccactgggtggggcattgcc
ccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcgcgtgctgga
caggggctcggctgttgggactgacaattccgtgggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttgcacct
ggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgccgctgctgccggctctgcgg
cctcttccgcgtcttcgcttcgccctcagacgagtcggatctccctttggggccgctccccgctggaattaattctgcagtcgagacct
agaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggaggaggagg
tgggttttccagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagagggg
actggaagggctaattcactcccaacgaagacaagataccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaa
ctacacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatgggtgtctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaaga
ggccaataaaggagagaaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtga
ggtttgacagccgcctagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatacgagcttgctacaag
ggactttccgctggggactttccagggagggcgtggcctggcgggactggggagtggcgagccctcagatcctgcataataagcagc
tgcttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggttaactagggaacccactgcttaagcctca
ataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtg
gaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagttattataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgaagggccttgaca
ttgcttgctttaccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattcca
cacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatagtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcc
cgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagaggcggttgcgtattggcgctct
tccgcttctcgtcactgactcgtcgcgtcggctcgttcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaaggcggttaatacggttatc
cacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgct
ggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactata
aagataccaggcggtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgccgcttaccggataacctgtccgccttttcct
tcgggaagcgtggcgcttttccatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggctgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaa
cccccgctcagcccgaccgctgcgccttatccggttaactatcgtcttgagtccaacccggttaagacacgacttatcgccactggcagc
agccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgtacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactaga
agaacagtatttgggtatctgcgctctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgct
ggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctga
cgctcagtggaaacgaaaactcacgttaagggttttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaatgaa

10

20

30

40

gttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctattt
 cgttcatccatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccg
 cgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaacttt
 atccgcctccatccagctctattaattgttgccggaagctagagtaagtagttgccagttaatagtttgcgcaacggtgttgccattgcta
 caggcatcgtgggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggt
 gtgcaaaaaagcggttagctccttcggctcctccgatcgtgtgcagaagtaagttggccgagtggttatcactcatggttatggcagcact
 gcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcg
 accgagttgctcttgcccggtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatattggaaaacgttcttc
 gggcgcaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactt
 tcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaaactc
 atactcttcttttcaataattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaata
 ggggttccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgtcgacggatcgggagatcaacttggttattgcagcttataatggttaca
 ataaagcaatagcatcacaaattcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgt
 ctggatcaactggataactcaagctaaccaaaatcatccaaacttccacccataccctattaccactgccaattacctgtggttcatt
 tactctaaacctgtgattcctctgaattattttcattttaagaaattgtattgttaaatatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO:
 20)

10

20

【 0 1 3 8 】

本開示のベクターの核酸配列の非限定的な例は、本明細書中で表2に提供され、かつ図3
 ～12において例証される。

【 0 1 3 9 】

(表2) 例示的なベクター配列

pLVX-CMV-TCR1-pTert-iCas9 (図3):

tggaagggttaattcactcccaaagaagacaagatatcctgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
 acacaccaggggccaggggtcagatatccactgaccttggatgggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagg
 ccaataaaggagagaaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggt
 ttgacagccgcctagcatttcatcagtggtggccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttctacaaggga
 ctttccgctggggacttccagggaggcgtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgct
 tttgctgtactgggtctctgtggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaaccactgcttaagcctcaataa
 agcttgcttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaa
 aatctctagcagtggtggccggaacagggtgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttctga
 agcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcgactgggtgagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
 gtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatata
 aattaaacatagatagggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagacaa
 atactgggacagctacaacctccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatc

30

40

aaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
cgcccgccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataagtagtaaaaattg
aaccattaggagtagcaccaccaaaggcaaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagcttggctt
gggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgc
agcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaa
gaatcctggctgtggaaagatacctaaggaatcaacagctcctggggatttggggttgccttggaactcattgaccactgctgtgc
cttggatgctagtgtggagtaataatctctggaacagatttggatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattaca
caagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatagttttgct
gtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacacctcccaaccccgaggggacccgcagggcc
cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggatcgcttcttaaaa
gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaagaattacaaaa
caaattacaaaaattcaaaatttctgggttattacagggacagcagagatccagtttgcataagcttgggagttccgcgttacataact
acggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag
ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttaccgtaactgccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtagcggcc
tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtagacgttatgggactttcctacttggcagtagcatctacgtat
tagtcatcgctattaccatgggtgatcggttttggcagtagcatcaatgggcgtggatagcggttgactcacggggatttccaagtcca
ccccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccacaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacactccgccccattgacgcaat
gggcggtaggcggtgacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgtgtg
ttgacctccatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCatgagcctcgggctcctgtgctg
tggggcctttctcctctgtgggcaggaccggtgGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATACCTTG
TTATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGCCATG
ACAAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATCCACT
ATTCCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAACAGT
CTCCAGAATAAGGACGGAGCATTTTCCCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCA
CATACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCCAACATTCAGTACTTCG
GCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCG
AACTAGTCgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacaggttctac
cccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacagaccgcagcccctcaaggag
cagccccccctcaatgactccagatactgcctgagcagccgctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgcaaccacttc
cgctgtcaagtccagttctacgggctctcggaatgacgagtggaccaggtataggccaaacctgtcaccagatcgtagcgcc
gaggcctggggtagagcagactgtggcttcacctccagcttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttgc
aggggaaggccaccttgtatgccgtgctggtcagtgccctcgtgctgatggccatggtcaagagaaaggattccagaggcGGGAG
CGGAGCCACGAACCTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCC
CGGTCCAtgacacaggttagcttgcgtgggcagtcgtggtctccacctgtctcgagtccggcatGGTCAACAGCT
GAATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAAC
TGCATTCTTCAAGCATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGGG
AAGGTCCTGTCTCTTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGG
AAGACTGACTGCTCAGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCA
GCATCCATACCTAGTGATGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAAG

10

20

30

40

TTACCTTTGGAAC TGGAAACAAAGCTCCAAGTCATCCCAAATATCCAGAACCCTGA
CCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCctattc
accgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgttatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatgga
cttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgcgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagaca
ccttctccccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaaacctgtc
agtgttgggtccgaatcctcctcctgaaagtggcgggttaatctgctcatgacgctgagggtgtgggtccagcTGAActcgaggga
tccccgccctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggataaaggccggtgtgctgtttgtctatatgttattttccac
catattgccgtcttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttccctctcgccaaa
ggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcag
gcagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcgccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacacccc
cagtgccacgttgtgagttggatagttgtgaaagagtgcaaatggctcacctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccaga
aggtacccattgtatgggatctgatctgggacctcggtgcacatgctttacatgtgtttatgtcgagggttaaaaaacgtctaggccccccg
aaccacggggacgtgggttttctttgaaaaacacgatgataatatggtgagcaaggcgaggaggataacatggccatcatcaagga
gttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgcccttac
gagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggcccttgccttgcctgggacatcctgtccctcagttcatgtac
ggctccaaggcctacgtgaagcaccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtg
atgaacttcgaggacggcggtgtgacgtgaccaggactcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcg
cggcaccaacttccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggatgtaccccgag
gacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgtgaggtcaagaccacctac
aaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacacat
cgtggaacagtacgaacgcgcccagggccgcccactccaccggcgccatggacgagctgtacaagtgaacgcgtctggaacaagct
tttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcgtatcccggtccaccttccccgtg
ccccgggtgtccccgcacgtgcgggtcggggatgcggggggagcgccggaccggagcggagccccgggctcgctgctg
ccccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtccccgtgagctcttactccctatcagtgatag
agaacgtatgaagagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgcagactttactccctatcagtgatagagaacgtataaggagtta
ctccctatcagtgatagagaacgtatgaccagtttactccctatcagtgatagagaacgtatctacagtttactccctatcagtgatagaga
acgtatatccagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgtcgaggtaggcgtgtacgggtggcgccctataaaagcagagctcggtt
agtgaaccgtcagatcgctggagcaattccacaacacttttgtcttatacttATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGA
GACTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGT
GGTGCATAACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCTCCCGGGA
CAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTG
GGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAACTGACTATATC
TCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCC
ACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGAG
TCGACGGATTGTTGGTGTGTCGGTGTCTTGTAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATT
GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTG
AACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTG
AGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGA
CCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCA
CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGC

10

20

30

40

10

20

30

40

20

40

tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatggttttgc
gtactttctatagtgaatagaggttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcc
cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgctttaa
gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaa
caaattacaaaaattcaaaatttccgggttattacagggacagcagagatccagtttgcgataagcttgggagttccggttacataact
acggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag
ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccagttacgcccc
tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagttacatgaccttgggactttcctacttggcagttacatcagttat
tagtcatcgctattaccatgggtgatcggttttggcagttacatcaatggcggtggatagcggtttgactcacggggatttcaagtctcca
ccccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccacaaatcaacgggactttccaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaat
gggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcggttagtgaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgtgt
ttgacctccatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCatgggacccaggctcctcttctg
ggcactgctttgtctcctcggaacCGGTCCGGTTGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATAC
CTTGTTATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGC
CATGACAAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATC
CACTATTCCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAA
CAGTCTCCAGAATAAGGACGGAGCATTTTCCCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCC
CTCACATACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCAACATTTCAGTAC
TTCGGCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCAC
CCGAgGCGGCCGCgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccacagg
cttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgggggtcagcacagaccccgagccccctc
aaggagcagccccccctcaatgactccagatactgctgagcagccgctgaggggtctggccaccttctggcagaacccccgcaa
ccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggtgaccaggtataggccaaacctgtcaccagatcgtc
agcgcggaggcctggggtagagcagactgtgggttcacctccgagttaccagcaagggtcctgtctgccaccatcctctatgaga
tcttctagggaaagccaccttctgtatgccgtgctggtcagtgccctcgtgctgatggccatggtcaagagaaaggattccagaggcG
GGAGCGGAGCCACGAACCTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAA
ACCCCGGTCTTatgaactcctctctggactttctaattctgatcttaattgtttggaggaACTAGTGGTCAACAGC
TGAATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAA
CTGCACTTCTTCAAGCATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGG
GAAGGTCTGTCTCTTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATG
GAAGACTGACTGCTCAGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTC
AGCATCCATACCTAGTGATGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAA
GTTACCTTTGGAACCTGGAACAAAGCTCCAAGTCATCCCAAATATCCAGAACCTTG
ACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCATGCctat
tcaccgattttgatttcaaaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgtagacatgaggtctatg
gacttcaagagcaacagtgtgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaaga
caccttctccccagccgaaagtctgtgatgtcaagctggctgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaacct
gtcagtgattgggttccgaatcctcctcctgaaagtggccgggtttaatctgtctcatgacgtgcgggtgtgtggtccagcTGActcgag
ggatcccgccccctcctcctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttc
caccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaacactggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtcttccccctcgcgc

10

20

30

40

aaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagctcttgaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgc
aggcagcgggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaac
cccagtgccacgttgtagttgtagttgtggaaagagtc aaatggctcacctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccca
gaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgagggtaaaaaacgtctaggcccc
cgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataatattggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaag
gagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgaggcgagggcgagggcgccct
acgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcagttcatgt
acggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactactgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcg
tgatgaacttcgaggacggcgggcgtggtgaccgtgacccaggactcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgc
gcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggatgtacccga
ggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgtgaggtcaagaccaccta
caaggccaagaagccctgcagctgcccggcgccctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacacca
tcgtggaacagtacgaacgcgcccagggcgccactccaccggcgccatggacgagctgtacaagtgaacgcgtctggaacaagc
ttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggtcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccggtccaccttccccgt
gccccgggtgtccccgcacgtgcccggctcgggggatgcggggggagcgcggaccggagcggagccccgggcggtcgtcgt
gccccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtccccgtgagctcttactccctatcagtgata
gagaacgtatgaagagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgcagactttactccctatcagtgatagagaacgtataaggagttt
actccctatcagtgatagagaacgtatgaccagtttactccctatcagtgatagagaacgtatctacagtttactccctatcagtgatagag
aacgtatatccagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgtcgaggttagcggtgtacgggtggcgccataaaaagcagagctcgtt
tagtgaaccgtcagatgcctggagcaattccacaacacctttgtcttatacttATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGA
GACTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGT
GGTGC ACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCTCTCCCGGA
CAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTG
GGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAAACTGACTATATC
TCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCC
ACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGAG
TCGACGGATTTGGTGATGTGCGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTT
GGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTG
AACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTG
AGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGA
CCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCA
CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGC
CACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGCGGTG
AGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGGAAGC
CCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGA
GGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGAT
GCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTA
GTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTT
TCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCT
TTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAA

10

20

30

40

TGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCTCC
 GGAAAAAACTTTTCTTTAAACATCAGTCGACTATCCGTACGACGTACCAGACTA
 CGCACTCGACTAAaagctttttcccgatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaa
 agcgatcccggtgccaccttcccggtgccggggtgtccccgcacgctgccggctcggggatgcggggggagcgccggaccggag
 cggagccccggggcggtcgtcgtccccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggagggggctgtcccc
 gtgagctcaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattctaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtcgt
 ttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgatggctttcattttctcctctgtataaatctgggtgctgtctctttatgaggagtgtggcc
 cgttgcaggcaacgtggcgtggtgctgactgtttgtgacgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctccttc
 cgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgcctgcccgtgctggacaggggctcggctgttgg
 gcactgacaattccgtggtgtgtcgggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttggccacctggattctgcggggacgt
 ccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgccgtgctcgggctctcgggctcttccgctcttcgcct
 tcgccctcagacgagtcggatctccctttgggcccctccccgcctggaattaattctgcagtcgagacctagaaaaacatggagcaat
 cacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggaggaggaggtgggtttccagtcacacct
 caggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaagaggggactggaagggttaattcac
 tccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaactacacaccaggggcagg
 ggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtagcagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagagaac
 accagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggtttgacagccgctagcat
 ttcacacgtggcccgagagctgcatccggagtagtcaagaactgctgatacagcttgcataaagggactttccgctggggactttc
 cagggaggcggtggcctggggcgggactggggagtgggcagccctcagatcctgcatataagcagctgcttttgcctgtactgggtctc
 tctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggttaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttca
 agtagtgtgtgccgtctgttgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaatatcttagcagtagtagtct
 atgtcatcttattatcagattttataacttgcaagaaatgaatatcagagagttagaggccttgacattgctagcgtttaccgtcgacctt
 agctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagca
 taaagtgtaaagcctgggggtgcctaattgagttagctaaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgcttccagtcgggaaacctgt
 cgtgccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggggcgtcttccgcttctcgtcactgactcg
 ctgcgctcggctcgttcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaaggcggttaatacgggtatccacagaatcaggggataacgca
 ggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaacgtaaaaaggccgcttgcgtggcggtttccataggtccgccc
 ccctgacgagcatcacaataatcgacgtcaagttagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggtttccccctgg
 aagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttctcccttcgggaagcgtggcgcttctcata
 gctcacgctgtaggtatctcagttcggttaggtcgttcgctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgc
 gccttatccggttaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcag
 agcgaggtatgtaggcggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagattttggtatctgcgctct
 gctgaagccagttaccttcggaaaaagagtgtgtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcggtgtgtttttgttgaag
 cagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatctttgatctttctacgggggtgacgctcagtggaacgaaaactcacg
 ttaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagttaaatcaatctaaagtatatg
 agtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactcc
 ccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagacccacgctcaccggctc
 cagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagctctattaat
 tgttccgggaagctagagtaagtagttcgccagttatagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgt
 cgtttggtatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggtagctcctt

10

20

30

40

10

20

30

40

cggtcctccgatcgtgtgcagaagtaagttggccgcagtggtatgacatggtatggcagcactgcataattctctactgtcatgccatc
cgtaagatgcttttctgtgactggtgagtagtcaaccaagtcattctgagaatagtgatgctggcgaccgagttgctcttggccggcgta
atacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttctcggggcgaaaactctcaaggatctta
ccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaa
aacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcttttcaatattattgaag
catttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaacaataaggggtccgcgcacatttccccgaaa
agtgccacctgacgtcgacggatcgggagatcaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcac
aaataaagcatttttctactgcattctagtgtgtgtgtgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcaactggataactcaagctaa
ccaaatcatcccaacttcccaccccataccctattaccactgccaaattacgtgtgttcttactctaaacctgtgattcctctgaattat
ttcattttaaagaaattgtattgttaaatatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO: 22)

pLVX-CMV-TCR3-pTert-iCas9 (図 5):

tggaagggtcaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
acacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaaggagg
ccaataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggt
ttgacagccgcctagcatttcacacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttctacaaggga
ctttccgctggggactttccagggaggcgtggcctgggcgggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgct
ttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacctgttaagcctcaataa
agcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaa
aatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaacagaggagctctctcgacgcaggactcggcttctgta
agcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcgactggtgagtagccaaaaattttagtagcggaggctagaaggagagagatgg
gtgagagagcgtcagtagtaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatata
aattaaaacatagtagtgaggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaa
atactgggacagctacaacatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataacagtagcaacctctattgtgtgcatc
aaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
cgccggcgctgacttctcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattg
aaccattaggtagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgtgtgcagagagaaaaagagcagtgggaataggagcttgttctt
gggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtagcggccagacaattattgtctgtgtatagtgc
agcagcagaacaatttctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaa
gaatcctggctgtggaaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgaccactgctgtgc
cttggatgctagtgtggagtaataatctctggaacagatttggatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattaca
caagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatagttttgct
gtactttctatagtgaatagagtttaggcagggatattcaccattatcggttcagaccacacctcccaaccccgaggggacccgcagggcc
cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgcttataaa
gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattacaaaa
caaattacaaaaattcaaaatttctgggttattacagggacagcagagatccagttatcgataagcttgggagttccgcgttacataactt
acggtaaatggccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatag
ggactttcattgacgtcaatgggtggagtattacggtaactgcccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtacgcccc
tattgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgccagtagatgacattatgggacttctacttggcagtagcatctacgtat

tagtcatcgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtagcatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggatttccaagtctcca
ccccattgacgtcaatgggagtttgggttttggcaccaaatcaacgggactttccaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaat
gggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgtgt
tttgacctcatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCatgggcacaaggtgttcttctat
gtggccctttgtctcctgtggaccggtcacatgGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATACCTTGT
TATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTTCTCAAACCATGGGCCATGA
CAAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATCCACTAT
TCCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAACAGTCT
CCAGAATAAGGACGGAGCATTTTCCCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCACA
TACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCCAACATTCAGTACTTCGGC
GCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaggacctgaaaaacgtgttcccaccgaggtcgctgtgtttgagccatc
agaagcagagatctcccacacccaaaaggccacACTAGTgtgcctggccacaggcttctaccccgaccagctggagctgagct
ggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgggtcagcacagacccgcagccccctcaaggagcagccccccctcaatgactcca
gatactgcctgagcagccgctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagtctacgg
gctctcggaagtacgagtgaccagagataggccaaacctgtcaccagatcgtagcgcgagggcctgggtagagcagac
tgtggcttcacctccgagcttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttctagggaaaggccacctgtatgcc
gtgctggcagtgccctcgtgctgatggccatgggtcaagagaaaggattccagaggcGGGAGCGGAGCCACGAAC
TTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCTatggcaggca
ttcagctttatttattgtacttgggtgcagctggactgggtctcgagaGGTCAACAGCTGAATCAGAGTCCTC
AATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAACTGCACTTCTTCAAG
CATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGGGAAGGTCCTGTCTC
TTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGGAAGACTGACTGCTC
AGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCAGCATCCATACCTAG
TGATGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAAGTTACCTTTGGAAC
GGAACAAAGCTCCAAGTCATCCCAaatatccagaacctgacctgacctgtaccagctgagagactctaaatc
cagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgttatatcacagacaaaa
ctgtgctagacatgaggtctatggactcaagagcaacagtGCGGCCgcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgc
cttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggtcgagaaaagctttgaaac
agatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgggttcgaatcctcctcctgaaagtggccgggttaatctgctcatgacgctg
cggctgtggtccagcTGActcgagggatcccggccctctcctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataagg
ccggtgtgcgtttgtctatattttccaccatattgccgtctttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttctgacgag
cattcctaggggtcttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaaga
caaacaacgtctgtagcgacctttgagggcagcggaaacccccacctggcgacaggtgcctctcgcgccaaaagccacgtgtata
agatacacctgcaaaggcggcacaacccagtgccacgtgtgagttggatagttgtggaaagagtcaaattggctcacctcaagcgta
ttcaacaaggggtgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgttag
tcgaggttaaaaaacgtctagggcccccgaaacacggggacgtggttttctttgaaaaacacgatgataatatgggtgagcaagggcg
aggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcg
agggcgagggcgagggccgcccctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccctgcct
gggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctcaaggcctacgtgaagcaccgccgacatccccgactactgaagctgtccttc
cccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcaggagcggcggtggtgacctgacctgagactcctcctgcaggacg

10

20

30

40

gcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaactccccctcgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggag
gcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgcca
ctacgacgtgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgctacaacgtcaacatcaagttggaca
tcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgcggaggggccgactccaccggcggtatggacgagct
gtacaagtgaacgcgtctggaacaagctttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctcaaagagcagcagagaagcgttcagagg
aaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgtgcccggctcggggatgcggggggagcgcgggaccgg
agcggagccccggggcggtcgtcgtgccccctagcggggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggggggggctgtcc
ccgtgagctcttactccctatcagtgatagagaacgtatgaagagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgcagactttactcccta
tcagtgatagagaacgtataaggagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgaccagtttactccctatcagtgatagagaacgtat
ctacagtttactccctatcagtgatagagaacgtatataccagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgtcaggttaggcgtgtacg
gtgggcgcctataaaagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctggagcaattccacaacacttttcttatacttATGCTC
GAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAG
CGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
GTTGATTCTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGG
AGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAG
CCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCAT
CATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAATCT
GGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTATGTCGGTGTCTTTGAGAGTTTGA
GGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCT
CATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGC
TCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGG
TGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGC
TGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCA
CGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCACAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
ATGCCCTGTGTGCGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCC
AGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAG
AAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCA
GTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACC
AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCT
ACTTTCCAGGTTTTTGTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG
AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCT
GGTTGCTTTAATTTCCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAAACATCAGTCGACTATCC
GTACGACGTACCAGACTACGCACTCGACTAAaagctttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctc
aaagagcagcagagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgtgcccggctcgg
ggatgcgggggggagcgcgggaccggagcggagccccggcggtcgtcgtgccccctagcggggggagggacgtaattacatc
cctgggggctttgggagggggctgtccccgtgagctcaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactat
gttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcctgtataaatc
ctggttgctgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcggtgtgcactgtgttgctgacgcaacccccactggt
tggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgtttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttg

10

20

30

40

cccgctgctggacaggggctcggtgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtccttccatggctgctcgcc
 tgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtccctcgccctcaatccagcggaccttctcccggcgctgctg
 ccggctctgcggccttccgcgtcttcgccttcgcccacagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgctggaattaattctg
 cagtcgagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaaga
 ggaggaggaggtgggtttccagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttataaa
 gaaaagaggggactggaagggctaattactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcc
 ctgattagcagaactacacaccaggggaggggctcagatatccactgaccttggatgggtgctacaagctagtagcaggttagccagat
 aaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagt
 gttagagtggaggtttgacagccgcctagcattcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtagtactcaagaactgctgatatcgag
 cttgctacaagggactttccgctggggactttccagggagcggtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgc
 atataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaaccactg
 ctttaagcctcaataaagcttgccttgagtgtcttaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagaccctt
 tagtcagtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttatttactgatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgaga
 ggcttgacattgctagcgtttaccgtgacctctagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctgtgtgaaattgttatccgc
 tcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatagtgagtaactcacattaattgcgttg
 cgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcggtttgcgta
 ttggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgtcgttcggtcgtcgagcggtatcagctcactcaaggcggtat
 atacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaagg
 ccgctgtgctggcggttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaaaccgac
 aggactataaagataaccaggcggtttccctggaagctccctcgtcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgc
 ctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtg
 tgcacgaacccccgttcagcccagccgtgcgccttatccggttaactatcgtcttgagccaacccggttaagacacgacttatcgcca
 ctggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggct
 aactagaagaacagtattttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagtggtagctcttgatccggcaaaacaa
 ccaccgctggtagcggtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacg
 gggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaatta
 aaaatgaagttttaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgat
 ctgtctatttctgtcatcatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgca
 atgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgagcaagtggtcc
 tgcaactttatccgcctccatccagctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttggtgc
 cattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatcc
 cccatgttggtgcaaaaaagcggttagctcctcggctcctccgatcgttgctcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatgg
 cagcactgcataattctcttactgtcatgcatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgat
 gggcgagccaggttgctcttggcggtcaataacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaa
 cgcttctcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgatagatccagttcgtatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcat
 cttttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttg
 aatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaa
 caaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatcaactgtttattgcagcttataatgg
 ttacaataaagcaatagcatcacaaattcacaaataaagcattttttcactgcatctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta
 tcatgtctggatcaactggataactcaagctaaccaaaatcatccaaacttccacccataccctattaccactgccaattacctgtggt

10

20

30

40

ttcatttactctaaacctgtgattcctctgaattattttcattttaagaaattgtatttgttaaataatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO: 23)	
pLVX-CMV-TCR4-pTert-iCas9 (図 6):	
tgggaagggttaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctactccctgattagcagaact acacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttttgatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagg ccaataaaggagagaacaccagctgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacctggagagagaagtgttagagtggaggt ttgacagccgcctagcatttcacacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttctacaaggga ctttccgctggggactttccagggagggcgtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgct ttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataa agcttgccttgagtcttcaagtagtgtgtgccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaa aatctctagcagtggcgccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttctgta agcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcactggtgagtacgcaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgg gtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaatata aattaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagacaa atactgggacagctacaaccatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtcatc aaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag cggccggcctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattg aaccattaggtagtagcaccaccaaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgggaataggagcttgttcctt ggggttctgggagcagcaggaagcactatgggcgacgctcaatgacgtgcaggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgc agcagcagaacaatttctgagggtattgaggcgcaacagcatctgttgaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaa gaatcctggctgtgaaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttggggttgcctctggaaaactcatttgaccactgctgtgc cttggaatgctagtgtgagtaataatctctggaacagatttggatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattaca caagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattatcataatgatagtaggaggcttggtaggttaagaatggttttgc gtactttctatagtaatagagttaggcaggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcc cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacgggtatcgcttataaa gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaagaattacaaaa caaattacaaaaattcaaaatttccgggtttattacagggacagcagagatccagtttatcgataagcttgggagttccgcgttacataact acggtaaatggccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggttaaactgccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgcccc tattgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagttacatctacgtat tagtcatcgctattaccatgggtgatgcggttttggcagttacatcaatggcggtggatagcggtttgactcacggggatttcaagtctcca cccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccacaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaaactccgccccattgacgcaaat gggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgtgt tttgacctcatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCatgggaatcaggctcctgtgtcg tgtggccttttcttctggtgtaggactagtaGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATACCTTGT TATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGCCATGA CAAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATCCACTAT TCCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAACAGTCT	10 20 30 40

CCAGAATAAGGACGGAGCATTTCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCACA
 TACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCCAACATTCAGTACTTCGGC
 GCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaggacctgaaaaacgtgtcccaccgaggtcgctgtgtttgagccatc
 agaagcagagatctcccacacccaaaaggccacACTgGCAtgcctggccacaggcttctaccccaccacgtggagctgagc
 tgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgggggtcagcacagaccgcagcccccaaggagcagcccgccctcaatgactcca
 gatactgcctgagcagccgcctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgg
 gctctcggagaatgacgagtggaccaggatagggccaaacctgtcaccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagac
 tgtggcttccctccgagcttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttctagggaaaggccaccttgtatgcc
 gtgctggcagtgccctcgctgtgatggccatgggtcaagagaaaggattccagaggcGGGAGCGGAGCCACGAAC
 TTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCTCTatgacacgagt
 tagcttgcctgtgggcagtcgtggtctccacctgtctcagtcgggcctgGGTCAACAGCTGAATCAGAGTCCTC
 AATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAACTGCACTTCTTCAAG
 CATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGGGAAGGTCCTGTCTC
 TTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGGAAGACTGACTGCTC
 AGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCTGAATATCTCAGCATCCATACCTAG
 TGATGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAAGTTACCTTTGGAAC
 GGAACAAAGCTCCAAGTCATCCCAaatatccagaacctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaatc
 cagtgaacagtcgtctgcctattccagattttgattctcaaaacatgtgtcacaaagtaaggattctgatgttatatcacagacaaaa
 ctgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtGCGGCCgcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgc
 cttaacaacagcattattccagaagacaccttctccccagcccagaaagtctcgtgtatgtcaagctggtcgagaaaagctttgaaac
 agatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgggttcgaatcctcctcctgaaagtggccgggttaatctgctcatgacgtg
 cggtgtggtccagcTGAActegaggatccccccctctcctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataagg
 ccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtctttggcaatgtgaggcccgaaacctggccctgtctcttgacgag
 cattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaaga
 caaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtcctctcgggccaaaagccacgtgtata
 agatacacctgcaaaggcggcacaacccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtc aaatggctcacctcaagcgta
 ttcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtttag
 tcgaggttaaaaaacgtctagggccccgaaccacggggacgtggttttctttgaaaaacacgatgataatatggtagcaagggcg
 aggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgttcaaggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagatcg
 agggcgagggcgagggcgccccctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgct
 gggacatcctgtccctcagttcatgtacggctcaaggcctacgtgaagcaccgcccgcacatccccgactacttgaagctgtccttc
 cccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggtggtgacctgaccagactcctccctgcaggacg
 gcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttccccccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggag
 gcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgcca
 ctacgacgtgaggtcaagaccactacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgccctacaacgtcaacatcaagttggaca
 tcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgcccagggccgactccaccggcgcatggacgagct
 gtacaagtgaacgcgtctggaacaagctttttccccgtatccccaggtgtctgcaggctcaagagcagcgagaagcgttcagagg
 aaagcgatcccgtgccaccttccccgtgcccgggctgtccccgcacgtgcgggctcggggatgcggggggagcgccggaccgg
 agcggagccccgggcggtcgtcgtgccccctagcgggggagggacgttaattacatccctgggggctttgggggggggctgtcc
 ccgtgagctcttactccctatcagtgatagagaacgtatgaagagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgcagactttactcccta

