

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7210286号
(P7210286)

(45)発行日 令和5年1月23日(2023.1.23)

(24)登録日 令和5年1月13日(2023.1.13)

| | | |
|-------------------------|----------------|-------|
| (51)国際特許分類 | F I | |
| C 1 2 N 5/0783(2010.01) | C 1 2 N 5/0783 | |
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | C 1 2 N 15/13 | Z N A |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01) | C 0 7 K 16/28 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| 請求項の数 12 (全136頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|-------------------|----------------------------------|----------|---|
| (21)出願番号 | 特願2018-559834(P2018-559834) | (73)特許権者 | 517171347 アディセット バイオ, インコーポレイ テッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 5 , メンロ パーク, コンステイテ ューション ドライブ 2 0 0 |
| (86)(22)出願日 | 平成29年5月12日(2017.5.12) | (74)代理人 | 110002077 園田・小林弁理士法人 |
| (65)公表番号 | 特表2019-519210(P2019-519210 A) | (72)発明者 | ジャコボヴィッツ, アヤ アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 2 1 0 , ビバリー ヒルズ, ハットン ド ライブ 3 1 3 5 |
| (43)公表日 | 令和1年7月11日(2019.7.11) | (72)発明者 | フォード, オリット アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4 , フォスター シティ, ケイマン 最終頁に続く |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2017/032530 | | |
| (87)国際公開番号 | WO2017/197347 | | |
| (87)国際公開日 | 平成29年11月16日(2017.11.16) | | |
| 審査請求日 | 令和2年5月12日(2020.5.12) | | |
| (31)優先権主張番号 | 62/335,572 | | |
| (32)優先日 | 平成28年5月12日(2016.5.12) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | |
| 前置審査 | | | |

(54)【発明の名称】 T細胞集団の選択的増殖方法及びその組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された混合細胞集団から濃縮 1 T細胞集団を製造する生体外方法であって、
1 T C R に特異的な活性化エピトープに結合することによって 1 T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤に、前記混合細胞集団を直接接触させて、濃縮 1 T細胞集団をもたらすことを含み、前記1つ以上の薬剤が、重鎖可変領域/軽鎖可変領域(H C V R / L C V R)配列ペアを含む抗体から選択され、前記H C V R / L C V R配列ペアが、配列番号：1 5 3 / 1 8 0、1 5 4 / 1 8 1、1 5 5 / 1 8 2、1 5 6 / 1 8 3、1 5 7 / 1 8 4、1 5 8 / 1 8 5、1 5 9 / 1 8 6、1 6 0 / 1 8 7、1 6 1 / 1 8 8、1 6 2 / 1 8 9、1 6 3 / 1 9 0、1 6 4 / 1 9 1、1 6 5 / 1 9 2、1 6 6 / 1 9 3、1 6 7 / 1 9 4、1 6 8 / 1 9 5、1 6 9 / 1 9 6、1 7 0 / 1 9 7、1 7 1 / 1 9 8、1 7 2 / 1 9 9、1 7 3 / 2 0 0、1 7 4 / 2 0 1、1 7 5 / 2 0 2、1 7 6 / 2 0 3、1 7 7 / 2 0 4、1 7 8 / 2 0 5、及び1 7 9 / 2 0 6からなる群から選択される、方法。

【請求項2】

1 T細胞を選択的に増殖させる前記1つ以上の薬剤が、配列番号：1 5 4 / 1 8 1、1 5 8 / 1 8 5、1 6 0 / 1 8 7、1 7 2 / 1 9 9、及び1 7 5 / 2 0 2からなる群から選択されるH C V R / L C V R配列ペアを含む抗体から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

1 T細胞を選択的に増殖させる前記1つ以上の薬剤が、配列番号：1 5 8 / 1 8 5

からなる H C V R / L C V R 配列ペアを含む抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

(i) 濃縮 1 T 細胞集団が、抗原提示細胞またはアミノホスフェートによって増殖させられていない；

(i i) 1 T 細胞を選択的に増殖させる 1 つ以上の薬剤が、抗体である；

(i i i) 1 T 細胞を選択的に増殖させる 1 つ以上の薬剤が、表面に固定されている；

(i v) 前記単離された混合細胞集団が、末梢血試料、臍帯血試料または腫瘍から選択される；

(v) 前記濃縮 1 T 細胞集団が多クローン性の T C R 多様性を含む；

(v i) 濃縮 1 T 細胞集団がさらに、対象への投与のために製剤化される；

(v i i) 前記濃縮 1 T 細胞集団が治療的有効量の 1 T 細胞を含む：かつ / 又は

(v i i i) 前記 1 T 細胞集団が、1 つ以上の腫瘍認識部分を安定的に発現するように操作されている、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記濃縮 1 T 細胞集団中の 1 T 細胞の百分率が 1 T 細胞の 60 % より高い、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

- 第 1 増殖の開始、
- ドナー試料を提供するステップ、または
- 前記混合細胞集団を 1 つ以上の活性化剤に直接接触させる第 1 ステップ

から 90 日未満、60 日未満、30 日未満、21 日未満または 19 日未満のうちに、前記単離された混合細胞集団から増殖した少なくとも 10^8 個の 1 T 細胞を実現する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

濃縮 1 T 細胞集団の少なくとも一部を、(a) T 細胞を増殖させる、及び / または (b) T 細胞を枯渇させる、1 つ以上の薬剤に直接接触させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

単離された混合細胞集団から濃縮 1 T 細胞集団を製造するための生体外方法において、1 T C R に特異的な活性化エピトープに結合することによって 1 T 細胞を選択的に増殖させて濃縮 1 T 細胞集団をもたらすための抗体であって、

配列番号：153 / 180、154 / 181、155 / 182、156 / 183、157 / 184、158 / 185、159 / 186、160 / 187、161 / 188、162 / 189、163 / 190、164 / 191、165 / 192、166 / 193、167 / 194、168 / 195、169 / 196、170 / 197、171 / 198、172 / 199、173 / 200、174 / 201、175 / 202、176 / 203、177 / 204、178 / 205、及び 179 / 206 からなる群から選択される重鎖可変領域 / 軽鎖可変領域 (H C V R / L C V R) 配列ペアを含む、抗体。

【請求項 9】

配列番号：154 / 181、158 / 185、160 / 187、172 / 199、及び 175 / 202 からなる群から選択される H C V R / L C V R 配列ペアを含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

配列番号：158 / 185 からなる H C V R / L C V R 配列ペアを含む、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする核酸であって、異種プロモータ

10

20

30

40

50

ーに機能可能に繋がられている、核酸。

【請求項 1 2】

請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする、異種プロモーターに機能可能に繋がられている核酸、及び/または請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む宿主細胞であって、前記核酸が、前記抗体と融合した膜アンカーまたは膜貫通ドメインをコードし、前記抗体が宿主細胞の細胞外表面において提示される、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2016年5月12日に出願された米国仮特許出願第62/335,572号に基づく第119条(e)の下での優先権及び利益を主張するものであり、これを以て参照によりその開示全体をあらゆる目的のために全体的に援用する。

【背景技術】

【0002】

Tリンパ球による抗原認識は、多様性に富む異種二量体受容体であるT細胞受容体(TCR)によって成し遂げられ得る。血液及びリンパ器官の中のヒトT細胞のおよそ95%は、異種二量体 TCR受容体(T細胞系統)を発現する。血液及びリンパ器官の中のヒトT細胞のおよそ5%は、異種二量体 TCR受容体(T細胞系統)を発現する。これらのT細胞サブセットはそれぞれ「 」及び「 」T細胞と呼称されることがある。及び T細胞は機能が異なる。しかも、 T細胞の活性化は、抗原提示細胞(APC)が抗原をクラスI/IIのMHCと関連付けて提示するとき起こる。

T細胞とは対照的に、 T細胞は、MHC拘束とは無関係に抗原を認識することができる。さらに、 T細胞は、自然免疫及び養子免疫による認識及び応答を両方とも併せ持っている。

【0003】

T細胞は、体細胞再構成された別個の可変遺伝子(V)、多様性遺伝子(D)、結合遺伝子(J)及び定常遺伝子(C)の組を利用する。 T細胞は、 T細胞よりも少ないV、D及びJセグメントを含有する。生殖細胞系のV及びV 遺伝子の数には、V及びV TCR遺伝子のレパートリーよりも限りがあるが、TCRの鎖及び鎖の再構成中に接合部の多様化プロセスがより大々的であることによって、潜在的な TCRレパートリーは TCRのそれよりも広くなる(Carding and Egan, Nat Rev Immunol(2002)2:336)。

【0004】

ヒト T細胞は、3つの主要なV (V₁、V₂、V₃)領域遺伝子と、多くて6つのV 領域遺伝子とを使用してそれらのTCRを作る(Hayday AC., Annu Rev Immunol.2000;18,975-1026)。2つの主要なV サブセットは、V₁及びV₂の T細胞である。種々のV を有するV₁T細胞は、粘膜 T細胞の上皮内サブセットの多数を占め、この場合、TCRは上皮細胞上のストレス分子を認識するようである(Beagley KW, Husband AJ. Crit Rev Immunol.1998;18(3):237-254)。V₉を共発現するのが一般的であるV₂T細胞は、末梢血及びリンパ系に豊富に存在している。

【0005】

疾患細胞上の抗原を直接認識し、腫瘍細胞を殺傷する本来備わっている能力を発揮する、 T細胞の能力は、 T細胞を魅力的な治療ツールにする。V₉V₂T細胞の養子移入は、研究段階でのがんの処置において限られた目標臨床応答をもたらす(Kondo et al, Cytotherapy, 10:842-856, 2008、Lang et al, Cancer Immunology, Immunotherapy: CII, 60:1447-1460, 2011、Nagamine et al, 2009、Nicol et al, British Journal of Cancer, 105:7

10

20

30

40

50

78-786, 2011, Wilhelm et al, Blood. 2003 Jul 1; 102(1): 200-6)、新たな T細胞集団を単離して臨床において試験する必要性を示唆した。

【0006】

強力な抗腫瘍活性を有する T細胞サブセット集団を、向上した純度及び臨床上妥当なレベルで選択的に増殖させる能力は、非常に望ましいものである。抗体とサイトカインとのカクテルは、T細胞のより多様な組を増殖させるために使用されてきたが、特定の T細胞サブセットを十分な純度及び臨床上妥当なレベルにまで活性化させることは成し遂げられなかった(Dokouhaki et al, 2010、Kang et al, 2009、Lopez et al, 2000、Kress, 2006)。したがって、特定の T細胞サブセットを生体外で増殖させる臨床上妥当な方法及びそれによって製造された細胞は、大いに必要とされている。

10

【0007】

配列表

本願は、EFSウェブを介してASCII形式で提出された、これを以て参照により全体的に援用される配列表を含んでいる。上記ASCIIコピーは、2016年3月3日に作られたものであり、名前が47165-701.201-SL.txt、サイズが4,366キロバイトである。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、一態様において、濃縮 T細胞集団を製造する生体外方法を提供する。濃縮 T細胞集団は、単離された混合細胞集団から、

(i) 1TCRに特有のエピトープに結合することによって 1T細胞を選択的に増殖させるか、

(ii) 2TCRに特有のエピトープに結合することによって 2T細胞を選択的に増殖させるか、

(iii) 1TCR及び 4TCRに特有のエピトープに結合することによって 1及び 4T細胞を選択的に増殖させるか、または

(iv) 1TCR、 3TCR、 4TCR及び 5TCRに特有のエピトープに結合することによって 1、 3、 4及び 5T細胞を選択的に増殖させる、1つ以上の薬剤に混合細胞集団またはその精製済み画分を接触させて濃縮 T細胞集団をもたらすことを含む方法によって、製造することができる。好ましい実施形態では、濃縮 T細胞集団は、臨床上妥当なレベルの T細胞を含む。

20

30

【0009】

別の態様において、本発明は、単離された混合細胞集団から濃縮 T細胞集団を製造する生体外方法であって、

(i) 1TCRに特有のエピトープに結合することによって 1T細胞を選択的に増殖させるか、

(ii) 2TCRに特有のエピトープに結合することによって 2T細胞を選択的に増殖させるか、

(iii) 1TCR及び 4TCRに特有のエピトープに結合することによって 1及び 4T細胞を選択的に増殖させるか、または

(iv) 1TCR、 3TCR、 4TCR及び 5TCRに特有のエピトープに結合することによって 1、 3、 4及び 5T細胞を選択的に増殖させる、1つ以上の薬剤に混合細胞集団を直接接触させて臨床上妥当なレベルの濃縮 T細胞集団をもたらすことを含む、当該方法を提供する。

40

【0010】

特定の実施形態では、臨床上妥当なレベルは、少なくとも約 10^8 個もしくはそれより多い T細胞、少なくとも約 10^9 個もしくはそれより多い T細胞、少なくとも約 10^{10} 個もしくはそれより多い T細胞、少なくとも約 10^{11} 個もしくはそれより多

50

い T細胞、または少なくとも約 10^{12} 個もしくはそれより多い T細胞（例えば、約 10^8 個～約 10^{12} 個）を含む。一実施形態では、単離された混合細胞集団は単一ドナーに由来し、方法は、単一ドナー、例えば、単一ドナーからの単一試料、または単一ドナーからの2つ以上の試料から増殖させた、臨床上妥当なレベルの濃縮 T細胞集団を提供する。他の実施形態では、単離された混合細胞集団は、1より多い数または多数のドナーに由来する。いくつかの実施形態では、本発明の第1濃縮ステップの後に濃縮 T細胞集団は、臨床上妥当なレベルの、 10^8 個より多い T細胞サブセットを含む。他の実施形態では、本発明の第2、第3、第4、第5などの濃縮ステップの後に濃縮 T細胞集団は、臨床上妥当なレベルの、 10^8 個より多い T細胞サブセットを含む。

【0011】

特定の実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、TS-1及びTS8.2から選択される抗体と同じエピトープに結合する薬剤から選択される。いくつかの実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、TS-1及び/またはTS8.2抗体が結合するエピトープとは異なるエピトープに結合する薬剤である。いくつかの実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、TS-1もしくはTS8.2が結合するエピトープとは重複しないエピトープに結合するかまたはTS-1もしくはTS8.2と競合しない、薬剤である。いくつかの実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、1可変領域を含むエピトープに特異的に結合する薬剤から選択される。他の実施形態では、薬剤は、図24のコンセンサス配列のアミノ酸配列を含む1 TCR可変領域に結合する。さらに他の実施形態では、薬剤は、1可変領域の残基Arg71もしくはAsp72、及び/またはJ1もしくはJ2領域の残基Lys120を含むエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、薬剤は、1 J1または1 J2のK120に突然変異、例えば、K120A、K120G、K120P、K120V、K120E、K120DまたはK120Sを含む突然変異体1 TCRポリペプチドに対する低減された結合性を有する。

【0012】

特定の実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、抗体R9.12と同じエピトープに結合する薬剤から選択される。いくつかの実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、抗体R9.12が結合するエピトープとは異なるエピトープに結合する薬剤である。いくつかの実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、抗体R9.12が結合するエピトープとは重複しないエピトープに結合するかまたは抗体R9.12と競合しない、薬剤である。

【0013】

特定の実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、1及び4 T細胞、もしくは1、3、4及び5 T細胞に選択的に結合する、及び/またはそれらを選択的に増殖させる、薬剤である。特定の実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、1-05、1-08、1-18、1-22、1-23、1-26、1-35、1-37、1-39、1-113、1-143、1-149、1-155、1-182、1-183、1-191、1-192、1-195、1-197、1-199、1-201、1-203、1-239、1-253、1-257、1-278、1-282及び1-285からなる群から選択される抗体の相補性決定領域(CDR)を含む薬剤である。特定の実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、1-05、1-08、1-18、1-22、1-23、1-26、1-35、1-37、1-39、1-113、1-143、1-149、1-155、1-182、1-183、1-191、1-192、1-195、1-197、1-199、1-201、1-203、1-239、1-253、1-257、1-278、1-282及び1-285からなる群から選択される抗体の可変領域を含む薬剤である。特定の実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、1-05、1-08、1-18、1-22、1-23、1-26、1-35、1-37、1-39、1-113、

10

20

30

40

50

1 - 143、1 - 149、1 - 155、1 - 182、1 - 183、1 - 191、1 - 192、1 - 195、1 - 197、1 - 199、1 - 201、1 - 203、1 - 239、1 - 253、1 - 257、1 - 278、1 - 282及び1 - 285からなる群から選択される抗体と同じもしくは本質的に同じエピトープに結合するか、または当該抗体と競合する、薬剤である。特定の実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、1 - 05、1 - 08、1 - 18、1 - 22、1 - 23、1 - 26、1 - 35、1 - 37、1 - 39、1 - 113、1 - 143、1 - 149、1 - 155、1 - 182、1 - 183、1 - 191、1 - 192、1 - 195、1 - 197、1 - 197、1 - 199、1 - 201、1 - 203、1 - 239、1 - 253、1 - 257、1 - 278、1 - 282及び1 - 285からなる群から選択される抗体である。特定の実施形態では、1 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、ピン1 1エピトープ、ピン1 b 1エピトープ、ピン2 1エピトープ、ピン2 b 1エピトープ、ピン2 c 1エピトープ、ピン3 1エピトープ、ピン4 1エピトープ、ピン5 1エピトープ、ピン6 1エピトープ、ピン7 1エピトープ、ピン8 1エピトープまたはピン9 1エピトープに結合する抗体である。

【0014】

10

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、Tリンパ球を含んでいる単離された混合細胞集団からの1細胞を60%、70%、80%または90%より多く含む濃縮T細胞集団(複数可)を提供する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、Tリンパ球を含んでいる単離された、例えば混合された細胞集団からの1細胞を60%、70%、80%または90%より多く含む濃縮T細胞集団(複数可)を、例えば、濃縮T細胞集団(複数可)からのT細胞の正の選択(例えば、1 T細胞、1及び3 T細胞; 1及び4 T細胞; もしくは1、3、4及び5 T細胞(例えば、示されているサブタイプ(複数可)のT細胞)の正の選択; 及び/または2 T細胞の正の選択)によるかまたは濃縮T細胞集団(複数可)からの非T細胞(例えば、T細胞などの非1 T細胞)の除去による増殖済みT細胞集団の精製のステップよりも前に、提供する。

20

【0015】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、1 T細胞及び2 T細胞を含むT細胞集団を提供し、当該集団の60%超、70%超、80%超または90%超は1 T細胞である。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、1 T細胞; 2 T細胞; 1及び4 T細胞; または1、3、4及び5 T細胞を含むT細胞集団を提供し、(i)当該集団の60%超、70%超、80%超もしくは90%超は1 T細胞であるか、(ii)当該集団の60%超、70%超、80%超もしくは90%超は1及び3 T細胞であるか、(iii)当該集団の60%超、70%超、80%超もしくは90%超は1及び4 T細胞であるか、または(iv)当該集団の60%超、70%超、80%超もしくは90%超は1、3、4及び5 T細胞である。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、T細胞を含まないかまたはそれを約2%、約1%、約0.5%、約0.4%、約0.1%、約0.05%もしくは約0.01%より少なく含む、T細胞(例えば1 T細胞)の集団を含む組成物を提供する。

30

40

【0016】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法でT細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約30%もしくはそれ未満、約25%もしくはそれ未満、約20%もしくはそれ未満、約15%もしくはそれ未満、約10%もしくはそれ未満、約5%もしくはそれ未満、約4%もしくはそれ未満、約3%もしくはそれ未満、約2%もしくはそれ未満、約1.5%もしくはそれ未満、約1.2%もしくはそれ未満、約1%もしくはそれ未満、約0.9%もしくはそれ未満、約0.8%もしくはそれ未満、約0.7%もしくはそれ未満、約0.6%もしくはそれ未満、約0.5%もしくはそれ未満、約0.4%もしくはそれ未満、約0.3%もしくはそれ未満、約0.2%もしくはそれ未満、または約0

50

． 1 % もしくはそれ未満の T 細胞（例えば、 1、 2、 1 及び 2、 1 及び 3、 もしくは 1 及び 4 T 細胞、またはそれらの組み合わせ）を含む。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 0 . 5 % ~ 約 5 % の T 細胞（例えば、 1、 2、 3、 4 もしくは 8 T 細胞、またはそれらの組み合わせ）を含む。

【 0 0 1 7 】

特定の実施形態では、単離された混合細胞集団は、中央値より大きいレベルの循環 T 細胞または試料内（例えば腫瘍内または上皮試料内）浸潤 T 細胞を有する 1 ドナーまたは多数のドナーからのものである。それゆえ、例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 0 . 5 % ~ 約 1 0 % の T 細胞（例えば、 1、 2、 3、 4 もしくは 8 T 細胞、またはそれらの組み合わせ）を含む。別の例を挙げると、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 1 0 % ~ 約 3 0 % の T 細胞（例えば、 1、 2、 3、 4 もしくは 8 T 細胞、またはそれらの組み合わせ）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 1 . 5 % またはそれ未満の T 細胞、好ましくは約 1 . 2 % 未満の T 細胞、より好ましくは約 1 % 未満の T 細胞、よりいっそう好ましくは約 0 . 5 % 未満の T 細胞、例えば約 0 . 1 % ~ 約 0 . 4 % の T 細胞を含む。

【 0 0 1 8 】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 8 0 %、約 7 0 %、約 6 0 %、約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 % または約 2 0 % の T リンパ球、及び約 3 0 % 未満、約 2 5 % 未満、約 2 0 % 未満、約 1 5 % 未満、約 1 0 % 未満、約 5 % 未満、約 4 % 未満、約 3 % 未満、約 2 % 未満、約 1 . 5 % 未満、約 1 . 2 % 未満、約 1 % 未満、約 0 . 9 % 未満、約 0 . 8 % 未満、約 0 . 7 % 未満、約 0 . 6 % 未満、約 0 . 5 % 未満、約 0 . 4 % 未満、約 0 . 3 % 未満、約 0 . 2 % 未満または約 0 . 1 % 未満の T 細胞（例えば、 1、 2、 1 及び 2、 1 及び 3、 もしくは 1 及び 4 T 細胞、またはそれらの組み合わせ）を含む。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 8 0 %、約 7 0 %、約 6 0 %、約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 % または約 2 0 % の T リンパ球、及び約 0 . 5 % ~ 約 5 % の T 細胞（例えば、 1、 2、 3、 4 もしくは 8 T 細胞、またはそれらの組み合わせ）を含む。

【 0 0 1 9 】

特定の実施形態では、単離された混合細胞集団は、中央値より大きいレベルの循環 T 細胞または試料内（例えば腫瘍内または上皮試料内）浸潤 T 細胞を有する 1 ドナーまたは多数のドナーからのものである。それゆえ、例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 8 0 %、約 7 0 %、約 6 0 %、約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 % または約 2 0 % の T リンパ球、及び約 0 . 5 % ~ 約 1 0 % の T 細胞（例えば、 1、 2、 3、 4 もしくは 8 T 細胞、またはそれらの組み合わせ）を含む。別の例を挙げると、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 8 0 %、約 7 0 %、約 6 0 %、約 5 0 %、約 4 0 %、約 3 0 % または約 2 0 % の T リンパ球、及び約 1 . 5 % 以下の T 細胞、好ましくは約 1 . 2 % 未満の T 細胞、より好ましくは約 1 % 未満の T 細胞、よりいっそう好ましくは約 0 . 5 % 未満の T 細胞、例えば約 0 . 1 % ~ 約 0 . 4 % の T 細胞を含む。

【 0 0 2 0 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、単離された混合細胞集団は、末梢血試料（例えば、全血、P B M CまたはP B L）、白血球アフェレーシス試料、臍帯血試料、腫瘍試料または組織試料（例えば上皮試料）から選択される。いくつかの実施形態では、単離された混合細胞集団は単一ドナーに由来する。他の実施形態では、単離された混合細胞集団は、1より多い数または多数のドナーに由来する。特定の実施形態では、本発明の方法は、多クローン性の T C R多様性を含む濃縮 T細胞集団（複数可）を提供する。

【0021】

他の実施形態では、2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、B 6及び1 5 Dから選択される抗体と同じエピトープに結合する薬剤から選択される。さらに他の実施形態では、

2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、B 6及び1 5 Dから選択される抗体とは異なるエピトープに結合する薬剤から選択される。さらに他の実施形態では、2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、B 6及び1 5 D抗体が結合するエピトープとは重複しないかまたはB 6及び1 5 D抗体と競合しないエピトープに結合する、薬剤から選択される。一実施形態において、2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、2可変領域を含むエピトープに特異的に結合する薬剤から選択される。具体的な実施形態において、薬剤は、2可変領域のG 3 5に突然変異を含む突然変異体2 T C Rポリペプチドに対する低減された結合性を有する。

【0022】

特定の実施形態では、2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、2 - 1 4、2 - 1 7、2 - 2 2、2 - 3 0、2 - 3 1、2 - 3 2、2 - 3 3、2 - 3 5、2 - 3 6、及び2 - 3 7（または、2 - 1 4、2 - 1 7、2 - 3 0、2 - 3 1、2 - 3 2、2 - 3 3、2 - 3 5、2 - 3 6、及び2 - 3 7）からなる群から選択される抗体の相補性決定領域（C D R）を含む薬剤である。特定の実施形態では、2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、2 - 1 4、2 - 1 7、2 - 2 2、2 - 3 0、2 - 3 1、2 - 3 2、2 - 3 3、2 - 3 5、2 - 3 6、及び2 - 3 7（または、2 - 1 4、2 - 1 7、2 - 3 0、2 - 3 1、2 - 3 2、2 - 3 3、2 - 3 5、2 - 3 6、及び2 - 3 7）からなる群から選択される抗体の可変領域を含む薬剤である。

【0023】

特定の実施形態では、2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、2 - 1 4、2 - 1 7、2 - 2 2、2 - 3 0、2 - 3 1、2 - 3 2、2 - 3 3、2 - 3 5、2 - 3 6、及び2 - 3 7（または、2 - 1 4、2 - 1 7、2 - 3 0、2 - 3 1、2 - 3 2、2 - 3 3、2 - 3 5、2 - 3 6、及び2 - 3 7）からなる群から選択される抗体と同じもしくは本質的に同じエピトープに結合するか、または当該抗体と競合する、薬剤である。特定の実施形態では、2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、2 - 1 4、2 - 1 7、2 - 2 2、2 - 3 0、2 - 3 1、2 - 3 2、2 - 3 3、2 - 3 5、2 - 3 6、及び2 - 3 7（または、2 - 1 4、2 - 1 7、2 - 3 0、2 - 3 1、2 - 3 2、2 - 3 3、2 - 3 5、2 - 3 6、及び2 - 3 7）からなる群から選択される抗体である。特定の実施形態では、2 T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、ピン1 2エピトープ、ピン2 2エピトープ、ピン3 2エピトープまたはピン4 2エピトープに結合する抗体である。

【0024】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、Tリンパ球を含んでいる単離された混合細胞集団からの2細胞を60%、70%、80%または90%より多く含む濃縮T細胞集団（複数可）を提供する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、Tリンパ球を含んでいる単離された、例えば混合された細胞集団からの2細胞を60%、70%、80%または90%より多く含む濃縮T細胞集団（複数可）を、例えば、濃縮T細胞集団（複数可）からのT細胞の正の選択（例えば、2 T細胞の正の選択）によるかまたは濃縮T細胞集団（複数可）からの非T細胞の除去（例えば、非2 T細胞の除去またはT細胞の除去）による増殖済みT細胞集団の精製のステップより

10

20

30

40

50

も前に、提供する。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、 2×10^6 T細胞及び 1×10^6 T細胞を含む 1×10^7 T細胞集団を提供し、当該集団の60%超、70%超、80%超または90%超は 2×10^6 T細胞である。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、T細胞を含まないかまたはそれを約2%、約1%、約0.5%、約0.4%、約0.1%、約0.05%もしくは約0.01%より少なく含む、 2×10^6 T細胞の集団を含む組成物を提供する。

【0025】

特定の実施形態では、本明細書に記載の方法で 1×10^6 T細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%または約20%のTリンパ球、及び約60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1%未満、約0.9%未満、約0.8%未満、約0.7%未満、約0.6%未満、約0.5%未満、約0.4%未満、約0.3%未満、約0.2%未満、約0.1%未満、約0.05%未満、または約0.02%未満の 1×10^6 T細胞を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で 1×10^6 T細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、末梢血試料（例えばPBMCまたはPBL）、白血球アフェレーシス試料、臍帯血試料、腫瘍または組織から選択される。特定の実施形態では、本発明の方法は、多クローン性のTCR多様性を含む濃縮 1×10^6 T細胞集団（複数可）を提供する。

【0026】

特定の実施形態では、濃縮 1×10^6 T細胞集団は、抗原提示細胞（APC）、人工抗原提示細胞（aAPC）、照射済み抗原提示細胞集団（例えば、照射済みPBMC、照射済み固定化細胞株、または照射済みaAPC）、アミノホスホネート、アミノホスフェート、ビスホスホネートもしくはそれらの組み合わせによって、またはその存在下で増殖させられていない。特定の実施形態では、濃縮 1×10^6 T細胞集団は、照射済みPBMCによって、またはその存在下で増殖させられていない。特定の実施形態では、濃縮 1×10^6 T細胞集団は、照射済みaAPC（例えば、操作型K562、RPMI8226、T2またはJVM-3）によって、またはその存在下で増殖させられていない。特定の実施形態では、濃縮 1×10^6 T細胞集団は、照射済みの固定化細胞株の細胞集団によって、またはその存在下で増殖させられていない。好ましい実施形態では、 1×10^6 T細胞、 2×10^6 T細胞、 1×10^6 T細胞及び 4×10^6 T細胞、または 1×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 及び 5×10^6 T細胞（例えば 1×10^6 T細胞）を選択的に増殖させる上記1つ以上の薬剤は、抗体である。

【0027】

いくつかの実施形態では、 1×10^6 T細胞、 2×10^6 T細胞、 1×10^6 T細胞及び 4×10^6 T細胞、または 1×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 及び 5×10^6 T細胞（例えば、示されているサブタイプ（複数可）の 1×10^6 T細胞）を選択的に増殖させる上記1つ以上の薬剤は、表面に固定されている。いくつかの実施形態では、 1×10^6 T細胞、 2×10^6 T細胞、 1×10^6 T細胞及び 4×10^6 T細胞、または 1×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 及び 5×10^6 T細胞（例えば、示されているサブタイプ（複数可）の 1×10^6 T細胞）を選択的に増殖させる上記1つ以上の薬剤は、第1及び/または第2あるいはそれに続く増殖において、抗原提示細胞（例えば、aAPC）の表面に固定されている。抗原提示細胞の表面に固定された薬剤は、例えば、APCの表面に発現したFc受容体と結合していてもよいし、またはAPCの表面に発現していてもよい。

【0028】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-19、IL-21、IL-23、IL-33、IFN γ 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、レクチン（例えば、PHA-E、PHA-L、またはConA）、またはそれらのうちの2つ以上もしくは全ての組み合わせが補充された培養用培地を使用して実施される。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、IL-21が補充されていない培養用培地を使用して実施される。いくつかの実施形態では、本発明の方法

10

20

30

40

50

は、IL - 2、IL - 4、IL - 7、IL - 9、IL - 12、IL - 15、IL - 18、IL - 19、IL - 21、IL - 23、IL - 33、IFN、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、レクチン(例えば、PHA-E、PHA-L、またはConA)、またはそれらのうちの2つ以上もしくは全ての組み合わせが補充された培養用培地を使用する第1 T細胞増殖を用いて実施される。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、IL - 21が補充されていない培養用培地を使用する第1 T細胞増殖を用いて実施される。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、IL - 2、IL - 4、IL - 7、IL - 9、IL - 12、IL - 15、IL - 18、IL - 19、IL - 21、IL - 23、IL - 33、IFN、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、レクチン(例えば、PHA-E、PHA-L、またはConA)、またはそれらのうちの2つ以上もしくは全ての組み合わせが補充された培養用培地を使用する第2 T細胞増殖を用いて実施される。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、IL - 21が補充されていない培養用培地を使用する第2 T細胞増殖を用いて実施される。

10

【0029】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、本明細書に記載の T細胞増殖方法または組成物のいずれかを含む第1 T細胞増殖を用い、その後、1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 3 T細胞； 1 T細胞及び 4 T細胞；または 1、 3、 4 及び 5 T細胞(例えば、示されている サブタイプ(複数可)の T細胞)を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤を含まない培養用培地を使用する第2 T細胞増殖を用いて、実施される。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 4 T細胞；または 1、 3、 4 及び 5 T細胞(例えば、示されている サブタイプ(複数可)の T細胞)を選択的に増殖させる固定された薬剤に操作型もしくは非操作型 T細胞、操作型もしくは非操作型 T細胞集団及び/または単離された混合細胞集団を接触させることを含む本明細書に記載の T細胞増殖方法あるいは本明細書に記載の組成物(例えば、活性化剤)のいずれかを含む第1 T細胞増殖を用い、その後、i) 1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 4 T細胞；もしくは 1、 3、 4 及び 5 T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤を含まないか；ii) 1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 4 T細胞；もしくは 1、 3、 4 及び 5 T細胞を選択的に増殖させる、構造的に異なる(例えば固定された)薬剤を含有するか；iii) 1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 4 T細胞；もしくは 1、 3、 4 及び 5 T細胞を選択的に増殖させる固定されていない(可溶性の)薬剤を含有するか；またはiv) T細胞を増殖させる(例えば、及び T細胞を増殖させる)かもしくは T細胞と比較して特異的に T細胞を増殖させる薬剤を含有する培養用培地を使用する第2 T細胞増殖を用いて、実施される。

20

30

【0030】

いくつかの事例では、T細胞を増殖させる薬剤は、CD3に結合する薬剤、例えば抗CD3抗体(例えば、OKT3)である。いくつかの事例では、T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、鎖定常領域もしくは鎖定常領域に結合する薬剤、または TCRに結合する薬剤、例えば、TCRに結合する抗体(例えば、IMMU510)である。いくつかの事例では、T細胞集団は、第1細胞増殖と第2細胞増殖との間で、及び/または第2細胞増殖の後に、正の選択によって濃縮される。いくつかの事例では、T細胞集団は、第1細胞増殖と第2細胞増殖との間で、及び/または第2細胞増殖の後に、T細胞の除去によって濃縮される。

40

【0031】

本発明の方法の特定の実施形態では、例えば濃縮された、T細胞集団は、抗原提示細胞(APC)を含有する培養用培地中での第1、第2またはそれに続く増殖において増殖させられている。いくつかの実施形態では、培養用培地は、T細胞を増殖させるか、T細胞を増殖させるか、T細胞を選択的に増殖させるか、または 1 T細胞、 2 T細胞、 1 T細胞及び 3 T細胞、もしくは 1 T細胞及び 4 T細胞を選択的に増殖

50

させる、1つ以上の薬剤（例えば、T C Rの定常もしくは可変領域に結合する抗体、C D 3に結合する抗体、及び/またはアミノホスホネート）を含有する。特定の実施形態では、濃縮 T細胞集団は、照射済みP B M Cを含有する培養用培地中で増殖させられている。特定の実施形態では、濃縮 T細胞集団は、照射済み人工A P C（a A P C）を含有する培養用培地中で増殖させられている。特定の実施形態では、濃縮 T細胞集団は、照射済みの固定化細胞株（例えば、K 5 6 2 A P C）の細胞集団を含有する培養用培地中で増殖させられている。いくつかの事例では、A P Cは、H L AクラスI、H L AクラスII、H L AクラスIIインバリエント鎖及び/またはH L A - D Mを発現しないか、または低減されたその発現を呈する。いくつかの事例では、A P Cは、接着分子または共刺激分子、例えば、細胞内接着分子 - 1、C D 1 1 a、C D 1 8、C D 5 4、C D 8 0、C D 8 6、4 - 1 B B L、O X - 4 0 L、C D 7 0、または膜に係留された1つ以上の T細胞活性化剤、及び/または白血球機能関連抗原 - 3を発現する。いくつかの事例では、A P Cは、F c受容体、例えば、本明細書に記載の T細胞発現方法において使用される活性化剤のアイソタイプに対して特異的であるF c受容体を発現する。いくつかの事例では、A P Cは、C D 6 4、C D 3 2 A、C D 3 2 B、C D 3 2 C、C D 1 6 A、C D 1 6 B、F c R n、T R I M 2 1もしくはC D 3 0 7、またはより高い親和性もしくは改変された特異性を有するそれらの操作型変異体からなる群から選択される1つ以上のF c受容体を発現する。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞（A P C）、人工抗原提示細胞（a A P C）、または照射済みの抗原提示細胞集団（例えば、P B M C、固定化細胞株、またはa A P C）を含有する培養用培地は、1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 3 T細胞； 1 T細胞及び 4 T細胞；または 1、 3、 4及び 5 T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤をさらに含有する。特定の実施形態では、例えば照射済みの、P B M C、A P C、a A P C、または固定化細胞株の細胞集団は、1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 4 T細胞；または 1、 3、 4及び 5 T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤をそれらの細胞表面に発現する。いくつかの好ましい実施形態では、1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 4 T細胞；または 1、 3、 4及び 5 T細胞を選択的に増殖させる上記1つ以上の薬剤は、抗体である。いくつかの実施形態では、1 T細胞； 2 T細胞； 1 T細胞及び 4；または 1、 3、 4及び 5 T細胞を選択的に増殖させる上記1つ以上の薬剤は、A P Cの表面に発現するか、またはA P Cの表面に発現するF c受容体（例えばF c 受容体）に結合している、抗体である。

20

30

【0033】

いくつかの実施形態では、本発明は、単離された、例えば混合された細胞集団から濃縮 T細胞集団を製造する生体外方法であって、(i)第1 T細胞増殖において、(a) T細胞を（例えば T C Rに結合することによって）増殖させるか、または(b)

- 1 T C Rに特有の活性化エピトープに結合することによって 1 T細胞を選択的に増殖させるか；
- 2 T C Rに特有の活性化エピトープに結合することによって 2 T細胞を選択的に増殖させるか；
- 1 T C R及び 4 T C Rに特有の活性化エピトープに結合することによって 1 T細胞及び 4 T細胞を選択的に増殖させるか；もしくは
- 1、 3、 4及び 5 T C Rに特有の活性化エピトープに結合することによって 1、 3、 4及び 5 T細胞を選択的に増殖させる、1つ以上の薬剤に、例えば混合された細胞集団を、直接接触させ、それによって第1濃縮 T細胞集団を製造すること、ならびにその後、(i i)第2 T細胞増殖において、(a) T細胞を増殖させるか、(b) T細胞を（例えば T C Rに結合することによって）増殖させるか、または(c)
- 1 T C Rに特有の活性化エピトープに結合することによって 1 T細胞を選択的に

40

50

に増殖させるか；

- 2 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 2 T 細胞を選択的に増殖させるか；

- 1 T C R 及び 4 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 1 T 細胞及び 4 T 細胞を選択的に増殖させるか；もしくは

- 1、 3、 4 及び 5 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 1、 3、 4 及び 5 T 細胞を選択的に増殖させる、1つ以上の可溶性であるかまたは固定された薬剤の任意での存在下で、第1濃縮 T 細胞集団の少なくとも一部を抗原提示細胞 (A P C) に直接接触させ、それによって第2濃縮 T 細胞集団を製造することを含み、第2濃縮 T 細胞集団が臨床上妥当な数の (例えば 10^8 個より多い) 1 T 細胞； 2 T 細胞； 1 T 細胞及び 4 T 細胞；または 1、 3、 4 及び 5 T 細胞を含む、当該方法を提供する。

10

【 0 0 3 4 】

いくつかの事例では、臨床上妥当な数の (例えば 10^8 個より多い) T 細胞は、単一ドナー、例えば、単一ドナーからの単一試料または2つ以上の試料から得られる。いくつかの事例では、臨床上妥当な数の (例えば 10^8 個より多い) T 細胞は、単一ドナー、例えば単一ドナーからの単一試料または2つ以上の試料から、30日未満の増殖、好ましくは21日未満の増殖のうちに、より好ましくは19日間の増殖のうちに得られる。

【 0 0 3 5 】

いくつかの事例では、 T 細胞集団は、 (i) と (i i) との間で、または (i i) の後に、正の選択によって濃縮される。いくつかの事例では、 T 細胞集団は、 (i) と (i i) との間で、または (i i) の後に、 T 細胞の除去によって濃縮される。いくつかの事例では、 T 細胞を増殖させる薬剤は、 C D 3 に結合する薬剤、例えば、抗 C D 3 抗体である。いくつかの事例では、 T 細胞を選択的に増殖させる薬剤は、 鎖定常領域もしくは 鎖定常領域に結合する薬剤、または T C R に結合する薬剤、例えば、 T C R に結合する抗体 (例えば、 I M M U 5 1 0) である。

20

【 0 0 3 6 】

本発明の方法の特定の実施形態では、濃縮 T 細胞集団は、 (i) 第1 T 細胞増殖において、 (a) T 細胞を (例えば T C R に結合することによって) 増殖させるか、または (b)

30

- 1 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 1 T 細胞を選択的に増殖させるか；

- 2 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 2 T 細胞を選択的に増殖させるか；

- 1 T C R 及び 4 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 1 T 細胞及び 4 T 細胞を選択的に増殖させるか；もしくは

- 1、 3、 4 及び 5 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 1、 3、 4 及び 5 T 細胞を選択的に増殖させる、1つ以上の第1薬剤に、単離された、例えば混合された細胞集団を接触させて、第1濃縮 T 細胞集団を提供すること、ならびにその後、 (i i) 第2 T 細胞増殖において、 (a) T 細胞を増殖させるか、 (b) T 細胞を (例えば T C R に結合することによって) 増殖させるか、または (c)

40

- 1 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 1 T 細胞を選択的に増殖させるか；

- 2 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 2 T 細胞を選択的に増殖させるか；

- 1 T C R 及び 4 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 1 T 細胞及び 4 T 細胞を選択的に増殖させるか；もしくは

- 1、 3、 4 及び 5 T C R に特有の活性化エピトープに結合することによって 1、 3、 4 及び 5 T 細胞を選択的に増殖させる、1つ以上の第2薬剤に、第1

50

濃縮 T細胞集団またはその一部を接触させ、この場合、1つ以上の第2薬剤が、1つ以上の第1薬剤とは構造的に異なるものであり、それによって第2濃縮 T細胞集団を提供することによって、製造される。いくつかの事例では、1つ以上の第2薬剤は、1つ以上の第1薬剤と比較して異なっている TCRエピトープに結合する。

【0037】

いくつかの事例では、T細胞集団は、(i)と(ii)との間で、または(ii)の後に、正の選択によって濃縮される。いくつかの事例では、T細胞集団は、(i)と(ii)との間で、または(ii)の後に、T細胞の除去によって濃縮される。いくつかの事例では、T細胞を増殖させる薬剤は、CD3に結合する薬剤、例えば、抗CD3抗体である。いくつかの事例では、T細胞を選択的に増殖させる薬剤は、鎖定常領域もしくは鎖定常領域に結合する薬剤、またはTCRに結合する薬剤、例えば、TCRに結合する抗体(例えば、IMMU510)である。

10

【0038】

いくつかの事例では、第1 T細胞増殖は、抗原提示細胞(APC)を含有する培養用培地中で実施される。いくつかの事例では、第2 T細胞増殖は、抗原提示細胞(APC)を含有する培養用培地中で実施される。いくつかの事例では、第1 T細胞増殖は、抗原提示細胞(APC)を含有しない培養用培地中で実施される。いくつかの事例では、第1 T細胞増殖は、抗原提示細胞(APC)を含有しない培養用培地中で実施され、第2 T細胞増殖は、抗原提示細胞(APC)を含有する培養用培地中で実施される。いくつかの事例では、第1及び第2 T細胞増殖は、抗原提示細胞(APC)を含有する培養用培地中で実施される。いくつかの事例では、第1及び第2 T細胞増殖は、アミノホスフェート、アミノホスホネート、ビスホスホネートまたはそれらの組み合わせを含有する培養用培地中で実施される。

20

【0039】

別の実施形態では、本発明の濃縮 T細胞集団(複数可)は、対象への投与のためにさらに製剤化され得る。本発明の濃縮 T細胞集団(複数可)は、治療的有効量のT細胞を含む。特定の実施形態では、当該 T細胞集団(複数可)は、1つ以上の構造的に別個の腫瘍認識部分を安定的に発現するように操作されている。特定の実施形態では、操作型 T細胞(複数可)は本明細書に記載のとおり、増殖させられており、かつ/またはさらに増殖させられる。

30

【0040】

上記の態様、実施形態、事例及び例のうちいくつかでは、1つ以上の薬剤は、30時間未満、例えば約17時間超~約30時間未満に1回の細胞分裂の平均速度でT細胞の増殖を刺激する。いくつかの実施形態では、分裂の上記平均速度は、連続する0~4、0~5、0~7日間のT細胞増殖、連続する0~13日間のT細胞増殖、連続する0~19日間のT細胞増殖、連続する0~21日間のT細胞増殖についてのもの、または連続する少なくとも3、4、5、6、7、10、13、19もしくは21日間のT細胞増殖についてのものである。他の実施形態では、1つ以上の薬剤は、24時間未満、例えば約17時間超~約24時間未満に1回の細胞分裂の平均速度でT細胞の増殖を刺激する。他の実施形態では、1つ以上の薬剤は、18時間未満または約18時間に1回の細胞分裂の平均速度でT細胞の増殖を刺激する。

40

【0041】

例えば、T細胞操作型クローンもしくは細胞株、1つ以上の(例えば構造的に異なる)操作型T細胞を含有する集団の確立後、またはT細胞を含有する細胞集団の負もしくは正の選択の1つ以上のステップの後の、実質的に一様な細胞集団からのT細胞増殖(例えば、選択的T細胞増殖)に、上記の態様、実施形態、事例及び例のうち1つ以上を容易に適合させることができることは、理解されよう。したがって、上記方法のうち1つ以上またはその組み合わせを用いて、可溶性形態または固定化形態にある(例えば、APCの表面に固定された)本明細書に記載の1つ以上の抗体を含めた本明細書に記載の活性化剤のいずれか1つ以上に操作型T細胞またはその集団を接触させ

50

ることによって操作型 T 細胞を増殖させることができる。

【0042】

かくして、いくつかの実施形態では、単離された混合細胞集団は、本明細書に記載の方法または組成物において、T 細胞操作型クローンもしくは細胞株、または1つ以上の（例えば構造的に異なる）操作型 T 細胞を含有する集団で置き換えられる。

【0043】

他の態様では、本発明は、増殖済み T 細胞の60%超、70%超、80%超または90%超が1 T 細胞；1 T 細胞及び4 T 細胞；または1 T 細胞、3 T 細胞、4 T 細胞及び5 T 細胞である、選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）を提供する。特定の実施形態では、選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）は、1 T 細胞及び2 T 細胞を含み、増殖済み T 細胞のうち60%超、70%超、80%超または90%超が、1 T 細胞、1 T 細胞及び4 T 細胞；または1 T 細胞、3 T 細胞、4 T 細胞及び5 T 細胞である。特定の実施形態では、選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）は、濃縮 T 細胞集団からの T 細胞の正の選択（例えば、1 T 細胞、1 T 細胞及び3 T 細胞、または1 T 細胞及び4 T 細胞の正の選択）によるかまたは濃縮 T 細胞集団からの非 T 細胞の除去（例えば、T 細胞などの非 T 細胞の除去）による精製がなされていない。

【0044】

特定の実施形態では、選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）は、Tリンパ球を含む単離された混合細胞集団から直接増殖させられている。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%のTリンパ球、及び約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1.5%未満、約1.2%未満、約1%未満、約0.9%未満、約0.8%未満、約0.7%未満、約0.6%未満、約0.5%未満、約0.4%未満、約0.3%未満、約0.2%未満または約0.1%未満の1細胞を含む。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、約1.5%未満、約1.2%未満、約1%未満、約0.9%未満、約0.8%未満、約0.7%未満、約0.6%未満、約0.5%未満、約0.4%未満、約0.3%未満、約0.2%未満または約0.1%未満の1細胞を含む。いくつかの実施形態では、単離された混合細胞集団は、末梢血試料、臍帯血試料、腫瘍、上皮組織または、皮膚、肝臓もしくはその他の組織の生検材料から選択される。いくつかの実施形態では、単離された混合細胞集団は、単一ドナーに由来する。他の実施形態では、単離された混合細胞集団は、1より多い数または多数のドナーに由来する。一実施形態では、増殖済み T 細胞集団（複数可）は、例えば結腸腺癌転移、肝臓、卵巣、頭頸部または腎臓のがんから単離され得る、腫瘍内浸潤リンパ球に由来する。

【0045】

いくつかの実施形態では、本発明の選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）は、ナイーブ表現型またはTセントラルメモリー（TCM）表現型であるそれぞれCD45RA+/CD27+及び/またはCD45RA-/CD27+を発現する1 T 細胞；1 T 細胞及び4 T 細胞；または1 T 細胞、3 T 細胞、4 T 細胞及び5 T 細胞を60%または70%より多く含む。いくつかの実施形態では、増殖済み T 細胞集団は多クローン性のTCR多様性を含む。

【0046】

他の態様では、本発明は、増殖済み T 細胞の80%超または90%超が2 T 細胞である、選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）を提供する。特定の実施形態では、選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）は、濃縮 T 細胞集団からの T 細胞の正の選択（例えば、2 T 細胞の正の選択）によるかまたは濃縮 T 細胞集団から

10

20

30

40

50

の非 T 細胞の除去（例えば、 T 細胞などの非 2 T 細胞の除去）による精製がなされていない。特定の実施形態では、選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）は、Tリンパ球を含む単離された混合細胞集団から直接増殖させられている。特定の実施形態では、 T 細胞集団（複数可）を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 80%、約 70%、約 60%、約 50%、約 40%、約 30% または約 20% の Tリンパ球、及び約 60% 未満、約 50% 未満、約 40% 未満、約 30% 未満、約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、約 1.5% 未満、約 1.2% 未満、約 1% 未満、約 0.9% 未満、約 0.8% 未満、約 0.7% 未満、約 0.6% 未満、約 0.5% 未満、約 0.4% 未満、約 0.3% 未満、約 0.2% 未満または約 0.1% 未満の 2 細胞を含む。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法で T 細胞を増殖させる元となる単離された混合細胞集団は、約 30% 未満、約 25% 未満、約 20% 未満、約 15% 未満、約 10% 未満、約 5% 未満、約 4% 未満、約 3% 未満、約 2% 未満、約 1.5% 未満、約 1.2% 未満、約 1% 未満、約 0.9% 未満、約 0.8% 未満、約 0.7% 未満、約 0.6% 未満、約 0.5% 未満、約 0.4% 未満、約 0.3% 未満、約 0.2% 未満または約 0.1% 未満の 2 細胞を含む。いくつかの実施形態では、単離された混合細胞集団は、末梢血試料、臍帯血試料または腫瘍から選択される。一実施形態では、増殖済み混合細胞集団（複数可）は、例えば結腸腺癌転移、肝臓、卵巣、頭頸部または腎臓のがんから単離され得る、腫瘍内浸潤リンパ球に由来する。

