

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6815400号
(P6815400)

(45) 発行日 令和3年1月20日(2021.1.20)

(24) 登録日 令和2年12月24日(2020.12.24)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 12 N 1/00	(2006.01)	C 12 N	1/00
C 12 N 5/0783	(2010.01)	C 12 N	5/0783
A 61 K 35/17	(2015.01)	A 61 K	35/17
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P	35/00
C 07 K 7/08	(2006.01)	C 07 K	7/08
			Z N A

請求項の数 14 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-527008 (P2018-527008)	(73) 特許権者	518046705 ハーエス ダイアグノミクス ゲーエムペ ーハー
(86) (22) 出願日	平成28年8月10日 (2016.8.10)		ドイツ国 ベルリン 12165 ヴラン ゲルストラッセ 11-12
(65) 公表番号	特表2018-525034 (P2018-525034A)	(74) 代理人	100149032 弁理士 森本 敏明
(43) 公表日	平成30年9月6日 (2018.9.6)	(72) 発明者	ハンマー, ルドルフ ドイツ国 ゾルンハイム 55270 コ ンラート-アデナウアー ストラッセ 2
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/069041	(72) 発明者	ヘニッヒ, ステファン ドイツ国 ベルリン 10961 シュラ イアーマッハーストラッセ 14
(87) 國際公開番号	W02017/025564		
(87) 國際公開日	平成29年2月16日 (2017.2.16)		
審査請求日	令和1年8月9日 (2019.8.9)		
(31) 優先権主張番号	15180383.0		
(32) 優先日	平成27年8月10日 (2015.8.10)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	15202419.6		
(32) 優先日	平成27年12月23日 (2015.12.23)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)		
		審査官	長谷川 強

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】腫瘍特異的T細胞を提供するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

腫瘍特異的T細胞調製物を提供するための方法であって、以下の工程：

a 腫瘍特異的T細胞受容体の核酸配列又はアミノ酸配列を以下により選択する工程：

- 患者から得られた腫瘍試料を提供する工程；
- 該腫瘍試料から核酸を抽出して核酸抽出物を得る核酸抽出工程；
- 該核酸抽出物から複数のT細胞受容体核酸配列を得る工程又は該複数のT細胞受容体核酸配列によってコードされる複数のT細胞受容体アミノ酸配列を得る工程；
- 前記複数のT細胞受容体核酸配列から腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を選択する工程、又は前記複数のT細胞受容体アミノ酸配列から腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列を選択する配列選択工程；

b 腫瘍特異的T細胞クローンを以下により選別する工程：

- 前記患者から得られたリンパ球調製物を提供する工程；
- 前記選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列又は前記選択された腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列を含む細胞を前記リンパ球調製物から単離する単離工程を含む、腫瘍特異的T細胞調製物を提供するための方法。

【請求項2】

前記単離工程は、以下の工程：

- 前記リンパ球調製物を、前記選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列又は前記選択されたT細胞受容体アミノ酸配列に対応するT細胞受容体のVセグメント内に含まれ

10

20

るアミノ酸配列に特異的に結合することができる反応性リガンドと、接触させる工程であって、前記リガンドが検出可能な標識に結合し、及び前記リガンドは、10⁻⁷ mol / 1 以下の解離定数で前記アミノ酸配列に結合する工程、及び

- 前記リンパ球調製物から、前記検出可能な標識を有するT細胞を単離する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記単離工程は、以下の工程：

- 前記リンパ球調製物を、前記選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブと接触させる工程であって、前記核酸プローブが検出可能な標識に結合する工程、

10

- 前記リンパ球調製物から、前記検出可能な標識を有するT細胞を単離する工程を含み、又は

前記単離工程は、以下の工程：

- 前記リンパ球調製物を複数の画分に分離する、分離工程、
- 前記複数の画分に含まれる細胞を細胞培養条件下で増殖させる、増殖工程、及び
- 前記選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列又は選択された腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列を含む前記複数の画分の少なくとも1つの画分が選択される、画分選択工程

を含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

20

前記画分選択工程は、以下の工程：

- 前記複数の画分を、前記選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブと接触させ、ここで前記核酸プローブが検出可能な標識に結合しており、かつ前記選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含む画分を同定する工程、又は

- 前記複数の画分からT細胞受容体核酸配列を得て、及び前記選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含む画分を同定する工程

を含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記配列選択工程は、以下の工程：

30

- 前記複数のT細胞受容体核酸配列又は前記複数のT細胞受容体アミノ酸配列を整列させる工程；

- 前記複数のT細胞受容体核酸配列に含まれるT細胞受容体核酸配列、前記複数のT細胞受容体アミノ酸配列に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列を、複数の腫瘍試料クローン型に分類する工程であって、ここで、特定のクローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列又はT細胞受容体アミノ酸配列は、同一の配列、又は1つの位置の塩基が異なる核酸配列又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を表す工程；

- 各クローン型に関連するT細胞受容体核酸配列の数を決定し、又は各クローン型に関連するT細胞受容体アミノ酸配列の数を決定し、それにより前記クローン型の各々についてクローン型頻度を取得する工程；

40

- 前記複数の腫瘍試料クローン型から腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで前記腫瘍特異的クローン型は、前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの1つである、及び/又は前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である工程、及び

- 前記選択された腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列

50

のうちの 1 つの T 細胞受容体核酸配列を、前記腫瘍特異的受容体核酸配列として選択する工程、又は前記選択された腫瘍特異的クローニング型に含まれる前記複数の T 細胞受容体アミノ酸配列のうちの 1 つの T 細胞受容体アミノ酸配列を、前記腫瘍特異的アミノ酸配列として選択する工程

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項を含む方法。

【請求項 6】

更に以下の工程 :

- 前記患者から得られた非腫瘍試料を提供する工程 ;
- 前記非腫瘍試料から核酸を抽出して核酸抽出物を得る核酸抽出工程 ;
- 前記核酸抽出物から複数の T 細胞受容体核酸配列を得て、又は該 T 細胞受容体核酸配列によってコードされる複数の T 細胞受容体アミノ酸配列を得て、複数の非腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列又は複数の非腫瘍特異的 T 細胞受容体アミノ酸配列を取得する工程 ;

- 前記複数の非腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列又は前記複数の非腫瘍特異的 T 紵胞受容体アミノ酸配列を整列させる工程 ;

- 前記複数の非腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列又は前記複数の非腫瘍特異的 T 細胞受容体アミノ酸配列に含まれる T 細胞受容体核酸配列を、複数の非腫瘍特異的クローニング型に分類する工程であって、ここで、特定のクローニング型に含まれる T 細胞受容体核酸配列又は T 細胞受容体アミノ酸配列は、同一の配列、又は 1 つの位置の塩基が異なる核酸配列又は 1 つ若しくは 2 つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を表す工程、

- 前記複数の腫瘍試料クローニング型から腫瘍特異的クローニング型を選択する工程であって、ここで、

・ 前記腫瘍特異的クローニング型は、該複数の腫瘍試料クローニング型のうちの頻度が最高のものから上位 100 個のクローニング型のうちの 1 つであるか、又は該複数の腫瘍試料クローニング型の中の別のクローニング型であって、これは、前記複数の腫瘍試料クローニング型のうちの頻度が最高のものから上位 100 個のクローニング型のうちの前記 1 つの腫瘍特異的クローニング型に含まれる前記複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの 1 つの T 細胞受容体核酸配列によりコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一又は 1 つ若しくは 2 つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列である T 細胞受容体アミノ酸配列を含む、前記複数の腫瘍試料クローニング型の中の別のクローニング型である、及び

・ 前記複数の腫瘍試料クローニング型のうちの頻度が最高のものから上位 100 個のクローニング型のうちの前記 1 つの腫瘍特異的クローニング型は、前記非腫瘍試料中には存在しないか、又は前記腫瘍特異的クローニング型の頻度の 20% 以下の頻度を示す非腫瘍特異的クローニング型に割り当てることができる、工程

を含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

更に以下の工程 :

- 前記患者から得られた血液試料を提供する工程 ;
- 該血液試料から核酸を抽出して核酸抽出物を得る核酸抽出工程 ;
- 該核酸抽出物から複数の T 細胞受容体核酸配列、又は該複数の T 細胞受容体核酸配列によってコードされる複数の T 細胞受容体アミノ酸配列を得る工程 ;

- 該複数の T 細胞受容体核酸配列又は該複数の T 細胞受容体アミノ酸配列を整列させる工程 ;

- 該複数の T 細胞受容体核酸配列に含まれる T 細胞受容体核酸配列又は T 細胞受容体アミノ酸配列を、複数の血液試料クローニング型に分類する工程であって、ここで特定のクローニング型内に含まれる T 細胞受容体核酸配列又は T 細胞受容体アミノ酸配列は同一の配列、又は 1 つの位置の塩基が異なる核酸配列又は 1 つ若しくは 2 つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を表す工程 ;

- 前記複数の腫瘍試料クローニング型から腫瘍特異的クローニング型を選択する工程であって、ここで、

10

20

30

40

50

・ 前記腫瘍特異的クローン型は、該複数の腫瘍試料のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの1つであるか、又は該複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、該複数の腫瘍試料クローン型のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である、及び

・ 前記複数の腫瘍試料のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型は、前記1つの腫瘍特異的クローン型の頻度未満の頻度を示す血液試料クローン型に割り当てることができる、工程
10
を含む、請求項5又は6記載の方法。

【請求項8】

更に以下の工程：

- 前記患者から得られた無細胞試料を提供する工程；
- 該無細胞試料から核酸を抽出して核酸抽出物を得る核酸抽出工程；
- 該核酸抽出物から複数のT細胞受容体核酸配列、又は該複数のT細胞受容体核酸配列によってコードされる複数のT細胞受容体アミノ酸配列を得る工程；
- 該複数のT細胞受容体核酸配列又は該複数のT細胞受容体アミノ酸配列を整列させる工程；

・ 該複数のT細胞受容体核酸配列に含まれるT細胞受容体核酸配列又は該複数のT細胞受容体アミノ酸配列に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列を、複数の無細胞試料クローン型に分類する工程であって、ここで特定のクローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列又はT細胞受容体アミノ酸配列は同一の配列、又は1つの位置の塩基が異なる核酸配列又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列を表す工程；

・ 前記複数の腫瘍試料クローン型から腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで、

・ 前記腫瘍特異的クローン型は、該複数の腫瘍試料クローン型のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの1つであるか、又は該複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、該複数の腫瘍試料クローン型のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である、及び

・ 前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型は、無細胞試料クローン型に割り当てることができる、工程

を含む、請求項5～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型は、前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、前記100個の腫瘍特異的クローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列、又は前記100個の腫瘍特異的クローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体アミノ酸配列のうちの1つのT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型

10

20

30

40

50

に割り当てることができる、

請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記腫瘍試料クローン型の最大頻度のクローン型、又は前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、前記最大頻度の腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型が、選択され、ここで前記最大頻度のクローン型が、前記非腫瘍試料中には存在しないか、又は前記腫瘍特異的クローン型の頻度の、20%以下の頻度を示す非腫瘍クローン型に割り当てることができ、及び／又は前記各腫瘍試料クローン型の頻度未満の頻度を示す血液試料クローン型に割り当てることができ、及び／又は無細胞クローン型に割り当てることができ、及び／又は前記最大頻度の腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型に割り当てることができる、

請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

更に以下の工程：

- 前記腫瘍試料から5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで、

・ 前記選択された腫瘍特異的クローン型は、頻度が最高のものから上位100個のクローン型のうちの5 ~ 20個であって、前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの頻度が最高のものから上位5 ~ 20個のクローン型であるか、及び／又は前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの前記選択された5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型のいずれか1つに含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である、及び／又は

・ 前記選択された5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型は、非腫瘍試料中には存在しないか、又は前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの前記選択された5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型の頻度の、20%以下の頻度を表す非腫瘍特異的クローン型に割り当てることができる、及び／又は

・ 前記選択された5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型は、前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの前記選択された5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型の頻度未満の頻度を示す血液試料クローン型に割り当てることができる、及び／又は

・ 前記選択された5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型は、無細胞試料クローン型に割り当てることができる、及び／又は

・ 前記選択された5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型は、前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの別のクローン型に割り当てることができ、これは、前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの前記選択された5 ~ 20個の腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体核酸配列のうちの前記T細胞受容体核酸配列のいずれか一つにコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は1つ若しくは2つの位置のアミノ酸が異なるアミノ酸配列であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、前記複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型に割り当てることができる、

請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

- 前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの、前記頻度が最高のものから上位100個

10

20

30

40

50

のクローン型のうちの 1 つ、前記選択された 5 ~ 2 0 個の腫瘍特異的クローン型のうちのいずれか 1 つが、以下の場合に非腫瘍特異的クローン型に割り当てられ、これは、前記腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数の T 細胞受容体核酸配列の中の T 細胞受容体核酸配列にコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列、又は前記腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数の T 細胞受容体アミノ酸配列のうちの 1 つの T 細胞受容体アミノ酸配列が、前記非腫瘍試料クローン型に含まれる T 細胞受容体核酸配列によりコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数の T 細胞受容体アミノ酸配列の T 細胞受容体アミノ酸配列が、前記非腫瘍試料クローン型に含まれる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である、及び / 又は

- 前記複数の腫瘍試料クローン型のうちの、前記頻度が最高のものから上位 1 0 0 個のクローン型のうちの 1 つ、前記選択された 5 ~ 2 0 個の腫瘍特異的クローン型のうちのいずれか 1 つが、以下の場合に血液試料クローン型に割り当てられ、これは、前記腫瘍特異的クローン型に含まれる T 細胞受容体配列にコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列が、前記血液試料クローン型に含まれる T 細胞受容体核酸配列によりコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローン型に含まれる T 細胞受容体アミノ酸配列が、前記血液試料クローン型に含まれる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である、及び / 又は

- 前記複数の腫瘍試料クローン型のうち前記頻度が最高のものから上位 1 0 0 個のクローン型のうちの 1 つ、前記選択された 5 ~ 2 0 個の腫瘍特異的クローン型のうちのいずれか 1 つが、以下の場合に無細胞試料クローン型に割り当てられ、これは、前記腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数の T 細胞受容体核酸配列の中の T 細胞受容体核酸配列にコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列が、前記無細胞試料クローン型に含まれる T 細胞受容体核酸配列によりコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数の T 細胞受容体アミノ酸配列のうちの T 細胞受容体アミノ酸配列が、前記無細胞試料クローン型に含まれる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である、

請求項 5 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記核酸抽出工程は、以下の工程 :

a . 前記腫瘍試料から T 細胞を単離し、前記単離された T 細胞から核酸を抽出する工程、及び / 又は

b . T 細胞受容体核酸配列を特異的に増幅する核酸増幅反応を行う工程を含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列は、ヒト T 細胞受容体の鎖の C D R 3 領域をコードし、又は前記腫瘍特異的 T 細胞受容体アミノ酸配列は、ヒト T 細胞受容体の鎖の C D R 3 領域に含まれるか、又はそのものである。

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

説明

本発明は、腫瘍特異的、特に腫瘍反応性の T 細胞調製物を提供する方法及びその使用、特に養子移入及び癌治療のための方法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

癌は、先進国の国で最も頻繁に死亡する原因の 1 つである。癌治療の分野での徹底的な研究にもかかわらず、癌治療のための治療法はいまだに非常にニーズがある。最近では、疾患と戦うために、患者の免疫細胞を自己移植することによって癌を治療する努力がなされ

10

20

30

40

50

ており、ここでは、患者の腫瘍から得られたT細胞が増殖され、養子移入されていた。しかしながら、これらの移入された細胞は、一般に、多くのタイプのT細胞の広範なコレクションに似ているにすぎず、したがって、中等度かつ改善可能な免疫応答のみを誘導するため、高い腫瘍特異性及び反応性を欠いている。結果として、自己の、高い腫瘍特異的及び腫瘍反応性T細胞の提供が非常に望ましいであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

したがって、本発明の目的は、特に養子移入及び癌の治療に使用するためのそのような細胞を提供することである。この目的は、独立請求項の保護対象によって達成される。

10

【0004】

用語と定義

本明細書の文脈における「核酸」という用語は、ヌクレオチドのオリゴマー又はポリマーを指す。このオリゴマー又はポリマーは、天然ヌクレオシド（すなわち、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン及びデオキシシチジン）、ヌクレオシド類似体（例えば2-アミノブリン、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルシチジン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニル-ウリジン、C5-プロピニル-シチジン、C5-メチルシチジン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、O(6)-メチルグアニン、及び2-チオシチジン）、化学的に修飾された塩基、生物学的に修飾された塩基（例えばメチル化された塩基）、挿入塩基、無塩基部位、リボース糖（RNA）、2'-デオキシリボース糖（DNA）、末端3'-デオキシリボース又は2'、3'-ジデオキシリボース糖、修飾糖（例えば、2'-フルオロリボース、アラビノース及びヘキソース）、又は修飾リン酸基（例えば、ホスホロチオエート結合及び5'-N-ホスホロアミダイト結合）を含み得る。さらに、骨格は、修飾されたロックド（LNA）アンロックド（UNA）糖、鏡形態の糖（spiegelmer）又はペプチド骨格（PNA）又はそれらの混合物を含み得る。

20

【0005】

本明細書の文脈における用語「プローブ」は、相補的な核酸にハイブリダイズすることができる核酸を指す。プローブは、蛍光色素又は放射性同位体のような検出又は同定のための標識、ビオチン又はジゴキシゲニンのような捕捉、検出又は固定化のためのハプテン、又はチオール、アルキン、アジド又はEDCのような官能基であって、固定化、ライゲーション又は誘導体化のためのものを含むよう修飾され得る。

30

【0006】

本明細書の文脈における「腫瘍試料」という用語は、患者の腫瘍から得られた試料又は試料のプールを指す。腫瘍には、転移又は転移の集合も含まれ得る。

【0007】

本明細書の文脈における「非腫瘍試料」という用語は、患者の腫瘍に近接した組織から得られた試料又は試料のプールを指す。

40

【0008】

本明細書の文脈における「血液試料」又は「血液からの試料」という用語は、患者の血液から得られた試料又は患者の血液から得られた試料のプールを意味する。

【0009】

本明細書の文脈における「無細胞試料」という用語は、好ましくはT細胞を含まないか、又はより好ましくは核酸を含むあらゆる細胞を完全に含まない、患者から得られた試料又は試料プールをいう。無細胞試料は、好ましくは血液から、典型的には血清又は血漿試料として得られる。無細胞試料の他の例は、脳脊髄液、腹腔液、滑液、唾液、尿又は糞便などの他の体液から得られる試料である。

【0010】

50

本明細書の文脈における「クローン型」という用語は、T C R の可変領域に関して実質的に同一の核酸配列を示すT細胞受容体核酸配列を含むか、又はT C R の可変領域に関して実質的に同一のアミノ酸配列を示すT細胞受容体アミノ酸配列を含む。T C R の可変領域に関して本質的に同一のアミノ酸配列を示すクローン型は、クラスター型とも称され得る。

【0011】

本明細書の文脈における「クラスター型」という用語は、T C R の可変領域に関して実質同一のアミノ酸配列を示すT細胞受容体核酸配列を含むT細胞の群を指す。本明細書の文脈における「可変領域」という用語は、V - セグメント及びJ - セグメント並びにCDR 3領域(図1参照)を含むT C R 再配列によって新たに生成される領域を指す。

10

【0012】

本明細書の文脈における用語「CDR 3」は、超可変相補性決定領域3を指す。CDR 3のサイズは、特に、V、V 又はV 又はV セグメント内に保存されたシステインからJ 又はJ 、J 又はJ 内に保存されたフェニルアラニンの位置までのアミノ酸(AA)及びそれぞれのヌクレオチドの総数によって特徴付けられる。

【0013】

本明細書の文脈における「腫瘍特異的」という用語は、特定の腫瘍中に存在し、特に特定の腫瘍において優先的な分布を示すT細胞を特に指す。

【0014】

本明細書の文脈における「腫瘍反応性」という用語は、特に、特定の腫瘍の腫瘍細胞の成長、生存又は増殖を間接的又は直接的に調節することができるT細胞を指す。このような腫瘍反応性T細胞は、特に、特定の腫瘍の自己腫瘍細胞と共に培養した場合に、サイトカイン又は表面活性化マーカーの発現が増加することにより特徴付けられる。

20

【0015】

本明細書の文脈における用語「TIL」は、腫瘍浸潤リンパ球を指す。

【0016】

本明細書の文脈における用語「CD45RA」は、ヒトナイーブリンパ球マーカー(PTPRC; Uniprot ID P07585; アイソフォームA)を指す。

【0017】

本明細書の文脈における用語「CCR7」は、ヒトケモカイン受容体7(Uniprot ID P32248)を指す。

30

【0018】

本発明の文脈における用語「CD62L」は、リンパ球の表面上の細胞接着分子(Uniprot ID P14151)を指す。CD62Lは、L-セレクチンとも呼ばれる。

【0019】

本明細書の文脈における用語「CD25」は、ヒトインターロイキン-2受容体のアルファ鎖(Uniprot ID P01589)を意味する。

【0020】

本明細書の文脈における「Foxp3」という用語は、天然のT制御性T細胞及び誘導されたT制御性T細胞(Uniprot ID B7ZIG1)の特異的マーカーを指す。Foxp3はscurfinとも呼ばれる。