10

20

30

40

tcagtgatagagaacgtataaggagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgaccagtttactccctatcagtgatagagaacgtat
ctacagtttactccctatcagtgatagagaacgtatatccagtttactccctatcagtgatagagaacgtatgtcgaggtaggcgtgtacg
gtgggcgccctataaaagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgccctggagcaattccacaacactttgtcttatacttATGCTC
GAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGAGACGGGCGCACCTTCCCCAAG
CGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
GTTGATTCTCTCCCGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGG
AGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAG
CCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCAT
CATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAATCT
GGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTTGAGAGTTTGA
GGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCT
CATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGC
TCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGG
TGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGC
TGGCGCGGCAGGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCA
CGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGG
ATGCCCTGTGTGCGTTCGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCC
AGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAG
AAAGACCATGGGTTTGGAGTGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCA
GTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACC
AGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCT
ACTTTCCAGGTTTTTGTTCCTGGAGGGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTG
AGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCT
CCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCT
GGTTGCTTTAATTTCTCCGGAATAAACTTTTCTTTAAACATCAGTCGACTATCC
GTACGACGTACCAGACTACGCACTCGACTAAaagcttttccccgtatccccccaggtgtctgcaggctc
aaagagcagcgagaagcgttcagaggaaagcgatcccgtgccaccttccccgtccccgggctgtccccgcacgtgccggctcgg
ggatgccccgggagcgccggaccggagcgagccccgggcggtcgtcgtccccctagcgggggaggagcgttaattacatc
cctgggggctttgggagggggctgtccccgtgagctcaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtattcttaactat
gttgctccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcctgtataaatc
ctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgtgacgcaacccccactggt
tggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggactttcgttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttg
cccgtgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtgggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcgc
tgtgttgccacctggattctgcgaggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcgaccttcttcccgcgccctgctg
ccggctctgcggccttctccgcttctgccttcgcccctcagacgagtcggatctcccttgggcccgcctccccgcctggaattaattctg
cagtcgagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaaga
ggaggaggaggtgggttttcagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttataaa
gaaaagaggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcc
ctgattagcagaactacacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttggatgggtgctacaagctagtagcaggttagccagat
aaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagctgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagt

10

20

30

40

gtagagtgagggttgacagccgctagcattcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtactcaagaactgctgatatcgag
 cttgctacaagggactttccgctggggactttccagggaggcggtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgc
 atataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctgtgtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccactg
 cttaagcctcaataaagcttgccctgagtgctcaagtagtggtgctgctgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttt
 tagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagttttataacttgcaaagaatgaatatcagagagtgaga
 ggcccttgacattgctagcgtttaccgtcgacctctagctagagcttgccgtaatcatggtcatagctgtttctgtgtgaaattgttatccgc
 tcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatagtgagtgagctaactcacattaattgcgttg
 cgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgcgta
 ttgggagctcttccgcttccctgctcactgactcgtcgcgtcggtcggtcggtgagcggtatcagctcactcaaaggcggtgta
 atacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaagg
 ccggttgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaacccgac
 aggactataaagataaccaggcggtttccccctggaagctccctcgctgcgtctctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgc
 ctttctcccttgggaagcgtggcggttttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtg
 tgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgccttatccgtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgcca
 ctggcagcagccactggttaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggct
 aactagaagaacagtagtttggtagctgcgtctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaa
 ccaccgctggtagcggtgggtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacg
 gggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattacaaaaaggatcttcacctagatccttttaatta
 aaaatgaagttttaaatcaatcaaatgaatatatgagtaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgat
 ctgtctatttctgtcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgca
 atgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagaataaaccagccagccggaaggggcgagcgagcaagtggttc
 tgcaactttatccgctccatccagctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatgtttgcgcaacgttggtgc
 cattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcc
 cccatgttgtcaaaaaagcggttagctccttcggctcctccgatcgttgctcagaagtaagtggccgcagtggttatcactcatggttatgg
 cagcactgcataattctctactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtat
 gcggcgaccgagttgctcttgcccggtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaa
 cggttctcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcat
 cttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtg
 aatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaaaataaa
 caaataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtccacctgacgtcgacggatcgggagatcaactgtttattgcagcttataatgg
 ttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttctactgattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatctta
 tcatgtctggatcaactggataactcaagctaaccaaaatcatccaaacttcccacccataccctattaccactgccaattacctgtggt
 ttcatctactctaaacctgtgattcctctgaattattttcatttttaagaaattgtattgttaaatatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID
 NO: 24)

10

20

30

40

pLVX-CMV-TCR5-pTert-iCas9 (図 7):

tggaagggttaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggtatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
 acacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagg
 ccaataaaggagagaacaccagctgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggt
 ttgacagccgctagcattcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgctacaaggga

10

20

30

40

ctttccgctggggactttccagggaggcgtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgct
ttttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacccactgcttaagcctcaataa
agcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgtctgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaa
aatctctagcagtgggcgccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctgacgcaggactcggctgtctga
agcgcgcacggcaagaggcgaggggcgcgactggtgagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
gtgagagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaatata
aattaaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagacaa
atactgggacagctacaacatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataacagtagcaacccctctattgtgtgcatc
aaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
cggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattg
aaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgagggaataggagctttgttcctt
gggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctgttatagtgc
agcagcagaacaatttctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaa
gaatcctggctgtggaaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgc
cttggaaatgctagtgtggagtaataatctctggaacagatttggaaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattaca
caagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggttaggttaagaatagttttgct
gtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacccctccaaccccgaggggacccgcagggcc
cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgatttagtaacggatctcgacggtatcgcttataaaa
gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattacaaaaa
caaattacaaaaattcaaaatttcgggtttattacagggacagcagagatccagttatcgataagcttgggagttccgcgttacataactt
acggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag
ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcccc
tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagttacatctacgtat
tagtcatcgctattaccatgggtgatcggttttggcagttacatcaatggcggtgtagcggtttgactcacggggatttcaaagtcca
ccccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttcaaaatgtcgttaacaaactccgccccattgacgcaaat
gggcggttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgt
tttgacctccatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCAatggcctccctgctcttcttctgtg
gggccttttatctcctgggaaccggttccatgGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATACCTTGTT
ATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGCCATGAC
AAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATCCACTATT
CCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAACAGTCTC
CAGAATAAGGACGGAGCATTTTCCCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCACAT
ACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCAACATTTCAGTACTTCGGCG
CCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgctgtgtttgagccatca
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacACTAGTgtgcttggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagct
ggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacagaccgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactcca
gatactgcctgagcagccgctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagtctacgg
gctctcggaatgacgagtgaccagagataggcccaaacctgtcaccagatcgtagcgcgaggcctggggtagagcagac
tgtggcttcacctccgagttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatctttagtaggaaggccaccttgtatgcc

gtgctggcagtgccctcgtgctgatggccatgggtcaagagaaaggattccagaggcGGGAGCGGAGCCACGAAC
TTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCTatgaactcctct
ctggactttctaattctgatcttaattgttggaggaACTAGTGGTCAACAGCTGAATCAGAGTCCTCAAT
CTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAACTGCACTTCTTCAAGCAT
ATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGGGAAGGTCCTGTCCTCTTG
ATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGGAAGACTGACTGCTCAGT
TTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCAGCATCCATACCTAGTGA
TGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAAGTTACCTTTGGAAGTGA
ACAAAGCTCCAAGTCATCCCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGC
TGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCATGCctattcacgattttgattctcaacaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgtgtggcctg
gagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccagcccagaaagtctctg
tgatgtcaagctggctcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgggtccgaatectcctctg
aaagtggccgggttaactgtctcatgacgtgcggctgtgggtccagcTGActcgagggatcccggccctctcctccccccccct
aacgttactggccgaagccgcttgaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgtattttccacatattgccgtctttggcaatgtgagg
gccccgaaacctggcctgtcttctgacgagcattctaggggtcttccccctctcgccaaaggaatgcaaggctgtgtgaatgtcgtg
aaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcggaacccccacctggcgac
aggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaacccagtgccacgtgtgagttggatagttg
tggaaagagtcaaatggctcacctcaagcgtattcaacaaggggtgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatct
ggggcctcgtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctagggccccgaaccacggggacgtggtttcctttga
aaaacacgatgataatattggtgagcaagggcgaggagataacatggccatcatcaaggagttcatgcgttcaagggtgcacatgga
gggctcctgtaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgccccctacgagggcacccagaccgccaagctga
aggtgaccaagggtggccccctgcccttcgctgggacatcctgtccccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcacc
cgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgctgatgaacttcgaggacggcgcgctggt
gaccgtgaccagactcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggatgaagctgcgcggcaccacacttccccctcgacggcc
ccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctcctcgagcggtatgtacccgaggacggcgccctgaaggcgagatca
agcagaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgtgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagccccgtgcagctgc
ccggcgctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcggtgaacagtacgaacgcgcgag
ggccgcccactccaccggcgcatggacgagctgtacaagtgaacgcgtctggaacaagcttttccccgtatccccccaggtgtctgc
aggctcaaagagcagcgagaagcgttcagaggaaaagcgatcccgtgccacattccccgtgccccgggtgtccccgcacgtgccg
gctcggggatgcggggggagcgccggaccggagcgagccccggggcggtcgtgctgccccctagcgggggagggacgtaa
ttacatccctgggggctttgggggggggctgtccccgtgagctcttactccctatcagtgatagagaacgtatgaagagttactccctat
cagtgatagagaacgtatgcagactttactccctatcagtgatagagaacgtataaggagtttactccctatcagtgatagagaacgtatg
accagtttactccctatcagtgatagagaacgtatctacagtttactccctatcagtgatagagaacgtatatccagtttactccctatcagt
gatagagaacgtatgtcgaggtaggcgtgtacggtggcgccctataaaagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctggagc
aattccacaacacttttgtcttatacttATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAGACTATCTCCCCAGGA
GACGGGCGCACCTTCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGG
ATGCTTGAAGATGGAAAGAAAGTTGATTCCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTT
AAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCC
CAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATG

10

20

30

40

GTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGT
 GGAGCTTCTAAAACCTGGAATCTGGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGA
 TGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGC
 ATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGT
 CCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCG
 CTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAA
 ATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCGGCAGGACCACGGTGCTCTGGACTGCT
 GCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCACCTGCAGTTCCCAGG
 GGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCCGTCGAGAAGATTGTGAACATC
 TTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGGAAGCCCAAGCTCTTTTTTCATCC
 AGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGACCATGGGTTTGAGGTGGCCTCCACTTCCC
 CTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGTTCCAGG
 AAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACACCCAG
 TGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCCCA
 AGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
 CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAA
 GGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTT
 TAAACATCAGTCGACTATCCGTACGACGTACCAGACTACGCACTCGACTAAaagc
 ttttccccgatccccaggtgtctgcaggtcaaagagcagcagagaagcgttcagaggaaagcgaatccccgtgccaccttccccgt
 gccccgggctgtccccgcacgtgcccggctcggggatgcggggggagcgcggaccggagcggagccccgggcggtcgtcgtcgt
 gccccctagcgggggagggacgtaattacatccctgggggctttgggagggggctgtccccgtgagctcaatcaacctctggattac
 aaaattgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgtcgtttaatgcctttgtatcatgctattgctt
 cccgtatggctttcattttctcctctgtataaatcctggttgcgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcgtggt
 gtgcactgtgtttgtgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctcccta
 ttgccacggcggaactcatcgccgctgcttggcctgctggacaggggctcggctgttgggactgacaattccgtggtgtgtc
 ggggaagctgacgtcctttcatggctgctgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccct
 caatccagcggaccttccctcccgccgctgctgcgggctctgcggcctcttccgctcttcgcttcgacctagacgagtcggatct
 cctttgggcccctccccgctggaattaattctgcagtcgagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagct
 accaatgctgattgtgctgtagaagcacaagaggaggaggaggtgggtttccagtcacacctcaggtaccttaagaccaatga
 cttaaacaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagaggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatac
 cttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcctgattagcagaactacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttt
 ggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtg
 agcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggtttgacagccgcttagcatttcacagtggtcccgagag
 ctgcatccggagctactcaagaactgctgatatcgagcttgcataagggactttccgctggggactttccagggaggcgtggcctggg
 cgggactggggagtgggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgag
 cctgggagctctctggctaactaggggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtt
 gtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatt
 tataacttcaaagaaatgaatatcagagagtgcagggccttgacattgctagcgtttaccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatc
 atggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacacattccacacaacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggt
 gcctaattgagtgcactaacacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaa

10

20

30

40

tcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttctcgctcactgactcgctcgctcggtcggtcggtcg
 cggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtataacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaa
 aggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcggttttccataggctccgccccctgacgagcatcaca
 atcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccaggcggttccccctggaagctccctcgcgctctcc
 tgttccgacctgcccgttaccggatactgtccgctttctccttcgggaagcggtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctca
 gttcgggtgtaggtcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccggtcagcccgaccgctgcgccttatccggttaactatcgt
 cttgagtcgaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggt
 gctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatgttggtatctgcgctctgtgaagccagttaccttcg
 gaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaccccgctggtagcggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcaga
 aaaaaaggatctcaagaagatctttgatcttttctacgggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggtttgtcatga
 gattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaaataaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggctgacagt
 taccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttctgctcatccatagttgcctgactccccgctgtagataactacg
 atacgggagggccttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaacc
 agccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagtcctattaattgttgcggggaagctagagt
 aagtagttcgcagttaatagtttgcgcaacgttggtgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgctgttggtatggcttcattcag
 ctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgtgcaaaaaagcggttagctccttcggctcctccgatcgtgtcag
 aagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgact
 ggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatggcgacccaggtgtccttgcccggtcaatacgggataataccgcgc
 acatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcg
 atgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttaccagcggttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgcc
 gcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactatacttctcttttcaatattattgaagcatttatcagggtattgtctc
 atgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgac
 ggatcgggagatcaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttctactg
 cattctagtgtgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcaactggataactcaagctaaccaaaatcatccaaacttc
 ccacccataacctattaccactgccaaactgtggtttcatttactctaaacctgtgattcctctgaattatttctatttaagaaattgtat
 ttgttaaatatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO: 25)

10

20

30

40

pLVX-CMV-TCR1 (図 8):

tggaagggtcaattcactccaaagaagacaagatatcctgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
 acacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagg
 ccaataaaggagagaacaccagcttggtacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggt
 ttgacagccgcttagcatttcacacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgctacaaggga
 ctttccgctggggactttccaggaggcggtggcctggcgggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgct
 tttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaaactagggaaccactgcttaagcctcaataa
 agcttgcttgagtgttcaagtagtgtgtgccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaa
 aatctctagcagtgggcgccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggctgtgta
 agcgcgcacggcaagaggcgaggggcgcgactggtgagtacccaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
 gtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatata
 aattaaaacatagtagtgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagaaa
 atactgggacagctacaacctccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacccctctattgtgtgcatc

aaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
 cggccggcgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataagtagtaaaaattg
 aaccattaggagtagcaccaccaaaggcaaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagctttgttcctt
 ggggttctgggagcagcaggaagcactatgggcgagcgtcaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctgtgtatagtgc
 agcagcagaacaatttgctgagggctattgagggcgcaacagcatctgttgaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaa
 gaatcctggctgtggaaagatacctaaggaatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcattgaccactgctgtgc
 cttggaatgctagtgtggagtaataaatctctggaacagatttgaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattaca
 caagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
 tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatagttttgct
 gtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgcagggcc
 cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggatcgctttaa
 gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaagaattacaaaa
 caaattacaaaaattcaaaatttctgggttattacagggacagcagagatccagtttgcataagcttgggagttccgcgttacataact
 acggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag
 ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttaccggtaaactgcccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtagcccc
 tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtagcatgacattatgggactttcctacttggcagtagcatctacgtat
 tagtcatcgctattaccatgggtgatcggttttggcagtagcatcaatgggctggatagcggttgactcacggggatttccaagtcca
 cccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccacaaatcaacgggactttccaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaat
 gggcggtaggcggtgacggtgggaggtctatataagcagagctcggttagtgaacgctcagatcgctggagacgccatccacgtgtg
 tttgacctccatagaagacaccgactctactagaggatctattccggtgAATTCGCCACCatgagcctcgggctcctgtgtg
 tggggcctttctcctgtgggcaggaccggtgGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATACCTTG
 TTATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGCCATG
 ACAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATCCACT
 ATTCCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAACAGT
 CTCCAGAATAAGGACGGAGCATTTTCCCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCA
 CATACTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCAACATTTCAGTACTTCG
 GCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCG
 AACTAGTCgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtgctggccacaggcttctac
 cccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacagaccgcagcccctcaaggag
 cagccccccctcaatgactccagatactgcctgagcagccgctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgcaaccacttc
 cgctgtcaagtccagttctacgggctctcggaatgacgagtggaccaggtatagggcaaacctgtcaccagatcgtagcgcc
 gaggcctggggtagagcagactgtggcttcacctccagcttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttgc
 aggggaaggccaccttgtatgccgtgctggtcagtgccctcgctgtatggccatggtcaagagaaaggattccagaggcGGGAG
 CGGAGCCACGAACCTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCC
 CGGTCCatgacacaggttagctgtgtgggcagtcgtgggtctccacctgtctcgagtccggcatGGTCAACAGCT
 GAATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAAC
 TGCATTCTTCAAGCATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGGG
 AAGGTCCTGTCTCTTGTATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGG
 AAGACTGACTGCTCAGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCA
 GCATCCATACCTAGTGATGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAAG

10

20

30

40

TTACCTTTGGAAC TGGAA CAAAGCTCCAAGTCATCCCAAATATCCAGAACCCTGA
 CCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCctattc
 accgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgttatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatgga
 cttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgcgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagaca
 ccttctccccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaacctgtc
 agtgattgggttccgaatcctcctcctgaaagtggcgggttaatctgctcatgacgctgaggctgtgggtccagcTGAActcgaggga
 tccccccctctccctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttggataaaggccggtgtgctgtttgtctatatgttattttccac
 catattgccgtcttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttccctctcgcctaaa
 ggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcag
 gcagcgggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcgccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccc
 cagtgccacgttgtgagttggatagttgtgaaagagtcaaatggctcacctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccaga
 aggtacccattgtatgggatctgatctgggacctcggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggccccccg
 aaccacggggacgtggttttctttgaaaaacacgatgataatgtgtgagcaaggcgaggaggataacatggccatcatcaagga
 gttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgcccttac
 gagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgctgggacatcctgtccctcagttcatgtac
 ggctccaaggcctacgtgaagcaccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtg
 atgaacttcgaggacggcggtgtgacgtgaccaggaactcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcg
 cggcaccaacttccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggatgtaccccgag
 gacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgtgaggtcaagaccacctac
 aaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctccacaacgaggactacacat
 cgtggaacagtacgaacgcgcccagggccgcccactccaccggcgccatggacgagctgtacaagtgaacgcgtctggaacaatca
 acctctggattacaaaatttgtgaagattgactggtattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatagcgtgctttaatgcctttgtat
 catgtattgcttcccgatggcctttcttctccttgtataaatcctggtgtgtctctttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaa
 cgtggcgtggtgtgactgtgtttgtgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctt
 tccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgcttgcctgctggacaggggctcggtgttgggcactgacaattc
 cgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttggccacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtc
 ccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgccctgctgcccgtctgcggcctcttccgcgtcttcgcttccgctcagacg
 agtcggatctccctttgggcccctccccgctggaattaattctgcagtcgagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagcaat
 acagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggaggaggaggtgggtttccagtcacacctcaggtacctttaa
 gaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagaggggactggaagggttaattcactccaacgaag
 acaagatatccttgatctgtgatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaactacacaccagggccaggggtcagatc
 cactgacctttggatggtgtctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagctgtt
 acacctgtgagcctgcatggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggtttgacagccgcttagcatttcatcagtg
 gcccagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgcataagggactttccgctggggactttccagggaggc
 gtggcctgggcccggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctgtggtaga
 ccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacctgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtg
 tggcgtctgtgtgactctggttaactagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatctt
 attattcagttattataacttgaagaaatgaatatcagagagtgaaggccttgacattgctagcgtttaccgtcgacctctagctagag
 cttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagccgggaagcataaagtga
 aagcctgggggtgcctaagtgtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgttccagtcgggaaacctgtcgtgccagc

10

20

30

40

tgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttctcgctcactgactcgctgcgctcg
 gtcgttccgctcgcgcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaac
 atgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacgtaaaaaggccggttctggcggttttccataggctccgccccctgacga
 gcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaagctccct
 cgtgcgctctctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttttctccctcgggaagcggtggcgctttctcatagctcacgc
 tgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatcc
 ggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggt
 atgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgtgaagc
 cagttaccttcggaaaaagagttgtagctcttgatccggcaaaacaccaccgctggttagcggtggtttttgttgcaagcagcagat
 tacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccttgatcttttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaaactcacgttaaggga
 ttttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaactt
 ggtctgacagttaccaatgcttaatacagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatcatagttgcctgactccccgtcgtgt
 agataactacgatacgggaggggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttacc
 agcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgctccatccagctctattaattgttgccgg
 gaagctagagtaagtagttgccagttaatagtttgcgcaacgttgtgccattgctacaggcatcggtgtcacgctcgtctgttggat
 ggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttggtgcaaaaaagcggttagctcctcggtcctcc
 gatcgttgctcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagat
 gcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatacggg
 ataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaaactcaaggatcttaccgctgtt
 gagatccagttcgtgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacagga
 aggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcatttatca
 ggggtattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataaggggttccgcgcacatttccccgaaaagtcca
 cctgacgtcgacggatcgggagatcaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaaattcacaaataaa
 gcatttttctactgcattctagtgtgtgttgcctaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcaactggataactcaagctaaccaaaat
 catccaaaacttccacccataccctattaccactgccaattacctgtggtttcatttactctaaacctgtgattcctctgaatttttcat
 aaagaaattgtattgttaaatatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO: 26)

10

20

30

40

pLVX-CMV-TCR2 (図 9):

tggaagggtcaattcactccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
 acacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagg
 ccaataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtgaggt
 ttgacagccgcctagcatttcatcagtggtggcgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttctacaaggga
 ctttccgctggggactttccaggaggcggtggcctgggcgggactggggagtggcgagccctcagatcctgcataagcagctgct
 tttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaaactaggaaccactgcttaagcctcaataa
 agcttgcttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaa
 aatctctagcagtggtggccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggctgtgta
 agcgcgcacggcaagaggcgaggggcgcgactggtgagtacccaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
 gtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatata
 aattaaaacatagtagtgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagaca
 atactgggacagctacaacctccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacccctattgtgtgcatc

aaaggatagagataaaagacaccaaggaagccttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
 cggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataagtagtaaaaattg
 aaccattaggtagtagcaccaccaaaggcaaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagctttgttcctt
 ggggttctgggagcagcaggaagcactatgggcgacgcgtcaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgc
 agcagcagaacaatttgctgagggctattgagggcgaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaa
 gaatcctggctgtggaaagatacctaaggaatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcattgaccactgctgtgc
 cttggaatgctagtgtggagtaataaatctctggaacagatttggaaacacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattaca
 caagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
 tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggttggttaggttaagaatagttttgtc
 gtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacacctcccaaccccgagggggacccgcagaggcc
 cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggatcgctttaa
 gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaagaattacaaaa
 caaattacaaaaattcaaaatttctgggttattacagggacagcagagatccagtttgcataagcttgggagttccgcgttacataact
 acggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag
 ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttaccgtaactgccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtagcggcc
 tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtagacattatgggactttcctacttggcagtagcatctacgtat
 tagtcatcgctattaccatgggtgatcggttttggcagtagcatcaatgggcgtggatagcggtttagtcacggggatttccaagtcca
 cccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccacaaatcaacgggactttccaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaat
 gggcggtaggcggtgacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgtgt
 tttgacctccatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCatgggacccaggctcctctctg
 ggactgctttgtctcctcggaacCGGTCCGGTTGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATAC
 CTTGTTATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGC
 CATGACAAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATC
 CACTATTCCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAA
 CAGTCTCCAGAATAAGGACGGAGCATTTTCCCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCC
 CTCACATACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCAACATTCAGTAC
 TTCGGCGCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCAC
 CCGAgGCGGCCGCgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactgggtgtgctggccacagg
 cttctaccccgaccacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacagaccgcagccctc
 aaggagcagcccgccctcaatgactccagatactgacctgagcagccgctgaggggtctcggccaccttctggcagaacccccgaa
 ccacttccgctgtcaagtcagttctacgggctctcggaatgacgagtggaaccaggaataggccaaacctgtcaccagatcgctc
 agcggcgaggcctggggtagagcagactgtggcttcacctccgagttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgaga
 tcttgctagggaaggccacctgtatgccgtgctggctcagtgccctcgtgctgatggccatggtcaagagaaaggattccagaggcG
 GGAGCGGAGCCACGAACCTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAA
 ACCCCGGTCCAtgaactcctctctggactttctaattctgatcttaattgttggaggaACTAGTGGTCAACAGC
 TGAATCAGAGTCCTCAATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAA
 CTGCACTTCTTCAAGCATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGG
 GAAGGTCCTGTCCTCTTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAATG
 GAAGACTGACTGCTCAGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTC
 AGCATCCATACCTAGTGATGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAA

10

20

30

40

GTTACCTTTGGAACCTGGAACAAAGCTCCAAGTCATCCCAAATATCCAGAACCCTG
 ACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCATGCctat
 tcaccgattttgattctcaaaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgttatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatg
 gacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaaga
 cacttcttccccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaactttcaaacct
 gtcagtattgggttccgaatcctcctcctgaaagtggccgggttaatctgctcatgacgctgaggctgtgtggtccagcTGActcgag
 ggatcccgcccctctccctccccccccctaactgtactggccgaagccgcttggataaggccggtgtgctgtttgtctatatgttatttc
 caccatattccgtcttttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttccctctcgcc
 aaaggaatgcaaggtctgtgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgaccctttgc
 aggcagcgggaacccccacctggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaac
 cccagtggcacgttgtgagttggatagttgtggaagagtcacaaatggctcacctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccca
 gaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccc
 cgaaccacggggacgtgggtttctttgaaaaacacgatgataatgtgtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaag
 gattcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgaggcgagggcgagggcgccct
 acgagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgctgggacatcctgtccctcagttcatgt
 acggctccaaggcctacgtgaagcaccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcg
 tgatgaactcgaggacggcgcggtgtgaccgtgaccaggaactcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgc
 gcggcaccaacttccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggatgtacccga
 ggacggcgccctgaaggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgtgaggtcaagaccaccta
 caaggccaagaagccgtgcagctgccggcgccctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacacca
 tctgtgaacagtacgaacgcgcgagggccgcccactccaccggcgccatggacgagctgtacaagtgaacgcgtctggaacaatc
 aacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatagctgtttaatgcctttgt
 atcatgctattgcttccgtatggctttcatttctcctcctgtataaatcctggtgtgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggc
 aacgtggcgtgggtgtgactgtgtttgtgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcg
 ctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgcttgcggctgtggacaggggctcggtgttgggcactgacaat
 tccgtggtgtgtcggggaagctgacgtccttccatggctgtcgcctgtgttggccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacg
 tcccttggccctcaatccagcggaccttccctccgcgccctgtgcgggctctgcggcctcttcgcgcttctgccttcgccttcaga
 cgagtcggatctcccttggggcgccctccccgctggaattaattctgcagtcgagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagc
 aatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggaggaggaggtgggtttccagtcacacctcaggtacctt
 aagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagaggggactggaagggctaattcactcccaacgaa
 gacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaactacacaccagggccaggggtcagatat
 cactgaccttggatgggtgtacaaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagctgt
 tacacctgtgacgtgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtgagggtttgacagccgctagcatttcatcagct
 ggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgtgatacgagcttgcataagggaacttccgctggggactttccagggagg
 cgtggcctggggcgggactggggagtgggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctctggttag
 accagatctgagcctgggagctctctggttaactagggaaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgt
 gtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatc
 ttattattcagttattataacttgcagaagaaatgaatatcagagagtgagaggccttgacattgctagcgtttaccgtcgacctctagctaga
 gcttggcgtaatcatggtcatagctgttctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaaggt
 aaagcctgggggtgcctaataagtgagtaactcacattaattgcgttgcgtcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccag

10

20

30

40

ctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggttgctattgggcgctctccgcttcctcgctcactgactcgctgcgctc
 ggtcggttcggctcgcgagcggtatcagctcactcaaggcggtatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaaga
 acatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaacgtaaaaaggccggttgctggcggttttccataggctccgccccctgacg
 agcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaagctccc
 tcgtgcgctctcctgttccgacctgccccttaccggatacctgtccgcttttcccttcgggaagcggtggcgctttctcatagctcag
 ctgtaggatctcagttcgggttaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttacc
 cggtaatatcgtcttgagtccaacccggttaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgag
 gtatgtaggcggtgctacagagtcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagtatttgggtatcgcgctctgtgaa
 gccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaccccgctggttagcggtggtttttgttgcaagcagca
 gattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaag
 ggattttggctcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatacaatctaaagtatatatgagtaa
 acttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtc
 gtgtagataactacgatacgggaggggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatt
 tatcagcaataaaccagccagccggaaggcgagcgagcaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagctctattaattgttgc
 cgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgaacgttggtgccattgctacaggcatcggtggtcacgctcgtcgttgc
 gtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcc
 tccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctctactgtcatgccatccgtaag
 atgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcggcggtcaatacgg
 gataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctg
 ttgagatccagttcgtatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcggttctgggtgagcaaaaacagg
 aaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttgaataactcatactcttcttttcaatattatgaagcatttacc
 aggggtattgtctcatgagcggtacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaataagggttccgcgcacatttccccgaaaagtgcc
 acctgacgtcgacggatcgggagatcaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataa
 agcattttttcactgcattctagtgtgtgttgcctaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcaactggataactcaagctaaccaaa
 atcatccaaacttcccacccataccctattaccactgccaattacctgtggttcttactctaaacctgtgattcctctgaattattttcatt
 ttaaagaaattgtatttgttaaatatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO: 27)