10

【0047】

他の態様では、本発明は、増殖済み T 細胞のうち 10~90% が 1 T 細胞であり、増殖済み T 細胞のうち 90~10% が 2 T 細胞である、選択的に増殖させた T 細胞集団（複数可）を提供する。

20

【0048】

特定の実施形態では、上記集団は、例えば 1 細胞； 1 T 細胞及び 3 T 細胞； 1 T 細胞及び 4 T 細胞；または 1 T 細胞、 3 T 細胞、 4 T 細胞及び 5 T 細胞を選択的に増殖させる薬剤と、 2 細胞を選択的に増殖させる薬剤とに同時に、あるいは別々の接触ステップにおいて混合細胞集団を接触させることによって、まとめて増殖させられている。他の実施形態では、集団は、単離された混合細胞集団から別々に選択的に増殖させられた、 1 及び 2 T 細胞集団の混合物である。全ての実施形態において、本発明の増殖済み T 細胞集団（複数可）またはその混合物はさらに、対象への投与のために製剤化され得る。

30

【0049】

特定の実施形態では、本発明の T 細胞または T 細胞集団（複数可）は、発現力セットによってコードされる 1 つ以上の構造的に別個の腫瘍認識部分を安定的に発現するように操作されている。一実施形態では、当該 T 細胞は、発現力セットによってコードされる 2 つ以上の構造的に別個の腫瘍認識部分を安定的に発現するように操作されている。いくつかの実施形態では、2 つ以上の構造的に別個の腫瘍認識部分は、同じ抗原の異なるエピトープ、または異なる抗原の異なるエピトープを認識する。腫瘍認識部分は、(i) 細胞表面腫瘍抗原、もしくは (i i) MHC との複合体（ペプチド - MHC 複合体）として細胞表面に発現する腫瘍抗原に由来するペプチドに結合する、 TCR、 TCR、 TCR、 TCR もしくは TCR の断片、キメラ抗原受容体（CAR）、全抗体もしくはそれらの抗原結合断片、一本鎖可変断片（scFv）、重鎖もしくは軽鎖単ドメイン抗体（sdAb）、Fab、F(ab)₂、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。特定の実施形態では、腫瘍認識部分は、非 MHC 拘束的に腫瘍特異抗原を認識する腫瘍内浸潤リンパ球の TCR である。

40

【0050】

別の態様では、本発明は、本発明の方法によって得られる増殖済み T 細胞集団（複数可）を提供する。いくつかの実施形態では、 T 細胞集団は、抗原提示細胞またはアミノホスホネートによる抗原刺激を伴わずに生体外で増殖させられている。特定の実施形

50

態では、 T細胞集団は、生体外でモノクローナル抗体、抗体断片または融合タンパク質によって活性化させられている。本発明の T細胞集団（複数可）はさらに、IL-2の共投与を伴わずに対象へ投与されることのために製剤化され得る。あるいは、本発明の T細胞集団（複数可）はさらに、IL-2の共投与を伴って対象へ投与されることのために製剤化され得る。

【0051】

他の態様では、本発明は、がんの処置を、それを必要とする対象に施す方法であって、本発明に係る増殖済み T細胞集団を治療的有効量投与することを含む、当該方法を提供する。一実施形態では、増殖済み T細胞集団は、対象のMHC遺伝子座に関して同種異系である。特定の実施形態では、増殖済み T細胞集団は、1つ以上の発現カセットによってコードされる1つ以上または2つ以上の腫瘍認識部分を安定的に発現するように操作されている。さらなる実施形態では、増殖済み T細胞集団は、少なくとも2つの構造的に異なる認識部分を安定的に発現し、構造的に異なる認識部分の各々が、(i) 同じ抗原の異なるエピトープ、または(ii)異なる抗原の異なるエピトープを認識する。腫瘍認識部分は、(i)細胞表面腫瘍抗原、または(ii)MHCとの複合体（ペプチド-MHC複合体）として細胞表面に発現した腫瘍抗原に由来するペプチドに結合する、TCR、TCR、キメラ抗原受容体（CAR）（全抗体もしくはそれらの抗原結合断片、一本鎖可変断片（scFv）、重鎖もしくは軽鎖単一ドメイン抗体（sdAb）、Fab、Fab₂、またはそれらの任意の組み合わせも含む）からなる群から選択され得る。

【0052】

別の態様では、本発明は操作型 T細胞を提供し、当該操作型 T細胞は腫瘍認識部分を発現するように操作されており、当該腫瘍認識部分は腫瘍抗原を認識するものであり、かつ/または当該操作型 T細胞は、TS-1、TS8.2、B6もしくは15D抗体と同じエピトープに結合する1つ以上の薬剤の存在下において（例えば、試験管内で当該1つ以上の薬剤と接触して）試験管内で増殖するものである。別の態様では、本発明は操作型 T細胞を提供し、当該操作型 T細胞は腫瘍認識部分を発現するように操作されており、当該腫瘍認識部分は腫瘍抗原を認識するものであり、かつ/または当該操作型 T細胞は、TS-1、TS8.2、B6もしくは15D抗体と結合するエピトープとは異なるエピトープもしくは重複しないエピトープに結合する1つ以上の薬剤の存在下において（例えば、試験管内で当該1つ以上の薬剤と接触して）試験管内で増殖するものである。いくつかの事例では、操作型 T細胞は、TS-1、TS8.2、B6または15D抗体による T細胞への結合と競合しない1つ以上の薬剤の存在下において（例えば、試験管内で当該1つ以上の薬剤と接触して）試験管内で増殖する。一実施形態では、薬剤は、本明細書に記載の可溶性であるかまたは固定された活性化剤のいずれか1つ以上である。一実施形態では、操作型 T細胞は、1、2、3または4操作型 T細胞である。

【0053】

特定の実施形態では、操作型 T細胞は、少なくとも1つのHLA遺伝子座からの遺伝子発現を欠くようにさらに操作されている。一実施形態では、1つ以上の薬剤は、30時間未満、例えば約17時間超～約30時間未満に1回の細胞分裂の平均速度で操作型 T細胞の増殖を刺激する。いくつかの実施形態では、分裂の上記平均速度は、連続する0～4、0～5、0～7日間の T細胞増殖、連続する0～13日間の T細胞増殖、連続する0～19日間の T細胞増殖、連続する0～21日間の T細胞増殖におけるもの、または連続する少なくとも3、4、5、6、7、10、13、19もしくは21日間の T細胞増殖におけるものである。他の実施形態では、1つ以上の薬剤は、24時間未満、例えば約17時間超～約24時間未満に1回の細胞分裂の平均速度で操作型 T細胞の増殖を刺激する。他の実施形態では、1つ以上の薬剤は、18時間未満または約18時間に1回の細胞分裂の平均速度で操作型 T細胞の増殖を刺激する。特定の実施形態では、腫瘍認識部分は腫瘍内浸潤リンパ球に由来する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

別の態様では、本発明は、増殖済み T 細胞集団であって、 T 細胞集団が抗腫瘍性細胞傷害性を含む、当該増殖済み T 細胞集団を提供する。いくつかの事例では、

T 細胞集団は、NK p 3 0 活性、NK p 4 4 活性及び / または NK p 4 6 活性とは無関係の抗腫瘍性細胞傷害性を含む。いくつかの事例では、 T 細胞集団は抗腫瘍性細胞傷害性を含み、抗腫瘍性細胞傷害性は、NK p 3 0 活性、NK p 4 4 活性及び / または NK p 4 6 活性とは無関係の抗腫瘍活性から構成されるかまたはそれから本質的に構成される。いくつかの事例では、 T 細胞集団は抗腫瘍性細胞傷害性を含み、抗腫瘍性細胞傷害性の少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 % または 9 9 % は、NK p 3 0 活性、NK p 4 4 活性及び / または NK p 4 6 活性とは無関係である。

10

【 0 0 5 5 】

いくつかの事例では、 T 細胞集団は、操作型 T 細胞の集団である。いくつかの事例では、 T 細胞集団は、非操作型 T 細胞の集団である。いくつかの事例では、

T 細胞集団は、NK p 3 0 活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性、NK p 4 4 活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性、及び / または NK p 4 6 活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性を含まない。いくつかの事例では、 T 細胞集団は、NK p 3 0 活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性を含まない。いくつかの事例では、 T 細胞集団は、NK p 4 4 活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性を含まない。いくつかの事例では、 T 細胞集団は、抗 CD 2 0 キメラ抗原受容体 (C A R) を含む操作型 T 細胞の集団である。いくつかの事例では、集団中の T 細胞のうち 9 0 % 未満、8 0 % 未満、7 5 % 未満、7 0 % 未満、6 0 % 未満、5 0 % 未満、4 0 % 未満、3 0 % 未満、2 0 % 未満または 1 0 % 未満が、検出可能なレベルの NK p 3 0、NK p 4 4 及び / または NK p 4 6 を発現する。

20

【 0 0 5 6 】

参照による組込み

本明細書において言及される全ての刊行物、特許及び特許出願は、個々の刊行物、特許及び特許出願を参照により援用することを具体的かつ個別に示したのと同じ程度に、参照により本明細書に援用される。

【 0 0 5 7 】

本発明の新規な特徴は別記の特許請求の範囲において詳しく明示されている。本発明の特徴及び利点についてのよりよい理解は、本発明の原理が利用されている例示的实施形態を示す以下の詳細な説明、及び添付の図面 (さらに、本明細書中の「図 (f i g u r e) 」及び「図 (F I G .) 」) を参照することによって得られよう。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 8 】

【 図 1 】 操作型 T 細胞を模式的に示す。パネル A は、1 つの腫瘍認識部分を発現している操作型 T 細胞を示す。パネル B は、2 つの構造的に別個の腫瘍認識部分を発現している操作型 T 細胞を示す。

【 図 2 】 対象を処置する方法を模式的に示す。

【 図 3 】 操作型 T 細胞の集団を対象に投与方法を模式的に示す。

【 図 4 】 肝臓への結腸腺癌転移癌 (T I L 1) 及び腎腫瘍 (T I L 2) から単離された、C C R 4 及び C C R 7 を発現することが示されている 1 及び 2 リンパ球の成長を示すグラフを描写する。

40

【 図 5 】 血清含有培地及び無血清培地での T 細胞成長を示すグラフを描写する。

【 図 6 】 5 A 6 . E 9、B 1、T S 8 . 2、1 5 D、B 3、B 6、T S - 1、3 . 2 0、I M M U 5 1 0、または 1 1 F 2 を使用する抗 T C R 抗体遮断実験を示すグラフを描写する。

【 図 7 】 5 A 6 . E 9、B 1、T S 8 . 2、1 5 D、B 3、B 6、T S - 1、3 . 2 0、I M M U 5 1 0、または 1 1 F 2 を使用する抗 T C R 抗体遮断実験を示すグラフを描写する。

【 図 8 】 抗 T C R V 1 T S - 1 抗体を使用する競合実験を描写する。

50

【図9】抗TCR V₁TS8.2抗体を使用する競合実験を描写する。

【図10】PBMCからのV₁T細胞の活性化及び増殖を示すグラフを描写する。

【図11】PBMCからのV₂T細胞の活性化及び増殖を示すグラフを描写する。

【図12】PBMCからのV₁T細胞の増殖倍率を示すグラフを描写する。

【図13】PBMCからのV₂T細胞の増殖倍率を示すグラフを描写する。

【図14】ヒトV₁アミノ酸配列を描写する。CDR1、CDR3及びCDR3領域に下線を引いてある。

【図15】ヒトV₂アミノ酸配列を描写する。CDR1、CDR3及びCDR3領域に下線を引いてある。

【図16】TS-1またはTS8.2抗体によるPBMCの活性化がV₁⁺T細胞の顕著かつ特異的な増殖をもたらすことを描写する。(A)24ウェルプレートにおいてMAb(TS1、TS8.2、B6及び15D)を直接塗布(1μg/mL)したかまたはヤギ抗マウスFc(5μg/mL)(TS1Fc、TS8.2Fc、B6Fc及び15DFc)に捕捉(0.1μg/mL)させた。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中10⁶細胞/mLのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、14日目までさらに増殖させた。培養用培地は2~3日ごとに補給した。データは、14日間にわたるV₁⁺細胞の増殖を描写する。(B)Aと同じ培養であり、14日目及び0日目(d0)のV₁⁺細胞の百分率を示す。(C)異なるドナーからの単離されたPBMCからV₁⁺細胞を増殖させた。24ウェルプレートにおいてMAb(TS1、TS8.2、B6及び15D)を直接塗布(1μg/mL)したかまたはヤギ抗マウスFc(5μg/mL)(TS1Fc、TS8.2Fc、B6Fc及び15DFc)に捕捉(0.1μg/mL)させた。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中10⁶細胞/mLのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、新鮮な培地で10⁶細胞/mLに調節した。培養用培地は2~3日ごとに補給し、10⁶細胞/mLに調節した。データは、14日間にわたるV₁⁺細胞増殖を描写する。(D)10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中10⁶細胞/mLのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、10⁶細胞/mLに調節し、23日目までさらに増殖させた。培養用培地は2~3日ごとに補給した。

【図17-1】B6及び15D抗体によるPBMCの活性化がV₂⁺T細胞の顕著で特異的な活性化及び増殖をもたらすことを描写する。(A)24ウェルプレートにおいてMAb(TS1、TS8.2、B6及び15D)を直接塗布(1μg/mL)したかまたはヤギ抗マウスFc(5μg/mL)(TS1Fc、TS8.2Fc、B6Fc及び15DFc)に捕捉(0.1μg/mL)させた。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中10⁶細胞/mLのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、14日目までさらに増殖させた。培養用培地は2~3日ごとに補給した。データは、14日間にわたるV₂⁺T細胞増殖を描写する。(B)Aと同じ培養であり、14日目及び0日目(d0)のV₂⁺細胞の百分率を示す。(C)24ウェルプレートにおいてMAb(15D及び、汎TCR Mab Immu510)を直接塗布(1μg/mL)した。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中10⁶細胞/mLの、異なるドナーからの単離されたPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移した。培養物は2~3日ごとに補給され、新鮮な培地で10⁶細胞/mLに調節された。データは、14日間にわたるV₂⁺T細胞増殖を描写する。(D)Cと同じ培養であり、14日目及び0日目(d0)のV₂⁺T細胞の百分率を示す。(E)24ウェルプレートにおいてMAb(TS1、TS8.2、B6及び15D)を直接塗布(1μg/mL)したかまたはヤギ抗マウスFc(5μg/mL)(TS1Fc、TS8.2Fc、B6Fc及び15DFc)に捕捉(0.1μg/mL)させた。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中10⁶細胞/mLの、別のドナーからのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、新鮮な培地で10⁶細胞/mLに調節した。培養用培

10

20

30

40

50

地を2～3日ごとに補給し、 10^6 細胞/mLに調節した。データは、14日間にわたるV₂+T細胞増殖を描写する。

【図17-2】B6及び15D抗体によるPBMCの活性化がV₂+T細胞の顕著で特異的な活性化及び増殖をもたらすことを描写する。(A)24ウェルプレートにおいてMAb(TS1、TS8.2、B6及び15D)を直接塗布($1\mu\text{g/mL}$)したかまたはヤギ抗マウスFc($5\mu\text{g/mL}$)(TS1Fc、TS8.2Fc、B6Fc及び15DFc)に捕捉($0.1\mu\text{g/mL}$)させた。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中 10^6 細胞/mLのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、14日目までさらに増殖させた。培養用培地は2～3日ごとに補給した。データは、14日間にわたるV₂+T細胞増殖を描写する。(B)Aと同じ培養であり、14日目及び0日目(d0)のV₂+T細胞の百分率を示す。(C)24ウェルプレートにおいてMAb(15D及び、汎TCR MAb Immu510)を直接塗布($1\mu\text{g/mL}$)した。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中 10^6 細胞/mLの、異なるドナーからの単離されたPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移した。培養物は2～3日ごとに補給され、新鮮な培地で 10^6 細胞/mLに調節された。データは、14日間にわたるV₂+T細胞増殖を描写する。(D)Cと同じ培養であり、14日目及び0日目(d0)のV₂+T細胞の百分率を示す。(E)24ウェルプレートにおいてMAb(TS1、TS8.2、B6及び15D)を直接塗布($1\mu\text{g/mL}$)したかまたはヤギ抗マウスFc($5\mu\text{g/mL}$)(TS1Fc、TS8.2Fc、B6Fc及び15DFc)に捕捉($0.1\mu\text{g/mL}$)させた。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中 10^6 細胞/mLの、別のドナーからのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、新鮮な培地で 10^6 細胞/mLに調節した。培養用培地を2～3日ごとに補給し、 10^6 細胞/mLに調節した。データは、14日間にわたるV₂+T細胞増殖を描写する。

10

20

【図18】特異的抗体TS1、TS8.2、B6及び15Dと共に培養されたPBMC中のT細胞の百分率の顕著な低下を描写する。(A)24ウェルプレートにおいてMAb(TS1、TS8.2、B6及び15D)を直接塗布($1\mu\text{g/mL}$)したかまたはヤギ抗マウスFc($5\mu\text{g/mL}$)(TS1Fc、TS8.2Fc、B6Fc及び15DFc)に捕捉($0.1\mu\text{g/mL}$)させた。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中 10^6 細胞/mLのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、14日目までさらに増殖させた。培養用培地は2～3日ごとに補給した。データは、14日間にわたるT細胞増殖を描写する。(B)Aと同じ培養であり、14日目及び0日目(d0)のT細胞の百分率を示す。

30

【図19】TCRの活性化がT細胞倍加時間の短縮をもたらすことを描写する。24ウェルプレートにおいてMAb(TS1、TS8.2、B6及び15D)を直接塗布($1\mu\text{g/mL}$)したかまたはヤギ抗マウスFc($5\mu\text{g/mL}$)(TS1Fc、TS8.2Fc、B6Fc及び15DFc)に捕捉($0.1\mu\text{g/mL}$)させた。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中 10^6 細胞/mLのPBMCを播種した。7日目に、抗体を含まない新しいプレートへ細胞を移し、新鮮な培地で 10^6 細胞/mLに調節した。培養物は2～3日ごとに補給され、新鮮な培地で 10^6 細胞/mLに調節された。V₁、V₂及びT細胞の倍加時間をそれぞれ(A)、(B)及び(C)に示す。

40

【図20】TS8.2及びTS1によるV₁の活性化が主にナイーブ表現型及びセントラルメモリー表現型をもたらすことを描写する。24ウェルプレートにおいて抗体(TS8.2、R9.12及び汎Immu510)を直接塗布($1\mu\text{g/mL}$)した。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中 10^6 個/mLのPBMCを播種した。培地は、新鮮な培地で1:2に希釈した15日目は別として23日目まで2～3日ごとに補給した。フローサイトメトリー分析を用いて、14日目及び23日目の細胞表現型をCD45RA及びCD27の発現によって決定した。

50

【図21】TS8.2及びMICAによるPBMCの活性化がV1T細胞ではなくV1T細胞の増殖を強化することを描写する。24ウェルプレートにおいて抗体TS8.2(1µg/mL)、またはTS8.2とMICA-Fc(1及び5µg/mL)を直接塗布した。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中10⁶個/mLのPBMCを播種した。培地は2~3日ごとに補給する。(A)はV1T細胞増殖であり、(B)はV1T細胞増殖である。

【図22】V1及びV2特異的抗体による臍帯血単核細胞の活性化がV1⁺及びV2⁺T細胞の顕著かつ特異的な増殖をもたらすことを描写する。24ウェルプレートにおいて1µg/mLのMAbTS8.2、R9.12、B6及び15Dを直接塗布した。10%のFBS及び100IU/mLのIL-2を含むRPMI中10⁶個/mLの臍帯血単核細胞を活性化させた。V1及びV2T細胞増殖をそれぞれ(A)及び(B)に示す。

10

【図23】V1J1、V1J2及びV1J3鎖と、C8鎖との対合によって生み出された可溶性TCRの結合性を描写する。データは、TS1及びTS8.2が、V1J1及びV1J2鎖から生み出された可溶性TCRを認識するがしかしV1J3鎖には結合し損なった、ということを示しており、J1及びJ2遺伝子セグメントがTS1及びTS8.2の結合性に肝要であることを示唆している。V1に結合するR9.12及び、C8定常領域に結合するものである汎抗体Immuno510は、特定J領域による影響を受けない。

【図24】ヒトV1のJ1、J2及びJ3領域の配列アラインメント、ならびにV1J1鎖の選定位置に生じさせた変異を描写する。BE-13は、C18TCRを発現しているT細胞白血病細胞株(DSMZ受託番号ACC396)からのV1J1領域を指す。V1J1及びV1J2領域における位置Lys120の単一アミノ酸のThrまたはAlaによる置き換えは、TS-1及びTS8.2MAbの結合性を完全に消滅させ、V1J1及びV1J2領域にあるこのアミノ酸がTS-1及びTS8.2の結合性に寄与していることが示唆された。V1J3領域における位置Thr120の単一アミノ酸のLysによる置き換えは、TS-1及びTS8.2MAbの結合性の獲得をもたらす、V1J1及びV1J2領域にあるこのアミノ酸がTS-1及びTS8.2の結合性に寄与していることがさらに示唆された。

20

【図25】V1J1におけるLys120からThrまたはAlaへの点突然変異がTS-1及びTS8.2MAbによる結合性の喪失を招くことを描写する。

30

【図26】ヒトV1タンパク質配列及び、ヒトV1アミノ酸配列とウシV1アミノ酸配列(GenBank:AFP25162.1)との差異に基づく6つの突然変異型ヒトV1配列を描写する。突然変異は太字で示されている。

【図27】ヒトV1突然変異鎖に対するTS-1及びTS8.2の結合性の喪失を描写する。

【図28】種々のV2/C鎖対合(C3、C8、C9)に対するB6MAbの結合性を描写する。

【図29】ヒトV2可変領域(IMGTHITRDV2)とアカゲザルV2可変領域(GenBank:AY190028.1)とのタンパク質配列アラインメント、ならびにV2のCDR1(G35S)、CDR2(D65G)及びCDR3(C104S)に生じた変化を描写する。

40

【図30】CDR1において突然変異したV2(G35S)に対する15Dの結合性の喪失を描写する。

【図31】V1、V2及びC8のためにそれぞれTS8.2、B6及びIP26を使用する、高度に濃縮されたV1⁺、V2⁺及びC8T細胞培養物の特性評価を描写する。

V1細胞を増殖させるTS-1とTS8.2との組み合わせ、またはV2細胞を増殖させる15DとB6との組み合わせを使用して、PBMCに由来する集団を増殖させた。IP26マイクロビーズを使用して、増殖済み培養物からC8T細胞を除去した。正の選択がなされたC8T細胞も採集した(C8を濃縮した)。

【図32】固形腫瘍(BxPC3、SKMEL5)細胞株及び形質細胞腫(RPMI82

50

26) 細胞株に対するV₁+集団、V₂+集団の細胞傷害性を描写する。

【図33-1】 1特異的MAbの重鎖のフレームワーク及び相補性決定領域のアミノ酸配列を描写する。

【図33-2】 1特異的MAbの重鎖のフレームワーク及び相補性決定領域のアミノ酸配列を描写する。

【図34-1】図33に記載の1特異的MAbの軽鎖のフレームワーク及び相補性決定領域のアミノ酸配列を描写する。

【図34-2】図33に記載の1特異的MAbの軽鎖のフレームワーク及び相補性決定領域のアミノ酸配列を描写する。

【図35-1】 2特異的MAbの重鎖のフレームワーク及び相補性決定領域のアミノ酸配列を描写する。 10

【図35-2】 2特異的MAbの重鎖のフレームワーク及び相補性決定領域のアミノ酸配列を描写する。

【図36-1】 2特異的MAbの軽鎖のフレームワーク及び相補性決定領域のアミノ酸配列を描写する。

【図36-2】 2特異的MAbの軽鎖のフレームワーク及び相補性決定領域のアミノ酸配列を描写する。

【図37】ELISAによって決定した、示されている1特異的抗体と他のTCRとの交差反応性を描写する。

【図38】ヒトとイルカとのV₁推測アミノ酸配列のアラインメントを描写する。 20

【図39】本明細書に記載のT細胞増殖方法によって得られた、増殖しているV₁細胞(A)またはV₂細胞(B)の百分率を描写する。

【図40】本明細書に記載のT細胞増殖方法によって得られた、単離された混合細胞集団からのV₁細胞(A)またはV₂細胞(B)の増殖倍率を描写する。

【図41】本明細書に記載のT細胞増殖方法によって得られた、単離された混合細胞集団からの表現型データを描写する。細胞表現型は、フローサイトメトリー分析を用いてCD45RA及びCD27の発現によって判定される。

【図42】本明細書に記載のT細胞増殖方法によって活性化及び増殖させた1T細胞が腫瘍細胞株に対して堅牢な細胞傷害性を示すことができることを例示する。

【図43】本発明の方法によって実現される19日目のV₁の増殖倍率及び純度を例示する。 30

【図44】本発明の方法によって実現される19日目のV₁の増殖倍率及び積算倍加時間を例示する。

【図45】本発明の方法によって実現される14日目から19日目までのV₁の増殖倍率及び積算倍加時間を例示する。

【図46】1T細胞上の抗CD20キメラ抗原受容体(CAR)の発現を例示する。CARレトロウイルス構築物による形質導入後から7日目に、増殖済み細胞をV₁特異的抗体(R9.12)及び抗リツキシマブFITC結合体で染色した。V₁細胞のうち最大35%がCD20CAR+であった。

【図47-1】A~Bは、-1特異的T細胞活性化物質についてのエピトープ結合特異性データを描写する。 40

【図47-2】A~Bは、-1特異的T細胞活性化物質についてのエピトープ結合特異性データを描写する。

【図47-3】A~Bは、-1特異的T細胞活性化物質についてのエピトープ結合特異性データを描写する。

【図48】-2特異的T細胞活性化物質についてのエピトープ結合特異性データを描写する。

【発明を実施するための形態】

【0059】

発明の詳細な説明

本明細書には本発明の様々な実施形態が示され記載されているが、当業者であれば、そのような実施形態が単に例として提供されているに過ぎないことは明らかであろう。当業者であれば、本発明から逸脱することなく多くの変型、変更及び代用を着想し得る。本発明の実施形態の様々な代替策を採用してもよいことは理解されるべきである。

【0060】

定義

特に定義されない限り、本明細書中で使用する全ての科学技術用語は、本明細書に記載の本発明が属する分野において通常の技量を有する者に普通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書を解説する目的のために以下の定義を適用することとし、適当と認められる場合には、単数形で使用される用語に複数形も含めることとし、その逆もまた同様である。明示されている何らかの定義が、参照により本明細書に援用される何らかの文献と矛盾する場合、以下に明示する定義が優先されることとする。

【0061】

本明細書中で使用する「 γ T細胞（ガンマデルタ T細胞）」という用語は、1つの鎖と1つの鎖とからなる独特の T細胞受容体（TCR）である TCR を表面に発現する T細胞のサブセットを指す。「 γ T細胞」という用語は、具体的には、限定することなく V₁ 及び V₂、V₃ T細胞、ならびにナイーブ、エフェクターメモリー、セントラルメモリー及び終末分化 T細胞を含めた、T細胞の全てのサブセットを含む。さらに例を挙げると、「 γ T細胞」という用語は、V₄、V₅、V₇ 及び V₈ T細胞、ならびに V₂、V₃、V₅、V₈、V₉、V₁₀、V₁₁ T細胞を含む。

【0062】

本明細書中で使用される場合、「Tリンパ球」または「T細胞」という用語は、CD3 を発現しており（CD3+）かつ T細胞受容体を発現している（TCR+）免疫細胞を指す。T細胞は、細胞性免疫において中心的な役割を果たす。

【0063】

本明細書中で使用される場合、「TCR」または「T細胞受容体」という用語は、アルファ - ベータまたはガンマ - デルタ受容体を形成している異種二量体型の細胞表面シグナル伝達タンパク質を指す。TCR が、MHC 分子によって提示される抗原を認識するのに対して、TCR は、MHC 提示とは無関係に抗原を認識する。

【0064】

「MHC」（主要組織適合性複合体）という用語は、細胞表面抗原提示タンパク質をコードする遺伝子のサブセットを指す。ヒトにおいてはこれらの遺伝子はヒト白血球抗原（HLA）遺伝子と呼ばれる。本明細書において、略語 MHC または HLA は互換的に使用される。

【0065】

本明細書中で使用される場合、「末梢血リンパ球（複数可）」または「PBL（複数可）」という用語は、最も広い意味で使用され、幅広い分化段階及び機能的段階の T細胞及び B細胞、形質細胞、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、好塩基球、好酸球などを含めた白血球細胞（複数可）を指す。末梢血中の Tリンパ球の範囲は約 20 ~ 80 % である。

【0066】

本明細書中で使用される場合、「細胞集団」という用語は、適切な供給源から（大抵、哺乳動物から）直接単離によって得られた多くの細胞を指す。単離された細胞集団は、その後、試験管内で培養され得る。当業者であれば、本発明と共に用いられる、細胞集団を単離及び培養する様々な方法、ならびに本発明で用いられるのに適する、細胞集団中の細胞の様々な数を熟知していよう。細胞集団は、例えば、末梢血試料、臍帯血試料、腫瘍、幹細胞前駆体、腫瘍生検材料、組織、リンパに由来するか、または外部環境に直接接している対象の上皮部位に由来するか、または幹前駆細胞に由来する、混合異種細胞集団であり得る。あるいは、混合細胞集団は、末梢血試料、臍帯血試料、腫瘍、幹細胞前駆体、腫

10

20

30

40

50

瘍生検材料、組織、リンパから、または外部環境に直接接している対象の上皮部位から、または幹前駆細胞から確立された、哺乳動物細胞の試験管内培養物に由来するものであり得る。

【 0 0 6 7 】

「濃縮」細胞集団または製剤は、出発混合細胞集団に由来する、含有している特定細胞種の百分率が出発集団中のその細胞種の百分率よりも高い細胞集団を指す。例えば、出発混合細胞集団を特定 T 細胞集団に関して濃縮することができる。一実施形態では、濃縮 T 細胞集団は、含有している 1 細胞の百分率が出発集団中の細胞種の百分率よりも高い。別の例を挙げると、濃縮 T 細胞集団は、含有している 1 細胞の百分率及び 3 細胞の百分率が両方とも出発集団中のその細胞種の百分率よりも高いものであり得る。さらに別の例を挙げると、濃縮 T 細胞集団は、含有している 1 細胞の百分率及び 4 細胞の百分率が両方とも出発集団中のその細胞種の百分率よりも高いものであり得る。さらに別の例を挙げると、濃縮 T 細胞集団は、含有している 1 T 細胞、 3 T 細胞、 4 T 細胞及び 5 T 細胞の百分率が出発集団中のその細胞種の百分率よりも高いものであり得る。別の実施形態では、濃縮 T 細胞集団は、含有している 2 細胞の百分率が出発集団中のその細胞種の百分率よりも高い。さらに別の実施形態では、濃縮 T 細胞集団は、含有している 1 細胞及び 2 細胞の百分率が両方とも出発集団中のその細胞種の百分率よりも高い。全ての実施形態において、濃縮 T 細胞集団は、 T 細胞集団をより低い百分率で含有する。

10

【 0 0 6 8 】

本明細書中で使用する「増殖済み」とは、濃縮済み製剤中の所望の細胞種すなわち標的細胞種（例えば、 1 及び / または 2 T 細胞）の数が、初期細胞集団中すなわち出発細胞集団中での数よりも大きいことを意味する。「選択的に増殖させる」とは、標的細胞種（例えば、 1 及び / または 2 T 細胞）を他の非標的細胞種、例えば T 細胞または NK 細胞よりも優先的に増殖させることを意味する。特定の実施形態では、本発明の活性化剤は、 2 T 細胞の顕著な増殖を伴わずに、例えば操作型または非操作型の、 1 T 細胞を選択的に増殖させる。他の実施形態では、本発明の活性化剤は、 1 T 細胞の顕著な増殖を伴わずに、例えば操作型または非操作型の、 2 T 細胞を選択的に増殖させる。特定の実施形態では、本発明の活性化剤は、 2 T 細胞の顕著な増殖を伴わずに、例えば操作型または非操作型の、 1 及び 3 T 細胞を選択的に増殖させる。特定の実施形態では、本発明の活性化剤は、 2 T 細胞の顕著な増殖を伴わずに、例えば操作型または非操作型の、 1 及び 4 T 細胞を選択的に増殖させる。特定の実施形態では、本発明の活性化剤は、 2 T 細胞の顕著な増殖を伴わずに、例えば操作型または非操作型の、 1、 3、 4 及び 5 T 細胞を選択的に増殖させる。これとの関連において、「顕著な増殖を伴わずに」という用語は、優先的に増殖した細胞集団が 基準細胞集団よりも少なくとも 1 0 倍、好ましくは 1 0 0 倍、より好ましくは 1 , 0 0 0 倍多く増殖させられていることを意味する。

20

30

【 0 0 6 9 】

本明細書中で使用する「混合物」という用語は、混合異種細胞集団に由来する 2 つ以上の単離された濃縮細胞集団の組み合わせを指す。特定の実施形態によれば、本発明の細胞集団は、単離された T 細胞集団である。

40

【 0 0 7 0 】

細胞集団に対して適用される「単離された」という用語は、生体内または試験管内で上記細胞集団に関連付けられる 1 つ以上の細胞集団を実質的に含まない、ヒトまたは動物の体から単離された細胞集団を指す。

【 0 0 7 1 】

細胞集団との関連において、「接触させること」という用語は、本明細書中で使用される場合、単離された細胞集団を試薬、例えば、ビーズか細胞かのどちらかに繋がれることができる抗体、サイトカイン、リガンド、マイトジェンまたは共刺激分子と共にインキュベートすることを指す。抗体またはサイトカインは、可溶性形態であってもよいし、ま

50

たは固定されていてもよい。一実施形態では、固定されている抗体またはサイトカインは、ビーズまたはプレートに緊密に結合または共有結合している。一実施形態では、抗体はFc被覆ウェルに固定されている。望ましい実施形態では、接触は、生体外（例えば試験管内）または生体内で起こる。

【0072】

本明細書中で使用される場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子及び、免疫グロブリン(Ig)分子の免疫学的活性部分、すなわち抗原と特異的に結合する(免疫反応する)抗原結合部位を含有する分子を指す。「特異的に結合する」または「免疫反応する」または「指向する」とは、抗体が、所望の抗原の1つ以上の抗原決定基とは反応するが、他のポリペプチドとは反応しないかまたははるかに低い親和性($K_D > 10^{-6}$ モラー)で結合する、ということの意味する。抗体としては、限定されないが例えば、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、sdAb(重鎖または軽鎖単一ドメイン抗体)、一本鎖のFab、Fab及びF(ab')断片、scFv、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、ならびにFab発現ライブラリーが挙げられる。

10

【0073】

本明細書中で使用する「キメラ抗原受容体(CAR)」という用語は、人工T細胞受容体、Tボディ、一本鎖免疫受容体、キメラT細胞受容体、またはキメラ免疫受容体を指し得、例えば、特定の免疫エフェクター細胞に人工的な特異性を融合させる操作型受容体を包含し得る。CARは、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に付与してそれによって例えば養子細胞療法用の多数の特異的T細胞を生じさせるために採用され得る。具体的な実施形態において、CARは、細胞の特異性を例えば腫瘍関連抗原へ差し向ける。いくつかの実施形態では、CARは、(標的指向性部分と標的腫瘍細胞などの標的細胞との係合に際してT細胞を活性化させる)細胞内活性化ドメインと、膜貫通ドメインと、疾患または障害関連抗原結合領域、例えば腫瘍抗原結合領域を含んでおり長さが様々であり得る細胞外ドメインとを含む。詳しい態様において、CARは、CD3-ゼータ膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインと融合した、モノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片(scFv)の融合体を含む。他のCAR設計の特異性は、受容体(例えばペプチド)のリガンド、またはデクチンなどのパターン認識受容体に由来し得る。特定の事例では、抗原認識ドメインの間隔を調整して活性化誘導細胞死を低減することができる。特定の事例では、CARは、追加の共刺激シグナル伝達のためのドメイン、例えばCD3-ゼータ、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10/12、及び/またはOX40、ICOS、TLRなどを含む。いくつかの事例では、共刺激分子、造影用(例えばポジトロン断層撮影用)のレポーター遺伝子、プロドラッグの添加によってT細胞を条件的に取り除く遺伝子産物、帰巢受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカイン及びサイトカイン受容体を含めた分子をCARと一緒に共発現させることができる。

20

30

【0074】

基本的な抗体構造単位は、四量体を含むことが知られている。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一対からなり、各対は1つの「軽鎖」(約25kDa)と1つの「重鎖」(約50~70kDa)とを有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主として担う、約100~110またはそれより多いアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主として担う定常領域を画定している。一般に、ヒトから得られた抗体分子は、クラスIgG、IgM、IgA、IgE及びIgDのいずれかに関係しており、それらは分子中に存在する重鎖の性質が互いに異なっている。特定のクラスは、IgG₁、IgG₂などといったサブクラスも有する。さらに、ヒトにおいては、軽鎖はカッパ鎖またはラムダ鎖であり得る。

40

【0075】

「Fab」という用語は、L鎖全体(V_L及びC_L)に加えてH鎖の可変領域ドメイン(V_H)と1本の重鎖の第1定常ドメイン(CH1)とから構成される抗体断片を指す。完全抗体のパイン消化を用いて2つのFab断片を生じさせることができ、その各々は、1つの抗原結合部位を含有する。典型的には、パイン消化によって生成するFabの

50

L鎖とH鎖断片は鎖間ジスルフィド結合によって繋がっている。

【0076】

「Fc」という用語は、スルフィド結合によってまとめ合わされた、両H鎖のカルボキシ末端部分(CH₂及びCH₃)とヒンジ領域の一部とを含む、抗体断片を指す。抗体のエフェクター機能は、Fc領域の配列によって決まり、この領域は、特定の種類の細胞上に見受けられるFc受容体(FcR)によって認識される部分でもある。1つのFc断片は、完全抗体のパパイン消化によって得られる。

【0077】

「F(ab')₂」という用語は、完全抗体のパパイン消化によって生成する抗体断片を指す。F(ab')₂断片は、ジスルフィド結合によってまとめ合わされた、2つのFab断片とヒンジ領域の一部とを含有する。F(ab')₂断片は、二価の抗原結合活性を有し、抗原を架橋することができる。

10

【0078】

Fab'という用語は、F(ab')₂断片の還元生成物である抗体断片を指す。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含んでいるCH₁ドメインのカルボキシ末端に少数の追加残基を有する点においてFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基(複数可)が遊離チオール基を有しているFab'に対する本明細書中での呼称である。

【0079】

「Fv」という用語は、緊密に非共有結合的に会合している1つの重鎖可変領域ドメインと1つの軽鎖可変領域ドメインとの二量体から構成される抗体断片を指す。これらの2つのドメインの折りたたみによって、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与しかつ抗体に抗原結合特異性を付与する6つの超可変ループ(H鎖及びL鎖からそれぞれ3つずつのループ)が生まれる。しかしながら、一本の可変ドメイン(または抗原に対して特異的であるCDRを3つしか含んでいないFvの半分)であっても、完全な結合部位よりも親和性が大抵低いものの、抗原を認識して抗原に結合する能力は有している。

20

【0080】

「sFv」または「scFv」とも略される「一本鎖Fv」という用語は、1本のポリペプチド鎖として連結されたVH及びVL抗体ドメインを含む抗体断片を指す。典型的には、scFvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間に、抗原結合のための所望の構造をscFvが形成することを可能にするものであるポリペプチドリンカーをさらに含む。scFvの総説については、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)、及びMalmberg et al., J. Immunol. Methods 183:7-13, 1995を参照されたい。

30

【0081】

「直鎖状抗体」という表現は、1対の抗原結合領域を形成する1対のタンデムV_H-C_H1セグメント(V_H-C_H1-V_H-C_H1)を含むポリペプチドを指して使用される。直鎖状抗体は、二重特異性または単一特異性であり得、例えば、Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)において記載がなされている。

40

【0082】

「可変」という用語は、可変ドメインの特定部分が、抗体間での配列の違いを広範囲に有しており、各特定抗体のその特定抗原に対する結合性及び特異性において使用される、という事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたって一様に分布してはいない。それは、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの両方において、超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。より高度に保存されている可変ドメインの部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重軽鎖の可変ドメイン

50

はそれぞれ、概ねベータシート配置を採っている4つのFRを含み、それらは、ベータシート構造を連結しがついくつもの事例においてはベータシート構造の一部を形成するループを形成している3つの超可変領域によって連結されている。各鎖の中の超可変領域は、FRによってごく近傍にまとめ合わされており、他方の鎖からの超可変領域と共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. を参照のこと)。定常ドメインは、抗体を抗原と結合させるのに直接関与しないが、様々なエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害(ADCC)における抗体の関与を呈する。

10

【0083】

「抗原結合部位」または「結合部分」という用語は、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の部分を指す。抗原結合部位は、重(「H」)鎖及び軽(「L」)鎖のN末端の可変(「V」)領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖のV領域内の差異の大きい3つの範囲は、「超可変領域」と呼ばれており、「フレームワーク領域」または「FR」として知られる両脇のより保存された範囲の間に挟まれている。このように、「FR」という用語は、免疫グロブリンの超可変領域同士の間でそれらに隣接して天然に見受けられるアミノ酸配列を指す。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域と、重鎖の3つの超可変領域は、互いに関して三次元空間に配置されて抗原結合表面を形成している。抗原結合表面は、結合した抗原の三次元表面に対して相補的であり、重鎖の各々の3つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれる。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))、またはChothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)、Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989)の定義による。

20

【0084】

「超可変領域」、「HVR」または「HV」という用語は、配列が超可変性であり、かつ/または構造的に画定されたループを形成する、抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、VH(H1、H2、H3)に3つと、VL(L1、L2、L3)に3つとの、6つのHVRを含む。天然抗体においては、6つのHVRの中ではH3及びL3が最大の多様性を呈し、特にH3は、抗体に微妙な特異性を付与する独特の役割を果たすと考えられている。例えば、Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000)、Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003)を参照されたい。実際、重鎖のみから構成される天然に存在するラクダ抗体は軽鎖の不在で機能的かつ安定である。例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)、Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)を参照されたい。

30

40

【0085】

「フレームワーク領域」(FR)は、CDR残基以外の可変ドメイン残基である。各可変ドメインは、典型的には、FR1、FR2、FR3及びFR4として同定される4つのFRを有する。CDRがKabatによって定義される場合、軽鎖FR残基は、残基約1~23(LCFR1)、35~49(LCFR2)、57~88(LCFR3)及び98~107(LCFR4)のところに位置しており、重鎖FR残基は、重鎖残基の残基約1~30(HCFR1)、36~49(HCFR2)、66~94(HCFR3)、及び103~113(HCFR4)のところに位置している。CDRが超可変ループからのアミノ酸残基を含む場合、軽鎖FR残基は、軽鎖の残基約1~25(LCFR1)、33~4

50

9 (LCFR2)、53~90 (LCFR3) 及び97~107 (LCFR4) のところに位置しており、重鎖FR残基は、重鎖残基の残基約1~25 (HCFR1)、33~52 (HCFR2)、56~95 (HCFR3)、及び102~113 (HCFR4) のところに位置している。ある場合には、CDRが、Kabatによる定義に倣うCDRと超可変ループのそれとの両方からのアミノ酸を含む場合、FR残基はそれに応じて調節されることになる。例えば、CDRH1がアミノ酸H26~H35を含む場合、重鎖FR1残基は位置1~25にあり、FR2残基は位置36~49にある。

【0086】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンのVLまたはVHフレームワーク配列の選択肢のうち最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンのVLまたはVH配列の選択肢は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。通常、配列のサブグループは、Kabatにおけるようなサブグループである。特定の事例では、VLの場合のサブグループは、Kabatにおけるような、サブグループカッパIである。特定の事例では、VHの場合のサブグループは、KabatにおけるようなサブグループIIIである。

10

【0087】

本明細書中で使用する場合、「Kd」または「Kd値」は、表面プラズモン共鳴アッセイを用いて、例えばBIAcore.TM.-2000またはBIAcore.TM.-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) を使用して、約10応答ユニット (RU) の抗原または抗体が固定されたCM5チップによって25で測定される、解離定数を指す。二価抗体または他の多価抗体の場合には、アビディティによって誘導される解離定数の測定結果との干渉を回避するために抗体を固定するのが典型的である。さらなる詳細については例えばChen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999) を参照されたい。

20

【0088】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体と特異的に結合することができる任意のタンパク質決定基、脂質または炭化水素決定基を含む。エピトープ決定基は大抵、アミノ酸、脂質または糖側鎖などの分子の活性表面群から構成され、大抵、特有の三次元構造特徴及び特有の電荷特徴を有する。抗体は、平衡解離定数 (K_D) が $10^{-6} \sim 10^{-12}$ Mの範囲である場合、抗原に特異的に結合するとされる。「活性化エピトープ」は、結合によって特定のT細胞集団を活性化させることができる。

30

【0089】

抗体が基準抗体と「本質的に同じエピトープ」に結合するというのは、2つの抗体が同一または立体的に重複するエピトープを認識する場合である。2つのエピトープが同一または立体的に重複するエピトープと結合するか否かを判定するための最も広く用いられている迅速な方法は、標識抗原か標識抗体かのどちらかを使用する、多種多様な方式で構成され得る競合アッセイである。いくつかの実施形態では、抗原を96ウェルプレートに固定し、標識抗体の結合を遮断する未標識抗体の能力を、放射性標識または酵素標識を使用して測定する。あるいは、標識抗体及び未標識抗体を使用する競合試験は、抗原発現細胞に対するフローサイトメトリーを用いて実施する。

40

【0090】

「エピトープ位置特定」は、抗体の標的抗原にある、抗体の結合部位またはエピトープを特定するプロセスである。抗体エピトープは、直鎖状エピトープまたは配座エピトープであり得る。直鎖状エピトープは、タンパク質中のアミノ酸の連続配列によって形成される。配座エピトープは、タンパク質配列中では不連続であるがタンパク質のその三次元構造体への折りたたみによって寄せ集められるアミノ酸から形成される。

【0091】

本明細書において定義されるところの「エピトープピング」は、抗体が認識するエピトープに基づいて抗体を分類するプロセスである。より詳しくは、エピトープピングは、抗体のエピトープ認識特性に基づいて抗体をクラスター化するため及び別個の結合特異

50

性を有する抗体を識別するためのコンピュータプロセスと組み合わせられた、異なる抗体のエピトープ認識特性を区別するための方法及びシステムを含む。

【0092】

本発明による「薬剤」または「化合物」は、小分子、ポリペプチド、タンパク質、抗体または抗体断片を含む。小分子は、本発明との関連において、一実施形態では分子量1000ダルトン未満、詳しくは800ダルトン未満、より詳しくは500ダルトン未満の化学物質を意味する。「治療剤」という用語は、生物学的活性を有する薬剤を指す。「抗がん剤」という用語は、がん細胞に対する生物学的活性を有する薬剤を指す。

【0093】

本明細書中で使用する場合、「細胞培養物」という用語は、細胞の任意の試験管内培養物を指す。この用語には、(例えば、不死化表現型を有する)連続細胞株、初代細胞培養物、有限細胞株(例えば、非形質転換細胞)、及び試験管内で維持される他の細胞集団、例えば、幹細胞、血液細胞、胚性臍帯血細胞、腫瘍細胞、形質導入細胞などが含まれる。

10

【0094】

「処置する」または「処置」という用語は、望ましくない生理学的変化または障害を防止するかまたは鈍化(減少)させることを目的とする、治療的処置と予防的または防止的手段との両方を指す。有益な、または所望の臨床結果としては、限定されないが例えば、検出可能であるか検出不能であるかにかかわらず、症候の軽減、疾患度合いの減弱(例えば、腫瘍の大きさ、腫瘍負荷または腫瘍分布の低減)、安定化された(つまり、悪化していない)疾患状態、疾患進行の遅延または鈍化、疾患状態の改善または緩和、及び(部分的であるか完全であるかにかかわらず)寛解が挙げられる。「処置」は、生存期間を、処置を受けていない場合に予想される生存期間よりも長くすることも意味し得る。処置を必要とする者には、症状または障害を既に有する者の他に、症状もしくは障害を有する傾向にある者または症状または障害が防止されるべき者が含まれる。

20

【0095】

1つ以上のさらなる治療剤「と組み合わせた」投与は、同時(同時発生的)投与及び任意の順序での連続投与を含む。

【0096】

「同一」という用語は、本明細書中で使用される場合、同じである2つ以上の配列または小配列を指す。さらに、「実質的に同一」という用語は、本明細書中で使用される場合、比較窓または比較アルゴリズムを使用するかもしくは手動での整列及び目視検査によって測定される指定領域にわたって最大的一致が得られるように比較及び整列されたときに同じである配列単位の百分率を有する2つ以上の配列を指す。単なる例を示すと、2つ以上の配列は、配列単位が特定領域にわたって約60%同一、約65%同一、約70%同一、約75%同一、約80%同一、約85%同一、約90%同一または約95%同一である場合に「実質的に同一」であり得る。そのような百分率は、2つ以上の配列の「同一性パーセント」を表現する。配列の同一性は、長さが少なくとも約75~100配列単位である領域、長さが少なくとも約50配列単位である領域または、指定のない場合には配列全体にわたって、存在し得る。この定義は、試験配列の相補体にも言及するものである。さらに、単なる例を示すと、2つ以上のポリヌクレオチド配列は、核酸残基が同じである場合には同一であるが、2つ以上のポリヌクレオチド配列は、核酸残基が特定領域にわたって約60%同一、約65%同一、約70%同一、約75%同一、約80%同一、約85%同一、約90%同一、または約95%同一である場合には「実質的に同一」である。同一性は、少なくとも約75~約100核酸の長さの領域、約50核酸の長さの領域または、指定のない場合にはポリヌクレオチド配列の配列全体にわたって、存在し得る。