40

【0021】

本明細書の文脈における用語「LAG3」(リンパ球活性化遺伝子3)は、活性化T細胞のマーカー(UniProtKB:P18627)を指す。

【0022】

本明細書の文脈における用語「CD69」は、活性化T細胞のマーカー(Uniprot Q7108)を指す。

【0023】

本明細書の文脈における用語「CD137」は、活性化T細胞のマーカー(Uniprot Q07011)を指す。

50

【0024】

本明細書の文脈における用語「CD154」は、活性化T細胞のマーカー（Uniprot P29965）を指す。

【0025】

本明細書の文脈における「PD-1」という用語は、T細胞（Uniprot Q15116）によって発現される細胞表面受容体を指す。PD-1はCD279とも呼ばれる。

【0026】

本明細書の文脈における用語「B7-H4」は、活性化T細胞のマーカー（Uniprot Q7Z7D3）を指す。B7-H4は、VTCN1とも呼ばれる。

【0027】

本明細書の文脈における用語「OX40」は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4（Uniprot P43489）を指す。OX40はTNFFSF4又はCD134とも呼ばれる。

10

【0028】

本明細書の文脈における用語「CD107a」は、リソソーム膜タンパク質1（Uniprot P11279）を意味し、CD107aは、LAMP-1とも称される。

【0029】

本明細書の文脈における用語「VISTA」は、T細胞活性化のVドメインIgサブレッサーを指す。VISTAはPD-1ホモログ（PD-1H）とも呼ばれる。

【0030】

本明細書の文脈における「ブチロフィリン」という用語は、活性化されたT細胞上で発現される、IGスーパーファミリーのサブグループを構成するタンパク質のファミリーを指す。

20

【0031】

本明細書の文脈における「ブチロフィリン様タンパク質」という用語は、活性化T細胞のマーカーを指す。

【0032】

本明細書の文脈における「TNFアルファ」という用語は、活性化T細胞（Uniprot P01375）によって分泌されるサイトカインを意味する。

【0033】

本明細書の文脈における「インターフェロンガンマ」又は「IFNガンマ」という用語は、活性化T細胞（Uniprot P01579）によって分泌されるサイトカインを意味する。

30

【0034】

いずれかの細胞集団が特定のマーカータンパク質に対して「陽性」と指定されている場合、この指定は前記細胞集団がマーカータンパク質に対する共通の蛍光色素標識抗体によって染色され得ることを意味し、また、標識されていない細胞又は同じ抗体で標識されているが前記マーカータンパク質を発現しないことが一般に知られている細胞と比較して、少なくとも110g高い強度の蛍光シグナルを示し得ることを意味する。あるいは、細胞集団は、前述のマーカータンパク質をコードするmRNA又は関連する制御エンティティに特異的にハイブリダイズすることができる標識された核酸プローブによって染色され得る。マーカータンパク質関連エンティティは、マーカータンパク質制御転写因子mRNA、非コードRNA、又は前記マーカータンパク質を発現する細胞集団において特異的に共発現される任意の他のRNAを表すことができる。

40

【0035】

本明細書の文脈における「T細胞活性化マーカー」という用語は、活性化されたT細胞の表面上の分子を指す。

【0036】

本明細書の文脈における高親和性は、リガンドの標的分子への結合の解離定数を指し、ここで解離定数は、 10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L又は 10^{-9} mol/L

50

L 以下であり、かつリガンドは、無関係な構造的特徴を有する制御分子、例えばタンパク質に結合しない。制御分子は、非限定的な例として、アルブミン、グロブリン、リポタンパク質、フィブリノゲン、プロトロンビン、急性期タンパク質などの血漿タンパク質、及びCEA、CA 19-9 又は AFPなどの腫瘍マーカー及びトランスフェリンである。

【0037】

本明細書の文脈における高い特異性は、適切に検出された標的又は検体と検出された全ての化合物又は物質の合計との比率を指し、ここではその比率は、80%、85%、90%、95%、99%又は99.9%である。

【0038】

本明細書の文脈における「最適なアニーリング温度」という用語は、本発明のプローブが細胞内の腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に結合する最も高い確率を示す温度を指す。 10

【0039】

本明細書の文脈における「金ナノ」という用語は、サブミクロンサイズの金粒子を指す。

【0040】

Uniprot ID番号は、UniProtナレッジベースのエントリーを指す。

【0041】

DSMZ番号は、Leibniz-Institut DSMZ - ドイツのブラウンシュヴァイク(Braunschweig)にある微生物及び細胞培養GmbHドイツコレクションにおけるエントリー又は寄託物をいう。

【0042】

本発明の文脈におけるトランスフェクション試薬は、核酸を細胞、特にヒト免疫細胞に意図的に導入するプロセスを可能にする又は補助する化合物を指す。 20

【課題を解決するための手段】

【0043】

発明の概要

本発明の第一の態様によれば、腫瘍特異的T細胞調製物を提供するための方法が提供される。この方法は、以下の工程を含む：

a 腫瘍特異的T細胞クローンを以下により選択する工程：

- 患者から得られた腫瘍試料を提供する工程であって、腫瘍試料は腫瘍に浸潤したT細胞を含む工程；
- 核酸単離工程において腫瘍試料から核酸調製物を単離する工程；
- 核酸調製物から複数のT細胞受容体核酸配列を得る工程又は該複数のT細胞受容体核酸配列によってコードされる複数のT細胞受容体アミノ酸配列を得る工程；
- 配列選択工程において、複数のT細胞受容体核酸配列から腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を選択する工程、又は複数のT細胞受容体アミノ酸配列から腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列を選択する工程；

b 腫瘍特異的T細胞クローンを以下により選別する工程：

- 患者から得られたリンパ球調製物を提供する工程；
- 選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列又は選択された腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列を含む細胞を、単離工程においてリンパ球調製物から単離する工程。 40

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1において、A：ヒトT細胞受容体のアルファ鎖のCDR3領域のスキームを示し、B：Aと同じであるが、ヒトT細胞受容体のベータ鎖の場合、C：CDR3を含むゲノム領域の増幅の原理を示す。PCRプライマーは、V/J-セグメントのレパートリーに特異的であり、及びそれらの間のCDR3領域を有するV-及びJ-セグメントの小領域を増幅する。

【図2】図2は、本発明の方法の原理を示すフロー図を示す。

【図3】図3は、TIL及び非腫瘍T細胞との比率の程度により、TILに対して、T細胞クローン型の腫瘍反応性が高いか低いかを分けることを示す。破線は腫瘍対非腫瘍比(50

T / nT) を示し、点線及び実線は特異的活性化マーカー (P D - 1 、 I FN ガンマ) を保有 / 発現する T 細胞クローニングの頻度を示す。閾値比 $T / nT > 5$ の場合、ほぼすべての腫瘍反応性クローニングが正確に予測され、 $T / nT > 20$ の場合、 2 つのクローニングが選択され、腫瘍反応性として正確に予測される。

【発明を実施するための形態】

【 0045 】

特定の実施形態において、単離工程は、以下の工程を含む：

- リンパ球調製物を、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列又は腫瘍特異的 T 細胞受容体アミノ酸配列に対応する T 細胞受容体の V セグメント内に含まれるアミノ酸配列に結合することができる特異的反応性リガンドと接触させる工程であって、リガンドが検出可能な標識に結合している工程、及び

- リンパ球調製物から、検出可能な標識を有する T 細胞を単離する工程。

【 0046 】

特に、 V セグメントは、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列と特異的に関連する核酸分子によってコードされる。

【 0047 】

特定の実施形態では、リガンドは、 10^{-7} 、 10^{-8} 又は 10^{-9} mol/l 以下の解離定数でアミノ酸配列に結合する。

【 0048 】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列は、ヒト T 細胞受容体のベータ鎖の V セグメントをコードする核酸配列に特異的に関連する。

【 0049 】

特定の実施形態では、特異的反応性リガンドは、抗 - V 抗体であり、これは T 細胞受容体のベータ鎖の V セグメントを対象とする。

【 0050 】

このような抗 - V 抗体は公知であり、例えば <http://www.imgt.org/IMGT/reptoire/Regulation/antibodies/human/TRB/TRBV/HuTRBVMab.html> にて参照可能であり、また、例えば Pierce Endogen, Serotec 又は Coulter で得られる。

【 0051 】

特定の実施形態において、単離工程は、以下の工程を含む：

- リンパ球調製物を、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブと接触させる工程であって、核酸プローブが検出可能な標識に結合している工程と、

- リンパ球調製物から、検出可能な標識を有する T 細胞を単離する工程。

【 0052 】

特に、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列への核酸プローブの特異的結合は、特に高ストリンジエンシー条件下で、選択された配列へのプローブのハイブリダイゼーションを特に指す。

【 0053 】

特定の実施形態において、単離工程は、以下の工程を含む：

- 選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列又は腫瘍特異的 T 細胞受容体アミノ酸配列に対応する T 細胞受容体の V 領域内に含まれるアミノ酸配列に結合することができる特異的反応性リガンドとリンパ球調製物を接触させる工程であって、リガンドが検出可能な標識に結合している工程、

- リンパ球調製物から、検出可能な標識を有する T 細胞を単離する工程、

- 単離された細胞を、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブと接触させる工程であって、前記核酸プローブが別の検出可能な標識に結合している工程と、

10

20

30

40

50

- 以前に単離された細胞から他の検出可能な標識を有するT細胞を単離する工程。

【0054】

特定の実施形態において、単離工程は、以下の工程を含む：

- リンパ球調製物を複数の画分に分離する、分離工程、
- 前記複数の画分に含まれる細胞を細胞培養条件下で増殖させる、増殖工程、及び
- 選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含む前記複数の画分の少なくとも1つの画分が選択される、選択工程。

【0055】

特に、リンパ球調製物は、複数の画分に分けられ、この複数の画分は、全ての画分ではなく、好ましくは該複数の画分の半分未満、より好ましくは該複数の分画の10%未満、さらにより好ましくは5%未満、最も好ましくは1%未満が、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含む。そのような分離は、複数の画分当たりの細胞の数を制限することによって達成され得る。

10

【0056】

特定の実施形態では、複数の画分のそれぞれは、 10^5 以下の細胞、好ましくは 10^4 以下の細胞、より好ましくは 10^3 以下の細胞、さらにより好ましくは 10^2 以下の細胞を含む。

20

【0057】

特定の実施形態では、リンパ球調製物は、少なくとも96の画分、好ましくは96画分に分離され、特に各画分は 10^5 以下の細胞を含む。

【0058】

特定の実施形態において、リンパ球調製物は、96画分～384画分に分離される。

【0059】

特定の実施形態では、選択する工程は、複数の画分からT細胞受容体核酸配列を得る工程、及び選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含む画分を同定する工程を含み、特にT細胞受容体核酸配列は、増幅、特にPCRにより得られる。

30

【0060】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含む画分は、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸の少なくとも一部に特異的にアニールするプライマーによる増幅反応により同定され、ここで特に、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含まない画分は増幅産物を示さない。

【0061】

特定の実施形態では、T細胞受容体核酸配列は、それぞれの画分に含まれる細胞のアリコートから、又はそれぞれの画分の上清から得られる。

【0062】

好都合なことに、このような選択によって、合成及び検証において長い遅延を有する高価なプローブは必要ではない。さらに、上記実施形態は、PCR感度対プローブバックグラウンドに起因する非常にまれなクローン型にも適用可能である。さらに、増幅工程は、潜在的な自己細胞治療のためにインビトロでの増幅に直接適用することができる迅速に分裂する細胞を生じる。

40

【0063】

特定の実施形態では、選択する工程は、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブと複数の画分を接触させる工程であり、この接触工程では核酸プローブは検出可能な標識に結合している工程と、及び検出可能な標識を有するT細胞を含む複数の画分の内の少なくとも1つを選択する工程を含む。

【0064】

特定の実施形態では、分離工程の前に、

- リンパ球調製物を、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列、又は選択された腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列に対応する、T細胞受容体のVセグメント内に含まれるアミノ酸配列に結合することができる特異的反応性リガンドと接触させる工程、この

50

接触工程ではリガンドが検出可能な標識に結合している工程、及び

- リンパ球調製物から検出可能な標識を担持するT細胞を単離する工程を含み、その後、単離されたT細胞は、上記の分離工程に付される。

【0065】

特定の実施形態において、単離工程は、更に以下の工程を含む：

- 選択された画分を第2の複数の画分に分離する、第2の分離工程、
- 前記第2の複数の画分に含まれる細胞を細胞培養条件下で増殖させる、第2の増殖工程、及び
- 選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含む前記第2の複数の画分の少なくとも1つの画分が選択される、第2の選択工程。

【0066】

特に、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を含む新たに選択された画分ごとに、分離工程、増殖工程及び選択工程を繰り返すことができる。好ましくは、分離工程、増殖工程及び選択工程は、1~4回繰り返される。

【0067】

特定の実施形態において、複数のT細胞受容体核酸配列は、核酸配列の核酸を配列決定することによって得られる。特定の実施形態では、核酸調製物の核酸は、並行して配列決定される。平行配列決定に適した方法は、WO 2014/096394 A1に開示されている。

【0068】

特定の実施形態では、核酸調製物は、腫瘍試料の細胞、特に腫瘍に浸潤したT細胞のゲノムDNAを含む。

【0069】

特定の実施形態では、核酸調製物は、腫瘍試料の成熟T細胞又は活性化T細胞由来の少なくとも10ngのDNAを含み、これは、約1,500個の成熟T細胞のDNA量に特に対応する。成熟T細胞DNAの量の定量化は、当業者に公知の方法、例えば定量PCR又はデジタル液滴PCRによって決定することができる。核酸調製物の配列決定は、既知の量のDNAを有する参照試料の配列決定を含み得る。さらに、腫瘍試料中の成熟T細胞の量は、免疫組織化学的染色及び顕微鏡検査、又はFACSによる細胞選別によって測定することができる。

【0070】

特定の実施形態では、リンパ球調製物は、患者から得られた腫瘍試料、患者から得られた血液試料、又は患者から得られた全腫瘍試料によって提供される。

【0071】

有利には、本発明の方法は、腫瘍特異的クローン型を同定し、それらを調製するために腫瘍試料から得られる生存可能な及び/又は増殖する腫瘍特異的T細胞とは無関係である。1つ又は複数の腫瘍特異的クローン型が、腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列又は腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列によって同定されると、そのクローン型は、患者の他の腫瘍試料又は血液などの他の供給源から調製され得る。

【0072】

特定の実施形態では、配列選択工程は、以下の工程を含む：

- 腫瘍試料から得られた複数のT細胞受容体核酸配列を整列させる工程；
- 複数のT細胞受容体核酸配列に含まれるT細胞受容体核酸配列を、複数の腫瘍試料クローン型に分類する工程であって、ここで、
 - a) 特定のクローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列は、TCRの可変領域に対して実質的に同一の核酸配列を表し、及び/又は
 - b) 特定のクローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列は、TCRの可変領域に関して同一のアミノ酸配列を示す工程；
- 各クローン型に関連する複数のT細胞受容体核酸配列内のT細胞受容体核酸配列の

10

20

30

40

50

数を決定し、それにより前記クローニ型の各々についてクローニ型頻度を取得する工程、

- 複数の腫瘍試料クローニ型から腫瘍特異的クローニ型を選択する工程であって、ここで腫瘍特異的クローニ型は、該複数の腫瘍試料クローニ型のうち最大頻度のクローニ型 100 個のうちの 1 つであるか、又は複数の腫瘍試料クローニ型の中の別のクローニ型であって、これは、複数の腫瘍試料クローニ型の 100 個の最大頻度のクローニ型のうちの 1 つの腫瘍特異的クローニ型に含まれる複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの 1 つの T 細胞受容体核酸配列によりコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一である T 細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローニ型の中の別のクローニ型である工程、及び

- 選択された腫瘍特異的クローニ型に含まれる複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの 1 つの T 細胞受容体核酸配列を、腫瘍特異的受容体核酸配列として選択する工程。 10

【 0073 】

特に、配列決定の後、1 つの塩基対のミスマッチまで逸脱する同一及び関連する核酸配列読み取り断片の全てを結合する対が、クラスター化され、クローニ型として指定される。

【 0074 】

特定の実施形態において、腫瘍特異的クローニ型は、複数の腫瘍試料クローニ型の中で 50 個の最も頻度の高いクローニ型のうちの 1 つである複数の腫瘍試料クローニ型から選択される。特定の実施形態では、腫瘍特異的クローニ型は、複数の腫瘍試料クローニ型の中で 20 個の最も頻度の高いクローニ型のうちの 1 つである複数の腫瘍試料クローニ型から選択される。 20

【 0075 】

特に、第 1 の T 細胞受容体核酸配列は、第 2 の T 細胞受容体核酸配列と実質的に同一であり、これは両方の配列が 1 つ以下の位置で異なる場合である。

【 0076 】

特定の実施形態では、第 1 の T 細胞受容体核酸配列は、第 2 の T 細胞受容体核酸配列と実質的に同一であり、これは、両方の配列が 1 つ以下の位置で異なる場合であり、かつ第 1 の T 細胞受容体核酸配列は、各試料、特に腫瘍試料において、第 2 の T 細胞受容体核酸配列と比較して、少なくとも 20 倍の頻度を示す。結果的に、第 1 及び第 2 の T 細胞受容体核酸配列の両方が同じクローニ型に割り当てられる。

【 0077 】

同様に、第 1 の T 細胞受容体アミノ酸配列は、第 2 の T 細胞受容体アミノ酸配列と実質的に同一であり、これは両方のアミノ酸配列が互いに対し 1 つ又は 2 つ以下の位置で異なる場合である。上記の T 細胞受容体アミノ酸配列は、T C R / のアルファ鎖、又はベータ鎖内又は T C R / のガンマ鎖又はデルタ鎖内に含まれ得る。

【 0078 】

特に、クローニ型頻度は、腫瘍試料内の T C R 核酸配列によって同定された T 細胞の相対的又は絶対的頻度の尺度である。

【 0079 】

特に、所与の試料におけるクローニ型頻度は、前記試料内の T C R 核酸配列によって同定される T 細胞の相対的又は絶対的頻度の尺度である。 40

【 0080 】

特定の実施形態では、上記の複数の内の T 細胞受容体核酸配列は、ヒト T 細胞受容体、特に T C R / 又は T C R / を形成するポリペプチド鎖の 1 つをコードする核酸配列内に含まれる。特定の実施形態では、上記の複数の T 細胞受容体核酸配列は、非コード核酸配列を含まない。非コード配列は、非機能的 T C R タンパク質配列をもたらす停止コドン又はフレームシフトを有するクローニ型をいう。

【 0081 】

特定の実施形態では、腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列は、30 ヌクレオチド ~ 110 ヌクレオチドの長さによって特徴付けられる。

【 0082 】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列は、ヒトT細胞受容体を形成するポリペプチド鎖（アルファ、ベータ、ガンマ及びデルタ）のいずれか1つに含まれる特有のアミノ酸配列をコードし、ここで特有のアミノ酸配列は、特定のクローン型又はクラスター型でのみ生じ、他のクローン型又はクラスター型では生じない。

【0083】

したがって、選択工程は、追加的又は代替的に、以下の工程を含む：

- 腫瘍試料から得られた複数のT細胞受容体アミノ酸配列を整列させる工程；
- 複数のT細胞受容体アミノ酸配列に含まれるT細胞受容体核酸配列を、複数の腫瘍試料クローン型に分類する工程であって、ここで、特定のクローン型内に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列は、TCRの可変領域と、実質的に同一又は同一のアミノ酸配列を示す工程；

10

- 各クローン型に関連する複数のT細胞受容体アミノ酸配列内の、T細胞受容体アミノ酸配列の数を決定し、それにより前記クローン型のそれぞれのクローン型頻度を取得する工程；

20

- 複数の腫瘍試料クローン型から腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで腫瘍特異的クローン型は、複数の腫瘍試料クローン型のうちの100の最も頻度の高いクローン型の1つであるか、又は複数の腫瘍試料クローン型のうちの別のクローン型であって、この別のクローン型は、複数の腫瘍試料クローン型のうち100個の最も頻度の高いクローン型の中の1つの腫瘍特異的クローン型内に含まれる、複数のT細胞受容体アミノ酸配列の中のT細胞受容体アミノ酸配列と実質同一又は同一のT細胞受容体アミノ酸配列を含む工程；

- 選択された腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体アミノ酸配列を、腫瘍特異的受容体アミノ酸配列として選択する工程。

【0084】

特定の実施形態では、複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの1つ、特に最も頻度の高いクローン型と、及び複数の腫瘍試料クローン型のうちの1つ以上の追加のクローン型であって、複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの1つの腫瘍特異的クローン型内に含まれる、複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一のT細胞受容体アミノ酸配列を含む複数の腫瘍試料クローン型の1つ以上の追加のクローン型とは、腫瘍特異的クローン型として選択され、及び、特にリンパ球を、選択されたクローン型に含まれる腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブと接触させることによって、リンパ球調製物から単離され、ここで、該核酸プローブは、検出可能な標識に結合しており、及び標識を有する細胞は、リンパ球調製物から単離される。