10

20

30

40

pLVX-CMV-TCR3 (図10):

tggaagggtcaattcactccaaagaagacaagatatcctgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
 acacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagg
 ccaataaaggagagaacaccagcttggtacacctgtgagcctgcatgggatggatgaccggagagagaagtgtagtgagggt
 ttgacagccgcttagcatttcacacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcagcttgctacaaggga
 ctttccgctggggactttccaggaggcggtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcataagcagctgct
 tttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaaactagggaaccactgcttaagcctcaataa
 agcttgcttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaa
 aatctctagcagtggtggcccgaaacagggacttgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctga
 agcgcgcacggcaagaggcgaggggcgcgactggtgagtacccaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
 gtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatata
 aattaaaacatagtagtgggcaagcaggggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagaaa
 atactgggacagctacaacatccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaacccctctattgtgtgcatc

aaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
cggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataagtagtaaaaattg
aaccattaggagtagcaccaccaaggcaaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagcttctgtcctt
gggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgagcgtcaatgacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctgtgtatagtgc
agcagcagaacaatttctgagggtctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctccaggcaa
gaatcctggctgtgaaagatacctaaggaatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgc
cttggaaatgctagtgttgagtaataaatctctggaacagatttggaaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattaca
caagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatagttttgtc
gtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacacctcccaaccccgaggggacccgcagggcc
cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggatcgcttcttaaaa
gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaagaattacaaaa
caaattacaaaaattcaaaatttctgggttattacagggacagcagagatccagtttctgataagcttgggagttccgcgttacataactt
acggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag
ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttaccggtaaactgccacttggcagtagcatcaagtgtatcatatgccaaagtagcggcc
tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtagacgttatgggactttcctacttggcagtagcatctacgtat
tagtcatcgctattaccatgggtgatcggttttggcagtagcatcaatggcggtggatagcggttgactcacggggatttccaagtcca
ccccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccacaaatcaacgggactttccaaatgtcgttaacaaactccgccccattgacgcaat
gggcggtaggcggtgacgggtgggaggtctatataagcagagctcggttagtgaacgtcagatcgctggagacgccatccacgtgtg
tttgacctccatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCatgggcacaaggtgttcttctat
gtggcccttctctcctgtggaccgggtcatatgGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATACCTTGT
TATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGCCATGA
CAAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATCCACTAT
TCCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAACAGTCT
CCAGAATAAGGACGGAGCATTTTCCCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCACA
TACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCCAACATTCAGTACTTCGGC
GCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaggacctgaaaaacgtgttccaccgaggtcgctgtgtttgagccatc
agaagcagagatctcccacacccaaaaggccacACTAGTgtgcctggccacaggttctaccccgaccagtgaggctgagct
gggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgggtgcagcagacccgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactcca
gatactgcctgagcagccgctgaggtctcgccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagtctacgg
gctctcggaatgacgagtggaaccaggatagggccaaacctgtcaccagatcgtcagcgccgaggcctgggtagagcagac
tgtggcttcacctccgagtcttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgatcttctaggggaaggccaccttgtatgcc
gtgctgggtcagtgccctcgctgtgatggccatgggtcaagagaaaggattccagaggcGGGAGCGGAGCCACGAAC
TTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCTatggcaggca
ttcagactttattatgtacttgggtgcagctggactgggtctcgagaGGTCAACAGCTGAATCAGAGTCCTC
AATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAACTGCACTTCTTCAAG
CATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGGGAAGGTCCTGTCTC
TTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGGAAGACTGACTGCTC
AGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCAGCATCCATACCTAG
TGATGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAAGTTACCTTTGGAAC

10

20

30

40

GGAACAAAGCTCCAAGTCATCCCAaatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaatc
 cagtgacaagtctgtctgcctattcaccgatttgcattctcaaaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaa
 ctgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtGCGGCCgcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgc
 cttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccagaaagtctctgtgatgtcaagctggcgagaaaagctttgaaac
 agatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgggttcgaatcctcctctgaaagtggccgggttaatctgctcatgacgctg
 cggctgtgggtccagcTGAActcgagggatcccgccccctctcctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataagg
 ccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgtgagggcccggaacctggccctgtcttctgacgag
 cattcctaggggtcttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaaga
 caaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcgagcggaacccccacctggcgacaggtgcctctcgcgccaaaagccacgtgtata
 agatacacctgcaaaggcgccgacaacccagtgccacgttgtgagttggatagttgtgaaagagtgcaaatggctcacctcaagcgta
 ttcaacaaggggtgaaggatgcccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcacatgctttacatgtgtttag
 tcgaggttaaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggttttctttgaaaaacacgatgataatatggtgagcaagggcg
 agggagataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagatcg
 agggcgagggcgagggcgccccctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggggtggccccctgcccttcgct
 gggacatcctgtccccctcagttcatgtacggctcaaggcctacgtgaagcaccgcccgcacatccccgactacttgaagctgtccttc
 cccgagggcttcaagtgggagcgcggtgatgaacttcgaggacggcgcgctgggtgacctgaccaggaactcctcctgcaggacg
 gcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccacacttccccctcgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggag
 gcctcctccgagcggtgtacccccgaggacggcgccccctgaagggcgagatcaagcagagggtgaagctgaaggacggcgccca
 ctacgacgtgaggtcaagaccactacaaggccaagaagcccggtgcagctgccccggcgctacaacgtcaacatcaagttggaca
 tcacctccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgcccagggccgcccactccaccggcgcatggacgagct
 gtacaagtgaacgcgtctggaacaatcaacctctggtattacaaaatttgaagattgactggtattcttaactatgttgcctctttacgct
 atgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgtattgcttcccgatggctttcatttctcctctgtataaatcctggttgcgtctcttta
 tgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtttgtgacgcaacccccactggttggggcattgccacca
 cctgtcagctcctttccgggactttcgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttcccgtgctggacag
 gggctcgggtgttgggactgacaattccgtggtgttgcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttccacctgga
 ttctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcgaccttcttcccgcggcctgctgcccgtctgcggcctc
 ttccgctcttcgcttccctcagacgagtcggatctccctttggggcgccctccccgctggaattaattctgcagtcgagacctaga
 aaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggaggaggaggtgg
 gtttccagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaagaggggact
 ggaagggctaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacaaaggctacttccctgattagcagaacta
 cacaccagggccaggggtcagatatccactgacctttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagggc
 caataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgaccggagagagaagtgttagagtggaggtt
 tgacagccgccttagcatttcatcagtgcccagagctgcacccggagtagtctcaagaactgctgatatcgagcttgcataagggac
 ttccgctggggactttccagggagcggtggcctggcggggactggggagtgccgagccctcagatcctgcatataagcagctgcttt
 ttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaacccactgcttaagcctcaataaa
 gcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgaggaaa
 atctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagttattataacttgcaagaaatgaatatcagagagtgaaggccctgacattgct
 agcgtttaccgtcgacctctagctagagcttggcgtaacatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacaca
 acatacagccggaagcataaagttaaagcctgggggtgctaataagtgagctaaactacattaattgcgttgcgtcactgcccgt
 ttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgcccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggcgctcttccg

10

20

30

40

cttctcgcctactgactcgcctcggctcgttcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccaca
 gaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttgctggcg
 ttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagat
 accaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcctttctcccttcggg
 aagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
 cgttcagcccagccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagcca
 ctggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaac
 agtatttggtatctgcgtctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtag
 cgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctc
 agtggaaacgaaaactcacgttaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacntagatccttttaataaaaaatgaagtttta
 aatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttc
 atccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggccttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgag
 accacgctcacgggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccg
 cctccatccagtctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgaacggtgttgccattgctacaggc
 atcgtggtgtcacgctcgtcgttggtagtggtcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgtgcaa
 aaaagcgggttagctccttcggtcctccgatcgtgtgcagaagtaagttggccgcagtggttatcactcatggttatggcagcactgcataatt
 ctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtagtcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagt
 tgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttctcggggcg
 aaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttaccag
 cgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttgaatactcactctt
 ccttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataagggttc
 cgcgacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatcaacttggttattgacgttataatggttacaaataaagc
 aatagcatcacaaatttcacaaataaagcattttttactgcattctagtgtgtgtgttgcacaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatc
 aactggataactcaagctaaccaaaatcatccaaacttcccacccatacctattaccactgcccaattacctgtggtttcatttactctaa
 acctgtgattcctctgaattattttcattttaagaaattgtattgttaaatatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO: 28)

10

20

pLVX-CMV-TCR4 (図 11):

30

tggaaagggttaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
 acacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttggatggtgctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagagg
 ccaataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggt
 ttgacagccgcctagcatttcatcacgtggcccagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttctacaaggga
 ctttccgctggggactttccagggaggcgtggcctggcgaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcatataagcagctgct
 ttttgcctgtactgggtctctgtgtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataa
 agcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaa
 aatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttctga
 agcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcgactggtgagtacgcaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
 gtgcgagagcgtcagtattaaaggggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatata
 aattaaaacatagatagggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagacaa
 atactgggacagctacaacctccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatc
 aaaggatagagataaaagacaccaaggaagcttttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag

40

cggccggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaaagtagtaaaaattg
 aaccattaggagtagcaccaccaaggcaaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtggaataggagctttgttcctt
 ggggttctgggagcagcaggaagcactatggcgagcgtcaatgacgtgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgc
 agcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaa
 gaatcctggctgtggaaagatacctaaggatcaacagctcctggggattggggttgccttggaactcatttgaccactgctgtgc
 cttggaatgctagttggagtaataatctctggaacagatttggaatcacagacctggatggagtgggacagagaaattaacaattaca
 caagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
 tgtggaattggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatatagtaggaggttggttaggttaagaatagttttgt
 gtactttctatagtgaatagagtttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcc
 cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgcttataaa
 gaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaactaaagaattacaaaaa
 caaattacaaaaattcaaaatttcgggtttattacagggacagcagagatccagtttatcgataagcttgggagttccgcgttacataact
 acggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag
 ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagtagacatcaagtgtatcatatgccaaagtagcggcc
 tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtagacattatgggactttcctacttggcagtagacatctacgtat
 tagtcatcgctattaccatgggtgatcggttttggcagtagacatcaatggcggtgtagacggtttgactcacggggatttccaggtcca
 cccattgacgtcaatgggagtttgggtggcaccaaatcaacgggactttccaaatgtcgttaacaactccgccccattgacgcaaat
 gggcggttagcggtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgt
 tttgacctccatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCatgggaatcaggtcctgtgtcg
 tgtggcctttgttccgtgtaggactagtaGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATACCTTGT
 TATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGCCATGA
 CAAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAATACACCTCATCCACTAT
 TCCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAACAGTCT
 CCAGAATAAGGACGGAGCATTTTCCCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCACA
 TACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCCAACATTTCAGTACTTCGGC
 GCCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaggacctgaaaaacgtgttccaccgaggtcgctgtgtttgagccatc
 agaagcagagatctcccacacccaaaaggccacACTgGCAtgacctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagc
 tgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgggggtcagcagaccccgagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactcca
 gatactgcctgagcagccgctgaggggtctcgccaccttctggcagaacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgg
 gctctcggagaatgacgagtgaccagagtagggccaaacctgtcaccagatcgctcagcgccgagggcctggggtagagcagac
 tgtggcttcacctccgagtttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttgcctaggggaaggccacctgtatgcc
 gtgtgtgagtcagtcctcgtgtgtatggccatggtcaagagaaaggattccagaggcGGGAGCGGAGCCACGAAC
 TTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCTTatgacacgagt
 tagcttgcgtgggcagtcgtgtctccacctgtctcgagtcggcatgGGTCAACAGCTGAATCAGAGTCCTC
 AATCTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAACTGCACTTCTTCAAG
 CATATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGGGAAGGTCCTGTCTC
 TTGATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGGAAGACTGACTGCTC
 AGTTTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCAGCATCCATACCTAG
 TGATGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAAGTTACCTTTGGAAC
 GGAACAAAGCTCCAAGTCATCCCAaatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaatc

10

20

30

40

cagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaa
 ctgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtGCGGCgcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgc
 cttaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccagcccagaaagtccctgtgatgtcaagctggtcgagaaaagctttgaaac
 agatacgaacctaaactttcaaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctcctgaaaagtggccgggtttaatctgctcatgacgctg
 cggctgtggtccagcTGAActcgagggatcccgcctctcctccccccccctaacgttactggccgaagccgcttgaataagg
 ccggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgccgtctttggcaatgtgagggcccgaaacctggccctgtcttctgacgag
 cattcctaggggtcttccctctcgccaaaggaatgcaaggctgtgtgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaaga
 caaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcgggaacccccacctggcgacaggtgcctctcgcgccaaaagccacgtgtata
 agatacacctgcaaaggcggcacaacccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtgcaaatggctcacctcaagcgta
 ttaacaaggggctgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatctggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgtttag
 tcgaggttaaaaacgtctaggccccccgaaccacggggacgtggtttcctttgaaaaacacgatgataatatggtgagcaagggcg
 aggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttaagggtgcacatggagggtccgtgaacggccacgagttcgagatcg
 agggcgagggcgagggcgccccctacgagggcacccagaccgccaagctgaagggtaccaagggtggccccctgccccctgcct
 gggacatcctgtccctcagttcatgtacggctcaaggcctacgtgaagcaccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttc
 cccgagggcttaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggtggtgacctgaccagactcctcctgcaggacg
 gcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcacaactccccctcgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggag
 gctcctccgagcggatgtacccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgcca
 ctacgacgtgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgctgcagctgccggcgccctacaacgtcaacatcaagttggaca
 tcacctccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtagaacgcgcggagggccgactccaccggcggtgacgagct
 gtacaagtgaacgcgtctggaacaatcaacctctggattacaaaatttggaaagattgactggattcttaactatgtgtccttttacgt
 atgtggatacgtgcttfaatgcctttgtatcatgtctattgcttccgtatggcttcattttctcctcctgtataaatcctggttgcgtctcttta
 tgaggagttgtggccgttgcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgtttgtgacgcaacccccactggttggggcattgccacca
 cctgtcagctcctttccgggactttcgttccccctcctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggcgctgctggacag
 gggctcgggctgttgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttgcacactgga
 ttctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcggaaccttcttcccgcggtgctgcggctctgcggcctc
 ttccgctcttcgcttcgccccagacgagtcggatctcccttggggcgccctccccgctggaattaattctgcagtcgagacctaga
 aaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggaggaggaggtgg
 gttttcagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaaaagaggggact
 ggaagggttaattcactcccaacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaacta
 cacaccaggggccagggtcagatatccactgacctttggatggtgtacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagaggc
 caataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggtt
 tgacagccgctagcattcatcacgtggcccagagctgcatccggagtagtcaagaactgctgatatcgagcttgcataaggagac
 ttccgctggggactttccagggaaggcgtggcctggggcgggactggggagtgccgagccctcagatcctgcatataagcagctgcttt
 ttgctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaa
 gcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagttggaaa
 atctctagcagtagtagttcatgtcatcttatttcatgtattataacttgcaagaaatgaatatcagagagtgagaggccttgacattgct
 agcgtttaccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaaattccacaca
 acatacagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatagtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgt
 ttccagtcgggaaacctgtcggtccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggcgctcttccg
 ctctcgtcactgactcgtcgcgtcggctcgttcggctgcggcgagcggatcagctcactcaaaggcggtataacggttatccaca

10

20

30

40

gaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcg
 ttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagat
 accaggcggttccccctggaagtcctcgtgctctcctgttccgacctgcccgttaccggatactgtccgctttctccctcggg
 aagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
 cgttcagcccagccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagtcacaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagcca
 ctggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagggcggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaac
 agtatttgggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtag
 cgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggctgacgctc
 agtggaaacgaaaactcacgttaagggtatttggctatgagattatcaaaaaggatcttcacntagatccttttaataaaaaatgaagttta
 aatcaatctaaagtatatatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgtatgtctatttcgttc
 atccatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggccttaccatctggccccagtgtgcaatgataccgcgag
 acccagctcacgggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccg
 cctccatccagtctattaattgttgcggggaagctagagtaagtagttcggcagtaataagtttgcgcaacgttgttgcattgctacaggc
 atcgtgggtgacgctcgtcgttggtagtggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaa
 aaaagcgggttagctccttcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataatt
 ctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtagcggcgaccgagt
 tgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattgaaaacgttcttcggggcg
 aaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagtgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccag
 cgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactctt
 ccttttcaatattattgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataagggttc
 cgcgacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatcaactgtttattgcagcttataatgggttacaataaagc
 aatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttctactgcattctagtgtgtgttgcctaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatc
 aactggataactcaagctaaccaaaatcatccaaacttccacccataccctattaccactgccaattacctgtgttcttacttacttaa
 acctgtgattcctctgaattatttctatttaagaaattgtattgttaatatgtactacaaacttagtagt (SEQ ID NO: 29)

10

20

30

40

pLVX-CMV-TCR5 (図 12):

tggaagggttaattcactcccaaagaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgattagcagaact
 acacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttggatgggtctacaagctagtaccagttgagccagataaggtagaagg
 ccaataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtgttagagtggaggt
 ttgacagccgcttagcatttcatcacgtggcccgagagctgcatccggagtacttcaagaactgctgatatcgagcttgcataaggga
 ctttccgctggggactttccagggagcggtggcctgggaggactggggagtggcgagccctcagatcctgcataataagcagctgct
 ttttgcctgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccactgcttaagcctcaataa
 agcttgccttgagtcttcaagtagtgtgtgccgtctgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaa
 aatctctagcagtggtggcggcgaacagggacttgaaagcgaaagggaacagaggagctctctcgacgcaggactcggcttctgta
 agcgcgcacggcaagaggcgaggggcgcgactggtgagtagccaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgg
 gtgcgagagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccaggggggaaagaaaaatata
 aattaaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagacaa
 atactgggacagctacaacctccctcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatc
 aaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagagggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaag
 cggccggcgctgatcttcagacctggaggaggagatatagggaacattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattg

aaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaagagcagtgggaataggagctttgttcctt
gggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgacgcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgc
agcagcagaacaatttctgtagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaa
gaatcctggctgtggaaagatacctaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcattgcaccactgctgtgc
cttggaaatgctagtgtggagtaataatctctggaacagatttggaaacacagcactggatggagtgaggacagagaaattaacaattaca
caagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtt
tgtggaattgggttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatggtttgtc
gtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcggttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacagggc
cgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaaacggatctcgacggtatcgcttataaa
gaaaaggggggatttgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaa
caaattacaaaaattcaaaatttccgggttattacagggacagcagagatccagttatcgataagcttgggagttccgcgttacataactt
acggtaaatggcccgctggctgacgccccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag
ggactttccattgacgtcaatgggtggagttttacggtaaaactgccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgcccc
tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagttacatctacgtat
tagtcatcgctattaccatgggtgatcggttttggcagttacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttcaagtctcca
ccccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccataatcaacgggactttccaaatgtcgttaacaaactccgccccattgacgcaaat
gggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgttagtgaaacgtcagatcgctggagacgccatccacgctgt
ttgacctccatagaagacaccgactctactagaggatctatttccggtgAATTCGCCACCatggcctccctgctcttcttctgtg
gggccttttctcctgggaaccggttccatgGAAGCTGACATCTACCAGACCCCAAGATACCTTGTT
ATAGGGACAGGAAAGAAGATCACTCTGGAATGTTCTCAAACCATGGGCCATGAC
AAAATGTACTGGTATCAACAAGATCCAGGAATGGAACCTACACCTCATCCACTATT
CCTATGGAGTTAATTCCACAGAGAAGGGAGATCTTTCCTCTGAGTCAACAGTCTC
CAGAATAAGGACGGAGCATTTCCTGACCCTGGAGTCTGCCAGGCCCTCACAT
ACCTCTCAGTACCTCTGTGCCAGCAGTCGGACGCCAACATTCAGTACTTCGGCG
CCGGGACCCGGCTCTCAGTGCTGgaggacctgaaaaacgtgttccacccgaggtcgctgtgtttgagccatca
gaagcagagatctccacacccaaaaggccacACTAGTgtgcctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagct
gggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgggtcagcacagacccgcagcccccaaggagcagcccgccctcaatgactcca
gatactgctgagcagccgctgaggtctcgccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgg
gctctcggaatgacgagtgaccaggtataggccaaacctgtcaccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagac
tgtggttccctccgagtttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttctagggaaaggccaccttgtatgcc
gtgctgggtcagtgccctcgtgctgatggccatggtcaagagaaaggattccagaggcGGGAGCGGAGCCACGAAC
TTCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCTTatgaactcctct
ctggactttctaattctgatcttaattgtttggaggaACTAGTGGTCAACAGCTGAATCAGAGTCCTCAAT
CTATGTTTATCCAGGAAGGAGAAGATGTCTCCATGAACTGCACTTCTTCAAGCAT
ATTTAACACCTGGCTATGGTACAAGCAGGAACCTGGGGAAGGTCCTGTCTCTTG
ATAGCCTTATATAAGGCTGGTGAATTGACCTCAAATGGAAGACTGACTGCTCAGT
TTGGTATAACCAGAAAGGACAGCTTCCTGAATATCTCAGCATCCATACCTAGTGA
TGTAGGCATCTACTTCTGTGCTGGCACATACCAGAAAGTTACCTTTGGAAGTGA
ACAAAGCTCCAAGTCATCCCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGC
TGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGCATGCTattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtc

10

20

30

40

acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgtgtggcctg
gagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttctccccagcccagaaagtctctg
tgatgtcaagctggctcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaactttcaaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctctg
aaagtggccgggttaatctgctcatgacgctgcggctgtgggtccagcTGAActcagaggatcccggccctctcctccccccccct
aacgttactggccgaagccgcttgaataaggccgggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtctttggcaatgtgagg
gcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtctttccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgatgtcgtg
aaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaaacaacgtctgtagcgacctttgcaggcagcgggaacccccacctggcgac
aggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtagttggatagttg
tgaaagagtcaaatggctcacctcaagcgtattcaacaaggggtgaaggatgccagaaggtacccattgtatgggatctgatct
ggggcctcgggtgcacatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaaacgtctagggccccgaaccacggggacgtggtttctcttga
aaaacacgatgataatatgttgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatgga
gggtcctgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgccctacgagggcaccagaccgccaagctga
aggtgaccaaggggtggccccctgcccttgcctgggacatcctgtccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcacc
cgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcgcggtgtg
gacctgacccaggactcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccacttccccctcgacggcc
ccgtaatgcagaagaagaccatgggtcgggagggcctcctcgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaaggcgagatca
agcagaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgc
ccggcgctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcggtgaacagtacgaacgcgccgag
ggccgcccactccaccggcgcatggacgagctgtacaagtgaacgcgtctggaacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaag
attgactggtattcttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtgcttaatgcctttgtatcatgtattgcttcccgatggcttca
ttttcctcctgtataaatcctggtgtctgtcttcttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgactgtgttgc
gacgcaacccccactggttggggcattgccaccacgtgcagctcctttccgggactttcgcttccccctcctattgccacggcgga
ctcatcgccgctgccttggcgtgctggacaggggtcggctgttgggactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgt
cctttccatggctgctgcctgtgttggcacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttggccctcaatccagcggacct
tcttccccggcgctgctccggctctgcggccttctccgcttctgccttccctcagacgagtcggatctccctttggcgccctc
cccgctggaattaattctgcagtcgagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgc
ctggctagaagcacaagaggaggaggaggtgggtttccagtcacacctcaggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgta
gatcttagccactttttaaaagaaaagaggggactggaagggttaattcactccaacgaagacaagatatccttgatctgtggtatc
cacacacaaggctacttccctgattagcagaactacaccagggccaggggtcagatatccactgaccttggatggtgtacaagct
agtaccagttgagccagataaggtagaagaggccaataaaggagagaacaccagcttgttacacctgtgagcctgcattgggatgga
tgacccggagagagaagtgtagtgagggtttgacagccgctagcatttcacacgtggcccagagctgcacccggagtacttc
aagaactgctgatatcgagcttgctacaagggactttccgctggggactttccaggaggcgtggcctggcggggactggggagtgg
cgagccctcagatcctgcataataagcagctgcttttgcctgtactgggtctctgtggttagaccagatctgagcctgggagctcttggc
taactaggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgttcaagtagtgtgtgccgctgtgtgtgactctggttaacta
gagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagattattataacttgcaagaaat
gaatatcagagagtgagaggccttgacattgctagcgtttaccgtcgacctctagctagagcttggcgtaacatgggtcatagctgttcc
tgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaagtgtgagct
aactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcg
gggagaggcggtttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatc
agctcactcaaaggcggtataacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaag

10

20

30

40

```

gccaggaaccgtaaaaaaggccgctgtggtggttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtc
agaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggtttccccctggaagctccctcgctgcgtctcctgttccgaccctgcc
gcttaccggatacctgtccgctttctcccttcgggaagcggtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcg
ttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccggtcagcccgaccgctgcgccttatccgtaactatcgctttagtccaacccg
gtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgtacagagttcttga
agtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagatatttggtatctgcgctctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagttgga
gctcttgatccggcaacaaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaa
gaagatcctttgatcttttctacggggtgtgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggat
cttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatca
gtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttctgtcatccatagttgcctgactccccgctgtgtagataactacgatacgggagggttca
ccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcacgggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagg
gccgagcgcagaaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttgccagtt
aatagtttgcgcaacgttgttgcattgtctacaggcatcggtgtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacg
atcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgc
agtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaacc
aagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttt
aaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgt
gcaccaactgatcttcagcatctttactttaccagcggtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaat
aagggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcatttatcaggggtattgtctcatgagcggatcata
tttgatgtatttagaaaaataaacaataggggttcgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatca
actgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagtgtgtgtt
gtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcaactggataactcaagctaaccaaaatcatccaaacttcccacccatacccta
ttaccactgccaattacctgtgtgttcttactctaaacctgtgattcctctgaattatttcaattttaaagaattgtattgttaaatatgtacta
caaacttagtagt (SEQ ID NO: 30)

```

10

20

【0140】

30

別の局面において、本技術は、ベクターを含む組換え細胞であって、該ベクターが、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、および TCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、および TCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含み；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記組換え細胞を提供する。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離され、任意で、組換え細胞は、細菌細胞、哺乳動物細胞、または酵母細胞である。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含む区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。

40

【0141】

1つの局面において、本技術は、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、および TCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、および TCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含む、組換えTCRベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポ

50

リヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記組換えTCRベクターライブラリーを提供する。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。

【0142】

いくつかの態様において、TCRベクターライブラリーは、TCRレパートリーを含む。したがって、いくつかの態様において、TCRベクターライブラリーは、V(D)J再編成および/またはT細胞選択の結果として、単一のドナーまたは対象において産生される様々なTCRの完全なまたは部分的な収集物である。他の態様において、本開示のTCRベクターライブラリーは、その結合特異性または他の所望の特性について具体的に選択されたTCRの定義された収集物を含む。例えば、TCRベクターライブラリーは、特定の標的細胞、抗原、抗原:MHC複合体、またはその組み合わせに特異的に結合するTCRのサブセットを含むことができる。これらの態様において、TCRは、単一のドナーもしくは対象、または1つよりも多いドナーもしくは対象に由来することができる。

【0143】

ある特定の態様において、TCRベクターライブラリーにおける各TCRは、遺伝学的に別個であり、別個の結合特異性を含む。いくつかの態様において、TCRベクターは、約2～約5種類の異なるTCR、約2～約10種類の異なるTCR、約5～約10種類の異なるTCR、約5～約15種類の異なるTCR、約5～約20種類の異なるTCR、約10～約30種類の異なるTCR、約10～約40種類の異なるTCR、約10～約50種類の異なるTCR、約20～約60種類の異なるTCR、約25～約75種類の異なるTCR、約50～約100種類の異なるTCR、または100種類よりも多い異なるTCRを含む。

【0144】

正確な分子組成は、生物治療薬（biotherapeutics）の安定性、効力、および/または安全性にとって利点であることができる。したがって、ある特定の態様において、TCRベクターライブラリーにおける各々のベクターおよび/またはTCRは、TCRの核酸および/もしくはアミノ酸の配列、ならびに/またはその結合特異性を決定するために特徴決定される。いくつかの態様において、分子特徴決定は、ベクターまたはベクターの一部（例えば、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチド）の核酸シーケンシングによって行われる。ある特定の態様において、分子特徴決定は、質量分析を用いたTCRタンパク質の解析によって行われる。いくつかの態様において、TCRベクターライブラリーの分子特徴決定は、TCRベクターライブラリーで形質転換された組換え細胞（例えば、細菌細胞）を各々が含む、2個以上、または3個以上、または4個以上、または5個以上、または6個以上、または7個以上、または8個以上、または9個以上、または10個以上、または15個以上、または20個以上、または30個以上、または40個以上、または50個以上の単離されたコロニーの核酸シーケンシングによって行われる。いくつかの態様において、TCRベクターライブラリーは、形質転換された組換え細胞の単一コロニー核酸増幅およびシーケンシング、その後の定義された分子ライブラリー組成を生成するための定義された比での様々なベクターコロニーの混合によって、精錬されるかまたは選択される。いくつかの態様において、ライブラリーに含めるための個々のベクターの選択は、出発ライブラリーの特徴決定および/または結合特異性の局面によって通知される。そのような局面の非限定的な例には、TCRクローン優勢度、インビトロアッセイ由来のTCR濃縮特性、TCR Vセグメント配列、TCR Dセグメント配列、TCR Jセグメント配列、TCR遺伝子モチーフ、および/またはCDR3遺伝子モチーフが含まれる。