30

40

【0097】

「薬学的に許容できる」という用語は、本明細書中で使用される場合、化合物の生物学的活性または特性を無効にせずしかも比較的無毒である材料、すなわち、望ましくない生物学的作用を引き起こすことまたは組成物中に含まれているいずれかの成分と有害な相互作用をすることを伴わずに個体に投与され得る、材料、限定されないが例えば、塩、担体

50

または希釈剤を指す。

【0098】

「対象」または「患者」という用語は、本明細書中で使用される場合、脊椎動物を指す。特定の実施形態では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物としては、限定されないが例えば、ヒト、非ヒト霊長類、家畜動物（例えばウシ）、競技用動物、及びペット（例えば、ネコ、イヌ及びウマ）が挙げられる。特定の実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0099】

「治療的有効量」という用語は、本明細書中で使用される場合、疾患、症状または障害を既に患っている対象、例えばヒト患者に投与される本発明の増殖済み細胞集団を含有する組成物及び/または混合物の、処置されている疾患、障害もしくは症状の1つ以上の症候を治癒させるか少なくとも部分的に停止させるかまたはある程度緩和するのに十分な量を指す。そのような組成物の有効性は、条件、限定されないが例えば、疾患、障害または症状の重症度及び経過、以前の療法、患者の健康状態及び薬物への応答、ならびに処置する医師の判断に依存する。単なる例を示すと、治療的有効量は、慣習的な実験、限定されないが例えば、用量漸増試験によって決定され得る。

10

【0100】

抗原提示細胞（APC）という用語は、野生型APCまたは、操作型もしくは人工の抗原提示細胞（aAPC）を指す。APCは、APCの照射済み集団として提供されることができる。APCは、固定化細胞株から提供されることができ（例えば、固定化細胞株に由来するK562または操作型aAPC）、または、ドナーからの細胞の画分として提供されることができる（例えば、PBMC）。

20

【0101】

本明細書中で使用する場合、タンパク質もしくはそのポリペプチド断片またはエピトープに関して「構造的に異なる」及び「構造的に別個」という用語は、少なくとも2つの異なるタンパク質、そのポリペプチド断片またはエピトープの間での共有結合的な（つまり構造的な）差異を指す。例えば、2つの構造的に異なるタンパク質（例えば抗体）は、異なる一次アミノ酸配列を有する2つのタンパク質を指し得る。いくつかの事例では、構造的に異なる活性化剤は、構造的に異なるエピトープ、例えば異なる一次アミノ酸配列を有するエピトープに結合する。

【0102】

本明細書中で使用する場合、特定受容体活性（例えば、NKp30活性、NKp44活性及び/またはNKp46活性）とは「無関係」な「抗腫瘍性細胞傷害性」という用語は、特定受容体または受容体の特定の組み合わせが細胞で発現するかまたは機能的であるか否かにかかわらず発揮される抗腫瘍性細胞傷害性を指す。このように、NKp30活性、NKp44活性及び/またはNKp46活性とは無関係な抗腫瘍性細胞傷害性を呈する

30

T細胞は、NKp30活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性、NKp44活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性及び/またはNKp46活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性を呈するものでもあり得る。

【0103】

本明細書中で使用する場合、「NKp30活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性」、「NKp44活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性」及び「NKp46活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性」という用語は、特定受容体の機能的発現を必要とする抗腫瘍性細胞傷害性を指す。そのような受容体依存性の抗腫瘍性細胞傷害性の存否は、実施例48で実施するような標準的な試験管内細胞傷害性アッセイを特定受容体に対する拮抗薬の存在下または非存在下で実施することによって判定することができる。例えば、NKp30活性依存性の抗腫瘍性細胞傷害性の存否は、実施例48で実施するような試験管内細胞傷害性アッセイの抗NKp30拮抗薬の存在下での結果と、抗NKp30拮抗薬の非存在下で得られた結果とを比較することによって判定することができる。

40

【0104】

抗腫瘍性細胞傷害性の少なくとも特定「%」分が特定受容体活性（例えば、NKp30

50

活性、NKp44活性及び/またはNKp46活性)と「無関係」である、抗腫瘍性細胞傷害性を含む T細胞集団は、本明細書中で使用される場合、特定受容体を遮断することによって測定抗腫瘍性細胞傷害性はその数値%値分より大きく低下することがない細胞を指す。したがって、抗腫瘍性細胞傷害性のうち少なくとも50%がNKp30活性とは無関係である、抗腫瘍性細胞傷害性を含む T細胞集団は、NKp30拮抗薬の存在下では、NKp30拮抗薬の非存在下における場合と比べて試験管内での抗腫瘍性細胞傷害性の50%以下の低下を示すであろう。

【0105】

概説

ヒトにおいて、T細胞(複数可)は、自然免疫応答と適応免疫応答との関連性を提供するT細胞のサブセットである。これらの細胞は、V-(D)-Jセグメント再構成を経て抗原特異的なT細胞受容体(TCR)を生み出し、T細胞(複数可)は、TCRが、独立もしくは協働して作用してT細胞エフェクター機能を活性化させる他の非TCRタンパク質かのどちらかによる抗原認識によって直接活性化されることができる。T細胞は、哺乳類においてT細胞集団全体の小画分を占め、末梢血中及びリンパ器官中のT細胞のおよそ1~5%を占めており、またそれらは、皮膚、肝臓、消化管、気道及び生殖管のような上皮細胞に富む区画に主として存在しているようである。主要組織適合性複合体分子(MHC)に結合している抗原を認識するTCRとは違い、TCRは、細菌抗原、ウイルス抗原、疾患細胞で発現するストレス抗原、及び完全タンパク質または非ペプチド化合物の形態の腫瘍抗原を直接認識することができる。

10

20

【0106】

TS-1、TS8.2、B6及び15Dは、T細胞を活性化させることができる。理論に拘泥しないが、異なるドナーから生じる培養物の活性化及び増殖の異なるレベルは、ドナーの可変TCRレパートリー、及び抗体結合エピトープに起因するものであり得る。特定のT細胞サブセットに結合する全ての薬剤が、特定のT細胞を活性化させること、特に、濃縮培養物中の特定のT細胞集団を臨床上妥当なレベル、すなわち10⁸個超の標的T細胞にまで活性化させることができるわけでない、ということが発見された。同様に、T細胞集団の全ての結合エピトープが、活性化エピトープである、つまり結合によって特定のT細胞集団を活性化させることができる、というわけではない。

30

【0107】

本発明者らは、特定のT細胞サブタイプの強力な活性化に関連する特定の可変TCR結合領域を同定し、かくして、患者へ投与されることができる、純度の向上した臨床上妥当なレベルの高濃縮T細胞集団及びその混合物を生じさせるT細胞サブタイプの特異的活性化を可能にした。T細胞サブタイプの強化された活性化及び増殖を誘導することができる活性化エピトープに特異的に結合する、抗体を含めた新規活性化リガンドも企図され、本明細書中にさらなる記載がある。

【0108】

いくつかの事例では、本発明の方法を使用する臨床上妥当なレベル(すなわち、10⁸個超)のT細胞の製造は、比較的少ない量の培養用培地を使用して達成することができる。例えば、いくつかの実施形態では、臨床上妥当なレベルのT細胞は、およそ25L; 20L; 10L; 5L; 3L; 2L; 1, 5000mL; 1, 000mL; 500mL; 200mL; 150mL; 100mLまたはそれ未満(例えば、約10mL~約100mL、約100mL~約500mL、約500mL~約5, 000mL, または約5L~約25L)の採集培養体積で、細胞集団(例えば、単離された混合細胞集団)の増殖によって得ることができる。別の例を挙げると、いくつかの実施形態では、臨床上妥当なレベルのT細胞は、1ドナーまたは多数のドナーから得られた単離された混合細胞集団を増殖させるのに使用する培養用培地の総体積が約50L未満、約25L未満、約20L未満、約10L未満、約5L未満、約1L未満または約750mL未満(例えば、約750mL~約50L未満、約100mL~約750mL、約750mL~約5L、約1L

40

50

～約10L、約10L～約50L、または約10L～約25L)となるような条件下で得ることができる。

【0109】

本明細書では、例えば事前の非標的細胞種の除去を伴わずに、細胞傷害特性を有する臨床妥当なレベルの濃縮 T細胞集団(複数可)を提供する、単離された混合細胞集団からの T細胞サブタイプの選択的活性化及び増殖のための方法について記載する。特定細胞集団(複数可)の 可変TCREピトープを活性化させることについても記載する。本発明はさらに、本発明の濃縮 T細胞集団(複数可)を含む組成物による処置方法を提供する。

【0110】

本発明では、 T細胞の1つ以上の特定サブセットを含む臨床妥当なレベル(10⁸個超)の操作型または非操作型 T細胞を製造または提供する方法について記載する。そのような方法を用いて、単一ドナーから、例えば単一ドナーの単一試料からそのような臨床妥当なレベルをもたらすことができる。さらに、そのような方法を用いて、10⁸個より著しく多い操作型または非操作型 T細胞を製造することができる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で、 T細胞の1つ以上の特定サブセットを含む操作型または非操作型 T細胞を約もしくは少なくとも約10⁹個、約もしくは少なくとも約10¹⁰個、約もしくは少なくとも約10¹¹個、または約もしくは少なくとも約10¹²個製造することができる。いくつかの事例では、集団のそのような大きさを、19～30日という短さで、かつ/または使用する培養用培地の総体積を約1L未満にして、実現することができる。

【0111】

T細胞の単離

いくつかの態様では、本発明は、操作型または非操作型 T細胞を増殖させる生体外方法を提供する。いくつかの事例では、方法は、IL-4、IL-2もしくはIL-15またはそれらの組み合わせなどの、 T細胞の特定集団の増殖に役立つサイトカインを含まない、1つ以上の(例えば、第1及び/または第2の)増殖ステップを採用する。いくつかの実施形態では、本発明は、単離された混合細胞集団から濃縮 T細胞集団を製造する生体外方法であって、1TCR; 1及び4TCR;または1、3、4及び5TCRに特有のエピトープに結合することによってそれぞれ1T細胞; 1T細胞及び3T細胞; 1T細胞及び4T細胞;または1、3、4及び5T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤に、混合細胞集団を接触させて、濃縮 T細胞集団をもたらすことを含む、当該方法を提供する。他の態様では、本発明は、単離された混合細胞集団から濃縮 T細胞集団を製造する生体外方法であって、2TCRに特有のエピトープに結合することによって2T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤に、混合細胞集団を接触させて、濃縮 T細胞集団をもたらすことを含む、当該方法を提供する。

【0112】

他の態様では、本開示は、対象から単離された T細胞を遺伝子操作する方法を提供する。濃縮、活性化、増殖または遺伝子操作の方法は、単独で、または組み合わせて、任意の順序で実施することができる。一実施形態では、 T細胞を、単離し、遺伝子操作し、その後、活性化及び増殖させることができる。好ましい実施形態では、 T細胞を、単離し、活性化及び増殖させ、その後、任意で遺伝子操作することができる。いくつかの実施形態では、そのような活性化及び増殖させその後遺伝子操作した T細胞をさらに活性化及び増殖させることができる。

【0113】

例えば非操作型の、 T細胞集団を、対象の複合試料から増殖させることができる。複合試料は、末梢血試料(例えば、PBLまたはPBMNC)、白血球アフェレーシス試料、臍帯血試料、腫瘍、幹細胞前駆体、腫瘍生検材料、組織、リンパ、または外部環境に直接接している対象の上皮部位からのもの、または幹前駆細胞に由来するものであり得る。

いくつかの事例では、本開示は、V₁⁺細胞、V₂⁺細胞、V₁⁺細胞及びV₃⁺細胞、V₁⁺細胞及びV₄⁺細胞、V₁⁺細胞、V₃⁺細胞、V₄⁺細胞及びV₅⁺細胞、またはそれらの任意の組み合わせを選択的に増殖させる方法を提供する。

【0114】

末梢血単核細胞は、例えばFicoll-Paque（商標）PLUS（GE Healthcare）システムまたは別の適切な装置/システムを含めたアフレーシス機械で、対象から採集することができる。採集した試料からT細胞（複数可）、またはT細胞（複数可）の所望の亜集団を例えばフローサイトメトリー技術によって精製することができる。対象が誕生する間に臍帯血から臍帯血細胞を得ることもできる。PBMC単離、T細胞活性化ならびにT細胞活性化剤の製造及び使用のための方法及び組成物を含めるが限定はされないあらゆる目的のために参照により本明細書に援用される、WO2016/081518を参照されたい。

10

【0115】

T細胞は、例えば第1増殖ステップにおいて、TCRのエピトープに特異的に結合することによってT細胞を増殖させる1つ以上の薬剤に混合細胞集団を接触させることによって試験管内で培養される単離された複合試料または混合細胞集団から増殖させられて、濃縮T細胞集団をもたし得る。いくつかの実施形態では、全PBMC集団中に含まれているT細胞を、1つ以上の特定細胞集団、例えば、次の非T細胞単球：T細胞、B細胞及びNK細胞のうち1つ以上または全ての事前の除去を伴うことなく活性化及び増殖させることができ、結果として濃縮T細胞集団が得られる。いくつかの態様では、T細胞の活性化及び増殖は、天然型または操作型APCの存在を伴わずに実施される。いくつかの態様では、腫瘍検体からのT細胞の単離及び増殖は、本明細書において提供されるTCRの活性化エピトープに結合する固定化T細胞マイトジェン、例えば、TCRの活性化エピトープに特異的な抗体及びレクチンを含めた他の活性化剤を使用して実施することができる。

20

【0116】

特定の実施形態では、T細胞を増殖させる1つ以上の薬剤に、単離された混合細胞集団を、約もしくは少なくとも約2日間、約3日間、約4日間、約5日間、約6日間、約7日間、約8日間、約9日間、約10日間、約11日間、約12日間、約13日間、約14日間、約15日間、約17日間、約19日間、約21日間、約25日間、約29日間、約30日間またはその中の任意の範囲にわたって接触させる。例えば、T細胞を増殖させる1つ以上の薬剤に、単離された混合細胞集団を、約1日間～約4日間、約2日間～約4日間、約2日間～約5日間、約3日間～約5日間、約5日間～約21日間、約5日間～約19日間、約5日間～約15日間、約5日間～約10日間、または約5日間～約7日間にわたって接触させて、第1濃縮T細胞集団をもたらし。別の例を挙げると、T細胞を増殖させる1つ以上の薬剤に、単離された混合細胞集団を、約7日間～約21日間、約7日間～約19日間、約7日間～約23日間、または約7日間～約15日間にわたって接触させて、第1濃縮T細胞集団をもたらし。

30

【0117】

いくつかの事例では、第1増殖ステップと第2増殖ステップとの間で精製または単離ステップを実施する。いくつかの事例では、単離ステップは1つ以上の活性化剤の除去を含む。いくつかの事例では、単離ステップは、T細胞またはそのサブタイプの特異的な単離を含む。いくつかの事例では、1つ以上（例えば全て）の活性化剤（例えば、細胞培養用培地の一般的成分でない全ての活性化剤、例えば血清成分及び/またはIL-2）が第1増殖ステップと第2増殖ステップとの間で除去されるが、T細胞は他の細胞種（T細胞）から特異的に単離されない。

40

【0118】

いくつかの実施形態では、第1濃縮ステップ及び場合によっては第2濃縮ステップにおいてTCRの活性化エピトープに結合する活性化剤を使用してT細胞を活性化及び増殖させた後、第2、第3、第4、第5などの濃縮ステップにおいて当技術分野で知ら

50

れている技術を用いて本発明の例えば第1の濃縮 T細胞集団(複数可)をさらに濃縮または精製して第2またはさらなる濃縮 T細胞集団(複数可)を得てもよい。例えば、 T細胞、B細胞及びNK細胞を例えば第1の濃縮 T細胞集団(複数可)から除去してもよい。採集された T細胞(複数可)上に発現される細胞表面マーカーの正及び/または負の選択を用いて例えば第1の濃縮 T細胞集団(複数可)から、同様の細胞表面マーカーを発現している T細胞または T細胞(複数可)の集団を直接単離することができる。例えば、CD2、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD44、Kit、TCR、TCR、TCR(1つ以上のTCRサブタイプを含む)、TCR(1つ以上のTCRサブタイプを含む)、NKG2D、CD70、CD27、CD28、CD30、CD16、OX40、CD46、CD161、CCR7、CCR4、NKp30、NKp44、NKp46、DNAM-1、CD242、JAML及びその他の適切な細胞表面マーカーなどのマーカーの陽性または陰性発現に基づいて T細胞を(例えば第1及び/または第2増殖ステップの後の)濃縮 T細胞集団から単離することができる。

10

【0119】

いくつかの実施形態では、第1増殖ステップの後(例えば、第1増殖ステップに続いて実施される単離ステップの後)に、増殖済み細胞を場合によって希釈し、第2増殖ステップにおいて培養する。好ましい実施形態では、第2増殖ステップは、培養用培地が第2増殖ステップにおいて約1~2日、約1~3日、約1~4日、約1~5日、約2~5日、約2~4日または約2~3日ごとに補給される条件下で実施される。いくつかの実施形態では、第2増殖ステップは、 T細胞のさらなる1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍またはそれ以上の増殖を支援する密度に細胞が希釈または調節される条件下で実施される。いくつかの事例では、細胞密度調節は、培養用培地の補給と同時期(すなわち、同日または同時)に実施される。例えば、細胞密度は第2増殖ステップにおいて1~2日、1~3日、1~4日、1~5日、2~5日、2~4日または2~3日ごとに調節され得る。T細胞のさらなる増殖を支援する典型的な細胞密度としては、限定されないが例えば、培養物に対して約 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 細胞/mL、 10×10^6 細胞/mL、 15×10^6 細胞/mL、 20×10^6 細胞/mL、または 30×10^6 細胞/mLが挙げられる。

20

30

【0120】

いくつかの実施形態では、細胞密度は、約 0.5×10^6 ~約 1×10^6 細胞/mL、約 0.5×10^6 ~約 1.5×10^6 細胞/mL、約 0.5×10^6 ~約 2×10^6 細胞/mL、約 0.75×10^6 ~約 1×10^6 細胞/mL、約 0.75×10^6 ~約 1.5×10^6 細胞/mL、約 0.75×10^6 ~約 2×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 2×10^6 細胞/mL、または約 1×10^6 ~約 1.5×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 2×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 3×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 4×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 5×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 10×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 15×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 20×10^6 細胞/mL、または約 1×10^6 ~約 30×10^6 細胞/mLの密度に調節される。

40

【0121】

いくつかの実施形態では、第2増殖ステップは、細胞を追跡評価して所定細胞密度(または密度区間)に維持する条件、及び/または所定グルコース含有量を有する培養用培地中に細胞を維持する条件のもとに実施される。例えば、細胞は、約 0.5×10^6 ~約 1×10^6 細胞/mL、約 0.5×10^6 ~約 1.5×10^6 細胞/mL、約 0.5×10^6 ~約 2×10^6 細胞/mL、約 0.75×10^6 ~約 1×10^6 細胞/mL、約 0.75×10^6 ~約 1.5×10^6 細胞/mL、約 0.75×10^6 ~約 2×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 2×10^6 細胞/mL、または約 1×10^6 ~約 1.5×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 3×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 4×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 5×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 10×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 15×10^6 細胞/mL、約 1×10^6 ~約 20×10^6 細胞/mL、または約 1×10^6 ~約 30×10^6 細胞/mLの密度に調節される。

50

$0.6 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞/mL、 $1 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/mL、 $1 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^6$ 細胞/mL の生細胞密度に維持され得る。

【0122】

いくつかの事例では、細胞は、増殖の少なくとも一部にわたってより高い濃度で維持され得る。例えば、第1または第2増殖の第1部分にわたって細胞の生存能はより高い細胞濃度で増強される可能性がある。別の例を挙げると、第1または第2増殖の最終部分にわたってより高い細胞濃度で最も効率的に培養物体積が利用される可能性がある。したがって、いくつかの実施形態では、第1もしくは第2増殖培養の少なくとも一部または第1もしくは第2増殖培養の全体にわたって細胞は約 $1 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/mL の生細胞密度で維持され得る。

10

【0123】

別の例を挙げると、細胞は、約 $0.5 \text{ g/L} \sim 1 \text{ g/L}$ 、約 $0.5 \text{ g/L} \sim 1.5 \text{ g/L}$ 、約 $0.5 \text{ g/L} \sim 2 \text{ g/L}$ 、約 $0.75 \text{ g/L} \sim 1 \text{ g/L}$ 、約 $0.75 \text{ g/L} \sim 1.5 \text{ g/L}$ 、約 $0.75 \text{ g/L} \sim 2 \text{ g/L}$ 、約 $1 \text{ g/L} \sim 1.5 \text{ g/L}$ 、約 $1 \text{ g/L} \sim 2 \text{ g/L}$ 、約 $1 \text{ g/L} \sim 3 \text{ g/L}$ 、または約 $1 \text{ g/L} \sim 4 \text{ g/L}$ のグルコース含有量を有する培養用培地中で維持され得る。いくつかの実施形態では、細胞は、約 1.25 g/L のグルコース含有量を有する培養用培地中で維持され得る。いくつかの事例、例えば、高細胞密度培養を維持する場合において、細胞は、約 $1 \text{ g/L} \sim 5 \text{ g/L}$ 、約 $1 \text{ g/L} \sim 4 \text{ g/L}$ 、約 $2 \text{ g/L} \sim 5 \text{ g/L}$ 、または約 $2 \text{ g/L} \sim 4 \text{ g/L}$ のグルコース含有量を有する培養用培地中で維持され得る。

20

【0124】

典型的には、グルコース含有量は、新鮮な血清を含有する培養用培地、または無血清培養用培地を培養物に添加することによって維持される。いくつかの実施形態では、細胞は、例えば各パラメータを追跡評価すること及び新鮮な培地を添加してパラメータを所定限界内に維持することによって、所定の生細胞密度区間で、所定のグルコース含有量区間を有する培養用培地中で維持され得る。いくつかの実施形態では、グルコース含有量は、灌流バイオリクターで細胞を内部に保持しつつ使用済み培地を除去する間に、新鮮な血清を含有する培養用培地、または無血清培養用培地を培養物に添加することによって、維持される。いくつかの実施形態では、T細胞増殖（例えば、選択的 T細胞増殖）中、または本明細書に記載の第1もしくは第2 T細胞増殖（例えば、選択的 T細胞増殖）ステップ中に、pH、 O_2 の分圧、 O_2 飽和度、 CO_2 の分圧、 CO_2 飽和度、ラクテート、グルタミン、グルタメート、アンモニウム、ナトリウム、カリウム及びカルシウムのうちの1つ以上を非限定的に含めた追加パラメータを追跡評価及び/または維持する。

30

【0125】

T細胞サブタイプは、例えば第1増殖ステップにおいて、

i) 1 TCRのエピトープに特異的に結合することによって 1 T細胞を選択的に増殖させるか、

ii) 2 TCRのエピトープに特異的に結合することによって 2 T細胞を選択的に増殖させるか、

iii) 1及び 4 TCRのエピトープに特異的に結合することによって 1及び 4 T細胞を選択的に増殖させるか、または

40

iv) 1、 3、 4及び 5 TCRのエピトープに特異的に結合することによって 1、 3、 4及び 5 T細胞を選択的に増殖させる、1つ以上の薬剤

に混合細胞集団を接触させることによって試験管内で培養される単離された複合試料または混合細胞集団から選択的に増殖させられて、濃縮 T細胞集団をもたし得る。いくつかの事例では、1つ以上の薬剤は、1 J 1、 1 J 2もしくは 1 J 3 TCR、またはそれらのうちの2つ、またはそれらの全てに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、全PBM C集団中の細胞を、特定の細胞集団、例えば、単球、T細胞、B細胞及びNK細胞の事前の除去を伴わずに活性化及び増殖させることができ、その結果として濃縮 T細胞集団を生じさせることができる。いくつかの態様では、T細胞の活

50

性化及び増殖は、天然型または操作型APCの存在を伴わずに実施される。いくつかの態様では、腫瘍検体からの T細胞の活性化及び増殖は、 1TCR ； 1 、 3 、 4 及び 5TCR 、 1 及び 4TCR ；または 2TCR に特有の活性化エピトープに対して特異的である抗体ならびに、 1TCR ； 1 、 3 、 4 及び 5TCR 、 1 及び 4TCR ；または 2TCR に特有の活性化エピトープに結合するレクチンを含めた他の活性化剤を含む固定化 T細胞マイトジェンを使用して実施され得る。

【0126】

特定の実施形態では、 1 、 1 及び 4 、 2 、または 1 及び 2 T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤に、単離された混合細胞集団を約5日間、6日間、約7日間、約8日間、約9日間、約10日間、約11日間、約12日間、約13日間、約14日間、約15日間またはそれらの間の任意の範囲にわたって接触させる。例えば、 1 または 2 T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の薬剤に、単離された混合細胞集団を約1～約3日間、約1～約4日間、約1～約5日間、約2～約3日間、約2～約4日間、約2～約5日間、約3～約4日間、約3～約5日間、約4～約5日間、約5～約15日間、または約5～約7日間にわたって接触させて、第1濃縮 T細胞集団をもたらす。いくつかの実施形態では、選択的に増殖させた 1 、 1 及び 3 、 1 及び 4 、 2 、または 1 及び 2 T細胞を第2増殖ステップにおいてさらに、本明細書において記載されているように増殖させる。

10

【0127】

特定の実施形態では、単離された出発混合細胞集団、例えば、末梢血試料は、約20～80%の範囲のTリンパ球を含む。特定の実施形態では、本発明の濃縮 T細胞集団（複数可）中の残留 T細胞及びNK細胞のパーセントはそれぞれ、約2.5%またはそれ未満、及び約1%またはそれ未満である。本発明の濃縮 T細胞集団（複数可）中の残留 T細胞またはNK細胞のパーセントは、約1%もしくはそれ未満、約0.5%もしくはそれ未満、約0.4%もしくはそれ未満、約0.2%もしくはそれ未満、約0.1%もしくはそれ未満、または約0.01%もしくはそれ未満である。特定の実施形態では、本発明の濃縮 T細胞集団（複数可）中の残留 T細胞のパーセントは、（例えば、T細胞もしくはそのサブタイプの正の選択のステップの後、またはT細胞の除去の後で）約0.4%もしくはそれ未満、約0.2%もしくはそれ未満、約0.1%もしくはそれ未満、または約0.01%もしくはそれ未満である。いくつかの実施形態では、第1及び/または第2 T細胞増殖の前または後に、T細胞は除去されるが、NK細胞は除去されない。特定の態様では、単離された混合細胞集団は、単一ドナーに由来する。他の態様では、単離された混合細胞集団は、1より多い数のドナーまたは多数のドナー（例えば、2、3、4、5、または2～5、2～10、または5～10、またはそれより多い数のドナー）に由来する。

20

30

【0128】

かくして、いくつかの実施形態において本発明の方法は、臨床上妥当な数（ 10^8 超、 10^9 超、 10^{10} 超、 10^{11} 超または 10^{12} 超、または約 10^8 ～約 10^{12} ）の増殖済み T細胞をたったの1ドナーからもたらすことができる。いくつかの事例では、本発明の方法は、臨床上妥当な数（ 10^8 超、 10^9 超、 10^{10} 超、 10^{11} 超または 10^{12} 超、または約 10^8 ～約 10^{12} ）の増殖済み T細胞を、ドナー試料を得た時から19日未満または21日未満のうちにもたらすことができる。

40

【0129】

1 、 1 及び 3TCR 、 1 及び 4TCR 、または 2TCR に特有の活性化エピトープに結合する活性化剤を使用する第1濃縮ステップにおける特定 T細胞サブセットの特異的活性化及び増殖に続いて、第2、第3、第4、第5などの濃縮ステップにおいて当技術分野で知られている技術を用いて本発明の第1濃縮 T細胞集団（複数可）をさらに濃縮または精製して第2またはさらなる濃縮 T細胞集団（複数可）を得てもよい。例えば、第1濃縮 T細胞集団（複数可）から T細胞、B細胞及びNK細胞を除去してもよい。採集された T細胞（複数可）上に発現される細胞表面マーカーの

50

正及び/または負の選択を用いて第1濃縮 T細胞集団(複数可)から、同様の細胞表面マーカーを発現している T細胞または T細胞(複数可)の集団を直接単離することができる。例えば、CD2、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD44、Kit、TCR、TCR、TCR(またはその1つ以上のサブタイプ)、TCR(またはその1つ以上のサブタイプ)、NKGD2D、CD70、CD27、CD28、CD30、CD16、OX40、CD46、CD161、CCR7、CCR4、DNAM-1、JAML及びその他の適切な細胞表面マーカーなどのマーカーの陽性または陰性発現に基づいて T細胞を第1濃縮 T細胞集団から単離することができる。

【0130】

いくつかの実施形態では、本発明の第1 T細胞増殖、第1濃縮ステップ、第2 T細胞増殖及び/または第2濃縮ステップの後に濃縮 T細胞集団は、例えば10mL未満、25mL未満、50mL未満、100mL未満、150mL未満、200mL未満、500mL未満、750mL未満、1L未満、2L未満、3L未満、4L未満、5L未満、10L未満、20L未満または25L未満の培養物体積において临床上妥当なレベルの、 10^8 細胞より多い T細胞サブセットを含む。例えば、本発明の方法は、10~100mL、25~100mL、50~100mL、75~100mL、10~150mL、25~150mL、50~150mL、75~150mL、100~150mL、10~200mL、25~200mL、50~200mL、75~200mL、100~200mL、10~250mL、25~250mL、50~250mL、75~250mL、100~250mL、150~250mL、5~1,000mL、10~1,000mL、または100~1,000mL、150~1,000mL、200~1,000mL、250~1,000mL、400mL~1L、1L~2L、2L~5L、2L~10L、4L~10L、4L~15L、4L~20L、または4L~25Lの体積の増殖培養物において临床上妥当なレベルの、 10^8 細胞より多い T細胞サブセットをもたらしすることができる。他の実施形態では、本発明の第2、第3、第4、第5などの濃縮ステップの後に濃縮 T細胞集団は、临床上妥当なレベルの、 10^8 個より多い T細胞サブセットを含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、T細胞(複数可)は、1つ以上の抗原との接触にตอบสนองして急速に増殖することができる。いくつかの T細胞(複数可)、例えばV α 9V β 2⁺の T細胞(複数可)は、プレニルピロリン酸、アルキルアミン、及び組織培養中の代謝産物または微生物抽出物のようないくつかの抗原との接触にตอบสนองして試験管内で急速に増殖する。さらに、いくつかの野生型 T細胞(複数可)、例えばV α 2V β 2⁺の T細胞(複数可)は、特定種類のワクチン接種(複数可)にตอบสนองしてヒトの生体内で急速に増殖する。刺激された T細胞は、数々の抗原提示、共刺激及び、複合試料からの T細胞(複数可)の単離を容易にすることができる接着分子を呈することができる。例えば抗体または固定化抗体などの本明細書に記載の選択的 T細胞増殖剤による増殖との組み合わせ、その前、またはその後において、複合試料中の T細胞(複数可)を少なくとも1つの抗原で1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、約5~15日間、5~10日間または5~7日間、または別の適切な期間にわたって試験管内で刺激することができる。適切な抗原による T細胞の刺激は、試験管内で T細胞集団を増殖させることができる。

【0132】

複合試料からの T細胞(複数可)の試験管内での増殖を刺激するために使用され得る抗原の非限定的な例としては、プレニルピロリン酸、例えばイソペンテニルピロリン酸(IPP)、アルキルアミン、ヒト微生物病原体の代謝産物、共生細菌の代謝産物、-メチル-3-ブテニル-1-ピロリン酸(2M3B1PP)、(E)-4-ヒドロキシ-3-メチル-ブタ-2-エニルピロリン酸(HMB-PP)、エチルピロリン酸(EP)、ファルネシルピロリン酸(FPP)、ジメチルアリルリン酸(DMAP)、ジメチルアリルピロリン酸(DMAPP)、エチル-アデノシン三リン酸(EP3PA)、ゲラニル

10

20

30

40

50

ピロリン酸 (GPP)、ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP)、イソペンテニル - アデノシン三リン酸 (IPPPA)、モノエチルリン酸 (MEP)、モノエチルピロリン酸 (MEPP)、3 - ホルミル - 1 - ブチル - ピロリン酸 (TUBAg1)、X - ピロリン酸 (TUBAg2)、3 - ホルミル - 1 - ブチル - ウリジン三リン酸 (TUBAg3)、3 - ホルミル - 1 - ブチル - デオキシチミジン三リン酸 (TUBAg4)、モノエチルアルキルアミン、アリルピロリン酸、クロトイルピロリン酸、ジメチルアリル - - ウリジン三リン酸、クロトイル - - ウリジン三リン酸、アリル - - ウリジン三リン酸、エチルアミン、イソブチルアミン、sec - ブチルアミン、イソアミルアミン、及び窒素を含有するビスホスホネートが挙げられる。

【0133】

本明細書に記載の活性化剤及び共刺激剤を使用して T 細胞の活性化及び増殖を実施して、特異的 T 細胞増殖及び持続性の集団を誘発することができる。いくつかの実施形態では、異なる培養物からの T 細胞の活性化及び増殖は、別個のクローン性または混合ポリクローン性の集団サブセットを実現することができる。いくつかの実施形態では、種々の作動薬を使用して、特異的 活性化シグナルをもたらす薬剤を同定することができる。一態様では、特異的 活性化シグナルをもたらす薬剤は、 TCR を指向する種々のモノクローナル抗体 (MAb) であり得る。

【0134】

一態様では、MAb は TCR 及び / または TCR の定常または可変領域上の異なるエピトープに結合することができる。一態様では、MAb は TCR 汎 MAb を含み得る。一態様では、 TCR 汎 MAb は、 1 及び 2 細胞集団を含めた 鎖上か 鎖上かのどちらかまたは両鎖上の種々の 及び TCR に共通しているドメインを認識し得る。一態様では、抗体は、5A6.E9 (Thermo scientific)、B1 (Biolegend)、IMMU510 及び / または 11F2 (11F2) (Beckman Coulter) であり得る。一態様では、MAb を、 鎖の可変領域に固有の特定ドメイン (V 9 TCR 類似体を指向する 7A5 MAb (Thermo Scientific #TCR1720))、または V 1 可変領域上のドメイン (Mab TS8.2 (Thermo Scientific #TCR1730); MAb TS-1 (ThermoFisher #TCR1055)、MAb R9.12 (Beckman Coulter #IM1761))、または V 2 鎖 (MAb 15D (Thermo Scientific #TCR1732 または Life technologies #TCR2732)、B6 (Biolegend #331402)、図 33 ~ 34 中に記載されている 1 - # 抗体のうちの 1 つ、または図 35 ~ 36 中に記載されている 2 - # 抗体のうちの 1 つ) に差し向けることができる。

【0135】

いくつかの実施形態では、 TCR の種々のドメインに対する抗体 (汎抗体及び、サブセット集団上の特有の可変領域エピトープを認識する抗体) を組み合わせて、 T 細胞の活性化を強化するそれらの能力を評価することができる。いくつかの実施形態では、 T 細胞活性化物質は、 TCR 結合剤、例えば MICA、NKG2D に対する作動薬抗体、MICA と例えば Fc タグとの融合タンパク質、ULBP1、または ULBP3 (R&D systems Minneapolis, MN) ULBP2、または ULBP6 (Sino Biological Beijing, China) を含み得る。いくつかの実施形態では、細胞のアネルギー及びアポトーシスを誘導することなく特異的 T 細胞増殖を誘発するのを支援するコンパニオン共刺激剤を同定することができる。これらの共刺激剤は、 細胞上に発現する受容体に対するリガンド、例えば、以下のうちの 1 つ以上に対するリガンド (複数可) を含み得る: NKG2D、CD161、CD70、JAML、DNAX、CD81 補助分子 - 1 (DNAM-1)、ICOS、CD27、CD196、CD137、CD30、HVEM、SLAM、CD122、DAP、及び CD28。いくつかの態様では、共刺激剤は、CD2 及び CD3 分子上の独特のエピトープに対する特異的抗体であり得る。CD2 及び CD3 は、 または T 細胞 (複数可) 上で

10

20

30

40

50

発現する場合に異なる配座構造を有し得、いくつかの事例では、CD3及びCD2に対する特異的抗体は T細胞の選択的活性化をもたらすことができる。

【0136】

T細胞(複数可)の集団を、 T細胞(複数可)の操作に先立って生体外で増殖させてもよい。 T細胞集団の試験管内での増殖を促進するために使用することができる試薬の非限定的な例としては、抗CD3または抗CD2、抗CD27、抗CD30、抗CD70、抗OX40抗体、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-19、IL-21、IL23、IL-33、IFN、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、CD70(CD27リガンド)、コンカバリンA(ConA)、ポークウィード(PWM)、ピーナッツ凝集素タンパク質(PNA)、ダイズ凝集素(SBA)、Le s Culinaris凝集素(LCA)、Pisum Sativum凝集素(PSA)、Helix pomatia凝集素(HPA)、Vicia gramineaレクチン(VGA)、Phaseolus Vulgarisエリスロアグルチニン(PHA-E)、Phaseolus Vulgarisロイコアグルチニン(PHA-L)、Sambucus Nigraレクチン(SNA、EBL)、Maackia Amurensis、レクチンII(MAL II)、Sophora Japonica凝集素(SJA)、Dolichos Biflorus凝集素(DBA)、Lens Culinaris凝集素(LCA)、Wisteria Floribundaレクチン(WFA、WFL)、またはT細胞増殖を刺激することができる別の適切なマイトジェンが挙げられる。

【0137】

T細胞(複数可)の遺伝子操作は、 TCRや、 TCRや、抗体、その抗原結合断片またはリンパ球活性化ドメインをコードするCARなどの腫瘍認識部分を発現する構築物を、単離された T細胞(複数可)のゲノムの中に安定的に組み込むことを含み得、T細胞の生体外及び生体内での増殖、生存及び機能を強化するサイトカイン(例えば、IL-15、IL-12、IL-2、IL-7、IL-21、IL-18、IL-19、IL-33、IL-4、IL-9、IL-23またはIL1)を含み得る。単離された T細胞の遺伝子操作はさらに、単離された T細胞のゲノムの中の1つ以上の内在性遺伝子、例えばMHC遺伝子座(複数可)の遺伝子発現を欠失させるかまたは妨害することを含み得る。

【0138】

T細胞の生体外増殖

他の態様では、本開示は、養子移入療法のために非操作型及び操作型 T細胞の集団を生体外で増殖させる方法を提供する。本開示の非操作型または操作型 T細胞は、生体外で増殖させられ得る。本開示の非操作型または操作型 T細胞は、APCによる活性化を伴わずに、またはAPC及び/またはアミノホスホネートとの共培養を伴わずに、試験管内で増殖させられることができる。さらに、またはあるいは、本開示の非操作型または操作型 T細胞は、APC及び/または1つ以上のアミノホスホネートによる活性化またはそれとの共培養を含む少なくとも1つの増殖ステップによって試験管内で増殖させられることができる。

【0139】

いくつかの実施形態では、本開示の非操作型または操作型 T細胞は、第1 T細胞増殖においてAPCによる活性化を伴わずに試験管内で増殖させられることができ、その後、第2 T細胞増殖においてAPCによる活性化を伴って試験管内で増殖させられることができる。いくつかの事例では、第1 T細胞増殖は、(a) T細胞を増殖させるか、または(b) 1TCR; 2TCR; 1及び 4TCR; もしくは 1、 3、 4及び 5TCRに特有の活性化エピトープに結合することによってそれぞれ 1T細胞; 2T細胞; 1T細胞及び 3T細胞; 1T細胞及び 4T細胞; もしくは 1、 3、 4及び 5T細胞を選択的に増殖させる、1つ以上の薬剤に、 T細胞を接触させることを含む。

10

20

30

40

50

【0140】

いくつかの事例では、第2 T細胞増殖は、第1 T細胞増殖で使用される1つ以上の薬剤を含まない培養用培地中で実施される。いくつかの事例では、第2 T細胞増殖は、(a) T細胞を増殖させるか、(b) T細胞を増殖させるか、または(c) 1 TCR; 2 TCR; 1及び4 TCR; もしくは 1、3、4及び5 TCR に特有の活性化エピトープに結合することによってそれぞれ 1 T細胞; 2 T細胞; 1 T細胞及び3 T細胞; 1 T細胞及び4 T細胞; もしくは 1、3、4及び5 T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の第2薬剤を含有する培養用培地中で実施される。

【0141】

いくつかの事例では、第2薬剤は、第1 T細胞増殖で使用される薬剤と比べて異なっている(例えば、異なる一次アミノ酸配列を有し、かつ/または構造的に異なる TCRエピトープに結合する)。いくつかの事例では、第2薬剤は、第1 T細胞増殖で使用される薬剤と重複する TCRエピトープもしくは同じ TCRエピトープに結合するものであるか、または TCRへの結合を当該薬剤と競合することができるものである。いくつかの事例では、第2薬剤はAPCの細胞表面に発現する。いくつかの事例では、第2薬剤は、例えば第2薬剤の定常領域とAPCの表面上のFc受容体との結合相互作用によって、APCの表面に結合している。いくつかの事例では、第2薬剤は可溶性である。いくつかの事例では、第2 T細胞増殖は、可溶性の第2薬剤とAPCとを含有する培養用培地中で実施され、場合によってAPCは、T細胞集団を増殖または選択的に増殖させる薬剤をその細胞表面上に発現するかまたはその表面に結合させる。

【0142】

いくつかの事例では、第1 T細胞増殖は、APCを伴わずに実施され、第2 T細胞増殖は、APCを伴って実施される。いくつかの事例では、第2 T細胞増殖は、APCと、(a) T細胞を増殖させるか、(b) T細胞を増殖させるか、または(c) 1 TCR; 2 TCR; 1及び4 TCR; もしくは 1、3、4及び5 TCR に特有の活性化エピトープに結合することによってそれぞれ 1 T細胞; 2 T細胞; 1 T細胞及び3 T細胞; 1 T細胞及び4 T細胞; もしくは 1、3、4及び5 T細胞を選択的に増殖させる1つ以上の第2薬剤とを使用して実施される。

【0143】

当業者であれば、特定の実施形態では本明細書に記載の第2増殖ステップの方法を第1増殖ステップとして実施してもよく、本明細書に記載の第1ステップの方法を第2増殖ステップとして実施してもよいということを理解するであろう。限定することなく一例を挙げると、いくつかの実施形態では、細胞の混合集団(例えばPBMC)を、第1ステップにおいてAPCと接触させることによって増殖させることができ、その後、例えば 1 TCR; 2 TCR; 1及び4 TCR; または 1、3、4及び5 TCR に特有の活性化エピトープに結合することによってそれぞれ 1 T細胞; 2 T細胞; 1 T細胞及び3 T細胞; 1 T細胞及び4 T細胞; または 1、3、4及び5 T細胞を選択的に増殖させる固定化薬剤に第1増殖ステップからの増殖済み集団を接触させることによって、APCの非存在下で増殖させることができる。

【0144】

本発明の方法は、様々な T細胞(複数可)集団、例えば、V¹⁺、V²⁺またはV³⁺ T細胞集団を増殖させることができる。いくつかの事例では、本発明の方法は、V¹⁺ T細胞集団; V¹⁺及びV³⁺ T細胞集団; V¹⁺及びV⁴⁺ T細胞集団; V¹⁺及びV²⁺ T細胞集団; またはV¹⁺、V³⁺、V⁴⁺及びV⁵⁺ T細胞集団を増殖させることができる。

【0145】

ある場合には、T細胞集団を36日未満、35日未満、34日未満、33日未満、32日未満、31日未満、30日未満、29日未満、28日未満、27日未満、26日未満、25日未満、24日未満、23日未満、22日未満、21日未満、20日未満、19日未満、18日未満、17日未満、16日未満、15日未満、14日未満、13日未満、

10

20

30

40

50

12日未満、11日未満、10日未満、9日未満、8日未満、7日未満、6日未満、5日未満、4日未満または3日未満の間、試験管内で増殖させることができる

【0146】

いくつかの態様では、混合細胞集団からの T細胞を活性化剤と接触させることによって操作型及び非操作型 T細胞を含めた様々な T細胞を選択的に増殖させる方法が提供される。いくつかの事例では、活性化 (activation) または活性化 (activating) 剤は、T細胞の細胞表面受容体上の特有のエピトープに結合する。活性化剤は、抗体、例えばモノクローナル抗体であり得る。活性化剤は、1種類以上の T細胞、例えば、1、2、1及び3、または1及び4細胞集団の成長を特異的に活性化させることができる。いくつかの実施形態では、活性化剤は1細胞集団の成長を特異的に活性化させて濃縮1 T細胞集団をもたらす。他の事例では、活性化剤は2細胞集団の成長を特異的に活性化させて濃縮2 T細胞集団をもたらす。

10

【0147】

活性化剤は、操作型及び非操作型 T細胞の増殖を速い成長速度で刺激し得る。例えば、薬剤は、30時間未満に1回の細胞分裂、29時間未満に1回の細胞分裂、28時間未満に1回の細胞分裂、27時間未満に1回の細胞分裂、26時間未満に1回の細胞分裂、25時間未満に1回の細胞分裂、24時間未満に1回の細胞分裂、23時間未満に1回の細胞分裂、22時間未満に1回の細胞分裂、21時間未満に1回の細胞分裂、20時間未満に1回の細胞分裂、19時間未満に1回の細胞分裂、18時間未満に1回の細胞分裂、17時間未満に1回の細胞分裂、16時間未満に1回の細胞分裂、15時間未満に1回の細胞分裂、14時間未満に1回の細胞分裂、13時間未満に1回の細胞分裂、12時間未満に1回の細胞分裂、11時間未満に1回の細胞分裂、10時間未満に1回の細胞分裂、9時間未満に1回の細胞分裂、8時間未満に1回の細胞分裂、7時間未満に1回の細胞分裂、6時間未満に1回の細胞分裂、5時間未満に1回の細胞分裂、4時間未満に1回の細胞分裂、3時間未満に1回の細胞分裂、2時間未満に1回の細胞分裂の平均速度で T細胞集団の増殖を刺激する。

20

【0148】

いくつかの事例では、活性化剤は、約4時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約5時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約6時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約7時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約8時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約9時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約10時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約11時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約12時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約13時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約14時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約15時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約16時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約17時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約18時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約19時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約20時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約21時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約22時間ごとに約1回の分裂の速度、約23時間ごとに約1回の分裂の速度、約24時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約25時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約26時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約27時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約28時間ごとに約1回の分裂の速度、約29時間ごとに約1回の分裂の速度、約30時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約31時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約32時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約33時間ごとに約1回の分裂の平均速度、約34時間ごとに約1回の分裂の速度、約35時間ごとに約1回の分裂の速度、約36時間ごとに約1回の分裂の平均速度で操作型及び非操作型 T細胞の増殖を刺激し得る。

30

40

【0149】

いくつかの事例では、活性化剤は T細胞増殖培養物における操作型及び/または非操作型 T細胞の急速な増殖を刺激し得、当該急速な増殖は、細胞分裂の上記平均速度のいずれか1つで約1連続日~約19連続日、約1連続日~約14連続日、約1連続日~約7連続日、約1連続日~約5連続日、約2連続日~約19連続日、約2連続日~約14

50

連続日、約2連続日～約7連続日、約2連続日～約5連続日、約4連続日～約19連続日、約4連続日～約14連続日、約4連続日～約7連続日、または約4連続日～約5連続日にわたって維持されるものである。

【0150】

いくつかの事例では、活性化剤は、約2連続日～約7連続日、または約2～約5連続日にわたって維持されている T細胞増殖培養物において約12時間（例えば10～12時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約13時間（例えば10～13時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約14時間（例えば10～14時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約15時間（例えば10～15時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約16時間（例えば10～16時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約17時間（例えば10～17時間または12～17時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約18時間（例えば10～18時間または12～18時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約19時間（例えば10～19時間または12～19時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約20時間（例えば、12～20時間、16～20時間または18～20時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約21時間（例えば、12～21時間、16～21時間または18～21時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約22時間（例えば、12～22時間、16～22時間または18～22時間）ごとに約1回の分裂の速度、約23時間以下（例えば、12～23時間、16～23時間または18～23時間）ごとに約1回の分裂の速度、約24時間（例えば、12～24時間、16～24時間または18～24時間）ごとに約1回の分裂の平均速度で操作型及び/または非操作型 T細胞の増殖を刺激し得る。

10

20

【0151】

いくつかの事例では、活性化剤は、約2連続日～約7連続日、または約2～約5連続日にわたって維持されている T細胞増殖培養物において約25時間（例えば、12～25時間、16～25時間、18～25時間または20～25時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約26時間（例えば、12～26時間、16～26時間、18～26時間または20～26時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約27時間（例えば、12～27時間、16～27時間、18～27時間または20～27時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約28時間（例えば、12～28時間、16～28時間、18～28時間、20～28時間または22～28時間）ごとに約1回の分裂の速度、約29時間（例えば、16～29時間、18～29時間、20～29時間または22～29時間）ごとに約1回の分裂の速度、約30時間（例えば、16～30時間、18～30時間、20～30時間または22～30時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約31時間（例えば、16～31時間、18～31時間、20～31時間、22～31時間または24～31時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約32時間（例えば、18～32時間、20～32時間、22～32時間または24～32時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約33時間（例えば、18～33時間、20～33時間、22～33時間または24～33時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約34時間（例えば、18～34時間、20～34時間、22～34時間または24～34時間）ごとに約1回の分裂の速度、約35時間（例えば、18～35時間、20～35時間、22～35時間または24～35時間）ごとに約1回の分裂の速度、約36時間（例えば、18～36時間、20～36時間、22～36時間または24～36時間）ごとに約1回の分裂の平均速度で操作型及び/または非操作型 T細胞の増殖を刺激し得る。

30

40

【0152】

いくつかの事例では、活性化剤は、少なくとも14連続日にわたって維持されている T細胞増殖培養物において約12時間（例えば10～12時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約13時間（例えば10～13時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約14時間（例えば10～14時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約15時間（例えば10～15時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約16時間（例えば10～16時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約17時間（例えば10～17時間または12～17時間）ごとに約1回の分裂の平均速度、約18時間（例えば10～18時間または12～18時

50

間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約19時間(例えば10~19時間または12~19時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約20時間(例えば、12~20時間、16~20時間または18~20時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約21時間(例えば、12~21時間、16~21時間または18~21時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約22時間(例えば、12~22時間、16~22時間または18~22時間)ごとに約1回の分裂の速度、約23時間以下(例えば、12~23時間、16~23時間または18~23時間)ごとに約1回の分裂の速度、約24時間(例えば、12~24時間、16~24時間または18~24時間)ごとに約1回の分裂の平均速度で操作型及び/または非操作型 T細胞の増殖を刺激し得る。