【0085】

特定の実施形態では、複数の腫瘍試料クローン型の中で、5個の最も頻度の高いクローン型、10個の最も頻度の高いクローン型、15個の最も頻度の高いクローン型、又は20個の最も頻度の高いクローン型、及び/又は複数の腫瘍試料クローン型の中で1つ以上の追加のクローン型であって、複数の腫瘍試料クローン型のうちの、5個の最も頻度の高いクローン型、10個の最も頻度の高いクローン型、15個の最も頻度の高いクローン型、又は20個の最も頻度の高いクローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によってコードされる、T細胞受容体アミノ酸配列と同一であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型のうちの1つ以上の追加のクローン型は、腫瘍特異的クローン型として選択され、そしてリンパ球調製物から単離され、特にリンパ球を、選択されたクローン型に含まれる選択された腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列、又は選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に対応する、T細胞受容体のVセグメント内に含まれるアミノ酸配列に特異的に結合することができる反応性リガンドと接触させることによって、リンパ球調製物から単離され、ここで、該リガンド

10

20

30

40

50

ドは、検出可能な標識に結合しており、及び標識を有する細胞は、リンパ球調製物から単離される。

【0086】

特定の実施形態において、腫瘍特異的受容体核酸配列は、T細胞受容体のCDR3領域をコードする。特定の実施形態では、腫瘍特異的受容体アミノ酸配列は、T細胞受容体のCDR3領域を含むか、又はそれに含まれる。

【0087】

特定の実施形態において、本発明の方法は、更に以下の工程を含む：

- 患者から得られた非腫瘍試料を提供する工程；
- 核酸単離工程において非腫瘍試料から核酸調製物を単離する工程；
- 核酸調製物から複数のT細胞受容体核酸配列を得て、複数の非腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を取得する工程；
- 非腫瘍試料から得られた複数の非腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列を整列させる工程；
- 複数の非腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に含まれるT細胞受容体核酸配列を、複数の非腫瘍特異的クローニング型に分類する工程であって、ここで、
 - a) 特定のクローニング型内に含まれるT細胞受容体核酸配列は、TCRの可変領域、特にCDR3領域に対して実質的に同一の核酸配列を表し、及び/又は
 - b) 特定のクローニング型内に含まれるT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列は、TCRの可変領域、特にCDR3領域に関して同一のアミノ酸配列を示す工程；
- 複数の腫瘍試料クローニング型から腫瘍特異的クローニング型を選択する工程であって、ここで、
 - ・ 腫瘍特異的クローニング型は、該複数の腫瘍試料クローニング型のうち最大頻度のクローニング型100個のうちの1つであるか、又は複数の腫瘍試料クローニング型の中の別のクローニング型であって、これは、複数の腫瘍試料クローニング型の100個の最大頻度のクローニング型のうちの1つの腫瘍特異的クローニング型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローニング型の中の別のクローニング型である、及び
 - ・ 複数の腫瘍試料クローニング型のうちの100個の最も頻度の高いクローニング型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローニング型は、非腫瘍試料中には存在しないか、又は腫瘍特異的クローニング型の頻度の20%、15%、10%、又は5%以下の頻度（非腫瘍試料中）を示す非腫瘍特異的クローニング型に割り当てる能够である工程。

【0088】

特に、非腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列は、腫瘍から得られたT細胞受容体核酸配列を複数の腫瘍試料クローニング型へ分類する方法と同様に、複数の非腫瘍特異的クローニング型に分類され、特に、腫瘍試料のクローニング型を非腫瘍クローニング型に割り当てる能够にする。

【0089】

特に、以下の場合に、腫瘍特異的クローニング型を非腫瘍特異的クローニング型に割り当てる能够である：

a) 上記のこのクローニング型内に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちのT細胞受容体核酸配列のいずれか1つは、非腫瘍クローニング型内に含まれるT細胞受容体核酸配列と実質同一である、及び/又は

b) 上記のこのクローニング型内に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちのT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列は、非腫瘍試料クローニング型内に含まれるT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である。

【0090】

10

20

30

40

50

同様に、腫瘍特異的クローン型が非腫瘍試料のクローン型のどれにも割り当てる事ができない場合、この腫瘍特異的クローン型は非腫瘍試料には存在しない。

【0091】

特定の実施形態では、非腫瘍試料は、腫瘍に隣接する非腫瘍組織の試料である。このような非腫瘍組織は、超音波検査、ラジオグラフィー、CT又は免疫染色などの一般的な技術によって同定することができる。

【0092】

特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに以下の工程を含む：

- 患者から得られた非腫瘍試料を提供する工程；
- 核酸単離工程において非腫瘍試料から核酸調製物を単離する工程；
- 核酸調製物由来の複数のT細胞受容体核酸配列及び複数のT細胞受容体核酸配列によりコードされる複数のT細胞受容体アミノ酸配列を得て、複数の非腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列を取得する工程；
- 非腫瘍試料から得られた複数の非腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列を整列させる工程；
- 複数の非腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列を、複数の非腫瘍特異的クローン型に分類する工程であって、ここで、特定のクローン型内に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列は、TCRの可変領域、特にCDR3領域に対して実質的に同一又は同一の配列を表す工程、
- 複数の腫瘍試料クローン型から腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで、
 - ・ 腫瘍特異的クローン型は、該複数の腫瘍試料クローン型のうち最大頻度のクローン型100個のうちの1つであるか、又は複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、複数の腫瘍試料クローン型の100個の最大頻度のクローン型のうちの1つの腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体アミノ酸配列のうちの1つのT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である、及び
 - ・ 複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型は、非腫瘍試料中には存在しないか、又は腫瘍特異的クローン型の頻度の20%、15%、10%、又は5%以下の頻度（非腫瘍試料中）を示す非腫瘍特異的クローン型に割り当てる事ができる工程。

【0093】

特に、非腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列は、腫瘍から得られたT細胞受容体アミノ酸配列を複数の腫瘍試料クローン型へ分類する方法と同様に、複数の非腫瘍特異的クローン型に分類され、特に、腫瘍試料のクローン型を非腫瘍クローン型に割り当てる事可能にする。

【0094】

特に、腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体アミノ酸配列の中のT細胞受容体アミノ酸配列のいずれかが非腫瘍クローン型に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と実質同一又は同一である場合、腫瘍特異的クローン型は非腫瘍特異的クローン型に割り当てる事ができる。

【0095】

特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに以下の工程を含む：

- 患者から得られた血液試料を提供する工程；
- 核酸単離工程において血液試料から核酸調製物を単離する工程；
- 核酸調製物から複数のT細胞受容体核酸配列を得る工程；
- 複数のT細胞受容体核酸配列を整列させる工程；
- 複数のT細胞受容体配列に含まれるT細胞受容体核酸配列を、複数の血液試料クローン型に分類する工程であって、ここで
 - a) 特定のクローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列は、TCRの可変領域

10

20

30

40

50

、特に C D R 3 領域に対して実質的に同一の配列を表し、及び／又は

b) 特定のクローニング内に含まれる T 細胞受容体配列によってコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列は、 T C R の可変領域、特に C D R 3 領域に関して同一の配列を表す工程；

- 複数の腫瘍試料クローニングから腫瘍特異的クローニングを選択する工程であって、ここで、

・ 腫瘍特異的クローニングは、該複数の腫瘍試料クローニングのうち最大頻度のクローニング 100 個のうちの 1 つであるか、又は複数の腫瘍試料クローニングの中の別のクローニングであって、これは、複数の腫瘍試料クローニングの 100 個の最大頻度のクローニングのうちの 1 つの腫瘍特異的クローニングに含まれる複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの 1 つの T 細胞受容体核酸配列によりコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一である T 細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローニングの中の別のクローニングである、及び

・ 複数の腫瘍試料クローニングのうちの 100 個の最も頻度の高いクローニングのうちの前記 1 つの腫瘍特異的クローニングは、前記 1 つの腫瘍特異的クローニングの頻度未満の頻度を示す血液試料クローニングに割り当てることができる工程。

【 0096 】

特に、血液試料から得られた T 細胞受容体アミノ酸配列は、腫瘍から得られた T 細胞受容体核酸配列を複数の腫瘍試料クローニングへ分類する方法と同様に、複数の血液試料クローニングに分類され、特に、腫瘍試料のクローニングを血液試料クローニングに割り当てるこ¹⁰と可能にする。

【 0097 】

特に、以下の場合に、腫瘍特異的クローニングを血液試料クローニングに割り当てるこ²⁰とができる：

a) 上記のこのクローニング内に含まれる複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの T 細胞受容体核酸配列のいずれか 1 つは、血液試料クローニング内に含まれる T 細胞受容体核酸配列と実質同一配列を表す、及び／又は

b) 上記のこのクローニング内に含まれる複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの T 細胞受容体核酸配列によってコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列は、血液試料クローニング内に含まれる T 細胞受容体核酸配列によってコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一である。

【 0098 】

特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに以下の工程を含む：

- 患者から得られた血液試料を提供する工程；
- 核酸単離工程において血液試料から核酸調製物を単離する工程；
- 核酸調製物由来の複数の T 細胞受容体核酸配列及び複数の T 細胞受容体核酸配列によりコードされる複数の T 細胞アミノ酸配列を得る工程；
- 複数の T 細胞受容体アミノ酸配列を整列させる工程；
- 複数の T 細胞受容体配列に含まれる T 細胞受容体アミノ酸配列を、複数の血液試料クローニングに分類する工程であって、ここで、特定のクローニング内に含まれる T 細胞受容体アミノ酸配列は、 T C R の可変領域に対して実質的に同一の配列を表す工程、
- 複数の腫瘍試料クローニングから腫瘍特異的クローニングを選択する工程であって、ここで、

・ 腫瘍特異的クローニングは、該複数の腫瘍試料クローニングのうち最大頻度のクローニング 100 個のうちの 1 つであるか、又は複数の腫瘍試料クローニングの中の別のクローニングであって、これは、複数の腫瘍試料クローニングの 100 個の最大頻度のクローニングのうちの 1 つの腫瘍特異的クローニングに含まれる複数の T 細胞受容体アミノ酸配列のうちの 1 つの T 細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一である T 細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローニングの中の別のクローニングである、及び

・ 複数の腫瘍試料クローニングのうちの 100 個の最も頻度の高いクローニングのうち

10

20

30

40

50

の前記 1 つの腫瘍特異的クローン型は、前記 1 つの腫瘍特異的クローン型の頻度未満の頻度を示す血液試料クローン型に割り当てることができる工程。

【 0 0 9 9 】

特に、血液試料から得られた T 細胞受容体アミノ酸配列は、腫瘍から得られた T 細胞受容体アミノ酸配列を複数の腫瘍試料クローン型へ分類する方法と同様に、複数の血液試料クローン型に分類され、特に、腫瘍試料のクローン型を血液試料クローン型に割り当てるこ¹⁰とを可能にする。

【 0 1 0 0 】

特に、腫瘍特異的クローン型に含まれる複数の T 細胞受容体アミノ酸配列の中の T 細胞受容体アミノ酸配列のいずれか 1 つが血液試料クローン型に含まれる T 細胞受容体アミノ酸配列と実質同一又は同一の配列を表す場合、腫瘍特異的クローン型は血液試料クローン型に割り当てる¹⁰ことができる。

【 0 1 0 1 】

特定の実施形態において、本発明の方法は、さら以下に工程を含む：

- 患者から得られた無細胞試料を提供する工程；
- 核酸単離工程において無細胞試料から核酸調製物を単離する工程；
- 核酸調製物から複数の T 細胞受容体核酸配列を得る工程；
- 複数の T 細胞受容体核酸配列を整列させる工程；
- 複数の T 細胞受容体配列に含まれる T 細胞受容体核酸配列を、複数の無細胞試料クローン型に分類する工程であって、ここで²⁰

a) 特定のクローン型内に含まれる T 細胞受容体核酸配列は、 T C R の可変領域、特に C D R 3 領域に対して実質的に同一の配列を表し、及び / 又は

b) 特定のクローン型内に含まれる T 細胞受容体核酸配列によってコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列は、 T C R の可変領域、特に C D R 3 領域に関して同一の配列を表す工程；

- 複数の腫瘍試料クローン型から腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで、

・ 腫瘍特異的クローン型は、該複数の腫瘍試料クローン型のうち最大頻度のクローン型 100 個のうちの 1 つであるか、又は複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、複数の腫瘍試料クローン型の 100 個の最大頻度のクローン型のうちの 1 つの腫瘍特異的クローン型に含まれる複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの 1 つの T 細胞受容体核酸配列によりコードされる T 細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一である T 細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である、及び³⁰

・ 複数の腫瘍試料クローン型のうちの 100 個の最も頻度の高いクローン型のうちの前記 1 つの腫瘍特異的クローン型は、無細胞試料に割り当てる⁴⁰ことができる、特に複数の無細胞試料クローン型の全頻度中、 0.001 % より大の頻度を示す無細胞試料クローン型に割り当てる⁴⁰ことができる工程。

【 0 1 0 2 】

特に、無細胞試料から得られた T 細胞受容体核酸配列は、腫瘍から得られた T 細胞受容体核酸配列を複数の腫瘍試料クローン型へ分類する方法と同様に、複数の無細胞試料クローン型に分類され、特に、腫瘍試料のクローン型を無細胞クローン型に割り当てる⁴⁰ことを可能にする。

【 0 1 0 3 】

特に、以下の場合に、腫瘍特異的クローン型を無細胞試料クローン型に割り当てる⁴⁰ことができる：

a) 上記のこのクローン型内に含まれる複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの T 細胞受容体核酸配列のいずれか 1 つは、無細胞試料クローン型内に含まれる T 細胞受容体核酸配列と実質同一配列を表す、及び / 又は

b) 上記のこのクローン型内に含まれる複数の T 細胞受容体核酸配列のうちの T 細胞⁵⁰

受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列は、無細胞試料クローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である。

【0104】

特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに以下の工程を含む：

- 患者から得られた無細胞試料を提供する工程；
- 核酸単離工程において無細胞試料から核酸調製物を単離する工程；
- 核酸調製物から複数のT細胞受容体核酸配列及び複数のT細胞受容体核酸配列によりコードされる複数のT細胞受容体アミノ酸配列を得る工程；
- 複数のT細胞受容体アミノ酸配列を整列させる工程；
- 複数のT細胞受容体配列に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列を、複数の無細胞試料クローン型に分類する工程であって、ここで、特定のクローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列は、T C Rの可変領域、特にC D R 3領域に対して実質的に同一又は同一の配列を表す工程；
- 複数の腫瘍試料クローン型から腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで、

・ 腫瘍特異的クローン型は、該複数の腫瘍試料クローン型のうち最大頻度のクローン型100個のうちの1つであるか、又は複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、複数の腫瘍試料クローン型の100個の最大頻度のクローン型のうちの1つの腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体アミノ酸配列のうちの1つのT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である、及び

・ 複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型は、無細胞試料クローン型に割り当てることができ、特に複数の無細胞試料クローン型の全頻度中、0.001%より大の頻度を示す無細胞試料クローン型に割り当てることができる工程。

【0105】

特に、無細胞試料から得られたT細胞受容体アミノ酸配列は、腫瘍から得られたT細胞受容体アミノ酸配列を複数の腫瘍試料クローン型へ分類する方法と同様に、複数の無細胞試料クローン型に分類され、特に、腫瘍試料のクローン型を無細胞試料クローン型に割り当てるなどを可能にする。

【0106】

特に、腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体アミノ酸配列の中のT細胞受容体アミノ酸配列のいずれか1つが、無細胞試料クローン型に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と実質同一又は同一である場合、腫瘍特異的クローン型は無細胞試料クローン型に割り当てることができる。

【0107】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的クローン型を、ヒトサイトメガロウイルス又はエプスタイン・バーウイルスに反応性である既知のクローン型に割り当てるとはできない。

【0108】

そのような割り当ては、特に、選択された腫瘍特異的クローン型内に含まれる腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列が、ヒトサイトメガロウイルス又はエプスタイン・バーウイルスに反応する既知のクローン型の核酸配列と比較されるバイオインフォマティクス法により行われる。

【0109】

特に、以下の場合に、選択された腫瘍特異的クローン型を、ヒトサイトメガロウイルス又はエプスタイン・バーウイルスに反応性である既知のクローン型に割り当てるとはできない：

- a) 上記のこのクローン型内に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちのどのT

10

20

30

40

50

細胞受容体核酸配列も、既知のクローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列と実質同一ではない。

b) 上記のこのクローン型内に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちのT細胞受容体核酸配列によってコードされるどのT細胞受容体アミノ酸配列も、既知のクローン型内に含まれるT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一ではない、又は

c) 上記のこのクローン型内に含まれる複数のT細胞アミノ酸配列のうちのどのT細胞受容体アミノ酸配列も、既知のクローン型内に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と実質同一又は同一ではない。

【0110】

10

特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに以下の工程を含む：

- 複数の腫瘍試料クローン型から腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで、

・ 腫瘍特異的クローン型は、該複数の腫瘍試料クローン型のうち最大頻度のクローン型100個のうちの1つであるか、又は複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、複数の腫瘍試料クローン型の100個の最大頻度のクローン型のうちの1つの腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である、及び

20

・ 複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの前記1つの腫瘍特異的クローン型は、複数の腫瘍試料クローン型のうちの別のクローン型に割り当てることができ、これは、前記100個の最大頻度の腫瘍特異的クローン型のうちの1つに含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうち1つのT細胞受容体核酸配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸と同一又は実質的に同一であるT細胞アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である。

【0111】

30

特定の実施形態において、腫瘍試料クローン型の最大頻度のクローン型、又は複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、最大頻度のクローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と実質的に同一であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型は、腫瘍特異的クローン型として選択され、ここで特に最も頻度の高いクローン型は、非腫瘍試料中には存在しないか、又は最も高い頻度のクローン型の頻度の、20%、15%、10%、又は5%以下の頻度（非腫瘍試料中）を示す非腫瘍特異的クローン型に割り当てることができ、及び／又は最大頻度のクローン型の頻度未満の頻度を示す血液試料クローン型に割り当てることができ、及び／又は無細胞クローン型、特に複数の血清試料クローン型の全頻度中、0.001%より大の頻度を示す無細胞クローン型に割り当てることができ、及び／又は

最大頻度の腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸と同一又は実質的に同一であるT細胞アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型に割り当てることができる。

40

【0112】

特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに以下の工程を含む：

- 腫瘍試料から5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型を選択する工程であって、ここで、

・ 腫瘍特異的クローン型は、該複数の腫瘍試料クローン型のうち最大頻度のクローン型100個のうちの5、10、15又は20個であるか、又は複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型であって、これは、複数の腫瘍試料クローン型の100個の最大頻度のクローン型のうちの5、10又は20個の腫瘍特異的クローン型に含まれる複数の

50

T細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型である、及び任意に

・ 複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの前記5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型は、非腫瘍試料中には存在しないか、又は複数の腫瘍試料クローン型の最も高い頻度のクローン型100個の腫瘍特異的クローン型の頻度の、20%、15%、10%、又は5%以下の頻度（非腫瘍試料中）を表す非腫瘍特異的クローン型に割り当てることができる、及び／又は

・ 複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの前記5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型は、前記腫瘍特異的クローン型の頻度未満の頻度を示す血液試料クローン型に割り当てることができる、及び／又は

・ 複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの前記5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型は、無細胞試料クローン型に割り当てることができ、特に複数の無細胞試料クローン型の全頻度中、0.001%より大の頻度を示す無細胞試料クローン型に割り当てることができる、及び／又は

・ 複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最も頻度の高いクローン型のうちの前記5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型は、複数の腫瘍試料クローン型のうちの別のクローン型に割り当てることができ、これは、複数の腫瘍試料クローン型のうちの100個の最大頻度の腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうち1つのT細胞受容体核酸配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸と同一又は実質的に同一であるT細胞アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローン型の中の別のクローン型に割り当てることができる工程。

【0113】

特に、5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型のそれぞれは、上記の非腫瘍試料、血液試料及び／又は無細胞試料のクローン型と個々に比較され、及び特に割り当てられる。

【0114】

特定の実施形態において、

- 複数の腫瘍試料クローン型のうち最大頻度のクローン型100個のうちの1、5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型のうちのいずれか1つが、以下の場合に非腫瘍特異的クローン型に割り当たられ、これは、腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列の中のT細胞受容体配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列が、非腫瘍試料クローン型に含まれるT細胞受容体配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体アミノ酸配列のT細胞アミノ酸配列が、前記非腫瘍試料クローン型に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である、及び／又は

- 複数の腫瘍試料クローン型のうち最大頻度のクローン型100個のうちの1、5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型のうちのいずれか1つが、以下の場合に血液試料クローン型に割り当たられ、これは、腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列の中のT細胞受容体配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列が、血液試料クローン型に含まれるT細胞受容体配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローン型に含まれるT細胞アミノ酸配列が、前記血液試料クローン型に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である、及び／又は

- 複数の腫瘍試料クローン型のうち最大頻度のクローン型100個のうちの1、5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型のうちのいずれか1つが、以下の場合に無細胞試料クローン型に割り当たられ、これは、1つ又は複数の腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列の中のT細胞受容体核酸配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列が、無細胞試料クローン型に含まれるT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローン型に

10

20

40

50

含まれる前記複数のT細胞アミノ酸配列のうちのT細胞アミノ酸配列が、前記無細胞試料クローニング型に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である。