【0145】

いくつかの態様において、TCRベクターライブラリーにおけるベクターの比は、ライブラリーの治療活性を最適化するために、調整されるかまたは選択される。例えば、2つのTCRを含むTCRベクターライブラリーは、約1:1、約1:2、約1:5、約1:10などのベクター比の

、各ベクターを有し得る。別の非限定的な例において、3つのTCRを含むライブラリーは、約1:1:1、約2:1:1、約2:2:1などのベクター比の、各ベクターを有し得る。

【0146】

別の局面において、本技術は、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを含む、単離された免疫細胞であって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記単離された免疫細胞を提供する。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、免疫細胞は、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはナチュラルキラー（NK）細胞である。

【0147】

1つの局面において、本技術は、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含む、組換えTCRベクターライブラリーを含む細胞集団であって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記細胞集団を提供する。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、集団は、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはNK細胞を含む。いくつかの態様において、細胞集団は、対象の完全なまたは部分的なTCRレパートリーを含む。

【0148】

本技術の追加的な局面は、担体と、本技術の1つまたは複数のベクターとを含む組成物に関する。あるいは、組成物は、担体と、本技術の1つまたは複数の組換えTCRベクターライブラリーとを含む。別の態様において、組成物は、担体と、本技術の1つまたは複数のベクターを含む1つまたは複数の免疫細胞とを含む。さらに別の態様において、組成物は、担体と、本技術の組換えTCRベクターライブラリーを含む細胞集団とを含む。周知の担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロースおよび改質セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、ならびに磁鉄鉱が含まれる。担体の性質は、本開示の目的で、可溶性または不溶性のいずれかであることができる。当業者は、ベクター、細胞、細胞集団、もしくはベクターライブラリーに結合するための他の適している担体のことを知っているか、または、日常的な実験法を用いて、そのようなものを確かめることができるであろう。

【0149】

いくつかの態様において、担体は、薬学的に許容される担体である。特許請求される組成物のいずれか1つを含むがそれに限定されない本開示の薬学的組成物は、1つまたは複数の薬学的にまたは生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤との組み合わせで、本明細書に記載されるようなベクター、ライブラリー、細胞、または細胞集団を含んでも

よい。そのような組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などのような緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース、またはデキストランなどの糖質；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存剤を含んでもよい。本開示の組成物は、経口、静脈内、局所、経腸、および/または非経口投与のために製剤化することができる。ある特定の態様において、本開示の組成物は、静脈内投与のために製剤化される。

【0150】

II. 本技術の組成物を調製する方法

(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含む、ベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む、組換えTCRライブラリーを調製するための方法が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、集団は、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはNK細胞を含む。

【0151】

方法のいくつかの態様において、ライブラリーは、標的細胞に対する特異的結合についてスクリーニングされる。ある特定の態様において、標的細胞は、がん細胞、ウイルスに感染した細胞、ウイルスに感染した対象に由来する細胞、腫瘍細胞、またはウイルス感染症もしくはがんを有する疑いがある対象から単離された組織生検細胞である。

【0152】

方法のいくつかの態様において、ライブラリーは、抗原:MHC複合体に対する特異的結合についてスクリーニングされる。いくつかの態様において、抗原:MHC複体の抗原は、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である。他の態様において、抗原:MHC複体の抗原は、CD45、グリピカン-3、IGF2B3、カリクレイン4、KIF20A、レングシン、メロエ、ムチン5AC（MUC5AC）、サバイピン、サイクリン-A1、MAGE-A1、MAGE-C1、MAGE-C2、SSX2、XAGE1b/GAGED2A、CD19、CD20、CD22、CD52、EGFR、HER2、TRAILR1、RANKL、IGF1R、EpCAM、およびCEAからなる群より選択される腫瘍抗原である。

【0153】

方法のいくつかの態様において、ライブラリーは、T細胞表現型マーカーについてスクリーニングされる。ある特定の態様において、T細胞表現型マーカーは、1つまたは複数の

TCR複合体構成要素、例えば、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR δ 、CD3 δ / ϵ 、CD3 γ / ϵ 、およびCD247 ζ / η または ζ / η の発現を特定する。いくつかの態様において、T細胞表現型マーカーは、ナイーブCD8⁺ T細胞、ナイーブCD4⁺ T細胞、CD4⁺ T細胞、CD8⁺細胞傷害性T細胞、 γ / δ T細胞、NKT細胞、Th1細胞、Th2細胞、Th9細胞、Th22細胞、濾胞性ヘルパーT細胞、Th17細胞、および制御性T細胞などの特定のT細胞サブセットの同定の手助けをする。これらのT細胞サブセットを同定するのに適している細胞表面マーカーに特異的な抗体は、当技術分野において公知であり、例えば、R&D Systemsから入手可能である。スクリーニングは、ELISA、ウェスタンブロット、ノーザンブロット、PCR、qPCR、およびフローサイトメトリーを含むがそれらに限定されない、当技術分野において公知の任意の方法によって行うことができる。

10

【0154】

方法のある特定の態様において、ライブラリーは、共培養系における活性についてスクリーニングされ、該共培養系は、(a) がん細胞株；(b) 公知のウイルスに感染した複数の細胞；(c) がん患者から単離された複数の腫瘍細胞；(d) 不死化細胞株；または(e) 患者組織生検に由来する複数の細胞、のうちの少なくとも1つを含む。いくつかの態様において、活性は、組換えTCR/CD3複合体と共刺激受容体、例えば、CD28との共会合 (co-engagement) をアッセイすることによって測定される。細胞表面上のこれらの受容体の共会合は、細胞内シグナル伝達事象、ならびに活性化T細胞核内因子 (NFAT)、NF- κ B、およびAP-1などの核内転写因子の活性化をもたらす。具体的には、TCR/CD3複合体の会合は、PLC- γ のリン酸化および活性化、細胞内カルシウム流入、ならびにNFAT経路の転写活性化をもたらす。いくつかの態様において、TCR/CD3と共刺激受容体CD28との共会合は、ERK/JNKおよびI κ Bキナーゼ (IKK) の活性化をもたらす、これは次に、それぞれ、AP-1経路およびNF- κ B経路の転写活性化を制御する。IL-2プロモーターは、NFAT、NF- κ B、およびAP-1に対するDNA結合部位を含有する。そのため、TCR/CD3とCD28との共会合は、T細胞活性化についての機能的読み取りとして一般的に用いられる、IL-2産生を結果としてもたらす。いくつかの態様において、T細胞活性化を測定するために用いられる他のエンドポイントには、細胞増殖、細胞傷害活性 (標的細胞の死)、およびIFN γ などの追加的なサイトカインの産生が含まれるが、それらに限定されない。T細胞活性を測定するかまたは検出するキットに適しているキットは、例えば、Promega Corp. から入手可能である (T Cell Activation Bioassay (IL-2) (a,b) (カタログ番号J1651およびJ1655))。

20

30

【0155】

方法のいくつかの態様において、形質転換された細胞は、インビトロで活性化される。特定の態様において、活性化は、抗CD3抗体、抗CD8抗体、抗CD27抗体、IL-2、IL-4、IL-21、抗PD1抗体、抗CTLA4抗体、抗CD3/CD28四量体抗体、腫瘍細胞溶解物、ウイルス感染細胞との細胞共培養、および腫瘍細胞株のうちの1つまたは複数の刺激物質を用いて行われる。T細胞活性化キットは、例えば、Miltenyi Biotecから入手可能である (T cell Activation/Expansion Kit, human, カタログ番号130-091-441)。

【0156】

方法のある特定の態様において、細胞の集団は、転写因子で形質転換される。いくつかの態様において、転写因子は、フォークヘッドボックスP3 (FOXP3, Entrez gene: 50943, RefSeq mRNA: NM_001114377; NM_014009)、PRドメインZnフィンガータンパク質1 (BLIMP-1, Entrez gene: 639, RefSeq mRNA: NM_001198; NM_182907)、Helios (IKZF2, Entrez gene: 22807, RefSeq mRNA: NM_001079526.1; NM_016260.2, Uniprot: Q9UKS7)、Ikaros (IKZF1, Entrez: gene: 10320, RefSeq mRNA: NM_001220765.2; NM_006060.6など; Uniprot: Q13422)、および形質転換増殖因子 β 1 (TGF- β 1, Entrez gene: 7040, RefSeq mRNA: NM_000660) からなる群より選択される。FOXP3は、免疫系応答に参与するタンパク質であり、制御性T細胞の発生および機能のマスター制御因子として機能すると考えられている。制御性T細胞は、概して、免疫応答を抑制する。BLIMP-1は、 β -インターフェロン (β -IFN) 遺伝子発現の抑制因子として作用する。制御性T細胞は、他のT細胞の作用を阻害するために、TGF- β 1を放出する。活性化T細胞のインターロイキン1およびインタ

40

50

ーロイキン2依存性の増殖、ならびに静止状態のヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞の活性化は、TGF- β 1の活性によって阻止される。同様に、TGF- β 1は、インターフェロン- γ 、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、および様々なインターロイキンを含む多くの他のサイトカインの分泌および活性を阻害することができる。これはまた、免疫細胞の活性を下方制御するために、IL-2受容体などのサイトカイン受容体の発現レベルを低下させることもできる。転写因子アミノ酸配列の非限定的な例を、本明細書において提供する。

【0157】

FOXP3 (UniProt Q9BZS1) :

MPNPRPGKPSAPSLALGPSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHA
SSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHA
RTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFP
NPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADHLLDEKG
RAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIV
AAGSQGPVVPAPWSGPAPDSLFAVRRHLWGSNGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPP
FTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFV
RVESEKGAVWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGP (SEQ ID NO: 31)

10

【0158】

BLIMP-1 (UniProt 075626) :

MLDICLEKRVGTTLAAPKCNSSTVRFQGLAEGTKGTMKMDMEDADMTLWTEAEFE
EKCTYIVNDHPWDSGADGGTSVQAEASLPRNLLFKYATNSEEVIGVMSKEYIPKGTR
FGPLIGEITYTNDTPKNNANRKYFWRIYSRGELHHFIDGFNEEKSNWMRYVNPAPHSR
EQNLAACQNGMNIYFYTIKPIPANQELLVWYCRDFAERLHYPYPGELTMMNLTQTQ
SSLKQPSTEKNELCPKNVPKREYSVKEILKLDSNPSKGKDLYRSNISPLTSEKDLDDFR
RRGSPMPFYPYPRVVYPIRAPLPEDFLKASLAYGIERPTYITRSPISSTTPSPSARSSPDQ
SLKSSSPHSSPGNTVSPVGPQSQEHRDSYAYLNASYGTEGLGSYPGYAPLPHLPPAFIP
SYNAHYPKFLLPPYGMNCNGLSAVSSMNGINNFGFLPRLCPVYSNLLGGGSLPHMPL
NPTSLPSSLPSDGARRLLQPEHPREVLVPAPHSAFSFTGAAASMKDKACSPTS GSPTA
GTAATAEHVVQPKATSAAMAAPSSDEAMNLIKNNKRNMTGYKTLPYPLKKQNGKIK
YECNVCAKTFGQLSNLKVHLRVHSGERPFCQCTCNKGFTQLAHLQKHLYVHTGEKP
HECQVCHKRFSSTSNLKTHLRLHSGEKPYQCKVCPAKFTQFVHLKLHKRLHTRERPH
KCSQCHKNYIHLCSLKVHLKGNC AAPAPGLPLEDLTRINEEIEKFDISDNADRLEDV
EDDISVISVVEKEILAVVRKEKEETGLKVSLQRNMGNGLLSSGCSLYESSDLPLMKLP
PSNPLPLVPVKVKQETVEPMDP (SEQ ID NO: 32)

20

30

40

【0159】

TGF- β 1 (UniProt P01137) :

MPPSGLRLLLLLLLPLLWLLVLTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKKRKRIEAIKRGQILSKLRL
 ASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVET
 HNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLKVEQHVELYQKY
 SNNSWRYLSNRLLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNT
 LQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSSRHRRALDTNYCFSS
 TEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYN
 QHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS (SEQ ID NO: 33)

10

【0160】

いくつかの態様において、方法は、本明細書に記載される方法に従って調製された組換えTCRライブラリーの有効量を、その必要がある対象に投与する工程をさらに含む。いくつかの態様において、その必要がある対象は、がんまたはウイルス感染症に罹患している。

【0161】

別の局面において、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された組換えTCRライブラリーが、本明細書において提供される。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、集団は、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはNK細胞を含む。

20

30

【0162】

1つの局面において、本技術は、担体と、本明細書に記載されるような方法によって調製された組換えTCRライブラリーとを含む組成物を提供する。いくつかの態様において、担体は、薬学的に許容される担体である。

【0163】

III. 使用の方法

本明細書に記載される処置の方法は、臨床治療に関連性がある時間尺度（例えば、数か月よりもむしろ数週間）で、迅速に発見し、増幅し、かつ対象に戻すことができる、特異的TCRの単離および使用のための型式を提供する。

40

【0164】

したがって、1つの局面において、組換えTCRライブラリーまたは組換えTCRライブラリーを含む組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、その必要がある対象を処置する方法が、本明細書において提供され、ここで、該組換えTCRライブラリーは、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞

50

のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。

【0165】

別の局面において、組換えTCRライブラリーまたは組換えTCRライブラリーを含む組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、その必要がある対象においてがんを処置する方法が、本明細書において提供され、ここで、該組換えTCRライブラリーは、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。

【0166】

いくつかの態様において、がんは、急性リンパ芽球性白血病（ALL）；急性骨髄性白血病（AML）；副腎皮質癌；AIDS関連がん；肛門がん；虫垂がん；星状細胞腫；非定型奇形腫瘍/ラプドイド腫瘍、脳腫瘍；皮膚の基底細胞癌；胆管がん；膀胱がん；骨がん；乳がん；気管支腫瘍；バーキットリンパ腫；カルチノイド腫瘍（胃腸）；胚細胞腫瘍；原発性CNSリンパ腫；子宮頸がん；胆管細胞癌；脊索腫；慢性リンパ球性白血病（CLL）；慢性骨髄性白血病（CML）；慢性骨髄増殖性新生物；大腸がん；頭蓋咽頭腫；皮膚T細胞リンパ腫；非浸潤性乳管癌（DCIS）；子宮内膜がん；上衣腫；食道がん；感覚神経芽腫；頭蓋外胚細胞腫瘍；性腺外胚細胞腫瘍；眼がん；眼球内黒色腫；網膜芽腫；卵管がん；悪性の骨の線維性組織球腫、および骨肉腫；胆嚢がん；胃（gastric）がん；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質腫瘍（GIST）；胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛性疾患；毛様細胞白血病；頭頸部がん；心臓腫瘍；肝細胞がん；ランゲルハンス細胞組織球症；ホジキンリンパ腫；下咽頭がん；眼球内黒色腫；膵島細胞腫瘍、膵神経内分泌腫瘍；腎臓がん；喉頭がん；白血病；口唇および口腔（oral cavity）がん；肝臓がん；肺がん；リンパ腫；男性乳がん；骨の悪性線維性組織球腫および骨肉腫；黒色腫；メルケル細胞癌；中皮腫；転移性がん；口腔（mouth）がん；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性骨髄腫/形質細胞新生物；菌状息肉腫；慢性の骨髄異形成症候群、骨髄増殖性新生物；鼻咽頭がん；神経芽腫；非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺がん；口腔（oral）がん、口咽頭がん；骨肉腫；卵巣がん；膵臓がん；膵神経内分泌腫瘍；乳頭腫症；傍神経節腫；副鼻腔がん；副甲状腺がん；咽頭がん；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；胸膜肺芽腫；前立腺がん；直腸がん；再発がん；腎細胞がん；網膜芽腫；横紋筋肉腫；唾液腺がん；肉腫；ユーイング肉腫；カボジ肉腫；骨肉腫；子宮肉腫；セザリイ症候群；皮膚がん；小細胞肺がん；小腸がん；軟部組織肉腫；皮膚の扁平上皮癌；頸部扁平上皮がん；胃（stomach）がん；T細胞リンパ腫；精巣がん；咽喉がん；鼻咽頭がん；下咽頭がん；胸腺癌；甲状腺がん；尿道がん；子宮がん；膣がん；血管腫瘍；外陰部がん；またはウィルムス腫瘍である。

【0167】

1つの局面において、組換えTCRライブラリーまたは組換えTCRライブラリーを含む組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、その必要がある対象において腫瘍成長を阻害する方法が、本明細書において提供され、ここで、該組換えTCRライブラリーは、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画における単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された。いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞のmRNAは、区画においてmRNA捕捉試薬を用いて単離される。他の態様において、ペアのT細胞受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、mRNA捕捉試薬の使用を伴わずに、単一細胞に由来している。追加的にまたは代替的に、いくつかの態様において、単一の溶解されたT細胞の内容物を含有する区画は、マイクロウェル（例えば、96ウェルプレート内のマイクロウェル）または小滴である。いくつかの態様において、腫瘍は固形腫瘍である。

10

【0168】

別の局面において、組換えTCRライブラリーまたは組換えTCRライブラリーを含む組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、その必要がある対象においてウイルス感染症を処置する方法が、本明細書において提供され、ここで、該組換えTCRライブラリーは、(a) ベクターバックボーン；ならびに (b) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または (b) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチドを各々が含む複数のベクターを含むベクターライブラリーであって；第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画においてmRNA捕捉試薬によって捕捉された単一の溶解されたT細胞のmRNAに由来している、前記ベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む方法によって調製された。いくつかの態様において、ウイルス感染症は、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスによって引き起こされる。

20

30

40

【0169】

いくつかの態様において、方法は、ベクターを含む細胞または細胞集団を自殺スイッチ（例えば、i-カスパーゼ9）で死滅させるために、自殺スイッチを活性化すること、それによって、患者に対する害のリスクを低減させることをさらに含む。いくつかの態様において、自殺スイッチは、長期の副作用のリスクを低減させるために、対象のがんまたは感染症の有意な改善または明らかな治癒の後に誘発される。

【0170】

ある特定の態様において、方法は、上記の調製の方法に記載されるように、インビボで所望のTCR機能またはT細胞同一性を達成するために、投与の前にインビトロで細胞をあらかじめ刺激することをさらに含む。

50

【0171】

いくつかの態様において、方法は、上記の調製の方法に記載されるように、強力な抗がん表現型または抗ウイルス表現型へのT細胞の発生に影響を及ぼすために、または免疫抑制するTregの発生を阻止するために、組換え細胞において1つまたは複数の転写因子を共発現させることをさらに含む。

【0172】

細胞、ライブラリー、細胞集団、または組成物の投与は、処置のコースを通して一用量で、連続的に、または断続的に行うことができる。投与の最も有効な手段および投薬量を決定する方法は、当業者に知られており、治療に用いられる組成物、治療の目的、および処置されている対象と共に変動するであろう。単一の投与または複数の投与を、処置する医師によって選択されている用量レベルおよびパターンで実施することができる。適している投薬製剤および作用物質を投与する方法は、当技術分野において公知である。さらなる局面において、本開示の細胞および組成物は、他の処置との組み合わせで投与することができる。細胞および細胞の集団は、当技術分野において公知であり、例えば、PCT/US2011/064191に記載されている方法を用いて、宿主に投与される。本開示の細胞または組成物のこの投与は、実験およびスクリーニングアッセイ用に所望の疾患、障害、または状態の動物モデルを生成するために、行うことができる。

【0173】

本開示の組成物は、疾患を処置するかまたは予防するのに適切な様式で、投与されてもよい。適切な投薬量は、臨床試験によって決定され得るが、投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患のタイプおよび重篤度などの要因によって決定されるであろう。

【0174】

いくつかの態様において、組換えTCRライブラリーの有効用量には、約 $50 \sim 10^2$ 細胞、約 10^2 細胞 $\sim 10^3$ 細胞、約 10^2 細胞 $\sim 10^4$ 細胞、約 10^3 細胞 $\sim 10^5$ 細胞、約 10^4 細胞 $\sim 10^6$ 細胞、約 10^5 細胞 $\sim 10^7$ 細胞、約 10^6 細胞 $\sim 10^8$ 細胞、約 10^7 細胞 $\sim 10^9$ 細胞、または約 10^8 細胞 $\sim 10^{10}$ 細胞が含まれる。特定の態様において、有効用量には、約 5×10^5 細胞 $\sim 1.5 \times 10^6$ 細胞、または約 1×10^4 細胞 $\sim 5 \times 10^4$ 細胞、約 5×10^4 細胞 $\sim 5 \times 10^5$ 細胞、または約 2.5×10^5 細胞 $\sim 7.5 \times 10^5$ 細胞が含まれる。

【0175】

ある特定の態様において、投与は、治療施与に対する対象の特異的応答に応じて必要とされるように、反復され、かつ/または改変される。反復投与は、例えば、その必要がある対象におけるがん細胞またはウイルスの再出現（例えば、腫瘍免疫「逃避」）時に、必要とされ得る。いくつかの態様において、反復される投与は、最初の投与とは別個である方法によって調製された細胞、ライブラリー、細胞集団、または組成物を含む（例えば、反復用量は、T細胞をプレスクリーニングするかまたは事前活性化する追加的な段階を含む）。特定の態様において、本明細書において提供される処置の方法は、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10の用量の組換えTCRライブラリーまたは組成物を投与することをさらに含む。

【0176】

いくつかの態様において、組換えTCRライブラリーは、処置される対象にとって自己由来または同種異系である細胞を含む。

【0177】

免疫アッセイおよびイメージング。いくつかの局面において、本明細書において開示される組換えTCRライブラリーは、対象から単離された生物学的試料（例えば、ヒト血漿）における標的細胞の存在についてアッセイするために、用いることができる。標的細胞（例えば、がん細胞）は、組換えTCRライブラリーを生物学的試料に曝露すること、ならびにTCRの活性化および/または結合についてアッセイすることによって、検出することができる。

【0178】

標的細胞の存在についてアッセイすることに加えて、本明細書において開示される組換えTCRライブラリーは、インビボイメージングのために用いることができる。組換えTCRライブラリーと共に組み入れることができる検出可能な標識には、X線撮影、NMR、またはESRによって検出可能なものが含まれる。X線撮影について、適している標識には、検出可能な放射線を放出するが、対象に明白には有害ではない、バリウムまたはセシウムなどの放射性同位体が含まれる。NMRおよびESRに適しているマーカーには、TCRライブラリー中に組み入れることができる、重水素などの検出可能な特徴的スピンを有するものが含まれる。放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴によって検出可能な物質などの、適切な検出可能なイメージング部分で標識されているTCRライブラリーが、対象中に（例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に）導入される。対象のサイズおよび用いられるイメージングシステムにより、診断画像を生じるのに必要されるイメージング部分の量が決定されることが、当技術分野において理解されるであろう。放射性同位体部分の場合、ヒト対象について、注射される放射活性の量は、通常、約5~20ミリキュリーの $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の範囲にわたる。組換えTCRライブラリーは、その時、標的細胞の場所に優先的に蓄積するであろう。例えば、インビボ腫瘍イメージングは、S. W. Burchiel et al., Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer 13 (1982)に記載されている。

10

【0179】

診断用途。本明細書において開示される組換えTCRライブラリーは、診断法のために用いることができる。そのように、本開示は、対象におけるがんまたはウイルス感染症の診断において、本明細書において開示される組換えTCRライブラリーを用いるための方法を提供する。診断法は、対象から単離された生物学的試料を、本開示の組換えTCRライブラリーと接触させることを含む。生物学的試料は、対象の任意の組織（生検材料を含む）、細胞、または体液から取得することができる。組換えTCRライブラリーの活性または結合が、アッセイされる。組換えTCRライブラリーが、生物学的試料に対する曝露時に活性化される場合には、対象の生物学的試料は、TCRライブラリーによって認識される細胞を含有する。したがって、対象は、がんまたはウイルス感染症と診断される。

20

【0180】

予後判定用途。本明細書において開示される組換えTCRライブラリーは、予後判定法のために用いることができる。そのように、本開示は、がんまたはウイルス感染症を有する対象の予後の予測において、本明細書において開示される組換えTCRライブラリーを用いるための方法を提供する。予後判定法は、対象から単離された生物学的試料を、本開示の組換えTCRライブラリーと接触させることを含む。生物学的試料は、対象の任意の組織（生検材料を含む）、細胞、または体液から取得することができる。組換えTCRライブラリーの活性または結合が、アッセイされる。組換えTCRライブラリーが、生物学的試料に対する曝露時に活性化される場合には、対象の生物学的試料は、TCRライブラリーによって認識される細胞を含有する。したがって、対象は、がんおよび/もしくは固形腫瘍、またはウイルス感染症を有するか、または発症するリスクがあると特定される。

30

【0181】

いくつかの態様において、対象は、ヒト、動物、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ヒツジ、マウス、ウマ、またはウシである。特定の態様において、対象はヒトである。

40

【0182】

IV. キット

本明細書において示されるように、本開示は、TCRライブラリー調製の方法、処置の方法、診断法、および予後判定法を提供する。1つの特定の局面において、本開示は、これらの方法を行うためのキット、ならびに、ドナー細胞の収集および/もしくはスクリーニングの実施、ならびに/または結果の解析などの本開示の方法を実施するための説明書を提供する。

【0183】

いくつかの態様において、キットは、本明細書において開示される組換えTCRライブラ

50

リー、および使用のための説明書を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。いくつかの態様において、キットは、本明細書において開示される1つまたは複数のベクター、および使用のための説明書を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。いくつかの態様において、キットは、本明細書において開示されるような薬学的組成物、および使用のための説明書を含むか、または代替的にそれから本質的になるか、またはまたさらにそれからなる。

【0184】

いくつかの局面において、キットは、本明細書において開示されるような1つまたは複数のベクター、細胞、集団、または組換えTCRライブラリー；生物学的試料において反応性抗原もしくは細胞の量を決定するための手段、またはTCRライブラリーの活性をアッセイする手段；および標準との比較のための手段を含むことができる。

10

【0185】

キット構成要素（例えば、試薬）は、適している容器に包装することができる。例えば、これらの示唆されるキット構成要素は、溶液において、または液体分散物としてなどで提供されてもよい。キットはまた、例えば、緩衝剤、保存剤、またはタンパク質安定剤を含むこともできる。キットは、検出可能な標識を検出するために必要な構成要素、例えば、酵素または基質をさらに含むことができる。キットはまた、アッセイして試験試料と比較することができる、対照試料または一連の対照試料を含有することもできる。キットの各構成要素は、個々の容器内に封入することができ、様々な容器のすべては、キットを用いて行われたアッセイの結果を解釈するための説明書と共に、単一包装内にあることができる。本開示のキットは、キット容器上またはキット容器中に、書面の製品を含有してもよい。書面の製品は、キットに含有される試薬の用い方を記載する。

20

【実施例】

【0186】

本技術は、決して限定的であると解釈されるべきではない、以下の実施例によってさらに例証される。

【0187】

実施例1：ペアの天然TCR α ： β アンプリコンの生成および発現ベクター中へのクローニング

最初に、天然でペアのT細胞受容体遺伝子の供給源として、ペアのTCR α ： β アンプリコンの収集のために、ヒトT細胞の集団を単離した。末梢血単核細胞（PBMC）を、Histopaque（登録商標）-1077を用いて400×gで30分間の遠心分離により、健常ヒト患者由来の抗凝固処理された全血から単離した。上の血漿層を除去した後、血漿とHistopaque（登録商標）-1077との間の単核細胞を収集し、リン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。血小板の除去のために、細胞を穏やかに混合し、250×gで10分間遠心分離した。上清を除去して、細胞ペレットを、PBMC培養培地（10%胎児ウシ血清を含むRPMI）、または凍結保存のための細胞凍結培地（10%胎児ウシ血清および10%DMSOを含むRPMI）で再懸濁した。

30

【0188】

次いで、完全長のT細胞受容体 α 鎖および β 鎖を増幅するためのエマルジョンPCRの前に、PBMCを、10%胎児ウシ血清を補給したRPMI培地で4時間培養し、T細胞の刺激のために、ホルボール12-ミリスタート13-アセタート（PMA）およびイオノマイシンを、100 ng/mLの最終濃度になるようにPBMC培養培地に添加した。特注のフローフォーカシングノズルを用いて、単一のPBMC細胞を、細胞溶解緩衝液およびmRNAを捕捉するポリ(dT)ビーズを含むエマルジョン滴中に単離した（参照文献番号1~4）。ノズルの設計により、細胞が単一の小滴中に単離された後まで溶解緩衝液に曝露されないことが保証された。小滴内で、細胞を、mRNAを放出するための溶解試薬、ならびにmRNAの捕捉および精製のためのポリ(dT)磁気ビーズと共に同時カプセル化した。ジエチルエーテルを用いてエマルジョンを壊したのに対して、ポリ(dT)ビーズを回収し、最初に高塩濃度ハイブリダイゼーション緩衝液、次いでPCR緩衝液を用いて洗浄した。次いで、ビーズを、下流のクローニング用の制限酵素配列およびT細胞受容体リーダー配列の組込みを伴うTCR α 鎖および β 鎖の配列に特異的な、

40

50

Boria et al. (参照文献番号5) 由来の適合させたプライマーを含むオーバーラップ伸長逆転写PCRのOE-RT-PCRミックスにおいて、再エマルジョン化した。TCR OE-RT-PCRの最中にTCR α 鎖および β 鎖の物理的結合を可能にするために、リンカー配列もまた含めた。SuperScript (商標) III One-Step RT-PCR System with Platinum (商標) Taq DNA Polymeraseを、エマルジョンPCR試薬のために用いた。OE-PCR熱サイクル条件を表3に提供し、プライマー配列を表4に提供する。

【0189】

(表3) OE-PCR熱サイクル条件

サイクル	温度	時間
1	55 °C	30 min
1	94 °C	2 min
5	94 °C	30 s
	50 °C	30 s
	72 °C	2 min
5	94 °C	30 s
	55 °C	30 s
	72 °C	2 min
30	94 °C	30 s
	60 °C	30 s
	72 °C	2 min
1	72 °C	7 min