【0153】

いくつかの事例では、活性化剤は、少なくとも14連続日にわたって維持されている
T細胞増殖培養物において約25時間(例えば、12~25時間、16~25時間、18~25時間または20~25時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約26時間(例えば、12~26時間、16~26時間、18~26時間または20~26時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約27時間(例えば、12~27時間、16~27時間、18~27時間または20~27時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約28時間(例えば、12~28時間、16~28時間、18~28時間、20~28時間または22~28時間)ごとに約1回の分裂の速度、約29時間(例えば、16~29時間、18~29時間、20~29時間または22~29時間)ごとに約1回の分裂の速度、約30時間(例えば、16~30時間、18~30時間、20~30時間または22~30時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約31時間(例えば、16~31時間、18~31時間、20~31時間、22~31時間または24~31時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約32時間(例えば、18~32時間、20~32時間、22~32時間または24~32時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約33時間(例えば、18~33時間、20~33時間、22~33時間または24~33時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約34時間(例えば、18~34時間、20~34時間、22~34時間または24~34時間)ごとに約1回の分裂の速度、約35時間(例えば、18~35時間、20~35時間、22~35時間または24~35時間)ごとに約1回の分裂の速度、約36時間(例えば、18~36時間、20~36時間、22~36時間または24~36時間)ごとに約1回の分裂の平均速度で操作型及び/または非操作型 T細胞の増殖を刺激し得る。

【0154】

いくつかの事例では、活性化剤は、少なくとも19連続日にわたって維持されている
T細胞増殖培養物において約12時間(例えば10~12時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約13時間(例えば10~13時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約14時間(例えば10~14時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約15時間(例えば10~15時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約16時間(例えば10~16時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約17時間(例えば10~17時間または12~17時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約18時間(例えば10~18時間または12~18時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約19時間(例えば10~19時間または12~19時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約20時間(例えば、12~20時間、16~20時間または18~20時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約21時間(例えば、12~21時間、16~21時間または18~21時間)ごとに約1回の分裂の平均速度、約22時間(例えば、12~22時間、16~22時間または18~22時間)ごとに約1回の分裂の速度、約23時間以下(例えば、12~23時間、16~23時間または18~23時間)ごとに約1回の分裂の速度、約24時間(例えば、12~24時間、16~24時間または18~24時間)ごとに約1回の分裂の平均速度で操作型及び/または非操作型 T細胞の増殖を刺激し得る。

【0155】

いくつかの事例では、活性化剤は、少なくとも19連続日にわたって維持されている
T細胞増殖培養物において約25時間(例えば、12~25時間、16~25時間、1

10

20

30

40

50

8 ~ 25 時間または 20 ~ 25 時間) ごとに約 1 回の分裂の平均速度、約 26 時間 (例えば、12 ~ 26 時間、16 ~ 26 時間、18 ~ 26 時間または 20 ~ 26 時間) ごとに約 1 回の分裂の平均速度、約 27 時間 (例えば、12 ~ 27 時間、16 ~ 27 時間、18 ~ 27 時間または 20 ~ 27 時間) ごとに約 1 回の分裂の平均速度、約 28 時間 (例えば、12 ~ 28 時間、16 ~ 28 時間、18 ~ 28 時間、20 ~ 28 時間または 22 ~ 28 時間) ごとに約 1 回の分裂の速度、約 29 時間 (例えば、16 ~ 29 時間、18 ~ 29 時間、20 ~ 29 時間または 22 ~ 29 時間) ごとに約 1 回の分裂の速度、約 30 時間 (例えば、16 ~ 30 時間、18 ~ 30 時間、20 ~ 30 時間または 22 ~ 30 時間) ごとに約 1 回の分裂の平均速度、約 31 時間 (例えば、16 ~ 31 時間、18 ~ 31 時間、20 ~ 31 時間、22 ~ 31 時間または 24 ~ 31 時間) ごとに約 1 回の分裂の平均速度、約 32 時間 (例えば、18 ~ 32 時間、20 ~ 32 時間、22 ~ 32 時間または 24 ~ 32 時間) ごとに約 1 回の分裂の平均速度、約 33 時間 (例えば、18 ~ 33 時間、20 ~ 33 時間、22 ~ 33 時間または 24 ~ 33 時間) ごとに約 1 回の分裂の平均速度、約 34 時間 (例えば、18 ~ 34 時間、20 ~ 34 時間、22 ~ 34 時間または 24 ~ 34 時間) ごとに約 1 回の分裂の速度、約 35 時間 (例えば、18 ~ 35 時間、20 ~ 35 時間、22 ~ 35 時間または 24 ~ 35 時間) ごとに約 1 回の分裂の速度、約 36 時間 (例えば、18 ~ 36 時間、20 ~ 36 時間、22 ~ 36 時間または 24 ~ 36 時間) ごとに約 1 回の分裂の平均速度で操作型及び/または非操作型 T 細胞の増殖を刺激し得る。

10

【0156】

活性化剤は、操作型または非操作型 T 細胞の亜集団の増殖を様々な成長速度で刺激し得る。例えば、薬剤は 1 細胞集団の成長を、1 日 ~ 90 日の培養 (例えば、約 1 日 ~ 約 19、21 または 23 日の培養) の期間にわたる増殖が別の T 細胞集団、例えば 2 または 3 集団よりも; 増殖前の T 細胞の開始時個数よりも; 増殖前の 1 T 細胞の開始時個数よりも; または培養物中の T 細胞集団よりも約 10 倍超、約 100 倍超、約 200 倍超、約 300 倍超、約 400 倍超、約 500 倍超、約 600 倍超、約 700 倍超、約 800 倍超、約 900 倍超、約 1,000 倍超、約 10,000 倍超、約 20,000 倍超、約 30,000 倍超、約 50,000 倍超、約 70,000 倍超、約 100,000 倍超または約 1,000,000 倍超だけ大きい増殖をもたらすようなより速い速度で刺激し得る。

20

【0157】

他の事例では、薬剤は 1 及び 4 集団の成長を、1 日 ~ 90 日の培養 (例えば、約 1 日 ~ 約 19、21 または 23 日の培養) の期間にわたる増殖が 2 T 細胞集団よりも; 別の T 細胞亜集団よりも; 増殖前の T 細胞の開始時個数よりも; 増殖前の 1 T 細胞の開始時個数よりも; 増殖前の 1 及び 3 T 細胞の開始時個数よりも; または培養物中の T 細胞集団よりも 10 倍超、100 倍超、200 倍超、300 倍超、400 倍超、500 倍超、600 倍超、700 倍超、800 倍超、900 倍超、1,000 倍超、10,000 倍超、20,000 倍超、30,000 倍超、50,000 倍超、70,000 倍超、100,000 倍超または 1,000,000 倍超だけ大きい増殖をもたらすようなより速い速度で刺激し得る。

30

【0158】

他の事例では、薬剤は 1 及び 4 集団の成長を、1 日 ~ 90 日の培養 (例えば、約 1 日 ~ 約 19、21 または 23 日の培養) の期間にわたる増殖が 2 T 細胞集団よりも; 別の T 細胞亜集団よりも; 増殖前の T 細胞の開始時個数よりも; 増殖前の 1 T 細胞の開始時個数よりも; 増殖前の 1 及び 4 T 細胞の開始時個数よりも; または培養物中の T 細胞集団よりも 10 倍超、100 倍超、200 倍超、300 倍超、400 倍超、500 倍超、600 倍超、700 倍超、800 倍超、900 倍超、1,000 倍超、10,000 倍超、20,000 倍超、30,000 倍超、50,000 倍超、70,000 倍超、100,000 倍超または 1,000,000 倍超だけ大きい増殖をもたらすようなより速い速度で刺激し得る。

40

【0159】

50

他の事例では、薬剤は 1、3、4 及び 5 集団の成長を、1日～90日の培養（例えば、約1日～約19、21または23日の培養）の期間にわたる増殖が 2 T細胞集団よりも；別の T細胞垂集団よりも；増殖前の T細胞の開始時個数よりも；増殖前の 1 T細胞の開始時個数よりも；増殖前の 1 及び 3 T細胞の開始時個数よりも；増殖前の 1、3、4 及び 5 T細胞の開始時個数よりも；または培養物中の T細胞集団よりも10倍超、100倍超、200倍超、300倍超、400倍超、500倍超、600倍超、700倍超、800倍超、900倍超、1,000倍超、10,000倍超、20,000倍超、30,000倍超、50,000倍超、70,000倍超、100,000倍超または1,000,000倍超だけ大きい増殖をもたらすようなより速い速度で刺激し得る。

10

【0160】

他の事例では、薬剤は 2 集団の成長を、1日～90日の培養（例えば、約1日～約19、21または23日の培養）の期間にわたる増殖が 1 T細胞集団よりも；3 T細胞集団よりも；別の T細胞垂集団よりも；増殖前の T細胞の開始時個数よりも；増殖前の 2 T細胞の開始時個数よりも；または T細胞よりも10倍超、100倍超、200倍超、300倍超、400倍超、500倍超、600倍超、700倍超、800倍超、900倍超、1,000倍超、10,000倍超、20,000倍超、30,000倍超、50,000倍超、70,000倍超、100,000倍超または1,000,000倍超だけ大きい増殖をもたらすようなより速い速度で刺激し得る。

【0161】

20

いくつかの態様では、本開示は、急速な速度、例えば、30時間ごとに約1回の細胞分裂、またはそれより速い速度で T細胞集団の増殖を刺激する薬剤に接触している操作型または非操作型 T細胞集団を提供する。いくつかの事例では、薬剤は、1；2；1及び4；または1、3、4及び5 T細胞のいずれかの増殖を選択的に刺激する。T細胞集団は、ある量の非操作型 T細胞及びある量の操作型 T細胞を含み得る。いくつかの事例では、T細胞集団は、1、2、3及び4 T細胞を異なる百分率で含む。操作型または非操作型 T細胞集団は、例えば、90%未満の1 T細胞、80%未満の1 T細胞、70%未満の1 T細胞、60%未満の1 T細胞、50%未満の1 T細胞、40%未満の1 T細胞、30%未満の1 T細胞、20%未満の1 T細胞、10%未満の1 T細胞または5%未満の1 T細胞を含み得る。あるいは、操作型または非操作型 T細胞集団は、5%超の1 T細胞、10%超の1 T細胞、20%超の1 T細胞、30%超の1 T細胞、40%超の1 T細胞、50%超の1 T細胞、60%超の1 T細胞、70%超の1 T細胞、80%超の1 T細胞または90%超の1 T細胞を含み得る。いくつかの事例では、薬剤は、本明細書に記載の選択的増殖剤のうちの一つである。いくつかの事例では、薬剤は、細胞培養表面またはAPCの表面などの表面に固定されている（例えば、APCの表面に発現しているかまたは、APCの表面に発現したFc受容体と結合している）。

30

【0162】

操作型または非操作型 T細胞集団は、例えば、90%未満の2 T細胞、80%未満の2 T細胞、70%未満の2 T細胞、60%未満の2 T細胞、50%未満の2 T細胞、40%未満の2 T細胞、30%未満の2 T細胞、20%未満の2 T細胞、10%未満の2 T細胞または5%未満の2 T細胞を含み得る。あるいは、操作型または非操作型 T細胞集団は、5%超の2 T細胞、10%超の2 T細胞、20%超の2 T細胞、30%超の2 T細胞、40%超の2 T細胞、50%超の2 T細胞、60%超の2 T細胞、70%超の2 T細胞、80%超の2 T細胞または90%超の2 T細胞を含み得る。

40

【0163】

操作型または非操作型 T細胞集団は、例えば、90%未満の1及び4 T細胞、80%未満の1及び4 T細胞、70%未満の1及び4 T細胞、60%未満の1及び4 T細胞、50%未満の1及び4 T細胞、40%未満の1及び4 T細胞、

50

30%未満の1及び4 T細胞、20%未満の1及び4 T細胞、10%未満の1及び4 T細胞、または5%未満の1及び4 T細胞を含み得る。あるいは、操作型または非操作型 T細胞集団は、5%超の1及び4 T細胞、10%超の1及び4 T細胞、20%超の1及び4 T細胞、30%超の1及び4 T細胞、40%超の1及び4 T細胞、50%超の1及び4 T細胞、60%超の1及び4 T細胞、70%超の1及び4 T細胞、80%超の1及び4 T細胞、または90%超の1及び4 T細胞を含み得る。

【0164】

操作型または非操作型 T細胞集団は、例えば、90%未満の4 T細胞、80%未満の4 T細胞、70%未満の4 T細胞、60%未満の4 T細胞、50%未満の4 T細胞、40%未満の4 T細胞、30%未満の4 T細胞、20%未満の4 T細胞、10%未満の4 T細胞または5%未満の4 T細胞を含み得る。あるいは、操作型または非操作型 T細胞集団は、5%超の1及び4 T細胞、10%超の1及び4 T細胞、20%超の1及び4 T細胞、30%超の1及び4 T細胞、40%超の1及び4 T細胞、50%超の1及び4 T細胞、60%超の1及び4 T細胞、70%超の1及び4 T細胞、80%超の1及び4 T細胞、または90%超の1及び4 T細胞を含み得る。操作型または非操作型 T細胞集団は、例えば、90%未満の1及び4 T細胞、80%未満の1及び4 T細胞、70%未満の1及び4 T細胞、60%未満の1及び4 T細胞、50%未満の1及び4 T細胞、40%未満の1及び4 T細胞、30%未満の1及び4 T細胞、20%未満の1及び4 T細胞、10%未満の1及び4 T細胞、または5%未満の1及び4 T細胞を含み得る。

【0165】

特定の実施形態では、本発明は、10~90%の1 T細胞及び90~10%の2 T細胞を含む増殖済み T細胞集団の混合物を提供する。特定の実施形態では、本発明は、10~90%の1及び3 T細胞ならびに90~10%の2 T細胞を含む増殖済み T細胞集団の混合物を提供する。特定の実施形態では、本発明は、10~90%の1及び4 T細胞ならびに90~10%の2 T細胞を含む増殖済み T細胞集団の混合物を提供する。特定の実施形態では、本発明は、10~90%の1、3、4及び5 T細胞ならびに90~10%の2 T細胞を含む増殖済み T細胞集団の混合物を提供する。

【0166】

1つ以上の活性化剤が T細胞（例えば、活性化物質 T細胞天然受容体）に接触し得、その後、共刺激分子が T細胞に接触してさらなる刺激を提供し得、かつ T細胞を増殖させ得る。いくつかの実施形態では、活性化剤及び/または共刺激剤は、植物及び非植物に由来するレクチン、 T細胞を活性化させるモノクローナル抗体、及びその他の非レクチン/非抗体剤であり得る。他の事例では植物レクチンはコンカナバリンA (ConA)であり得るが、他の植物レクチンなどが使用されてもよい。レクチンの他の例としては、ピーナッツ凝集素タンパク質 (PNA)、ダイズ凝集素 (SBA)、*Lesculinaris* 凝集素 (LCA)、*pisum sativum* 凝集素 (PSA)、*Helix pomatia* 凝集素 (HPA)、*Vicia graminea* レクチン (VGA)、*Phaseolus Vulgaris* エリスロアグルチニン (PHA-E)、*Phaseolus Vulgaris* ロイコアグルチニン (PHA-L)、*Sambucus Nigra* レクチン (SNA、EBL)、*Maackia Amurensis*、レクチン II (MAL II)、*Sophora Japonica* 凝集素 (SJA)、*Dolichos Biflorus* 凝集素 (DBA)、*Lens Culinaris* 凝集素 (LCA)、*Wisteria Floribunda* レクチン (WFA、WFL) が挙げられる。

【0167】

活性化剤及び共刺激分子の非限定的な例としては、本明細書に記載のもしくは鎖またはそれらのサブタイプに対して選択的である任意の1つ以上の抗体、5A6.E9、B

10

20

30

40

50

1、TS8.2、15D、B6、B3、TS-1、3.20、7A5、IMMU510、R9.12、11F2などの抗体、またはそれらの組み合わせが挙げられる。活性化剤及び共刺激分子の他の例としては、ゾレドロネート、ホルボール 12-ミリステート-13-アセテート(TPA)、メゼレイン、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)、連鎖球菌プロテインAまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0168】

他の事例では、活性化剤及び/または共刺激剤は、TCR、TCR、TCR、TCR、CD277、CD28、CD46、CD81、CTLA4、ICOS、PD-1、CD30、NKG2D、NKG2A、HVEM、4-1BB(CD137)、OX40(CD134)、CD70、CD80、CD86、DAP、CD122、GITR、FcRI、CD1、CD16、CD161、DNAX、補助分子-1(DNAM-1)、1つ以上のNCR(例えば、NKp30、NKp44、NKp46)、SLAM、コクサッキーウイルス及びアデノウイルス受容体、またはそれらの組み合わせに対する抗体またはリガンドであり得る。

【0169】

操作型 T細胞

操作型 T細胞(例えば図1参照)は、当技術分野で知られている様々な方法によって生成され得る。操作型 T細胞は、特定の腫瘍認識部分を安定的に発現するように設計され得る。腫瘍認識部分または別のタイプの認識部分を含む発現カセットをコードするポリヌクレオチドは、トランスポゾン/トランスポゼース系またはウイルスに基づく遺伝子移入系、例えばレンチウイルスもしくはレトロウイルス系、または別の適切な方法、例えばトランスフェクション、電気穿孔、形質導入、リポフェクション、リン酸カルシウム(CaPO₄)、ナノ操作型物質、例えばOrmosil、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルスを含めたウイルス送達方法、または別の適切な方法によって T細胞内へ安定的に導入され得る。かかるどちらかである抗原特異的TCRは、抗原特異的TCRの遺伝コードを含むポリヌクレオチドを T細胞のゲノムの中に安定的に挿入することによって操作型 T細胞内に導入されることができ、腫瘍認識部分を有するCARをコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドを T細胞のゲノムの中に安定的に挿入することによって操作型 T細胞内に導入され得る。いくつかの事例では、操作された腫瘍認識部分は操作型 T細胞受容体であり、操作型 T細胞のゲノムの中に組み込まれる発現カセットは、操作されたTCR(TCRアルファ)遺伝子、操作されたTCR(TCRベータ)遺伝子、TCR(TCRデルタ)遺伝子または操作されたTCR(TCRガンマ)遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの事例では、操作型 T細胞のゲノムの中に組み込まれる発現カセットは、抗体断片またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの事例では、抗体断片またはその抗原結合断片は、キメラ抗原受容体(CAR)構築物の、またはCARとT細胞受容体(TCR)とを含んでいるかもしくは異なる抗原を指向する抗体を有するCARを含んでいる二重特異性構築物の一部として、細胞表面腫瘍抗原に結合する、全抗体、抗体断片、一本鎖可変断片(scFv)、単ドメイン抗体(sdAb)、Fab、F(ab)₂、Fc、抗体上の軽鎖もしくは重鎖、抗体の可変もしくは定常領域、またはそれらの任意の組み合わせをコードする、ポリヌクレオチドである。いくつかの事例では、ポリヌクレオチドは、ヒトに由来するかまたは別の種に由来する。非ヒト種に由来する抗体断片または抗原結合断片のポリヌクレオチドは、ヒトにおいて天然に産生する抗体変異型とそれらとの類似性を向上させるように改変されることができ、抗体断片または抗原結合断片は、部分的または完全にヒト化されることができ、抗体断片または抗原結合断片のポリヌクレオチドは、キメラ、例えばマウス-ヒト抗体キメラであることもできる。CARを発現する操作型 T細胞は、腫瘍認識部分によって認識される抗原に対するリガンドを発現するように操作されることもできる。

【0170】

当技術分野で知られている様々な技術を使用して、腫瘍認識部分の遺伝コードを含んで

いるクローニングされたかまたは合成的に操作された核酸を操作型 T細胞のゲノム内の特定位置に導入することができる。WO201409370、WO2003087341、WO2014134412及びWO2011090804（参照によりそれらの各々の全体を本明細書に援用する）にそれぞれ記載されている、微生物の規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列（CRISPR）システムからのRNAガイドCas9ヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、及びメガヌクレアーゼの技術を用いて T細胞（複数可）における効率的なゲノム操作をもたらすことができる。本明細書に記載の技術は、ある遺伝子のロックアウトと別の遺伝子のロックインとを同時にもちこたすゲノム位置への発現カセットの挿入のために用いられることもできる。例えば、MHC遺伝子をコードするゲノム領域内に、本開示の発現カセットを含むポリヌクレオチドを挿入することができる。そのような操作は、1つ以上の遺伝子、例えば発現カセット内に含まれている遺伝子のロックインと、別の遺伝子、例えばMHC遺伝子座のロックアウトとを同時にもちこたすことができる。

10

【0171】

1つの事例では、腫瘍認識部分をコードする核酸を含むSleeping Beautyトランスポゾン、操作されようとしている T細胞の細胞内に導入する。野生型Sleeping Beautyと比較して強化された組込みを提供する突然変異体Sleeping Beautyトランスポゼース、例えばUS7,985,739（参照によりその全体を本明細書に援用する）に記載されているトランスポゼースを使用してポリヌクレオチドを操作型 T細胞に導入してもよい。

20

【0172】

いくつかの事例では、ウイルスによる方法を用いて操作型 T細胞のゲノムの中に、腫瘍認識部分を含むポリヌクレオチドを導入する。ウイルスによる多くの方法、例えばWO1993020221（参照によりその全体を本明細書に援用する）に記載されている方法がヒト遺伝子療法のために使用されている。 T細胞を操作するために用いることができる、ウイルスによる方法の非限定的な例としては、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクチニアウイルス、ポックスウイルスまたはアデノウイルス随伴ウイルスによる方法が挙げられる。

30

【0173】

腫瘍認識部分の遺伝コードを含有するポリヌクレオチドは、操作型 T細胞の成長、増殖、活性化状態に影響を与える突然変異もしくはその他の導入遺伝子、または精巢特異的がん抗原などの腫瘍細胞特異的な抗原を含み得る。本開示の T細胞は、抗原認識部分に繋がられた活性化ドメイン、例えば、TCR-CD3複合体中の分子、または共刺激因子を含んでいるポリヌクレオチドを発現するように操作され得る。操作型 T細胞は、Tリンパ球活性化ドメインである細胞内シグナル伝達ドメインを発現することができる。 T細胞は、細胞内活性化ドメイン遺伝子または細胞内シグナル伝達ドメインを発現するように操作され得る。細胞内シグナル伝達ドメイン遺伝子は、例えば、CD3、CD28、CD2、ICOS、JAML、CD27、CD30、OX40、NKG2D、CD4、OX40/CD134、4-1BB/CD137、FcRI、IL-2RB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP分子、CD70、サイトカイン受容体、CD40、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの事例では、操作型 T細胞は、サイトカイン、抗原、細胞受容体、または他の免疫調節分子を発現するようにさらに操作される。

40

【0174】

操作型 T細胞で発現させる適切な腫瘍認識部分は、処置すべき疾患に基づいて選択することができる。例えば、いくつかの事例では、腫瘍認識部分はTCRである。いくつかの事例では、腫瘍認識部分は、がん細胞上に発現するリガンドに対する受容体である。適切な受容体の非限定的な例としては、NKG2D、NKG2A、NKG2C、NKG2F、LLT1、AICL、CD26、NKRP1、CD244（2B4）、DNAM-1

50

、NKp30、NKp44、NKp46及びNKp80が挙げられる。いくつかの事例では、腫瘍認識部分は、リガンド、例えばIL-13リガンド、または腫瘍抗原に対するリガンド模倣体、例えばIL13Rに対するIL-13模倣体を含むことができる。

【0175】

T細胞は、NKG2D、NKG2A、NKG2C、NKG2F、LLT1、AICL、CD26、NKRP1、CD244(2B4)、DNAM-1、または抗腫瘍抗体、例えば抗Her2neuもしくは抗EGFRに由来するリガンド結合ドメインと、CD3-、Dap10、Dap12、CD28、41BB及びCD40Lから得られるシグナル伝達ドメインとを含むキメラ腫瘍認識部分を発現するように操作され得る。いくつかの例では、キメラ受容体は、MICA、MICB、Her2neu、EGFR、EGFRvIII、メソテリン、CD38、CD20、CD19、BCMA、PSA、RON、CD30、CD22、CD37、CD38、CD56、CD33、CD138、CD123、CD79b、CD70、CD75、CA6、GD2、アルファフェトタンパク質(AFP)、CS1、がん胎児性抗原(CEA)、CEACAM5、CA-125、MUC-16、5T4、Nap12b、ROR1、ROR2、PLIF、Her2/Neu、EGFRvIII、GPMNB、LIV-1、糖脂質F77、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、PSMA、STEAP-1、STEAP-2、c-Met、CSPG4、CD44v6、PVRL-4、VEGFR2、C4.4a、PSCA、葉酸結合タンパク質/受容体、SLC44A4、Cripto、CTAG1B、AXL、IL-13R2、IL-3R、EPHA3、SLTRK6、gp100、MART1、チロシナーゼ、SSX2、SSX4、NYESO-1、上皮腫瘍抗原(ETA)、MAGEAファミリー遺伝子(例えば、MAGEA3、MAGEA4)、KKLC1、突然変異型ras(H、N、K)、BRaf、p53、 β -カテニン、EGFRT790、MHCクラスI鎖関連分子A(MICA)もしくはMHCクラスI鎖関連分子B(MICB)、またはHPV、CMVもしくはEBVの1つ以上の抗原に結合する。

【0176】

いくつかの事例では、腫瘍認識部分は、腫瘍関連ペプチドと複合体化したMHCクラスI分子(HLA-A、HLA-BまたはHLA-C)を標的とする。MHCクラスI分子と複合体化した腫瘍関連ペプチドを標的とする腫瘍認識部分を生成及び使用するための方法及び組成物としては、例えば、Weidanz et al., Int. Rev. Immunol. 30:328-40, 2011、Scheinberg et al., Oncotarget. 4(5):647-8, 2013、Cheever et al., Clin. Cancer Res. 15(17):5323-37, 2009、Dohan & Reiter Expert Rev Mol Med. 14:e6, 2012、Dao et al., Sci Transl Med. 2013 Mar 13; 5(176):176ra33、U.S. 9,540,448、及びWO2017/011804に記載されているものが挙げられる。いくつかの実施形態では、ペプチドMHC複合体の標的化腫瘍関連ペプチドは、ウィルムス腫瘍タンパク質1(WT1)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、サバイピン、マウス二重微小染色体2相同体(MDM2)、シトクロムP450(CYP1B)、KRASまたはBRAFのペプチドである。

【0177】

遺伝学的に異なるか実質的に異なるかもしくは実質的に同一である、操作型 T細胞から安定的に発現する TCRポリヌクレオチドから、または操作型 T細胞に安定的に組み込まれた遺伝学的に別個の TCRポリヌクレオチドから、2つ以上の腫瘍認識部分を T細胞で発現させてもよい。遺伝学的に別個の TCR(複数可)の事例では、同じ症状に関連している異なる抗原を認識する TCR(複数可)を利用してもよい。1つの好ましい実施形態では、 T細胞は、異なるMHCハプロタイプとの関連において同じ抗原を認識する1つ以上の発現カセットから、ヒトまたはマウスを起源とする異なるTCRを発現するように操作される。別の好ましい実施形態では、 T細胞は、1つのTCRと、異なるMHCハプロタイプと複合体化している所与の抗原からの同じ

10

20

30

40

50

または異なるペプチドを指向する2つ以上の抗体とを発現するように操作される。いくつかの事例では、操作型 T細胞による単一のTCRの発現は、適切なTCR対合を促進する。異なるTCRを発現する操作型 T細胞は、普遍的な同種異系操作型 T細胞を提供することができる。もう1つの好ましい実施形態では、 T細胞は、ペプチド-MHC複合体を指向する1つ以上の異なる抗体を発現するように操作され、各抗体は、同じまたは異なるMHCハプロタイプと複合体化した同じまたは異なるペプチドを指向するものである。いくつかの事例では、腫瘍認識部分は、ペプチド-MHC複合体に結合する抗体であり得る。

【0178】

T細胞は、異なるMHCハプロタイプとの関連において同じ抗原を認識する1つ以上の発現カセットからのTCRを発現するように操作され得る。いくつかの事例では、操作型 T細胞は、操作型細胞内でのTCR誤対合の可能性を最小限に抑えるために、単一のTCRまたは、CARと組み合わせたTCRを発現するように設計される。2つ以上の発現カセットから発現する腫瘍認識部分は、好ましくは、異なるポリヌクレオチド配列を有し、例えば異なるHLAハプロタイプとの関連において同じ標的の異なるエピトープを認識する腫瘍認識部分をコードする。そのような異なるTCRまたはCARを発現する操作型 T細胞は、普遍的な同種異系操作型 T細胞を提供することができる。

10

【0179】

いくつかの事例では、 T細胞は、1つ以上の腫瘍認識部分を発現するように設計される。 T細胞において操作された遺伝学的に同一または実質的に同一の抗原特異的キメラ(CAR)ポリヌクレオチドから、2つ以上の腫瘍認識部分を発現させてもよい。

20

T細胞において操作された遺伝学的に別個のCARポリヌクレオチドから2つ以上の腫瘍認識部分を発現させてもよい。遺伝学的に別個のCAR(複数可)は、同じ症状に関連している異なる抗原を認識するように設計されてもよい。

【0180】

T細胞は、あるいは二重特異性であってもよい。二重特異性操作型 T細胞は、2つ以上の腫瘍認識部分を発現することができる。二重特異性操作型 T細胞は、TCR腫瘍認識部分とCAR腫瘍認識部分との両方を発現することができる。二重特異性操作型 T細胞は、同じ症状に関連している異なる抗原を認識するように設計されることができる。操作型 T細胞は、同一または実質的に同一の抗原を認識する2つ以上のCAR/TCR(複数可)二重特異性ポリヌクレオチドを発現することができる。操作型 T細胞は、別個の抗原を認識する2つ以上のCAR/TCR(複数可)二重特異性構築物を発現することができる。いくつかの事例では、本開示の二重特異性構築物は、標的細胞の活性化及び不活性化ドメインに結合し、それにより、向上した標的特異性を提供する。

30

T細胞は、少なくとも1個の腫瘍認識部分、少なくとも2個の腫瘍認識部分、少なくとも3個の腫瘍認識部分、少なくとも4個の腫瘍認識部分、少なくとも5個の腫瘍認識部分、少なくとも6個の腫瘍認識部分、少なくとも7個の腫瘍認識部分、少なくとも8個の腫瘍認識部分、少なくとも9個の腫瘍認識部分、少なくとも10個の腫瘍認識部分、少なくとも11個の腫瘍認識部分、少なくとも12個の腫瘍認識部分、または別の適切な数の腫瘍認識部分を発現するように操作され得る。

40

【0181】

適切なTCR機能は、ITAMモチーフを含む2つの機能性 (ゼータ)タンパク質によって強化され得る。適切なTCR機能は、 または 活性化ドメイン、例えば、CD3、CD28、CD2、CTLA4、ICOS、JAML、PD-1、CD27、CD30、41-BB、OX40、NKG2D、HVEM、CD46、CD4、FcRI、IL-2RB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP分子、及びCD70によっても強化され得る。発現したポリヌクレオチドは、腫瘍認識部分、リンカー部分及び活性化ドメインの遺伝コードを含み得る。操作型 T細胞によるポリヌクレオチドの翻訳は、タンパク質リンカーによって繋ぎ合わされた腫瘍認識部分と活性化ドメインとを提供し得る。大抵、リンカーは、腫瘍認識部分及び活性化ドメイン折りたたみを妨げない

50

アミノ酸を含む。リンカー分子は、長さが少なくとも約5アミノ酸、約6アミノ酸、約7アミノ酸、約8アミノ酸、約9アミノ酸、約10アミノ酸、約11アミノ酸、約12アミノ酸、約13アミノ酸、約14アミノ酸、約15アミノ酸、約16アミノ酸、約17アミノ酸、約18アミノ酸、約19アミノ酸または約20アミノ酸であり得る。いくつかの事例では、リンカー中のアミノ酸のうち少なくとも50%、少なくとも70%または少なくとも90%がセリンまたはグリシンである。

【0182】

いくつかの事例では、活性化ドメインは1つ以上の突然変異を含み得る。適する突然変異は、例えば、活性化ドメインを恒常的に活性にする突然変異であり得る。1つ以上の核酸の同一性を変更することは、翻訳されるアミノ酸のアミノ酸配列を変化させる。コードされるアミノ酸を極性、無極性、塩基性または酸性のアミノ酸に改変するような核酸突然変異をもたらすことができる。腫瘍からのエピトープを認識するように腫瘍認識部分を最適化するような核酸突然変異をもたらすことができる。操作された腫瘍認識部分、操作された活性化ドメイン、または T細胞の別の操作された構成要素は、1個より多いアミノ酸突然変異、2個のアミノ酸突然変異、3個のアミノ酸突然変異、4個のアミノ酸突然変異、5個のアミノ酸突然変異、6個のアミノ酸突然変異、7個のアミノ酸突然変異、8個のアミノ酸突然変異、9個のアミノ酸突然変異、10個のアミノ酸突然変異、11個のアミノ酸突然変異、12個のアミノ酸突然変異、13個のアミノ酸突然変異、14個のアミノ酸突然変異、15個のアミノ酸突然変異、16個のアミノ酸突然変異、17個のアミノ酸突然変異、18個のアミノ酸突然変異、19個のアミノ酸突然変異、20個のアミノ酸突然変異、21個のアミノ酸突然変異、22個のアミノ酸突然変異、23個のアミノ酸突然変異、24個のアミノ酸突然変異、25個のアミノ酸突然変異、26個のアミノ酸突然変異、27個のアミノ酸突然変異、28個のアミノ酸突然変異、29個のアミノ酸突然変異、30個のアミノ酸突然変異、31個のアミノ酸突然変異、32個のアミノ酸突然変異、33個のアミノ酸突然変異、34個のアミノ酸突然変異、35個のアミノ酸突然変異、36個のアミノ酸突然変異、37個のアミノ酸突然変異、38個のアミノ酸突然変異、39個のアミノ酸突然変異、40個のアミノ酸突然変異、41個のアミノ酸突然変異、42個のアミノ酸突然変異、43個のアミノ酸突然変異、44個のアミノ酸突然変異、45個のアミノ酸突然変異、46個のアミノ酸突然変異、47個のアミノ酸突然変異、48個のアミノ酸突然変異、49個のアミノ酸突然変異、または50個のアミノ酸突然変異を含み得る。

【0183】

いくつかの事例では、本開示の T細胞は1つ以上のMHC分子を発現しない。操作型 T細胞における1つ以上のMHC遺伝子座の欠失は、宿主免疫系によって操作型 T細胞が認識される可能性を低減することができる。ヒトの主要組織適合性複合体(MHC)遺伝子座は、ヒト白血球抗原(HLA)系として知られ、 T細胞を含めた抗原提示細胞において発現する大きな遺伝子ファミリーを構成する。HLA-A、HLA-B及びHLA-C分子は、抗原としての細胞内ペプチドを抗原提示細胞に提示するように機能する。HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ及びHLA-DR分子は、抗原としての細胞外ペプチドを抗原提示細胞に提示するように機能する。HLA遺伝子のいくつかの対立遺伝子は、GVHD、自己免疫障害及びがんに関連付けられてきた。本明細書に記載の操作型 T細胞は、1つ以上のHLA遺伝子の遺伝子発現が欠如するかまたは妨害されるようにさらに操作されることができる。本明細書に記載の操作型 T細胞は、MHC複合体の1つ以上の構成要素の遺伝子発現が欠如するかまたは妨害されるように、例えば、MHC遺伝子のうちの1つ以上が完全に欠失するか、特定のエクソンが欠失するかまたは β 2マイクログロブリン(B2m)が欠失するように、さらに操作されることができる。少なくとも1つのHLA遺伝子の遺伝子切除または遺伝子妨害は、宿主対移植片疾患を引き起こすことなく任意のHLAハプロタイプを有する対象に投与されることができる臨床治療的な T細胞をもたらすことができる。本明細書に記載の操作型 T細胞は、任意のHLAハプロタイプを有するヒト対象の

10

20

30

40

50

ための普遍的ドナーとなることができる。

【0184】

T細胞は、1つまたは様々なHLA遺伝子座（複数可）が欠如するように操作されることができる。操作されたT細胞は、HLA-A対立遺伝子、HLA-B対立遺伝子、HLA-C対立遺伝子、HLA-DR対立遺伝子、HLA-DQ対立遺伝子またはHLA-DP対立遺伝子が欠如するように操作されることができる。いくつかの事例では、HLA対立遺伝子は、ヒトの症状、例えば自己免疫症状に関連している。例えば、HLA-B27対立遺伝子は関節炎及びぶどう膜炎と関連付けられており、HLA-DR2対立遺伝子は全身性紅斑性狼瘡及び多発性硬化症に関連付けられており、HLA-DR3対立遺伝子は21-水酸化酵素欠損症に関連付けられており、HLA-DR4は関節リウマチ及び1型糖尿病に関連付けられている。例えばHLA-B27対立遺伝子が欠如している操作型T細胞は、対象の免疫系によってすぐに認識されることなく、関節炎を患う対象に投与されることができる。いくつかの事例では、1つ以上のHLA遺伝子座の欠失は、任意のHLAハプロタイプを有する任意の対象のための普遍的ドナーである操作型T細胞をもたらす。

10

【0185】

いくつかの事例では、T細胞を操作することは、T細胞ゲノムの一部の欠失を必要とする。いくつかの事例では、ゲノムの欠失部分は、MHC遺伝子座（複数可）の一部を含む。ある場合には、操作型T細胞は野生型ヒトT細胞に由来し、MHC遺伝子座はHLA遺伝子座である。いくつかの事例では、ゲノムの欠失部分は、MHC複合体中のタンパク質に対応する遺伝子の一部を含む。いくつかの事例では、ゲノムの欠失部分は、2マイクログロブリン遺伝子を含む。ある場合には、ゲノムの欠失部分は、免疫チェックポイント遺伝子、例えば、PD-1、CTLA-4、LAG3、ICOS、BTLA、KIR、TIM3、A2aR、B7-H3、B7-H4及びCECAM-1を含む。いくつかの事例では、操作型T細胞は、T細胞の活性化及び細胞傷害性を強化する活性化ドメインを発現するように設計されることができる。操作型T細胞で発現させることができる活性化ドメインの非限定的な例としては、CD2、ICOS、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、CD27、CD70、CD80、CD86、DAP分子、CD122、GITR、FcRIが挙げられる。

20

【0186】

操作型T細胞のゲノムの任意の部分を欠失させて内在性T細胞遺伝子の発現を妨害することができる。T細胞のゲノムにおいて欠失させるかまたは妨害することができるゲノム領域の非限定的な例としては、プロモーター、アクチベーター、エンハンサー、エクソン、イントロン、非コードRNA、マイクロRNA、核内低分子RNA、可変数縦列型反復配列（VNTR）、短鎖縦列型反復配列（STR）、SNPパターン、超可変領域、ミニサテライト、ジヌクレオチド反復配列、トリヌクレオチド反復配列、テトラヌクレオチド反復配列、または単純反復配列が挙げられる。いくつかの事例では、ゲノムの欠失部分は、1核酸～約10核酸、1核酸～約100核酸、1核酸～約1,000核酸、1核酸～約10,000核酸、1核酸～約100,000核酸、1核酸～約1,000,000核酸の範囲、または他の適切な範囲である。

30

40

【0187】

操作型T細胞におけるHLA遺伝子発現は、当技術分野で知られている様々な技術を用いて妨害することもできる。いくつかの事例では、操作型T細胞ゲノムから遺伝子を切除するかまたは操作型T細胞における少なくとも1つのHLA遺伝子座の遺伝子発現を妨害するために、広い遺伝子座の遺伝子編集技術が用いられる。操作型T細胞のゲノム上の所望の遺伝子座を編集するために用いることができる遺伝子編集技術の非限定的な例としては、WO201409370、WO2003087341、WO2014134412及びWO2011090804（参照によりそれらの各々の全体を本明細書に援用する）にそれぞれ記載されている、規則的な間隔をもってクラスター化された短鎖反復回文配列（CRISPR）-Cas、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転

50

写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ (T A L E N)、及びメガヌクレアーゼの技術が挙げられる。

【 0 1 8 8 】

T細胞は、腫瘍認識部分を既に発現する単離された非操作型 T細胞から操作されてもよい。操作型 T細胞は、単離された、例えば腫瘍試料の腫瘍内浸潤リンパ球から単離された野生型 T細胞で内在的に発現する腫瘍細胞認識部分を保持することができる。いくつかの事例では、野生型 TCRが操作型 T細胞の腫瘍細胞認識部分で置き換えられる。

【 0 1 8 9 】

T細胞は、1つ以上の帰巢分子、例えばリンパ球帰巢分子を発現するように操作されることができる。帰巢分子は、例えば、リンパ球帰巢受容体または細胞接着分子であり得る。帰巢分子は、操作型 T細胞を対象に投与した時に操作型 T細胞が遊走して標的化固形腫瘍を含めた固形腫瘍に浸潤することを助けることができる。帰巢受容体の非限定的な例としては、CCRファミリーのメンバー、例えば、CCR2、CCR4、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10、CLA、CD44、CD103、CD62L、E-セレクトリン、P-セレクトリン、L-セレクトリン、インテグリン、例えばVLA-4及びLFA-1が挙げられる。細胞接着分子の非限定的な例としては、ICAM、N-CAM、VCAM、PE-CAM、L1-CAM、ネクチン (PVRL1、PVRL2、PVRL3)、LFA-1、インテグリン アルファXベータ2、アルファvベータ7、マクロファージ-1抗原、CLA-4、糖タンパク質IIb/IIaが挙げられる。細胞接着分子のさらなる例としては、T-カドヘリンなどのカルシウム依存分子及び、MMP9またはMMP2などのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) に対する抗体が挙げられる。

【 0 1 9 0 】

T細胞の成熟、活性化、増殖及び機能に係るステップは、免疫チェックポイントタンパク質を介する共刺激性及び抑制性のシグナルによって調節され得る。免疫チェックポイントは、免疫系に本来備わっている共刺激性及び抑制性の要素である。免疫チェックポイントは、疾患症状、例えば細胞形質転換または感染に免疫系が応答するときに組織に対する損傷を防止すべく自己寛容を維持しかつ生理学的免疫応答の持続期間及び大きさを調節するのを助ける。 T細胞か T細胞かのどちらかからの免疫応答を制御するために用いられる共刺激シグナルと抑制シグナルとの平衡は、免疫チェックポイントタンパク質によって調節され得る。免疫チェックポイントタンパク質、例えばPD1及びCTLA4は、T細胞の表面に存在しており、免疫応答の「入」または「切」を切り替えるために使用され得る。腫瘍は、とりわけ腫瘍抗原に特異的なT細胞に対して、チェックポイントタンパク質機能を免疫耐性機序として調節不全にし得る。本開示の操作型 T細胞は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子座 (複数可)、例えば、PD-1、CTLA-4、LAG3、ICOS、BTLA、KIR、TIM3、A2aR、CEACAM1、B7-H3、及びB7-H4が欠如するようにさらに操作されることができる。あるいは、本開示の操作型 T細胞における内在性免疫チェックポイント遺伝子の発現を遺伝子編集技術によって妨害することができる。

【 0 1 9 1 】

免疫学的チェックポイントは、本開示の操作型 T細胞において抑制シグナル伝達経路を調節する分子 (例を挙げると、CTLA4、PD1及びLAG3) または刺激シグナル伝達経路を調節する分子 (例を挙げると、ICOS) であり得る。幅広い免疫グロブリンスーパーファミリー内のいくつかのタンパク質は、免疫学的チェックポイントのリガンドとなり得る。免疫チェックポイントリガンドタンパク質の非限定的な例としては、B7-H4、ICOSL、PD-L1、PD-L2、MegaCD40L、MegaOX40L、及びCD137Lが挙げられる。いくつかの事例では、免疫チェックポイントタンパク質は、腫瘍で発現する抗原である。いくつかの事例では、免疫チェックポイント遺伝子はCTLA-4遺伝子である。いくつかの事例では、免疫チェックポイント遺伝子はPD

10

20

30

40

50

- 1 遺伝子である。

【0192】

PD1は、CD28/CTLA4ファミリーに属する抑制性受容体であり、活性化されたTリンパ球、B細胞、単球、DC及びT-regにおいて発現する。PD1に対する2つの既知のリガンド、PD-L1及びPD-L2が存在し、それらはT細胞、APC及び悪性細胞において発現するものであり、自己反応性リンパ球を抑制しかつTAA特異的な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)のエフェクター機能を抑制するように機能する。したがって、PD1が欠如している操作型T細胞はその細胞傷害活性を、腫瘍細胞によるPD-L1及びPD-L2の発現に関係なく保持することができる。いくつかの事例では、本開示の操作型T細胞にはPD-1遺伝子の遺伝子座が欠如している。いくつかの事例では、操作型T細胞におけるPD-1遺伝子の発現は遺伝子編集技術によって妨害される。

10

【0193】

CTLA4(細胞傷害性Tリンパ球抗原4)は、CD152(分化抗原152)としても知られている。CTLA4は、配列相同性及びリガンド(CD80/B7-1及びCD86/B7-2)を共刺激分子CD28と共有しているものの、CTLA4を受容体として発現しているT細胞に抑制シグナルを送達する点で異なる。CTLA4は、両リガンドに対する全親和性がよりはるかに高く、リガンド密度が限られている場合に結合に関してCD28を凌駕することができる。CTLA4は、CD8⁺エフェクターT細胞の表面に発現することが多く、ナイーブ及びメモリーT細胞の両方の初期活性化段階において機能的役割を果たす。CTLA4は、T細胞活性化の初期段階の間、CD80及びCD86に対する増加した親和性によってCD28の活性を打ち消す。CTLA4の主要な機能には、ヘルパーT細胞の下方制御及び調節性T細胞の免疫抑制活性の強化が含まれる。ある場合には、本開示の操作型T細胞にはCTLA4遺伝子が欠如している。いくつかの事例では、操作型T細胞におけるCTLA4遺伝子の発現は遺伝子編集技術によって妨害される。

20

【0194】

LAG3(リンパ球活性化遺伝子3)は、活性化された抗原特異的細胞傷害性T細胞上に発現し、調節性T細胞の機能を強化することができ、独立してCD8⁺エフェクターT細胞活性を抑制することができる。LAG3は、MHCクラスIIタンパク質に対する高い結合親和性を有するCD4様の負の調節性タンパク質であり、いくつかの上皮癌では上方制御されており、T細胞増殖及び恒常性の寛容をもたらす。LAG-3-IG融合タンパク質を使用するLAG-3/クラスII相互作用の軽減は、抗腫瘍免疫応答を強化し得る。いくつかの事例では、本開示の操作型T細胞にはLAG3遺伝子の遺伝子座が欠如している。ある場合には、操作型T細胞におけるLAG3遺伝子の発現は遺伝子編集技術によって妨害される。

30

【0195】

非操作型及び操作型T細胞の表現型

操作型T細胞は、対象の体の特定の身体位置に帰巢し得る。操作型T細胞の遊走及び帰巢は、特定のケモカイン及び/または接着分子の発現と作用との複合に依存し得る。操作型T細胞の帰巢は、ケモカインとその受容体との相互作用によって制御され得る。例えば、限定されないがCXCR3(そのリガンドはIP-10/CXCL10及び6Ckine/SLC/CCL21で表される)、CCR4+CXCR5+(RANTES、MIP-1、MIP-1の受容体)、CCR6+及びCCR7を含めてサイトカインは操作型T細胞の帰巢に影響を与え得る。いくつかの事例では、操作型T細胞は、炎症及び損傷の部位ならびに疾患細胞に帰巢して修復機能を発揮し得る。いくつかの事例では、操作型T細胞はがんへ帰巢することができる。いくつかの事例では、操作型T細胞は、胸腺、骨髄、皮膚、喉頭、気管、胸膜、肺、食道、腹部、胃、小腸、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、尿道、膀胱、精巣、前立腺、精管、卵巣、尿管(ureters)、乳腺、副甲状腺、脾臓または対象の体の別の部位に帰巢し得る。操作型T細胞

40

50

胞は1つ以上の帰巢部分、例えば特定のTCR対立遺伝子及び/またはリンパ球帰巢分子を発現することができる。

【0196】

操作型 T細胞は特定の表現型を有し得、表現型は細胞表面マーカー発現の観点から表されることができる。様々なタイプの T細胞を本明細書に記載されているとおりに操作することができる。好ましい実施形態では操作型 T細胞はヒトに由来するが、操作型 T細胞が別の供給源、例えば哺乳動物または合成細胞に由来するものであってもよい。

【0197】

増殖済み細胞集団の免疫表現型は、限定されないがCD27、CD45RA、CD45RO、CCR7及びCD62Lを含めたマーカーを使用して決定され得る(Klebanoff et al., Immunol Rev. 211:214-2006)。CD45RAはナイーブTリンパ球上に発現し、抗原との遭遇によってCD45ROに置き換えられるが、後のエフェクター細胞において再発現する(Michie et al., Nature 360, 264-265(1992))。CD62Lは、二次リンパ組織に進入する帰巢分子として振舞う細胞接着分子であり、T細胞がエフェクター機能を獲得するときのT細胞活性化の後に消失する(Sallusto et al., Nature. 401:708(1999))。CD27は、T細胞分化中に消失する共刺激マーカーである(Appay et al., Nat Med. 8:379(2002)、Klebanoff et al., Immunol Rev. 211:214-2006)。

【0198】

抗原

本明細書において開示される本発明は、抗原認識部分を発現する操作型 T細胞を提供し、この場合、抗原認識部分は、疾患に特有のエピトープを認識する。抗原は、免疫応答を惹起する分子であり得る。この免疫応答は、抗体産生か、免疫応答能を有する特定細胞の活性化かのどちらか、またはその両方を伴い得る。抗原は、例えば、ペプチド、タンパク質、ハプテン、脂質、炭水化物、細菌、病原体またはウイルスであり得る。抗原は腫瘍抗原であり得る。腫瘍エピトープは、MHC IまたはMHC II複合体によって腫瘍細胞の表面に提示され得る。エピトープは、細胞表面に発現して腫瘍認識部分によって認識される、抗原の一部であり得る。