【0115】

特定の実施形態において、本発明の方法は、さらに以下の工程を含む：

- 腫瘍試料から5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型を選択する工程であって、ここで、

・ 腫瘍特異的クローニング型は、該複数の腫瘍試料クローニング型のうちの、5個の最大頻度のクローニング型、10個の最大頻度のクローニング型、15個の最大頻度のクローニング型又は20個の最大頻度のクローニング型であるか、又は複数の腫瘍試料クローニング型の中の別のクローニング型であって、これは、複数の腫瘍試料クローニング型のうち前記選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列のうちの1つのT細胞受容体核酸配列によってコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一又は実質的に同一であるT細胞受容体アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローニング型の中の別のクローニング型である、及び任意に

・ 前記選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型は、非腫瘍試料中には存在しないか、又は複数の腫瘍試料クローニング型の中で前記選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型の頻度の、20%、15%、10%、又は5%以下の頻度（非腫瘍試料中）を表す非腫瘍特異的クローニング型に割り当てる能够である、及び／又は

・ 複数の腫瘍試料クローニング型のうちの前記選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型は、複数の腫瘍試料クローニング型のうちの選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型の頻度未満の頻度を示す血液試料クローニング型に割り当てる能够である、及び／又は

・ 複数の腫瘍試料クローニング型のうちの前記選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型は、無細胞試料クローニング型に割り当てる能够である、特に複数の無細胞試料クローニング型の全頻度中、0.001%より大の頻度を示す無細胞試料クローニング型に割り当てる能够である、及び／又は

・ 複数の腫瘍試料クローニング型のうちの前記選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型は、複数の腫瘍試料クローニング型のうちの別のクローニング型に割り当てる能够である、これは、複数の腫瘍試料クローニング型のうちの100個の最大頻度の腫瘍特異的クローニング型に含まれる複数のT細胞受容体アミノ酸配列のうち1つのT細胞受容体アミノ酸配列と実質的に同一であるT細胞アミノ酸配列を含む、複数の腫瘍試料クローニング型の中の別のクローニング型に割り当てる能够である工程。

【0116】

特に、選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型のそれぞれは、上記の非腫瘍試料、血液試料及び／又は無細胞試料のクローニング型と個々に比較され、及び特に割り当てる。

【0117】

特定の実施形態において、

- 複数の腫瘍試料クローニング型のうちの選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型のうちのいずれか1つが、以下の場合に非腫瘍特異的クローニング型に割り当たられ、これは、腫瘍特異的クローニング型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列の中のT細胞受容体配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列が、非腫瘍試料クローニング型に含まれるT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローニング型に含まれる前記複数のT細胞受容体アミノ酸配列のT細胞アミノ酸配列が、前記非腫瘍試料クローニング型に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である、及び／又は

- 複数の腫瘍試料クローニング型のうちの選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローニング型のうちのいずれか1つが、以下の場合に血液試料クローニング型に割り当たられ、これは、腫瘍特異的クローニング型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列の中のT細胞

10

20

30

40

50

受容体核酸配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列が、血液試料クローン型に含まれるT細胞受容体核酸によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体アミノ酸配列のT細胞アミノ酸配列が、前記血液試料クローン型に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である、及び／又は

- 複数の腫瘍試料クローン型のうちの選択された5、10、15又は20個の腫瘍特異的クローン型のうちのいずれか1つが、以下の場合に無細胞試料クローン型に割り当たられ、これは、腫瘍特異的クローン型に含まれる複数のT細胞受容体核酸配列の中のT細胞受容体核酸配列にコードされるT細胞受容体アミノ酸配列が、無細胞試料クローン型に含まれるT細胞受容体核酸配列によりコードされるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合、又は前記腫瘍特異的クローン型に含まれる前記複数のT細胞受容体アミノ酸配列のうちのT細胞アミノ酸配列が、前記無細胞試料クローン型に含まれるT細胞受容体アミノ酸配列と同一である場合である。

【0118】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブは二本鎖オリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドの第1の鎖は選択された腫瘍特異的核酸配列に相補的であり、かつ金ナノ粒子に結合されており、及び第2の鎖が第1の鎖に相補的であり、発光標識を有し、この標識の発光は、第2の鎖が第1の鎖に結合している場合、金ナノ粒子によって消光される。そのようなプローブの非限定的な例は、メルクミリポア（メルクK G a A、ダルムシュタット、ドイツ）から入手可能なSmartFlare（登録商標）プローブである。特定の実施形態では、上記二本鎖オリゴヌクレオチドは、35塩基未満の長さ、特に18～30塩基の長さで特徴付けられる。

【0119】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブはペプチド核酸プローブであり、ここで核酸塩基は、プローブが選択された腫瘍特異的T細胞受容体配列に結合又はハイブリダイゼーションする際に発光（蛍光又は燐光）する色素で置換される。そのような色素はインターラーティング色素として知られており、非限定的な例はチアゾールオレンジ色素又はオキサゾールイエロー色素のような色素を包含する。そのようなプローブはまた強制インターラーティングプローブとしても知られている。そのようなプローブの例は、国際公開第2006/072368号A2に開示されている。特定の実施形態では、上記ペプチド核酸プローブは、20塩基未満の長さ、特に18ヌクレオチド長で特徴付けられる。

【0120】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブはペプチド酸プローブであり、ここで核酸塩基、又はペプチド酸モノマーは、プローブが選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に結合又はハイブリダイゼーションされた際に発光する色素で置き換えられる。特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブは、核酸塩基がチアゾールオレンジ色素又はオキサゾールイエロー色素で置き換えられる核酸プローブである。

【0121】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブは、核酸モノマー及びペプチド酸モノマーを含むオリゴマーであり、モノマーのうち少なくとも1つは、プローブが結合又はハイブリダイゼーションする際発光する色素、特にチアゾールオレンジ色素又はオキサゾールイエロー色素により置き換えられる。

【0122】

特定の実施形態では、核酸単離工程は、以下の工程を含む：

- a. 腫瘍試料からT細胞を単離し、T細胞から核酸を単離する工程、及び／又は
- b. T細胞受容体核酸配列を特異的に增幅する核酸增幅反応を行う工程。

【0123】

特定の実施形態において、細胞懸濁液は、腫瘍試料から調製され、ここで、細胞懸濁液は

10

20

30

40

50

、腫瘍試料の腫瘍細胞及び特に腫瘍に浸潤したT細胞を含む。このような細胞懸濁液は、例えば、ミルテニーバイオテク社、ベルギッシュ グラートバッハ、ドイツ製のgentle MACS（登録商標）システムによる、腫瘍試料から調製可能である。

【0124】

特定の実施形態では、CD3+T細胞は、腫瘍試料又は細胞懸濁液、及び任意に非腫瘍試料、及び/又は血液試料から単離され、ここで特にクローン型の頻度が、腫瘍試料又は細胞懸濁液と非腫瘍試料及び/又は血液試料との間における単離された細胞間で評価又は比較される。

【0125】

特定の実施形態では、CD4+T細胞は、腫瘍試料又は細胞懸濁液、及び任意に非腫瘍試料、及び/又は血液試料から単離され、ここで特にクローン型の頻度が、腫瘍試料又は細胞懸濁液と非腫瘍試料及び/又は血液試料との間における単離された細胞間で評価又は比較される。

10

【0126】

特定の実施形態では、CD8+T細胞は、腫瘍試料又は細胞懸濁液、及び任意に非腫瘍試料、及び/又は血液試料から単離され、ここで特にクローン型の頻度が、腫瘍試料又は細胞懸濁液と非腫瘍試料及び/又は血液試料との間における単離された細胞間で評価又は比較される。

【0127】

特定の実施形態では、T細胞活性化マーカー又は分泌インターフェロンガンマ又はTNFアルファを含むT細胞は、腫瘍試料又は細胞懸濁液、及び任意に非腫瘍試料、及び/又は血液試料から単離され、ここで特にクローン型の頻度が、腫瘍試料又は細胞懸濁液と非腫瘍試料及び/又は血液試料との間における単離された細胞間で評価又は比較され、及び特にT細胞は、10⁻⁷、10⁻⁸又は10⁻⁹モル/1以下の解離定数を有するT細胞活性化マーカー、インターフェロンガンマ又はTNFアルファに特異的に結合することができる反応性リガンドで染色されるか、又は活性化マーカー、インターフェロンガンマ又はTNFアルファをコードするmRNAと特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブで染色され、そして染色されたT細胞が単離される。

20

【0128】

特定の実施形態において、腫瘍試料から単離されたT細胞は、T細胞活性化マーカーに特異的に結合するリガンドで染色される。

30

【0129】

特定の実施形態では、腫瘍試料から単離されたT細胞は、T細胞が細胞培養の条件下で増殖する増殖工程に供される。

【0130】

特定の実施形態において、T細胞は、10⁻⁷、10⁻⁸又は10⁻⁹モル/1以下の解離定数でT細胞活性化マーカーに特異的に結合することができる反応性リガンドで単離する前に染色され、そして染色されたT細胞が単離される。

【0131】

本発明によるリガンドは、高い親和性及び特異性で標的分子又は分析物に結合する任意の分子であり得る。そのようなリガンドは、長さが10~75ヌクレオチドの抗体、抗体フラグメント、抗体様分子又は核酸アプタマー分子であり、そのいずれも標的分子に結合する。

40

【0132】

抗体フラグメントは、抗体の抗原結合フラグメントであるFabフラグメント、又はペプチドリンカーにより結合される抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域の融合タンパク質である一本鎖可変フラグメントであり得る。抗体様分子は、設計されたアンキリンリピートタンパク質（モレキュラー パートナーズ、スイス）のようなリピートタンパク質であり得る。

【0133】

本発明の上記態様による適切なリガンドは、ファージディスプレイ、リボソームディスプ

50

レイ又はS E L E Xのような方法によっても開発することができ、ここでポリペプチド又はオリゴヌクレオチドは、目的の標的に対するそれらの結合親和性に基づき選択される。さらに、同定されたリガンドの結合親和性は、アミノ酸配列又はヌクレオチド配列の進化のサイクルによって改善され得、進化した阻害剤の選択は、必要とされる親和性に基づいて行われ得る。

【0134】

ある実施形態において、T細胞活性化マーカーは、L A G 3、O X 4 0、C D 1 0 7 a、C D 1 5 4、P D - 1、B 7 - H、V I S T A、B u t y r o p h i l i nのメンバー、B u t y r o p h i l i n様タンパク質、C D 6 9 及びC D 1 3 7 から選択される。特定の実施形態では、T細胞活性化マーカーは、インターフェロンガンマ又はT N Fアルファの分泌である。特に、インターフェロンガンマ及び／又はT N Fアルファを分泌するT細胞は、例えば、ミルテニーバイオテク社、ベルギッシュ グラートバッハ、ドイツによるI F N - 分泌アッセイ又はI F N ガンマ及びT N Fアルファ細胞内サイトカイン染色アッセイ、を用いて単離することができる。

【0135】

特定の実施形態では、核酸調製物が単離細胞から単離される単離工程の前、又は上記の核酸增幅工程を実施する前に、上記単離されたT細胞は、C D 2 5 + 制御性T細胞及び／又は制御性F o x p 3 + T細胞から枯渇される。特に、C D 2 5 + 制御性T細胞及び／又は制御性F o x p 3 + T細胞は、上記細胞を抗 - C D 2 5 抗体又は少なくとも部分的にC D 2 5 又はF o x p 3 をコードする核酸にハイブリダイズすることができる核酸プローブで染色し、染色された細胞を選別することで、例えば、フローサイトメトリー法によって涸渇することができる。

【0136】

特定の実施形態では、細胞懸濁液が、腫瘍試料の腫瘍細胞及び腫瘍に浸潤したT細胞を含む腫瘍試料から調製され、C D 1 5 4 + T細胞が細胞懸濁液から単離され、核酸は単離されたC D 1 5 4 + T細胞から単離され、及び複数のT細胞受容体核酸配列は単離された核酸から得られる。好ましくは、C D 1 5 4 + T細胞は、例えば蛍光色素分子のような光学的標識、又は磁性粒子又はビーズに結合した抗 - C D 1 5 4 抗体で標識され、標識細胞はフローサイトメトリー又は磁気分離によって単離される。有利なことに、細胞懸濁液中に腫瘍抗原が存在するため、例えば抗原、抗原フラグメント又は抗原提示細胞の形態でさらなる刺激は必要ではない。さらに、C D 1 5 4 + T細胞のダウントレギュレーションを防止するための抗 - C D 4 0 抗体の使用も必要ではない。細胞懸濁液の残りの部分は、上記のようにさらに処理することができる。

【0137】

特定の実施形態では、腫瘍特異的T細胞がリンパ球調製物から単離される単離工程に続いて、単離されたT細胞が細胞培養の条件下で増殖する増殖工程が続く。

【0138】

特に、単離された腫瘍特異的T細胞は、1 ~ 2 0 個の異なるクローン型を含み得るか、又はそれらから構成され得る。特定の実施形態では、単離された腫瘍特異的T細胞は、5、1 0、1 5 又は2 0 個の異なるクローン型を含むか又はそれらから構成される。好都合には、単離された腫瘍特異的T細胞は、患者の腫瘍又は腫瘍細胞に対する高い親和性及び反応性によって特徴付けられる。

【0139】

T細胞活性化マーカーを含むか又は暴露するT細胞、及び／又はインターフェロンガンマ又はT N Fアルファを分泌するT細胞は、リンパ球調製物又は増殖したT細胞調製物から単離された腫瘍特異的T細胞調製物から単離することができ、特にT細胞はT細胞活性化マーカーのため、及び／又はインターフェロンガンマ又はT N Fアルファの分泌のために染色され、そして染色された細胞は単離され、活性化された腫瘍特異的T細胞調製物を生じる。

【0140】

10

20

30

40

50

本発明の腫瘍特異的T細胞調製物又は増殖したT細胞調製物は、また、患者の自己腫瘍の細胞懸濁液と共に培養することができ、及びT細胞活性化マーカーを含むか又は暴露するT細胞、及び/又はインターフェロンガンマ又はTNFアルファを分泌するT細胞は、また、上記のT細胞調製物から単離され、活性化された腫瘍特異的T細胞調製物を產生する。

【0141】

そのような活性化T細胞調製物は、特に、高い腫瘍反応性を有するT細胞で特徴づけられる。

【0142】

特定の実施形態において、CD4+T細胞は、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物、又は活性化腫瘍特異的T細胞調製物から単離される。

10

【0143】

特定の実施形態では、CD8+T細胞は、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物、又は活性化腫瘍特異的T細胞調製物から単離される。

【0144】

特定の実施形態において、CCR7+CD62L+セントラルメモリーT細胞、特にCCR7+CD62L+CD45RO+T細胞、より具体的にはCCR7+CD62L+CD45RO+CD45RA-T細胞は、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物、又は活性化腫瘍特異的T細胞調製物から単離され、腫瘍特異的セントラルメモリーT細胞調製物を產生する。

20

【0145】

特定の実施形態では、CD4+CCR7+CD62L+セントラルメモリーT細胞、特にCD4+CCR7+CD62L+CD45RO+T細胞、より具体的にはCD4+CCR7+CD62L+CD45RO+CD45RA-T細胞を、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物、又は活性化腫瘍特異的T細胞調製物から単離され、腫瘍特異的セントラルメモリーCD4+T細胞調製物を產生する。

【0146】

特定の実施形態では、CD8+CCR7+CD62L+セントラルメモリーT細胞、特にCD8+CCR7+CD62L+CD45RO+T細胞、より具体的にはCD8+CCR7+CD62L+CD45RO+CD45RA-T細胞は、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物又は活性化腫瘍特異的T細胞から単離され、腫瘍特異的セントラルメモリーCD8+T細胞調製物を產生する。

30

【0147】

特定の実施形態では、CCR7-CD62L-エフェクターメモリーT細胞、特にCCR7-CD62L-CD45RO+T細胞、より具体的にはCCR7-CD62L-CD45RO+CD45RA-T細胞を、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物又は、活性化された腫瘍特異的T細胞調製物から単離し、腫瘍特異的エフェクターメモリーT細胞調製物を產生する。

【0148】

特定の実施形態では、CD4+CCR7-CD62L-エフェクターメモリーT細胞、特にCD4+CCR7-CD62L-CD45RO+T細胞、より具体的には、CD4+CCR7-CD62L-CD45RO+CD45RA-T細胞は、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物又は活性化腫瘍特異的T細胞調製物から単離され、腫瘍特異的エフェクターメモリーCD4+T細胞調製物を產生する。

40

【0149】

特定の実施形態では、CD8+CCR7-CD62L-エフェクターメモリーT細胞、特にCD8+CCR7-CD62L-CD45RO+T細胞、より具体的には、CD8+CCR7-CD62L-CD45RO+CD45RA-T細胞は、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物、又は活性化された腫瘍特異的T細胞から単離され、腫瘍特異的エフェクターメモリーCD8+T細胞調製物を產生する。

【0150】

50

特定の実施形態において、CD25+及び/又はFoxp3+制御性T細胞は、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物又は活性化腫瘍特異的T細胞調製物から単離され、腫瘍特異的制御性T細胞調製物を產生する。

【0151】

特定の実施形態では、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物、増殖T細胞調製物又は活性化腫瘍特異的T細胞調製物は、特に増殖工程の前に、CD25+制御性T細胞及び/又は制御性Foxp3+T細胞から枯渇する。

【0152】

有利には、得られた腫瘍特異的T細胞調製物は、腫瘍特異的抑制性制御T細胞の不在のために、腫瘍反応性の増大及びより高い増殖能を特徴とする。

10

【0153】

特に、本発明の腫瘍特異的T細胞調製物の腫瘍反応性は、以下により確認され得る：

- 少なくとも本発明の腫瘍特異的T細胞調製物のいずれか1つのアリコート、特に、単離工程でリンパ球調製物から単離された腫瘍特異的T細胞の1つのアリコートを、患者の自己腫瘍の細胞懸濁液と、又は患者の自己抗原提示細胞を併せた自己腫瘍の溶解物と共に培養すること、及び

- 細胞懸濁液の存在下で、T細胞調製物によって產生されたインターフェロンガンマ又はTNFアルファの量を決定すること、及び/又は細胞懸濁液の存在下で、T細胞調製物中のT細胞活性化マーカーのレベルを決定すること、特にOX40、CD107a、CD137、CD154、LAG3、PD-1、B7-H4、PD-1、ブチロフィリンのメンバー、ブチロフィリン様タンパク質及び/又はCD69の量を決定すること。

20

【0154】

特に、インターフェロンガンマ又はTNFアルファの分泌及び/又はT細胞活性化マーカーの発現又は増加した発現を特徴とする腫瘍特異的T細胞調製物は、活性化腫瘍特異的T細胞調製物とみなされる。

【0155】

特定の実施形態では、腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列は、ヒトT細胞受容体の鎖のCDR3領域、特にヒトT細胞受容体のアルファ鎖又はベータ鎖をコードする核酸配列内に含まれる。

30

【0156】

特定の実施形態では、腫瘍特異的T細胞受容体アミノ酸配列は、ヒトT細胞受容体の鎖のCDR3領域、特にヒトT細胞受容体のアルファ鎖又はベータ鎖に含まれるか、又はそのものである。

【0157】

特定の実施形態では、腫瘍特異的核酸配列は、RNAに含まれる。特定の実施形態では、mRNAは、ヒトT細胞受容体のアルファ鎖又はベータ鎖のCDR3領域内に含まれるアミノ酸配列をコードする。

【0158】

特定の実施形態において、リンパ球調製物は、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブと接触する前に、TCR mRNAの転写レベルを増加させる薬剤で処理される。

40

【0159】

有利には、TCR mRNAのレベルを増加させることにより、所望の腫瘍特異的クローニング型の特異的検出のためのシグナル対ノイズ比が改善される。

【0160】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的T細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブは、T細胞細胞質などのアニーリング媒体の生理学的条件下で、45以下の中適な標的アニーリング温度によって特徴付けられる。有利には、中適なアニーリング温度は、リンパ球調製物のための中適な培養温度内にある。特定の実施形態では、中適なアニーリング温度は、20~37である。

50

【0161】

本発明の別の態様によれば、抗がん剤の免疫抑制効果を決定する方法が提供される。この方法は、以下の工程を含む：

- 本発明の方法による腫瘍特異的T細胞調製物を提供する工程；
- 腫瘍特異的T細胞調製物を抗癌剤と接触させる工程；及び
- 接触後の腫瘍特異的T細胞調製物の機能性及び／又は生存能力を決定する工程。

【0162】

特定の実施形態では、腫瘍特異的T細胞調製物の機能性を決定する工程は、以下の工程を含む：

- 腫瘍特異的T細胞調製物を、患者の自己腫瘍の細胞懸濁液と、又は患者の自己抗原提示細胞を併せた自己腫瘍の溶解物と共に培養する工程、及び
- 細胞懸濁液の存在下で、T細胞調製物によって產生されたインターフェロンガンマ又はTNFアルファの量を決定すること、及び／又は細胞懸濁液の存在下で、T細胞調製物中のT細胞活性化マーカーのレベルを決定すること、特にOX40、CD107a、CD137、CD154、LAG3、PD-1、B7-H4、PD-1、ブチロフィリンのメンバー、ブチロフィリン様タンパク質及び／又はCD69の量を決定する工程。