10

20

【0190】

(表4) OE-PCRに用いたプライマー

30

プライマー名	配列	SEQ ID NO:
TRBV2for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GATGCTGAAGTCRCMCAGACTCC	34
TRBV3for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GATGCWGMTGTTWCCCAGAC	35
TRBV4for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GACACTGRAGTYACSCAGACACC	36
TRBV5for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GAGGCTGGAGTCACHCAAAS	37
TRBV6for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GAGCCTGGWGTCASYCAGAC	38
TRBV7for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GGTGCTGGAGTYKCCCAGW	39
TRBV10for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GATGCTGRRATCACCCAGR	40
TRBV11for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GAAGCTGAAGTTGCCCAGTC	41
TRBV13for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GATGCTGGAGTYATCCAGTC	42
TRBV14for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GAAGCTGGAGTKRYTCAGT	43
TRBV15for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GATGCCATGGTCATCCAGAA	44
TRBV18for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC AATGCCGGCGTCATGCAGAA	45
TRBV19for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GATGGTGGGAATCACTCAGTC	46
TRBV20for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC AGTGCTGTCRTCTCTCAAMA	47
TRBV25for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GAAGCTGACATCTACCAGAC	48
TRBV27for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC GATGTGAAAGTRACCCAGARCYC	49
TRBV30for	CGCAGTAGCGGTAAACGGC ACACTCCAGGCACAGAGATA	50

10

20

30

TRBC	tgctaaaacgctagctgctgggtcGTCGACca AGGCAGTATCTGGAGTCATTGAG	51
APEX	CGCAGTAGCGGTAAACGGC	52
TRAV1for	ccagcagctagcggttttagcaGGACAAARCMTTGASCAGCC	53
TRAV2for	ccagcagctagcggttttagcaAAGGACCAAGTGTTCAGCC	54
TRAV3for	ccagcagctagcggttttagcaGCTCAGTCAGTGRCYCAGCC	55
TRAV4for	ccagcagctagcggttttagcaGATGCTAAGACCACMCAGCC	56
TRAV5for	ccagcagctagcggttttagcaAGAAAASAWSTGGAGCAGAGTC	57
TRAV6for	ccagcagctagcggttttagcaAGCCAAAAGATAGAACAGAA	58
TRAV7for	ccagcagctagcggttttagcaGAAAACCAGGTGGAGCACAG	59
TRAV8for	ccagcagctagcggttttagcaGCCAGTCKGTGASCCAGCW	60
TRAV9for	ccagcagctagcggttttagcaGGAAATTCAGTGRYCCAGAY	61
TRAV12for	ccagcagctagcggttttagcaCAGAAGGAGGTGGAGCAGRATYC	62
TRAV13for	ccagcagctagcggttttagcaGGAGAGARTGTGGRGCWGCA	63
TRAV14for	ccagcagctagcggttttagcaGCCAGAAGRTWACTCAARC	64
TRAV16for	ccagcagctagcggttttagcaGCCAGASAGTSACTCAGYC	65
TRAV17for	ccagcagctagcggttttagcaAGTCAACAGGGAGAAGAGGA	66
TRAV18for	ccagcagctagcggttttagcaGGAGACTCGGTTACCCAGAC	67
TRAV20for	ccagcagctagcggttttagcaAAACAGGAGGTGACGCAGAKTCC	68
TRAV23for	ccagcagctagcggttttagcaGCCCAACAGAAGGAGAAAAG	69
TRAV24for	ccagcagctagcggttttagcaGAGCTGAAMGTGGAACAAAR	70
TRAV25for	ccagcagctagcggttttagcaGGACAACAGGTAATGCAAAT	71
TRAV27for	ccagcagctagcggttttagcaACCCAGCTGCTGGAGCAGAG	72
TRAV29for	ccagcagctagcggttttagcaAGTCAACAGAAGAATGATGA	73
TRAV30for	ccagcagctagcggttttagcaCAACAACCAGTGCAGAGTCC	74
TRAV35for	ccagcagctagcggttttagcaGGTCAACAGCTGAATCAGAG	75
TRAV36for	ccagcagctagcggttttagcaGAAGACAAGGTGGTACAAAG	76
TRAV40for	ccagcagctagcggttttagcaAGCAATTCAGTCAAGCAGAC	77
TRAC	CGACCAGCTTGACATCACAG	78

10

20

30

40

【 0 1 9 1 】

OE-RT-PCR反応後に、PCR試料を、DNAクリーンアップキットによって精製し、DNAゲル電気泳動に供した。図1に示されるように、連結されたTCR α および β アンプリコンが、1000 b.p.あたりに同定され、OE-RT-PCR反応の成功を示した。

【 0 1 9 2 】

DNAゲル電気泳動後に、ゲル抽出を行って、TCR α ： β アンプリコンを取得した。5 ngの精製されたPCR産物を、半ネステッドPCRを行うための鋳型として用いた。ネステッドPCR

50

熱サイクル条件を、表5に提供する。

【0193】

(表5) ネステッドPCR熱サイクル条件

サイクル	温度	時間
1	95 °C	2 min
30	98 °C	20 s
	63 °C	30 s
	72 °C	2 min
1	72 °C	7 min

10

【0194】

PCR産物を精製するために、Zymo DNA Clean & Concentrator kit (Zymo Research) を用いてDNAクリーンアップを行った。精製されたPCR産物を、DNA電気泳動によって解析した。PCRの結果を図2に示し、約1000 b.p. のバンドは、TCR α : β アンプリコンの増幅の成功を示した。

【0195】

DNA電気泳動後に、TCR α : β アンプリコンを切り出し、Zymoclean (商標) Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) を用いてゲル精製を行った。TCR α : β アンプリコン配列を解析するために、精製されたアンプリコンを、zero-blunt cloning (Thermo Fisher Scientific) に供した。配列を、NCBI IGBLAST T細胞受容体遺伝子データベース (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/で利用可能) によって同定した。8種類のTCR α : β アンプリコンならびにそのそれぞれのTCR α 鎖および β 鎖の遺伝子のシーケンシング結果を、表6に列記する。

20

【0196】

(表6) 単一コロニーシーケンシングのためにプラスミドベクター中にクローニングされたTCR α : β アンプリコンの遺伝子シーケンシング結果

アンプリコン	TRAV 遺伝子	TRBV 遺伝子
1	26	28
2	35	4
3	2	2
4	21	19
5	12	11
6	13	19
7	12	25

30

【0197】

シーケンシングされたTCR α : β アンプリコンは、ヒトPBMC由来の多様なTCR α : β レパートリーに相当し、これは、本実施例に記載されるTCRプライマー設計が、TCRレパートリーを成功裡に増幅することができるという結論を支持した。制限エンドヌクレアーゼ標的切断部位を有する表4に示されるプライマーを、アンプリコン中に組み込み、OE-PCRおよびネステッドPCRの実施に成功した。T細胞受容体遺伝子(可変、多様性、連結、および定常領域を含む)においてめったに見出されない(例えば、5個よりも少ないセグメントにおいて見出される)標的切断部位を選択するように、制限酵素が選択され、これにより、制限酵素消化中の切断およびその後の発現プラスミドの環状化プロセスのために、TCRライブラリーの多様性を失うことなく、かつTCRライブラリーバイアスを低減させることなく

40

50

、元のTCRアミノ酸配列の発現が可能になる。天然のTCR遺伝子においてめったに見出されない追加的な制限酵素切断部位を付加するために、サイレント変異および非サイレント変異を伴ういくつかの制限部位を組み込んだ（表7および表8）。

【0198】

（表7）遺伝子のアミノ酸配列を変化させることなくT細胞受容体をレンチウイルス発現ベクター中にクローニングするために用いた、サイレント変異

制限酵素	アミノ酸配列	アミノ酸部位	TCR遺伝子名	元の配列	変異した配列
Age I	TG	16-17	TRBV 10-3	acagga	accggt
Age I	TG	16-17	TRBV 15-1	acaggt	accggt

Age I	TG	16-17	TRBV 24-1	acaggg	accggt	
Age I	TG	10-11	TRBV 24-2	acaggg	accggt	
Age I	TG	16-17	TRBV 24-3	acaggg	accggt	
Age I	TG	16-17	TRBV 5-8	acaggc	accggt	
Age I	GPV	17-19	TRBV5-1	ggcccagta	ggaccggtg	10
Age I	GPV	17-19	TRBV5-2	ggcccagtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV5-3	ggcccagtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV5-5	ggcccagtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV5-7	ggcccagtg	ggaccggtg	20
Age I	GPV	17-19	TRBV5-8	ggcccagtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV6-2	ggtccagtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV6-3	ggtccagtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV6-4	ggtccagtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV6-5	ggtccagtg	ggaccggtg	30
Age I	GPV	17-19	TRBV6-6	ggtccagtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV6-8	ggtcccgtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV6-9	ggtcccgtg	ggaccggtg	
Age I	GPV	17-19	TRBV9-1	ggcccagtg	ggaccggtg	40
Age I	GPV	17-19	TRBV9-2	ggcccagtg	ggaccggtg	

SpeI	GLV	17-19	TRBV 28-1	ggcctcgta	ggactagta
SpeI	GLV	17-19	TRBV 5-6	ggcttagtg	ggactagt
SpeI	TS	18-19	TRAV40	accagc	actagt
SpeI	TS	18-19	TRAV18	accagt	actagt
XhoI	LE	16-17	TRAV38-1	cttgaa	ctcgag
XhoI	LE	16-17	TRAV38-2	cttgaa	ctcgag
XhoI	VSR	18-20	TRAV13-2	gtgagcaga	gtctcgaga
NheI	QLA	15-17	TRAV17-1	caactggct	caGctAgct
NheI	QLA	13-15	TRAV27-1	cagttggca	cagCTAgca
BsiWI	RT	16-17	TRAV8-5	agaact	CGTACG
BsiWI	RT	17-18	TRAV18-5	aggacc	CGTACG
BsiWI	GVR	15-17	TRBV30-1	ggggtcaga	GGCGTACGA
BsiWI	GVR	15-17	TRBV30-2	ggggtcaga	GGCGTACGA
BsiWI	GVR	15-17	TRBV30-3	ggggtcaga	GGCGTACGA
MluI	TR	18-19	TRAV8-2	accaga	ACGCGT
MluI	TR	18-19	TRAV8-4	accaga	ACGCGT
MluI	TR	18-19	TRAV8-6	accaga	ACGCGT
MluI	TR	17-18	TRAV8-7	accaga	ACGCGT
MluI	TR	18-19	TRAV9-2	accgt	ACGCGT

10

20

30

40

MluI	TR	18-19	TRAV16-1	acaaga	ACGCGT
SphI	AC	72-73	TRAC	gcatgt	gcatgC
BstZI7I	VY	9-10	TRAC	gtgtac	GTATAC
BstBI	DSK	14-16	TRAC	GACTCTAA	GATTCGAA
SpeI	TLV	28-29	TRBC1	acactgggtg	acACTAGTg
SpeI	TLV	28-29	TRBC2	acactgggtg	acACTAGTg

10

【 0 1 9 9 】

(表 8) 天然のアミノ酸配列に対して最小の改変を伴ってT細胞受容体をレンチウイルス発現ベクター中にクローニングするために用いた、非サイレント変異

制限酵素	元のアミノ酸配列	変異したアミノ酸配列	アミノ酸部位	TCR遺伝子名	元のDNA配列	変異したDNA配列
NotI	VAV	AAA	11-13	TRBC1	gtcgctgtg	CGGCCGCGT
NotI	VAV	AAA	11-13	TRBC2	gtcgctgtg	CGGCCGCGT
SpeI	VAV	LVV	11-13	TRBC1	gtcgctgtg	GAACTAGTC
SpeI	VAV	LVV	11-13	TRBC2	gtcgctgtg	GAACTAGTC
sphI	VC	AC	30-31	TRBC1	gtgtgc	GcaTGC
sphI	VC	AC	30-31	TRBC2	gtgtgc	GcaTGC
XhoI	PE	LE	9-10	TRBC1	CCCGAG	CTCGAG
XhoI	PE	LE	9-10	TRBC2	CCCGAG	CTCGAG

20

30

40

XhoI	FE	LE	14-15	TRBC1	tttgag	CTCGAG
XhoI	FE	LE	14-15	TRBC2	tttgag	CTCGAG
XhoI	AE	LE	19-20	TRBC1	GCAGAG	CTCGAG
XhoI	AE	LE	19-20	TRBC2	GCAGAG	CTCGAG
NheI	TLV	TLA	30	TRBC1	acactggtg	acGCTAGCC
NheI	TLV	TLA	30	TRBC2	acactggtg	acGCTAGCC
NheI	AT	AS	28	TRBC1	GCCACa	GCTAGC
NheI	AT	AS	28	TRBC2	GCCACa	GCTAGC
NotI	AVA	AAA	62-64	TRAC	gctgtggcc	GCGGCCgcc
SphI	VC	AC	22-23	TRAC	gtctgc	GcaTGC
NheI	VS	AS	34-35	TRAC	gtgtca	gctagc

10

20

【0200】

TCR α : β アンプリコンを、レンチウイルス発現ベクターであるpLVX-EF1 α -IRES-mCherry (Clontech) 中にサブクローニングした。TCR発現用のレンチウイルス粒子を生成するために、TCRを含有するレンチウイルス発現ベクターと、レンチウイルスパッケージングベクターおよびエンベロープベクターとのHEK293T細胞中へのコトランスフェクションを行った。HEK293T細胞に、以下の比：10 μ g pLVX、8 μ g psPAX2パッケージングプラスミド、3 μ g pMD2.gエンベローププラスミド、100 μ l Eugeneトランスフェクション試薬でトランスフェクトした。TCRの発現のために、TCRをコードする組換えレンチウイルスを、インビトロディスプレイJ.RT3 T細胞株中に形質導入した。J.RT3の内在性のTCR α 遺伝子および β 遺伝子は、ノックアウトされており、これにより、外来のTCR α 鎖および β 鎖のトランスジェニック発現が可能になる。細胞の大多数が、単一TCRのペアの α : β アンプリコンのみを発現するように、形質導入プロトコルを最適化して、0.2以下のMOIを達成した。最終的に、形質導入された細胞を、フローサイトメトリー解析のために抗 α 鎖抗体、抗 β 鎖抗体、抗CD8抗体、および抗CD3抗体で染色して、機能的なペプチド-MHC結合解析の準備ができた、完全にアSEMBLされたTCR複合体を提示するmCherry発現細胞の画分を決定した。

30

40

【0201】

図15は、単一細胞エマルジョン化オーバーラップ伸長RT-PCR由来のT細胞受容体 (TCR) アンプリコン (α : β 鎖) のDNA電気泳動解析を示す。簡潔に述べると、CD8単離キットを用いてPBMCから精製されたT細胞を、細胞溶解およびRNA捕捉のために、溶解緩衝液およびmRNAを捕捉するためのポリ(dT)ビーズを含む油エマルジョン滴中に単離した。T細胞RNAを伴うポリ(dT)ビーズを、cDNA合成およびオーバーラップ伸長PCR (OE-PCR) のために再エマルジョン化した。2回の半ネステッドPCR (1回目の半ネステッドおよび2回目の半ネステッド) を行って、TCRペア α : β 鎖アンプリコン濃度を増加させた。次いで、Mi-seq PCRを

50

行って、ハイスループットシーケンシング解析のための次世代配列バーコードを付加した。

【0202】

ハイスループットシーケンシング後に、未加工のDNA配列を、品質でふるい分けし、NCBI IgBLASTおよびCDR3モチーフアルゴリズムを介してTCR遺伝子使用頻度について注釈をつけ、 α 鎖と β 鎖とをペアにして、TCRレパートリーにコンパイルした。図16は、連結された α : β T細胞受容体遺伝子分布の概要を示す。

【0203】

実施例2：サイレント変異または非サイレント変異を含有するTCRクローンの評価

本明細書において列記される制限酵素を用いてTCR遺伝子に成功裡にクローニングするために、目的クローニングベクターpLVX-EF1 α -IRES-mCherryを、部位特異的変異誘発を介して以下の4つの切断部位を除去するように改変した：AgeI (2415)、SphI (2331)、NheI (8192)、およびMluI (6669) 切断部位 (数字は、これらの切断部位の場所を示す)

【0204】

以前に同定されたTCRである抗HIV-Nef-Rm9を、表7および表8に列記される様々な変異を有するTCR遺伝子の評価のためのモデルTCRとして用いた。活性TCRの発現のために、野生型抗HIV-Nef-RM9 TCR遺伝子断片を、レンチウイルスベクターpLVX-EF1 α -IRES-mCherry中にサブクローニングした。すべての抗HIV-Nef-RM9変異体クローン (表7および表8) を、制限酵素消化およびライゲーションと共に遺伝子合成によって導入した。野生型および変異体抗HIV-Nef-Rm9 TCRを有するレンチウイルス発現ベクターを、別々に、レンチウイルスの発現のためにHEK293FT細胞中へ、エンベローププラスミドおよびパッキングプラスミド (psPAX2およびpMD2.G) と共にトランスフェクトした。活性T細胞受容体発現を有さないように改変された、操作されたJurkat細胞株JRT3/CD8を、TCR発現プラットフォームとして用いた。野生型および変異体抗HIV-Nef-RM9 TCRをコードするレンチウイルスを、別々に、TCR発現のためにJRT3/CD8細胞中に形質導入した。主要組織適合複合体 (MHC) 上にカップリングしたHIVペプチドRPQVPLRPM (SEQ ID NO: 1) に対する、野生型および変異体抗HIV-Nef-Rm9 TCRの結合親和性を評価した。ペプチド-MHCに対するTCRの結合の検出のために、RPQVPLRPM-MHC (「RPQVPLRPM」は、SEQ ID NO: 1として開示される) 複合体を、ストレプトアビジン-アロフィコシアニン (SA-APC) とコンジュゲートさせた。並行して、様々な変異を有する抗HIV-Nef-Rm9のT細胞受容体発現の評価のために、形質導入されたJRT3/CD8細胞を、BV421蛍光マーカーとコンジュゲートされた抗TCR抗体で染色した。

【0205】

図17および図18は、様々な非天然リーダーペプチドを有する変異体抗HIV-Nef-Rm9 TCRが、様々なレベルのTCR発現をもたらすことを実証する。野生型抗HIV-TCRの発現レベルおよびpMHCに対するその結合親和性と比較して (図17、パネルCおよびD)、TRBV24-1リーダーペプチドまたはTRAV40-1リーダーペプチドを含む変異体TCRは、匹敵するレベルのTCR発現およびpMHC結合親和性を示した (図17、TRBV24-1についてはパネルGおよびH、ならびにTRAV40-1についてはパネルKおよびL) が、TRBV30リーダーペプチドを有する変異体TCRは、低減したTCR発現およびpMHC結合能力を示した (図17、パネルEおよびF)。TRAV17-1リーダーペプチドを有する変異体抗HIV TCRは、いかなるpMHC結合傾向も示さず、低レベルのTCR発現を示した (図17、パネルIおよびJ)。野生型抗HIV-TCRの発現レベルおよびpMHCに対するその結合親和性と比較して (図17、パネルCおよびD)、(SpeI制限部位の組込みのための) サイレント変異を有するTCRは、匹敵するレベルのTCR発現およびpMHC結合親和性を有していた (図18、パネルAおよびB)。単一のアミノ酸変異TRBCV30Aを有する変異体TCRは、野生型抗HIV TCRのものと同様のTCR発現およびpMHC結合能力を示した (図18、パネルCおよびD)。単一のアミノ酸変異TRBCP9Lを有する変異体抗HIV TCRは、いかなるpMHC結合傾向も示さず、いかなるTCR発現も示さなかった (図18、パネルEおよびF)。

【0206】

図19 (a) は、ヒト化マウスモデルおよびがん患者の腫瘍特異的T細胞解析のためのヒト

エフェクターT細胞の単離を示す。図19 (b) は、単離され、RT-PCR増幅され、NGSを介して解析された、31,718種類のヒトCD8+ TCRクラスターにおけるV α :V β 遺伝子使用頻度を示す。

【0207】

実施例3：既知のペプチド:MHCの組み合わせに対する結合についての天然TCR α : β のスクリーニング

本実施例において、既知のエプスタイン-バーウイルス (EBV) ペプチドがロードされた組換えヒト白血球抗原 (HLA) 四量体複合体を用いて、四量体染色を行う。細胞表面上にTCRを有するEBV反応性T細胞は、EBVペプチド-HLA四量体複合体を認識すると考えられる。HLA複合体を、ビオチン化して、蛍光体に連結されたストレプトアビジンとコンジュゲートさせ、これが、EBV反応性T細胞の選別を可能にした。PBMCを、既知のHLAアレルを有するエプスタイン-バーウイルス陽性ドナーから単離して、実施例1に記載されるように、エマルジョンオーバーラップ逆転写伸長PCR (OE-RT-PCR) を行って、ドナーのT細胞受容体レパートリーを単離する。TCRアンプリコンを、実施例1において構築された、開発されたTCR発現レンチウイルスベクター中に挿入した。天然でペアのT細胞受容体ライブラリーを発現させるためのベクターの生成後に、J.RT3細胞株に、0.2以下のMOIでレンチウイルスベクターを形質導入し、これにより、インビトロ細胞ライブラリー上でのTCR α 鎖および β 鎖の発現が可能になる。

【0208】

いくつかの以前に特徴決定されたEBV TCR-ペプチド-MHC相互作用を、評価する (参照文献番号6~8)。特に、既知の免疫優性EBVペプチドである、潜伏性EBV抗原タンパク質EBNA3Aに由来するHLA-B8拘束性エピトープFLRGRAYGL (SEQ ID NO: 79) がロードされたHLA B8 (参照文献番号9)。EBV防御のために重要な、潜在的に防御的な効果を有すると考えられるが、より慎重なEBV応答を含む、既知のEBV発癌タンパク質であるLMP2由来のHLA-A*02.01拘束性エピトープに対するトランスジェニックJ.RT3細胞の応答もまた、試験する (参照文献番号10)。次いで、ビオチン化HLA四量体を、5:1のMHC単量体対、細胞選別マーカーとしてのストレプトアビジンのモル比で、Thermo Fisher Scientific (カタログ番号S32362) 由来のストレプトアビジンアロフィコシアニンコンジュゲートとコンジュゲートさせる。ストレプトアビジン標識されたMHC複合体を、その細胞表面上に組換えTCRを有するレンチウイルスで形質導入されたJ.RT3細胞とインキュベートして、Altman et al (参照文献番号11) に記載されているように、蛍光活性化細胞選別に供する。

【0209】

EBV反応性T細胞受容体配列 (α : β 鎖) を発現する選別されたJ.RT3細胞を、フローサイトメトリーによって選別し、10%FBSを含むRPMIにおいて一晚回復させる。次いで、以前に記載されているように (参照文献番号12~16)、TCRアンプリコン配列を、選別されたT細胞受容体ライブラリーの次世代シーケンシング解析によって同定する。あるいは、EBV反応性を含有するJ.RT3細胞を、単一細胞クローンを単離するために、1細胞/ウェルの密度で96ウェルプレート上に播種する。単一細胞が増殖してコロニーになったら、RNAを抽出し、逆転写酵素によってcDNAを合成する。以前に記載されているように (参照文献番号17~19)、TCR α : β ペア配列を増幅するために、PCRを行う。プラスミドを抽出し、サンガーシーケンシングによって配列を同定する。

【0210】

実施例4：インビトロでの細胞株による活性化およびEBV感染細胞死滅についての天然TCR α : β のスクリーニング

ナイーブT細胞を、健常ヒトドナーのPBMCから、EasySep (商標) Human Naive CD8+ T Cell Isolation Kit (Stemcell Technology) を用いて単離する。Sleeping Beautyトランスポゾン/トランスポザーゼシステムを用いて、実施例1および2において回収されるようなTCR α : β 遺伝子配列を、単離されたナイーブT細胞中に送達する。TCR配列ライブラリーを、実施例2由来のpLVXベクターにおいて、遺伝子発現用のEF1 α プロモーターと共に、SBトランスポザーゼを含有するsleeping beautyトランスポゾンクローニングベクターpT2/B

H中にサブクローニングする（参照文献番号20）。ナイーブT細胞に、pT2/BHベクターおよびpCMV(CAT)T7-SB100 (Addgene Plasmid # 34879) の両方をトランスフェクトする。pCMT7-SB100は、機能亢進性のSleeping Beautyトランスポザーゼを発現し、これにより、完全長TCRの発現が可能になる。EBV TCRを含有する遺伝子送達トランスポゾンプラスミドおよびSB100Xトランスポザーゼプラスミドを、4DNucleofectorを用いて製造業者の説明書に従って (Lonza, Cologne, Germany)、T細胞集団中にトランスフェクトする。並行して、ナイーブT細胞に、陰性対照として実施例2において同定された非EBV応答性TCRをトランスフェクトする。形質導入されたT細胞ライブラリーを、フローサイトメトリーを介して、安定なTCR複合体アセンブリーを示したTCR表面マーカーについての染色によって同定し（抗 α 、抗 β 、抗CD8、抗CD3）、解析する。形質導入された細胞上の生産的TCRディスプレイの効率を解析する。 10

【0211】

次に、トランスフェクトされたTCRライブラリーを、EBV感染B細胞（EBVの存在が陽性と試験されているがん細胞株である、Raji細胞）との共培養によってインビトロ機能について、およびまた、EBVに感染した自己由来ドナーB細胞に対する活性についても解析する。T細胞を、10:1の比でEBV陽性B細胞と共に播種し、24時間共培養する。24時間のインビトロ共培養後に、T細胞を回収し、染色して、T細胞マーカー、およびCD107の発現/膜TNF- α 上方制御について選別した（参照文献番号21~23）。レパートリーにおけるEBVターゲットエンゲージング腫瘍浸潤リンパ球（TIL）配列を明らかにするために、それらがコードするTCRを、NextGen配列解析によって解析する。 20

【0212】

次いで、モノクローナルのペアのTCR α : β cDNAを、回収し、モノクローナルTCRとしてナイーブヒトT細胞中に形質導入し、EBV感染B細胞の同じ集団とのインビトロ共培養によってアッセイして、EBVペプチドを標的とするそれらのTCRの能力を検証する。共培養アッセイを繰り返して、炎症誘発性サイトカインを、IFN γ 、TNF- α 、パーフォリン、およびグランザイムを測定するためのELISAキットを用いて測定する。陰性対照のTCRがトランスフェクトされたナイーブT細胞と比較して、EBV特異的TCRを発現するナイーブT細胞は、すべての炎症誘発性サイトカインのレベルの増加を実証する。

【0213】

形質転換されたナイーブT細胞の、EBV感染B細胞またはRaji細胞に対する活性を評価するために、インビトロ細胞傷害活性アッセイもまた行う。Raji細胞および自己由来B細胞を、別々に、 5×10^6 /mLの濃度に希釈し、 $0.25 \mu\text{M}$ のカルボキシフルオレセインジアセタートスクシンイミジルエステル（CFSE）と共に30分間、 37°C CO_2 インキュベーターでインキュベートして、CFSE色素を細胞由来のすべての遊離アミンに共有結合で結合させた。CFSE色素は、B細胞の生存率および増殖の評価を可能にした。染色されたB細胞を、RPMI培地で3回洗浄する。ナイーブT細胞は、EBV反応性TCRのみを対照TCRレパートリーと共に発現しており、次いで、ある範囲のエフェクター細胞対標的細胞の比で、CFSEで染色されたB細胞またはRaji細胞と共培養した。細胞の細胞傷害活性を、それぞれ492および517の励起波長および発光波長で、フローサイトメトリーによって評価する。対照TCR実験におけるナイーブT細胞（EBVペプチド親和性を有さないTCR）と比較して、健常ナイーブT細胞集団中に形質導入されたEBV反応性TCRは、EBV感染自己由来B細胞またはRaji細胞に対して、優れた細胞傷害活性を示す。 30 40

【0214】

実施例5：がんの処置のための天然TCR α : β ライブラリーの遺伝子移入

がん特異的TCRの単離、回収、および細胞ベースの治療薬としての回収されたTCRライブラリーの追跡応用を実証するために、動物モデルを用いる。ヒトPBMC移植CD34-NSGヒト化マウスに、ヒトRKO結腸癌異種移植片を埋め込む（Charles River Labs）。CD34-NSGに、最初に、静脈内注射（i.v.）によってヒトPBMCを移植し、次いで、皮下注射によって50% Matrigel（登録商標） Matrix（Corning）中の 1×10^7 個のRKO腫瘍を移植した。次いで、抗腫瘍TCR応答を増強するために、マウスに、2種類のチェックポイント阻害剤、ペムブロ 50

リズマブ（抗PD-1）およびイピリムマブ（抗CTLA-4）を与えた。マウスに、100 μ gのペムプロリズマブおよび100 μ gのイピリムマブを、1週間に2回与えた。15日目に、脾臓および腫瘍浸潤T細胞を単離するために、脾臓および腫瘍組織をマウスから取り出した。セントラルメモリー（TCM）および移行メモリー（transitional memory）（TTM）T細胞を、CD3+CD8+CD45RA CCR7発現についてのFACS解析によって取得した。次いで、TCM集団およびTTM集団を、増大させ、実施例1および2におけるように、TCRレパートリーを取得するためにエマルジョンOE-PCRおよびネステッドPCRに供し、実施例3に記載されるように、Sleeping Beautyトランスポゾン/トランスポザーゼ形質導入プラスミド中にクローニングした。

【0215】

Illumina MiSeq 2x300ペアードエンドリードプラットフォームを用いて、TCRライブラリーの分子的特徴を正確に定義し、決定した。未加工のIllumina配列を、品質でふるい分けし、International Immunogenetics Information System (IMGT、参照文献番号24)を用いて抽出されたV遺伝子、D遺伝子、およびJ遺伝子、ならびにCDR3にマッピングした。配列データを、インフレイムのV(D)Jジャンクションについてふるい分けし、かつ、生産的なTCR α 配列およびTCR β 配列を、IlluminaリードIDによってペアにして、正確なCDR3ヌクレオチドおよびV(D)J遺伝子使用頻度の合致によってコンパイルする。CDR- β 3ヌクレオチド配列を、抽出して、末端ギャップを無視して96%nt同一性にクラスター化させ（USEARCH v5.2.32、参照文献番号25）、結果として生じた2以上のリードを有するV α :V β ペアは、V α :V β クラスターのリストを含んでいた。