【0199】

操作型 T細胞によって認識される抗原の非限定的な例としては、CD19、CD20、CD30、CD22、CD37、CD38、CD56、CD33、CD138、CD123、CD79b、CD70、CD75、CA6、GD2、アルファフェトタンパク質(AFP)、がん胎児性抗原(CEA)、RON、CEACAM5、CA-125、MUC-16、5T4、NaPi2b、ROR1、ROR2、PLIF、Her2/Neu、EGFRvIII、GPMNB、LIV-1、糖脂質F77、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、PSMA、STEAP-1、STEAP-2、メソテリン、c-Met、CSPG4、PVRL-4、VEGFR2、PSCA、CLEC12a、L1CAM、GPC2、GPC3、葉酸結合タンパク質/受容体、SLC44A4、Cripto、CTAG1B、AXL、IL-13R、IL-3R2、SLTRK6、gp100、MART1、チロシナーゼ、SSX2、SSX4、NYESO-1、WT-1、PRAME、上皮腫瘍抗原(ETA)、MAGEAファミリー遺伝子(例えば、MAGEA3、MAGEA4)、KKLC1、突然変異型ras、raf、p53、MHCクラスI鎖関連分子A(MICA)もしくはMHCクラスI鎖関連分子B(MICB)または、HPV、CMVもしくはEBVの1つ以上の抗原が挙げられる。

【0200】

抗原は細胞の細胞内区画または細胞外区画において発現し得、操作型 T細胞は細胞内または細胞外腫瘍抗原を認識することができる。いくつかの事例では、操作型 T細胞のTCRは、細胞内腫瘍抗原か細胞外腫瘍抗原かのどちらかに由来するペプチドを

認識する。例えば、抗原は、ウイルスに感染した細胞によって細胞内または細胞外に産生されるタンパク質、例えば、H I V、E B V、C M VまたはH P Vタンパク質であり得る。抗原は、がん細胞で細胞内または細胞外に発現するタンパク質であってもよい。

【0201】

抗原認識部分は、ストレス下にある細胞、例えば、がん細胞またはウイルスに感染している細胞からの抗原を認識し得る。例えば、ヒトMHCクラスI鎖関連遺伝子(MICA及びMICB)は6番染色体のHLAクラスI領域内に位置している。MICA及びMICBタンパク質は、ヒト上皮での「ストレス」のマーカーストレスと考えられ、一般的なナチュラルキラー細胞受容体(NKG2D)を発現する細胞にとってのリガンドとして作用する。MICA及びMICBは、がん細胞からストレスマーカーとして高発現し得る。操作型 T細胞はMICAまたはMICB腫瘍エピトープを認識することができる。

10

【0202】

腫瘍認識部分は、特定のアビディティーで抗原を認識するように操作され得る。例えば、TCRまたはCAR構築物によってコードされる腫瘍認識部分は、少なくとも少なくとも10 fM、少なくとも100 fM、少なくとも1ピコモラー(pM)、少なくとも10 pM、少なくとも20 pM、少なくとも30 pM、少なくとも40 pM、少なくとも50 pM、少なくとも60 pM、少なくとも70 pM、少なくとも80 pM、少なくとも90 pM、少なくとも100 pM、少なくとも200 pM、少なくとも300 pM、少なくとも400 pM、少なくとも500 pM、少なくとも600 pM、少なくとも700 pM、少なくとも800 pM、少なくとも900 pM、少なくとも1ナノモラー(nM)、少なくとも2 nM、少なくとも3 nM、少なくとも4 nM、少なくとも5 nM、少なくとも6 nM、少なくとも7 nM、少なくとも8 nM、少なくとも9 nM、少なくとも10 nM、少なくとも20 nM、少なくとも30 nM、少なくとも40 nM、少なくとも50 nM、少なくとも60 nM、少なくとも70 nM、少なくとも80 nM、少なくとも90 nM、少なくとも100 nM、少なくとも200 nM、少なくとも300 nM、少なくとも400 nM、少なくとも500 nM、少なくとも600 nM、少なくとも700 nM、少なくとも800 nM、少なくとも900 nM、少なくとも1 μM、少なくとも2 μM、少なくとも3 μM、少なくとも4 μM、少なくとも5 μM、少なくとも6 μM、少なくとも7 μM、少なくとも8 μM、少なくとも9 μM、少なくとも10 μM、少なくとも20 μM、少なくとも30 μM、少なくとも40 μM、少なくとも50 μM、少なくとも60 μM、少なくとも70 μM、少なくとも80 μM、少なくとも90 μMまたは少なくとも100 μMの解離定数で抗原を認識し得る。

20

30

【0203】

ある場合には、腫瘍認識部分は、10 fM以下、100 fM以下、1ピコモラー(pM)以下、10 pM以下、20 pM以下、30 pM以下、40 pM以下、50 pM以下、60 pM以下、70 pM以下、80 pM以下、90 pM以下、100 pM以下、200 pM以下、300 pM以下、400 pM以下、500 pM以下、600 pM以下、700 pM以下、800 pM以下、900 pM以下、1ナノモラー(nM)以下、2 nM以下、3 nM以下、4 nM以下、5 nM以下、6 nM以下、7 nM以下、8 nM以下、9 nM以下、10 nM以下、20 nM以下、30 nM以下、40 nM以下、50 nM以下、60 nM以下、70 nM以下、80 nM以下、90 nM以下、100 nM以下、200 nM以下、300 nM以下、400 nM以下、500 nM以下、600 nM以下、700 nM以下、800 nM以下、900 nM以下、1 μM以下、2 μM以下、3 μM以下、4 μM以下、5 μM以下、6 μM以下、7 μM以下、8 μM以下、9 μM以下、10 μM以下、20 μM以下、30 μM以下、40 μM以下、50 μM以下、60 μM以下、70 μM以下、80 μM以下、90 μM以下または100 μM以下の解離定数で抗原を認識するように操作され得る。

40

【0204】

新規活性化剤

本発明の発明者らは、特定サブタイプの TCR に結合しそれゆえ T細胞の特定

50

集団を活性化する、活性化剤を同定した。一態様において、本発明は、本明細書の実施例 14 及び実施例 39 ならびに図 23 ~ 30 及び図 33 ~ 36 において同定され記載されている新規活性化エピトープに結合する新規活性化剤を提供する。活性化剤としては、限定されないが例えば、MAb TS8.2、TS-1、15D、B6、R9.12、1-05、1-08、1-18、1-22、1-23、1-26、1-35、1-37、1-39、1-113、1-143、1-149、1-155、1-182、1-183、1-191、1-192、1-195、1-197、1-199、1-201、1-203、1-239、1-253、1-257、1-278、1-282、1-285、2-14、2-17、2-22、2-30、2-31、2-32、2-33、2-35、2-36 及び 2-37 が挙げられる。

10

【0205】

これらの活性化剤にはさらに、限定されないが、TS8.2、TS-1、15D、B6、R9.12、1-05、1-08、1-18、1-22、1-23、1-26、1-35、1-37、1-39、1-113、1-143、1-149、1-155、1-182、1-183、1-191、1-192、1-195、1-197、1-199、1-201、1-203、1-239、1-253、1-257、1-278、1-282、1-285、2-14、2-17、2-22、2-30、2-31、2-32、2-33、2-35、2-36 及び 2-37 からなる群から選択される 1 つ以上の MAb と同じエピトープに結合するかまたは当該 1 つ以上の MAb と競合する活性化剤が含まれる。

20

【0206】

これらの活性化剤にはさらに、限定されないが、TS8.2、TS-1、15D、B6、R9.12、1-05、1-08、1-18、1-22、1-23、1-26、1-35、1-37、1-39、1-113、1-143、1-149、1-155、1-182、1-183、1-191、1-192、1-195、1-197、1-199、1-201、1-203、1-239、1-253、1-257、1-278、1-282、1-285、2-14、2-17、2-22、2-30、2-31、2-32、2-33、2-35、2-36 及び 2-37 からなる群から選択される MAb の相補性決定領域 (CDR) 及び / または可変領域を含有する活性化剤が含まれる。

30

【0207】

本発明はさらに、(i) TS8.2、TS-1、15D、B6、R9.12、1-05、1-08、1-18、1-22、1-23、1-26、1-35、1-37、1-39、1-113、1-143、1-149、1-155、1-182、1-183、1-191、1-192、1-195、1-197、1-199、1-201、1-203、1-239、1-253、1-257、1-278、1-282、1-285、2-14、2-17、2-22、2-30、2-31、2-32、2-33、2-35、2-36 及び 2-37 からなる群から選択される MAb の相補性決定領域 (CDR) 及び / もしくは可変領域を含有するか、(ii) 当該 MAb と同じエピトープに結合するかもしくは当該 MAb と競合するか、または (iii) 当該 MAb である、活性化剤をコードする核酸を提供する。いくつかの事例では、核酸は、宿主細胞内 (例えば異種宿主細胞内) にある。いくつかの事例では、核酸は、異種プロモーターに機能可能に繋がられているか、または異種ポリペプチドをコードする核酸に機能可能に繋がられている。本明細書中で使用する場合、「異種」という用語は、一緒に天然に存在することが全くない 2 つの構成要素を指す。

40

【0208】

特定の実施形態では、活性化剤 (例えば抗体) は、1 つ以上の T 細胞集団 (例えば、1 T 細胞または 2 T 細胞) を増殖または活性化させる。特定の実施形態では、活性化剤は、1 及び 3 T 細胞を選択的に活性化させる。特定の実施形態では、活性化剤は

50

、 1 及び 4 T細胞を選択的に活性化させる。特定の実施形態では、活性化剤は、 1 T細胞を選択的に活性化させる。特定の実施形態では、活性化剤は、 1、 3、 5 及び 5 T細胞を選択的に活性化させる。特定の実施形態では、活性化剤は、 2 T細胞を選択的に活性化させる。

【0209】

本発明はさらに、上記活性化剤のうちの1つ以上を製造する方法を提供する。例えば、活性化剤をコードする核酸を含有する宿主細胞を培養して上記活性化剤のうちの1つ以上を製造することができる。

【0210】

A P C

本明細書ではさらに、操作型または非操作型 T細胞、例えば T細胞の1つ以上の亜集団の増殖のためのA P Cについて記載する。いくつかの実施形態において、本明細書では、上記活性化剤のうちの1つ以上をコードする異種核酸を含有するA P Cについて記載する。いくつかの実施形態において、本明細書では、上記活性化剤のうちの1つ以上を細胞表面に発現するA P Cについて記載する。いくつかの実施形態において、本明細書では、1つ以上のF c受容体を細胞表面に発現するA P Cであって、F c受容体(複数可)が上記活性化剤のうちの1つ以上と接触及び/または結合している、当該A P Cについて記載する。

10

【0211】

いくつかの事例では、A P C(例えば、上記活性化剤のうちの1つ以上が細胞表面に発現しているかまたは細胞表面に発現したF c受容体に結合している、A P C)は、H L AクラスI、H L AクラスIのインバリエント鎖及び/またはH L A-D Mを発現しないか、または低減されたその発現を呈する。いくつかの事例では、A P Cは、接着分子、例えば、接着分子- 1、C D 1 1 a、C D 1 8、C D 5 4 及び/または白血球機能関連抗原- 3を発現する。いくつかの事例では、A P Cは、F c受容体、例えば、本明細書に記載の T細胞増殖方法において使用される活性化剤のアイソタイプに対して特異的であるF c受容体を発現する。いくつかの事例では、A P Cは、C D 6 4、C D 3 2 A、C D 3 2 B、C D 3 2 C、C D 1 6 A、C D 1 6 B、F c R n、T R I M 2 1もしくはC D 3 0 7、またはより高い親和性を有するかもしくは変化した特異性を有するその操作された変異型からなる群から選択される1つ以上のF c受容体を発現する。

20

30

【0212】

さらに本明細書では、上記A P Cのうちの1つ以上を含む培養物について記載する。培養物は、増殖済みまたは未増殖の操作型または非操作型 T細胞をさらに含有し得る。培養物は、追加で、または代わりに、本明細書に記載の T細胞活性化剤のいずれか1つを含む選択的または非選択的な T細胞活性化剤を含有し得る。いくつかの事例では、培養物はI L - 2 1を含有しない。いくつかの事例では、培養物は、I L - 4、I L - 2もしくはI L - 1 5またはそれらの組み合わせを含有しない。いくつかの事例では、培養物は、 T細胞の亜集団を選択的に増殖させるサイトカインを含有しない。

【0213】

エピトープ同定

本発明の発明者らは、 T C R活性化M A b T S 8 . 2、T S - 1、1 5 D、B 6、R 9 . 1 2、 1 - 0 5、 1 - 0 8、 1 - 1 8、 1 - 2 2、 1 - 2 3、 1 - 2 6、 1 - 3 5、 1 - 3 7、 1 - 3 9、 1 - 1 1 3、 1 - 1 4 3、 1 - 1 4 9、 1 - 1 5 5、 1 - 1 8 2、 1 - 1 8 3、 1 - 1 9 1、 1 - 1 9 2、 1 - 1 9 5、 1 - 1 9 7、 1 - 1 9 9、 1 - 2 0 1、 1 - 2 0 3、 1 - 2 3 9、 1 - 2 5 3、 1 - 2 5 7、 1 - 2 7 8、 1 - 2 8 2、 1 - 2 8 5、 2 - 1 4、 2 - 1 7、 2 - 2 2、 2 - 3 0、 2 - 3 1、 2 - 3 2、 2 - 3 3、 2 - 3 5、 2 - 3 6 及び 2 - 3 7のエピトープ内の結合領域を同定した。典型的なエピトープとしては、限定されないが例えば、 T C R活性化M A b T S 8 . 2、T S - 1、1 5 D、B 6、R 9 . 1 2、 1 - 0 5、 1 - 0 8、 1 - 1 8、 1 - 2 2、 1 -

40

50

23、 1-26、 1-35、 1-37、 1-39、 1-113、 1-143、 1-149、 1-155、 1-182、 1-183、 1-191、 1-192、 1-195、 1-197、 1-199、 1-201、 1-203、 1-239、 1-253、 1-257、 1-278、 1-282、 1-285、 2-14、 2-17、 2-22、 2-30、 2-31、 2-32、 2-33、 2-35、 2-36及び 2-37のエピトープが挙げられる。いくつかの実施形態では、エピトープは、TCR活性化MAb TS8.2、TS-1、15D、B6、R9.12、1-05、1-08、1-22、1-26、1-35、1-37、1-39、1-113、1-143、1-149、1-155、1-182、1-183、1-191、1-192、1-195、1-197、1-199、1-201、1-203、1-253、1-257、1-278、1-282、1-285、2-14、2-17、2-30、2-31、2-32、2-33、2-35、2-36及び 2-37のうちの一つ以上に特異的に結合するエピトープである。

10

【0214】

一態様において、本開示は、操作型及び非操作型 T 細胞の増殖を速い成長速度で刺激する薬剤のエピトープを同定する方法を提供する。エピトープは、独特の空間配座にある少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20アミノ酸を含み得る。エピトープは、連続アミノ酸、またはタンパク質の三次折りたたみによって並置された不連続アミノ酸の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、通常、変性溶媒に曝露された際に保持され得るが、三次折りたたみによって形成されるエピトープは、通常、変性溶媒で処理されると消失し得る。

20

【0215】

関心対象の活性化剤、例えば、TS8.2、15D、B6、TS-1及びR9.12抗体によって（例えば特異的に）認識される直鎖状または非直鎖状の不連続アミノ酸配列（複数可）すなわちエピトープを同定するために、エピトープ位置特定を実施することができる。エピトープ位置特定の一般的な手法は、関心対象の抗体またはリガンドによって認識される完全長ポリペプチド配列、及びポリペプチド配列の様々な断片すなわち切詰形態を、大抵は異種発現系において、発現させることを必要とし得る。その後、これらの様々な組換えポリペプチド配列またはその断片（例えば、N末端タンパク質（例えばGFP）と融合したもの）を使用して、関心対象の抗体またはリガンドがポリペプチド配列の一つ以上の切詰形態と結合できるか否かを判定することができる。

30

【0216】

いくつかの実施形態では、組換えポリペプチド配列は、2つ以上の相同性親ポリペプチドを接合した断片を含有するキメラであり、少なくとも1つの親ポリペプチドが、関心対象の活性化剤に結合するものであり、少なくとも1つの親ポリペプチドが、関心対象の活性化剤に結合しないものである。例えば、ヒト 1鎖遺伝子のセグメントを相同イルカ鎖遺伝子のセグメントと接合することができ、組換え発現系においてキメラTCRを生み出す能力に関して試験することができる。例えば細胞表面での汎 TCR抗体による検出によって指し示されるところの、TCRを形成するキメラTCR遺伝子は、その後、関心対象の活性化剤との結合性に関して試験され得る。別の例を挙げると、ヒト 2鎖遺伝子のセグメントを相同マカク鎖遺伝子のセグメントと接合することができ、キメラTCRを生み出す能力を組換え発現系において試験することができる。例えば細胞表面での汎 TCR抗体による検出によって指し示されるところの、TCRを形成するキメラTCR遺伝子は、その後、関心対象の活性化剤との結合性に関して試験され得る。

40

【0217】

重複アミノ酸領域を有する組換えポリペプチド配列の反復的な切詰め及び作出を用いることにより、関心対象の抗体によって認識されるポリペプチド配列の領域を同定することが可能である（例えば、Epitope Mapping Protocols in M

50

ethods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)を参照のこと)。方法は、エピトープライブラリー、例えば、膜担体上の合成ペプチドアレイやコンビナトリアル式ファージディスプレイペプチドライブラリーに由来するエピトープライブラリーから再作出された配列に関心対象の抗体などの薬剤が結合する能力に依拠している。そうして、エピトープライブラリーは、抗体に対してスクリーニングされる様々な可能性を提供する。さらには、エピトープの1つ以上の残基を標的とする部位特異的な突然変異誘発またはランダムAlaスキャンを遂行してエピトープの同一性を確認することができる。

【0218】

T細胞受容体(TCR)の可能な様々な組換えをcDNA構築物として合成設計し、それらを適切な系で発現させることにより、エピトープのライブラリーを作出することができる。例えば、J領域が異なっている複数のV1遺伝子セグメント、例えば、J1、J2及びJ3遺伝子セグメントを合成設計することができる。あるいは、V2J1及びV3J1鎖を合成遺伝子として注文して適切なベクターの中にクローニングすることもできる。合成的にクローニングされた複数のTCR鎖、例えば、V1J1、V1J2、V1J3、V1J4、V2及びV3鎖を、合成的にクローニングされたTCR鎖、例えば、V2、V3、V4、V5、V8、V9及びV10合成設計遺伝子セグメントと一緒に宿主系に共トランスフェクトすることができる。他の事例では、ヒトPBMCまたはヒトの正常及び悪性組織から単離されたT細胞から抽出した全RNAから、TCR鎖、例えば、V1J1、V1J2、V1J3、V1J4、V2及びV3鎖を増幅することができる。

【0219】

宿主系は、任意の適切な発現系、例えば、293細胞、昆虫細胞または適切な試験管内翻訳系であり得る。宿主系にトランスフェクトされる合成設計T細胞セグメントの可能な多種多様な組換えは、TCRの可能な対合の組み合わせを例えば25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85または90通りより多くもたすことができる。前述のライブラリーの中のエピトープのうちの1つに対する薬剤の結合は、標識された抗体、例えばTS8.2、15D、B6、TS-1及びR9.12をライブラリーのエピトープと接触させること、ならびに標識からの信号を検出することによって検出することができる。

【0220】

エピトープ位置特定のために、配座的に不連続なエピトープを位置特定することが示されたコンピュータ計算アルゴリズムも開発された。配座エピトープは、例えばX線結晶学及び二次元核磁気共鳴を含めた方法を用いてアミノ酸の空間配座を決定することによって同定され得る。いくつかのエピトープ位置特定方法、例えば、抗原：抗体複合体の結晶のX線解析は、エピトープの原子的分解能を提供することができる。他の事例では、エピトープ位置特定のためのコンピュータ計算によるコンビナトリアル式方法を採用して潜在的なエピトープを抗体、例えばTS-1抗体またはTS8.2抗体の配列に基づいてモデリングすることができる。そのような事例では、抗体の抗原結合部分を配列決定し、コンピュータ計算モデルを使用して抗体の潜在的結合部位を再構築及び予測する。

【0221】

いくつかの事例では、本開示は、T細胞受容体のエピトープを決定する方法であって、(a) T細胞受容体からエピトープのライブラリーを調製することと、(b) エピトープのライブラリーを抗体と接触させることと、(c) エピトープのライブラリーの中で抗体と結合している少なくとも1つのエピトープのアミノ酸配列を同定することを含む、当該方法を提供する。いくつかの事例では、抗体は、TS8.2、15D、B6、TS-1及びR9.12抗体からなる群から選択される。ある場合には、抗体は固体担体に付着している。エピトープのライブラリーは、T細胞受容体、例えばTCRまたはTCRの連続または不連続エピトープに対応する配列を含み得る。いくつかの事例では、エピトープのライブラリーは、約10アミノ酸～約30アミノ酸にわたる長さ、約10ア

10

20

30

40

50

ミノ酸～約20アミノ酸にわたる長さ、または約5アミノ酸～約12アミノ酸にわたる長さの T細胞受容体からの断片を含む。いくつかの事例では、抗体は標識されており、標識は放射性分子、発光分子、蛍光分子、酵素またはビオチンである。

【0222】

1 エピトープピン

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒトV₁のアミノ酸47～70（SKEMIFLIRQGSDQNA）とJ1（TDKLIFGKGTRVTVEP）またはJ2（LTAQLFFGKGTQLIVEP）とからなるエピトープであり、当該活性化剤は、J1またはJ2にK120T突然変異を含有するエピトープには結合しないものである。このエピトープは、本明細書においてピン1 1 エピトープと呼称される。ピン1 1 エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、TS-1、及び 1-18が挙げられる。ヒトV₁J領域は、（D）（J）再構成によって様々であり得、ピン1 1 エピトープを有する

10

TCRの 1鎖のV₁J領域の一例は、
SKEMIFLIRQGSDQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISAL
QLEDS AKYFCALGTGVRGLQD TD KLIFGKGTRVTVEP
であり、TCRの 1鎖のV₁J領域ピン1 1 エピトープの別の例は、
SKEMIFLIRQGSDQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISAL
QLEDS AKYFCALGEAPSAWGKHLTAQLFFGKGTQLIVEP
である。

20

【0223】

いくつかの事例では、ピン1 1 エピトープに結合する活性化剤は、
AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDS AKYFCALGTGVRGLQD TD KLIFGKGTRVTVEP
の配列を有するTCRの 1に結合するが、
AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDS AKYFCALGTGVRGLQDSWDTRQMFFGTGIKLFVEP
の配列を有するTCRの 1には結合しない。

30

【0224】

ピン1 1 エピトープに結合する活性化剤は、
AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDS AKYFCALGEAPSAWGKHLTAQLFFGKGTQLIVEP
の配列を有するTCRの 1にも結合することができる。

【0225】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒトV₁のアミノ酸47～70（SKEMIFLIRQGSDQNA）とJ1（TDKLIFGKGTRVTVEP）とからなるエピトープであり、当該活性化剤は、J1にK120T突然変異を含有するエピトープには結合しないものである。このエピトープは、本明細書においてピン1 b 1 エピトープと呼称される。ピン1 b 1 エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、1-37が挙げられる。ピン1 b 1 エピトープを有するTCRの 1鎖のV₁J領域の一例は、
SKEMIFLIRQGSDQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISAL
QLEDS AKYFCALGTGVRGLQD TD KLIFGKGTRVTVEP
である。

40

【0226】

いくつかの事例では、ピン1 b 1 エピトープに結合する活性化剤は、
AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL

50

PSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDSAKYFCALGTGVRGLQDTDKLI FGKGTRVTVEP

の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDSAKYFCALGTGVRGLQDSWDTRQMFFGTGIKLFVEP

の配列を有する TCRの 1鎖には結合しない。

【0227】

ピン1b 1エピトープに結合する活性化剤は、

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDEQNAKS . GRYSVNFKKA AKSVALTIS
ALQLEDSAKYFCALGEAPSAWGKHLTAQLFFGKGTQLIVEP

10

の配列を有する TCRの 1鎖にも結合しない。

【0228】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって(例えば特異的に)認識される
エピトープは、ヒトV 1のアミノ酸11~21(VSMPVRKAVTL)からなるエ
ピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン2 1エピトープと呼称され
る。ピン2 1エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、 1-2
85が挙げられる。

【0229】

いくつかの事例では、ピン2 1エピトープに結合する活性化剤は、

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDSAKYFCALGTGVRGLQDTDKLI FGKGTRVTVEP

の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、

AQKVTQVQRAMS SQLGEAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDSAKYFCALGTGVRGLQDTDKLI FGKGTRVTVEPRS
QPHTKPSV FVMKNGT NVACL VKEF

の配列を有する TCRの 1鎖には結合しない。

20

30

【0230】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって(例えば特異的に)認識される
エピトープは、ヒトV 1のアミノ酸11~21(VSMPVRKAVTL)からなるエ
ピトープであり、当該活性化剤は、V 1にR16の突然変異、例えばR16N突然変異
を含有するエピトープには結合しないものである。このエピトープは、本明細書において
ピン2b 1エピトープと呼称される。ピン2b 1エピトープに結合する活性化剤の例
としては、限定されないが、R9 . 12が挙げられる。

【0231】

いくつかの事例では、ピン2b 1エピトープに結合する活性化剤は、

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDSAKYFCALGTGVRGLQDTDKLI FGKGTRVTVEP

の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、

AQKVTQAQSSVSMPVNKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDSAKYFCALGTGVRGLQDTDKLI FGKGTRVTVEP

の配列を有する TCRの 1鎖には結合せず、かつ/または

AQKVTQVQRAMS SQLGEAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQL
PSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALTISA
LQLEDSAKYFCALGTGVRGLQDTDKLI FGKGTRVTVEPRS

40

50

Q P H T K P S V F V M K N G T N V A C L V K E F
の配列を有する T C R の 1 鎖には結合しない。

【 0 2 3 2 】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒト V 1 のアミノ酸 1 1 ~ 2 1 (V S M P V R K A V T L) からなるエピトープであり、このエピトープに結合する活性化剤は、 3、 4 及び 5 T C R とともに結合（交差反応）する。このエピトープは、本明細書においてピン 2 c 1 エピトープと呼称される。ピン 2 c 1 エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、 1 - 3 9 が挙げられる。

【 0 2 3 3 】

いくつかの事例では、ピン 2 c 1 エピトープに結合する活性化剤は、
A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

の配列を有する T C R の 1 鎖に結合するが、

A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P R S
Q P H T K P S V F V M K N G T N V A C L V K E F

の配列を有する T C R の 1 鎖には結合しない。

【 0 2 3 4 】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒト V 1 のアミノ酸 8 0 ~ 9 5 (F K K A A K S V A L T I S A L Q) またはヒト V 1 のアミノ酸 7 0 ~ 9 5 (A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A L Q) からなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン 3 1 エピトープと呼称される。ピン 3 1 エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、 1 - 0 8、及び 1 - 2 3 が挙げられる。

【 0 2 3 5 】

いくつかの事例では、ピン 3 1 エピトープに結合する活性化剤は、
A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

の配列を有する T C R の 1 鎖に結合するが、

A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L S C Q Y E T S L S W Y D I F W Y K Q L
P S G E M T F L I H Q I S S D Q N A K N G R Y S V N F Q E R H K F I S L T I S A
L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P R S
Q P H T K P S V F V M K N G T N V A C L V K E F Y P K D

の配列を有する T C R の 1 鎖には結合しない。

【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒト V 1 のアミノ酸 1 ~ 1 1 (A Q K V T Q A Q S S V) と J 1 または J 2 とからなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン 4 1 エピトープと呼称される。いくつかの事例では、ピン 4 1 エピトープに結合する活性化剤は、J 1 または J 2 に K 1 2 0 T 突然変異を含有するエピトープには結合しない。ピン 4 1 エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、 1 - 3 5、及び 1 - 2 0 3 が挙げられる。

【 0 2 3 7 】

いくつかの事例では、ピン 4 1 エピトープに結合する活性化剤は、
A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A

L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D S W D T R Q M F F G T G I K L F V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖には結合しない。

【0238】

いくつかの事例では、ピン4 1エピトープに結合する活性化剤は、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G E A P S A W G K H L T A Q L F F G K G T Q L I V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖に結合する。

10

【0239】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって(例えば特異的に)認識される
 エピトープは、ヒトV 1のアミノ酸28~47(SWWSYYIFWYKQLPS)と
 J1とからなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン5 1エ
 ピトープと呼称される。ピン5 1エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定され
 ないが、1-113、1-155、1-183、1-191、1-278、及
 び1-282が挙げられる。ピン5 1エピトープを有する TCRの 1鎖のV
 1J1領域の一例は、

20

S W W S Y Y I F W Y K Q L P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F
 K K A A K S V A L T I S A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I
 F G K G T R V T V E P

である。

【0240】

いくつかの事例では、ピン5 1エピトープに結合する活性化剤は、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、

30

A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G E A P S A W G K H L T A Q L F F G K G T Q L I V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖には結合しない。

【0241】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって(例えば特異的に)認識される
 エピトープは、ヒトV 1のアミノ酸21~28(LNCLYETS)とJ1とからなる
 エピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン6 1エピトープと呼称さ
 れる。ピン6 1エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、TS8
 .2及び1-143が挙げられる。ピン6 1エピトープを有する TCRの 1鎖
 のV 1J1領域の一例は、

40

L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S
 G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L
 Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

である。

【0242】

いくつかの事例では、ピン6 1エピトープに結合する活性化剤は、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

50

の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D S W D T R Q M F F G T G I K L F V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖には結合しない。

【0243】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識される
 エピトープは、ヒトV 1のアミノ酸47~70（SKEMIFLIRQGSDEQNA）とJ1またはJ2とからなるエピトープである。このエピトープは、本明細書において
 ビン7 1エピトープと呼称される。ビン7 1エピトープに結合する活性化剤の例とし
 ては、限定されないが、1-149、1-253、及び1-257が挙げられる。

10

ビン7 1エピトープを有する TCRの 1鎖のV 1J領域の一例は、
 S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A L
 Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P であり
 、 TCRの 1鎖のV 1J領域ビン7 1エピトープの別の例は、
 S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A L
 Q L E D S A K Y F C A L G E A P S A W G K H L T A Q L F F G K G T Q L I V E P
 である。

【0244】

いくつかの事例では、ビン7 1エピトープに結合する活性化剤は、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D S W D T R Q M F F G T G I K L F V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖には結合しない。

20

【0245】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識される
 エピトープは、ヒトV 1のアミノ酸70~80（AKSGRYSVNF）とJ1または
 J2とからなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてビン8 1エピ
 トープと呼称される。ビン8 1エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定され
 ないが、1-192が挙げられる。ビン8 1エピトープを有する TCRの 1鎖
 のV 1J領域の一例は、

30

A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V
 R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 であり、 TCRの 1鎖のV 1J領域ビン8 1エピトープの別の例は、
 A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A L Q L E D S A K Y F C A L G E A P
 S A W G K H L T A Q L F F G K G T Q L I V E P
 である。

40

【0246】

いくつかの事例では、ビン8 1エピトープに結合する活性化剤は、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D S W D T R Q M F F G T G I K L F V E P

50

の配列を有する TCRの 1鎖には結合しない。

【0247】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒトV 1のアミノ酸80～95（FKKAAKSVALTISALQ）からなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン9 1エピトープと称される。ピン9 1エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、1-201が挙げられる。

【0248】

いくつかの事例では、ピン9 1エピトープに結合する活性化剤は、
A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

10

の配列を有する TCRの 1鎖に結合するが、

A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L S C Q Y E T S L S W Y D I F W Y K Q L
P S G E M T F L I H Q I S S D Q N A K N G R Y S V N F Q E R H K F I S L T I S A
L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

の配列を有する TCRの 1鎖には結合しない

【0249】

本明細書に記載の 1特異的抗体は、 2含有 TCRよりも 1含有 TCRに
対して選択的に結合する。このため、上記 1特異的抗体は、例えば、

20

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R K
T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K I L
A P S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P

の配列及び/または当該配列を含む TCRには結合しない。

【0250】

2エピトープピン

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒトV 2のアミノ酸83～94（AKNLA VLKILAP）からなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン1 2エピトープと称される。いくつかの事例では、ピン1 2エピトープに結合する活性化剤は、V 2にK90の突然変異、例えばK90N突然変異を含有するエピトープとは結合しない。ピン1 2エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、2-17、及びB6が挙げられる。

30

【0251】

いくつかの事例では、ピン1 2エピトープに結合する活性化剤は、

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R K
T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K I L
A P S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P

の配列を有する TCRの 2鎖に結合するが、

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R K
T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D F L N N Q A V L N I L
E A S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P

40

の配列を有する TCRの 2鎖には結合しない。

【0252】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒトV 2のアミノ酸28～38（E A I G N Y Y）からなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン2 2エピトープと称される。いくつかの事例では、ピン2 2エピトープに結合する活性化剤は、V 2にG35突然変異、例えばG35S突然変異を含有するエピトープには結合しない。ピン2 2エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、15Dが挙げられる。

50

【0253】

いくつかの事例では、ピン2 2エピトープに結合する活性化剤は、
 A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R K
 T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K . D N F Q G D I D I A K N L A V L K I
 L A P S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 2鎖に結合するが、
 A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G D S I S N Y Y T F W Y R R
 T P G N T M T L I Y R E G G T Y G P G F E D N L Q G E I D F L N N Q A V L N I L
 E A S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 2鎖には結合しない。

10

【0254】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒトV 2のアミノ酸72～83（KDNFQGDIDIA）からなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン3 2エピトープと呼称される。ピン3 2エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、2-32が挙げられる。

【0255】

いくつかの事例では、ピン3 2エピトープに結合する活性化剤は、
 A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R K
 T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K . D N F Q G D I D I A K N L A V L K I
 L A P S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 2鎖に結合するが、
 A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R K
 T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F E D N L Q G E I D F L N N Q A V L N I L
 E A S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 2鎖には結合しない。

20

【0256】

いくつかの実施形態では、関心対象の活性化剤によって（例えば特異的に）認識されるエピトープは、ヒトV 2のアミノ酸1～27（AIELVPEHQTPVPSIGVPA TLRCSMKG）からなるエピトープである。このエピトープは、本明細書においてピン4 2エピトープと呼称される。ピン4 2エピトープに結合する活性化剤の例としては、限定されないが、2-14、2-22、2-30、2-31、2-36、及び2-37が挙げられる。

30

【0257】

いくつかの事例では、ピン4 2エピトープに結合する活性化剤は、
 A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R K
 T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K . D N F Q G D I D I A K N L A V L K I
 L A P S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 2鎖に結合するが、
 A V T L V P Q N Q A R S V S V G E S V T L R C S M K G D S I S N Y Y T F W Y R R
 T P G N T M T L I Y R E G G T Y G P G F E D N L Q G E I D F L N N Q A V L N I L
 E A S E R D E G S Y Y C A C D P L G G P P D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列を有する TCRの 2鎖には結合しない。

40

【0258】

本明細書に記載の 2特異的抗体は、1含有 TCRよりも 2含有 TCRに対して選択的に結合する。このため、上記 2特異的抗体は、例えば、
 A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q L
 P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S A
 L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 の配列及び/または当該配列を含む TCRには結合しない。

50

【0259】

総じて、本明細書に記載の 1 - 及び 2 - 特異的抗体は、 T C Rに関連する配座エピトープを認識する。いくつかの事例では、本明細書に記載の 1 - 及び 2 - 特異的抗体は、それぞれ 1 - または 2 - T C R の 1 つ以上の対に対して特異的である。例えば、いくつかの事例では、本明細書に記載の 1 特異的抗体は、 8 1 T C R に対して特異的である。いくつかの事例では、本明細書に記載の 1 特異的抗体は、 8 1 T C R に結合するが、 9 1 T C R には結合しない。

【0260】

処置方法

非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び / またはその混合物を含有する、本明細書に記載の医薬組成物は、予防及び / または治療処置のために投与され得る。治療用途では、疾患または症状を既に患っている対象に、疾患または症状の症候を治癒させるかまたは少なくとも部分的に阻止するのに十分な量の組成物を投与することができる。症状の発症、罹患または悪化の可能性を低くするために非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び / またはその混合物を投与することもできる。治療に使用する非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び / またはその混合物の有効量は、疾患または症状の重症度及び経過、以前の療法、対象の健康状態、体重及び / または薬物への応答、及び / または処置する医師の判断に基づいて様々であり得る。

10

【0261】

本開示の非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び / またはその混合物は、症状の処置を必要とする対象を処置するために使用されることができる。症状の例としては、がん、感染症、自己免疫障害及び敗血症が挙げられる。対象は、ヒト、非ヒト霊長類、例えばチンパンジー及びその他の類人猿ならびにサル種；畜産動物、例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ；飼育動物、例えば、ウサギ、イヌ及びネコ；実験動物、例えば齧歯動物、例えば、ラット、マウス及びモルモットなどであり得る。対象は任意の年齢であり得る。対象は、例えば、高齢成体、成体、青年、少年、小児、幼年、乳児であり得る。

20

【0262】

本発明の濃縮 T 細胞集団によって対象の症状（例えば病気）を処置する方法は、対象に非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び / またはその混合物を治療的有効量投与することを含み得る。本開示の濃縮 T 細胞集団及び / またはその混合物は、様々な投薬計画（例えば、タイミング、濃度、投薬量、処置間隔、及び / または剤形）で投与され得る。本開示の濃縮 T 細胞集団及び / またはその混合物を受ける前の対象を例えば化学療法、放射線またはその両方の併用によって前処置することもできる。処置の一部として非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び / またはその混合物を第 1 投薬計画において対象に投与してもよく、第 1 投薬計画において処置が治療有効性の所与のレベルを満たしているか否かを判定すべく対象を追跡評価してもよい。いくつかの事例では、操作型 T 細胞または別の操作型 T 細胞を第 2 投薬計画において対象に投与してもよい。図 2 は、対象を処置する方法を模式的に示す。第 1 操作 2 0 1 では、所与の症状（例えば、がん）を有するかまたはその疑いのある対象に少なくとも 1 つの操作型 T 細胞を投与する。第 1 投薬計画において操作型 T 細胞を投与してもよい。第 2 操作 2 0 2 では、対象は例えば医療提供者（例えば、処置する医師または看護師）によって追跡評価され得る。ある例においては、対象は、対象の症状の処置における操作型 T 細胞の有効性を決定または測定するために追跡評価される。ある状況では、対象における T 細胞集団の生体内増殖を判定するために対象を追跡評価してもよい。次に、第 3 操作 2 0 3 では、少なくとも 1 つの他の操作型 T 細胞を第 2 投薬計画において対象に投与する。第 2 投薬計画は、第 1 投薬計画と同じであってもよいし、または第 1 投薬計画とは異なってもよい。ある状況においては、例えば第 1 操作 2 0 1 における操作型 T 細胞の投与が効果的である（例えば、症状を処置するのに 1 回目の投与で十分であり得る）と判明している場合には、第 3 操作 2 0 3 を実施しない。同種異

30

40

50

系で普遍的なドナー特性ゆえに、操作型 T細胞の集団は、種々のMHCハプロタイプを有する様々な対象に投与され得る。操作型 T細胞は、対象に投与される前に冷凍または凍結保存され得る。

【0263】

T細胞（すなわち操作型または非操作型）の濃縮集団及び/またはその混合物は、対象に投与される前に冷凍または凍結保存されてもよい。特定の実施形態では、操作型濃縮 T細胞の集団は、同一の腫瘍認識部分、異なる腫瘍認識部分、または同一の腫瘍認識部分と異なる腫瘍認識部分との組み合わせを発現する2つ以上の細胞を含み得る。例えば、操作型濃縮 T細胞の集団は、異なる抗原、または同じ抗原の異なるエピトープを認識するように設計されたいくつかの別個の操作型 T細胞を含み得る。例えば、メラノーマに罹患しているヒト細胞は、NY-ESO-1がん遺伝子を発現し得る。ヒトの中の感染細胞は、NY-ESO-1腫瘍性タンパク質をより小さい断片にプロセッシングすることができ、NY-ESO-1タンパク質の様々な部分を抗原認識のために提示することができる。操作型濃縮 T細胞の集団は、NY-ESO-1タンパク質の異なる部分を認識するように設計された異なる腫瘍認識部分を発現する様々な操作型 T細胞を含むことができる。図3は、メラノーマ抗原NY-ESO-1の異なるエピトープを認識する操作型 T細胞の集団によって対象を処置する方法を模式的に示す。第1操作301では、同じ抗原の異なるエピトープを認識する操作型 T細胞の集団を選択する。例えば、操作型 T細胞の集団は、NY-ESO-1タンパク質の異なる部分を認識する異なる腫瘍認識部分を発現している2つ以上の細胞を含み得る。第2操作302では、操作型 T細胞の集団が第1投薬計画において投与され得る。第2操作303では、対象は例えば医療提供者（例えば、処置する医師または看護師）によって追跡評価され得る。

10

20

【0264】

本開示の濃縮 T細胞集団、すなわち非操作型または操作型の当該集団、及び/またはその混合物は、様々な症状を処置するために使用され得る。いくつかの事例では、本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、固形腫瘍及び血液悪性腫瘍を含めたがんを処置するために使用され得る。がんの非限定的な例としては、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌腫、AIDS関連癌、AIDS関連リンパ腫、肛門癌、虫垂癌、星細胞腫、神経芽腫、基底細胞癌腫、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳腫瘍、例えば、小脳星細胞腫、大脳星細胞腫/悪性神経膠腫、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、視路視床下部神経膠腫、乳癌、気管支腺腫、パーキットリンパ腫、原発不明の癌腫、中枢神経リンパ腫、小脳星細胞腫、子宮頸癌、小児癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮内膜癌、上衣腫、食道癌、ユーイング肉腫、胚細胞腫瘍、胆嚢癌、胃癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍、神経膠腫、有毛細胞白血病、頭頸部癌、心臓癌、肝細胞（肝臓）癌、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、眼内メラノーマ、睪島細胞癌腫、カポジ肉腫、腎臓癌、喉頭癌、口唇及び口腔癌、脂肪肉腫、肝臓癌、肺癌、例えば非小細胞及び小細胞肺癌、リンパ腫、白血病、マクログロブリン血症、骨の悪性線維性組織球腫/骨肉腫、髄芽腫、メラノーマ、中皮腫、原発不明の転移性扁平頸部癌、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、骨髄異形成症候群、骨髄性白血病、鼻腔及び副鼻腔癌、鼻咽頭癌腫、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、口腔癌、中咽頭癌、骨肉腫/骨の悪性線維組織球腫、卵巣癌、上皮性卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、睪臓癌、睪島細胞癌、副鼻腔及び鼻腔癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、クロム親和性細胞腫、松果体星細胞腫、松果体胚腫、下垂体腺腫、胸膜肺芽腫、形質細胞性新生物、中枢神経原発リンパ腫、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌腫、腎盂及び尿管移行上皮癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、皮膚メルケル細胞癌腫、小腸癌、軟部組織肉腫、扁平上皮癌腫、胃癌、T細胞リンパ腫、咽喉癌、胸腺腫、胸腺癌腫、甲状腺癌、栄養膜腫瘍（妊娠性）、原発部位不明のがん、尿道癌、子宮肉腫、膣癌、外陰癌、ワルデンストレームマクログロブリン血症、ならびにウィルムス腫瘍が挙げられる。

30

40

【0265】

50

いくつかの事例では、本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、感染症を処置するために使用され得る。感染症は、例えば、病原性細菌またはウイルスによって引き起こされ得る。様々な病原性タンパク質、核酸、脂質またはその断片が疾患細胞で発現し得る。抗原提示細胞は、そのような病原性分子を例えば食作用または受容体媒介性エンドサイトーシスによって内在化させることができ、適切なMHC分子に結合した抗原断片を提示することができる。例えば、病原性タンパク質の様々な9mer断片がAPCによって提示され得る。本開示の操作型濃縮 T細胞は、病原性細菌またはウイルスの様々な抗原及び抗原断片を認識し得る。病原性細菌の非限定的な例は、a) *Bordetella*属、例えば*Bordetella pertussis*種；b) *Borrelia*属、例えば*Borrelia burgdorferi*種；c) *Brucella*属、例えば*Brucella abortus*、*Brucella canis*、*Brucella melitensis*、及び/または*Brucella suis*種；d) *Campylobacter*属、例えば*Campylobacter jejuni*種；e) *Chlamydia*及び*Chlamydophila*属、例えば*Chlamydia pneumonia*、*Chlamydia trachomatis*、及び/または*Chlamydophila psittaci*種；f) *Clostridium*属、例えば*Clostridium botulinum*、*Clostridium difficile*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium tetani*種；g) *Corynebacterium*属、例えば*Corynebacterium diphtheriae*種；h) *Enterococcus*属、例えば*Enterococcus faecalis*、及び/または*Enterococcus faecium*種；i) *Escherichia*属、例えば*Escherichia coli*種；j) *Francisella*属、例えば*Francisella tularensis*種；k) *Haemophilus*属、例えば*Haemophilus influenzae*種など；l) *Helicobacter*属、例えば*Helicobacter pylori*種；m) *Legionella*属、例えば*Legionella pneumophila*種；n) *Leptospira*属、例えば*Leptospira interrogans*種；o) *Listeria*属、例えば*Listeria monocytogenes*種；p) *Mycobacterium*属、例えば*Mycobacterium leprae*、*mycobacterium tuberculosis*、及び/または*mycobacterium ulcerans*種；q) *Mycoplasma*属、例えば*Mycoplasma pneumoniae*種；r) *Neisseria*属、例えば*Neisseria gonorrhoeae*及び/または*Neisseria meningitidis*種；s) *Pseudomonas*属、例えば*Pseudomonas aeruginosa*種；t) *Rickettsia*属、例えば*Rickettsia rickettsii*種；u) *Salmonella*属、例えば*Salmonella typhi*及び/または*Salmonella typhimurium*種；v) *Shigella*属、例えば*Shigella sonnei*種；w) *Staphylococcus*属、例えば*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、及び/または*Staphylococcus saprophyticus*種；x) *Streptococcus*属、例えば*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus pneumoniae*、及び/または*Streptococcus pyogenes*種；y) *Treponema*属、例えば*Treponema pallidum*種；z) *Vibrio*属、例えば*Vibrio cholerae*；及び/またはaa) *Yersinia*属、例えば*Yersinia pestis*種に見出すことができる。

【0266】

いくつかの事例では、本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団、及び/またはその混合物は感染症を処置するために使用され得、感染症はウイルスによって引き起こされるものであり得る。ウイルスの非限定的な例は、以下のウイルスの科

10

20

30

40

50

に見出すことができ、典型的な種と共に示す：a) *Adenoviridae* 科、例えばアデノウイルス種；b) *Herpesviridae* 科、例えば、単純ヘルペス1型、単純ヘルペス2型、水痘帯状疱疹ウイルス、エプスタイン・パールウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス8型種；c) *Papillomaviridae* 科、例えばヒトパピローマウイルス種；d) *Polyomaviridae* 科、例えば、BKウイルス、JCウイルス種；e) *Poxviridae* 科、例えば天然痘種；f) *Hepadnaviridae* 科、例えばB型肝炎ウイルス種；g) *Parvoviridae* 科、例えば、ヒトボカウイルス、パルボウイルスB19種；h) *Astroviridae* 科、例えば、ヒトアストロウイルス種；i) *Caliciviridae* 科、例えばノーウォークウイルス種；j) *Flaviviridae* 科、例えば、C型肝炎ウイルス (HCV)、黄熱ウイルス、デングウイルス、西ナイルウイルス種；k) *Togaviridae* 科、例えば風疹ウイルス種；l) *Hepeviridae* 科、例えばE型肝炎ウイルス種；m) *Retroviridae* 科、例えばヒト免疫不全ウイルス (HIV) 種；n) *Orthomyxoviridae* 科、例えばインフルエンザウイルス種；o) *Arnaviridae* 科、例えば、グアナリトウイルス、フニンウイルス、ラッサウイルス、マチュポウイルス、及び/またはサビアウイルス種；p) *Bunyaviridae* 科、例えばクリミア・コンゴ出血熱ウイルス種；q) *Filoviridae* 科、例えばエボラウイルス及び/またはマールブルグウイルス種；*Paramyxoviridae* 科、例えば、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヘンドラウイルス及び/またはニパウイルス種；r) *Rhabdoviridae* 属、例えば狂犬病ウイルス種；s) *Reoviridae* 科、例えばロタウイルス、オルビウイルス、コルチウイルス及び/またはパンナウイルス種。いくつかの例では、ウイルスは、D型肝炎など、ウイルス科に割り当てられないものである。

10

20

【0267】

いくつかの事例では、本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、免疫疾患、例えば自己免疫疾患を処置するために使用され得る。自己免疫疾患を含めた炎症性疾患は、B細胞障害に関連する疾患の部類でもある。自己免疫症状を含めた免疫疾患または症状の例としては、関節リウマチ、リウマチ熱、多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎、乾癬、ぶどう膜炎、真性糖尿病、全身性紅斑性狼瘡 (SLE)、狼瘡腎炎、湿疹、強皮症、多発性筋炎/強皮症、多発性筋炎/皮膚筋炎、潰瘍性直腸炎 (ulcerative proctitis)、重症複合免疫不全症 (SCID)、ディ・ジョージ症候群、毛細血管拡張性運動失調症、季節性アレルギー、通年性アレルギー、食物アレルギー、アナフィラキシー、肥満細胞症、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、脾機能亢進症、白血球接着不全症、X連鎖リンパ増殖性疾患、X連鎖無ガンマグロブリン血症、選択的免疫グロブリンA欠損症、高IgM症候群、HIV、自己免疫性リンパ増殖症候群、ウイスコット・アルドリッチ症候群、慢性肉芽腫症、分類不能型免疫不全症 (CVID)、高免疫グロブリンE症候群、橋本甲状腺炎、急性特発性血小板減少性紫斑病、慢性特発性血小板減少性紫斑病、皮膚筋炎、シデナム舞蹈病、重症筋無力症、多腺性症候群、水疱性類天疱瘡、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、連鎖球菌感染後腎炎、結節性紅斑、多形性紅斑、gA腎症、高安動脈炎、アジソン病、サルコイドーシス、潰瘍性大腸炎、結節性多発性動脈炎、強直性脊椎炎、グッドパスチャー症候群、閉塞性血栓性血管炎 (thromboangiitis obliterans)、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、橋本甲状腺炎、甲状腺中毒症、慢性活動性肝炎、多発性軟骨炎、尋常性天疱瘡 (pamphigus vulgaris)、ウェゲナー肉芽腫症、膜性腎症、筋萎縮性側索硬化症、脊髄癆、巨細胞性動脈炎/多発筋痛症、悪性貧血 (pernicious anemia)、急速進行性糸球体腎炎、乾癬、線維化肺炎、及びがんが挙げられる。