【0163】

本発明の別の態様によれば、腫瘍特異的T細胞を単離するための部品のキットが提供される。このキットは、トランスフェクション試薬と、成熟T細胞に特異的なmRNAに特異的に結合する核酸プローブとを含む。有利には、本発明のキットを用いて本発明の方法を実施することができる。

【0164】

核酸プローブは、混合された細胞集団中の成熟T細胞を同定し、形質移入効率を確認するための陽性対照としての役割を果たすことができる。

【0165】

特に、キットに含まれるトランスフェクション試薬は、成熟T細胞に特異的なmRNAに特異的に結合する上記の核酸プローブ、特注設計されたT細胞クローニング特異的プローブなどの細胞内プローブの送達のために設計されており、別々の波長で個々に監視される。

【0166】

特定の実施形態では、トランスフェクション試薬は、ストレプトリジン-O、金ナノ、リポフェクタミン及びポリエチレンイミンからなる群から選択される。

【0167】

特定の実施形態では、成熟T細胞に特異的なmRNAは、成熟T細胞受容体の1つのサブユニットをコードするmRNAである。特定の実施形態では、核酸プローブは、成熟T細胞受容体の定常部分をコードするmRNAの領域に特異的に結合する。特定の実施形態では、mRNAは、成熟T細胞受容体のベータサブユニットをコードする。

【0168】

特定の実施形態では、トランスフェクション試薬は核酸プローブに接続され、発光と消光の両機能を提供し、且つプローブの細胞取り込みをもたらす。

【0169】

T細胞特異的mRNAプローブは、T細胞に特異的であるT細胞受容体mRNA、例えばTCRアルファ又はTCRベータmRNA、TCRガンマ又はTCRデルタmRNA又は他のmRNA又はRNAに特異的にハイブリダイズすることができる。好ましくは、プローブは、Cベータ1又はCベータ2ドメイン及び膜貫通ドメイン(Jurkat TCRベータmRNAのヌクレオチド181～709、配列番号101)をコードする保存領域を含むTCRベータmRNAの定常領域に結合し、より好ましくは、異なる個体間で高度に保存され、細胞内に存在する他のRNA転写物と少なくとも相同性を共有する領域に結合する。さらに、Jurkat TCRベータmRNAのヌクレオチド356～437及び618～660を含む領域(配列番号101)のような、検出のための非常に効率的で特異的なプローブハイブリダイゼーションをもたらすために構造がほとんど複雑でなく高

10

20

30

40

50

度に保存された領域に、プローブが結合することがより好ましい。最も好ましくは、T細胞特異的RNAプローブは、Jurkat TCRベータmRNAのヌクレオチド370～419を含む領域に特異的にハイブリダイズする。このプローブは、細胞の混合集団におけるT細胞を同定し、トランスフェクション又は取り込み効率を確認するための陽性対照として役立ち得る。任意に、キットはまた、標的RNAに結合せず、細胞内に移されたときに発光性である、一般的な取り込み又はトランスフェクション陽性対照プローブを含んでもよい。キットは、プローブのシグナルバックグラウンドレベルを決定するためにスクランブル陰性対照プローブをさらに含んでもよい。好ましくは、スクランブル陰性対照プローブは、細胞RNAのどの相補的配列にも存在しない配列を含む。

【0170】

10

好ましくは、細胞選別による配列特異的T細胞クローンの濃縮を行う前提として、両方のプローブ（成熟T細胞に特異的なmRNAに特異的に結合する核酸プローブ及び上記の特別に設計されたT細胞クローン特異的プローブ）に由来するシグナルが存在しなければならない。いずれかのプローブシグナルの1つのみを有する細胞、又は全く存在しない細胞は、廃棄される。

【0171】

特定の実施形態では、キットは、TCRmRNAの転写レベルを増加させる薬剤をさらに含む。特定の実施形態において、薬剤は、インターロイキン2又はシクロヘキシミドである。

【0172】

20

特定の実施形態では、キットは、コントロールT細胞株、及びコントロールT細胞株内に含まれかつ別のT細胞又はT細胞株に含まれない特有のアミノ酸配列をコードするmRNAに、特異的に結合するコントロール核酸プローブをさらに含む。特定の実施形態では、この特有のアミノ酸配列は、コントロールT細胞株のT細胞受容体のベータサブユニットのCDR3領域内に含まれる。特定の実施形態では、コントロールT細胞株はJurkat細胞株DSMZの第ACC282である。特定の実施形態では、コントロールT細胞株内に含まれ、別のT細胞又はT細胞株に含まれない特有のアミノ酸配列をコードするmRNAに特異的に結合するコントロール核酸プローブは、配列番号101（Jurkat細胞株由来のヒトT細胞受容体活性ベータ鎖mRNA（クローンJUR-ベータ-1））を特徴とする核酸配列から構成され、又は含む。

【0173】

30

特定の実施形態では、キットは、血液からT細胞を単離するための手段をさらに含む。特定の実施形態では、手段は、CD3、CD8又はCD4に対する抗体を含む磁気ビーズである。特定の実施形態では、この手段は、例えばCD3、CD4又はCD8のようなT細胞特異的マーカーに対する抗体であり、ここで、抗体は、蛍光に基づくフローサイトメトリーに適する。

【0174】

特定の実施形態では、キットは、血液からT細胞を単離するための手段をさらに含む。特定の実施形態では、手段は、CD3、CD8又はCD4のmRNA検出に特異的なプローブであり、特に、CD3、CD8又はCD4をコードするmRNAに特異的にハイブリダイズすることができる標識された核酸プローブである。特定の実施形態では、この手段は、T細胞特異的マーカーのmRNAに特異的なプローブ、特に、例えばCD3、CD4又はCD8のような、T細胞特異的マーカーをコードするmRNAに特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブであり、このプローブは、特に、プローブに結合された発光又は蛍光標識を用いる、発光又は蛍光に基づくフローサイトメトリーに適している。特定の実施形態では、手段は、例えばCD3、CD4又はCD8などのT細胞特異的マーカーのmRNAに特異的なプローブであり、プローブはPCRによる検出に適しており、特にプローブは、T細胞特異的マーカーをコードする核酸に特異的にアニーリングすることができるプライマー又はプライマー対であり、特にT細胞特異的マーカーをコードする核酸を含む細胞のみにおいて、PCRの増幅産物が得られるようなものである。

40

50

【0175】

本発明の別の態様によれば、患者の癌を治療するための方法が提供される。該方法は、本発明の方法により腫瘍特異的T細胞調製物を提供し、該腫瘍特異的T細胞調製物を該患者に投与する工程を含む。特定の実施形態では、この方法は、投与前に特異的T細胞調製物の有効性を確認することをさらに含む。

【0176】

特定の実施形態では、本発明の上記態様又は実施形態の、活性化腫瘍特異的T細胞調製物、腫瘍特異的セントラルメモリーT細胞調製物、腫瘍特異的セントラルメモリーCD4+T細胞調製物、CD8+腫瘍特異的セントラルメモリーT細胞調製物、腫瘍特異的エフェクターメモリーT細胞調製物、CD4+腫瘍特異的エフェクターメモリーT細胞調製物、CD8+腫瘍特異的エフェクターメモリーT細胞調製物又は制御性腫瘍特異的T細胞調製物を患者に投与する。

10

【0177】

本発明の別の態様によれば、人工腫瘍特異的T細胞受容体を製造する方法が提供される。本方法は、以下の工程を含む：

- 本発明の方法による本発明の腫瘍特異的T細胞調製物のいずれか1つを提供する工程、特に活性化腫瘍特異的T細胞調製物を提供する工程、
- 個々の腫瘍特異的T細胞を腫瘍特異的T細胞調製物から単離する工程；
- 単離された個々の腫瘍特異的T細胞の中のT細胞受容体の両方のサブユニットのCDR3領域を決定する工程；
- 両方のサブユニットの決定されたCDR3領域を含む人工T細胞受容体を調製する工程。

20

【0178】

特定の実施形態では、人工T細胞受容体は、受容体が単離され得る部分を含む。特定の実施形態では、人工受容体は、アルファ鎖及びベータ鎖のCDR3領域を含む。特定の実施形態では、人工受容体は、ガンマ鎖及びデルタ鎖のCDR3領域を含む。特定の実施形態では、人工T細胞受容体は、T細胞受容体の四量体に含まれ、少なくとも1つ又は全ての单量体が、決定されたCDR3領域を含む。

【0179】

特定の実施形態では、人工T細胞受容体が組換えにより調製され、ここで人工T細胞受容体をコードする核酸が宿主細胞に導入され、そして発現されて人工T細胞受容体を产生する。特定の実施形態では、核酸は、宿主細胞において作動可能なプロモーターの制御下にある。特定の実施形態では、宿主細胞はヒトCD3+細胞である。人工T細胞受容体を含むこのようなCD3+細胞は、養子移入のため、特に癌を治療するために使用することができる。特定の実施形態において、人工T細胞受容体は、宿主細胞の表面上に機能的に曝露される。

30

【0180】

本発明の別の態様によれば、腫瘍特異的抗原を有する細胞を単離する方法が提供される。この方法は、以下の工程を含む：

- 本発明の方法による腫瘍特異的T細胞調製物を提供する工程、
- 個々の腫瘍特異的T細胞を腫瘍特異的T細胞調製物から単離する工程；
- 単離された個々の腫瘍特異的T細胞のT細胞受容体の両サブユニットのCDR3領域を決定する工程；
- 両サブユニットの決定されたCDR3領域を含む人工T細胞受容体を調製する工程であって、人工T細胞受容体は部分を含み、この部分により人工T細胞受容体が選択的に単離可能となる、
- 人工T細胞受容体を、抗原を有する細胞と接触させる工程、
- 人工受容体に結合する細胞を単離する工程。

40

【0181】

特定の実施形態において、単離された個々の腫瘍特異的T細胞のT細胞受容体は、アルフ

50

ア鎖及びベータ鎖を含み、この両鎖の CDR3 領域が決定される。特定の実施形態では、単離された個々の腫瘍特異的 T 細胞の T 細胞受容体は、ガンマ鎖及びデルタ鎖を含み、この両方の鎖の CDR3 領域が決定される。

【0182】

特定の実施形態では、この部分は、ビオチン又は磁気ビーズである。特定の実施形態では、単離されるべき細胞は、対象の血液から得られる。特定の実施形態では、単離された細胞の少なくとも 1 つから、人工 T 細胞受容体により認識される抗原が、特に質量分析によって同定される。

【0183】

本発明の別の態様によれば、特定の T 細胞受容体核酸又はアミノ酸配列によって特徴付けられる目的の T 細胞クローニング型を濃縮、特に単離する方法が提供される。この方法は、以下の工程を含む：

- 目的の T 細胞クローニング型を含むリンパ球調製物を提供する工程、
- 分離工程において前記リンパ球調製物を複数の画分に分離する工程、
- 前記複数の画分に含まれる細胞を、増殖工程における細胞培養の条件下で増殖させる増殖工程、及び
- 選択工程において前記特異的 T 細胞受容体核酸配列又はアミノ酸配列を含む前記複数の画分のうちの少なくとも 1 つの画分を選択する工程。

【0184】

特に、リンパ球調製物は複数の画分に分離され、この複数の画分の全てではなく、好ましくは複数の画分の半分未満、より好ましくは複数の画分の 10 % 未満、さらにより好ましくは 5 % 未満、最も好ましくは 1 % 未満が、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列を含む。そのような分離は、複数のうちの画分当たりの細胞の数を制限することによって達成され得る。

【0185】

特定の実施形態では、リンパ球調製物は、目的の T 細胞クローニング型を含む最初のリンパ球調製物を、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列又はアミノ酸配列に対応する T 細胞受容体の V セグメント内に含まれるアミノ酸配列に特異的に結合することができる反応性リガンドと接触させることにより提供され、ここでリガンドは検出可能な標識に結合しており、検出可能な標識を有する T 細胞は最初のリンパ球調製物から単離され、上記のリンパ球調製物が得られ、これは、本発明の上記態様により分離されるべきものである。

【0186】

特定の実施形態では、リンパ球調製物又は最初のリンパ球調製物は、患者から得られた試料によって提供される。特定の実施形態では、患者から得られた試料は、腫瘍試料、組織試料又は体液試料、特に血液試料、より具体的には末梢血の試料である。

【0187】

特定の実施形態では、複数の画分のそれぞれは、 10^5 以下の細胞、好ましくは 10^4 以下の細胞、より好ましくは 10^3 以下の細胞、さらにより好ましくは 10^2 以下の細胞が含まれる。

【0188】

特定の実施形態では、リンパ球調製物は、少なくとも 96 の画分、好ましくは 96 画分に分離され、特に各画分は 10^5 以下の細胞を含む。

【0189】

特定の実施形態において、リンパ球調製物は、96 画分 ~ 384 画分に分離される。

【0190】

特定の実施形態では、選択する工程は、前記複数の画分から T 細胞受容体核酸配列を取得し、前記選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列を含む画分を同定する工程を含み、特に T 細胞受容体核酸配列は、増幅、特に PCR により得られる。

【0191】

特定の実施形態では、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体配列を含む画分は、選択された

10

20

30

40

50

腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸の少なくとも一部に特異的にアニールするプライマーを用いる増幅反応により同定され、ここでは、特に、腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列を含まない画分は増幅産物を示さない。

【 0 1 9 2 】

特定の実施形態では、T 細胞受容体核酸配列は、それぞれの画分に含まれる細胞の 1 つのアリコート又はそれぞれの画分の上清から得られる。

【 0 1 9 3 】

特定の実施形態では、選択する工程は、複数の画分を、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列に特異的に結合する核酸プローブと接触させる工程であって、該核酸プローブは検出可能な標識に結合している工程、及び検出可能な標識を有する T 細胞を含む複数の画分のうちの 1 つの画分を選択する工程を含む。

10

【 0 1 9 4 】

特定の実施形態では、濃縮する方法は、さらに以下の工程を含む：

- 選択された画分が第 2 の複数の画分に分離される、第 2 の分離工程、
- 第 2 の複数の画分に含まれる細胞が、細胞培養条件下で増殖される、第 2 の増殖工程、及び
- 選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列を含む、第 2 の複数の画分の少なくとも 1 つの画分が選択される、第 2 の選択工程。

【 0 1 9 5 】

特に、選択された腫瘍特異的 T 細胞受容体核酸配列を含む画分が新たに選択されるごとに、分離工程、増殖工程及び選択工程を繰り返してもよい。好ましくは、分離工程、増殖工程及び選択工程は、1 ~ 4 回繰り返される。

20

【 0 1 9 6 】

特定の実施形態では、特定の T 細胞受容体配列によって特徴付けられる目的の T 細胞クローン型を濃縮、特に単離する方法は、マイクロアレイで実施され、ここで、リンパ球調製物が、上記の複数の画分を含むマイクロアレイの異なるコンパートメントにおいて分離される。そのようなマイクロアレイは、複数のウェルを含むマイクロタイターブレート、又は複数の空洞及び / 又はチャネル、又はマトリックスを含むマイクロ流体チップであってもよく、ここで、異なる画分は、画分中の細胞が自由に拡散するのを妨げるマトリックスに埋め込まれている。

30

【 0 1 9 7 】

本発明のさらなる態様によれば、オリゴペプチド又はポリペプチドが提供され、ここで、該オリゴペプチドは、配列番号 0 1 (C A S S V D R G A E A F F)、配列番号 0 2 (C A W N K Q V D G Y T F)、配列番号 0 4 (C A S S P D G E T Q Y F)、配列番号 0 7 (C A I S D W T G S N Y G Y T F)、配列番号 1 1 (C A S S S G L V Y E Q Y F)、配列番号 1 2 (C A S S T G T G G L G E L F F) によって特徴付けられるオリゴペプチドを含むか又はそれからなる、又は該ポリペプチドは、配列番号 0 1 、配列番号 0 2 、配列番号 0 4 、配列番号 0 7 、配列番号 1 1 又は配列番号 1 2 によって特徴付けられているオリゴペプチドを含む。

40

【 0 1 9 8 】

驚くべきことに、特定の C D R 3 ペプチド配列が、N S C L C のような同じ疾患に罹患している患者の大部分に見出され得ることがわかっている。したがって、本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドは、特に 10^{-7} 、 10^{-8} 又は 10^{-9} mol / l 以下の解離定数で、それらのオリゴペプチド又はポリペプチドに特異的に結合することができる反応性リガンドを生成するために使用され得る。

【 0 1 9 9 】

本発明のさらなる態様によれば、核酸が提供され、この核酸は、配列番号 0 1 、配列番号 0 2 、配列番号 0 4 、配列番号 0 7 、配列番号 1 1 又は配列番号 1 2 によって特徴付けられているオリゴペプチドをコードする核酸配列からなるか、又はそれを含む。

【 0 2 0 0 】

50

したがって、本発明のさらなる態様において、本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドは、本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドに特異的に結合することができるリガンドを製造するために、使用することが提供される。そのようなリガンドの製造方法は当該技術分野において公知である。

【0201】

本発明のさらなる態様によれば、本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドに特異的に結合することができる反応性リガンドが提供され、ここで、特に反応性リガンドは、配列番号01、配列番号02、配列番号04、配列番号07、配列番号11又は配列番号12によって特徴づけられているオリゴペプチドと、 10^{-7} 、 10^{-8} 又は 10^{-9} mol / 1以下の解離定数で、特異的に結合することができる。

10

【0202】

本発明のさらなる態様によれば、NSCLCを診断するための方法における本発明の特異的反応性リガンドの使用が提供される。

【0203】

本発明のさらなる態様によれば、NSCLCを診断するための方法が提供される。この方法は、以下の工程を含む。

- 患者から得られた試料を提供する工程であって、前記試料はT細胞を含み、
- 特に本発明のリガンドと試料を接触させることによって、本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドを含むT細胞の存在を検出する工程。

【0204】

20

特定の実施形態において、本発明のリガンドは、検出可能な標識に結合される。特定の実施形態において、本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドを含むT細胞は、本発明のリガンドによって標識され、それによって検出される。

【0205】

特定の実施形態では、本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドを含むT細胞の存在は、NSCLCの発生を示す。

【0206】

上記局面の代替法によれば、NSCLC(非小細胞肺癌)を診断するための方法が提供される。この方法は、

- 患者から得られた試料を提供する工程であって、試料はT細胞を含む工程、
- 試料から核酸調製物を得る工程、
- 本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドをコードする核酸配列の存在を検出する工程。

30

【0207】

本発明の別の態様によれば、特定の人工腫瘍特異的T細胞受容体を製造する方法が提供される。この方法は、以下の工程を含む：

- 本発明のオリゴペプチド又はポリペプチドを含む人工T細胞受容体を特に両方のサブユニットにおいて調製する工程。

【0208】

本発明は、以下の実施例及び図面によりさらに説明され、それからさらなる実施形態及び利点を引き出すことができる。これらの実施例は、本発明を説明することを意図しているが、その範囲を限定するものではない。

40

【実施例】

【0209】

実施例1：比較配列分析による腫瘍特異的T細胞及び腫瘍特異的配列の同定

【0210】

利用可能な次世代シーケンシング(NGS)テクノロジーを用いて、ハイスループットで、1試料あたり数千のTCRベータCDR3領域(1つのTCRが1つのT細胞に相当する)を配列決定し、これにより、ヒトTCRベータのCDR3-領域のシークエンシングライブラリーが生成された。得られた配列をバイオインフォマティクスツールで分析し、

50

試料当たりの最終結果は、それぞれのクローン型（同じ TCR ベータを有する T 細胞のタイプ）を列挙して表にする。

【 0 2 1 1 】

TCR レセプターの CDR3 領域は、定常の V 及び J セグメント（図 1 参照）及びそれらの間の非常に可変な領域によって決定される。この構造に起因して、1 つの同一の CDR3 アミノ酸配列は、複数のヌクレオチド配列によってコードされ得、これは異なる V / J セグメントで構成されていてもよい。1 組の腫瘍特異的 T 細胞及び潜在的な腫瘍反応的 T 細胞（TRTC）のうち、1 つのアミノ酸配列あたり、複数の（> 1）ヌクレオチド CDR3 配列の出現は、それぞれの CDR3 アミノ酸配列を有する T 細胞は、腫瘍細胞に対して反応性であることの強い教示である。

10

【 0 2 1 2 】

CDR3 配列は、そのスコア（下記の表 1 を参照）が 1000 以上であれば、CDR3 配列の最終選択にその特性と共に常に加えられる。

【 0 2 1 3 】

配列プロファイリング及びバイオインフォマティクス分析による腫瘍特異的 T 細胞（TSTCs）の同定のためのスコアリングスキーマ

【 0 2 1 4 】

本方法は、以下に示すスコアリングシステム（表 1）に基づいており、ここでは 1 つ又はいくつかの試料を採取して並行して分析し、各試料の種類ごとの頻度に対する各比率のクローン型について最良のスコアを得る。一般的に、腫瘍浸潤リンパ球は、以下の一連の分析ステップによって同定された：