【0216】

あるいは、高度に多様なTCRライブラリーをクローニングするために、エマルジョンRT-PCRおよびネステッドPCRを行った後に、TCR α : β アンプリコンライブラリーを、sleeping beautyトランスポゾンベクター（pT2/BH）中にライゲーションし、XL-Gold (Agilent #200314) などの高効力のコンピテント大腸菌（E. coli）細胞を形質転換することができる。次いで、ペアの α β TCRを、細菌コロニーサンガーシーケンシングによって個々にシーケンシングする。およそ100個のコロニーを、公知のTCR配列と組み合わせて、ナイーブT細胞中への送達のために、正確に定義されたペアの α β TCRライブラリーを生成する。RKOがん細胞株の移植を伴わないヒト化マウスに由来するTCMおよびTTM T細胞から獲得されたTCRレパートリーを、陰性対照群として用いる。

【0217】

次に、両方のTCRレパートリー（RKO異種移植TCRに由来、またはRKO異種移植TCRを有さないマウスに由来）を、実施例3において報告されるようなSleeping Beautyトランスポゾン/トランスポザーゼシステムを用いて、ナイーブT細胞において発現させる。形質転換されたTCRライブラリーを、i.v.注射を介して、様々なRKO異種移植マウスに別々に投与する。個々のマウスの腫瘍体積および体重変化を毎日測定して、腫瘍サイズおよび疾患の進行を追跡する。他のRKO異種移植マウス由来のTILが形質導入されたT細胞集団で処置されたRKO異種移植マウスは、対照群由来の（すなわち、RKO異種移植片を有さないヒトPBMC CD34移植マウスに由来する）TCRライブラリーが形質導入されたT細胞で処置されたマウスと比較して、腫瘍成長の遅延を示す。これは、腫瘍進行を有効に低減させることができる細胞ベースの治療薬としての、正確に定義されたTCRライブラリーの応用性を実証する。

【0218】

実施例6：がんの処置のための抗がん活性についての事前選択後の天然TCR α : β ライブラリーの遺伝子移入

実施例4と同様の手順および同じマウスモデル（RKO結腸がん異種移植片を有するヒトPBMC移植CD34-NSGヒト化マウスモデル）を、本実施例において用いるが、細胞ベースの治療薬としての使用の前に、インビトロ選択によって抗がんTCRを単離するための追加的なT細胞事前選択段階を伴う。脾細胞および腫瘍浸潤リンパ球集団を、RKO結腸がん異種移植後に単離する。TCMおよびTTMを、マーカーCD3+CD8+CD45RAおよびCCR7でのFACSによって単離する。実施例4に記載されるように、TCRレパートリーを、エマルジョンOE-PCRおよびネステッドPCRを用いて単離し、次いで、Sleeping Beautyトランスポゾンベクター中にサブク

ローニングして、PBMCから単離されたナイーブT細胞中に再送達する。実施例3に記載されるように、トランスジェニックナイーブT細胞を、放射線照射RKO結腸がん細胞株との共培養によって刺激し、CD107および膜TNF- α についてのフローサイトメトリーを用いて単離する。

【0219】

あるいは、樹状細胞（DC）を、血液樹状細胞単離キットII（Miltenyi Biotec）を用いてヒト化マウスから単離し、DCを、50 ng/mLの顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を補給した10%FBSを含むRPMIにおいて培養する。樹状細胞を、RKOがん細胞溶解物またはヒト結腸がん細胞溶解物で2時間パルスする。Sleeping Beautyトランスポゾン/トランスポザーゼベクター中にクローニングされているTCRライブラリーが形質導入されたナイーブT細胞を、次いで、10:1の比で4日間、DC細胞と共培養する。刺激された抗がん細胞傷害性T細胞を、膜結合型CD107、膜結合型TNF- α 発現、またはCD137（4-1BB）発現でゲーティングする。CD107aは、活性化CD8⁺ T細胞の脱顆粒のマーカーである（参照文献番号26～33）。CD137は、TNFRファミリーに属し、T細胞の増殖および生存に関連している（参照文献番号34～35）。選別されたT細胞（抗がんT細胞）を、実施例4に記載されるようにRKO結腸がんマウスモデル中に送達する。非RKO異種移植マウス由来のTCRが形質導入されたナイーブT細胞で処置されたマウスと比較して、インビトロ機能的スクリーニングから単離されたRKOターゲティングTCRが形質導入されたナイーブT細胞で処置されたマウスは、より高い生存率および低減した腫瘍成長を示した。最終的な細胞ベースの治療薬の抗がん効力を増加させるために、T細胞を、抗がん共培養アッセイにおいて活性化について選択し、がん特異的TCRについて濃縮する。

【0220】

実施例7：抗腫瘍細胞死滅を増強するための、抗がん活性についての事前選択およびインビトロ事前活性化後の天然TCR α ： β ライブラリーの遺伝子移入

実施例6における実験手順を、天然でペアのTCRライブラリーのナイーブT細胞中への形質導入後の追加的なT細胞活性化段階を伴って、実施例5に記載されるように行う。この活性化段階は、増強したがん細胞死滅のために、T細胞をあらかじめプライミングし、かつそれらを活性化する。簡潔に述べると、OE-PCRおよび1回目のネステッドPCRの後に、TCRライブラリーを、TCRのトランスジェニック発現のためにsleeping beautyトランスポゾンベクター中にクローニングする。TCRライブラリーのサイズおよび多様性を定義するために、個々のプラスミドの次世代シーケンシングまたはサンガーシーケンシングを行う。プールされたTCRトランスポゾンプラスミドを、sleeping beautyトランスポザーゼ発現ベクターSB100とコトランスフェクトし、これが、ナイーブT細胞におけるTCRの発現を可能にする。トランスジェニックT細胞を、RKO細胞株またはがん抗原でパルスされたT細胞で最初に刺激し、CD137/CD107/TNF- α 発現抗がんT細胞を、FACSによって選別する。次いで、これらの細胞を、細胞ベースの治療薬としてのRKO腫瘍マウスモデル中への送達の前に、インビトロで活性化する。Gibco（商標） Dynabeads（商標） Human T-Activator CD3/CD28（Thermo Fisher Scientific）を、TCRが形質導入されたナイーブT細胞培養物に、1:1のビーズ対細胞の最終的な比で添加し、37°C CO₂インキュベーターにおいて3日間インキュベートする。T細胞と抗原提示細胞（APC）とのインビボ相互作用を模倣して、Dynabeadsを抗CD3および抗CD28抗体とコンジュゲートさせ、これにより、T細胞クローンの増大および分化が可能になる（参照文献番号36）。細胞の増殖および生存率を、活性化後に毎日モニターする。

【0221】

T細胞の分化を示すIFN- γ およびTNF- α の発現を、ELISAによって検討する。ビーズの添加後3日目に、さらなるT細胞の増大を誘導するために、20 U/mLの組換えヒトインターロイキン2（IL2）を、培養培地中に添加する。7日目に、増大したT細胞を計数して、尾静脈i.v.注射を介してRKO異種移植マウス中に送達する。腫瘍成長および個々のマウスの体重を評価して、実施例4および5において得られたものと比較した。本実施例におけるトランスジェニックのRKO腫瘍特異的な、刺激され、かつ活性化されたT細胞で処置されたRKO移

植マウスは、実施例4由来のもの（腫瘍選択または活性化を伴わないトランスジェニックT細胞）および実施例5由来のもの（インビトロ事前活性化を伴わない、RKOに対する反応性についてスクリーニングされたT細胞）と比較して、優れた抗がん効率を示す。本実施例に記載される追加的な活性化段階は、マウスモデルにおける腫瘍免疫抑制の速度および強度を増強するために、治療的送達の前にエフェクター細胞傷害性T細胞の分化を可能にする。

【0222】

実施例8：抗原特異的免疫寛容の誘導のための天然TCR α ： β ライブラリーの遺伝子移入

CD34+ヒトPBMC移植マウスモデルは、マウスにおいて移植片対宿主病（GvHD）を誘導することが公知である。この問題を緩和するために、GvHDを患うマウスから単離されたTCRを有する制御性T細胞を誘導して、免疫寛容を誘導するための治療薬として用いた。

10

【0223】

T細胞を、実施例4に記載されるように調製されているマウスの脾臓およびPBMCから単離する。T細胞は、GvHDの発症が始まる時である移植後30日目に単離する。Treg細胞（CD4+CD25+）および従来のT細胞（CD4+CD25-）の両方からTCRライブラリーを取得するために、実施例1由来のTCRクローニングプライマーセットを使用して、オーバーラップ伸長逆転写PCRを行う。次に、2つのTCRライブラリーを、pT2/BH Sleeping Beautyトランスポゾンベクター中にサブクローニングする。次世代シーケンシングを行って、これらの2セットのT細胞受容体ライブラリーを解析し、かつT細胞受容体遺伝子使用頻度を特徴決定する。

【0224】

ナイーブT細胞を、以下の選別マーカー設定：CD25⁻CD44^{low}CD62L^{hi}でPBMCから単離する。GvHDマウスから単離されているTCR配列ライブラリーを用いて、TCR発現のために、細胞に、上記の2つのライブラリーを含有するTCRドナートランスポゾンプラスミドを、Sleeping Beautyトランスポザーゼプラスミド（SB100）と共にトランスフェクトする。次いで、トランスジェニックナイーブT細胞を、5 ng/mLのTGF- β 1と共にDynabeads（商標） Human T-Activator CD3/CD28によって、Treg細胞に誘導する。TGF- β は、Foxp3発現を誘導することが示されているマスター制御因子であり、ナイーブT細胞の制御性T細胞への分化を可能にする（参照文献番号37～38）。誘導の5日後に、誘導された制御性T細胞（iTreg）に、GvHD発症マウスの処置のためにT細胞増大を可能にするrIL-2を供給する。

20

【0225】

あるいは、以前に記載されているように、T細胞に、Foxp3配列を直接形質導入する（参照文献番号39～40）。増大の3日後に、トランスジェニックTCRを有するiTreg細胞およびトランスジェニックTCRを有さないiTreg細胞を、別々に、尾静脈注射を介して静脈内に、GvHD発症マウス中に注射する（n=5）；これらのマウスは、より早期のGvHDマウスと同じドナーおよびサンプリングの時点由来のCD34+ヒトPBMCを、移植されている。CD4+CD25+トランスジェニックTCRを有するiTregで処置されたマウスは、トランスジェニックCD4+CD25- TCRを有するiTreg細胞およびトランスジェニックTCRを有さないiTreg由来のものと比較して、遅延したGvHD疾患発症を示す。

30

【0226】

3つの群（非トランスジェニックTCR、CD4+CD25+ TCR、およびCD4+CD25- TCR）の間の、体重変化およびGvHDスコアを解析する。CD4+CD25+トランスジェニックTCRを発現するT細胞が注射されたマウスは、T細胞のみおよびCD4+CD25-トランスジェニックTCRを有するT細胞が注入されたマウスと比較して、最も低い体重の変化、および最も低いGvHDスコアを示した。免疫寛容原性活性およびT細胞表現型を、モニターする。T細胞注入の20日後に、ヒト化マウスの屠殺、脾臓の採集、および赤血球溶解緩衝液消化によって、脾細胞を単離する。結果として生じた白血球を、抗CD25、抗CD4+、抗CD3、およびFoxp3で染色し、その後フローサイトメトリー解析を行って、免疫寛容原性活性を評価する。トランスジェニックCD4+CD25+ TCRを有するマウス由来の白血球は、他の2つの群のマウス（非トランスジェニックTCRおよびCD4+CD25- TCRを有する）由来の白血球と比較して、フローサイトメトリー染色解析から最も強いFoxp3シグナルおよびCD25シグナルを示す。

40

50

【0227】

実施例9：哺乳動物患者およびヒト患者におけるがん治療のための天然TCR α ： β ライブラリー遺伝子移入の応用

本実施例において、ヒトがん患者などの哺乳動物患者を処置する。いくつかの態様において、がんのタイプは、肺がん、黒色腫、腎細胞癌、乳がん（トリプルネガティブ乳がんを含む）、結腸がん、または前立腺がんである。治療手順は、実施例4に記載されるものと同様に行われてもよい。簡潔に述べると、哺乳動物患者またはヒト患者からのT細胞を回収し、これは、患者からのPBMC、腫瘍浸潤リンパ球、脾臓組織、罹患臓器、または他のヒト組織に由来してもよい。次いで、TCR遺伝子を回収して、発現ベクター中にクローニングする。いくつかの態様において、T細胞ライブラリーを、最初に、抗腫瘍活性についてプレスクリーニングする。スクリーニングは、腫瘍ペプチド新生抗原に対する反応性、あるいは、インビトロでの全腫瘍細胞に対する反応性を有するTCRを特定することができる。いくつかの態様において、腫瘍細胞は、がん患者に由来してもよい。

10

【0228】

次に、選択されたT細胞ライブラリーを、細胞ベースの治療薬として用いることができる。いくつかの態様において、細胞ベースのTCR治療薬の分子組成を正確に定義するために、ライブラリーを、ハイスループットシーケンシングを用いて解析する。他の態様において、細菌における多数の個々のプラスミドコロニー（ライブラリーに由来する3~100,000個の範囲にわたるコロニー）をサブサンプリングすること、およびミニプレップ後に個々に各プラスミドコロニーをシーケンシングすることによって、ライブラリーを選択する。次いで、正確に定義された分子ライブラリーを再構成するために、それらの個々のプラスミドを、定義された比で混合する。これらの正確に定義された分子ライブラリーは、TCRライブラリーが元々RT-PCRによって生成された場合に生じ得るPCRエラーバリエーションの存在を、低減させることができる。

20

【0229】

いくつかの態様において、TCR導入遺伝子が、遺伝子レシピエントT細胞において天然のヒトT細胞受容体遺伝子と会合することを阻止するために、マウスTCR定常領域遺伝子を用いる。TCRおよび任意の他のプラスミド遺伝子をヒトT細胞に移入するために、ライブラリーを用いる。いくつかの態様において、これらのT細胞は、患者に由来している。いくつかの態様において、これらのT細胞は、患者由来のナイーブT細胞であろう。他の態様において、これらのT細胞は、他のヒトまたは細胞株に由来してもよい。いくつかの態様において、実施例6に記載されるような増強したがん細胞死滅のために、T細胞をあらかじめブライミングし、かつそれらを活性化する活性化段階があってもよい。

30

【0230】

いくつかの態様において、実施例7に記載されるように、細胞の運命に影響を及ぼすために、転写因子が用いられてもよい。TCR導入遺伝子を発現する形質転換されたT細胞を、細胞バンクを生成するためにインビトロで増大させてもよく、または、それらを患者に直接投与してもよい。いくつかの態様において、T細胞を、腫瘍中に直接注射する。他の態様において、T細胞を、静脈内またはくも膜下腔内に投与する。

【0231】

その後の反復投与用にT細胞導入遺伝子の集団を再作製するために、プラスミド遺伝子ライブラリーを、任意の時に再び用いることができる；他の態様において、増大した細胞バンクを、反復治療用投与のために用いてもよい。継続的ながんの進行および/もしくは腫瘍成長、または任意の方法での腫瘍の不適切な処置の事象において、治療プロセス全体を繰り返すことができる。いくつかの態様において、これは、患者のT細胞遺伝子を再び捕捉すること、ならびに、スクリーニングおよびライブラリー生成のプロセスを繰り返すことを含んでもよい。他の態様において、反復治療は、進化したがん細胞を標的とするTCRを特定するために、元々捕捉されたTCR遺伝子ライブラリーを耐性腫瘍細胞集団に対して再スクリーニングすることを含むことができる。他の態様において、反復治療は、TCR遺伝子ライブラリーの追加的な活性化を含んでもよい。いくつかの態様において、インビト

40

50

ロ細胞活性化プロセスは、複数の処置投与のコースにわたって変化してもよく、例えば、がんが進行する場合には、より強力な活性化段階が、治療的投与の前にインビトロで、細胞ベースの治療薬のために用いられてもよい。

【0232】

いくつかの態様において、治療的投与後に細胞ベースの治療法の運命を制御するために、i-カスパーゼ遺伝子または他の誘導性自殺スイッチ遺伝子が、導入遺伝子ベクターに含まれてもよい。

【0233】

実施例10：ウイルス感染症の処置のための天然TCR α : β ライブラリー遺伝子移入の応用

移植後リンパ増殖性障害 (PTLD) は、固形臓器移植の重篤な合併症である。原発性エプスタイン-バーウイルス (EBV) 感染症が、主要なリスク因子であり、PTLD症例のおよそ60~80%が、EBV血清陽性である。EBVペプチドに対するT細胞応答は、悪性度を抑制するために非常に重要である (Llaurador, G. et al., Curr. Opin. Pediatr. 29, 34-40 (2017))。

【0234】

本明細書において開示されるTCR α : β ライブラリーは、抗ウイルスTCR治療薬のためのモデルとしてのマウスモデルにおいて、PTLDを処置するかまたは予防するために用いられる (Ahmed, E. H. & Baiocchi, R. A, ILAR J. 57, 55-62 (2016); Ricciardelli, I. et al., Blood 124, 2514-2522 (2014))。簡潔に述べると、抗EBV TCRが、ペアの α 遺伝子および β 遺伝子の単一細胞単離によって特定され、TCRディスプレイベクター中にクローニングされ、かつ抗EBVペプチド結合についてのFACSによって細胞ベースのスクリーニングがされる。他の態様において、トランスジェニックTCRで形質転換されたT細胞の認識、増大、および/またはインビトロ死滅活性を特定することによって、抗EBV TCRが発見され得る。他の態様において、様々な抗ウイルス療法のために、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、単純ヘルペスウイルス1または2 (HSV-1/HSV-2)、および黄熱ウイルス (YFV) を含むがそれらに限定されない他のウイルスを標的とするT細胞受容体が、発見される。

【0235】

抗ウイルスT細胞受容体ポリヌクレオチドを単離した後、それを、DNAベクター中にクローニングして、PTLDを処置するための自家遺伝子治療に利用する。形質転換されたT細胞を、他のウイルス感染症を処置するために、または異種遺伝子治療のために用いてもよい。他の態様において、それらを、PTLDまたは他のウイルス感染症を予防するための予防的細胞治療として用いてもよい。他の態様において、ベクターを、ウイルスに関連した予防がんワクチンとして遺伝子治療に用いてもよい。

【0236】

ウイルスに感染した細胞のインビトロ死滅効力を評価するために、レンチウイルス遺伝子形質導入を用いて、ヒト汎T細胞を抗ウイルスTCRで形質転換する。形質転換されたT細胞を、以下の刺激条件：なし、IL-2、抗CD3/抗CD28磁気ビーズ、またはIL-2/抗CD3/抗CD28のいずれかで、ウイルスに感染した細胞と共培養してもよい。インビトロでのウイルスに感染した細胞の死滅は、蛍光標識された腫瘍細胞の細胞死滅による喪失を測定する、Incucyte Live Cellアッセイによって評価される (Single, A. et al., J. Biomol. Screen 20, 1286-1293 (2015))。

【0237】

次に、ヒト汎T細胞に、最適化条件下で抗ウイルスTCRを形質導入し、マウスモデルにおいてウイルス感染症を処置するために用いる。EBV感染症およびPTLDのマウスモデルが、用いられる (Johannessen, I. et al. J. Med. Virol. 83, 1585-1596 (2011))。他の態様において、マウスに、ウイルスを感染させ、ウイルスタンパク質に特異的なT細胞で処置してもよい。形質導入されたT細胞を、トランスジェニックTCR発現についてのフローサイトメトリーによって単離して、純粋な形質導入されたTCRライブラリーを取得する。次に、形質転換された細胞を、上記の条件を含み得るT細胞刺激プロトコルを用いて刺激し、刺激されたT細胞を、静脈内尾静脈注射を介してマウスに送達する (Kurtz, A. Mesen

chymal Stem Cell Delivery Routes and Fate. Int. J. Stem Cells 1, 1-7 (2008))。

【0238】

マウスを、30日間追跡して、体重減少およびPTLD腫瘍体積を記録する。処置されたマウスを、処置されていないマウス対照、ならびに、抗ウイルス抗体および抗ウイルス小分子阻害剤で処置された他の対照と比較する。PTLD腫瘍成長におけるいずれかの遅延を、主要な研究エンドポイントとして定量する。本技術の抗EBV TCRを含む形質転換された細胞で処置されたマウスは、処置されていない対照と比較して、PTLD成長における遅延、遅延したウイルス増殖速度論、および/またはウイルス感染後のより早い疾患回復を示すことが期待される。これらの結果により、本技術の組成物が、その必要がある対象において、ウイルス感染症およびウイルスに関連したがんを処置するかまたは予防するための方法に有用であることが、実証されるであろう。

10

【0239】

実施例11：PDXマウスモデルにおいてがんを処置する際の抗原特異的TCR α ： β の評価

抗腫瘍T細胞の発見のための更新可能な細胞供給源として、卵巣がん患者からの、患者由来異種移植（PDX）マウスモデルを確立する（図22）。

【0240】

ヒト汎T細胞に、0.2未満の感染多重度（すなわち、細胞当たり1つのTCR導入遺伝子）で形質導入し、形質導入されたライブラリーを、共培養されたPDX腫瘍細胞に対するTCR活性化についてインビトロでスクリーニングする。増大および活性化因子遺伝子発現（CD69/CD107/膜TNF- α ）を、抗腫瘍TCR認識の証明として定量する。クローニングおよび選択プロセスにおける各段階で（すなわち、インプットcDNA、レンチウイルス粒子生成後、および表面に提示されたTCRを有するmCherry+ J.RT3細胞）、Illumina MiSeq 2x300ペアードエンドシーケンシングを利用して、TCRライブラリーの多様性を解析し、V β 遺伝子およびV α 遺伝子の特徴決定する。2x300シーケンシングにより、CDR α 3領域およびCDR β 3領域を完全に網羅することが可能になる。ハイスループットシーケンシングにより、TCRライブラリーが高い多様性を維持し、かつ哺乳動物T細胞上で提示される 10^5 以上の天然TCR α ： β が生じるであろうことが検証される。NGSもまた用いて、PDX新生抗原を特定し、TCR分子モデリングを行って、抗PDX TCRの新生抗原標的を決定する。

20

【0241】

抗PDX TCRがスクリーニングによって特定されたら、自己由来患者T細胞にそれらの抗腫瘍TCRを形質導入し、インビトロでPDX腫瘍細胞を死滅させるその能力をアッセイする。ヒトT細胞に、レンチウイルス遺伝子形質導入を介して、抗腫瘍TCR α ： β 遺伝子をトランスフェクトする（図20）。患者T細胞に、形質導入されたTCRの優先的な発現を促進するためのシステイン改変を含む、天然ヒトTCR定常領域遺伝子を形質導入する。インビトロでTCRベースの腫瘍細胞死滅を評価するために、形質導入されたT細胞を、T細胞刺激物質（一例として、抗CD3/抗CD28磁気ビーズ/IL-2）で事前活性化し、IncuCyte標識された腫瘍細胞とインキュベートする。腫瘍細胞を標的としない連結されたTCR α ： β 遺伝子が形質導入された自己由来T細胞が、陰性対照として働く。陰性対照TCR遺伝子と比較した腫瘍細胞死滅の統計解析のために、ANOVAを用いる。

30

【0242】

次に、抗原特異的腫瘍免疫療法のために、トランスジェニック抗PDX T細胞を、PDXマウスにおいて送達する。形質導入されたT細胞を、フローサイトメトリーによって単離して、純粋な形質導入されたTCRライブラリーを取得する。マウス汎T細胞に、抗PDX TCRを形質導入し、細胞死滅アッセイにおいて決定された条件を用いて、あらかじめ刺激する；刺激されたT細胞を、静脈内尾静脈注射を介してマウスに送達する。マウスを30日間追跡し、処置されたマウスを、対照群およびチェックポイント阻害剤で処置された動物と比較する。遅延した腫瘍成長を、主要な研究エンドポイントとして定量し、統計学的有意性を検証するために、生存のカプラン・マイヤー生存解析を適用する。抗PDX TCRを含むT細胞で処置された動物は、チェックポイント免疫療法処置を受ける動物において観察される治療応答と合致するかまたはそれを超えるであろうことが予想される。これらの結果により、

40

50

本技術のTCRライブラリーが、ヒト患者における個別化抗原特異的治療法に有用であることが実証されるであろう。

【0243】

実施例12：PDXマウスモデルにおいてがんを処置する際の抗原特異的TCR α ： β の評価

腎細胞癌（RCC）は、免疫療法に感受性であり、かつ典型的に、腫瘍が局所的に進行するかまたは転移するまで、臨床的に無症状である。したがって、後期RCCの診断が一般的であり、外科切除により、実験室での研究のための実質的なT細胞浸潤物を伴う大きな腫瘍が生じる。進行RCCはまた、チェックポイント阻害および組換えIL-2療法についてFDAに認可された適応症であり、RCCは、免疫療法で再び活気づけることができる大量のT細胞浸潤物を伴い、高度に免疫原性であることができる。RCCに応答するTIL TCRのハイスループットシーケンシングを用いて、精密な治療に活用することができる新生抗原特異的TCRを特定する。

10

【0244】

最初に、TILおよびがん細胞を、フローサイトメトリーを用いて腫瘍から単離し；腫瘍細胞を凍結保存し、他方、TILは、TCRレパートリーの単離およびクローニングのためのインプットである。次に、TCRレパートリーを、ナイーブT細胞中に形質転換し、結果として生じたディスプレイライブラリーを、自己由来患者腫瘍細胞との共培養において播種する。24時間の共培養後に、活性化されたT細胞を、CD69/CD107/膜TNF- α 上方制御についてのFACSによって選別し、コードされるTCRを、NextGenシーケンシングによって解析して、レパートリー中の腫瘍ターゲティングTCRを明らかにする。最終的に、モノクローナルのペアのTCR α ： β cDNAを回収し、ヒト汎T細胞中に形質導入して、抗RCC TCRを特定するために、腫瘍細胞共培養によってアッセイする。これらの結果により、本技術のTCRライブラリーが、ヒト患者における個別化抗原特異的治療法に有用であることが実証されるであろう。

20

【0245】

実施例13：結腸癌、卵巣がん、およびB細胞がんを処置するためのペアのTCR α ： β 遺伝子治療の応用

結腸がん。RKO細胞（ヒト結腸癌細胞株）に対するペアのTCR α ： β 遺伝子ライブラリーを、マウスT細胞中にクローニングする。簡潔に述べると、汎T細胞を、磁気ビーズを用いてマウス脾臓から単離し、レンチウイルスまたはトランスポザーゼのいずれかベースのTCR遺伝子送達に供する。

30

【0246】

図20に示されるレンチウイルス戦略に従って、ヒトTCR定常領域遺伝子を用いて、天然マウスTCRとの交差二量体化を阻止する。次に、トランスジェニックヒト α および β 定常領域タンパク質の表面発現を評価するために、T細胞を抗体で染色し、TCR発現を、フローサイトメトリーによって定量する。RKO死滅効力を評価するために、レンチウイルス遺伝子形質導入を用いて、マウス汎T細胞を抗RKO TCRで形質転換する。形質導入されたT細胞を、ヒトTCR発現についてのフローサイトメトリーによって単離して、純粋な形質導入されたTCRライブラリーを取得する。形質転換された細胞を、以下の刺激条件：なし、IL-2、抗CD3/抗CD28磁気ビーズ、またはIL-2/抗CD3/抗CD28のいずれかで、RKO腫瘍細胞と共培養してもよい。インビトロRKO細胞死滅を、蛍光標識された腫瘍細胞の細胞死滅による喪失を測定する、Incucyte Live Cellアッセイによって評価した。

40

【0247】

インビボ研究のために、刺激されたT細胞を、静脈内尾静脈注射を介してマウスに送達する。マウスを、30日間追跡して、体重減少および腫瘍体積を記録する。処置されたマウスを、処置されていないマウス対照（群1および4、図21（b））、ならびに、現在認可されている抗体ベースの免疫療法で処置された歴史的対照（図21（a））と比較する。腫瘍成長における遅延を、主要な研究エンドポイントとして定量する。抗RKO TCRを含むT細胞で処置された動物は、抗体ベースの免疫療法で処置された動物において観察される腫瘍成長における遅延と一致するかまたはそれを超えることが期待される。

50

【0248】

卵巣がん。ヒト臨床PBMCおよびTIL試料を、切り出された腫瘍および/または患者の血液から収集する。卵巣がん患者由来のTCR α : β ライブラリーを単離する。臨床PBMCおよびTIL試料を、外科切除および/または採血後に取得する。J.RT3 T細胞中へのレトロウイルスTCR形質導入のために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) レポーター系を用いて、TCR α : β クローニングを行う。J.RT3細胞は、内在性TCRを発現せず、TCR発現のための安定化タンパク質および共発現因子 (CD3およびCD8を含む) を提供して、これにより、J.RT3は、TCRディスプレイに理想的な哺乳動物宿主になる。天然でペアの α : β 可変領域遺伝子を、連結されたアンプリコンの末端にある制限部位を用いて、pLVXレンチウイルス発現ベクター中にクローニングする。ベクターライブラリーを、大腸菌において増幅し、TCR α : β 発現ライブラリーを、パッケージングベクターおよびエンベロープベクター (psPax2およびpMD2.g) と共にHEK293T細胞中にコトランスフェクトして、レンチウイルスTCR α : β 形質導入粒子を生成する (図20)。

10

【0249】

B細胞がん。B細胞系列がんには、TCRによって標的とされる腫瘍特異的新生抗原として抗体遺伝子を発現する、リンパ腫および多発性骨髄腫が含まれる。ペアのTCR α : β 遺伝子ライブラリーを、B細胞系列がん患者から単離する。J.RT3 T細胞中へのTCR発現プラスミドのレトロウイルス形質導入のために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) レポーター系を用いて、ペアのTCR α : β クローニングを行う。J.RT3細胞は、内在性TCRを発現せず、安定なTCR発現に必要とされる安定化タンパク質および共発現因子 (CD3およびCD8を含む) もまた提供して、これにより、J.RT3は、TCRライブラリーディスプレイに適している哺乳動物宿主になる。天然でペアの α : β 可変領域遺伝子を、連結されたアンプリコンの末端にある制限部位を用いて、pLVXレンチウイルス発現ベクター中にクローニングする (図20に示される通り)。

20

【0250】

ベクターライブラリーを、安定なレンチウイルスプラスミド複製のために設計された株 (例えば、Stb13¹²) を用いて大腸菌において増幅し、次いで、TCR α : β 発現ライブラリーを、パッケージングベクターおよびエンベロープベクター (psPax2およびpMD2.g) と共にHEK293T細胞中にコトランスフェクトして、レンチウイルスTCR α : β 形質導入粒子を生成する。並行して、腫瘍特異的BCRを、PBMC臨床試料からシーケンシングする。J.RT3 T細胞に、0.2未満の感染多重度 (MOI) (すなわち、細胞当たり1つのTCR導入遺伝子) で形質導入して、BCR新生抗原に対するTCR結合をアッセイする。形質導入された細胞を、患者のシーケンシングされた腫瘍にコードされる抗体遺伝子からのCDR-H3、CDR-L3、および体細胞変異に由来する新生抗原由来の、オーバーラップするペプチド-MHCに対してスクリーニングする。

30

【0251】

クローニングプロセスにおける各段階で (すなわち、インプットcDNA、レンチウイルス粒子生成後、および表面に提示されたTCRを有するmCherry+ J.RT3/CD8細胞)、Illumina MiSeq 2x300ペアードエンドNGSシステムを用いて、ライブラリーの多様性を解析し、V β ライブラリーおよびV α ライブラリーを特徴決定する。2x300シーケンシングにより、CDR α 3領域およびCDR β 3領域を完全に網羅することが可能になる。ハイスループットシーケンシングにより、TCRライブラリーがライブラリークローニングプロセスを通して高い多様性を維持すること、および哺乳動物細胞上で提示される 10^6 以上の天然TCR α : β が生じるであろうことが検証される。ペプチド:MHC新生抗原スクリーニングによって発見されたTCR α : β を、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いて親和性について試験する。これらの結果により、本技術のTCRライブラリーが、ヒト患者における個別化抗原特異的治療法に有用であることが実証されるであろう。

40

【0252】

本明細書において述べられるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、あたかも各々が参照により個々に組み入れられるのと同じ程度まで、その全体が参照に

50

より明白に組み入れられる。矛盾する場合には、本明細書が、定義を含めて、支配することになる。

【 0 2 5 3 】

参考文献

1. DeKosky, B. Decoding the Antibody Repertoire: High Throughput Sequencing of Multiple Transcripts from Single B Cells. (Springer, 2017).
2. Hunicke-Smith, S., Dekosky, B., Ellington, A. & Georgiou, G. High throughput sequencing of multiple transcripts of a single cell. (2015), US20150141261A1.
3. McDaniel, J. R., DeKosky, B. J., Tanno, H., Ellington, A. D. & Georgiou, G. Ultra-high-throughput sequencing of the immune receptor repertoire from millions of lymphocytes. *Nat Protoc* 11, 429–42 (2016). 10
4. DeKosky, B. J., Kojima, T., Rodin, A., Charab, W., Ippolito, G. C., Ellington, A. D. & Georgiou, G. In-depth determination and analysis of the human paired heavy- and light-chain antibody repertoire. *Nat Med* 21, 86–91 (2015).
5. Primer sets for cloning the human repertoire of T cell Receptor Variable regions Ilenia Boria doi: 10.1186/1471-2172-9-50 20
6. Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Brody, R. M. & Luzuriaga, K. Phenotypic and Functional Heterogeneity of EBV Epitope-Specific CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 168, 4184–4191 (2002).
7. Hislop, A. D. & Taylor, G. S. in *Epstein Barr Virus Volume 2* (ed. Münz, C.) 391, 325–353 (Springer International Publishing, 2015).
8. Ibsch, C., Saulquin, X., Gallot, G., Vivien, R., Ferrand, C., Tiberghien, P., Houssaint, E. & Vié, H. The TCR repertoire Selected *In vitro* Against EBV: Diversity, Specificity, and Improved Purification Through Early IL-2 Receptor α -Chain (CD25)-Positive Selection. *J. Immunol.* 164, 4924–4932 (2000). 30
9. *J Immunol* January 1, 2012, 188 (1) 311-321; DOI: doi.org/10.4049/jimmunol.1102686
10. Jones, K., Wockner, L., Brennan, R. M., Keane, C., Chattopadhyay, P. K., Roederer, M., Price, D. A., Cole, D. K., Hassan, B., Beck, K., Gottlieb, D., Ritchie, D. S., Seymour, J. F., Vari, F., Crooks, P., Burrows, S. R. & Gandhi, M. K. The impact of HLA class I and EBV latency-II antigen-specific CD8+ T cells on the pathogenesis of EBV+ Hodgkin lymphoma. *Clin. Exp. Immunol.* 183, 206–220 (2016). 40
11. *Science*. 1996 Oct 4;274(5284):94-6. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Altman JD1, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM.