30

40

【0268】

本開示の T細胞集団及び/またはその混合物による処置は、症状の臨床的発症の前

50

、間及び後に対象に提供され得る。処置は、疾患の臨床的発症から1日後、1週間、6ヶ月後、12ヶ月後または2年後に対象に提供され得る。処置は、疾患の臨床的発症の後、1日間、1週間、1ヶ月間、6ヶ月間、12ヶ月間、2年間、3年間、4年間、5年間、6年間、7年間、8年間、9年間、10年間またはそれ以上にわたって対象に提供され得る。処置は、疾患の臨床的発症の後、1日未満、1週間未満、1ヶ月未満、6ヶ月未満、12ヶ月未満または2年未満にわたって対象に提供され得る。処置は治験でヒトを処置することも含み得る。処置は、本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物を対象に投与することを含むことができる。

【0269】

いくつかの事例では、本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の対象への投与は、対象の体内での内在性リンパ球の活性を調節する。いくつかの事例では、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の対象への投与は、内在性T細胞に抗原を提供し、免疫応答を増強し得る。いくつかの事例では、メモリーT細胞はCD4⁺T細胞である。いくつかの事例では、メモリーT細胞はCD8⁺T細胞である。いくつかの事例では、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の対象への投与は、別の免疫細胞の細胞傷害性を活性化させる。いくつかの事例では、他の免疫細胞は、CD8⁺T細胞である。いくつかの事例では、他の免疫細胞は、ナチュラルキラーT細胞である。いくつかの事例では、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の対象への投与は、調節性T細胞を抑制する。いくつかの事例では、調節性T細胞は、Fox3⁺Treg細胞である。いくつかの事例では、調節性T細胞は、Fox3⁻Treg細胞である。本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物によって活性を調節されることができる細胞の非限定的な例としては、造血幹細胞、B細胞、CD4、CD8、赤血球、白血球(white blood cells)、樹状細胞、例えば樹状抗原提示細胞、白血球(leukocytes)、マクロファージ、メモリーB細胞、メモリーT細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、好中性顆粒球、Tヘルパー細胞、及びTキラー細胞が挙げられる。

【0270】

大抵の骨髄移植の間、対象の免疫系による移植体中の造血幹細胞(HSC)の拒絶反応を防止するためにシクロホスファミドと全身照射との組合せが慣例的に採用される。いくつかの事例では、生体外でのドナー骨髄とインターロイキン-2(IL-2)とのインキュベーションを実施して骨髄でのキラーリンパ球の産生を強化する。インターロイキン-2(IL-2)は、野生型リンパ球の成長、増殖及び分化に必要とされるサイトカインである。ヒトに T細胞を養子移入する現在の研究は、 T細胞とインターロイキン-2との共投与を要求し得る。しかしながら、低投薬量及び高投薬量のIL-2はどちらも有毒な副作用を有し得る。IL-2毒性は、多数の臓器/系、最も顕著には心臓、肺、腎臓及び中枢神経系において顕在化し得る。いくつかの事例では、本開示は、サイトカイン、例えば、IL-2、IL-15、IL-12またはIL-21の共投与を伴わずに非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物を対象に投与する方法を提供する。いくつかの事例では、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、IL-2の共投与を伴わずに対象へ投与されることができる。いくつかの事例では、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、骨髄移植などの手順の間に、IL-2の共投与を伴わずに対象へ投与される。

【0271】

投与方法

本発明の1つまたは多数の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、任意の順序で、または同時に対象へ投与されることができる。同時の場合、本発明の多数の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物を、静脈注射などの単回分の1まとまりの形態で、または多回分形

10

20

30

40

50

態で、例えば、多回分の静脈内点滴、皮下注射もしくは錠剤として、提供することができる。本発明の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、単一のパッケージまたは複数のパッケージに一緒または別々に包装することができる。本発明の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物のうちの1つまたは全てを多回用量で与えることができる。同時でない場合、多回用量間のタイミングは、約1週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月または約1年もの長さまで様々であり得る。いくつかの事例では、本発明の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、対象への投与の後に対象の体内で生体内増殖することができる。非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、冷凍されて、同じ細胞製剤による多回処置のための細胞を提供することができる。本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物、ならびにそれを含む医薬組成物は、キットとして包装されることができる。キットは、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物ならびにそれを含む医薬組成物の使用に関する取扱説明(例えば、取扱説明書)を含み得る。

10

【0272】

いくつかの事例では、がんを処置する方法は、治療的有効量の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物を対象に投与することを含み、当該投与によってがんが処置される。いくつかの実施形態では、治療的有効量の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、少なくとも約10秒間、30秒間、1分間、10分間、30分間、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、24時間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間、3週間、1ヶ月間、2ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間または1年間にわたって投与される。いくつかの実施形態では、治療的有効量の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、少なくとも1週間にわたって投与される。いくつかの実施形態では、治療的有効量の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、少なくとも2週間にわたって投与される。

20

【0273】

本明細書に記載の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、疾患または症状の発生の前、間または後に投与されることができ、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物を含有する医薬組成物を投与するタイミングは様々であり得る。例えば、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、予防薬として使用されることができ、疾患または症状の発生の可能性を低くするために症状または疾患の傾向を有する対象に継続的に投与されることができる。非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、症候の発症の間、またはその後できるだけ早く、対象へ投与され得る。非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の投与は、症候発症時まで、症候発症後の最初の3時間以内、症候発症後の最初の6時間以内、症候発症後の最初の24時間以内、症候発症から48時間以内、または症候発症から任意の時間までに、早急に開始され得る。初回投与は、任意の実用的経路によって、例えば本明細書に記載の任意の剤形を使用して本明細書に記載の任意の経路によって行うことができる。いくつかの事例では、本開示の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の投与は、静脈内投与である。非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の1回分または多回分の投薬量は、がん、感染症、免疫疾患、敗血症の発症後に実施可能になり次第、または骨髄移植と共に、かつ免疫疾患の処置に必要な長さの時間にわたって、例えば、約24時間~約48時間、約48時間~約1週間、約1週間~約2週間、約2週間~約1ヶ月間、約1ヶ月間~約3ヶ月間にわたって、投与され得る。がんの処置のためには、非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の1回分

30

40

50

または多回分の投薬量を、がんの発症から数年後であって他の処置の前または後に投与することができる。いくつかの例では、非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び/またはその混合物を少なくとも約 10 分間、30 分間、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、12 時間、24 時間、少なくとも 48 時間、少なくとも 72 時間、少なくとも 96 時間、少なくとも 1 週間、少なくとも 2 週間、少なくとも 3 週間、少なくとも 4 週間、少なくとも 1 ヶ月間、少なくとも 2 ヶ月間、少なくとも 3 ヶ月間、少なくとも 4 ヶ月間、少なくとも 5 ヶ月間、少なくとも 6 ヶ月間、少なくとも 7 ヶ月間、少なくとも 8 ヶ月間、少なくとも 9 ヶ月間、少なくとも 10 ヶ月間、少なくとも 11 ヶ月間、少なくとも 12 ヶ月間、少なくとも 1 年間、少なくとも 2 年間、少なくとも 3 年間、少なくとも 4 年間、または少なくとも 5 年間にわたって投与することができる。処置の長さは対象ごとに異なり得る。

10

【0274】

投薬量

本明細書において開示される非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び/またはその混合物は、正確な投薬量の単回投与に適した単位剤形として製剤化され得る。いくつかの事例では、単位剤形はさらなるリンパ球を含む。単位剤形では製剤が、1 つ以上の化合物を適切な量で含有する単位用量に分割されている。単位投薬量は、製剤の個々の量を含有するパッケージの形態とすることができる。非限定的な例は、包装された錠剤またはカプセル、及びバイアルまたはアンプルに入った粉末である。水性懸濁液組成物は単回用量の再封不可能容器に入れることができる。多回用量の再封可能容器を、例えば保存料と組み合わせて、または保存料なしで使用することができる。いくつかの例では、医薬組成物は保存料を含まない。非経口注射用製剤は、単位剤形、例えばアンプルで、または保存料と共に多回用量容器で提供することができる。

20

【0275】

本明細書に記載の非操作型濃縮 T 細胞集団、操作型濃縮 T 細胞集団及び/またはその混合物は、少なくとも 5 細胞、少なくとも 10 細胞、少なくとも 20 細胞、少なくとも 30 細胞、少なくとも 40 細胞、少なくとも 50 細胞、少なくとも 60 細胞、少なくとも 70 細胞、少なくとも 80 細胞、少なくとも 90 細胞、少なくとも 100 細胞、少なくとも 200 細胞、少なくとも 300 細胞、少なくとも 400 細胞、少なくとも 500 細胞、少なくとも 600 細胞、少なくとも 700 細胞、少なくとも 800 細胞、少なくとも 900 細胞、少なくとも 1×10^3 細胞、少なくとも 2×10^3 細胞、少なくとも 3×10^3 細胞、少なくとも 4×10^3 細胞、少なくとも 5×10^3 細胞、少なくとも 6×10^3 細胞、少なくとも 7×10^3 細胞、少なくとも 8×10^3 細胞、少なくとも 9×10^3 細胞、少なくとも 1×10^4 細胞、少なくとも 2×10^4 細胞、少なくとも 3×10^4 細胞、少なくとも 4×10^4 細胞、少なくとも 5×10^4 細胞、少なくとも 6×10^4 細胞、少なくとも 7×10^4 細胞、少なくとも 8×10^4 細胞、少なくとも 9×10^4 細胞、少なくとも 1×10^5 細胞、少なくとも 2×10^5 細胞、少なくとも 3×10^5 細胞、少なくとも 4×10^5 細胞、少なくとも 5×10^5 細胞、少なくとも 6×10^5 細胞、少なくとも 7×10^5 細胞、少なくとも 8×10^5 細胞、少なくとも 9×10^5 細胞、少なくとも 1×10^6 細胞、少なくとも 2×10^6 細胞、少なくとも 3×10^6 細胞、少なくとも 4×10^6 細胞、少なくとも 5×10^6 細胞、少なくとも 6×10^6 細胞、少なくとも 7×10^6 細胞、少なくとも 8×10^6 細胞、少なくとも 9×10^6 細胞、少なくとも 1×10^7 細胞、少なくとも 2×10^7 細胞、少なくとも 3×10^7 細胞、少なくとも 4×10^7 細胞、少なくとも 5×10^7 細胞、少なくとも 6×10^7 細胞、少なくとも 7×10^7 細胞、少なくとも 8×10^7 細胞、少なくとも 9×10^7 細胞、少なくとも 1×10^8 細胞、少なくとも 2×10^8 細胞、少なくとも 3×10^8 細胞、少なくとも 4×10^8 細胞、少なくとも 5×10^8 細胞、少なくとも 6×10^8 細胞、少なくとも 7×10^8 細胞、少なくとも 8×10^8 細胞、少なくとも 9×10^8 細胞、少なくとも 1×10^9 細胞またはそれより多い量で組成物中に存在し得る。

30

40

【0276】

50

胞～約 1×10^9 細胞であり得る。

【0278】

いくつかの事例では、本発明の非操作型濃縮 T細胞集団、操作型濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物の治療的有效用量は、約 1×10^6 細胞～約 2×10^6 細胞、約 1×10^6 細胞～約 3×10^6 細胞、約 1×10^6 細胞～約 4×10^6 細胞、約 1×10^6 細胞～約 5×10^6 細胞、約 1×10^6 細胞～約 6×10^6 細胞、約 1×10^6 細胞～約 7×10^6 細胞、約 1×10^6 細胞～約 8×10^6 細胞、約 1×10^6 細胞～約 9×10^6 細胞、約 1×10^6 細胞～約 1×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 2×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 3×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 4×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 5×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 6×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 7×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 8×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 9×10^7 細胞、約 1×10^6 細胞～約 1×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 2×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 3×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 4×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 5×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 6×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 7×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 8×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 9×10^8 細胞、約 1×10^6 細胞～約 1×10^9 細胞、約 1×10^6 細胞～約 2×10^9 細胞、約 1×10^6 細胞～約 3×10^9 細胞、約 1×10^6 細胞～約 4×10^9 細胞、約 1×10^6 細胞～約 5×10^9 細胞、約 1×10^6 細胞～約 6×10^9 細胞、約 1×10^6 細胞～約 7×10^9 細胞、約 1×10^6 細胞～約 8×10^9 細胞、約 1×10^6 細胞～約 9×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 1×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 2×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 3×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 4×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 5×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 6×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 7×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 8×10^9 細胞、約 1×10^7 細胞～約 9×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 1×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 2×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 3×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 4×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 5×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 6×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 7×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 8×10^9 細胞、約 1×10^8 細胞～約 9×10^9 細胞、または約 1×10^9 細胞～約 1×10^{10} 細胞であり得る。

【0279】

保存

いくつかの実施形態では、濃縮 T細胞集団及び/またはその混合物は、冷凍用培地で製剤化されて、少なくとも約1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、1年、2年、3年または少なくとも5年の長期保管のために液体窒素冷凍庫（-195）または超低温冷凍庫（-65、-80または、-120）などの凍結保管ユニット内に置かれ得る。冷凍用培地は、ジメチルスルホキシド（DMSO）及び/または塩化ナトリウム（NaCl）及び/またはデキストロース及び/またはデキストランサルフェート及び/またはヒドロキシエチルデンプン（hydroxyethyl starch）（HES）を生理学的pH緩衝剤と共に含有してpHを約6.0～約6.5、約6.5～約7.0、約7.0～約7.5、約7.5～約8.0または約6.5～約7.5に維持することができる。凍結保存された T細胞は、解凍されて、本明細書に記載の抗体、タンパク質、ペプチド及び/またはサイトカインによる刺激によってさらに処理されることができる。凍結保存された T細胞は、解凍されて、本明細書に記載のウイルスベクター（レトロウイルス及びレンチウイルスベクターを含む）または非ウイルス的手段（RNA、DNA及びタンパク質を含む）によって遺伝子改変されることができる。あるいは、非操作型 T細胞を本明細書に記載の方法によって増殖させて、遺伝子改変して、凍結保存することができる。

【0280】

このようにして、遺伝子操作型及び/または非操作型 T細胞をさらに凍結保存して、凍結溶媒地中1mLあたり少なくとも約 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 または少なくとも約 10^{10} 細胞の、少なくとも1、5、10

10

20

30

40

50

、100、150、200、500バイアルの量の細胞バンクを生成することができる。凍結保存された細胞バンクは、その機能性を保持し得、解凍されてさらに刺激され増殖することができる。いくつかの態様では、解凍された細胞を細胞培養バッグ及び/またはバイオリアクターなどの適切な閉鎖容器内で刺激して増殖させて、多量の細胞を同種異系細胞製品として作り出すことができる。凍結保存された T 細胞は、凍結保管条件下でその生物学的機能を少なくとも約6ヶ月間、7ヶ月間、8ヶ月間、9ヶ月間、10ヶ月間、11ヶ月間、12ヶ月間、13ヶ月間、15ヶ月間、18ヶ月間、20ヶ月間、24ヶ月間、30ヶ月間、36ヶ月間、40ヶ月間、50ヶ月間または少なくとも約60ヶ月間にわたって維持することができる。いくつかの態様では、製剤に保存料を使用しない。凍結保存された T 細胞は、解凍されて、同種異系の在庫細胞製品として多数の患者に点滴

10

【0281】

本明細書中で言及する全ての刊行物及び特許は、参照によりそれらの全体が、例えば本明細書に記載の本発明に関連して用いられる可能性のある当該刊行物に記載の構築物及び方法論を記述及び開示することを目的として本明細書に援用される。本明細書において述べられている刊行物は、単に本願の出願日の前でのその開示のために提供されているに過ぎない。本明細書中のいかなるものも、本明細書に記載の本発明者らが先行発明またはその他任意の理由のためにそのような開示に先行する権利を有さないということの承認として解釈されるべきではない。

【0282】

本発明を以下の非限定的な実施例によってより詳しく説明する。

20

【実施例】

【0283】

実施例1. 初代細胞の単離、消化及び培養

アフエレシス機械を使用して健常ドナーから初代ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を採集する。Ficoll-Plus (商標) PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) システムまたは同様のシステムを使用してPBMCを精製する。その後、細胞を適切な成長培地中に再懸濁させる。

【0284】

あるいは、末梢血、臍帯血、骨髄、正常組織、または疾患に罹患した組織、例えば、がん組織から末梢血初代ヒト細胞を採集する。

30

【0285】

健常ドナーからの組織

健常ドナーからの新鮮な組織を、The Cooperative Human Tissue Network (CHTN) から受け取り、RPMI-1640培地中で研究所へ搬送する。外科用メスで組織を1~3mm³の切片に薄切する。24ウェルプレート(Costar)において、GlutaMAX、25mMのHEPES pH7.2、100U/mlのペニシリン、100U/mlのストレプトマイシン及び10%のヒトAB血清及び100IU/mlのrhIL-2が補充された2mLのRPMI-1640中に2~5切片/ウェルを入れるかまたは下記のとおり消化する。プレートを加湿インキュベータ内で37℃及び空気中5%のCO₂でインキュベートする。リンパ球の増殖を追跡するために培養物を1日おきに検査する。培養開始後7日ごとに全てのウェルにおいて培地の半分を入れ替える。密に敷き詰められたリンパ球が切片の周囲を覆っているとき、または下記のとおり消化組織に由来するリンパ球集団が適度な濃度に達したときに、リンパ球を採集する。

40

【0286】

組織の酵素的消化

健常ドナーからの新鮮な組織試料を、The Cooperative Human Tissue Network (CHTN) から受け取り、RPMI-1640培地中で研

50

研究所へ搬送した。2酵素ブレンドであるLiberase(商標)DL研究用(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO)またはLiberase(商標)TM研究用(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO)、またはgentleMACS解離装置を備えたMiltenyi腫瘍解離キット(130-095-929)を使用して酵素的消化によってリンパ球を単離した。

【0287】

組織を2~3mm³の切片に切断し、37℃及び5%CO₂で1時間消化した。消化された細胞懸濁液を40ミクロンフィルターに通し、遠心沈降させ、RPMI-1640培地で洗浄した。細胞を計数し、10%のヒトAB血清(Corning)及び100IU/mlのrhIL-2が補充されたRPMI培地(GIBCO BRL)中に再懸濁させた。採集した細胞集団を0.5~1×10⁶細胞/mlで24ウェル組織培養プレートに播種した。細胞が1.5×10⁶細胞/mlの濃度を越えたときに細胞を分割してRPMI-IL2含有培地に入れた。

10

【0288】

腫瘍検体の培養

結腸、乳房、卵巣、腎臓、頭頸部、口腔、膵臓及び肝臓のものを含めた原発性及び転移性のがんを有する患者からの新鮮な腫瘍検体を、The Cooperative Human Tissue Network(CHTN)から受け取り、RPMI培地中で研究所へ搬送した。外科用メスで腫瘍検体を1~3mm³の切片に薄切した。24ウェルプレート(Costar)において、GlutaMAX、25mMのHEPES pH7.2、100U/mlのペニシリン、100U/mlのストレプトマイシン及び10%のヒトAB血清及び100IU/mlのrhIL-2が補充された2mLのRPMI-1640中に2~5切片/ウェルを入れた。プレートを加湿インキュベータ内で37℃及び空気中5%のCO₂でインキュベートした。リンパ球の増殖を追跡するために培養物を1日おきに検査した。培養開始後7日ごとに全てのウェルにおいて培地の半分を入れ替えた。密に敷き詰められたリンパ球が切片の周囲を覆っているときにリンパ球を採集した。

20

【0289】

新鮮な腫瘍検体の酵素的消化

結腸、乳房、卵巣、腎臓、頭頸部、口腔、膵臓及び肝臓のものを含めた原発性及び転移性のがんを有する患者からの新鮮な腫瘍検体を、The Cooperative Human Tissue Network(CHTN)から受け取り、RPMI培地中で研究所へ搬送した。酵素ブレンドであるLiberase(商標)DL研究用(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO)、Liberase(商標)TM研究用(Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO)、またはgentleMACS解離装置を備えたMiltenyi腫瘍解離キット(130-095-929)を使用して酵素的消化によってリンパ球を単離した。組織を2~3mm³の切片に切断し、37℃及び空気中5%のCO₂で1時間消化した。消化された細胞懸濁液を40ミクロンフィルターに通し、遠心沈降させ、RPMI-1640培地で洗浄した。細胞を計数し、10%のヒトAB血清(Corning)及び100IU/mlのrhIL-2が補充されたRPMI培地(GIBCO BRL)中に再懸濁させた。採集した細胞集団を0.5~1×10⁶細胞/mlで24ウェル組織培養プレートに播種した。細胞が1.5×10⁶細胞/mlの濃度を越えたときに細胞を分割してRPMI-IL2含有培地に入れた。

30

40

【0290】

典型的な血清補充培地中での初代細胞の培養

Ficoll-Paque(商標)PLUS(GE Healthcare Bio-Sciences PA, USA)を使用して健常ドナーに由来する Buffy コートからの分離によってPBMC集団を生じさせた。24ウェル組織培養プレートにおいて、10%のウシ胎仔血清(Gibco)、2mmol/LのL-グルタミン、100U/mLのペニシリン、100U/mLのストレプトマイシン及び100IUのrhIL-2/ml

50

が補充されたRPMI - 1640 (Corning CellGro) 中 1×10^6 細胞/mLのPBMCを培養した。

【0291】

末梢血、臍帯血、骨髓、正常組織、または疾患に罹患した組織、例えば前述のがん組織から採集した初代ヒト細胞を成長させるために同様の培養条件を用いることができる。

【0292】

典型的な無血清培地中での初代細胞の培養

Ficoll - Paque (商標) PLUS (GE Healthcare Bio - Sciences PA, USA) を使用して健常ドナーに由来するbuffy coatからの分離によってPBMC集団を生じさせた。24ウェル組織培養プレートにおいて、CTS - Optimizer 補充剤を含むCTS無血清培地中 1×10^6 細胞/mLのPBMCを培養した。

10

【0293】

末梢血、臍帯血、骨髓、正常組織、または疾患に罹患した組織、例えば前述のがん組織から採集した初代ヒト細胞を成長させるために同様の培養条件を用いることができる。

【0294】

実施例2：付着している単球ならびにマクロファージならびにCD4+及びCD8+のT細胞の除去

前述したようなアフレーション法によってPBMCを採集し、低張処理、またはFicoll 勾配遠心分離法を用いる密度分離によって赤血球を除去する。赤血球不含PBMCを、10段または40段Cell Factory (Nunc)、ローラーボトル (Nunc) などの大型培養容器内でインキュベートする。マクロファージ及び単球を含む付着性集団は、通常は細胞培養容器の表面に結合したままとなる。懸濁集団中で成長した細胞集団はT細胞が濃縮されている。およそ 10^8 、 10^9 または 10^{10} 個のPBMCを、抗ヒトCD4及び抗ヒトCD8で被覆された鉄含有マイクロビーズ (例えば、Miltenyi Biotechマイクロビーズ) と共にインキュベートする。インキュベートした細胞集団を流して磁場に通し、そこにCD4+及びCD8+のT細胞が保持される。「貫流」細胞集団はT細胞が濃縮されている。

20

【0295】

実施例3：単球及びマクロファージの除去

前述したようなアフレーション法によってPBMCを採集し、低張処理、またはFicoll 勾配遠心分離法を用いる密度分離によって赤血球を除去する。赤血球不含PBMCを、10段または40段Cell Factory (Nunc)、ローラーボトル (Nunc) などの大型培養容器内でインキュベートする。単球及びマクロファージは、赤血球が除去されたPBMCを充填ガラスウールカラムに流すことによって除去される。「貫流」細胞集団は、さらなる処理のためにT細胞が濃縮されている。

30

【0296】

実施例4：T細胞の濃縮

前述したようなアフレーション法によってPBMCを採集し、低張処理、またはFicoll 勾配遠心分離法を用いる密度分離によって赤血球を除去する。赤血球不含PBMCを、10段または40段Cell Factory (Nunc)、ローラーボトル (Nunc) などの大型培養容器内でインキュベートする。単球及びマクロファージは、実施例2または実施例3に記載の方法のどちらかを用いて除去される。およそ 10^8 、 10^9 または 10^{10} 個のPBMCを、CD4及びCD8で被覆された鉄含有マイクロビーズ (例えば、Miltenyi Biotechマイクロビーズ) と共にインキュベートする。インキュベートした細胞集団を流して磁場に通し、そこに抗ヒトCD4+及び抗ヒトCD8+のT細胞が保持される。「貫流」細胞集団はT細胞が濃縮されている。不要な細胞、例えば、NK、T細胞、B細胞、単球及びマクロファージは、不要な細胞種を指向する抗体のカクテルを使用して免疫磁気ビーズ分離 (例えば、Miltenyi Biotech AutoMACSシステム) によって除去される。

40

50

【0297】

あるいは、不要な細胞種は、マウス抗ヒト TCR (IP26、BW242/412) 抗体を使用するかまたは、NK上、T細胞上、B細胞上、単球上もしくはマクロファージ上の表面受容体を指向しかつ抗マウスIgGマイクロビーズ (Miltenyi 130-048-401) に取り付けられている1つ以上の他の抗体を使用するかまたは、NK上、T細胞上、B細胞上、単球上もしくはマクロファージ上の表面受容体を指向する1つ以上の四量体型抗体複合体もしくは二重特異性抗体を使用するかまたは、それらの組み合わせを使用することによって、除去される。

【0298】

抗体による初代細胞からの T細胞の単離

10

一例を挙げると、天然 T細胞は、細胞表面マーカーの陽性 (つまり、TCR) または陰性 (つまり、TCR、CD4、CD8、CD56) の発現に基づいてフローサイトメトリー選別によって初代培養物から単離される。

【0299】

実施例5 . 原発腫瘍からの T細胞の単離

T細胞を、実施例1で詳述されている方法に従って単離した。手短に述べると、採取して間もない腫瘍検体をNCI Cooperative Human Tissue Network (CHTN) から入手した。肝臓への結腸腺癌転移癌 (TIL1) 及び腎腫瘍 (TIL2) をRPMI-1640培地中に出荷した。平刃を使用して腫瘍組織を大ききさ2mm³の薄片に刻み、続いて、2mLのRPMI中Liberase酵素カクテル (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 及び3000ユニットのDNaseによる消化を記載のとおりに行った。消化後、腫瘍を無菌ガーゼ40ミクロンナイロン製メッシュで濾過し、RPMI-1640で2回洗浄した。細胞を計数し、L-グルタミンが補充された10%のヒトAB血清及び100U/mLのrhIL-2を含有するRPMI-1640中1×10⁶個/mLで24ウェルプレートに播種した。6日間培養した後に腫瘍内浸潤リンパ球を採集した。Tリンパ球の存在をフローサイトメトリーで抗TCR (FITC結合抗V1TS8.2、(Thermo Fisher)) 及び抗V2B6 (Biolegend) によって分析した。データをFlowJoソフトウェアによって解析した。

20

【0300】

30

図4は、肝臓への結腸腺癌転移癌 (TIL1) 及び腎腫瘍 (TIL2) から単離した1及び2リンパ球の成長を示すグラフを描写する。これらのリンパ球は、CCR4及びCCR7を発現することが示された (データ示さず)。図4で示されているように、V1サブセットは、両タイプの腫瘍から単離された主たる集団であった。

【0301】

実施例6 . T細胞の刺激及び増殖

サイトカイン (IL-2、IL-4、IL-7、IL-15、IL-12、IL-21、IL-23、またはIL-33)、成長因子 (インスリン及びトランスフェリン、インスリン様成長因子)、アルブミン、脂質 (コレステロール、脂質溶液、脂質前駆体)、ビタミン、銅、鉄、セレン、タンパク質加水分解物、必須アミノ酸、非必須アミノ酸、及び剪断保護剤 (Pluronic F-68) を含有する、Ex-Vivo10 (Lonza 04-380Q)、Ex-Vivo15 (Lonza 04-744Q)、Ex-Vivo20 (Lonza 04-448Q)、AIMV培地 (ThermoFisher Scientific 12055091)、Optimizer CTS (ThermoFisher Scientific A1048501) などの無血清培地中で T細胞を刺激し、増殖させる。

40

【0302】

本明細書中の実施例に記載の無血清培地には、T細胞の生物学的機能性を維持しながら懸濁培養 (例えば、WAVEバイオリアクター) における10⁵~2×10⁷細胞/mLの高細胞密度での T細胞成長を支援する添加剤を補充することもできる。

50

【0303】

堅牢な T細胞成長をもたらした追加の添加剤としては、例えば、塩化カルシウム、無水、硝酸カルシウム、硫酸銅、五水和物、クエン酸第二鉄、硝酸第二鉄、硫酸第一鉄、硫酸亜鉛及び/またはプトレシンが挙げられる。

【0304】

血清に取って代わる低レベルの元素成分を供給するために、パラモリブデン酸アンモニウム、バナジウム、マンガン、ニッケル、セレン酸ナトリウム、メタケイ酸ナトリウム、九水和物、塩化ズ、塩化アルミニウム、酢酸バリウム、塩化カドミウム、塩化クロム、コバルト、二酸化ゲルマニウム、臭化カリウム、ヨウ化カリウム、塩化ルビジウム、硝酸銀、フッ化ナトリウム及び/または塩化ジルコニウムを含む微量金属を無血清培地に供給した。

10

【0305】

細胞培養用培地に追加される、T細胞の堅牢な成長を支援する他の成分は、例えば、アデノシン、グアノシン、シチジン、ウリジン、ペタイン、タウリン、フォリン酸、エタノールアミン、リノレン酸、オレイン酸ヒドロコルチゾン、ビルベート、植物加水分解物、酵母加水分解物及び/または -メルカプトエタノールである。

【0306】

堅牢な T細胞成長を促進するために追加されるビタミンとしては、例えば、ピオチン(B7)、D-パントテン酸カルシウム(B5)、塩化コリン、シアノコバラミン(B12)、葉酸(B9)、i-イノシトール(myo-イノシトール)、ナイアシンアミド(B3)、ピリドキサル、一塩酸塩、ピリドキシン、一塩酸塩(B6)、リボフラビン(B2)、チアミン及び/または一塩酸塩(B1)が挙げられる。

20

【0307】

実施例7：増殖済み T細胞の特性評価：免疫表現型

増殖済みT細胞集団は、例えば、異なる集団同士を区別する細胞表面マーカーに対するFACS染色によって特性評価され得る。細胞を、2%のウシ胎仔血清を含有するHEPES緩衝生理食塩水(HBSS)で1回洗浄し、適量のMAbと共に4℃で30分間インキュベートし、HBSSで再洗浄した。手短に述べると、CD2、CD3(BioLegend、クローンOKT3)、CD4(BioLegend、クローンOKT4)、CD7、CD8(BioLegend、クローンRPAT8)、CD11a、CD16、CD18、CD19、CD27、CD28、CD38、CD45RA、CD56、CD57、CD69、CD71、CD95、CD107、ICAM-1、MICA/B、NKG2D、DR5、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR5、CXCR6、CXCR7、IL-2R、IL-7R、Ki67、L-セレクチン、VLA-4、JAML、PD1、PDL1、CTLA-4、Ox40、TCRV1(ThermoFisher Scientific、クローンTS8.2)、またはTCRV2(BioLegend、クローンB6)を指向する、フルオロイソチオシアネート(FITC)またはフィコエリスリン(PE)と結合したMAbを含有している、体積100µlのFACS染色培地(FSM; 2%のウシ胎仔血清を含有するHBSS)中で、 1×10^6 個の細胞を染色する。

30

40

【0308】

表面マーカー以外にも、当技術分野で知られている方法に従ってサイトカイン分泌、細胞内サイトカイン及び/または膜結合サイトカイン、例えば、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-17、またはIL-21を評価してもよい。

【0309】

本明細書中の特定の実施形態では、zombie violet(BioLegend)アミン染料の非存在または少ない取込みによって生細胞を判定した。Fluorescence Minus One(FMO)対照を使用して各抗原の表面発現の陽性と陰性と

50

区切る境界を画定する。染色された細胞をSony SH800サイトメータで採集し、FlowJo v10.1を使用してデータを解析する。フローサイトメトリデータをドットプロットとして視覚化する。

【0310】

実施例8．血清含有培地中及び無血清培地中での 2 T細胞増殖

種々の 2 T細胞の成長及び増殖速度を血清含有培地 (R2: RPMI + 10% FBS) 及び無血清培地 (AIMV + ウシアルブミン; CTS無血清補充剤) において評価した。図5は、 2 T細胞の成長を示すグラフを描写する。当実験で使用した培地は全て、100 IU/mLのIL-2、2 mMのグルタミン及び1×のペニシリン/ストレプトマイシンを含有していた。さらに、1、5及び20 µMのゾレドロン酸で細胞を0日目に刺激した。2~3日ごとに、さらなるゾレドロン酸を添加せずに培地を補給した。10⁶個のPBMCから増殖した 2 T細胞の総数、及び13日間の期間の後における各処理の増殖倍率を図5に示す。これらの結果は、 2 T細胞を無血清培地中で増殖させることができることを示唆している。

10

【0311】

実施例9．抗 TCR抗体の遮断アッセイ及び競合アッセイ

図6及び図7は、抗 TCR抗体遮断実験を示すグラフを描写し、図8及び図9は、抗体競合アッセイを描写する。図6及び図7は、様々な抗体、すなわち、5A6.E9、B1、TS8.2、15D、B3、B6、TS-1、3.20、IMMU510、または11F2と共にPBMCを前インキュベートした場合の遮断実験の結果を示す。続いて細胞を洗浄し、TS8.2-FITC (1特異的) またはB6-PE (2特異的) 二次抗体で染色した。PBMC試料をフローサイトメトリで分析した。幾何平均蛍光強度 (gMFI) の低下を用いて遮断度合いを見積もった。TS8.2-FITC (図6) 及びB6-PE (図7) に対する抑制のレベルを図で示す。

20

【0312】

1 TCR発現細胞株BE13に対する結合に関する、MAb TS-1及びTS8.2と、抗体5A6.E9、B1、IMMU510、R9.12-2、または11F2との競合試験は、1、2または10 µgの未標識競合抗体 (IgG1、5A6.E9、B1、TS8.2、TS-1、R9.12、IMMU510または11F2) と、FITCに結合した0.2 µgの抗V 1 TCRクローンTS8.2 (図8) または抗V 1 TCRクローンTS-1 (図9) とを同時に1×10⁵個の細胞と共に氷上で30分間インキュベートすることによって行った。競合%は、幾何平均蛍光の変化を幾何平均蛍光の最大変化で割ることによって算出される。図9で描写されているように、TS-1抗体は、TS8.2自体と同じくらい効果的に、細胞に対するTS8.2の結合と競合した。試験した他のどの抗体も、TS8.2の結合と競合することができなかった。TS8.2抗体は、TS-1自体ほど効果的ではないが、細胞に対するTS-1の結合と競合した。TS-1の結合とのいくらかのレベルの競合は11F2抗体においても認められた。これらの結果は、TS-1抗体及びTS8.2抗体がどちらも 1に結合するがしかし同じエピトープには結合していない可能性がある、ということを示唆している。

30

【0313】

実施例10．腫瘍検体の酵素的消化及び、特異 エピトープに対する抗体による T細胞増殖

24ウェルプレートに0.5~1 µgの抗 TCR抗体を塗布した。実施例4に記載の消化された腫瘍組織から単離した細胞を計数し、10%のヒトAB血清及びrhIL-2 (100 IU/mL) が補充されたRPMI 1640中0.5~1×10⁶細胞/mLで抗体被覆ウェルに播種した。培養物を37、5%CO₂で7~21日間インキュベートした。

40

【0314】

実施例11．腫瘍検体の酵素的消化及び、特異 エピトープに対する抗体による T細胞増殖

50

実施例1の「新鮮な腫瘍検体の酵素的消化」の節に記載されている消化された腫瘍組織から単離した細胞を計数し、10%のヒトAB血清及びrhIL-2(100IU/mL)が補充されたRPMI1640培地中 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLで、3D細胞培養プレート(Corning(登録商標)Costar(登録商標)超低付着性マルチウェルプレート)の抗体被覆ウェルに播種した。培養物を37℃、5%CO₂で7~21日間インキュベートした。

【0315】

実施例12：PBM CからのCD4⁺T細胞の活性化及び増殖

活性化剤を可溶性薬剤または培養ウェル上に固定された薬剤として試験した。 1×10^6 細胞/mLの細胞密度で24ウェルプレートにて培養したヒトPBM Cに、可溶性抗原及び抗体を0.1~5µg/mLの終濃度で添加した。あるいは、同じ抗原CD3/CD28抗体を、24ウェル組織培養プレートのウェルに塗布することによって固定した。抗CD3/CD28抗体は0.1~10µg/mLの濃度で添加された。ウェルをPBSで2回洗浄し、次いで、上記のRPMI-1640、AIM-VまたはCTS-OpTmizerのいずれかの培地中でPBM Cをプレートに移して培養した。培養される培地には100IU/mLのrhIL-2を補充した。

【0316】

具体例を挙げると、0日目にドナーB3からの百万個PBM C/mLを、24ウェルプレートに固定された1ウェルあたり0.5、1及び2µgの様々な抗体で刺激した。試験した抗体は、マウスIgG1アイソタイプ対照クローンMG1-45(BioLegend)、UCHT-1、5A6.E9、B1、TS8.2、15D、B6、B3、TS-1、3.20、7A5、及びゾレドネートであった。図10及び図11は、PBM CからのそれぞれCD4⁺及びCD8⁺T細胞の活性化及び増殖を示すグラフを描写する。細胞は、10%のFBS、100IU/mLのrhIL-2、グルタミン及び1xのペニシリンストレプトマイシンと共にRPMIを含有する培地中で活性化されかつ増殖した。初回刺激後7日目に、細胞を新しい培地に継代し、同じ濃度の同じ抗体で新たに塗布された24ウェルプレートに入れた。再刺激された培養物の中の培地を13日目まで2~3日ごとに補給し、フローサイトメトリーで分析した。

【0317】

図12はCD4⁺T細胞の総数を示し、図13は13日間の成長及び増殖の後でのCD8⁺T細胞の総数を示す。CD4⁺T細胞の総数は、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の百分率(それぞれ、TS8.2-FITC及びB6-PEを使用してフローサイトメトリーで決定した)に生細胞総数を掛け、非特異的マウスIgG MG1-45(BioLegend 401403)によって活性化されたCD4⁺及びCD8⁺T細胞による陰性対照値を差し引くことにより、算出した。

【0318】

細胞増殖のための活性化は、抗体を培養プレート上に固定した場合にのみ得られ、これらの抗体を可溶性形態で培養物に添加した場合には、全PBM C細胞集団における場合を含めて増殖は検出されなかった(データ示さず)。汎用CD3/CD28 MAb 5A6.E9及びB1は、CD4⁺及びCD8⁺細胞集団のどちらの成長も活性化させた。MAb 15D及びB6は、CD8⁺細胞集団の選択的成長を誘導した。MAb TS8.2及びTS-1は、CD4⁺細胞集団の選択的成長を誘導した。興味深いのは、MAb TS-1及びTS8.2が細胞表面CD3への結合時に互いに競合するにもかかわらず、TS-1によって誘導される増殖の方が3倍大きかったということである。同様に、抗体B1、5A6.E9、15D、B6及びB3において様々な程度のCD8⁺細胞集団増殖誘導が検出された。このデータは、CD8⁺細胞集団の特異的かつ堅牢な増殖を誘発するには独特のエピトープが必要とされることを示唆している。

【0319】

実施例13：PBM Cからの特異的CD4⁺T細胞集団の活性化及び増殖、PBM CからのVβ1 T細胞の活性化及び増殖

10

20

30

40

50

0.25もしくは1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合のデータを示す) の活性化抗体 (TS1、TS8.2、R9.12、B6及び15D) をプラスチック製24ウェルプレートに直接固定したか、または24ウェルプレートにおいて0.05もしくは0.1 mg/mL (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合のデータを示す) の当該活性化抗体を、プレートに結合したヤギ抗マウスIgGFc (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に捕捉させた。10%のFBS、100 IU/mLのrhIL-2と共にRPMIを含有する培地中で 1×10^6 細胞/mLのヒトPBMCを活性化させた。培養物中の培地は2~3日ごとに補給した。7日目に、活性化抗体を有さない新しいプレートに細胞を移し、合計14日間または23日間にわたって2~3日ごとに新鮮な培地を補給することによってさらに増殖させた。細胞計数及びフローサイトメトリー分析を0、7、14及び23日目に行ってV₁及びV₂T細胞の百分率及び数を決定した。増殖倍率は、T細胞の数を、各ウェルに播種された出発PBMC中の同じ型のT細胞の数で割ったものとして定義される。図16は、異なるドナーからのPBMCからのV₁T細胞の活性化及び増殖を示すグラフを描写する。MAb TS-1、R9.12及びTS8.2は、V₁T細胞集団の顕著な選択的成長を誘導した。V₁T細胞は、400~14,500倍に増殖し(図16A、図16C)、14日間で細胞集団全体の約95%を占めるTリンパ球集団の1.2%から87.0%にまで濃縮された(図16B)。V₁T細胞は、23日間で26,330倍に増殖した(図16D)。

10

【0320】

PBMCからのV₂T細胞の活性化及び増殖

20

0.25もしくは1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合のデータを示す) の活性化抗体 (TS1、TS8.2、R9.12、B6及び15D) をプラスチック製24ウェルプレートに直接固定したか、または0.05もしくは0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合のデータを示す) の当該活性化抗体を、プレートに結合したヤギ抗マウスIgGFc (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に捕捉させた。10%のFBS、100 IU/mLのrhIL-2と共にRPMIを含有する培地中で 1×10^6 細胞/mLのヒトPBMCを活性化させた。培養物中の培地は2~3日ごとに補給した。7日目に、活性化抗体を有さない新しいプレートに細胞を移し、合計14日間にわたって2~3日ごとに新鮮な培地を補給することによってさらに増殖させた。図17は、異なるドナーからの14日後のV₂T細胞の増殖倍率及び百分率を示す。MAb B6及び15Dは、14日間を経てV₂T細胞集団の70~4,740倍の選択的増殖を誘導し(図17A、図17C及び図17E)、細胞集団全体の約95%を占めるTリンパ球集団の80%にまでV₂集団を濃縮した(図17B及び図17D)。

30

【0321】

TCR活性化PBMCにおけるT細胞の百分率の低減

細胞培養ウェルにおいて固定された活性化剤を試験した。24ウェルプレートにおいてMAb (TS1、TS8.2、B6及び15D) を、直接塗布した(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) かまたはヤギ抗マウスFc (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に捕捉させた(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。10%のFBS、100 IU/mLのrhIL-2と共にRPMIを含有する培地中で 1×10^6 細胞/mLのヒトPBMCを活性化させた。培養物中の培地は2~3日ごとに補給した。7日目に、抗体を有さない新しいプレートに細胞を移し、14日目まで2~3日ごとに培地を補給することによってさらに増殖させ、フローサイトメトリーで分析した。図18は、14日後のT細胞の増殖倍率及び百分率を示す。MAb TS1、TS8.2、B6及び15Dと共に培養されたPBMCは、14日間の培養期間を経て92%から9%もの低さまでのT細胞の顕著な低減をもたらした。

40

【0322】

1及び2特異的抗体による活性化は1及び2T細胞の集団倍加時間を短縮するMAbの直接塗布(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) またはヤギ抗マウスFc (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による捕捉(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を24ウェルプレートにおいて行った。10%のFBS及び100 IU/mLのIL-2を含むRPMI中 10^6 細胞/mLのPBMCを播種した。7日

50

目に、抗体を有さない新しいプレートに細胞を移し、新鮮な培地で 10^6 細胞/mLに調節した。7日目に、抗体を有さない新しいプレートに細胞を移し、 10^6 細胞/mLに調節し、2~3日ごとに新鮮な培地を補給した。結果を図19に描写する。V₁T細胞集団倍加時間は、活性化抗体が存在しないときの37時間から、固定化TS1抗体が存在するときの24時間に短縮された。V₂T細胞集団倍加時間は、活性化抗体が存在しないときの125時間から、固定化15D抗体が存在するときの27.5時間に短縮された。アルファベータT細胞集団倍加時間は、TCR抗体による活性化によって大して影響を受けなかった。

【0323】

TS8.2及びTS1抗体を使用する活性化は主としてナイーブ表現型及びセントラルメモリー表現型をもたらす

10

抗体TS8、R9.12及びImmuno510を $1.0\mu\text{g/mL}$ の濃度でプラスチック製ウェルに直接固定した。10%のFBS、 100IU/mL のrhIL-2と共にRPMIを含有する培地中で 1×10^6 細胞/mLのヒトPBMCを活性化させ、培養した。培養物中の培地を23日目まで2~3日ごとに補給し、0、14及び23日目にフローサイトメトリーで分析した。図20は、フローサイトメトリーによるCD45RA及びCD27発現分析によって決定された、14及び23日目のV₁T細胞の表現型を描写する。細胞の表現型は、ナイーブ(CD45RA+/CD27+)、セントラルメモリー(TCM、CD45RA-/CD27+)、エフェクターメモリー(TEM、CD45RA-/CD27-)、及びエフェクターメモリー発現性(TEMRA、CD45RA+/CD27-)として定義した。TS8.2及びR9.12による活性化は、23日間の増殖期間を経てV₁T細胞表現型を維持し、ナイーブ集団が43~63%であり、セントラルメモリー集団が23~27%であった。対照的に、汎抗体Immuno510は、47%から8~33%へのナイーブV₁-T細胞の減少を招いた。

20

【0324】

MICA-FcによるV₁T細胞集団の特異的な強化された増殖

プレートに結合したTS8.2抗体($1\mu\text{g/mL}$)によって、またはプレートに結合したTS8.2とMICA-Fc融合タンパク質と(それぞれ、1及び $5\mu\text{g/mL}$)によって、ヒトPBMCを活性化させた。10%のFBS、 100IU/mL のrhIL-2を含有するRPMI培地中で培養物を増殖させた。図21は、10日後の細胞増殖を描写する。TS8.2とMICA-Fcとの組み合わせは、T細胞集団(B)に対して影響を与えることなく、TS8.2のみの対照(A)の場合よりも2倍強くV₁T細胞集団の増殖を強化した。

30

【0325】

臍帯血からのV₁及びV₂T細胞の特異的かつ顕著な活性化

ヒト臍帯血からの単核細胞を、Ficollを使用する密度勾配遠心分離法によって単離し、RPMI、10%のFBS、 100IU/mL のrhIL-2を含有する培地中で抗体TS8.2、R9.12、B6及び15Dによって活性化させた。図22は、7日間を経てV₁T細胞がV₁特異的抗体によって152倍にまで増殖し、V₂T細胞がV₂特異的抗体によって93倍にまで増殖したことを示す。

40

【0326】

実施例14. 活性化TCR MA bのエピトープ位置特定

TCR活性化抗体のエピトープ結合ドメインを決定した。TCR V₁特異的活性化MA b TS8.2、TS1、ならびにV₂特異的活性化MA b 15D及びB6の結合エピトープを、野生型及び突然変異型のTCR対合鎖の様々な組み合わせを使用してELISA結合アッセイで決定した。TS1、TS8.2及びR9.12は、フローサイトメトリーによって検出(データ示さず)されるところの、V₁TCRを発現するヒトT白血病細胞株BE13の表面に結合するV₁特異的MA bである。BE13のTCR鎖V₁J1及びV₂J2をクローニングし、V₁特異的MA bのエピトープ位置特定のために使用した。

50

【0327】

及び鎖の細胞外のV、多様性(D)、結合(J)及びC領域ドメインを含有する可溶性TCR構築物をクローニングし、293細胞の一過的トランスフェクションによって発現するヒトIgG1重鎖融合TCR-FCタンパク質のヒンジ領域、CH2及びCH3ドメインと融合させた。

【0328】

1特異的MAbについての位置特定のために、V1J1、V1J2及びV1J3を含めた種々の鎖を発現させた。V及びJ領域において突然変異させたさらなるV1J1鎖を作り出した。種々の鎖は全て、BE13細胞株からクローニングされた8TCR鎖と対合し、1特異的MAbの結合性は鎖との対合による影響を受けなかった。

10

【0329】

種々のTCRは、293細胞に共トランスフェクトされ、正確に組み立てられることができ、正確に対合した受容体鎖として分泌されるジスルフィド結合した異種二量体を形成することができた。TCR-FC異種二量体の正確な折りたたみは、あらゆるT細胞受容体を認識するB1.1(Biolegend #331202)、5E6.E9(ThermoFisher Scientific #TCR1061)、11F2(Beckman Coulter #340884)及びIMMU510(Beckman Coulter #IM1349)抗体を含めた抗TCR汎抗体を使用してELISA結合アッセイによって確認した。

20

【0330】

全事例において、全てのTCR MA bの結合はTCR異種二量体に限られ、適切な結合構造には1及び2鎖と、鎖との対合が必要とされることを示唆していた。

【0331】

293細胞の一過的トランスフェクション及びキメラタンパク質の製造。239細胞を、10%のウシ胎仔血清が補充されたダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で成長させた。トランスフェクションの前日に 1×10^5 細胞/ウェルの付着性293細胞を24ウェルプレートに播種し、37(5%CO₂)で一晩インキュベートした。1µgずつのTCR-FcとTCR-FCプラスミドとを混ぜ合わせた。プラスミドDNA及びfectin293トランスフェクション試薬(ThermoFisher Scientific #12347019)を無血清Opti-MEM培地で5分間掛けて希釈し、その後、室温で20~30分間複合体化させた。調製した細胞に、トランスフェクション混合物の全体積を滴加した。トランスフェクトされた293細胞を37(5%CO₂)で48~72時間インキュベートした。トランスフェクションから48時間後に細胞上清を採集し、選定した抗ヒトTCRモノクローナル抗体との結合性に関してELISAアッセイで試験した。