20

【 0 2 1 5 】

a) 次世代シークエンシング（NGS）は、腫瘍試料から開始して実施される。腫瘍試料は、腫瘍組織から採取された 1 つの試料又は複製試料のセットとして定義される。実際には、TCR を分析する材料は、以下のいずれかから選択される：

i .) 異なる生検又は 1 つの生検の中の異なる領域の選択。これは免疫組織化学的染色によって補助され、ここでは、特に、腫瘍反応性 T 細胞（TRTC）を、好ましくは T 細胞活性化マーカー、例えば LAG3、OX40、CD107a 又は CD137 で免疫組織学的により染色し、染色された領域を DNA 抽出のために選択する；

i i .) 腫瘍組織の溶解。TCR 分析の出発点としての単一細胞懸濁液の調製のためであり、ビーズベースの技術による。単一細胞懸濁液は、異なる T 細胞サブセット、例えば、CD4+ 及び CD8+ サブセットに分けることができる。

30

さらに、腫瘍試料は、細胞材料のための資源として細胞保存条件下で保存することができる。

【 0 2 1 6 】

b) 同じ患者から得た非腫瘍試料を、腫瘍試料に隣接する組織 / 領域、もし可能であれば複製で、可能な場合には別個の組織スポットから選択し、かつ 及び / 又は TCR / CDR3 NGS 配列分析を行った。

【 0 2 1 7 】

c) 血液試料（細胞成分）を同じ患者から採取する：標準的な血液学的分画法により、細胞成分を全血から単離し、 及び / 又は TCR / CDR3 NGS 配列分析を行い、TCR プロファイルを計算した。

40

【 0 2 1 8 】

d) 血清、血漿又は他の無細胞生物学的液体 / 組織は、場合により標準的な血液学的分画法による細胞成分のさらなる除去によって、同じ患者から採取される。無細胞試料中の TCR 特異的 DNA の存在は、T 細胞に対するアポトーシス過程の強力な教示となり得る。有意な量のクローン型（以下の表 1 を参照）が無細胞試料及び腫瘍において見出される場合、そのスコアはスコアリング表に寄与する（表 1）。

【 0 2 1 9 】

e) 任意に、患者の治療 / 診断の過程における 2 つ以上の時点が、スクリーニングに使

50

用される。すなわち、試料は血液などから異なる時点で採取される（2. a - d 参照）。これにより、例えば再発の診断、又は転移などに対する新しいT S T Cの検出をし得る。

【0220】

NGSデータからのクローン型（シーケンスクラスター）計算の原理

【0221】

a. T C R - 及び T C R - 鎖の C D R 3 領域は、NGS技術によって配列決定される。C D R 3 領域に隣接するV - セグメント及びJ - セグメントに特異的に結合するT C R 又はT C R プライマーを用いて、2段階P C R法（WO2014/096394 A 1に開示されている）を行った。DNAをNGSプロセスの出発物質として使用した。

【0222】

b. 試料当たりの莫大な数（> 10⁵）の読み取り断片（ヌクレオチド配列）は、NGSによって一般的に作成され、この読み取り断片は実質同一のヌクレオチド配列のクラスターに合併され、クラスターあたりの読み取り断片の数によってそのクラスターの頻度が決定され、ここでクラスターの頻度はクラスターに含まれる試料中の読み取り断片のパーセントで測定される。

【0223】

c. クラスター化は非常に慎重であり、2つのラウンドで機能する：第1ステップにおいて、100%のヌクレオチド配列同一性を有する全ての読み取り断片は、クラスター配列が読み取り配列と同一である1つのクラスターとしてカウントされる。第2のステップでは、クラスターを互いに比較し、そして、

i 1 bp 以下のミスマッチ及び

i i 一方のクラスター（クラスターA）が、他方のクラスター（クラスターB）よりも少なくとも20倍多くの読み取り断片を有する場合、

そのクラスターはマージされてクラスターAと同一であるとみなされる。ヌクレオチド配列クラスターは、クローン型と等価であるとみなされる。

【0224】

d. ヌクレオチド配列クラスターはアミノ酸配列（ペプチド）に翻訳され、表にされる。各クラスターは、（1. b）で定義された頻度を持つ1つのクローン型とみなされる。頻度は、試料中のそれぞれのT細胞の頻度の直接測定値である。

【0225】

e. 実質的に同一のアミノ酸配列を共有するクラスター（クローン型）は、クラスター型にマージされ、クラスター型の頻度は前記クラスター型の要素であるヌクレオチド配列クラスターの頻度の合計と同一である。

【0226】

T S T C（腫瘍特異的T細胞）スコアのランク付けは、4桁の数字1011、1010、1001、1000（最高から最低まで）で与えられ、他のすべてのケースは除外される。

【0227】

列内では、得点は以下のように定義される。

【0228】

【表1】

T細胞のC D R 3 の ヌクレオチド配列	T S T C スコア	A : 腫瘍組織	B : 非腫瘍組織	C : 血液細胞 成分	D : 無細胞DNA
Seq1	1011	1	0	1	1
Seq2	1110	1	1	1	0
Seq3	1001	1	0	0	1
...					

表1 最良のT S T C - クローン型の選択のための得点表

10

20

30

40

50

【0229】

各列（1つの組織型につき1つの列）内で、CDR3のヌクレオチド配列（Seq 1、2、3、...）ごとに、単純な2進法スコアが与えられる：「1」は、対応するCDR3のDNA配列が生じることを意味し、「0」は、対応するCDR3のDNA配列が存在しないか、低レベルで生じることを意味する。正確な定義を以下に示す。表2に示すように、2進法スコアは4桁のTSTCスコアに結合される。受け入れられたTSTCスコアのランク付けは、自然順序：1011、1010、1001、1000（最良から最悪）で与えられ、他のすべてのスコアは除外される。TSTC得点スキーマはまた、以下の場合をも含み、例えば、血液試料が存在しない場合、すなわち列C及びDは「0」で埋められ、又は腫瘍試料のみが存在する場合、すなわち列B、C及びDは「0」で埋められ得る。10
列（=組織の1種類）あたりの2進法スコアは、次のように定義される：

【0230】

A：スコア = 1：配列（seq 1、2、...）は、（最高から最低までの頻度によって選別された）上位100個のクローン型のうちの1つであり、完全なオープンリーディングフレームを示し、すなわち終止コドン又はフレームシフトは見つからないことをいう。それ以外は、スコア = 0。

【0231】

B：スコア = 0：配列（seq 1、2、3、...）は、非腫瘍試料には存在しないか、又は非腫瘍試料では同一であるが、pep Bが非腫瘍試料中の頻度であり、pep Aが腫瘍試料中の頻度である場合、その比 $R = \text{pep B} / \text{pep A}$ が0.2、0.15、0.1又は0.05以下である場合である。それ以外の場合はスコア = 1。20

【0232】

C：スコア = 1：配列Seq 1、2、3、...の頻度が、腫瘍組織（A）における対応する配列の頻度よりも低い場合である。そうでなければスコア = 0。

【0233】

D：スコア = 1：配列Seq 1、2、3、...の頻度が、無細胞DNA由来の全配列の0.001%より高い場合。そうでなければスコア = 0。

【0234】

E：既にTSTCスコア（上記A～Dを参照）によって選択されたCDR3配列Seq 1、2、3...については、場合により、以下の追加のフィルターを適用することができる：A（腫瘍試料）由来の同一CDR3アミノ酸配列が、異なるCDR3ヌクレオチド配列Seq 1、2、3...によりコードされる場合、これは、収束組換え及び高度に免疫原性の腫瘍抗原の指標である。この特性を有するクローン型には、最も高いTSTCスコア = 1011が与えられる。30

【0235】

F：TSTCスコアによって（上記のA～Dを参照して）選択されたCDR3配列Seq 1、2、3...については、場合により、以下の追加のフィルターを適用する：A（腫瘍試料）由来のアミノ酸配列に翻訳されたCDR3配列を、BLOSUM80又はBLOSUM62のようなアミノ酸置換マトリックスを用いたタンパク質アラインメント（blast）により互いに比較し得る。最大1ミスマッチと非常に類似しているアミノ酸配列は、類似性クラスターに分類され、類似性クラスターの各メンバー（Seq 1、2、3...）には、その類似クラスター内の最良得点のCDR3配列と同じTSTCスコアが与えられる。40

【0236】

各スコアグループ1011、1010、1001、1000（最も良いものから最悪のもの）内で、CDR3ヌクレオチド配列は頻度が最大のものから最低のものまで選別され、最後の選別されたリストから、上位1～100のCDR3ヌクレオチド配列が次のステップのための候補群として選択される。

【0237】

他の実施形態では、上位5、10、15、20、30、40又は50のCDR3配列が選50

択される。しかし、好みいのは 20 である。

【 0 2 3 8 】

最良の得点クローン型 (20まで) は、以下のものとして保存される：

a . 蛍光タグの合成のためのテンプレート

b . 遺伝子導入による新規の腫瘍特異的 T 細胞の合成のためのテンプレート。

【 0 2 3 9 】

上記の腫瘍試料は、患者から得た単一の試料又は試料のセットであり得る。したがって、1人の患者由来の複数の腫瘍試料を、上記のように分析することができる。異なる腫瘍試料で生じたクローン型は、腫瘍試料の少数に存在するクローン型よりも好みい。

【 0 2 4 0 】

実施例 2 : 標的配列の同定

【 0 2 4 1 】

目的の T 細胞クローンの T C R 核酸配列が同定されると、前記 T 細胞クローンの検出及び濃縮に使用することができる理想的な標的配列を定義するためのさらなるステップが必要である。最初に、特定のゲノム配列を使用して、少なくとも部分的に成熟した m R N A 配列を生成し、生存細胞中のプローブによる特異的認識の標的となり得ないあらゆるイントロン部分を捨てる。次に、クローン成熟 m R N A 配列を、標的特異的配列のみを同定するために、目的のクローンに属さない他の全ての T 細胞の成熟 T C R m R N A を含む完全なトランスクリプトームと比較する。特に、主に T C R m R N A の C D R 3 領域は、クローン型ベースで異なり、細胞内の他の転写物との差異も表示する。標的 - クローン特異的配列は、プローブハイブリダイゼーションを妨害する構造についてさらに分析することができる。これは、ハイブリダイゼーション効率を検査することによって実験的に行うことができ、又は M F o l d 又は U N A F o l d (h t t p : / / m f o l d . r n a . a l b a n y . e d u /) などのツールを用いたコンピューター解析によって行うことができる。最高デルタ G (ゼロに近い) を有する領域をプローブ設計のために選択することが好みい。

【 0 2 4 2 】

実施例 3 : インビオ検出のためのプローブ

【 0 2 4 3 】

目的のクローンの標的特異的 D N A 配列を同定した後、生きた T 細胞における検出のためのプローブを設計することができる。異なるプローブ形式を使用することができる。しかしながら、標的 - 特異的領域の長さに従って、多部位プローブ又は單一オリゴヌクレオチドプローブを選択することができる。分子ビーコンは、細胞培養に適合する温度で標的 R N A にハイブリダイズするように設計することができる。 P R E M I E R B i o s o f t I n t e r n a t i o n a l (w w w . p r e m i e r b i o s o f t . c o m) によって開発された B e a c o n D e s i g n e r (商標) などのソフトウェアパッケージは市販されている。分子プローブは、標的にハイブリダイズしない間システムの構造によりクエンチされる、大部分が末端に結合した色素の対を有することができる。標的ハイブリダイゼーションの際に、末端システムが開かれて、色素が消光されなくなる。しかし、生細胞の細胞質のような複雑な環境では、タンパク質との非特異的相互作用がシステムを開き、偽陽性シグナルを生じることがある。分子ビーコンの特異性を高めるために、第 2 の分子ビーコンは、2 成分プローブとして第 1 の分子ビーコンに直接隣接してハイブリダイズするように設計することができる。両方のビーコンの末端が 4 ヌクレオチドまでの距離内で特異的にハイブリダイズする場合、隣接する色素間の非常に特異的な F R E T シグナルを用いてハイブリダイゼーション事象を検出することができる。分子ビーコン形式以外の非構造化プローブでも多部位認識を行うことができる。いわゆる S m a r t F l a r e は、金ナノ表面に近接して固定化された蛍光色素の細胞トランスフェクション及び消光を促進する金ナノ粒子の特性を組み合わせた新しいプローブ形式である。したがって、単一の蛍光色素を有する所与の標的配列に相補的な単純なプローブで十分である。プローブの色素は、金ナノ粒子に固定された別の核酸にハイブリダイズすると、効果的に消光される。

10

20

30

40

50

生存細胞へのトランスフェクションの際に、プローブはその相補的標的配列との特異的ハイブリダイゼーションにより置換され、ナノ粒子から分離することによって蛍光を発することができる。強制インターラーニングプローブ（F I T プローブ、国際公開第2006/072368号A2）はさらに望ましい形式である。形成されたプローブ-標的二本鎖の核酸塩基間の特定の色素のインターラーニングは、前記色素の2つの複素環系のねじり柔軟性を制限する。その結果、F I T プローブは、ハイブリダイゼーション時の蛍光を強く増加させる。チアゾールオレンジ（T O）を有するF I T - プローブは、蛍光強度の少なくとも25倍の増強を伴って、相補的DNA又はRNAの存在下で、シグナルを生じることが報告されている。より最近では、二重蛍光色素標識P N A F I T プローブが蛍光強度の最大450倍の増強によって相補的DNA又はRNAの高感度検出のために、極めて応答性が高く、明るいハイブリダイゼーションプローブであることが発見された。既存のDNAベースの分子ビーコンとは対照的に、このP N Aベースのプローブ形態は、色素-色素コミュニケーションを強制するためのステム配列を必要としない。F I T プローブを含むオキサゾールイエロー（Y O）は、蛍光の減衰によって一塩基ミスマッチを識別することが示されており、一塩基多型（S N P）を特異的に検出しなければならない場合に使用することができる。さらに、C末端リジン残基の付加は、さらなるトランスフェクション試薬を必要とせずに生細胞への取り込みを可能にすることが実証されている。F I T - プローブはもともとP N A - ベースのプローブとして公開されていたが、DNAとL N Aに基づくF I T プローブも同様に開発されている。T O及びY Oなどの二重色素の組み合わせを有するDNA F I T プローブは、分子ビーコンの輝度を超えることでインビオにおいて、非常に特異的であることが判明した。さらに、P N A及びDNAのいわゆるミックスマーが市販されている。したがって、生存T細胞クローニングの効率的な蛍光検出のためのF I T プローブを生成するために、特異性、溶解性及び融解温度を最適化することが可能である。

【0244】

それらの塩基組成及びヌクレオチドの種類に応じて、異なる長さが標的T C R m R N Aの細胞質認識に最適であろう。標準P N Aプローブの標的特異的ハイブリッド形成部分は20塩基より短く、標準DNAプローブでは35塩基より少ないことが好ましい。しかしながら、核酸の特異性及び/又は融解温度を上昇又は低下させるために用いることができる多くの非標準的改変が存在する。例えば、無塩基部位及びロック解除された核酸は、融解温度を低下させ、特異性を増加させる可能性がある。L N AはDNAよりも高い融解温度を有し、ヌクレアーゼ分解から保護される。4つの天然塩基のうちの3つに対応するイノシンなどの修飾塩基でさえ、細胞内認識を微調整するために使用することができる。

【0245】

インビオで生じる可能性のある核酸構造が非常に複雑なため、その機能性に対して構造に依存しない単一成分（m o n o p a r t i t e）プローブを選択することが好ましい。他の細胞転写産物及び構造的接近可能性と比較して、予め同定された、好ましい特異的標的領域があれば、当業者は、それぞれのバイオインフォマティクス設計ツールを用いて適切なプローブを設計する方法を知るであろう。

【0246】

実施例4：プローブ取り込み機構

【0247】

核酸は、多数のメカニズムによって生きた細胞に取り込まれる可能性がある。このプロセスは、真核生物細胞が非ウイルス性機構の標的とされる場合、トランスフェクションと呼ばれる。化学ベースのトランスフェクション、非化学的トランスフェクション、及び粒子ベーストランスフェクションと呼ばれる、3つの一般的なトランスフェクション方法が利用可能である。化学ベースのトランスフェクション法は、細胞摂取を促進する追加の化学物質を利用する。そのような添加剤は、塩、ポリマー、リポソーム及びナノ粒子又はそれらの混合物であり得る。

【0248】

10

20

30

40

50

トランスフェクション法の効率は、細胞型だけでなくヌクレオチドのサイズ及び形態に強く依存する。小さな核酸は、細孔形成化合物によって効率的にトランスフェクションされ得る。ストレプトリジン - O (S L O) 可逆的透過化は、 s i R N A 又は分子ビーコンなどの小さな核酸を送達する効率的な方法であり、 T 細胞と適合性がある。さらに、 T 細胞は、 S m a r t F l a r e s のような標識されたプローブと結合する金ナノ粒子によって効果的にトランスフェクションされている。また、 L i p o f e c t a m i n e (登録商標) は、 s i R N A 又はアンチセンス R N A などの小さなオリゴヌクレオチドの T 細胞へのトランスフェクションに効果的に使用された。

【 0 2 4 9 】

特に、 P N A は、いくつかのリジン残基によって単純に伸長することにより、追加のトランセフェクション試薬なしで細胞の取り込みを達成することができる。好ましい非化学的トランセフェクション法は、マグネットフェクション及びエレクトロポレーションである。より好ましくは、胚性幹細胞及びナイーブ免疫細胞を含む 20 種以上の細胞型に、カーボンナノチューブ、タンパク質及び s i R N A などの広範な物質を送達することが実証された細胞スクイージングである。 S q z バイオテクノロジー社のマイクロ流体プラットフォームは、トランセフェクション試薬を必要とせずに、 T 細胞のハイスループットと効率的なトランセフェクションを可能にする。

【 0 2 5 0 】

実施例 5 : 特定のシグナルの増加 :

【 0 2 5 1 】

細胞中の T C R m R N A 転写物のレベルは、好ましくは単一成分プローブによる特異的検出に関し、ノイズに対する高いシグナル比を提供するために増加させることができる。本発明者らは、 10 U / m l の I L - 2 で T 細胞を一晩前処理すると、 T C R m R N A の転写レベルを増加させることができることを発見した。あるいは、シクロヘキシミドで T C R m R N A レベルを上昇させることができる。タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (C H X) は、 T C R - アルファ遺伝子転写の同時増加なしで成熟 T C R - アルファ転写物蓄積の 20 倍の増加を誘発することから、 C H X が成熟 T C R - アルファ m R N A の蓄積を妨げる核転写後事象を逆転させることを示唆する。 T C R - ベータ遺伝子転写は、 2 ~ 4 倍にしか増加しないが (W i l k i n s o n & M c L e o d E M B O J . 1 9 8 8 J a n ; 7 (1) : 1 0 1 - 1 0 9) 、 C H X はまた、 90 倍を超える全長 T C R - ベータ転写物を誘導する。 C H X による阻害が可逆的であることが判明したので、プローブによる検出のために m R N A レベルを 10 倍に上昇させるのに十分な短時間だけのインキュベーションを行うことが好ましい。

【 0 2 5 2 】

もう 1 つの選択肢は、 T 細胞を活性化し、活性化された細胞を 24 時間インキュベートすることであり、それにより特異的検出のために m R N A の量が倍増する。

【 0 2 5 3 】

実施例 6 : T 細胞クローニング型の配列特異的単離のためのアレイベースの方法

【 0 2 5 4 】

T 細胞クローニング型、特に本発明の腫瘍特異的クローニング型は、クローニング陽性ウェルに T 細胞を希釈し、所望のクローニング型を含む均質な T 細胞集団が生成されるまで、この方法を繰り返すことを含む反復アプローチによって単離することができる。

【 0 2 5 5 】

核酸に基づくアッセイは、細胞内での直接的なプローブハイブリダイゼーション又は検出のための標的配列の特異的増幅のいずれかによって行うことができる。直接プローブハイブリダイゼーションは、死細胞 (M i c r o s c o p e) による分析、マイクロタイターウェルスキャン、又は F A C S) 又は生細胞 (F I T - プローブ、 M i c r o s c o p e) による分析、マイクロタイターウェルスキャン、又は F A C S) を用いて行うことができる。増幅反応は、好ましくは、アレイ試料についての (R T -) P C R である。

【 0 2 5 6 】

10

20

30

40

50

適切な試料は、これに限定されないが、細胞外核酸（無細胞）を含み、上清又はアレイ表面は、有益な細胞を死滅させることなく特異的かつ高感度な同定に使用できる無細胞核酸を含み得る。これにより、細胞分裂や、アレイの一部（ウェル又は位置）、精製された核DNA、精製されたmRNAに由来する粗溶解物を必要とせずに、標的細胞のより迅速な単離が可能になる。

【0257】

この方法に適合する異なるアレイ形式は、これに限定されるものではないが、以下を含む：

- マイクロタイターウェル（少なくとも2ウェル、好ましくは6ウェルより多く、より好ましくは128ウェルから384ウェルの間である）。

- 埋め込みアレイ。細胞は、好ましくは、細胞の自由な拡散を妨げるマトリックスによって埋め込まれ、したがって、最初に沈着されたクローンの座標を保存する。マトリックスは、好ましくは、アガロース、ゼラチン又はポリアクリルアミドなどのポリマーを含む。