12. Golding, A., Darko, S., Wylie, W. H., Douek, D. C. & Shevach, E. M. Deep sequencing of the TCRB repertoire of human Foxp3⁺ and Foxp3⁻ T cells suggests that they are completely distinct and non-overlapping. *Clin Exp Immunol* n/a-n/a (2016).

doi:10.1111/cei.12904

13. Lee, E. S., Thomas, P. G., Mold, J. E. & Yates, A. J. Identifying T Cell Receptors from High-Throughput Sequencing: Dealing with Promiscuity in TCR α and TCR β Pairing. *PLOS Computational Biology* 13, e1005313 (2017).

10

14. Poschke, I., Flossdorf, M. & Offringa, R. Next-generation TCR sequencing – a tool to understand T-cell infiltration in human cancers. *J. Pathol.* n/a-n/a (2016).

doi:10.1002/path.4800

15. Marrero, I., Aguilera, C., Hamm, D. E., Quinn, A. & Kumar, V. High-throughput sequencing reveals restricted TCR V β usage and public TCR β clonotypes among pancreatic lymph node memory CD4⁺ T cells and their involvement in autoimmune diabetes. *Molecular Immunology* 74, 82–95 (2016).

20

16. Lossius, A. *et al.* High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 3439–3452 (2014)

17. Sprouse, M. L. *et al.* Streamlined Single Cell TCR Isolation and Generation of Retroviral Vectors for *In vitro* and *In vivo* Expression of Human TCRs. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e55379–e55379 (2017). doi:10.3791/55379

18. Dash, P., Wang, G. C. & Thomas, P. G. Single-Cell Analysis of T-Cell Receptor $\alpha\beta$ Repertoire. in *Immunosenescence* (ed. Shaw, A. C.) 1343, 181–197 (Springer New York, 2015).

30

19. Guo, X. J. *et al.* Rapid cloning, expression, and functional characterization of paired $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-cell receptor chains from single-cell analysis. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 3, 15054 (2016).

20. JUNG, S. *et al.* Sleeping Beauty transposon system harboring HRAS, c-Myc and shp53 induces sarcomatoid carcinomas in mouse skin. *Oncol Rep* 29, 1293–1298 (2013).

40

21. Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G. & Deniz, G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell. Immunol.* 254, 149–154 (2009).

22. Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M. & Koup, R. A. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* 281, 65–78 (2003).

23. Haney, D., Quigley, M. F., Asher, T. E., Ambrozak, D. R., Gostick, E., Price, D. A., Douek, D. C. & Betts, M. R. Isolation of viable antigen-specific CD8⁺ T cells based on membrane-bound tumor necrosis factor (TNF)- α expression. *J. Immunol. Methods* 369, 33–41 (2011).

24. Brochet, X., Lefranc, M.-P. & Giudicelli, V. IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 36, W503–W508 (2008)

25. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461 (2010).

26. Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M. & Koup, R. A. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* 281, 65–78 (2003).

27. Haney, D., Quigley, M. F., Asher, T. E., Ambrozak, D. R., Gostick, E., Price, D. A., Douek, D. C. & Betts, M. R. Isolation of viable antigen-specific CD8⁺ T cells based on membrane-bound tumor necrosis factor (TNF)- α expression. *J. Immunol. Methods* 369, 33–41 (2011).

28. Chattopadhyay, P. K., Yu, J. & Roederer, M. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4⁺ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat. Med.* 11, 1113–1117 (2005).

29. Boswell, K. L., Paris, R., Boritz, E., Ambrozak, D., Yamamoto, T., Darko, S., Wloka, K., Wheatley, A., Narpala, S., McDermott, A., Roederer, M., Haubrich, R., Connors, M., Ake, J., Douek, D. C., Kim, J., Petrovas, C. & Koup, R. A. Loss of Circulating CD4 T Cells with B Cell Helper Function during Chronic HIV Infection. *PLoS Pathog* 10, e1003853 (2014)

30. Isolation of T-Cell Receptors Specifically Reactive with Mutated Tumor-Associated Antigens from Tumor-Infiltrating Lymphocytes Based on CD137 Expression Maria Parkhurst, Alena Gros, Anna Pasetto, Todd Prickett, Jessica S. Crystal, Paul Robbins and Steven A. Rosenberg

31. Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8⁺ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities Matthias Wolf¹, Jürgen Kuball¹, William Y. Ho¹, Hieu Nguyen¹, Thomas J. Manley¹, Marie Bleakley¹ and Philip D. Greenberg^{1,2}

32. CD137 Accurately Identifies and Enriches for Naturally Occurring Tumor-Reactive T Cells in Tumor Qunrui Ye, De-Gang Song, Mathilde Poussin, Tori Yamamoto, Andrew Best, Chunsheng Li, George Coukos and Daniel J. Powell Jr. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0945 Published January 2014

10

33. *Cell Immunol.* 2009;254(2):149-54. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.08.007. Epub 2008 Oct 5. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. Aktas E1, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G.

34. Cannons JL, Lau P, Ghumman B, *et al.* 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol.* 2001;167:1313–1324.]

20

35. Lee HW, Park SJ, Choi BK, Kim HH, Nam KO, Kwon BS. 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol.* 2002;169:4882–4888.

36. Ex vivo expansion protocol for human tumor specific T cells for adoptive T cell therapy. *Journal of Immunological Methods* Volume 355, Issues 1–2, 15 April 2010, Pages 52-60

37. *Am J Transplant.* 2004 Oct;4(10):1614-27 TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. Fu S¹, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS.

30

38. *Science.* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61. Epub 2003 Jan 9. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Hori S1, Nomura T, Sakaguchi S.

39. Wang, Y. *et al.* *J Am Soc Nephrol.* 2006 Mar;17(3):697-706.

40. Dons, E. *et al.* *Hum Immunol.* 2012 Apr; 73(4):328-34.

41. *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1070-8. doi: 10.1038/ni.3004. Epub 2014 Sep 28. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. Levine AG¹, Arvey A1, Jin W1, Rudensky AY2.

40

42. *Nat Immunol.* 2014 Nov;15(11):1070-8. doi: 10.1038/ni.3004. Epub 2014 Sep 28. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. Levine AG1, Arvey A1, Jin W1, Rudensky AY2.
43. Boyd, D., Florent, G., Kim, P. & Brattain, M. Determination of the Levels of Urokinase and Its Receptor in Human Colon Carcinoma Cell Lines. *Cancer Res.* 48, 3112–3116 (1988).
44. Lorz, A., Botesteanu, D.-A. & Levy, D. Universal response in the RKO colon cancer cell line to distinct antimitotic therapies. *Sci. Rep.* 8, 8979 (2018). 10
45. June, C. H., O'Connor, R. S., Kawalekar, O. U., Ghassemi, S. & Milone, M. C. CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* 359, 1361–1365 (2018).
46. Kebriaei, P. *et al.* Phase I trials using *Sleeping Beauty* to generate CD19-specific CAR T cells. *J. Clin. Invest.* 126, 3363–3376 (2016).
47. Levine, B. L., Miskin, J., Wonnacott, K. & Keir, C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 4, 92–101 (2017). 20
48. Wang, X. & Rivière, I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol. Ther. - Oncolytics* 3, 16015 (2016).
49. Single, A., Beetham, H., Telford, B. J., Guilford, P. & Chen, A. A Comparison of Real-Time and Endpoint Cell Viability Assays for Improved Synthetic Lethal Drug Validation. *J. Biomol. Screen.* 20, 1286–1293 (2015).
50. Kurtz, A. Mesenchymal Stem Cell Delivery Routes and Fate. *Int. J. Stem Cells* 1, 1–7 (2008). 30
51. Khodadoust, M. S. *et al.* Antigen presentation profiling reveals recognition of lymphoma immunoglobulin neoantigens. *Nature* 543, 723–727 (2017).
52. González, S., Volkova, N., Beer, P. & Gerstung, M. Immuno-oncology from the perspective of somatic evolution. *Semin. Cancer Biol.* (2017). doi:10.1016/j.semcancer.2017.12.001
53. J.RT3-T3.5 ATCC ® TIB-153™ Homo sapiens peripheral blood ac. Available at: <https://www.atcc.org/Products/All/TIB-153.aspx>. (Accessed: 3rd April 2017) 40
54. Al-Allaf, F. A., Tolmachov, O. E., Zambetti, L. P., Tchetchelnitski, V. & Mehmet, H. Remarkable stability of an instability-prone lentiviral vector plasmid in *Escherichia coli* Stbl3. *3 Biotech* 3, 61–70 (2013).

55. Descours, B. *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4⁺T-cells. *Retrovirology* 9, 87 (2012).
56. DeKosky, B. J. *et al.* High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. *Nat Biotech* 31, 166–169 (2013).
57. DeKosky, B. J. *et al.* In-depth determination and analysis of the human paired heavy- and light-chain antibody repertoire. *Nat. Med.* 21, 86–91 (2015).
58. McDaniel, J. R., DeKosky, B. J., Tanno, H., Ellington, A. D. & Georgiou, G. Ultra-high-throughput sequencing of the immune receptor repertoire from millions of lymphocytes. *Nat. Protoc.* 11, 429–42 (2016). 10
59. DeKosky, B. J. *et al.* Large-scale sequence and structural comparisons of human naïve and antigen-experienced antibody repertoires. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E2636–E2645 (2016).
60. Tian, M. *et al.* Induction of HIV Neutralizing Antibody Lineages in Mice with Diverse Precursor Repertoires. *Cell* 166, 1471–1484.e18 (2016). 20
61. Wang, B. *et al.* Functional interrogation and mining of natively paired human V_H:V_L antibody repertoires. *Nat. Biotechnol.* 36, 152–155 (2018).
62. Wu, L. C., Tuot, D. S., Lyons, D. S., Garcia, K. C. & Davis, M. M. Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide–MHC. *Nature* 418, 552–556 (2002).
63. Zhang, S.-Q. *et al.* Direct measurement of T cell receptor affinity and sequence from naïve antiviral T cells. *Sci. Transl. Med.* 8, 341ra77–341ra77 (2016).
64. Vargas, J. E. *et al.* Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. *J. Transl. Med.* 14, 288 (2016). 30
65. Cohen, C. J. *et al.* Enhanced Antitumor Activity of T Cells Engineered to Express T-Cell Receptors with a Second Disulfide Bond. *Cancer Res.* 67, 3898–3903 (2007).
66. Dudley,1, W. N., Wickham,2, R. & COOMBS,3, N. An Introduction to Survival Statistics: Kaplan-Meier Analysis. *J. Adv. Pract. Oncol.* 7, 91–100 (2016).
67. Birnbaum, M. E. *et al.* Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell* 157, 1073–1087 (2014). 40
68. Glanville, J. *et al.* Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature* advance online publication, (2017).

69. Han, A., Glanville, J., Hansmann, L. & Davis, M. M. Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level. *Nat. Biotechnol.* 32, 684–692 (2014).

70. Atkins, M. Clinical manifestations, evaluation, and staging of renal cell carcinoma. *UpToDate* 18, (2017).

71. Betts, M. R. *et al.* Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* 281, 65–78 (2003).

72. Aktas, E., Kucuksezer, U. C., Bilgic, S., Erten, G. & Deniz, G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell. Immunol.* 254, 149–154 (2009).

73. Haney, D. *et al.* Isolation of viable antigen-specific CD8⁺ T cells based on membrane-bound tumor necrosis factor (TNF)- α expression. *J. Immunol. Methods* 369, 33–41 (2011).

74. Roybal, K. T. *et al.* Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. *Cell* 164, 770–779 (2016).

【 0 2 5 4 】

等価物

本技術は、本技術の個々の局面の単一の例証として意図される、本出願に記載される特定の態様に関して限定されない。当業者に明らかであるように、本技術の多くの改変物および変形物を、その精神および範囲から逸脱することなく、作ることができる。本明細書において列挙されるものに加えて、本技術の範囲内の機能的に等価の方法および装置が、前述の説明から当業者に明らかであろう。そのような改変物および変形物は、添付の特許請求の範囲内に入るように意図される。本技術は、添付の特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の完全な範囲と共に、そのような特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。本技術は、特定の方法、試薬、化合物、組成物、または生物システムに限定されず、当然変動し得ることが、理解されるべきである。本明細書において用いられる用語法は、特定の態様を説明することを目的とするだけであり、限定的であるようには意図されないこともまた、理解されるべきである。

【 0 2 5 5 】

加えて、本開示の特徴または局面が、マーカッシュ群に関して説明される場合、開示がそれによって、マーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーの部分群に関して説明されることを、当業者は認識するであろう。

【 0 2 5 6 】

当業者によって理解されるであろうように、任意のおよびすべての目的で、特に書面の説明を提供することに関して、本明細書において開示されるすべての範囲は、その任意のおよびすべての可能な部分範囲および部分範囲の組み合わせも包含する。任意の列記される範囲は、十分に説明し、かつ同じ範囲を少なくとも同等の半分、三分の一、四分の一、五分之一、十分の一などに分けることを可能にするとして、容易に認識され得る。非限定的な例として、本明細書において議論される各範囲は、下位の三分の一、中間の三分の一、および上位の三分の一などに容易に分けることができる。当業者によってまた理解されるであろうように、「最大で」、「少なくとも」、「よりも大きい」、「よりも小さい」などのようなすべての言語は、列挙される数を含み、かつ上記で議論されるような部分範囲にその後分けることができる範囲を指す。最後に、当業者によって理解されるであろうように、範囲は、各個々のメンバーを含む。したがって、例えば、1～3つの細胞を有する群は、1つ、2つ、または3つの細胞を有する群を指す。同様に、1～5つの細胞を有する群

は、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの細胞を有する群を指す、などである。

【0257】

本明細書において言及されるかまたは引用されるすべての特許、特許出願、仮出願、および刊行物は、それらが本明細書の明確な教義と矛盾していない程度まで、すべての図および表を含んで、その全体が参照により組み入れられる。

【0258】

本技術は、以下の文字で記された段落において列挙される特徴および特徴の組み合わせを含んでもよいが、それらに限定されず、以下の段落は、本明細書に添付されるような特許請求の範囲を限定するとして、またはすべてのそのような特徴が、そのような特許請求の範囲に必ず含まれなければならないことを要求するとして解釈されるべきではないことが、理解されている。

【0259】

A. (a) ベクターバックボーン；ならびに

(b) (i) TCR α ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR β ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド；または

(ii) TCR γ ポリペプチドをコードする第1のポリヌクレオチド、およびTCR δ ポリペプチドをコードする第2のポリヌクレオチド

を含む、組換えT細胞受容体 (TCR) ライブラリーベクターであって、

第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、同族ペアであり、かつ第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、区画に存在する単一の溶解されたT細胞から単離されたmRNAに由来している、前記ベクター。

B. 前記単一の溶解されたT細胞のmRNAが、mRNA捕捉試薬または逆転写PCR (RT-PCR) を用いて単離される、パラグラフAのベクター。

C. 第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとが、任意でリンカーポリヌクレオチドを介して、機能的に連結され、かつ任意で、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとが、T細胞mRNAの逆転写およびPCR増幅によって機能的に連結されている、パラグラフAまたはBのベクター。

D. 第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、TCR遺伝子において天然に見出される標的制限エンドヌクレアーゼ部位での切断によって、ベクターバックボーン中にクローニングされている、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

E. 標的制限エンドヌクレアーゼ部位が、低頻度でTCR遺伝子中に存在している、パラグラフDのベクター。

F. 第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドが、表7または表8に記載される少なくとも1つの標的制限エンドヌクレアーゼ部位を組み込むように変更されている、パラグラフDまたはEのベクター。

G. 前記標的制限エンドヌクレアーゼ部位が、サイレント変異を含む、パラグラフD～Fのいずれか一つのベクター。

H. 前記mRNA捕捉試薬が、ポリ (dT) でコーティングされたビーズ、オリゴヌクレオチドでコーティングされたビーズ、ヒドロゲルビーズ、およびマイクロアレイウェルの表面上のプリントされたオリゴからなる群より選択される、パラグラフD～Gのいずれか一つのベクター。

I. 前記区画が、エマルジョン滴またはウェルである、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

J. 前記ウェルが、プリントされたポリマースライド、プラスチックプレート、マイクロタイタープレート、またはゲルに位置する、パラグラフIのベクター。

K. 前記区画が、5 nL以下の体積を有する、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

L. 第1のポリヌクレオチドおよび/または第2のポリヌクレオチドに機能的に連結された発現調節エレメントをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドをさらに含む、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

M. 前記発現調節エレメントが、プロモーター、p2A配列、およびIRES配列からなる群よ

10

20

30

40

50

り選択される、パラグラフLのベクター。

N. 前記プロモーターが、EF1 α プロモーターまたはCMVプロモーターである、パラグラフMのベクター。

O. 前記発現調節エレメントをコードするポリヌクレオチドが、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとの間に位置する、パラグラフL~Nのいずれか一つのベクター。

P. 環状化されている、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

Q. 前記発現調節エレメントのベクター中への組込みの前に環状化されている、パラグラフL~Pのいずれか一つのベクター。

R. 前記発現調節エレメントのベクター中への組込みの後に環状化されている、パラグラフL~Pのいずれか一つのベクター。

S. 前記発現調節エレメントが、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の近くに組み込まれている、パラグラフL~Rのいずれか一つのベクター。

T. 前記発現調節エレメントが、制限酵素またはTALENから選択されるDNA修飾酵素を用いて、ベクター中に組み込まれている、パラグラフL~Rのいずれか一つのベクター。

U. 第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つに連結されたトランスポゾンにコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドをさらに含む、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

V. 検出可能なマーカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

W. 選択可能なマーカーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

X. 第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの発現および/または活性化を調節するためのスイッチ機構をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

Y. Kozakコンセンサス配列またはエンハンサーをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

Z. 前記ベクターバックボーンが、レトロウイルスベクターバックボーン、レンチウイルスベクターバックボーン、アデノウイルスベクターバックボーン、およびアデノ随伴ウイルスベクターバックボーンからなる群より選択される、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

AA. 標的細胞または疾患抗原に対する結合特異性を有するTCRをコードする、前記パラグラフのいずれか一つのベクター。

BB. 前記標的細胞が、がん細胞またはウイルスに感染した細胞であり、任意で、該標的細胞が対象から単離された、パラグラフAAのベクター。

CC. 前記疾患抗原が、ウイルス抗原または腫瘍抗原であり、任意で、該抗原が抗原:MHC複合体中にロードされる、パラグラフAAのベクター。

DD. 前記疾患抗原が、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である、パラグラフCCのベクター。

EE. 前記疾患抗原が、CD45、グリピカン-3、IGF2B3、カリクレイン4、KIF20A、レングシ

10

20

30

40

50

ン、メロエ、ムチン5AC (MUC5AC)、サバイビン、サイクリン-A1、MAGE-A1、MAGE-C1、MAGE-C2、SSX2、XAGE 1b/GAGED2A、CD19、CD20、CD22、CD52、上皮成長因子受容体 (EGFR)、ヒト上皮成長因子受容体2 (HER2)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10a (TRAILR1)、核内因子κB活性化受容体リガンド (RANKL)、インスリン様増殖因子1受容体 (IGF1R)、上皮細胞接着分子 (EpCAM)、およびがん胎児性抗原 (CEA) からなる群より選択される腫瘍抗原である、パラグラフCCのベクター。

FF. 前記パラグラフのいずれか一つのベクターを含む、組換え細胞であって、任意で、細菌細胞、哺乳動物細胞、または酵母細胞である、前記組換え細胞。

GG. パラグラフA~EEのいずれか一つの複数のベクターを含む、組換えTCRベクターライブラリー。

10

HH. 前記複数のベクターが、TCRレパートリーを含む、パラグラフGGの組換えTCRベクターライブラリー。

II. 前記複数のベクターにおける各ベクターが、TCRクローン優勢度、インビトロアッセイ由来のTCR濃縮特性、TCR結合特異性、TCR Vセグメント配列、TCR Dセグメント配列、TCR Jセグメント配列、TCR遺伝子モチーフ、および/またはCDR3遺伝子モチーフのうちの1つまたは複数の特性に基づいて選択されている、パラグラフGGまたはHHの組換えTCRベクターライブラリー。

JJ. 第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドの核酸シーケンシングによって特徴決定されている、パラグラフGG~IIのいずれか一つの組換えTCRベクターライブラリー。

20

KK. パラグラフA~EEのいずれか一つのベクターを含む、単離された免疫細胞。

LL. 造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはナチュラルキラー (NK) 細胞である、パラグラフKKの単離された免疫細胞。

MM. パラグラフA~EEのいずれか一つのベクターまたはパラグラフGG~JJのいずれか一つのベクターライブラリーを含む、細胞集団。

NN. 造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、および/またはNK細胞を含む、パラグラフMMの細胞集団。

OO. パラグラフGG~JJのいずれか一つのベクターライブラリーで、細胞の集団を形質転換する工程を含む、組換えTCRライブラリーを調製するための方法。

PP. 前記細胞が、造血幹細胞、造血前駆細胞、T細胞、またはNK細胞である、パラグラフOOの方法。

30

QQ. 標的細胞に対する特異的結合についてライブラリーをスクリーニングする工程をさらに含む、パラグラフOOまたはPPの方法。

RR. 前記標的細胞が、がん細胞またはウイルスに感染した細胞であり、任意で、該細胞が対象から単離された、パラグラフQQの方法。

SS. 抗原:MHC複合体に対する特異的結合についてライブラリーをスクリーニングする工程をさらに含む、パラグラフOOまたはPPの方法。

TT. 前記抗原:MHC複合体の抗原が、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス (EBV)、エンテロウイルス71 (EV71)、エボラウイルス、A型肝炎 (HAV)、B型肝炎 (HBV)、サイトメガロウイルス (CMV)、C型肝炎 (HCV)、D型肝炎 (HDV)、E型肝炎 (HEV)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、単純ヘルペスウイルス (HSV)、ヒトTリンパ球向性ウイルス (HTLV)、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎 (TBEV)、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス (TEV)、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスに由来するウイルス抗原である、パラグラフSSの方法。

40

UU. 前記抗原:MHC複合体の抗原が、CD45、グリピカン-3、IGF2B3、カリクレイン4、KIF2

50

0A、レングシン、メロエ、ムチン5AC (MUC5AC)、サバイビン、サイクリン-A1、MAGE-A1、MAGE-C1、MAGE-C2、SSX2、XAGE1b/GAGED2A、CD19、CD20、CD22、CD52、EGFR、HER2、TRAILR1、RANKL、IGF1R、EpCAM、およびCEAからなる群より選択される腫瘍抗原である、パラグラフSSの方法。

VV. T細胞表現型マーカーについてライブラリーをスクリーニングする工程をさらに含む、パラグラフ00~UUのいずれか一つの方法。

WW. 共培養系における活性についてライブラリーをスクリーニングする工程であって、該共培養系が、

- (a) がん細胞株；
- (b) 公知のウイルスに感染した複数の細胞；
- (c) がん患者から単離された複数の腫瘍細胞；
- (d) 不死化細胞株；または
- (e) 患者組織生検に由来する複数の細胞

10

のうちの少なくとも1つを含む、工程

をさらに含む、パラグラフ00~VVのいずれか一つの方法。

XX. 形質転換された細胞の集団のインビトロ活性化をさらに含む、パラグラフ00~WWのいずれか一つの方法。

YY. 前記インビトロ活性化が、抗CD3抗体、抗CD8抗体、抗CD27抗体、IL-2、IL-4、IL-21、抗PD1抗体、抗CTLA4抗体、腫瘍細胞溶解物、ウイルス感染細胞との細胞共培養、および腫瘍細胞株のうちの1つまたは複数の刺激物質を用いて行われる、パラグラフXXの方法。

20

ZZ. 転写因子をコードするポリヌクレオチドで、細胞の集団を形質転換する工程をさらに含む、パラグラフ00~YYのいずれか一つの方法。

AAA. 前記転写因子が、FOXP3、BLIMP-1、Ikaros、Helios、およびTGF- β からなる群より選択される、パラグラフZZの方法。

BBB. TCRクローン優勢度、インビトロアッセイ由来のTCR濃縮特性、TCR結合特異性、TCR Vセグメント配列、TCR Dセグメント配列、TCR Jセグメント配列、TCR遺伝子モチーフ、および/またはCDR3遺伝子モチーフのうちの1つまたは複数の特性に基づいて、組換えTCRライブラリーに含めるために個々のベクターを選択する工程をさらに含む、パラグラフ00~AAAのいずれか一つの方法。

CCC. 前記選択が、合成に由来するTCRライブラリーを生成するために、定義された比で個々のベクターを混合することを含む、パラグラフBBBの方法。

30

DDD. パラグラフ00~CCCのいずれか一つの方法によって調製された、組換えTCRライブラリー。

EEE. パラグラフDDDの組換えTCRライブラリーと担体とを含む、組成物。

FFF. 前記担体が、薬学的に許容される担体である、パラグラフEEEの組成物。

GGG. 対象に対するパラグラフDDDの組換えTCRライブラリーまたはパラグラフEEEもしくはFFFの組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、処置の必要がある対象を処置する方法。

HHH. 対象に対するパラグラフDDDの組換えTCRライブラリーまたはパラグラフEEEもしくはFFFの組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、がんの処置の必要がある対象においてがんを処置する方法。