30

【0332】

サンドイッチELISAアッセイ。細胞培養物上清を酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)で試験した。アッセイ用プレート(Greiner Bio-One高結合能マイクロプレート)を、100µlの1µg/mlのヤギ抗ヒトIgG, Fc断片特異的抗体(Jackson ImmunoResearch #109-005-008)と共に4で一晩インキュベートした。200µl/ウェルの遮断用緩衝液(3%のBSAを含有するPBS)を使用して室温で1時間プレートの遮断を行った。可溶性TCRを含有する上清をPBS-Tween(PBS中0.5ml/LのTween)中に添加し、室温で1時間インキュベートし、続いて洗浄し、選定したマウス抗ヒトTCR特異的mabと共にインキュベートした。可溶性TCRのセットに対するTCR mabの結合は、遮断用緩衝液で1:10,000に希釈したHRP結合ヤギ抗マウスFC特異体(Jackson ImmunoResearch Laboratories; Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc Fragment Specific #115-035-008)を使用して1時間

40

50

掛けて検出した。その後、プレートを洗浄し、TMB試薬で発色させた。プレートにおける色の変化をVictor X3プレートリーダー(Perkin Elmer)によって波長450nmで測定した。

【0333】

図23で示されているように、可溶性TCRに対するTS1及びTS8.2の結合は、1鎖がV1J1及びV1J2配列を含む場合には検出されたが、V1J3鎖に対しては検出されず、デルタJ3に欠けているデルタJ1及びデルタJ2領域内の肝要な残基がTS1及びTS8.2の結合に関与していることが示唆された。データは、TS1及びTS8.2が1J1及び1J2のTCRに結合し、R9.12が1J1、1J2及び1J3のTCRに結合すること、ならびにJ1及びJ2セグメントがTS1及びTS8.2の結合に肝要な配列を含有することを示唆している。

10

【0334】

TS8.2及びTS1の結合に必要なJ1/J2領域内の肝要なアミノ酸(複数可)を同定すべく、ヒトのデルタJ領域の配列アラインメントは、J1とJ2とに共通しているがJ3配列とは異なっている4つの可能な残基9つのJ1/J2残基Leu116、Lys120及びThr122を指し示した。J1配列をJ3配列に照らして改変し、Leu116をMetに改変し、Lys120をThr及びAlaに改変し、Thr122をIleで置き換えた。Lys120をThrに変更するとTS8.2及びTS1の結合性はどちらも消滅したが、R9.12の結合性は消滅しなかった。図24及び図25で示されているように、デルタJ1及びデルタJ2の位置120のリジン残基はTS-1及びTS8.2抗体の結合に肝要である。

20

【0335】

TS8.2及びTS1の結合にとって重要なV1配列をさらに同定するために、さらなる突然変異型V1TCR構築物を作った。図26に示すように、6本の突然変異型V1鎖を構築した。突然変異は、相同性の高いウシV1S1とヒトV1とのアミノ酸配列の差異(68%の同一性)に基づいて考案した。合成遺伝子(Integrated DNA Technologies)を使用して突然変異型V1鎖を生じさせた。可溶性TCRは、ヒト8TCRFc鎖と対合したV1鎖として発現した。

【0336】

図27で示されているように、TS-1及びTS8.2抗体は、突然変異型V1鎖のうち2本であるV1Mut1及びV1Mut6に結合し損なった。V1Mut1は、ヒト1鎖の可変領域のGly57~Ala88の領域にある残基の並びにおいて9つの残基の変化を呈しており、V1Mut6は、位置71及び位置72(付番は図14に示すとおり)の2つの残基の変化を呈している。V1MAbR9.12、及び汎鎖構築物MAbImmuno510の結合性は、V1に対するどの変更によっても影響を受けなかった。したがって、位置Arg71及び位置Asp72のV1残基は、J1/J2領域にあるLys120とともに、TS-1及びTS8.2MAbのどちらの結合性にも肝要である。

30

【0337】

まとめると、データは、TS-1及びTS8.2のどちらの肝要な結合及び活性化エピトープも1鎖のV及びJ1/J2領域内に位置していることを示唆している。

40

【0338】

V2特異的活性化MAb15D及びB6のエピトープ位置特定
MAbB6及び15Dの特異的結合は、ゾレドロン酸によって活性化された2T細胞集団に対してはフローサイトメトリーで検出されたが、1TCRを発現しているBE13細胞株に対する結合は検出されなかった(データ示さず)。さらに、競合結合アッセイデータからは、B6及び15Dが互いに競合せず、異なるエピトープに結合することが示された。

【0339】

TCR鎖の組み合わせ

50

15D及びB6のMAbにとっての結合エピトープを同定するために、種々のTCR構築物を作り出した。3、4、8、9J1及び9JPF融合鎖と共にV2鎖を共トランスフェクトした。分泌されたTCR異種二量体の正確な折りたたみは、9特異的MAbである7A5(ThermoFisher Scientific #TCR1720)と共に抗TCR汎抗体IMMU510(Backman Coulter #IM1349)を使用してELISA結合アッセイによって確認された。

【0340】

B6の結合性は、2鎖との対合のために選定された鎖によって影響を受けた。B6の結合は、2鎖を9鎖と対合させた場合に9のJ配列に関係なく検出された。32TCR対の結合性は大きく低下し、8と対合した2鎖の結合は検出不可能であった。図28で示されているように、B6MAbが最も安定化されて結合するのは、29TCRに対する場合である。3及び8は、どちらもガンマファミリー1に属し、互いに高い配列相同性(75%)を共有しており、9は、ガンマ2ファミリーのメンバーであり、3及び8との低い配列相同性(約20%)を共有している。B6の高い結合親和性には、2鎖及び9鎖の両方の残基が関与している。陽性対照MAbは、鎖の定常領域に結合しかつあらゆるTCRを認識する汎TCRであるIMMU510、及び9特異的MAbである7A5MAbであった。B6MAbの結合は、29TCRに対して検出された。B3はV9抗体である。

【0341】

近年、ヒト及びアカゲザルのTCR細胞がTCR遺伝子セグメントの高度な生殖細胞系配列相同性、及びCDR3領域の多様性を示すことが示された(Daubenberg et al., J Immunol 2001; 167: 6421-30)。15Dの結合に必要な肝要な配列を同定するために、部位特異的変異導入法によって特定の点突然変異をヒトV2鎖のCDRドメインに導入して位置Gly35(V2のCDR1)、Asp65(V2のCDR2)及びCys104(V2のCDR3)をアカゲザル配列で置き換えた。図29は、ヒトV2可変領域(IMGTHITRDV2)とアカゲザルV2可変領域(GenBank: AY190028.1)とのタンパク質配列アラインメントを示す。CDR1(G35S)、CDR2(D65G)、及びCDR3C104Sにおいて変更がなされた(付番は図15に示すとおり)。ヒトV2のCDR1におけるGlyからSerへの単一残基の置き換えは、15Dによる結合活性の完全な喪失を招いた。図30で示されているように、Gly35は、15Dの結合に肝要な残基として同定された。V2のCDR1、CDR2及びCDR3における変化は、B6、TCR汎MAbであるIMMU510、及び9特異的MAbである7A5の結合性に影響を与えなかった。

【0342】

実施例15. T細胞の活性化及び増殖の新規調節剤のエピトープ位置特定

CD2エピトープ:

CD2分子は、2つの細胞外免疫グロブリンスーパーファミリドメインであるIg様V型ドメイン及びIg様C型ドメインからなり、そこに存在している3つの主要な免疫原性領域についての記載がなされている(Davis et al., Immunol Today 1996; 17: 177-187)。領域1及び領域2は1つ目のドメインに位置しており、領域3は2つ目のドメインに位置している。領域1を認識するMAbは、休止T細胞と活性T細胞との両方に結合し、CD2に対するCD58の結合を強く抑制することができる。領域2を認識するモノクローナル抗体は、同様の結合特性を有するものの、CD58結合の遮断に効果的ではない。領域3を認識するモノクローナル抗体は、活性T細胞上のCD2のみを認識し、CD58結合を遮断しない。

【0343】

CD58に対する競合アッセイ、CD2の天然のリガンド、及び活性化アッセイによって、CD2作動薬MAbの結合エピトープの位置特定を行う。さらに、MAbの結合性に関して、CD58の結合性の喪失を招く肝要なCD2結合残基の部位特異的変異導入の試

10

20

30

40

50

験を行う。突然変異の例としては、位置 67 (K から R へ)、位置 70 (Q から K へ)、位置 110 (Y から D へ)、及び位置 111 (D から H へ)における CD2 配列の変異導入が挙げられる。CD2 の結合エピトープの位置特定のための構築物を設計するために、Vector NTI (Thermo Fisher) を使用してヒトとマウスとの CD2 の配列アラインメントを実施する。アラインメントは、ヒトとマウスとで CD2 の 50% の配列相同性を示す。ヒト CD2 の細胞外ドメインに結合する MA b は、マウス CD2 と交差反応するとは予想されない。結合エピトープを同定するために本発明者らはマウス/ヒトキメラ CD2 構築物のドメイン交換物を作成する。そのような構築物では、ヒト N 末端 Ig 様 V 型ドメイン (残基 25 ~ 128) は、CD2 の細胞外ドメインを発現する発現ベクターにおいてマウス残基 (23 ~ 121) で置き換わっている。キメラ cDNA 種を CHO または 293 細胞に一過的にトランスフェクトする。ヒト野生型 CD2 及びヒトマウスキメラ構築物は CHO 細胞の表面に発現する。キメラ CD2 細胞表面発現を FACS canto によって分析する。キメラ分子に対する結合性または結合性喪失をフローサイトメトリーによって検出し、活性化アッセイによって検証する。

10

【0344】

NK G2D エピトープ

NK G2D に対する活性化 MA b のエピトープ位置特定は、NK G2D とそのリガンド (MICA / MICB) のうちの 1 つ以上との相互作用を軽減または遮断する抗 hNK G2D 抗体の能力によって、または hNK G2D リガンド相互作用を遮断することが知られている抗体との競合によって、試験される。作動薬 MA b は、NK G2D によって媒介される NK または T 細胞の活性化を軽減するその能力によって同定される。これは、典型的な細胞毒性アッセイ、リガンド遮断抗体の添加、または T 細胞によって媒介される MICA 発現腫瘍細胞の殺傷の遮断によって用量依存的に評価することができる。

20

【0345】

CD27 エピトープ

CD27 に対する作動薬抗体のエピトープ位置特定は、機能アッセイ及び、ヒト CD27 とその天然のリガンドであるヒト CD70 との相互作用を遮断する当該抗体の能力によって行う。CD27 発現細胞を 5 µg の MA b と共に 4 時間で 30 分間インキュベートし、その後、1 µg のビオチン化 CD70 をチューブに加える。混合物を 4 時間でさらに 15 分間インキュベートし、その後、洗浄する。次に、細胞を (CD70 リガンド結合の検出のための) ストレプトアビジン - PE の混合物と共に 30 分間インキュベートし、続いて洗浄ステップを数回行い、FACS を用いて分析する。CD70 結合の遮断は、MA b と CD70 とが同じエピトープを共有していることを示唆するものである。

30

【0346】

実施例 16 : 増殖済み T 細胞の集団の TCR V レパートリーの特性評価

個々のドナーから増殖した T 細胞のクローン多様性をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって評価する。健常ドナーから単離されて間もない PBMC のクローン多様性を、抗 TCR 特異的抗体を含めた本明細書に記載の種々の活性化剤、リガンド及びレクチンで 7 ~ 13 日間刺激された培養物のクローン多様性と比較する。

【0347】

上記 T 細胞からの RNA を抽出し、cDNA へと逆転写し、V₁、V₂ 及び V₃ に対して特異的であるプライマー対を使用して PCR によって増幅する。V₁ 順方向プライマー (5' ATGCTGTTCTCCAGCCTGCTGTGTGTATTT3' ; 配列番号 : 1)、V₂ 順方向プライマー (5' ATGCAGAGGATCTCCTCCCTCATCCATCT3' ; 配列番号 : 2) 及び V₃ 順方向プライマー (5' ATGATTTCTTACTGTGGGCTTTAGCTTTTGT3' ; 配列番号 : 3) を C 逆方向プライマー (5' CTTGGGGTAGAATTCCTTCAACCAGACAAGC3' ; 配列番号 : 4) と組み合わせて使用して 500 bp の DNA 断片を増幅した。

40

【0348】

鎖は別個の RT-PCR 反応において、V₂、V₃、V₄ 及び V₅ (5' GG

50

TGCTTCTAGCTTTCCTGTCTCCTGCG3' (配列番号: 10))、V₈ (5'ATGCTGTTGGCTCTAGCTCTGCTTCTA3' (配列番号: 11)) ならびにV₉ (5'ATGCTGTCACCTGCTCCACACATCAACG3' (配列番号: 12)) を増幅するV_H 特異的プライマーを使用して増幅され、V_H プライマーはC_H 逆方向プライマー (5'GGAAGAAAATAGTGGGCTTGGGGGA A3' (配列番号: 13)) との対にされた。逆方向プライマーはC_H 1及びC_H 2のコンセンサス配列に基づいていた。PCR断片をクローニングし、80個の独立したV_H インサートのヌクレオチド配列が得られる。CDR3配列アラインメントと併せて、V_H、D_H 及びJ_H の接合部の配列を解析する。

【0349】

実施例17: T細胞の操作のためのMAB及び関連する標的指向性構築物

ヒトCD20遺伝子をcDNAクローン(Origene Technologies, Inc., 6 Taft Court, Suite 100, Rockville, Md. 20850)から得る。順方向プライマー(5'ATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAATGG3' (配列番号: 14))及び逆方向プライマー(5'TCAAGGAGAGCTGTCAATTTCTATTGGTG3' (配列番号: 15))を使用してCD20遺伝子を増幅し、増幅されたCD20 cDNAを、哺乳動物細胞用の高発現ベクターとしてのpCDNA3.4(Thermo Fisher Scientific)の中に組み込み、宿主細胞としてのCHO細胞にトランスフェクトする。CD20分子を細胞表面に高レベルで発現している組換えCHO細胞(CD20/CHO細胞)は、FACS分析によって同定される。

【0350】

CD20/CHO細胞を使用して、BALB/Cマウス、またはJakobovits and Bornstein(Jakobovits Curr. Opin. Biotechnol. 1995 6:561-6; Bornstein et al., Invest New Drugs. 2010 28:561-74.)に記載されているような完全ヒト抗体を産生するように操作された遺伝子導入マウスを免疫する。ヒトCD20に対する高い親和性及び特異性を有する抗体をFACSアッセイによってスクリーニングする。マウス抗体をCDRグラフトによってヒト化する(Kim and Hong Methods Mol Biol. 2012; 907:237-45)。さらに、ヒト重鎖単ドメイン抗体を産生するように操作されたマウスまたはラットからヒト単ドメインCD20抗体を生じさせる(Janssens et al., PNAS 2006 vol. 103: 15130)。

【0351】

上記の高親和性/特異性CD20抗体をコードする遺伝子をMSGV1レトロウイルスベクター骨格またはpCAGレンチウイルスベクターの中にクローニングする。選定MABを発現するマウスハイブリドーマか、ヒト化抗体鎖かのどちらかからVH及びVLドメインをクローニングする。本明細書に記載のCD20 MABによってT細胞を操作する。

【0352】

実施例18: T細胞の操作のためのTCR構築物

高反応性 TCR鎖の配列を含むTCRを発現する構築物を、NY-ESO-1-MHC特異ペプチド複合体を発現するTリンパ球から単離する。NY-ESO-1-MHC特異ペプチド複合体は、様々なNYESO-1発現腫瘍に対する試験管内及び生体内での強力な抗腫瘍活性を誘導する。

【0353】

高反応性 TCR鎖は、メラノーマ患者から、肉腫患者から、またはヒトのメラノーマもしくは肉腫の腫瘍に由来する患者由来異種移植片を保有するマウスから単離される。あるいは、当該TCRは、NY-ESO-1ペプチドまたはNYESO-1ペプチド複合体を発現するヒト化免疫系を有するように変化させたマウスに由来するものである(Go

10

20

30

40

50

nzales et al., Immunol Res. 2013 57:326-334; Boucherma et al., J Immunol. 2013. 191; 583-593; Liang-Ping L. Et al., Nature Med. 2010, 16:1029-1035を参照のこと)。優勢クラスI対立遺伝子HLA-A*02(例えば、ペプチドSLLMWITQC残基157~167(配列番号:16))及び優勢HLA-A*01関連ペプチドと関連付けてNY-ESO-1のエピトープを認識するT細胞を同定する。

【0354】

TCR 転写産物及びTCR 転写産物の配列は、One step RT-PCRキット(Qiagen Hilden Germany)を製造業者の提言に従って使用することで逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって生じる。第一鎖cDNAは、反応性T細胞から単離されたRNAから生じる。完全RNAは、TRIzol Total RNA Isolation Reagent(Invitrogen Life Technologies)によってCTLクローンから抽出される。TCRの 及び 鎖の増幅は、アミノ酸位置34及び35(Kabat付番)のトリプトファン-チロシン残基周辺を中心とするTCRの 及び 鎖のV領域の高度に保存された領域に結合することができる1組の縮重プライマーと、 及び 定常領域逆方向プライマーとを組み合わせる使用することによって行われる(Moonka and Loh Journal of Immunological Methods 169(1994)41-51)。増幅されたPCR断片をゲル精製し、そのまま配列決定に供する。配列情報を用いて、個々の完全長cDNAのクローニングに適するPCRプライマーを設計する。

【0355】

TCR 遺伝子をクローニングし、MSGV系レトロウイルスベクターに挿入し、選定T細胞から完全長cDNAを増幅する。野生型NY-ESO-1反応性ヒトTCRの 鎖と 鎖との両方をコードするレトロウイルスベクターを、MSGV1骨格を使用して構築する。TCR 鎖とTCR 鎖との連結は、1つの構築物において配列内リボソーム進入部位(IRES)エレメントによって、または切断可能なピコウイルス(picorovirus)ペプチド配列を使用して分断によって、行われる。

【0356】

以前に記載されているようなLipofectamine 2000(Invitrogen)を使用して、またはNucleofector(Lonza)を使用する電気穿孔法によって、MMLVのgag及びpolタンパク質を安定的に発現した293細胞に各MSGV1 TCRベクターと、内在性ウイルスのレトロウイルスエンベロープタンパク質をコードするベクターとを共トランスフェクトすることにより、レトロウイルス上清を生じさせる。トランスフェクション後の2日目または3日目に上清を採集し、10%のFCSを含有する新鮮なDMEMで1:1に希釈した。操作型 T細胞は、さらなる操作を何ら伴わずに、TCRの 及び 鎖をコードする遺伝子を適切に発現することができる。

【0357】

実施例19. TCR構築物による T細胞の操作

TCR(腫瘍認識部分)を含むポリヌクレオチドを、所望の抗原に特異的であるように選定したT細胞から標準的技術を用いてクローニングする。単離した内在性野生型T細胞を、以前の実施例に記載されている方法によって少なくとも 6×10^6 細胞にまで成長させ、その後、腫瘍認識部分をコードする発現カセットを含むレトロウイルスまたはレンチウイルスに感染させる。ウイルス感染のための標準的プロトコルを用いてベクターシステムを野生型 T細胞に導入することができる。選択マーカーの発現を用いて、好結果にトランスフェクトされた細胞を選択する。

【0358】

操作型 TCRの発現は、フローサイトメトリー及び/または定量的QRT-PCRによって、ならびに細胞毒性及びサイトカイン分泌に関する標的細胞についての機能アッセイによって、評価することができる。操作型活性化ドメインの発現も、フローサイトメ

トリー及び/または定量的qRT-PCRによって評価することができる。関心対象の細胞表面マーカーを発現している操作型 T細胞をフローサイトメトリーにより判定する。操作型 T細胞を本明細書に記載の適切な方法論、例えばCRISPR-Cas、talen、メガヌクレアーゼ、亜鉛フィンガー、またはsleeping beautyトランスポゾン技術によってさらに操作してHLA遺伝子または 2M遺伝子に関連するエクソンを欠失させる。

【0359】

実施例20：CAR及びTCR構築物による T細胞の操作

腫瘍細胞を特異的に認識して活性化されてそれを殺傷するように操作型 T細胞を導くことができる標的指向性部分を発現させるために、レトロウイルスまたはレンチウイルスに基づくベクターを T細胞に形質導入する。形質導入された標的指向性部分は、腫瘍に特有の表面タンパク質または腫瘍に特有の細胞内ペプチドを指向するMAbを含む。

T細胞は、ペプチド-MHC複合体を指向する高親和性TCRによってさらに操作される。

【0360】

あるいは、非ウイルス性ベクターによる形質導入によって細胞を操作することができる。

【0361】

実施例21：単離された T細胞の標的指向性部分による操作

CAR構築物の構造は、種々の主要な機能的ドメイン、腫瘍細胞上に提示された関心対象のタンパク質またはMHC結合ペプチドを認識する標的部分、細胞膜を横切って細胞内活性化シグナル伝達ドメインと繋がっている膜貫通ドメインに細胞外受容体標的指向性要素を連結する短いスペーサーを含む。

【0362】

T細胞の表面に発現する標的部分受容体は、がん細胞上に発現する標的タンパク質に特異的に結合するように設計されることになる。腫瘍認識部分は、CD19、CD20、CD22、CD37、CD38、CD56、CD33、CD30、CD138、CD123、CD79b、CD70、CD75、CA6、GD2、アルファフェトタンパク質(AFP)、がん胎児性抗原(CEA)、CEACAM5、CA-125、MUC-16、5T4、NaPi2b、ROR1、ROR2、5T4、PLIF、Her2/Neu、EGFRvIII、GPMNB、LIV-1、糖脂質F77、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、PSMA、STEAP-1、STEAP-2、メソテリン、c-Met、CSPG4、PVRL-4、VEGFR2、PSCA、葉酸結合タンパク質/受容体、SLC44A4、Crypto、CTAG1B、AXL、IL-13R 2、IL-3R及びSLTRK6を含めた標的に対するものとして設計されることになる。

【0363】

標的部分受容体は、腫瘍細胞の表面に発現した腫瘍糖タンパク質に対して特異的である抗体の一部に由来するものであり得、あるいは操作型受容体は、既知の特異性を有するTCR受容体に由来するものであり得るかまたは、gp100、MART1、チロシナーゼ、SSX2、SSX4、NYESO-1、上皮腫瘍抗原(ETA)、MAGEAファミリー遺伝子(例えば、MAGEA3、MAGEA4)、KKLC1、突然変異したN及びK及びHras、Braf、p53、MHCクラスI鎖関連分子A(MICA)、MHCクラスI鎖関連分子B(MICB)もしくは、HPV、EBVもしくはCMVの1つ以上の抗原を含めた、MHC複合体と結び付いて表面に提示される細胞内腫瘍特異抗原に由来する特異ペプチド配列を認識する抗体に由来するものであり得る。そのような高親和性のT細胞受容体様腫瘍認識部分は、ペプチド-MHC複合体を高度な特異性で以て認識するであろう。

【0364】

実施例22：スペーサー及び膜貫通ドメインを有する標的指向性部分構築物

操作型T細胞のがん細胞に対する効力を最適化すべく、種々のスペーサーは腫瘍認識部分構築物の中へと操作されることになる。各スペーサーの大きさは、標的タンパク質の大

10

20

30

40

50

きさ、受容体によって認識されるエピトープ、操作される腫瘍認識部分の大きさ、及び受容体の親和性によって様々であろう。配座変化を許容できるスペーサーは、ヒト I g G、C D 8 a 及び C D 4 ヒンジ領域の配列を含む。

【0365】

試験されるスペーサーは、向上した結合親和特性を有するキメラ受容体を提供するために、異なる長さ（19～9残基）で使用される G l y、S e r 及び T h r アミノ酸からなる。各構築物のヒンジ及び膜貫通部分は、C D 8 a 配列（ヒト C D 8 a の残基 117～178）に由来するか、あるいは C D 28 膜貫通ドメイン（残基 153～179）を有するヒト I g G 1 ヒンジ - F c c D N A に由来する。

【0366】

実施例 23：共刺激ドメインを有する標的指向性部分構築物

種々の共刺激ドメインは、腫瘍認識部分を含む構築物の中へと操作されることになる。C D 28、4-1BB、C D 2、C D 27、N K G 2 D、D A P 10、D A P 12、C D 161、C D 30、J A M L、T L R、C D 244 または C D 100 共刺激シグナル伝達ドメインを含む共刺激ドメインを T 細胞の中へと操作して、キメラ受容体を介して活性化を増幅する「第2シグナル」を模倣し、結果として、より堅牢なシグナルが増大してがん細胞を殺傷することにつながる。

【0367】

細胞質側領域は、C D 28（残基 180～220）、C D 137（残基 214～255）、I C O S（残基 165～199）C D 27（残基 213～260）N K G 2 D（残基 1～51）、J A M L（残基 297～394）C D 2（残基 236～351）、C D 30（残基 408～595）O X 40（残基 1～23）、H V E M（残基 224～283）または C D 46 分子を含めた 及び/または T 細胞共刺激分子の細胞内ドメインに由来するものである。最適な構築物は、誘導される細胞の細胞傷害性に関する操作型 T 細胞集団の活性化度に基づいて、かつ試験管内及び生体内でのサイトカイン分泌度に基づいて選択される。

【0368】

実施例 24：C D 3 活性化ドメインを含む標的指向性部分

3つの I T A M ドメイン（I T A M 1：A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R、（配列番号：5）；I T A M 2：P Q R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M、（配列番号：6）；及び I T A M 3：E R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q、（配列番号：7））を含有する細胞内 C D 3（残基 52～164）をクローニングした。

【0369】

T C R の細胞内ドメインを、プライマー 5' A G A G T G A A G T T C A G C A G G A G C G C A - 3'（配列番号：8）及び逆方向プライマー 5' C T C G A G T G G C T G T T A G C C A G A - 3'（配列番号：9）を使用して精製した。

【0370】

マルチステップオーバーラップ伸長 P C R によって C A R 構築物を作り出す。オーバーラップ伸長ポリメラーゼ連鎖反応プロトコルを用いて P l a t i n u m T a q D N A P o l y m e r a s e H i g h F i d e l i t y キット（I n v i t r o g e n）を後に伴うプライマーによって促される別個の P C R 反応において、生成物を融合させた。完全長構築物をコードする D N A を M S G V 1 レトロウイルスベクターにライゲートした。構築物は、C D 3 活性化ドメインを含んでいる C A R 標的指向性部分をもたらす。

【0371】

実施例 25：1つより多い認識部分による T 細胞の操作

同じ細胞内腫瘍特異タンパク質を指向する腫瘍認識部分を含んでいる1つより多い構築物（T C R 及び M A b を含む）を、T 細胞に形質導入する。各構築物は、A 2 及び A 1 などの種々の M H C ハプロタイプと関連付けて特異ペプチドを認識するように選択され、同じ腫瘍細胞に発現する異なる標的を指向する抗体であるかまたは、同じ標的上の異なる

10

20

30

40

50

るエピトープを指向する抗体である。

【0372】

実施例26：操作型 T細胞の試験管内での増殖

適切な組織培養用培地、例えば以前の実施例に記載されている組織培養用培地を使用して操作型 T細胞を成長及び増殖させる。37 で5%CO₂のインキュベータ内で操作型 T細胞を、外部抗原による刺激を伴うかまたは伴わずに、かつAPCまたはアミノホスフェートとの共培養を伴わずに、約1×10⁶個にまで指数関数的に成長させる。

【0373】

実施例27：活性化された操作型及び非操作型 T細胞によって放出されるサイトカインの機能特性評価

IFN-、TNF- (R&D Systems)、IL-1、IL-2、(Biosource International)、IL-12 (Diaclone Research)、IL-6、及びIL-18の発現は、市販の酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キットを使用して測定されることになる。酵素結合免疫吸着アッセイは、製造業者による指示事項に従って実施されることになる。ヒトサイトカインに対するモノクローナルマウスIgG1が0.05Mの炭酸水素ナトリウム緩衝液中1µg/mLの濃度で塗布されて4 で一晩経ったポリスチレン製96ウェルプレート (Maxisorb、Nunc) において、(24~72時間の) 様々な時点でサイトカインの量が測定されることになる。0.05%のTweenを含むPBSによる洗浄後にプレートは、PBST中3%のウシ血清アルブミン (BSA、wt/vol、Sigma) による遮断が37 で1時間行われることになる。標準 (R&D提供の組換えヒトサイトカイン) 及び、培養物試料からの上清が添加されることになり、プレートは室温で2時間インキュベートされることになる。検出は、組換えヒトサイトカイン標準に関して適合した抗体対を使用して実施する。

【0374】

実施例28：共刺激剤の同定

種々の共刺激剤が操作型及び非操作型 T細胞の活性化、増殖及び生存能を支援する能力を、全PBMCまたは濃縮された操作型もしくは非操作型 T細胞集団に対して共刺激剤を添加することによって試験する。抗 TCR特異的MAbを含めた種々の活性化剤に可溶性形態または固定化形態の共刺激剤を添加する。100IU/mLのrhIL-2が補充された完全RPMI-1640培地1mL中2×10⁶個の、以前の実施例に記載されているような健常ドナーのバフイーコートから精製されたヒトPBMC、または組織から単離されたリンパ球を、CD2、CD27、CD28、CD30、CD137、ICOS、CD161、CD122、CD244及びNKGD2に対する作動性抗体または、刺激リガンド、例えば、CD70-FC (CD27に対するリガンド)、MICA、MICB及びULBP (NKGD2に対するリガンド)、4-1BB (CD137に対するリガンド) ならびにPillar9 (CD161に対するリガンド) が可溶性であるかまたは固定された状態で存在しているかまたは存在していない、2~10µgの抗 TCR抗体を有する24ウェル平底組織に播種する。

【0375】

実施例29：サイトカイン支援による活性化

種々のサイトカインが操作型及び非操作型 T細胞の活性化、増殖及び生存能を支援する能力を、全PBMCまたは濃縮された操作型もしくは非操作型 T細胞集団に対してサイトカインを添加することによって試験する。サイトカインによる活性化支援を試験するために、別個の細胞培養物に100IU/mLの種々のサイトカインを3日ごとに個別に添加する。試験されるサイトカインには、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-33、IL-21、IL-18、IL-19、IL-4、IL-9、IL-23、IFN-及びIL1が含まれる。選定された期間の最後に細胞の試料を採取し、細胞集団の組成、すなわち T細胞、 T細胞、B細胞及びNK細胞の百分率をフローサイトメトリーによって決定する。

10

20

30

40

50

【0376】

細胞を培養下に保ち、選択された集団の増殖を14日目及び21日目に試験する。

【0377】

実施例30：活性化によって誘導されるV₁+、V₂+ T細胞集団は腫瘍細胞に対して細胞傷害性である

選択的に活性化され濃縮された本発明の1及び2 T細胞集団の細胞傷害性を決定するために、Ficoll paque PLUS (GE Healthcare #17-1440-02) 密度勾配遠心分離法を用いて、正常ドナーから得られたバッフィーコートからPBMCを単離し、(ペニシリン/ストレプトマイシン、L-グルタミン及び100 IU/mLのヒト組換えIL2が補充されたRPMI 1640中に10%のウシ胎仔血清を含む) R2培地中1×10⁶細胞/mLで24ウェルプレートに播種した。

10

【0378】

0日目に、1 µg/mLの1特異的MAb (TS1、TS8.2) または2特異的MAb (15D、B6) のどちらかが塗布されたプレートに細胞を播種してPBMC集団中の細胞を活性化させた。50%の培地交換を3日目及び5日目に実施した。7日目に、活性化させた細胞を、いかなるMAb被覆も有さない6ウェル培養皿に移し、増殖させ、14日目まで約1×10⁶細胞/mLに維持した。V₁+及びV₂+の活性T細胞の培養を進行させるために、抗マウスIgGマイクロビーズ (Miltenyi #130-048-401) に結合させたIP26モノクローナル抗体 (Biolegend #306702) を使用して、T細胞の、正の選択ならびに1及び2活性培養物からの除去を行った。これにより、図31で示されているように高度に濃縮されたV₁+及びV₂+ T細胞集団がもたらされた。正の選択がなされたT細胞も採集した(を濃縮した)。これらの濃縮されたV₁+、V₂+及びT細胞培養物を22日目までR2培地中に維持した。

20

【0379】

22日目に、濃縮された培養物の1及び2 T細胞組成を、フローサイトメトリー表面TCR染色によって1、2及び3に対するそれぞれTS8.2、B6及びIP26抗体を使用して決定した。高度に濃縮された培養物は、V₁+ (TS8.2+)、V₂+ (B6+) 及び3 (IP26+) T細胞をそれぞれ92%、98%及び99%含有していた。

30

【0380】

V₁+、V₂+及び3 T細胞集団についての試験管内での細胞毒性アッセイ
V₁+、V₂+及び3 T細胞培養物の細胞傷害性を評価するために、エフェクター細胞を標的細胞株と共に10:1の比で6時間インキュベートした。このアッセイで試験した標的細胞株は、固形腫瘍細胞株BxPc3 (ATCC (登録商標) CRL-1687 (商標)) 膵臓腺癌及びSK-MEL-5 (ATCC (登録商標) HTB-70 (商標)) ヒトメラノーマ、ならびに血液B腫瘍細胞株RPMI 8226 (ATCC (登録商標) CCL-155 (商標)) を含んでいた。Cytotox Glo試薬 (Promega Cat #) を使用して細胞死を測定した。特異的溶解%は、以下の式:

$$\text{特異的溶解\%} = \left(\frac{(T_{Exp}) - (T_{spon} + E_{spon})}{T_{100\%} - T_{spon}} \right) \times 100$$

40

を使用して算出した。

【0381】

高度に濃縮されたV₁+、V₂+及び3 T細胞培養物を、BxPc3、SKMEL5及びRPMI 8226細胞株の殺傷に関して試験した。図32で示されているように、V₁+ T細胞は、上皮腫瘍細胞株BxPc3及びSKMEL5ならびに形質細胞腫瘍細胞株RPMI 8226の殺傷を示すが(図32A)、V₂+ T細胞は、主にRPMI 8226に対する効力を示し、固形腫瘍細胞株に対する効果がより小さかった。3 T細胞

50

は細胞傷害活性を何ら示さない。

【0382】

実施例31：増殖済み T細胞の試験管内での抗腫瘍活性

様々な腫瘍細胞株及び原発腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を、エフェクター対標的の1：1～40：1の比で試験した。腫瘍細胞株及び原発腫瘍細胞の溶解を、細胞内酵素である乳酸脱水素酵素の遊離を検出することによって測定する。操作された腫瘍認識部分を培養物中で発現している T細胞の百分率をフローサイトメトリー、ELISA及び/またはELISPOTアッセイによって測定する。

【0383】

実施例32：生体内での抗腫瘍活性

ヒト腫瘍異種移植片が生着した免疫不全マウス、またはhuPBMC-NOG (Tac onic) マウス、または上記のようなヒト化免疫系を有するマウスのコホートに、結腸、乳房、卵巣、腎臓、頭頸部、前立腺、膀胱、口腔、膵臓及び肝臓のがんを含めた患者由来の腫瘍または腫瘍細胞株から得られた細胞を皮下または同所に注射し、平均の大きさを50～100mm³に達せしめる。濃縮または単離された、ナイーブ T細胞か操作型 T細胞かのどちらかを、様々な用量でマウスに静脈注射するかまたは腫瘍内に直接注射する。腫瘍退行は、 T細胞投薬後の腫瘍体積の減少として定義され、特定兆候に対する未処置の標準的医療と比較される。ある実験では、ナイーブ T細胞または操作型 T細胞をGFPまたはルシフェラーゼで標識して腫瘍保有マウスに注射し、それらの持続及び帰巢を追跡する。研究の最後に腫瘍を採取し、GFP陽性細胞をフローサイトメトリー及び免疫組織化学によって分析した。

【0384】

実施例33．抗体特異的活性化によって誘導されるV₁及びV₂集団の多クローン性TCR多様性

TS8.2及びB6で活性化された集団からTCR鎖を増幅してクローニングした。1特異的活性化mAb TS8.2及び、2特異的MAb B6による14日間の特異的活性化の後にPBMC培養物を採取した。PBMC培養物を350µlのRLT緩衝液(Qiagen)中に溶解させ、Qiagen RNeasy Mini Kit(Qiagen、カタログ番号74106)を製造業者による指示事項に従って使用して5×10⁵個の細胞から全てのRNAを精製した。手短に述べると、350µlの70%エタノールを細胞溶解物に添加して理想的な結合条件を提供した。その後、溶解物をRNeasyシリカ膜スピンカラムに装填した。汚染物質を洗い流した。濃縮されたRNAを50µlの水中に溶出させた。

【0385】

One step RT-PCR：完全長デルタ鎖は、5' 1 (5' GCCCAGAAAG GTTACTCAAGCCCAAGTC3')及び5' 2 (5' GCCATTGAGTTGG TGCCCTGAACACC3')プライマーを3' ヒトC (5' TTACAAGAAAAA TAACTTGGCAGTCAAGAGAAA3')プライマーと組み合わせて使用して増幅された。完全長デルタ鎖の800bpのPCR断片をpCI発現ベクター(Promega カタログ番号E1841)の中にクローニングした。同様に、完全長ガンマ鎖は、5' プライマー 2、 3、 4 (5' TCTTCCAACCTTGGAAGGGAGAAC GAAGTC3')、 5 (5' TCTTCCAACCTTGGAAGGGGGGAACGA3')、 8 (5' TCTTCCAACCTTGGAAGGGGAGAACAAAGTC3')、 9 (5' GCAGGTCACCTAGAGCAACCTCAAATTTCC3')を単一の3' Cガンマプライマー(5' GGAAGAAAAAATAGTGGGCTTGGGGGA3')と組み合わせて使用して増幅された。

【0386】

逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用いて100ngの全RNAからデルタ及びガンマ転写産物を増幅した。TS8.2 MAbで活性化された各試料(1、2～4、5、8及び9)につき合計5つのRT-PCR反応を進行させ、B

10

20

30

40

50

6 MAbで活性化された各試料(2及び 9)につき2つのRT-PCR反応を進行させた。QIAGEN One Step RT-PCRキットを増幅のために使用した(Qiagen, Inc.)。このキットは、Sensiscript逆転写酵素及びOmniscript逆転写酵素、HotStarTaq DNAポリメラーゼ、dNTPミックス、緩衝液及び、「困難な」(例えばGCに富む)鋳型の効率的な増幅を可能にする新規添加剤であるQ液の混合物を提供するものである。5µlのRNA、0.5の100µMのデルタ鎖プライマーかガンマ鎖プライマーかのどちらか(IDTによる特注合成)、5µlの5xのRT-PCR緩衝液、1µlのdNTP、逆転写酵素とDNAポリメラーゼとを含有する1µlの酵素ミックス、及び0.4µlのリボヌクレアーゼ阻害剤RNasin(1ユニット)を含む、反応混合物を調製した。反応混合物は、逆転写及びPCRの両方に必要とされる試薬を全て含有する。熱サイクラーのプログラムは、RTステップ50を30分間、95を15分間、続いて30サイクルの(95を30秒間、48を30秒間、72を1.0分間)であった。その後には、72で10分間の最終インキュベーションが存在した。抽出されたPCR産物をpCI発現ベクターの中に直接クローニングした。IMG_Tを用いてヌクレオチド配列を解析し、最も高い配列相同性を有する生殖細胞系V、D及びJ遺伝子メンバーを同定した。

10

【0387】

TS8.2で活性化されたV1鎖のCDR3の配列の例(接合部の多様性を太字で示す)：

TS8.2で活性化されたクローン1 V1、J1

20

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALT
ISALQLEDSAKYFCALGPVVI PKGKLSFGKGTRVTVEP

TS8.2で活性化されたクローン2 V1、D3、J1

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQNAKS. GRYSVNFKKA AKSVALT
ISALQLEDSAKYFCALGELCLGDTYTDKLI FGKGTRVTVEP

30

TS8.82で活性化されたクローン3 V1、D2+D3、J1

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALT
ISALQLEDSAKYFCALGDPKVYWGCTDKLI FGKGTRVTVEP

TS8.2で活性化されたクローン4 V1、D3、J1

40

AQKVTQAQSSVSMPVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQDAKSGRYSVNFKKA AKSVALT
ISALQLEDSAKYFCALGTGVRGLQDADKLI FGKGTRVTVEP

TS8.2で活性化されたクローン5 V1 D1+D3、J1

50

AQKVTQAQSSVSM PVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALT I
SALQLEDSAKYFCALLGDT SFYTDKLI FGKGTRVTVEP

TS8.2で活性化されたクローン6 V 1 D1+D3、J1

AQKVTQAQSSVSM PVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALT I
SALQLEDSAKYFC AALLPFLPSDWGIPVTDKLI FGKGTR
VTVEP

10

TS8.2で活性化されたクローン7 V 1、D2及びD3、J1

AQKVTQAQSSVSM PVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALT I
SALQLEDSAKYFCALGTGVRGLQD TDKLI FG TGTRVTVE
P

TS8.2で活性化されたクローン8 V 1、D2及びD3、J1

AQKVTQAQSSVSM PVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALT I
SALQLEDSAKYFCALGGLSSLDLGD TDNHYTDKLI FGKG
TRVTVEP

20

TS8.2で活性化されたクローン9 V 1、D2及びD3、J1

AQKVTQAQSSVSM PVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQ
LPSKEMIFLIRQGSDEQNAKSGRYSVNFKKA AKSVALT I
SALQLEDSAKYFCALGHPRSLMGVYTDKLI FGKGTRVTV
EP

30

【0388】

TS8.2 Mabで活性化されたガンマ鎖の例：

B8 TS8.82で活性化されたクローン-1 γ 4、J1/J2

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSTGYIHWY LHQ
EGKAPQRLLYYDSYTSSVLES GISPGKYDTYGSTRKNL
RIILRNLIENDSGVYYCATWDDGKKLFGSGTTLVVT

40

B8 TS8.82で活性化されたクローン-2 9、JP1

AGHLEQPQISSSTKTL SKTARLECVVSGITISATSVYWYR
ERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI PETS
TSTLTIHNVEKQDIATYYCALWDDTRLGKKIKVFAPGTK
LIIT

TS8.2で活性化されたクローン-3 4、J1

50

SSNLEGR TKSVIRQTGSSAEITCDLAE GSTGYIHWY LHQ
EGKAPQRLLYYDSYTSSVVLESGISP GK YDTYGSTRKNL
RMILRNLIENDSGVYYCATWSDK K LFGSGTTLVVT

TS8.2で活性化されたクローン - 4 9、J1/J2

AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATS VYWYR
ERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI PETS
TSTLTIHNVEKQDIATYYCALWIHK K LFGSGTTLVVT

10

TS8.2で活性化されたクローン5 2、J1

SSNLEGR TKSVIRQTGSSAENTCDLAE GSNGYIHWY LHQ
EGKTPQRLLQYYDSYNSKV VLESGVSPGKYTYASTRNNL
RLILRNLIENDSGVYYCATWDCHYK K LFGSGTTLVVT

TS8.2で活性化されたクローン6 3、JP2

SSNLEGR TKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTFYIHWY LHQ
EGKAPQRLLYYDVSTARDVLESGLSPGKYTYHTPRRWSW
ILRLQNLIENDSGVYYCATWDRRWIKTF AKGTKLIVTSP

20

TS8.2で活性化されたクローン7 2、JP1

SSNLEGR TKSVIRQTGSSAEITCDLAE GSNGYIHWY LHQ
EGKAPQRLLQYYDSYNSKV VLESGVSPGKYTYASTRNNL
RLILRNLIENDSGVYYCATWDGLDATCGVDTTGWFKIFA
EGTKLIVTSP

TS8.2で活性化されたクローン8 4、J1/J2

SSNLEGR TKSVTRPTGSSAVITCDLPVENAVYTHWY LHQ
EGKAPRLLYYDSYTSSVVLESGISP GK YDTYGSTRKNL
RMILRNLIENDSGVYYCATK K LFGSGTTLVVT

30

TS8.2で活性化されたクローン9 9、JP1

AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATS VYWYR
ERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI PETS
TSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEIASQLG K KIKVFGPGT
KLIIIT

TS8.2で活性化されたクローン10 3、J1

SSNLGGRTKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTFYIHWY LHQ
EGKAPQRLLYYDVSTARDVLESGLSPGKYTYHTPRRWSW
ILRLQNLIENDSGVYYCATWDRYYYK K LFGSGTTLVVT

40

TS8.2で活性化されたクローン11 3、JP2

SSNLEGR TKSVTRQTGSSAEITCDLTVTNTFYIHWY LHQ
EGKAPQRLLYYDVSTARDVLESGLSPGKYTYHTPRRWSW
ILRLQNLIENDSGVYYPNSSDWIKTF AKGTKLIVTSP

TS8.2で活性化されたクローン12 4、J2

50

SSNLEGGTKSVTRPTRSSAEITCDLAERNIFYIHWYLLHQ
 EGKAPQRLQYYDSYTS SVVLESGISPGKYDTYGSTRKNL
 RMILRNLIENDSGVYYCATRDVPNYYKKLFGSGTTLVVT
 TS8.2で活性化されたクローン13 2、JP1

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSNGYIHWYLLHQ
 EGKAPQRLQYYDSYNSKVVLESGVSPGKYTYASTRNNL
 RLILRNLIENDSGVYYCATWDGRVSYTTGWFKIFAEGTK
 LIVTSP

10

TS8.2で活性化されたクローン14 4、J1/J2

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSTGYIHWYLLHQ
 EGKAPQRLLYYDSYTS SVVLESGISPGKYDTYGSTRKNL
 RMILRNLIENDSGVYYCATWDKGRKLFSGTTLVVT

TS8.2で活性化されたクローン15 9、J1

AGHLEQPQISSTKTL SKTARLECVVSGITISATSVYWYR
 ERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI PETS
 TSTLTIHNVEKQDIATYYCALWETHYKKLFGSGTTLVVT

20

TS8.2で活性化されたクローン16 2、J1

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSNGYIHWYLLHQ
 EGKAPQRLQYYDSYNSKVVLESGVSPGKYTYASTRNNL
 RLILRNLIENDSGVYYCATWDGRYKKLFGSGTTLVVT

TS8.2で活性化されたクローン17 4、JP1

SSNLEGRTKSVIRQTGSSAEITCDLAEGSTGYIHWYLLHQ
 EGKAPQRLLYYDSYTS SVVLESGISPGKYDTYGSTRKNL
 RMILRNLIENDSGVYYCATWGTTGWFKIFAEGTKLIVTS
 P

30

【0389】

B8(バッフィーコート8) - B6で活性化されたクローン:

B6で活性化されたクローン 2、D3、J1

AIELVPEHQTVPVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYR
 KTQGNTMTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLK
 ILAPSERDEGSYYCACDKVLGVPTASYTDNKLI FGKGTR
 VTVEP

B6で活性化されたクローン 2、D3、J1

40

AIELVPEHQTVPVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYR
 KTQGNTMSFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLK
 ILAPSERDEGSYYCACDTVGI LPYDKLI FGKGTRVTVEP

B6で活性化されたクローン 2、D2+D3、J1

AIELVPEHQTVPVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYR
 KTQGNTMTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLK
 ILAPSERDEGSYYCACDILT VLGDNRTDKLI FGKGTRVT
 VEP

50

B 6 で活性化されたクローン 2、D 3、J 1

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R
 K T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K
 I L A P S E R D E G S Y Y C A C D V V G E G G A D K L I F G K G T R V T V E P

B 6 で活性化されたクローン 2、D 3、J 1

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R
 K T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K
 I L A P S E R D E G S Y Y C A C D T V G G G E Y T D K L I F G K G T R V T V E
 P

10

B 6 で活性化されたクローン 2、D 3、J 1

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R
 K T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K
 I L A P S E R D E G S Y Y C A C D T V G T G D I R T Y T D K L I F G K G T R V
 T V E P

B 6 で活性化されたクローン 2、D 2 + D 3、J 1

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R
 K T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K
 I L A P S E R D E G S Y Y C A C D S L T G G S G L T D K L I F G K G T R V T V
 E P

20

B 6 で活性化されたクローン 2、D 3、J 3

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R
 K T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K
 I L P P S E R D E G S Y Y C A C D T G G Y S S W D T R Q M F F G T G I K L F V
 E P

30

B 6 で活性化されたクローン 2、D 2 + D 3、J 1

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R
 K T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K
 I L A P S E R D E G S Y Y C A C D P L K T L G T Y T D K L I F G K G T R V T V
 E P

B 6 で活性化されたクローン 2、D 1 + D 3、J 1

A I E L V P E H Q T V P V S I G V P A T L R C S M K G E A I G N Y Y I N W Y R
 K T Q G N T M T F I Y R E K D I Y G P G F K D N F Q G D I D I A K N L A V L K
 I L A P S E R D E G S Y Y C A C D A V I A G G S F T D K L I F G K G T R V T V
 E P

40

【 0 3 9 0 】

B 6 で活性化されたガンマ鎖：

B 6 で活性化されたクローン 9、J P 1

A G H L E Q P Q I S S T K T L S K T A R L E C V V S G I T I S A T S V Y W Y R
 E R P G E V I Q F L V S I S Y D G T V R K E S G I P S G K F E V D R I P E T S
 T S T L T I H N V E K Q D I A T Y Y C A L W E D Q E L G K K I K V F G P G T K
 L I I T

50

B 6 で活性化されたクローン 9、JP 1

AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVYWYR
ERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI PETS
TSTLTIHNVEKQDIATYYCALWAYPPELGKKIKVFGPGT
KLIIT

B 6 で活性化されたクローン 9、JP 1

AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECAVSGITISATSVYWYR
ERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI PETS
TSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEVQELGKKIKVFGPGTK
LIIIT

10

B 6 で活性化されたクローン 9、JP 1

AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVVCWYR
ERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI PETS
TSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEVLQELGKKIKVFGPGT
KLIIT

B 6 で活性化されたクローン 9、JP 1

AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVYWYR
ERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI PETS
TSTLTIHNVKKQDIATYYCALWEVRELGKKIKVFGPGTK
LIIIT

20

B 6 で活性化されたクローン 9、

JP1AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVY
WYRERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI P
ETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWRELGKKIKVFGPGT
KLIIT

30

B 6 で活性化されたクローン 9、

JP1AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVY
WYRERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI P
ETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEAQELGKKIKVFGP
GTKLIIT

B 6 で活性化されたクローン 9、

JP1AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVY
WYRERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI P
ETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWETELGKKIKVFGPG
TKLIIT

40

B 6 で活性化されたクローン 9、

JP1AGHLEQPQISSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVY
WYRERPGEVIQFLVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRI P
ETSTSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEEVELGKKIKVFGP
GTKLIIT

B 6 で活性化されたクローン 9、JP 1

50

AGHLEQPQISSTKTL SKTARLECVVSGITISATS VYWYR
ERPGEVIQFPVSI SYDGTVRKESGIPSGKFEVD RIPETS
TSTLTIHNVEKQDIATYYCALWEPPQSLGKKIKVFGPGT
KLIIT