- ランダムアレイ。ランダムアレイは、試料を含むのに、事前に形成されたグリッドに依存しない。

- マイクロフルイディック。マイクロ流体アレイは、細胞及び／又は核酸の初期細胞分布、洗浄、希釈、増殖及び回収を含む取り扱い段階を可能にするチャネル及び他の構造によって特異的に形成することができる。そのようなマイクロ流体アレイの非限定的な例は、<http://www.biome-msrc.org/research/ce11-tissue-microengineering/living-cell-array> に示されている。

【0258】

所定の希釈アリコート又はウェル内に1つ以上のクローン型が存在しないことを確実にするために、試料中の標的クローン型の頻度に依存して、適切な限界希釈を行うことができる。単一の細胞さえも、誘電泳動（不均一電場中生きた細胞のような誘電体粒子がマイクロウェルを離れるのを防ぐプロセス）によって、マイクロウェルを連通したアレイに直接閉じ込めることができる。

【0259】

培養条件は、細胞の増殖を最適化するように選択することができる。これは、試料から希釈された単一細胞の細胞死又は増殖の欠如を防止するフィーダー細胞との共培養を含み得る。さらに、細胞分裂をさらに増強するために、培地にサイトカイン及び栄養素を含めることができる。所望のT細胞の種類に応じて、異なる最適条件を適用することができる。場合によっては、試験のための無細胞核酸の供給源としての標的T細胞によるエキソソームの生成を誘発又は増強することができる。ここで前記エキソソームの産生は抗原提示細胞による、又はIL-2と接触されることによって前記T細胞の活性化により引き起こすことができる。

【0260】

血液試料から単離された 10^6 個のT細胞の集団が、予め同定されたCDR3を有する1つのT細胞を含むと仮定すると、アレイベースのスクリーニング手順を用いることができる。典型的なRT-PCR装置は、384ウェルのマイクロタイタープレートを取り扱うことができる。 10^6 個のT細胞は、ウェルあたり約 3×10^3 個の細胞に相当する384個のウェルに等しく希釈することができ、そのうち1個は目的のクローン型を保持する。4分割の後、各細胞は8個の複製で存在し、これにより、目的のクローンは理想的には以前と同じ $1 : 3 \times 10^3$ の比で存在する。上清の半分を回収し、1アリコート384マイクロタイタープレートの座標を維持しながらDNA（又はmRNA）を精製する。（DNA又はRNAの自動精製方法については、<https://www.promega.com/resources/tools/automated-methods/> を参照）。試料をRT-PCRに供して、標的クローン体の座標を検出する。座標が分かれれば、座標からの生きた細胞のアリコート（ 10^4 細胞中4個）を別の384ウェルプレートに

10

20

20

30

40

50

希釈する。ここで、最大4つのウェルには、約1:30の比で標的クローニング型が含まれ得る。4回の細胞分裂の後、ウェルをPCRによって再びスクリーニングし、陽性ウェルのアリコート(120例中4例)を適切な寸法を有するマイクロタイプレートに再度希釈してクローニング培養物を得ることができる。いくつかの標的細胞の潜在的な損失でさえも、全ての陽性ウェルを1つの384プレートに希釈することができる。さらに4回の細胞分裂の後、RT-PCR又は他のプローブベースの方法によって、陽性クローニングをアリコート中で迅速に同定することができる。増殖条件を最適化するために、サイトカイン及びフィーダー細胞(表面抗原によって容易に区別することができる)を有する適切な培地を使用することができる。

【0261】

10

より多くの陽性のクローニングが100万個の細胞の元の試料に存在する場合、この手順は、増殖のために増殖性クローニング型を得る機会をより高くするために、より多くの陽性クローニングを処理することができる。

【0262】

この手順では、細胞分裂速度及び標的クローニング型の増殖能力が制限されている。インビトロで初めてCD4⁺T細胞が分裂するのに24~48時間かかることがあり、一方でその後の分裂は典型的にはより速く起こる。1つのT細胞分裂が1日かかる場合、3つのアレイを有する手順は少なくとも2週間かかり得る。しかしながら、効果的な治療のために前もってクローニング型の増殖が不可欠である。上記の方法では、増殖性T細胞の単離が本質的に好ましい。無細胞上清がTCR-ベータmRNAを含有する場合、上清の非破壊分析により、その後の単離がより早く進行し得る。

20

【0263】

実施例7：腫瘍反応性T細胞クローニング型の配列に基づく予測の効率

【0264】

30

表2において、100個の最も頻度の高いクローニング型が例示されている(NN：非腫瘍組織ではクローニング型を測定できなかった)。示された100個の最も多くのクローニング型は、配列番号01~100に等しい。表3、表4及び表5において、NSCLC-腫瘍試料由来の新たに単離されたTILの最も多い頻度が5、10及び15個のクローニング型が、それぞれ示されており(列E)、これらは、特有のCDR3-ベータペプチド(列A)、及びそれらに隣接するV-及びJ-セグメント(列B及び列C)により特徴付けられる。増殖されたCD4⁺TILsを自己腫瘍細胞とともに共インキュベートした後のIFNガンマ分泌アッセイにより、上位5、10及び15個の中で、有意な数の、明らかに腫瘍反応性のCD8⁺クローニングの存在を明らかにする(表3~5の列H、IFNガンマ>0.25)。

【0265】

表3において、ベータT細胞受容体のCDR3領域(ペプチド)は、上位5個のTILs CD8⁺クローニング型について同じ腫瘍患者(NSCLC)の異なる試料において同一であることが示されている。Vセグメント及びJセグメントは、IMGT命名法によって示される。配列読み取りのパーセントとしてのCDR3頻度は、以下の試料について与えられる：血液：T細胞を血液(PBMC)から抽出した。TILs CD8⁺：腫瘍(TIL)由来のT細胞を抽出し、CD8⁺に関して選別した。非腫瘍T細胞CD8⁺：肺組織試料を腫瘍から遠位に採取し、T細胞を抽出し、選別した(CD8⁺)。TILs CD4⁻PD1⁺：T細胞を腫瘍から抽出し、CD4に関して枯渇させ、PD1特異的抗体によって選別し、傷害活性化T細胞の画分を得た。IFNガンマCD4⁻：腫瘍から最初に抽出されたT細胞を20日間培地で維持し、腫瘍細胞と共に培養し、IFNガンマの分泌を市販のアッセイにより測定した結果は、腫瘍反応性の測る直接的な尺度としてのT細胞の活性化を示す。TILs CD8⁺/非腫瘍 CD8⁺：TIL及び非腫瘍試料(CD8⁺)において見出される頻度の比率。比率>5(>20)では、IFNガンマ及びPD1⁺の頻度によって同時に示されているように、高度に腫瘍反応性のクローニング型の明らかな有病率がある。

40

50

【0266】

表4は、表3と同じであるが、上位10個のTILs CD8⁺ クローン型について示す。再び、TILs CD8⁺ / 非腫瘍 CD8⁺ 比が > 5 (> 20) の場合、IFNガンマ及びPD1⁺の頻度によって同時に示されるように、高度に腫瘍反応性のクローン型の明らかな有病率がある。

【0267】

表5は、表3と同じであるが、上位15個のTILs CD8⁺ クローン型について示す。再び、TILs CD8⁺ / 非腫瘍 CD8⁺ 比が > 5 (> 20) の場合、IFNガンマ及びPD1⁺の頻度によって同時に示されるように、高度に腫瘍反応性のクローン型の明らかな有病率がある。

10

【0268】

これらの高頻度の腫瘍反応性クローンは、腫瘍細胞と非腫瘍 CD8⁺ T細胞 (T / nT 比、列I)との間の頻度の比を適用して予測かつ同定することができる。

【0269】

表3において、上位5個の中で、T / nT 比が > 20 のものは、クローン2を同定し、その比が > 5 のものは、クローン1、2及び4を同定する。従って、上位5個内の全ての腫瘍反応性クローンは、T / nT 比を用いて同定される。

【0270】

表4において、上位10個の内の、T / nT 比が > 20 のものは、クローン2及び7、その比が > 5 のものについては、クローン1、2、4及び7が腫瘍反応性があるものとして同定する。

20

【0271】

表5において、上位15個の内の、T / nT 比が > 20 のものは、クローン2及び7を同定し、その比が > 5 のものについては、クローン1、2、4、11及び12であり、これは最も頻度の高い15個のCD8⁺ TILs 内の全ての腫瘍反応性クローンを含む。

【0272】

表6において、IFNガンマ頻度 > 0.25 について、腫瘍特異的T細胞を同定する3つの方法の比較が示されている：a)腫瘍組織のみが使用される、すなわち全ての統計はTILのみを指す、b)TIL (CD8⁺) 頻度を、非腫瘍組織由来のT細胞 (CD8⁺) と比較し、かつTILは腫瘍 / 非腫瘍比が > 20 のもののみ使用される、c)TIL (CD8⁺) 頻度を、非腫瘍組織由来のT細胞 (CD8⁺) と比較し、かつTILsは腫瘍 / 非腫瘍比が > 5 のもののみ使用される。腫瘍反応性T細胞の数及び測定されたIFNシグナルの強度に関して最良の結果は、組織比較によって、好ましくはその > 5 の比で達成されることは明らかである。

30

【0273】

上位15個のクローン型の選択について、腫瘍反応性の予測は、図1において非常に正確であることが示されている：ルール比 T / nT > 5 は、T細胞クローン型を、高腫瘍反応性及び軽微な腫瘍反応性のものに効率的に分離する。比が T / nT > 20 の場合、腫瘍反応性の予測は 100% 正確であり、数多くの真に腫瘍反応性のクローン型が欠けている。

【0274】

40

実施例8：腫瘍反応性クローン型のTCR配列特異的単離

【0275】

特定の配列 (CDR3ベータ、Vベータセグメント) によって特徴付けられる腫瘍反応性クローン型の同定は、腫瘍反応性クローンの濃縮のための配列特異的戦略の道を開く。

【0276】

腫瘍 (NSCLC) の切除後6週間、血液を患者から採取し、PBM Cを調製した。PBM Cの一部をTCRベータについて配列決定した。PBM C調製物のアリコートを患者のクローン2に特異的なVベータ-30抗体と共にインキュベートした。

【0277】

結果を表7に示し、それぞれのVベータセグメント特異的抗体を用いた配列特異的選別に

50

よる、所望のT細胞クローニング濃縮を示す。CDR3ペプチド：ベータT細胞受容体のCDR3領域（ペプチド）。Vセグメント及びJセグメントは、IMGT命名法によって示される。TILs CD8⁺：腫瘍（TIL）由来のT細胞を抽出し、CD8⁺に関して選別した。IFNガンマCD4⁻：腫瘍から最初に抽出されたT細胞を20日間培地で維持し、腫瘍細胞と共に培養し、市販のアッセイによってIFNガンマの分泌を測定した結果は、対応する抗原によって刺激されたT細胞の活性化を示す。TILs CD4⁻PD1⁺：T細胞を腫瘍から抽出し、CD4に関して枯渇させ、PD1特異的抗体によって選別し、傷害活性化T細胞の割合を得る。TILs CD8⁺ / 非腫瘍 CD8⁺：TIL及び非腫瘍試料（CD8⁺）で見出される頻度の比率。Vベータ-AB：専用のクローニング型の捕捉に使用されるそれぞれのVベータ-セグメント特異的抗体。VベータAB選択後頻度：Vベータ特異的抗体を用いてビーズ分離を行った後の各クローニング型の頻度。PBM C頻度：末梢血における各クローニング型の頻度。濃縮率：Vベータ-抗体による分離後のクローニング型頻度と末梢血中のクローニング型頻度との比。第2のクローニング型については、末梢血中に検出可能な頻度はなかったので、濃縮率は、可能な限り高い値として0.001%の低い閾値を用いることによってのみ推測することができた。

【0278】

クローニング2は、頻度が0.097%の患者のPBM Cにおいて測定した（列J）。Vベータ-30抗体及びビーズ分離を使用して、頻度を5.52%に増加させた（列I）。これは57.0の濃縮率であり、患者の末梢血からの標準的な手順を用いてクローニングを完全に単離する段階を設定する。

【0279】

方法及び材料

【0280】

以下の実験は、ベルリン医師倫理委員会（Nr. Eth-62-15）によって承認された。

【0281】

腫瘍及び肺組織断片由来のTリンパ球マイクロカルチャーの開始及び増殖

【0282】

各腫瘍検体を周囲の正常組織及び壊死領域から解離させた。腫瘍及び正常な肺組織から得た約1gの立方体を、各次元において約2~3mmの小さな塊に切断した。Tumour Dissociation Kit（ミルテニーバイオテク）を使用し、製造者の指示に従って、スライスした腫瘍（及び非腫瘍）の生検材料を市販の機械的/酵素的組織解離システム（ミルテニーバイオテク社、ベルギッシュ グラートバッハ、ドイツ製のGentleMACS（登録商標））に供した。

【0283】

GentleMACS解離後、細胞懸濁液を70-μmのストレーナーに通した。腫瘍細胞のアリコートを採取し、後の使用のために10%DMSO（シグマアルドリッヂ）及び90%FCS（ライフテクノロジーズ）中で凍結保存した。残りの細胞懸濁液をPBS/RPMI 1640中のパーコール（登録商標）（GEヘルスケアヨーロッパ社）の40%/80%段階勾配を用いて密度勾配遠心分離に供した。間期からTリンパ球を採取し、完全培地（RPMI 1640、ロンザ）で洗浄した。続いて、T-リンパ球を、0.5×10⁶細胞/mLの濃度で2mLの回収培地（RM）を含む24ウェル組織培養プレートに入れた。RMは、25mM HEPES pH 7.2を補充したRPMI 1640、及びL-グルタミン（ロンザ）、100IU/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシン、及び50μM -メルカプトエタノール（サーモフィッシュ-サイエンティフィック、ウォルサム、マサチューセッツ州、USA）からなり、これに10%の自家ヒト血清を含む。プレートを、加湿した37°の5%CO₂インキュベーターに入れ、一晩培養した。

【0284】

翌日、細胞を採取し、ウェルからプールし、CD4及びCD8マイクロビーズ及びLS

10

20

30

40

50

カラム（ミルテニーバイオテク）を、製造業者のプロトコールに従って用いて、磁気ビーズに基づく M i d i M A C S システムによって分離した。C D 4 マイクロビーズ実験、すなわち C D 4 枯渇細胞画分のフロースルーを、さらに P D 1 及び I N F ガンマ実験における C D 8 T I L クローン型の追跡に用いた。P D 1 + クローン型の分離のために、P D - 1 マイクロビーズ（ミルテニーバイオテク、陽性選択）を使用した。全ての細胞画分を完全培地（C M）中で $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞 / m l の密度で培養した。C M は、25 mM H E P E S pH 7.2 を補充した R P M I 1640、及び L - グルタミン（ロンザ）、100 IU / m L ベニシリン、100 μ g / m L ストレプトマイシン、2.5 mg / L アンホテリシン B（シグマアルドリッヂ、セントルイス、U S A）、及び 50 μ M の - メルカプトエタノール（サーモフィッシュ・サイエンティフィック）からなり、これに 10 10% F C S、プラス 3000 IU / m L の組換えヒト I L - 2（ミルテニーバイオテク）及び D y n a b e a d s H u m a n T - A c t i v a t o r C D 3 / C D 2 8（ライフテクノロジーズ）を、ビーズ : T 細胞の比が 1 : 1 で補充した。このプレートを、5% C O₂ を含む加湿 37 インキュベーターに入れ、22 日目まで培養した。2 日目又は 3 日ごとに培地の半分を取り出し、新鮮な I L - 2 を補充した新鮮な培地と交換した。必要に応じて、細胞密度がおよそ 10^6 細胞 / m l を維持するために、I L - 2 を補充した新鮮な培地を添加することにより、細胞を倍加したウェルに分割した。最初の 1 週間以内に、細胞培養物を D N A 抽出及び N G S ライブライアリーアダプター調製のために採取し、残留 T I L をさらに増殖した。14 日目と 18 日目の間に、D y n a b e a d s を除去し、培地中の I L - 2 濃度を 1500 IU / m l に減少させ、10% F C S を 6% 20 自家ヒト血清と交換した。

【 0 2 8 5 】

インターフェロン - ガンマ 分泌アッセイ - 細胞濃縮及び検出

【 0 2 8 6 】

22 日目の腫瘍共培養アッセイのために、I L - 2 を培地から除いた。共培養は、増殖 T I L 及び自己腫瘍細胞（1 ウェルあたり 10^5 個の T I L 及び 10^5 個の自己腫瘍細胞）が 1 : 1 の比で確立した。腫瘍細胞は、10% D M S O（シグマアルドリッヂ）及び 90% F C S（ライフテクノロジーズ）で凍結保存した初期腫瘍分解物に由来し、添加前に R P M I 1640 で洗浄した。共培養物を加湿インキュベーター内で、37 で 20 時間インキュベートした後、I F N ガンマ分泌アッセイ及び検出キット（ミルテニーバイオテク）において製造者の指示に従ってインターフェロンガンマ（I F N）の産生について細胞を採取し分析した。ビーズ結合細胞を溶出し、ゲノム D N A 単離及び N G S ライブライアリーアダプター調製のためにペレット化した。

【 0 2 8 7 】

V - ベータ抗体ベースの細胞濃縮

【 0 2 8 8 】

血液からの T 細胞の単離のために、新たに採取した血液 3 m l を 5 倍量の赤血球溶解緩衝液（E L 緩衝液、キアゲン）とともに 4 で 15 分間インキュベートした。単核細胞を、冷凍遠心器にて、400 g でペレット化した。細胞を E L 緩衝液及び P B S で数回洗浄し、最後に抗 - V ベータ 3 0 抗体 P E - 結合体（ベックマンコールター、ブレア、カリフォルニア州、U S A）で標識した。細胞を抗 - P E マイクロビーズ（ミルテニーバイオテク）で間接的に磁気標識し、製造元の説明書（ミルテニーバイオテク）に従って M i n i M A C S 磁気分離システムを使用して M S カラムで分離した。ビーズ結合細胞を溶出し、ゲノム D N A 単離及び N G S ライブライアリーアダプター調製のためにペレット化した。

【 0 2 8 9 】

ゲノム D N A の単離

【 0 2 9 0 】

マッハライ・ナーゲル（デューレン、ドイツ）の N u c l e o S p i n（登録商標）組織キットを用いて、組織材料からゲノム D N A（g D N A）を抽出した。血液 g D N A を、Q I A a m p（登録商標）D N A 血液ミニキット（キアゲン、ヒルデン、ドイツ）又は A 50

I I P r e p (登録商標) DNA / RNA / m i RNA ユニバーサルキット (キアゲン) のいずれかを用いて製造業者のプロトコールに従って、2 ~ 3 ml の新鮮な血液から単離した。

【0291】

NGSデータから得たクローン型(配列クラスター)頻度の計算

【0292】

CDR3領域に隣接するVセグメント及びJセグメントに特異的に結合するTCRベータプライマーを使用する、独自の2段階PCR増幅法 (WO 2014 / 096394 A1に開示) に従ったNGS (イルミナMiSEQ) 技術を用いて配列決定した。ゲノムDNAをNGSプロセスの出発物質として使用した。

10

【0293】

試料ごとに、多数 (> 10⁵) の対の読み取り (ヌクレオチド配列) は一般にNGSによって生成される。読み取り対は、典型的には40 ~ 80塩基で重複しており、読み取り対と読み取り対を合併して、連続配列にする。次いで、これらの配列を実質的に同一のヌクレオチド配列のクラスターに組み立て、クラスターあたりの読み取り断片の数がそのクラスターの頻度を決定し、ここではクラスターに入る試料中の読み取り断片のパーセンテージでクラスターの頻度が測定される。

【0294】

クラスター化は非常に慎重であり、2つのラウンドで機能する：第1工程において、100%ヌクレオチド配列同一性を有する全ての読み取り断片は、クラスター配列が読み取り配列と同一であるクラスター1としてカウントされる。第2の工程では、クラスターを互いに比較し、

20

- 1 bp 以下のミスマッチ及び
- 1つのクラスター (クラスターA) が他のクラスター (クラスターB) よりも少なくとも20倍の読み取り断片を有する

場合には、合併されてクラスターAと同一であるとみなされる。ヌクレオチド配列クラスターは、クローン型と等価であるとみなされる。

【0295】

ヌクレオチド配列クラスターは、アミノ酸配列 (ペプチド) に翻訳され、表にされる。各クラスターは、上記で定義した頻度を有する1つのクローン型であるとみなされる。頻度は、試料中のそれぞれのT細胞の頻度の直接測定値である。

30

【0296】

試料間のTCR配列プロファイルの比較

【0297】

クローン型のCDR3アミノ酸配列を、ミスマッチのない配列のみが1つの且つ同一のCDR3アミノ酸配列として受け入れられる、同一性試験手順によって、試料間で比較した。複数試料比較の結果は、1つのTCRベータCDR3アミノ酸配列が1行あたり1つ以上の試料によって共有される表であり、各試料は、その試料中のそれぞれのCDR3頻度を含む1つの列によって表される。別個の試料間の比 (同じCDR3アミノ酸配列を共有する) は、それぞれの頻度の比によって計算される。