40

III. 前記がんが、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)；急性骨髄性白血病 (AML)；副腎皮質癌；AIDS関連がん；肛門がん；虫垂がん；星状細胞腫；非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍、脳腫瘍；皮膚の基底細胞癌；胆管がん；膀胱がん；骨がん；乳がん；気管支腫瘍；パーキットリンパ腫；カルチノイド腫瘍 (胃腸)；胚細胞腫瘍；原発性CNSリンパ腫；子宮頸がん；胆管細胞癌；脊索腫；慢性リンパ球性白血病 (CLL)；慢性骨髄性白血病 (CML)；慢性骨髄増殖性新生物；大腸がん；頭蓋咽頭腫；皮膚T細胞リンパ腫；非浸潤性乳管癌 (DCIS)；子宮内膜がん；上衣腫；食道がん；感覚神経芽腫；頭蓋外胚細胞腫瘍；性腺外胚細胞腫瘍；眼がん；眼球内黒色腫；網膜芽腫；卵管がん；悪性の骨の線維性組織球腫、および骨肉腫；胆嚢がん；胃 (gastric) がん；消化管カルチノイド腫瘍；消化管間質腫

50

瘍（GIST）；胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛性疾患；毛様細胞白血病；頭頸部がん；心臓腫瘍；肝細胞がん；ランゲルハンス細胞組織球症；ホジキンリンパ腫；下咽頭がん；眼球内黒色腫；膵島細胞腫瘍、膵神経内分泌腫瘍；腎臓がん；喉頭がん；白血病；口唇および口腔（oral cavity）がん；肝臓がん；肺がん；リンパ腫；男性乳がん；骨の悪性線維性組織球腫および骨肉腫；黒色腫；メルケル細胞癌；中皮腫；転移性がん；口腔（mouth）がん；多発性内分泌腫瘍症候群；多発性骨髄腫/形質細胞新生物；菌状息肉腫；慢性の骨髄異形成症候群、骨髄増殖性新生物；鼻咽頭がん；神経芽腫；非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌がん；口腔（oral）がん、口咽頭がん；骨肉腫；卵巣がん；膵臓がん；膵神経内分泌腫瘍；乳頭腫症；傍神経節腫；副鼻腔がん；副甲状腺がん；咽頭がん；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；胸膜肺芽腫；前立腺がん；直腸がん；再発がん；腎細胞がん；網膜芽腫；横紋筋肉腫；唾液腺がん；肉腫；ユーイング肉腫；カボジ肉腫；骨肉腫；子宮肉腫；セザリー症候群；皮膚がん；小細胞肺癌がん；小腸がん；軟部組織肉腫；皮膚の扁平上皮癌；頸部扁平上皮がん；胃（stomach）がん；T細胞リンパ腫；精巣がん；咽喉がん；鼻咽頭がん；下咽頭がん；胸腺癌；甲状腺がん；尿道がん；子宮がん；陰がん；血管腫瘍；外陰部がん；またはウィルムス腫瘍である、パラグラフHHHの方法。

JJJ. 対象に対するパラグラフDDDの組換えTCRライブラリーまたはパラグラフEEEもしくはFFFの組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、腫瘍成長の阻害の必要がある対象において腫瘍成長を阻害する方法。

KKK. 前記腫瘍が固形腫瘍である、パラグラフJJJの方法。

LLL. 対象に対するパラグラフDDDの組換えTCRライブラリーまたはパラグラフEEEもしくはFFFの組成物の有効量を、対象に投与する工程を含む、ウイルス感染症の処置の必要がある対象においてウイルス感染症を処置する方法。

MMM. 前記ウイルス感染症が、アデノウイルス、CMV、コロナウイルス、コクサッキーウイルス、デングウイルス、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、エンテロウイルス71（EV71）、エボラウイルス、A型肝炎（HAV）、B型肝炎（HBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、C型肝炎（HCV）、D型肝炎（HDV）、E型肝炎（HEV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトTリンパ球向性ウイルス（HTLV）、A型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、日本脳炎、白血病ウイルス、麻疹ウイルス、伝染性軟属腫、オルフウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、風疹ウイルス、ロタウイルス、ダニ媒介性脳炎（TBEV）、サル免疫不全ウイルス、タバコエッチウイルス（TEV）、水痘帯状疱疹ウイルス、疱疹、西ナイルウイルス、ジカウイルス、およびチクングニアウイルスからなる群より選択されるウイルスによって引き起こされる、パラグラフLLLの方法。

NNN. パラグラフDDDの組換えTCRライブラリーまたはパラグラフEEEもしくはFFFの組成物の第2の用量を、対象に投与する工程をさらに含む、パラグラフGGG～MMMのいずれか一つの方法。

OOO. 前記組換えTCRライブラリーが、処置される対象にとって自己由来または同種異系である細胞を含む、パラグラフGGG～NNNのいずれか一つの方法。

PPP. 前記対象が、ヒト、動物、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ヒツジ、マウス、ウマ、またはウシである、パラグラフGGG～OOOのいずれか一つの方法。

QQQ. 前記対象がヒトである、パラグラフPPPの方法。

【0260】

他の態様を、添付の特許請求の範囲に示す。

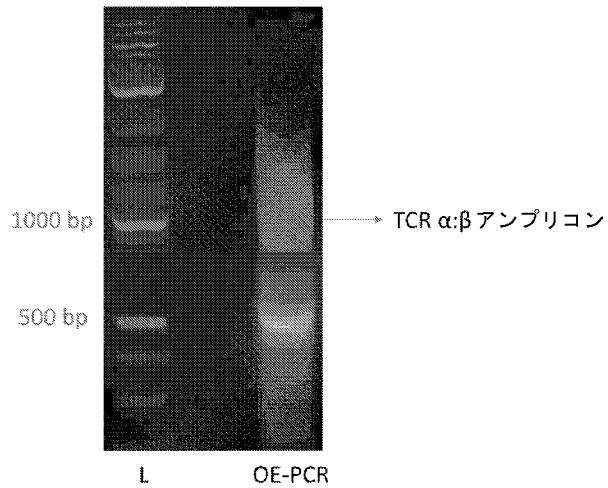
10

20

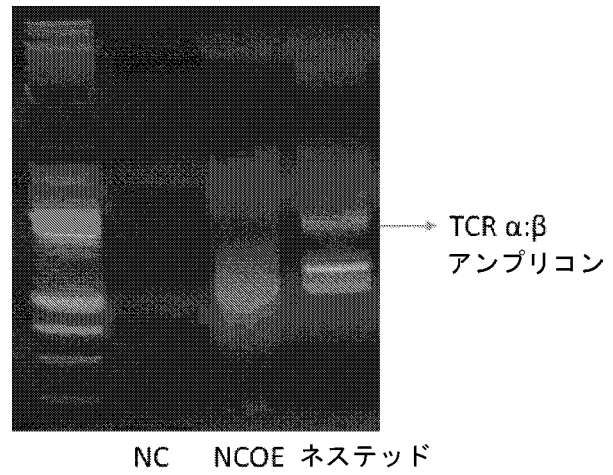
30

40

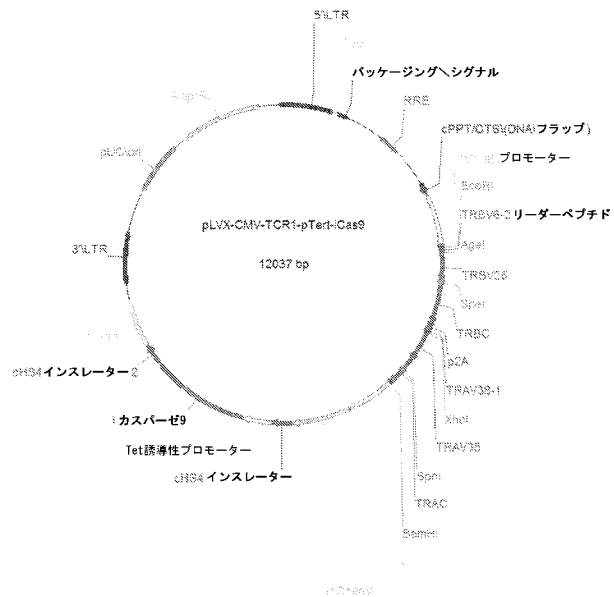
【図 1】



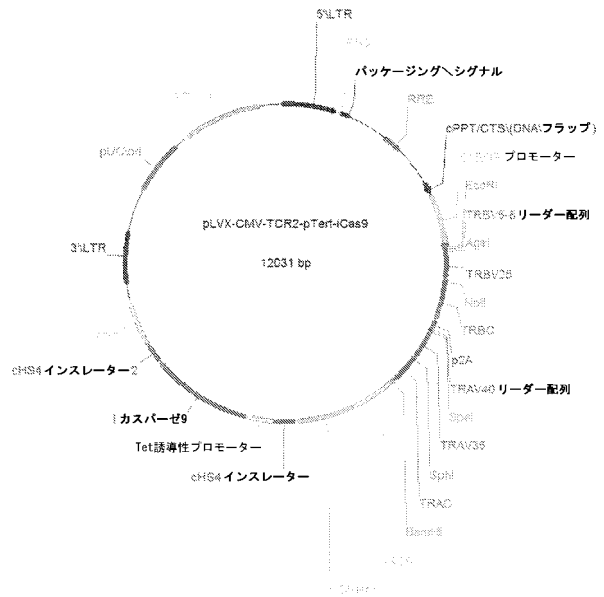
【図 2】



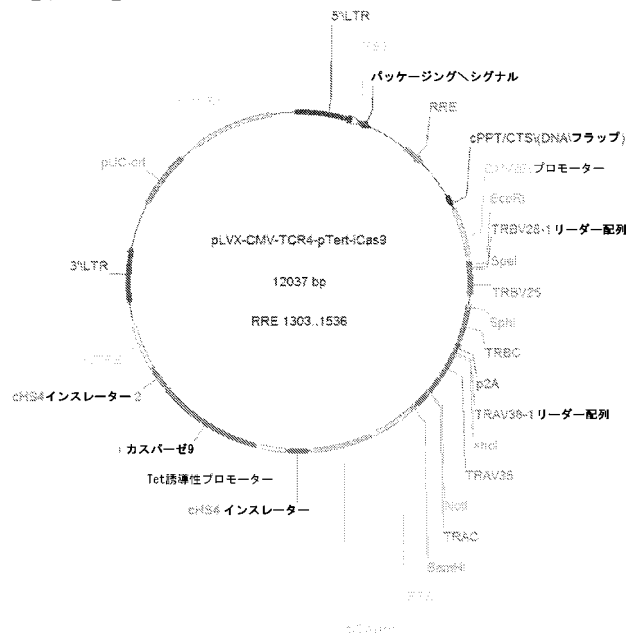
【図 3】



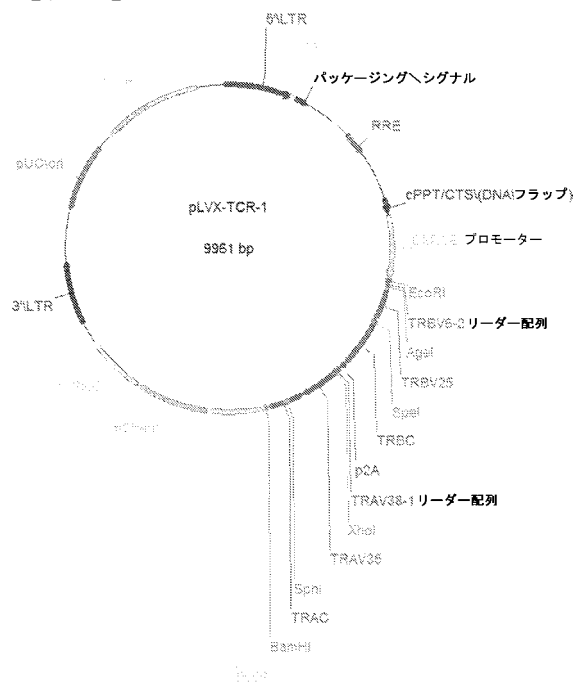
【図 4】



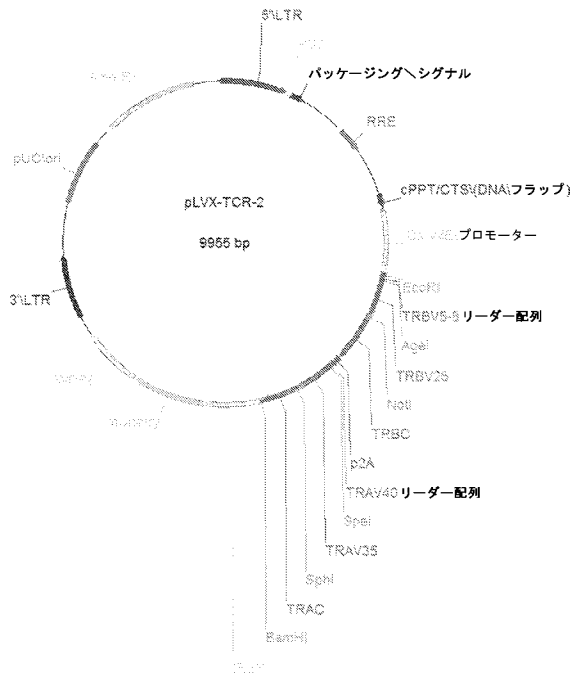
【 図 6 】



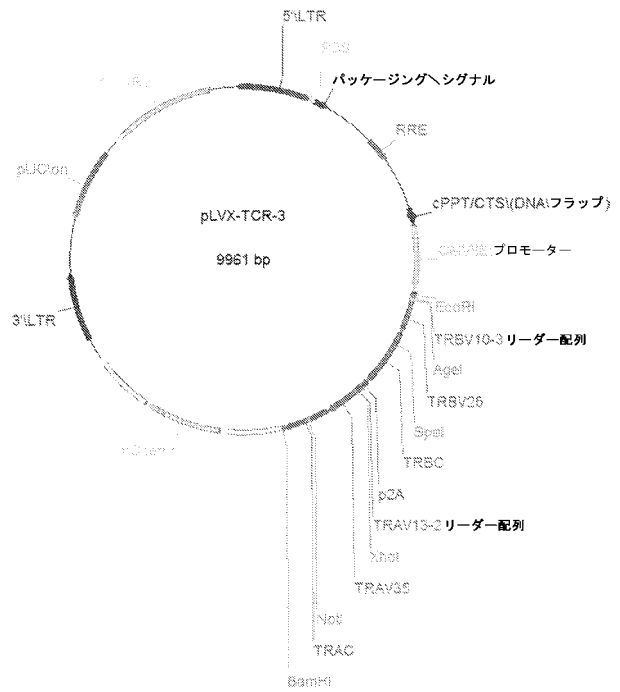
【图 8】



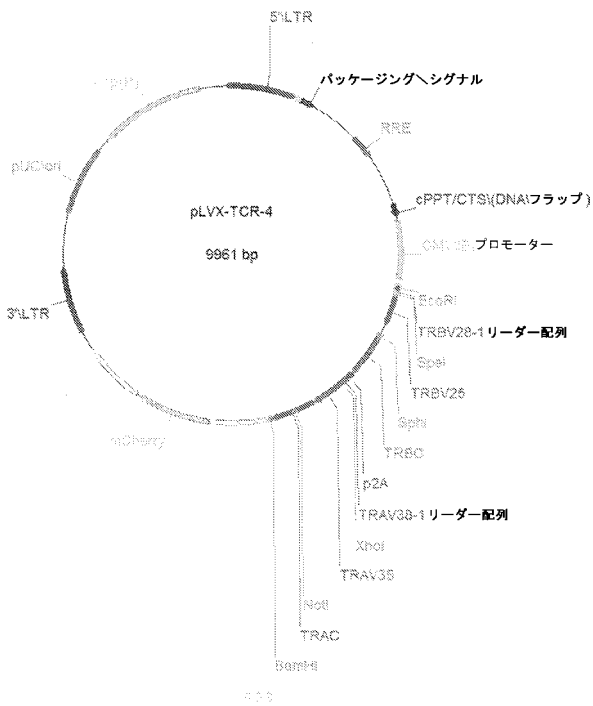
【図 9】



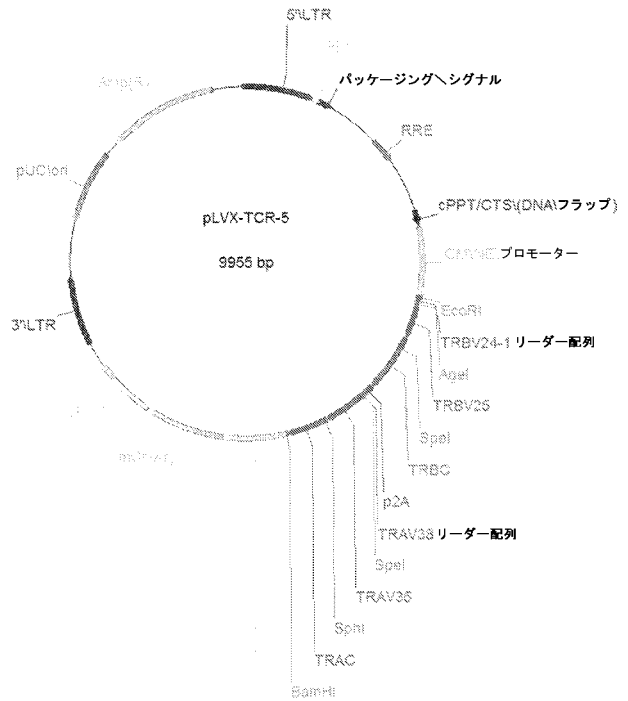
【図 10】



【図 11】



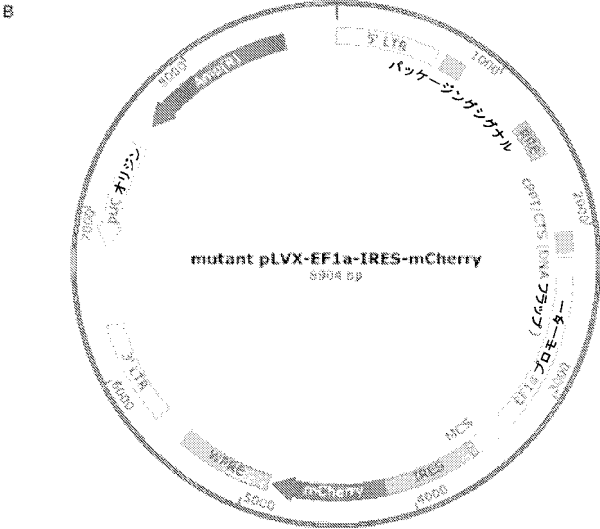
【図 12】



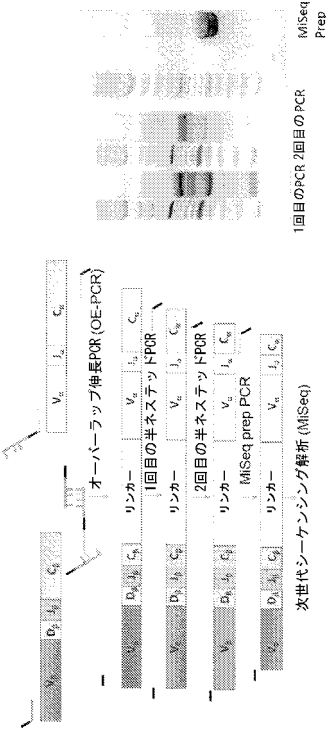
【図 13】



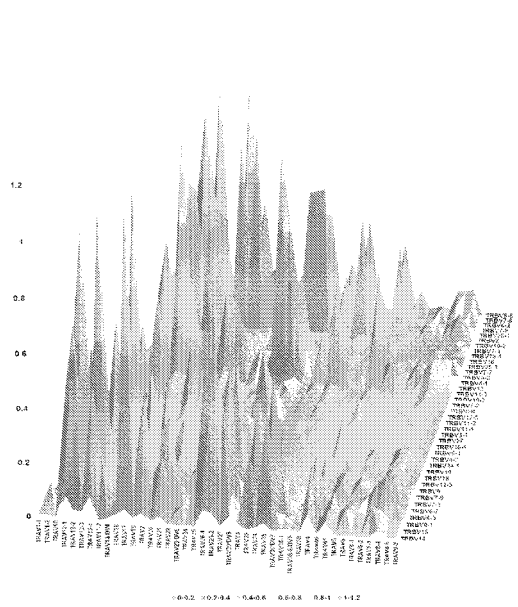
【図 14】



【図 15】



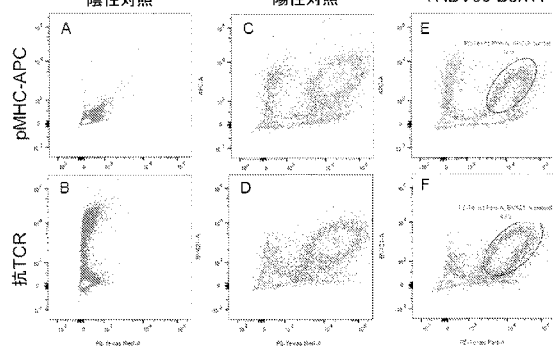
【図 16】



JRT3/CD8
陰性对照

野生型抗HIV
陽性对照

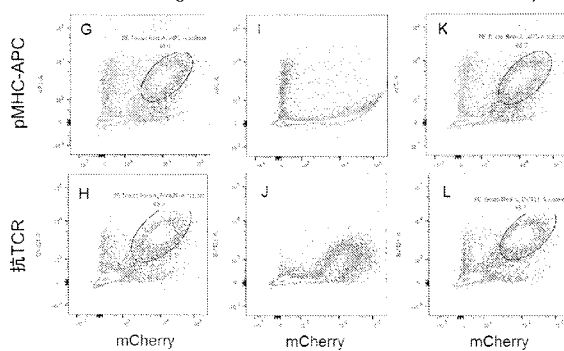
TRBV30 BsiWI



TRBV24-1

TRAV17-1 NheI

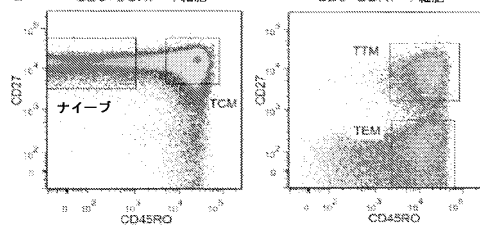
TRAV40-1 Spel



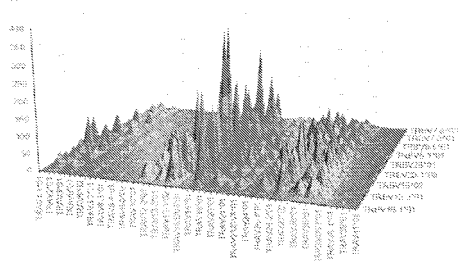
3

CD3+CCR7+ T細胞

CD3+CCR7- T細胞



9

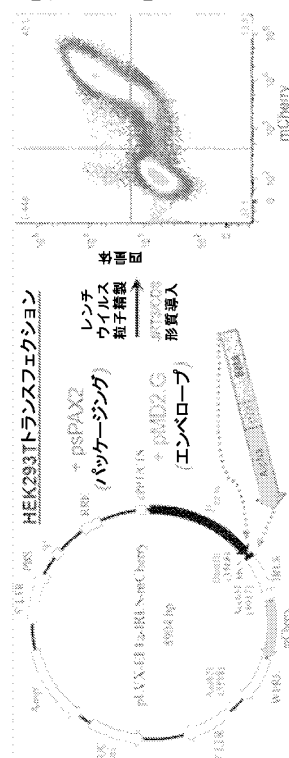
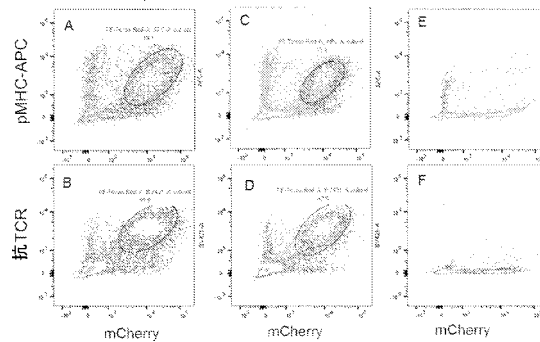


TRBC Spel

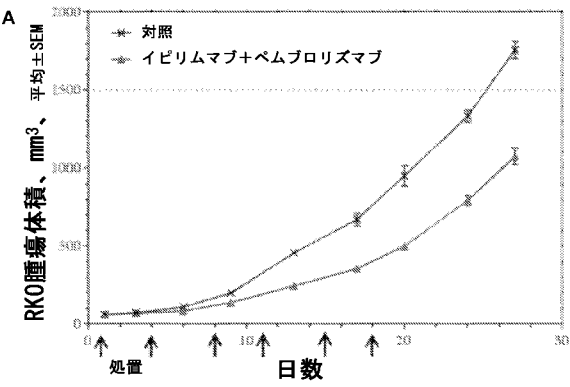
TRBC Spel

TRBCV30A

TRBCP9L



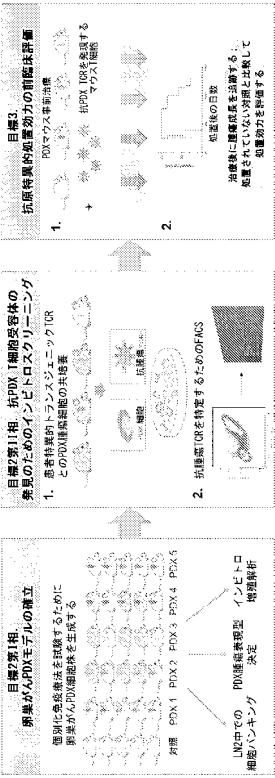
【図 2 1】



B マウス結腸がんモデル
における処置群

群	抗RKO T細胞、i. v.	リンパ 球枯渴
1	対照	なし
2	10 ⁷	なし
3	10 ⁸	なし
4	対照	あり
5	10 ⁷	あり
6	10 ⁸	あり

【図 2 2】



【配列表】

2021516049000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 19/19754
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/725, C12N 15/10, C07K 14/47, C07K 14/00, C12N 5/0783, C12N 15/85 (2019.01) CPC - C07K 14/7051, C12N 15/1037, C12N 15/1041, C07K 2317/56, C07K 14/4705, C07K 14/00, C12N 5/0636, C12N 2510/00, C12N 5/0638, C12N 5/0637, C12N 15/85		
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.
Y	US 2017/0051036 A1 (IMMUNOCORE LIMITED et al.,) 23 February 2017 (23.02.2017) Claim 1; Claim 6; Claim 14; Claim 28; para [0012]; para [0036]; para [0077]; para [0088]; para [0131]; para [0161]; para [0168]; para [0171]; para [0189]	1-38
Y	KIM et al., Analysis of the Paired TCR .alpha.- and .beta.-chains of Single Human T Cells, PLoS ONE, 2012, Vol. 7, No.5, page e37338 (pp 1-12). Abstract; p1, col 2, para 2; p2, col 1, para 3; p10, col 2, para 2; p11, col 1, para 3	1-38
Y	US 2011/0217736 A1 (HINDSON) 8 September 2011 (8.09.2011) Abstrct; para [0029]	11, (32-38)/11
Y	US 2016/0046700 A1 (BELLICUM PHARMACEUTICALS, INC.) 18 February 2016 (18.02.2016) Claim 11; Claim 13; para [0102]; para [0207]; para [0261]; para [0264]	12-15, 17-20, 24, (32-38)/(12-15, 17-20, 24)
Y	WO 2017/023801 A1 (UNIV MINNESOTA et al.,) 9 February 2017 (9.02.2017) para [0003]; para [0039]	19, 21, (32-38)/(19, 21)
☒ 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 "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 3 May 2019		Date of mailing of the international search report 17 MAY 2019
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: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

International application No.
PCT/US 19/19754

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/201394 A1 (MILTENYI BIOTEC TECH INC) 15 December 2016 (15.12.2016) p20, para 2	30-31, (32-38)/(30-31)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/19754

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.: 39-69
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:

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.:

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.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/864	(2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/34	(2006.01)	C 1 2 N	15/34		
C 1 2 N	15/40	(2006.01)	C 1 2 N	15/40		
C 1 2 N	15/50	(2006.01)	C 1 2 N	15/50		
C 1 2 N	15/49	(2006.01)	C 1 2 N	15/49		
C 1 2 N	15/51	(2006.01)	C 1 2 N	15/51		
C 1 2 N	15/38	(2006.01)	C 1 2 N	15/38		
C 1 2 N	15/44	(2006.01)	C 1 2 N	15/44		
C 1 2 N	15/41	(2006.01)	C 1 2 N	15/41		
C 1 2 N	15/37	(2006.01)	C 1 2 N	15/37		
C 1 2 N	15/48	(2006.01)	C 1 2 N	15/48		
C 1 2 N	15/45	(2006.01)	C 1 2 N	15/45		
C 1 2 N	15/39	(2006.01)	C 1 2 N	15/39		
C 1 2 N	15/35	(2006.01)	C 1 2 N	15/35		
C 1 2 N	15/46	(2006.01)	C 1 2 N	15/46		
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/071		
C 4 0 B	40/08	(2006.01)	C 4 0 B	40/08		
C 1 2 N	5/0789	(2010.01)	C 1 2 N	5/0789		
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12		
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14		
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P	31/22		
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18		
A 6 1 P	31/20	(2006.01)	A 6 1 P	31/20		
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	1 7 1	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		T
A 6 1 K	9/107	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		U
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	38/19	(2006.01)	A 6 1 K	9/107		
			A 6 1 K	35/17		Z
			A 6 1 K	38/19		

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 デコスキー ブランドン
アメリカ合衆国 6 6 0 4 5 カンザス州 ローレンス ジェイホーク ブールバード 1 4 5 0
ストロング ホール 2 4 5 ユニバーシティ オブ カンザス内

(72)発明者 チャン チェンユー
アメリカ合衆国 6 6 0 4 7 カンザス州 ローレンス クリントン パークウェイ 5 0 0 0
アパートメント 1 3 0 4

F ターム(参考) 4B063 QA08 QQ08 QQ13 QQ42 QQ79 QR32 QR40 QR77 QS32 QS33
QS38 QX01
4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C076 AA17 AA95 BB11 CC27 CC35
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 DA01 DA27 MA02 MA66 NA05
NA14 ZB02 ZB05 ZB09 ZB21 ZB22 ZB26 ZB33 ZC02 ZC41
ZC61
4C085 AA14 BB01 BB18 CC08 CC21 DD62 EE01
4C087 AA01 AA02 AA03 AA04 BB37 DA20 MA02 MA66 NA05 NA14
ZB02 ZB05 ZB09 ZB26 ZB33 ZC02 ZC41 ZC75