40

【0298】

【表2】

A	CDR3ペプチド	B	Vセグメント	C		D	E	F	G
				セグメント	血液	TILs CD8 ⁺	非腫瘍 CD8 ⁺	TILs CD8 ⁺ / 非腫瘍 CD8 ⁺	
CASSVDRGAEAFF	V19*01/*02/*03			J1-1*01	0,000	3,660	0,407	8,993	
CANNKQVDGTF	V30*01/**03/*05			J1-2*01	0,026	2,394	0,055	43,527	
CASSFGVNTAEFF	V5-5*01/*02/*03			J1-1*01	0,000	2,330	1,461	1,595	
CASSPDGETOYF	V4-2*01/*02			J2-5*01	0,000	2,256	0,201	11,224	
CASSLGQAYEQYF	V7-8*01/*02/*03			J2-7*01	0,608	1,786	1,016	1,758	
CASSPVAGNTEAFF	V7-3*01/*05			J1-1*01	0,035	1,417	3,386	0,418	
CASSDWIGNYGYTF	V10-3*01/*02/*03/*04			J1-2*01	0,000	1,162	0,058	20,034	
CASSGRGDLLEQYF	V5-6*01			J2-7*01	0,326	1,121	0,596	1,881	
CASSETGAETQYF	V18*01			J2-5*01	0,000	1,095	4,883	0,224	
CASSRLAGGTDIYQYF	V7-3*01/*05			J2-3*01	0,564	0,950	2,477	0,384	
CASSGLVYEQYF	V19*01/*02/*03			J2-7*01	0,000	0,898	0,128	7,016	
CASSTGTTGGELEFF	V28*01			J2-2*01	0,000	0,875	0,102	8,578	
CASSEAPPLYEQYF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05			J2-7*01	0,051	0,855	0,211	4,052	
CASSNDRAGLINEQFFF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05			J2-1*01	0,352	0,846	0,739	1,145	
CASSDGRLEQFF	V24-1*01			J2-1*01	0,127	0,822	0,113	7,274	
CASSLGYRGTAEFF	V5-4*01/*02/*03/*04			J1-1*01	0,752	0,810	3,512	0,231	
CASSQDNGGYTF	V4-1*01/*02			J1-2*01	0,000	0,803	0,148	5,426	
CASSQGDSFYGYTF	V4-1*01/*02			J1-2*01	0,232	0,800	0,195	4,103	
CASSADLGDVRNGYTF	V5-1*01/*02			J1-2*01	0,000	0,782	0,807	0,969	
CASSLDRGGEYEQYF	V4-1*01/*02			J2-7*01	0,000	0,754	0,140	5,386	
CAPPAGIHDTOYF	V28*01			J2-3*01	0,000	0,731	0,000	NN	
CASSDQGHSNQFQHFF	V4-1*01/*02			J1-5*01	0,160	0,713	0,130	5,485	
CASSRPSFRVSEQEFF	V4-1*01/*02			J2-1*01	0,464	0,704	1,214	0,580	
CASSILLAGASYEQYF	V5-5*01/*02/*03			J2-7*01	0,343	0,665	0,392	1,696	
CASSSFQGGNEQFFF	V28*01			J2-1*01	0,874	0,614	3,060	0,201	
CASSLVRGNEQFFF	V27*01			J2-1*01	0,068	0,609	0,189	3,222	
CASSLERSRPFYEQYF	V7-9*01-*07			J2-7*01	0,801	0,596	4,943	0,121	
CASTFRNTGELEFF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05			J2-2*01	0,145	0,571	0,280	2,039	
CANFGRGTREQYF	V5-6*01			J2-7*01	0,020	0,564	0,098	5,755	
CASSLRINVEQYF	V5-5*01/*02/*03			J2-7*01	0,000	0,557	0,307	1,814	

CASSRPEATNEKLF	V4-1*01/*02	0,000	0,012	46,333
CASSWGTITEAFF	V27*01	0,041	0,472	4,816
CAWAKGIAFF	V30*01/**03/**05	0,000	0,471	31,400
CASSQVITEAFF	V14*01/*02	0,302	0,457	0,684
CASSPGGEREYEQYF	V5-4*01/*02/*03/*04	0,000	0,417	41,700
CASSPGQEGEYEQYF	V4-1*01/*02	0,070	0,387	3,721
CASSQVGSSVAGGRSEA	V4-1*01/*02	0,000	0,351	0,288
CASSSTGTGSSSNEQF	V6-1*01/V6--5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	0,000	0,350	0,018
CATGTGSTEQYF	V19*01/*02/*03	0,000	0,284	0,000
CASSIWESEGYTF	V5-6*01	0,012	0,282	0,174
CASSQTGGSYEQYF	V4-1*01/*02	0,000	0,280	0,130
CASSIAQGYEQYF	V27*01	0,000	0,278	0,866
CASSQRNNTAEFF	V16*01/**02/*03	0,000	0,273	0,000
CASSLGTAKETQIF	V7-9*01-*07	0,214	0,262	1,014
CASSFEAAYEQYF	V5-8*01/*02	0,000	0,252	0,258
CASSLAGGSLVEQYF	V19*01/*02/*03	0,267	0,249	0,188
CATIQAGENTAEFF	V19*01/*02/*03	0,000	0,246	0,055
CASSPGQEGEYEQYF	V4-1*01/*02	0,030	0,242	0,022
CASSQEGGETQYF	V4-1*01/*02	0,026	0,237	0,019
CASSVGPGLNMOVDTQ	V7-6*01/*02	0,000	0,236	0,027
CASSYRDSSYEQYF	V9*01/*02/*03	0,000	0,229	0,000
CASSYLAEPGNEQFF	V6-2*01/**02/**03/-3*01	0,078	0,229	0,199
CASSYSESTANYGYTF	V5-1*01/*02	0,014	0,223	0,097
CASSQERSTGELFF	V4-2*01/*02	0,000	0,223	0,132
CASSIWGGTNTEAFF	V6-1*01/V6--5*01/-6*01/-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	0,000	0,219	0,189
CASSIDRSEAFF	V19*01/*02/*03	0,000	0,217	0,144
CASSQVLSGGEYEQYF	V4-1*01/*02	0,000	0,216	0,154
CAWSKEYGYTF	V30*01/**03/*05	0,000	0,213	0,000
CANTWGGNEQYF	V30*01/**03/*05	0,194	0,213	0,084
CATSDLHETPDNTEAF	V24-1*01	0,038	0,207	0,111
CASSSQGDGTDTQF	V7-9*01-*07	0,000	0,202	0,135
CASSPGMNEQYF	V7-6*01/*02	0,021	0,201	0,012
CASSLEEGYTF	V7-2*01/*02/*03/*04	0,605	0,199	1,816
CASSQDRVAYEQYF	V4-3*01/*02/*03/*04	0,000	0,198	0,000
CASSLRGTSTYEQYF	V7-8*01/*02/*03	0,017	0,191	0,194
CASSLSNNEQFF	V27*01	0,000	0,188	0,085

CAVNDAWGNGGTOYF	V27*01	J2-3*01	0,108	0,180	0,060	3,000
CAMSFGASGGETQYF	V30*01/**03/**05	J2-5*01	0,000	0,180	0,132	1,364
CASSQRRAAPYGYTF	V4-1*01/*02	J1-2*01	0,000	0,177	0,039	4,538
CASSSGHGYNEQFF	V3-1*01/*02	J2-1*01	0,000	0,169	0,129	1,310
CASSILLSGGAAADTYQF	V27*01	J2-3*01	0,011	0,166	0,560	0,296
CASSRGENYEQYF	V7-6*01/*02	J2-7*01	0,043	0,158	0,172	0,919
CASSIDSNNEQFF	V19*01/*02/*03	J2-1*01	0,077	0,155	0,163	0,951
CATSDLIDFDRVTGYTF	V24-1*01	J1-2*01	0,000	0,153	0,000	NN
CASSPLTGMQFF	V7-6*01/*02	J2-1*01	0,000	0,147	0,098	1,500
CASTWRLGMNTAFFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	0,145	0,260	0,558
CASSSTVAGEQYF	V27*01	J2-7*01	0,444	0,145	1,494	0,097
CASSPRTGNNTGELFF	V4-2*01/*02	J2-2*01	0,065	0,143	0,164	0,872
CASTRSVGAGTEAFFF	V27*01	J1-1*01	0,000	0,140	0,085	1,647
CASSPQTGGSGLGSPHL	V27*01	J1-6*01	0,000	0,137	0,015	9,133
CASSWDSSYEQYF	V6-2*01/**02/**03/-3*01	J2-7*01	0,000	0,134	0,029	4,621
CASSPLGGEKLF	V6-1*01/V6--5*01/-6*01/6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J1-4*01	0,000	0,134	0,271	0,494
CASSQAGIHINGYTF	V14*01/*02	J1-2*01	0,000	0,130	0,079	1,646
CASSTAGGPGEQYF	V19*01/*02/*03	J2-5*01	0,000	0,126	0,088	1,432
CASSQVPDRDGYTF	V4-3*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,000	0,123	0,194	0,634
CASSQGAALGYEQYF	V4-1*01/*02	J2-7*01	0,000	0,122	0,000	NN
CASSEYYLEVQEQQF	V25-1*01	J2-5*01	0,027	0,120	0,090	1,333
CASSLEANNEQFF	V5-6*01	J2-1*01	0,000	0,120	0,101	1,188
CAISESKDRPSSYNEQF	V10-3*01/*02/*03/*04	J2-1*01	0,000	0,119	0,129	0,922
CASSPGAGLYEQYF	V5-4*01/*02/*03/*04	J2-7*01	0,000	0,119	0,149	0,799
CASSQKGN1QYF	V14*01/*02	J2-4*01	0,017	0,118	0,046	2,565
CATLAGGQQEQYF	V24-1*01	J2-7*01	0,099	0,118	0,070	1,686
CASSLIDGYTF	V7-2*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,306	0,118	1,023	0,115
CASSLIDGYTF	V7-2*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,083	0,117	0,176	0,665
CASTPGSYREIYQF	V5-1*01/*02	J2-5*01	0,055	0,116	0,491	0,236
CASGTDPSYEQYF	V19*01/*02/*03	J2-7*01	0,000	0,115	0,017	6,765
CAPFSSGANLIF	V10-3*01/*02/*03/*04	J2-6*01	0,000	0,112	0,000	NN
CASSLIVGGPHEQYF	V7-9*01-*07	J2-7*01	0,000	0,111	0,000	NN
CASSSAGTGHNEQFF	V6-1*01/V6--5*01/-6*01/6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-1*01	0,000	0,111	0,054	2,056
CASSQKDRGYTF	V4-2*01/*02	J1-2*01	0,000	0,109	0,010	10,900

【表3】

A C D R 3ペプチド	B Vセグメント	C Jセグメント	D 血液	E TILs CD8 [*]	F 非腫瘍 CD8 [*]	G TILs CD4 [*] PD1 ⁺	H IFN ガンマ CD4 ⁻	I TILs CD8 [*] / CD8 [*] 非腫瘍	J TSTCスコア
CASSVDRGAEAFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	3,660	0,407	1,066	2,742	8,993	1010
CAWNQKVQDQYIF	V30*01/**03/*05	J1-2*01	0,026	2,394	0,055	1,231	0,740	43,527	1010
CASSFGVANTAEAFF	V5-5*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	2,330	1,461	0,533	0,089	1,595	1110
CASSFDDGETQIF	V4-2*01/*02	J2-5*01	0,000	2,256	0,201	0,971	1,127	11,224	1010
CASSIGQAYEQYIF	V7-8*01/*02/*03	J2-7*01	0,608	1,786	1,016	0,115	0,045	1,758	1110

10

20

30

【表4】

CDR 3 ベブチド	Vセグメント	Jセグメント	血液	E	F	G	H	I	J
CASSVDRGAEAFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	3,660	0,407	1,066	2,742	8,993	1010
CANNKQYDGTTE	V30*01/*03/*05	J1-2*01	0,026	2,394	0,055	1,231	0,740	43,527	1010
CASSEGMANTEAFF	V5-5*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	2,330	1,461	0,533	0,089	1,595	1110
CASSPDESETYF	V4-2*01/*02	J2-5*01	0,000	2,256	0,201	0,971	1,127	11,224	1010
CASSLIGATEQYF	V7-8*01/*02/*03	J2-7*01	0,608	1,786	1,016	0,115	0,045	1,758	1110
CASSPAGMNTTEAFF	V7-3*01/*05	J1-1*01	0,035	1,417	3,386	0,212	0,244	0,418	1110
CAISDWIGSNYGTTF	V10-3*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,000	1,162	0,058	0,393	2,382	20,034	1010
CASSGREDLLEQYF	V5-6*01	J2-7*01	0,326	1,121	0,596	0,092	0,000	1,881	1110
CASSEFGAAATQYF	V18*01	J2-5*01	0,000	1,095	4,883	0,246	0,097	0,224	1110
CASSRLAGGIDTOYF	V7-3*01/*05	J2-3*01	0,564	0,950	2,477	0,052	0,040	0,384	1110

【表5】

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
CDR3ペプチド	ベセグメント	ベセグメント	血液	TILs CD8*	非腫瘍 CD8*	TILs CD4* PD1*	IFN- γ CD4*	TILs CD8* / 非腫瘍 CD8*	TSTCスコア
CASSVDRGAEFF	V19*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	3,660	0,407	1,066	2,742	8,993	1010
CARNKQVQDGYTE	V30*01/**03/*05	J1-2*01	0,026	2,394	0,055	1,231	0,740	43,527	1010
CASSEFGMNTAEFF	V5-5*01/*02/*03	J1-1*01	0,000	2,330	1,461	0,533	0,089	1,595	1110
CASSEPDGEETQYF	V4-2*01/*02	J2-5*01	0,000	2,256	0,201	0,971	1,127	11,224	1010
CASSILGATEQYF	V7-8*01/*02/*03	J2-7*01	0,608	1,786	1,016	0,115	0,045	1,758	1110
CASSPVAGANTTEFF	V7-3*01/*05	J1-1*01	0,035	1,417	3,386	0,212	0,244	0,418	1110
CATSDWTGSNYCTF	V10-3*01/*02/*03/*04	J1-2*01	0,000	1,162	0,058	0,393	2,382	20,034	1010
CASSGRSDDLEYCF	V5-6*01	J2-7*01	0,326	1,121	0,596	0,092	0,000	1,881	1110
CASSETTAETYTF	V18*01	J2-5*01	0,000	1,095	4,883	0,246	0,097	0,224	1110
CASSRLAGGDDTQF	V7-3*01/*05	J2-3*01	0,564	0,950	2,477	0,052	0,040	0,384	1110
CASSSGLIVVEQYF	V19*01/*02/*03	J2-7*01	0,000	0,898	0,128	0,217	0,888	7,016	1010
CASSSTGUGLGLFF	V28*01	J2-2*01	0,000	0,875	0,102	1,050	0,651	8,578	1010
CASSEAPPLYTYQYF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01 /-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-7*01	0,051	0,855	0,211	0,000	0,000	4,052	1110
CASSNDRAGLINEQFF	V6-1*01/V6-5*01/-6*01 /-6*02/-6*03/-6*04/-6*05	J2-1*01	0,352	0,846	0,739	0,017	0,000	1,145	1110
CATSDGRLEQFF	V24-1*01	J2-1*01	0,127	0,822	0,113	0,725	0,000	7,274	1010

【表6】

中央値
1 FNガンマ
腫瘍反応性クローニ
腫瘍反応性クローニ
のパーセンテージ

	腫瘍組織のみ使用	腫瘍／非腫瘍比 > 20	腫瘍／非腫瘍比 > 5
中央値 1 FNガンマ	0,74	0,74	1,13
腫瘍反応性クローニ	3	1	3
腫瘍反応性クローニ のパーセンテージ	60%	100%	100%

	腫瘍組織のみ使用	腫瘍／非腫瘍比 > 20	腫瘍／非腫瘍比 > 5
中央値 1 FNガンマ	0,17	1,56	1,76
腫瘍反応性クローニ	4	2	4
腫瘍反応性クローニ のパーセンテージ	40%	100%	100%

	腫瘍組織のみ使用	腫瘍／非腫瘍比 > 20	腫瘍／非腫瘍比 > 5
中央値 1 FNガンマ	0,10	1,56	0,89
腫瘍反応性クローニ	6	2	7
腫瘍反応性クローニ のパーセンテージ	40%	100%	88%

【表 7】

CDR3ペプチド	Vセグメント	Jセグメント	TILs CD8+	IFN γ シマ CD4 \cdot PD1 $^+$	TILs CD4 \cdot PD1 $^+$	TILs_CD8 / 非腫瘍	Vベータ-AB 選択後の頻度	PBMCの頻度	濃縮率
CAWNKQVDGYTF	V30*01/**03/**05	J1-2*01	2,394	0,740	1,231	43,527	V30-AB	5,525	0,097
CAWAKGTEAFF	V30*01/**03/**05	J1-1*01	0,471	0,703	0,254	31,400	V30-AB	1,294	no value >1000

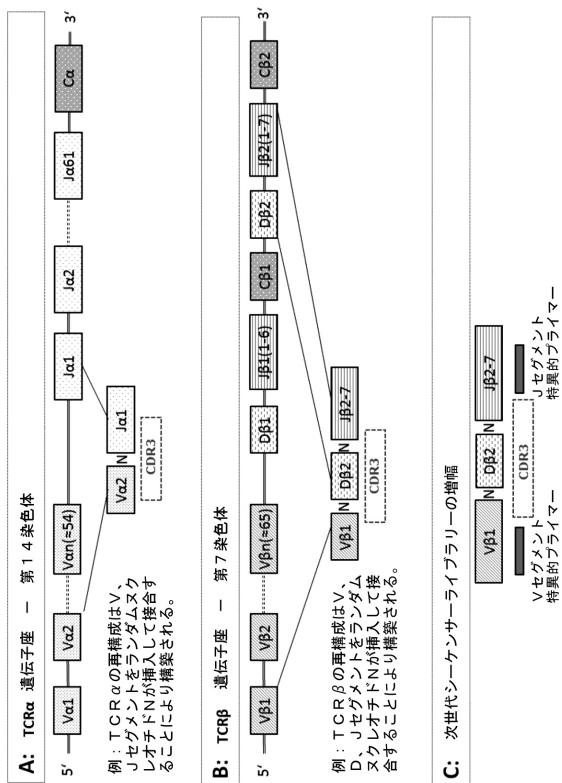
10

20

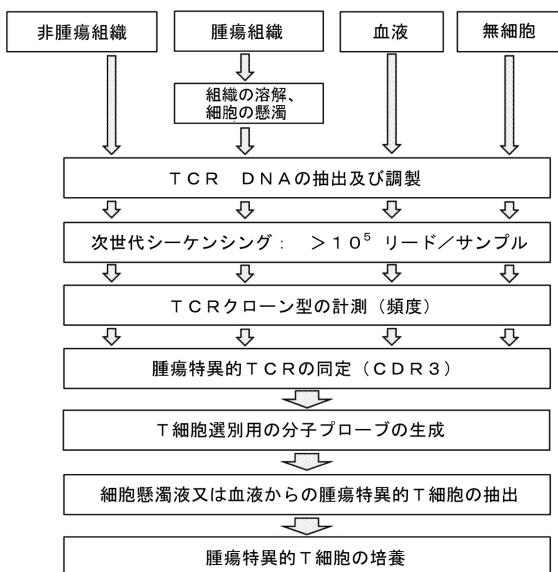
30

40

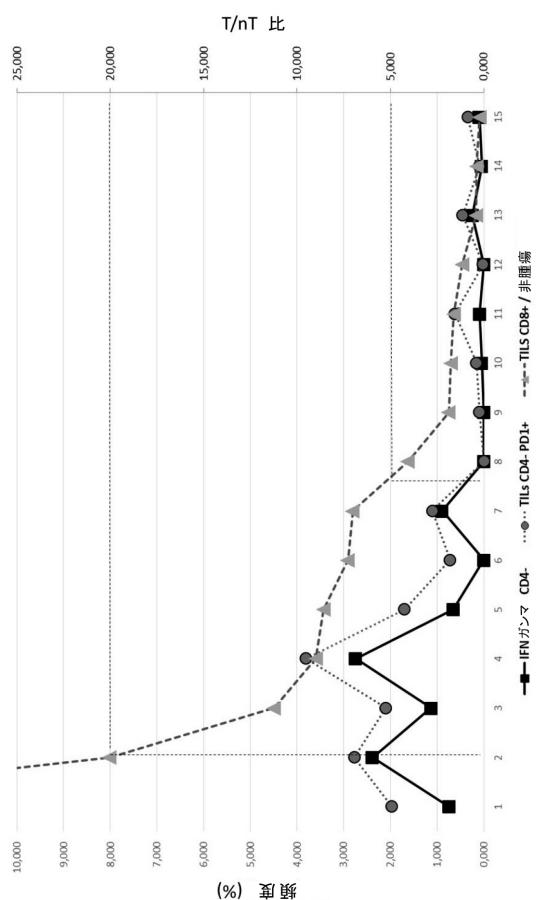
【図1】



【図2】



【図3】



【配列表】

0006815400000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 N 15/09 (2006.01) C 12 N 15/09 Z

(56)参考文献 特表2005-509442 (JP, A)
国際公開第2015/075939 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 1 / 0 0
A 6 1 K 3 5 / 1 7
A 6 1 P 3 5 / 0 0
C 12 N 5 / 0 7 8 3
C 0 7 K 7 / 0 8
C 12 N 1 5 / 0 9
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
W P I D S / W P I X (S T N)