【0391】

実施例34 .さらなる処理のための細胞バンクを生成するための、凍結保存用培地中での T細胞の凍結保存

非改変型 T細胞は、凍結保存用培地で製剤化されて、長期保管のために液体窒素冷凍庫(- 195)または超低温冷凍庫(- 65 、 - 80 または、 - 120)などの凍結保管ユニット内に置かれることになる。凍結保存用培地は、6.5 ~ 7.5の範囲の生理学的pH緩衝剤と共に、ジメチルスルホキシド(DMSO)、塩化ナトリウム(NaCl)、デキストロース、デキストランサルフェートまたはヒドロキシエチルデンプン(HES)を含有することになる。

10

【0392】

凍結保存された T細胞は、解凍されて、抗体、タンパク質、ペプチド及びサイトカインによる刺激によってさらに処理されることになる。凍結保存された T細胞は、解凍されて、本願において前述したように遺伝子改変されることになる。操作型 T細胞は、凍結保存用培地中に1mLあたり10⁶ ~ 10⁸細胞で10個、100個、200個のバイアル量の細胞バンクを生成するためにさらに凍結保存されることになる。非操作型及び/または操作型 T細胞は、凍結保存用培地中に1mLあたり10⁶ ~ 10⁸細胞で10個、100個、200個、500個及び1,000個のバイアルまたはバッグの量の細胞バンクを生成するためにさらに凍結保存されることになる。

20

【0393】

実施例35 .さらなる処理のための細胞バンクを生成するための、凍結保存用培地中での T細胞の代替的凍結保存

栄養補助及び、凍結解凍プロセス中の溶解からの生物物理学的細胞保護を提供するために、以前の実施例に記載されている凍結保護担体に他の凍結保護剤を添加する。これらとしては、例えば、D-グルコース、マンニトール、蔗糖、アデニン、グアノシン、組換えヒトアルブミン、シトレート、抗凝固剤、Benzonase、DNase、プロピレングリコール、エチレングリコール、2-メチル-2,4-ペンタンジオールが挙げられる。高細胞密度凍結製品に緩衝能を提供するように設計された追加の添加剤としては、例えば、無機リン酸塩、炭酸水素ナトリウム及びHEPESが挙げられる。

30

【0394】

実施例36 .さらなる処理のための細胞バンクを生成するための、凍結保存用培地中での T細胞の凍結保存

T細胞の初回凍結は、1分あたり - 0.1 ~ - 5 の凍結速度を実現するように設計された温度制御式定速法で、速度制御冷凍庫(例えば、CryoMed速度制御冷凍庫)または所望の凍結速度を提供する略遮熱型棚入システムを備えた機械的な - 70 の冷凍庫を使用して実施される。凍結細胞は、30 ~ 60日間以内の短期保管のために - 70 の冷凍庫に入れられる。12、24、36及び48ヶ月間までのより長い期間にわたって保管するためには、以前の節において記載されている方法によって測定される T細胞数及び細胞機能を低下させずに維持しつつ、凍結細胞を液体N₂保管タンクに入れる。

40

【0395】

この実施例に記載されている凍結保存細胞は、解凍され、適切な密閉容器内、例えば培養バッグ内及び/またはバイオリアクター内でさらに刺激されかつ増殖して、対象への投与のための適切な量の操作型 T細胞を生じさせることになる。

【0396】

実施例37 .患者への直接輸注のための T細胞の製剤化

操作型 T細胞を遠心分離及び/または膜透析濾過によって、凍結保護用賦形剤を含

50

有する生理学的緩衝液中 5×10^6 細胞 / mL ~ 10^8 細胞 / mL に濃縮し、長期保管のために凍結保管ユニット、例えば液体窒素または超低温冷凍庫の中に入れる。

【0397】

実施例38. がんに罹患しているヒト対象の処置

新鮮な、または凍結した操作型及び/または非操作型 T細胞をベッド脇で解凍し、ヒト対象に静脈内輸注する。1キログラムあたり約1細胞~1キログラムあたり約 1×10^{10} 細胞の操作型及び/または非操作型 T細胞を30~60分の期間にわたってヒト対象に輸注する。操作型 T細胞は、共刺激性サイトカインIL-2またはその他のサイトカインの支援を伴うかまたは伴わずに投与される。場合によっては手順を繰り返す。対象の生体内での T細胞の増殖は、フローサイトメトリーによって測定する。

10

【0398】

実施例39. 特異的 T細胞活性化物質の作出

マウス抗体の形態の T細胞活性化物質を、組換え可溶性ヒト TCRの免疫化によって生じさせた。8 1-TCR-FCを使用する免疫化によって 1特異的活性化物質を作り出し、9 2-TCR-FCを使用する免疫化によって 2特異的活性化物質を作り出し、どちらの構築物も、ヒトIgG1FCと融合した TCR鎖の成熟ECDを含むものであった。3系統のマウス(Balb/c、CD-1及びFVB)にヒト組換え TCRを接種して、高親和性のマウスモノクローナル抗体活性化物質を分泌するハイブリドーマを生じさせた。

【0399】

h TCR-FC融合構築物をPCR増幅によって作り出した。8 1TCR鎖は、8 1TCRを発現しているT細胞白血病の細胞株であるBE13(DSMZ #ACC396)から単離したRNAから増幅された。9 2TCR鎖は、ゾレドロン酸活性化ヒトPBMCから単離したRNAから増幅された。可溶性 1TCR-FC及び 2TCR-FCは、一過的にトランスフェクトされたHEK293細胞の上清から精製された。10µgの可溶性TCRを等体積のTITERMAX(登録商標)Gold(Sigma Aldrich)またはImject Alum Adjuvant(Thermo Fisher)で乳化させて各マウスの免疫化のために使用した。結果として生じた乳剤をその後、6匹のマウス(各々2匹ずつ: Balb/c、CD-1及びFVB)に足蹠を介して注射した。

20

30

【0400】

固相ELISAアッセイを用いてヒト TCRに特異的なマウスIgG抗体のためにマウス血清をスクリーニングした。手短に述べると、ELISA塗布用緩衝液中1µg/mlの組換え TCRを96ウェルプレート(VWR International、カタログ番号610744)に塗布して一晩置いた。0.02%(v/v)のTween 20を含有するPBSで洗浄した後、200µL/ウェルのPBS中3%(w/v)のBSAによるウェルの遮断を室温(RT)で1時間行った。マウス血清の力価測定(1:100、1:200、1:400、及び1:800)を行い、50µL/ウェルを、TCRが塗布されたプレートに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、その後、3%BSA-PBSまたはFCSを2%含むPBSによるHRP標識ヤギ抗マウスIgGの1:10,000希釈物50µL/ウェルと共に、室温で1時間インキュベートする。再びプレートを洗浄し、室温で15分間、40µL/ウェルのTMB基質溶液(Thermo Scientific 34028)を添加しておく。発色後、等体積の2N H2SO4を添加して基質発色を止め、プレートを分光光度測定器によってOD 450で分析した。

40

【0401】

血清陽性免疫化マウスを 殺し、(膝窩部及び鼠径部の)流入領域リンパ節を切り出して抗体産生細胞源として使用した。B細胞の単一細胞懸濁液(766×10^6 細胞)を電氣的融合によって非分泌性P3x63Ag8.653骨髓腫細胞(ATCC #CRL-1580)と1:1の比で融合させた。電氣的融合は、BTX Hybrimmune(

50

商標)システム(BTX Harvard Apparatus)を製造業者の指示事項に従って使用して実施した。融合後、アザセリン(Sigma #A9666)、ピルビン酸ナトリウムを含む高グルコースDMEM培地(Cellgro カタログ番号15-017-CM)が補充された、15%のFetal Clone I血清(Hyclone)、10%のBM Condimed(Roche Applied Sciences)、4 mMのL-グルタミン、100 IUのペニシリン-ストレプトマイシン及び50 µMの2-メルカプトエタノールを含有するハイブリドーマ選択培地中に、細胞を再懸濁させ、その後、3本のT150フラスコにおいてフラスコ1本につき50 mLの選択培地中に播種した。その後、5%のCO₂及び95%の空気を含有する37 °Cの加湿インキュベータ内にフラスコを6~7日間置いた。

10

【0402】

6日間成長させた後、T150フラスコ内でまとまって成長した細胞からなるライブラリーを、Aria II細胞選別機を使用して1ウェルあたり1細胞でFalcon 384ウェル平底プレートに播種した。その後、15%のFetal Clone I血清(Hyclone)、10%のBM-Condimed(Roche Applied Sciences)、1 mMのピルビン酸ナトリウム、4 mMのL-グルタミン、100 IUのペニシリン-ストレプトマイシン、50 µMの2-メルカプトエタノール及び100 µMのヒポキサンチンを含有する90 µLの培養用培地中で、選択されたハイブリドーマを成長させた。残った未使用のハイブリドーマライブラリー細胞は全て将来のライブラリー試験のために冷凍した。10日間成長させた後、細胞が播種された各ウェルの上清を、1 TCRに対して反応する抗体に関してELISA及びFACSアッセイで評価した。

20

【0403】

FACSによるスクリーニングのために、フローサイトメトリーに基づくアッセイを用いて、マウス免疫グロブリンを分泌しているハイブリドーマのウェルをヒト 1 / TCR 特異性に関してスクリーニングした。1 8 TCR を発現しているBE13細胞、または 2 9 TCR を発現しているゾレドロン酸処理済みヒトPBMCを氷上で25 µLのハイブリドーマ上清と共に60分間インキュベートした。細胞を2%FCSのPBSで2回洗浄し、その後、PEに結合した二次ヤギ抗マウスIgG Fc断片特異体のPBS / 2%FCSによる1 : 300希釈物50 µLと共にインキュベートした。15分間インキュベートした後、細胞をPBS / 2%FCSで2回洗浄し、DAPIを含むPBS / 2%FCS中に再懸濁させ、FACS Cantoを製造業者の指示事項に従って使用してフローサイトメトリーで分析した。BE13細胞に優先的に結合した免疫グロブリンを含んでいるウェルを増殖させ、ELISAアッセイによって 1 特異性に関してさらに試験した。ゾレドロン酸で活性化されたPBMC細胞に優先的に結合した免疫グロブリンを含んでいるウェルを増殖させ、ELISAアッセイによって 2 特異性に関してさらに試験した。

30

【0404】

下記 TCR鎖: 8 1、8 2、9 1及び 9 2を対合させることによって作り出した可溶性 TCRタンパク質を、高結合能ELISA 96ウェルプレートに塗布した。可溶性TCRは、炭酸水素ナトリウム緩衝液で1 µg / mlに希釈して4 40 で一晩置いてから使用した。プレートを洗浄し、PBS / Tween中3%のBSAによる遮断を37 °Cで1時間行い、すぐさま使用したか、または4 °Cに保った。プレート上で未希釈のハイブリドーマ上清を室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、3%BSA-PBSで1 : 10,000に希釈されたHRP標識ヤギ抗マウスIgGによる探査を室温で1時間行った。その後、プレートを上記の基質溶液と共にインキュベートし、OD450で読み取った。バックグラウンドより高い信号によって判定された、ヒト 1 TCR鎖に優先的に結合した免疫グロブリンを含んでいるウェルを移し、増殖させた。

【0405】

結果として生じた 1 及び 2 TCR特異的クローン性ハイブリドーマをCS-10凍結保存用培地(Biolife Solutions)中で凍結保存し、液体窒素中で保

50

管した。

【0406】

実施例40. 1 - 及び 2 - 特異的活性化物質の配列決定

特異的に 1 T細胞に結合してそれを活性化及び増殖させる典型的な別個のモノクローナル抗体を配列決定及びさらなる解析のために選択した。以下の表に示すように、実施例39で作りに出した選定 1 - TCR特異的モノクローナル抗体の重鎖可変領域(図33)及び軽鎖可変領域(図34)の配列解析は、新規な相補性決定領域及び、新規なVDJ構成の提示を裏付けた。図33~34に示す相補性決定領域は、Kabataによる定義に倣うものである。特異的に 2 T細胞に結合してそれを活性化及び増殖させる典型的な別個のモノクローナル抗体を配列決定及びさらなる解析のために個別に選択した。以下の表に示すように、実施例39で作りに出した選定 2 - TCR特異的モノクローナル抗体の重鎖可変領域(図35)及び軽鎖可変領域(図36)の配列解析は、新規な相補性決定領域、及び新規なVDJ構成の提示を裏付けた。図35~36に示す相補性決定領域は、Kabataによる定義に倣うものである。

10

【0407】

RNeasy単離キット(RNeasy Mini Kit Qiagen #74106)を使用して、選択されたハイブリドーマ細胞から全てのRNAを抽出した。10⁴個のハイブリドーマ細胞を350µlのRLT緩衝液中に溶解させ、等体積の70%エタノールを添加し、試料をRNeasy Minisピンカラムに装填した。カラムを2回洗浄し、直接ピンカラム膜に掛けた100µlのRNase不含有水でRNAを溶離させた。RNA製剤の品質は、使用時まで-80℃で保管する前に3µLを1%アガロースゲルに分取することによって決定した。

20

【0408】

完全マウスVHレパートリーを標的とするように設計された32個のマウス特異的リーダー配列プライマーを含んでいる5'プライマーミックスを、全てのマウスIgアイソタイプに対して特異的である3'マウスCプライマーと組み合わせて使用して、各ハイブリドーマのIg重鎖の可変領域を増幅した。同じPCRプライマーを使用して、VHの400bpのPCR断片の配列決定を両端から行った。同様に、各Vマウスファミリーを増幅するように設計された32個の5'Vリーダー配列プライマーのミックスを、マウス定常領域に対して特異的である単一の逆方向プライマーと組み合わせて使用して、軽鎖の増幅及び配列決定を行った。逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を使用してVH及びVL転写物を100ngの全RNAから増幅した。

30

【0409】

各ハイブリドーマにつき合計8つのRT-PCR反応を進行させた: V軽鎖に対する4つと、V重鎖に対する4つ。One Step One Step Ahead RT-PCRキットを増幅に使用した(Qiagen #220213)。5µLのRNA、0.5の100µMの重鎖プライマーまたは軽鎖プライマーのどちらか(IDTによる特注合成)、DNAポリメラーゼと緩衝剤とdNTPとを含む12.5µLのmaster mix、逆転写酵素とDNAポリメラーゼとを含有する1µLの酵素ミックス、及び0.4µLのリボヌクレアーゼ阻害剤RNasin(1ユニット)を含む、反応混合物を調製した。反応混合物は、逆転写及びPCRの両方に必要とされる試薬を全て含有する。熱サイクラーのプログラムは、RTステップ 50℃を10分間、95℃を5分間、続いて30サイクルのPCR(95℃を30秒間、58℃を30秒間、72℃を1分間)に設定した。その後には、72℃で10分間の最終インキュベーションが存在した。

40

【0410】

QIAquick(商標)PCR精製キット(Qiagen)を製造業者のプロトコールに従って使用して、DNA配列決定を直接行うためにPCR産物を調製した。50µLの滅菌水を使用してDNAをピンカラムから溶離させ、その後、両鎖から直接、特異的V領域プライマーを使用して配列決定を行った。VBase2を使用してヌクレオチド配列を解析し、最も高い配列相同性を有する生殖細胞系V、D及びJ遺伝子メンバーを同定

50

した。

【0411】

図33は、1特異的抗体からの重鎖可変領域の連続アミノ酸配列を描写する。図34は、軽鎖可変領域の対応する連続アミノ酸配列を描写する。まとめ合わせると、図33～34は、同定された機能可能な抗1TCR抗体の注記付きの配列を提供する。

【0412】

図35は、2特異的抗体からの重鎖可変領域の連続アミノ酸配列を描写する。図36は、軽鎖可変領域の対応する連続アミノ酸配列を描写する。まとめ合わせると、図35～36は、同定された機能可能な抗2TCR抗体の注記付きの配列を提供する。

【0413】

実施例41. 1特異的活性化物質の交差反応性

3つ目のガンマデルタ集団はV3T細胞であり、それは循環T細胞の約0.2%を占めている。

【0414】

V3T細胞は、血中では稀であるが、肝臓中ならびに、白血病及びいくつかの慢性ウイルス感染症を患う患者において豊富に存在する。他の小サブセットは、V4、V5、V6、V7及びV8のT細胞を含み、Cに各々接合されたVJ遺伝子からなり、別個のTCRアルファタンパク質及びデルタタンパク質をコードしている。

【0415】

8つの異なるデルタ鎖(V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7及びV8)からなる可溶性TCRと1特異的な特異的活性化物質との結合を検出する結合アッセイによって、交差反応性及び、1特異的活性化物質が他のT細胞集団と交差反応する能力について試験した。8つ全てのデルタ鎖をC末端Fc融合物としてクローニングし、-FC鎖と共に293細胞中へ共トランスフェクトして、可溶性TCR-Fcを培地中へと分泌させた。

【0416】

トランスフェクションの前日に、 1×10^5 細胞/ウェルの293付着細胞を12ウェルプレートに播種した。

【0417】

トランスフェクションの日に、無血清培地中の293fectin(商標)トランスフェクション試薬(ThermoFisher #12347019)を使用して0.5μgずつの各プラスミド(デルタ+ガンマ鎖)を共トランスフェクトした。

【0418】

トランスフェクションの3日後に、分泌されたTCRをELISAアッセイにおける結合性分析のために採集した。

【0419】

ELISA結合アッセイ

1μg/mLのヤギ抗ヒトFc(ヤギ抗ヒトIgG, Fc断片特異体-Jackson ImmunoResearch #109-005-098)が塗布されたELISA用プレートの表面に、可溶性TCR-Fcタンパク質を捕捉させた。結合は4で一晚実施した。プレートに捕捉された可溶性TCRと、1特異的な特異的活性化物質との結合を、遮断用緩衝液で1:10,000に希釈されたHRP結合二次抗体:ヤギ抗マウスFc特異体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Peroxidase-AffiniPureヤギ抗マウスIgG, Fc断片特異体 #115-035-008)による検出及びその後の各ウェルへのTMBの添加によって試験した。結果を図37に示す。

【0420】

1T細胞に加えて他のサブセットのT細胞と交差反応してそれを活性化させる能力は重要であり得る、というのも、クローン的に増殖したTRDV4及びTRDV8T細胞は、AMLを指向する免疫応答に寄与するが、TRDV5及びTRDV6は、再発を

10

20

30

40

50

被っている患者において発生する可能性がある、ということが示されたからである。(Jin et al. Journal of Hematology & Oncology (2016) 9:126)。

【0421】

実施例42．活性化及び増殖についてのアッセイ

T細胞の活性化及び増殖の誘導に関して 1及び 2 TCR特異的抗体を試験した。手短に述べると、50 mMのNaHCO₃中またはPBS中5 µg/mLのヤギ抗マウスFc-ポリクローナル抗体を48ウェルプレート(Corning)に塗布して一晩置いた。ウェルをPBSで洗浄し、さらに、PBS中1%のBSAによる遮断を37°Cで1時間行い、0.1%BSA中1 µg/mLの 1-TCR特異的抗体を2時間添加しておいた。細胞標識のために、新鮮な、または凍結したヒトPBMCを、完全培地中に一晩置いてその後に洗浄し、5 µMのCFSE(PBS)で再構成し、暗所にて常温で5分間インキュベートした。細胞をFBS含有培地で洗浄し、10%のFBS、2 mMのグルタミン、25 mMのHEPES及び200 IU/mLのrhIL-2を含有するRPMI-1640培養用培地で10⁶個/mLに再構成した。0.5 × 10⁶/ウェルのCFSE標識PBMCを播種し、5日間培養した。

10

【0422】

5日後に細胞を採取し、汎CD4、V₁、V₂及び 1 TCRに対する特異的表面マーカーで染色し、細胞増殖をCFSE蛍光の漸進的变化によって評価した。活性化の結果として5日間で分裂した細胞の百分率を図39に示し、活性化の効力に関して抗体を順位付けるために役立つ。

20

【0423】

実施例43．特異的MAbを使用するヒトPBMC由来のV₁及びV₂T細胞の1ステップ増殖

2%FBS(PBS)中1 µg/mLの選定された活性化 1-TCR抗体及び 2-TCR抗体(D1-08、D1-35、D1-39、D2-14、D2-17、D2-22、D2-30、D2-32、D2-33、D2-33、D2-35、D2-36、D2-37)及びOKT3を、上記実施例2と同様に、24ウェルプレートにおいて予め塗布されたヤギ抗マウスFc抗体に捕捉させた。細胞全体の0.2~0.28%の初期 1集団及び細胞全体の約0.2~4%のV₂集団を有する数名のドナーからのヒトPBMCを、10%のFBS、2 mMのグルタミン、100 IU/mLのrhIL-2を含有するRPMI-1640培地中10⁶個/mL/ウェルで播種した。2~3日ごとの培地補給によって、培養中の細胞に栄養補給した。7日目に細胞を採取し、活性化抗体を有さない新しいプレートに10⁶個/mLで再播種し、栄養補給の継続及び14日目の再播種によって10⁶個/mLの細胞密度にまでさらに増殖させた。21日目に細胞分析(計数及びフローサイトメトリー)を実施して 1及び 2細胞の純度及び増殖倍率を決定した。図40は、PBMC培養物中の 1(A)及び 2(B)細胞の増殖倍率を示す。V₁MAb及びV₂MAbは、21日間でV₁T細胞については約12000倍、V₂T細胞については6700倍にまで 1及び 2T細胞の増殖を誘導した。

30

【0424】

21日目の増殖済み 1細胞の表現型をCD27表面マーカー発現によって評価した。図41は、MAbで活性化されたV₁T細胞の21日目の表現型が主として(>50%)CD27+CD45RA+(ナイーブ)及びCD27+CD45RA-(セントラルメモリー)であることを示している。

40

【0425】

実施例44．臍帯血由来の 1-T細胞の1ステップ増殖

0.4%のV₁細胞を含有するヒト臍帯血からの単核細胞をFicoll密度勾配法によって単離し、実施例43に記載されているように、捕捉された 1TCR特異的抗体で活性化させた。以下の表に示すとおり、V₁T細胞は、 1特異的MAbによる活性化後に21日で1503倍にまで増殖した。

50

| D 1 抗体 | 増殖倍率、21日目 |
|-------------------|-----------|
| TS 8. 2 | 1 0 6 2 |
| δ 1 - 0 8 | 1 1 0 4 |
| δ 1 - 2 2 | 1 5 0 3 |
| δ 1 - 2 6 | 5 5 7 |
| δ 1 - 3 5 | 9 1 8 |
| δ 1 - 3 7 | 1 0 1 7 |
| D 1 - 3 9 | 1 0 3 9 |
| I m m u n o 5 1 0 | 4 6 0 |

10

【0426】

実施例45. フィーダー細胞を使用するV δ 1 T細胞の2ステップ増殖

この実施例では、実施例4に記載のプロトコールに従って、ヒトPBMCを活性化させ、 δ 1細胞を14日間増殖させた。手短に述べると、塗布されたヤギ抗マウスFcポリクローナル抗体によってV δ 1抗体TS-1、D1-08、D1-37、D1-39を24ウェルプレートに捕捉し、記載されているように細胞を活性化及び増殖させた。14日目に細胞培養物を採取し、ビオチン化抗TCR δ 1抗体と磁気マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)とを使用してT細胞を除去することによって δ 1 T細胞を濃縮した。濃縮されたV δ 1細胞を、照射済みPBMCフィーダー細胞を使用して第2ステップの活性化/増殖に供した。手短に述べると、10%のFBS、2mMのグルタミン、100IU/mLのIL-2及び30ng/mLのD1-35MAbを含有する20mLのRPMI-1640培地中で130,000個の全ての濃縮細胞を、照射済みヒト同種異系PBMCが200:1の比で存在する状態で培養した。培養物をT25フラスコ内に縦に入れた。18日目に、培地の70%を置き換えることによって細胞に栄養補給した。その時から2~3日ごとに培地の50%を交換すること及び生細胞密度を 1×10^6 個/mLに調節することによって細胞に栄養補給し、28日目に細胞を採取した。以下の表に示すように、 δ 1細胞は2ステップ増殖手順において約28,000倍にまで増殖した。

20

30

| 第1ステップ 活性化、MAb | 第2ステップ $\alpha\beta$ T細胞除去後の活性化/MAb | V δ 1増殖倍率 |
|-------------------|--|------------------|
| δ 1 - 3 7 | i PBMC / D 1 - 3 5 | 1 1 5 7 3 |
| δ 1 - 0 8 | i PBMC / D 1 - 3 5 | 2 7 9 6 5 |
| δ 1 - 3 9 | i PBMC / D 1 - 3 5 | 1 5 7 6 9 |

40

【0427】

実施例46. T細胞除去を伴わない、フィーダー細胞を使用するV δ 1 T細胞の2ステップ増殖

この実施例では、実施例6に記載のプロトコールに従って、0.2%の出発V δ 1集団を含むヒトPBMCを活性化させ、 δ 1細胞を7日間増殖させた。手短に述べると、塗布されたヤギ抗マウスFcポリクローナル抗体によってV δ 1抗体TS-1、D1-08、D1-37、D1-39を24ウェルプレートに捕捉し、記載されているように細胞を

50

活性化及び増殖させた。7日目に細胞培養物を採取し、増殖済み細胞を、照射済みフィーダー細胞を使用して第2ステップの活性化/増殖に供した。手短に述べると、10%のFBS、2mMのグルタミン、100IUのIL-2及び30ng/mLのD1-35MAbを含有する20mLのRPMI1640培地中で130,000個の全ての細胞を、照射済みヒト同種異系PBMCが200:1の比で存在する状態で培養した。培養物をT25フラスコ内に縦に入れた。12日目に、培地の70%を置き換えることによって細胞に栄養補給した。その時から21日目の採取まで、2~3日ごとに培地の50%を交換すること及び生細胞密度を10⁶個/mLに調節することによって細胞に栄養補給した。以下の表に示すように、1細胞は2ステップ増殖手順において約114,000倍にまで増殖した。

10

| 第1ステップ 活性化、MAb | 第2ステップ 活性化/MAb | Vδ1増殖倍率 |
|-------------------|-------------------|---------|
| TS-1 | iPBMC/D1-35 | 82298 |
| D1-37 | iPBMC/D1-35 | 113764 |
| D1-08 | iPBMC/D1-35 | 55348 |
| D1-39 | iPBMC/D1-35 | 81391 |

20

【0428】

実施例47. T細胞除去を伴いフィーダー細胞を使用するV δ 1T細胞の2ステップ増殖

この実施例では、実施例4に記載のプロトコールに従って、0.36%の出発V δ 1集団を含むヒトPBMCを活性化させ、V δ 1細胞を14日間増殖させた。14日目に細胞培養物を採取し、ビオチン化抗TCR抗体と磁気マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)とを使用してT細胞を除去することによってV δ 1T細胞を濃縮した。濃縮されたV δ 1細胞を、照射済みフィーダー細胞を使用して第2ステップの活性化/増殖に供した。手短に述べると、10%のFBS、2mMのグルタミン、100IU/mLのIL-2及び30ng/mLのD1-35MAbを含有する20mLのRPMI-1640培地中で濃縮細胞を、照射済みK562細胞が49:1、9:1及び2:1の比で存在する状態で培養した。指定比の培養物(それぞれ25x10⁶個の全ての生細胞)を6ウェルG-Rexフラスコ(Wilson Wolf)内に入れた。18日目に、培地の75%を置き換えることによって細胞に栄養補給し、21日目に細胞を採取した。以下の表に示すように、1細胞は2ステップ増殖手順において約31,000倍にまで増殖した。

30

| 第1ステップ 活性化、MAb | 第2ステップ 活性化/MAb | Vδ1増殖倍率 |
|-------------------|----------------------|---------|
| D1-35 | iK562/D1-35 49:1で | 31121 |
| D1-35 | iK562/D1-35 9:1で | 18142 |
| D1-35 | iK562/D1-35 2:1で | 6346 |

40

50

【0429】

実施例48. V₁MAbによって活性化されかつ増殖した T細胞は腫瘍細胞株に対して堅牢な細胞傷害性を示す

ヒトPBMCを固定化D1-08MAbによって7日間活性化させ、培養物を、定常状態において2日ごとに栄養補給することによって増殖させた。増殖の最後に、抗TCR

抗体と磁気マイクロビーズ(Miltenyi)とを使用して T細胞を除去することによって T細胞を濃縮した。精製された T細胞を、Jurkat(白血病)及びColo205(結腸癌)細胞株に対する細胞傷害性アッセイにおいて使用した。手短に述べると、増殖済み T細胞を、96ウェル丸底プレート(懸濁液)において100IU/mLのIL-2を含有する完全培地中でCFSE標識標的細胞と共に、10:1、5:1、2:1、1:1及び1:5のエフェクター:標的細胞の比で4時間インキュベートした。インキュベーションの最後に細胞懸濁液をアネキシン-V-APC結合体及びZombie Violet生存能染料で染色し、フローサイトメトリーで分析して死細胞/死滅しつつある細胞を検出した。図42で示されているように、V₁細胞は、様々な比率のどちらの腫瘍細胞株に対しても4時間のアッセイにおいて最大45%の細胞傷害性を実証した。

10

【0430】

実施例49. 振盪を伴う第2ステップを含む2ステップ手順によって活性化されかつ増殖した T細胞

末梢血単核細胞の単離

アフレーシス機械によって採集した新鮮な血液産物を、Ca²⁺及びMg²⁺を含まないPBSで1:3に希釈する。その後、Sepmate(STEMCELL)を使用しFicoll-Plus(商標)PLUS(GE Healthcare)を使用して、希釈された血液産物を精製する。その後、濃縮リンパ球層を濃縮し、2回の洗浄、すなわち、まずはCa²⁺及びMg²⁺を含まないPBSによる洗浄、その後にはCa²⁺及びMg²⁺を含まないPBS中0.25%のヒト血清アルブミンによる洗浄を行う。最後に、超低付着性の24ウェルプレート、6ウェルプレート及びT-75フラスコにおいてウシ胎仔血清含有培地中及び無血清培地中で1×10⁷細胞/mLの精製血液産物を一晩置く。

20

【0431】

T細胞活性化

T細胞活性化の前日に、組織培養用処理済みの24ウェルプレート、6ウェルプレート、T75フラスコまたはガス透過性バッグを含めた適切な細胞培養容器に抗Fc抗体を塗布する。初回塗布の後に容器を暗所にて2~8で一晩保管する。初回の抗Fc塗布の後、Ca²⁺及びMg²⁺を含まないPBS中5%のウシ胎仔血清による遮断を容器に対して行い、37のCO₂インキュベータにおいて1時間インキュベートする。1時間のインキュベート後に、Ca²⁺及びMg²⁺を含まないPBSで容器を1回洗浄し、その後、V₁特異的モノクローナル抗体による捕捉を容器に対して行う。その後、振盪を伴うかまたは伴わずに容器を室温で最長4時間インキュベートする。捕捉の最後に容器は、Ca²⁺及びMg²⁺を含まないPBSで2回洗浄され、T細胞活性化の準備が整う。

30

【0432】

ウシ胎仔血清含有培地か無血清培地かのどちらかを使用して、一晩置いたPBMCを0.5×10⁶~2×10⁶細胞/cm²に希釈する。その後、希釈済みPBMCを、V₁特異的モノクローナル抗体が固定された容器に添加する。PBMCを3~7日間静置した状態に維持する。グルコース及びグルタミンなどの十分な栄養レベルを維持しかつ毒性副産物、例えばラクテート及びアンモニウムの蓄積を薄めるために、新鮮な細胞培養用培地を3日目から毎日追加する。初回活性化の最後に細胞を力学的または化学的な方法で採取する。その後、次の増殖のために細胞を新しいフラスコへ移す。

40

【0433】

T細胞増殖

初回T細胞活性化の後、細胞培養物を37のCO₂インキュベータに最長21日間維

50

持する。まず、活性化された細胞培養物を、ウシ胎仔血清含有培地及び無血清培地で 1×10^6 細胞 / mL に希釈する。T細胞は、T - 25、T - 75、T - 150 及び T - 225 フラスコを含めた、超低付着性表面もしくは組織培養用処理済み表面を有する静置式 T フラスコにおいて、または容器全体の容積が 125 mL、250 mL、500 mL、1000 mL、2000 mL 及び 3000 mL であるものを含めた、邪魔板なしもしくは邪魔板付きの標準的な振盪式フラスコにおいて、培養されることができる。静置式 T フラスコでは、培養物の十分な酸素負荷を確保するために、表面に対する使用体積の比率を $0.5 \text{ mL} / \text{cm}^2$ 以下に維持する。振盪式フラスコでは、十分な混合及び曝気を確保するために、楕円運動する振盪架台上での容器全体の容積に対する使用体積の比率を 1 ~ 2 以下に維持する。

10

【0434】

生細胞培養物密度 (VCD)、代謝産物、pH 及びガスの測定を毎日行う。代謝産物測定は、グルコース、ラクトース、グルタミン、グルタメート、アンモニウム、ナトリウムイオン、カリウムイオン及びカルシウムイオンについて行う。酸素、 CO_2 の分圧及び pH を含めた pH 及びガスの測定も行う。酸素、 CO_2 及び pH の測定は、温度補償を伴って行われる。細胞培養物を維持するために、VCD または代謝産物に基づく栄養補給を用いることができる。VCD に基づく栄養補給策としては、VCD が 1.5×10^6 細胞 / mL 以上に増大した場合に新鮮な培地を使用して培養物を 1×10^6 細胞 / mL に希釈する。代謝産物に基づく栄養補給策としては、グルコースレベルが $1 \text{ g} / \text{L}$ 未満である場合に新鮮な培地を添加して $1.5 \text{ g} / \text{L}$ に高める。

20

【0435】

細胞採取及びバンク生成

19日間または21日間の増殖の最後には常に90%より高い細胞生存能が認められる。細胞増殖後に細胞培養物を洗浄し、細胞バンク生成用培地中に再懸濁させる。その後、細胞を 20×10^6 細胞 / mL より高い細胞密度で等分する。液体窒素の気相中での凍結保存は、速度制御冷凍庫または冷凍容器を使用する凍結制御によって進められる。

【0436】

実施例 49a

この実施例では、0.4%の出発V₁組成を有していたドナーAの新鮮な血液産物を Ficoll によって精製し、超低付着性 T75 フラスコ内に一晩置いた。固定化 1 特異的モノクローナル抗体 1-35 及び 1-08 による0日目から5日目までの活性化の後、培養物を振盪式フラスコに移した。5日目から19日目まで毎日培養物をサンプリングし、新鮮な血清培地を使用してVCDに基づく栄養補給策によって栄養分及び老廃物の濃度を維持した。V₁増殖倍率ならびに、1-35 及び 1-08 によって活性化された培養物の純度を図43に示す。

30

【0437】

実施例 49b

この実施例では、0.1%の出発V₁組成を有していたドナーBの新鮮な血液産物を Ficoll によって精製し、超低付着性 T75 フラスコ内に一晩置いた。固定化 1 特異的モノクローナル抗体 1-08 による0日目から5日目までの活性化の後、培養物を振盪式フラスコに移した。5日目から19日目まで毎日培養物をサンプリングし、新鮮な血清含有培地か新鮮な無血清培地かのどちらかを使用してVCDに基づく栄養補給策によって栄養分及び老廃物の濃度を維持した。血清含有培地中及び無血清培地中で増殖させた培養物におけるV₁増殖倍率及び倍加時間(DT)(0日目から19日目までの積算)を図44に示す。

40

【0438】

実施例 49c

この実施例では、0.5%の出発V₁組成を有していたドナーCの新鮮な血液産物を Ficoll によって精製し、超低付着性 T75 フラスコ内に一晩置いた。固定化 1 特異的モノクローナル抗体 1-08 による0日目から7日目まで(49c.1)及び0日

50

日から5日目までの活性化の後、培養物を振盪式フラスコに移した。7日目から19日目まで毎日培養物をサンプリングし、新鮮な血清培地を使用してグルコースに基づく栄養補給策によって栄養分及び老廃物の濃度を維持した。他の2つの培養物については、7日目から19日目まで毎日培養物をサンプリングし、新鮮な血清培地を使用してVCDに基づく栄養補給策かグルコースに基づく栄養補給策かのどちらかによって栄養分及び老廃物の濃度を維持した。V₁増殖倍率及び倍加時間(DT)(14日目から19日目までの積算)を図45に示す。

【0439】

図45の部分49c.1は、7日間活性化されてその後7日目から19日目までグルコースに基づく栄養補給策を用いて維持された培養物からのV₁増殖及びDT(14日目から19日目までの積算)を示す。図45の部分49c.2は、5日間活性化されてその後7日目から19日目までVCDに基づく栄養補給策を用いて維持された培養物のV₁増殖倍率及びDT(14日目から19日目までの積算)を示す。図45の部分49c.3は、5日間活性化されてその後7日目から19日目までVCDに基づく栄養補給策を用いて維持された培養物のV₁増殖倍率及びDT(14日目から19日目までの積算)を示す。

【0440】

実施例50.レトロウイルスキメラ抗原受容体構築物によるV₁T細胞の形質導入
 健全ドナーからの末梢血単核細胞を固定化抗V₁特異的モノクローナル抗体(1-08)で刺激し、実施例49aに記載されているように、rhIL-2が補充された培地中で19日間培養した。手短に述べると、単離したPBMCを、24ウェルプレートにおいて予め塗布されたヤギ抗マウスFcγ抗体によって捕捉させたD1-08V₁MAbで活性化させた。細胞を、10%のFBS、25mMのHEPES、2mMのグルタミン及び100IU/mLのIL-2を含有するRPMI1640中1e⁶個/mL/ウェルで播種した。5日後に細胞を振盪式フラスコに移し、実施例49aに記載されているように増殖させた。19日目に細胞を採取し、洗浄し、PHA(2μg/mL)で2日間再刺激し、続いて、抗CD20(リツキシマブ)由来キメラ抗原受容体(CD28-CD3に繋がられたscFv)をコードするレトロウイルスベクターで形質導入した。手短に述べると、24ウェルプレートのウェルにretronectin(TaKaRa Bio)を前もって塗布し、レトロウイルスを含有する上清(1mL)を32℃で4時間インキュベートしてウイルス粒子を付着させ、その後、上清を除去した(retronectinプレート)。増殖済みV₁T細胞を洗浄し、100IU/mLのIL-2を含有する1mLのウイルス懸濁液中に0.5×10⁶細胞/mLで再懸濁させ、retronectinプレートに播種した。プレートを1800rpmで10分間遠心分離し、37℃のインキュベータ内に置いた。細胞をさらに7日間、2日ごとに栄養補給しながらインキュベートし、その後、T細胞表面に発現したCD20特異的CARを認識する蛍光ラット抗リツキシマブイディオタイプ抗体(FITC結合体)を使用して形質導入パーセントに関してフローサイトメトリーで分析した。図46で示されているように、V₁⁺生細胞のうち34%超がCAR構築物を発現した。

【0441】

実施例51. T細胞TCRに対する抗体のエピトープ位置特定
 目的は、V₁特異的活性化物質のエピトープ特異性を位置特定することであった。全てのV₁特異的活性化物質はTCRのV₁鎖を指向する。位置特定は、ヒト及びイルカのV₁TCR鎖の組換えキメラ分子を使用することによって行った。ヒトとイルカとでV₁鎖のアミノ酸同一性が高いにもかかわらず、V₁特異的活性化物質はイルカV₁鎖に結合しなかった。それゆえ、本発明者らはヒトV₁とイルカV₁との配列及び配座の類似性(65%の配列類似性)を利用して組換えキメラ分子を構築し、この場合、本発明者らは、ヒト残基の異なるセグメントをそれらのイルカV₁TCR鎖由来の相同対応物で置き換えた。

【0442】

全てのmAbは TCRの 1鎖の可変領域に特異的に結合することがフローサイトメトリー分析によって確認された。18 TCRを、正確に折りたたまれた配座の可溶性FC融合タンパク質として発現させ、抗1マウスモノクローナル抗体(mAb)の全パネルの結合によって決定した。これらのmAbは、TCRの配座依存性エピトープを標的とすることが示された。

【0443】

ヒト1TCRの不連続なエピトープを発現させるために、7つの組換えキメラ1鎖の組をクローニングしてヒト/イルカ1-FC TCR鎖を生じさせた。図38で示されているように、イルカ残基はそれぞれ、T細胞受容体可変ドメインについてのIMGT独特の付番(Lefranc et al., *Developmental and Comparative Immunology* 27(2003)55-77)によるアミノ酸1~11、1~21、1~28、1~47、1~70、1~80及び1~95を含んでいた。

10

【0444】

これらの1特異的結合ドメインは、潜在的な接触残基についての予備知識なしでELISA結合アッセイ及び結合性喪失の検出によって同定された。本発明者らは、選定した1活性化物質の結合性に影響を与えた肝要なイルカ残基を重ね合わせることにより、1TCR鎖のV及びJ領域内の8つの可能な結合ピンを特定した。

【0445】

この研究で使用した発現ベクターは、pCI-Neo哺乳動物発現ベクター(Promega #E1841)であり、可溶性TCRの発現はCMVプロモーターに起因するものであった。可溶性TCRタンパク質を培地中へ搬出するためにマウスIgHシグナルペプチドを使用し、続いて可溶性TCRをELISA用プレートに捕捉するためにヒトFCドメインを使用した。

20

【0446】

ヒト1鎖のECDを1BE-13T細胞株から増幅した。イルカV1配列は、公開済みの配列(*Tursiops truncatus*のT細胞受容体デルタ鎖(TRD遺伝子)のmRNA、単離体5R1D80)(GenBank:LN610748.1)に基づいて合成遺伝子として注文したものであった。鋳型としてのこれらのcDNAを使用して、シグナルペプチドの5' AgeI部位及びデルタ定常領域の3' EcoRIへクローニングされる合成断片(IDT DNA)から新たなキメラ分子をクローニングした。イルカ/ヒト1鎖からなる6つの構築物をクローニングし、8-FC鎖と一緒に共トランスフェクトして293細胞において可溶性18TCRタンパク質を発現させた。

30

【0447】

HEK-293細胞を90mm細胞培養用プレートにおいて10%のウシ胎仔血清(Hyclone(商標)Fetal Clone(商標)ISerum(U.S.)-GE Healthcare Life Sciences)を含むDMEM培地(ThermoFisher Scientific)中で培養した。全ての構築物について、293Fectinをトランスフェクション試薬として使用して 1×10^6 個のHEK-293細胞に10µgのプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの72時間後に上清を採取した。

40

【0448】

1特異的活性化物質-モノクローナル抗体はキメラに対するそれらの結合パターンが異なっており、各モノクローナル抗体の別個の結合パターンについてはELISAアッセイで試験して同定することができた。

【0449】

ポリスチレン製マイクロタイタープレート(Greiner bio-one #655061)に、ELISA塗布用緩衝液(50mmのNa₂CO₃、0.05%のNaH₃、pH9.6)中1µg/ウェルのヤギ抗ヒトFC特異的抗体(Jackson Imm

50

unoResearch #109-005-098)を塗布して室温で1晩置いた。プレートを洗浄用緩衝液(PBS 0.05%(v/v)Tween20)で3回洗浄し、その後、100μl/ウェルのELISA遮断用緩衝液(PBST中3%のBSA)による遮断を室温(RT)で1時間行った。遮断されたプレートに対する可溶性TCRの結合は、100mlの各上清を添加して室温で1時間インキュベートすることによって行った。各抗体をELISA遮断用緩衝液で1μg/mlに希釈し、各TCRキメラ分子に対する結合性を試験した。

【0450】

結合の検出は、HRP結合二次抗体としてヤギ抗マウスFc特異体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc Fragment Specific #115-035-008)を遮断用緩衝液で1:10,000に希釈したものを100μl/ウェルで添加することによって行った。結合した抗体の量は、TMB基質(Thermo Fisher #34029)の使用によって検出した。発色は10分後に分光光度測定によって450nmで測定した。全てのアッセイは2反復で行った。

10

【0451】

全ての構築物の配列

1-D3-J1 FC-完全ヒトTCR

g c c c a g a a a g g t t a c t c a a g c c c a g t c a t c a g t a t c c a t g
c c a g t g a g g a a a g c a g t c a c c c t g a a c t g c c t g t a t g a a a
c a a g t t g g t g g t c a t a t t a t a t t t t t g g t a c a a g c a a c t
t c c c a g c a a a g a g a t g a t t t t c c t t a t t c g c c a g g g t t c t
g a t g a a c a g a a t g c a a a a a g t g g t c g c t a t t c t g t c a a c t
t c a a g a a a g c a g c g a a a t c c g t c g c c t t a a c c a t t t c a g c
c t t a c a g c t a g a a g a t t c a g c a a a g t a c t t t t g t g c t c t t
g g g a c g g g g g t g a g g g g a c t c c a g g a c a c c g a t a a a c t c a
t c t t t g g a a a a g g a a c c c g t g t g a c t g t g g a a c c a a
A Q K V T Q A Q S S V S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q
L P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S
A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

20

30

【0452】

イルカTRD単離体5R1D8

g c c c a g a a a a g t t a c t c a a g t c c a g c g a g c c a t g t c c a g t
c a g c t a g g g g a g g c g g t c a c c t t g a g c t g t c a g t a t g a a a
c a a g c t t g a g c t g g t a c g a t a t t t t t t g g t a t a a g c a g c t
t c c c a g t g g a g a g a t g a c t t t c c t t a t t c a t c a g a t t t c t
t c t g a c c a a a a t g c a a a g a a t g g c c g c t a t t c t g t a a a c t
t t c a g g a a a g a c a t a a a t t c a t c a g c c t c a c c a t t t c a g c
c t t a c t g g t g g a a g a t t c t g c a a a c t a c t t c t g t g c t c t c
c g g g a g c g c g t t g t c c a c g t c g t t t t a t t c a a t a c g c g c a
a t a a g c c a c t g c t a t t c g g c a a a g g a a c c t a t c t g a a c g t
t g a a c c a a
A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L S C Q Y E T S L S W Y D I F W Y K Q
L P S G E M T F L I H Q I S S D Q N A K N . G R Y S V N F Q E R H K F I S L T I
S A L L V E D S A N Y F C A L R E R V V H V V L F N T R N K P L L F G K G T Y L
N V E P

40

【0453】

イルカ/ヒトキメラ-可溶性TCRの組をクローニングした-ヒト配列は青色

イルカ/ヒト 1-11

50

g c c c a g a a a g t t a c t c a a g t c c a g c g a g c c a t g t c c a t g
c c a g t g a g g a a a g c a g t c a c c c t g a a c t g c c t g t a t g a a a
c a a g t t g g t g g t c a t a t t a t a t t t t t t g g t a c a a g c a a c t
t c c c a g c a a a g a g a t g a t t t t c c t t a t t c g c c a g g g t t c t
g a t g a a c a g a a t g c a a a a a g t g g t c g c t a t t c t g t c a a c t
t c a a g a a a g c a g c g a a a t c c g t c g c c t t a a c c a t t t c a g c
c t t a c a g c t a g a a g a t t c a g c a a a g t a c t t t t g t g c t c t t
g g g a c g g g g g t g a g g g g a c t c c a g g a c a c c g a t a a a c t c a
t c t t t g g a a a a g g a a c c c g t g t g a c t g t g g a a c c a a

A Q K V T Q V Q R A M S M P V R K A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q
L P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S . G R Y S V N F K K A A K S V A L T I
S A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

10

【0454】

イルカ/ヒト 1 - 21

g c c c a g a a a g t t a c t c a a g t c c a g c g a g c c a t g t c c a g t
c a g c t a g g g g a g g c g g t c a c c t t g a a c t g c c t g t a t g a a a
c a a g t t g g t g g t c a t a t t a t a t t t t t t g g t a c a a g c a a c t
t c c c a g c a a a g a g a t g a t t t t c c t t a t t c g c c a g g g t t c t
g a t g a a c a g a a t g c a a a a a g t g g t c g c t a t t c t g t c a a c t
t c a a g a a a g c a g c g a a a t c c g t c g c c t t a a c c a t t t c a g c
c t t a c a g c t a g a a g a t t c a g c a a a g t a c t t t t g t g c t c t t
g g g a c g g g g g t g a g g g g a c t c c a g g a c a c c g a t a a a c t c a
t c t t t g g a a a a g g a a c c c g t g t g a c t g t g g a a c c a a

20

A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L N C L Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q
L P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S
A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

【0455】

イルカ/ヒト 1 - 28

g c c c a g a a a g t t a c t c a a g t c c a g c g a g c c a t g t c c a g t
c a g c t a g g g g a g g c g g t c a c c t t g a g c t g t c a g t a t g a a a
c a a g c t g g t g g t c a t a t t a t a t t t t t t g g t a c a a g c a a c t
t c c c a g c a a a g a g a t g a t t t t c c t t a t t c g c c a g g g t t c t
g a t g a a c a g a a t g c a a a a a g t g g t c g c t a t t c t g t c a a c t
t c a a g a a a g c a g c g a a a t c c g t c g c c t t a a c c a t t t c a g c
c t t a c a g c t a g a a g a t t c a g c a a a g t a c t t t t g t g c t c t t
g g g a c g g g g g t g a g g g g a c t c c a g g a c a c c g a t a a a c t c a
t c t t t g g a a a a g g a a c c c g t g t g a c t g t g g a a c c a a

30

A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L S C Q Y E T S W W S Y Y I F W Y K Q
L P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S
A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P

40

【0456】

イルカ/ヒト 1 - 47

g c c c a g a a a g t t a c t c a a g t c c a g c g a g c c a t g t c c a g t
c a g c t a g g g g a g g c g g t c a c c t t g a g c t g t c a g t a t g a a a
c a a g c t t g a g c t g g t a c g a t a t t t t t t g g t a t a a g c a g c t
t c c c a g t a a a g a g a t g a t t t t c c t t a t t c g c c a g g g t t c t
g a t g a a c a g a a t g c a a a a a g t g g t c g c t a t t c t g t c a a c t
t c a a g a a a g c a g c g a a a t c c g t c g c c t t a a c c a t t t c a g c
c t t a c a g c t a g a a g a t t c a g c a a a g t a c t t t t g t g c t c t t
g g g a c g g g g g t g a g g g g a c t c c a g g a c a c c g a t a a a c t c a

50

t c t t t g g a a a a g g a a c c c g t g t g a c t g t g g a a c c a a
 A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L S C Q Y E T S L S W Y D I F W Y K Q
 L P S K E M I F L I R Q G S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S
 A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 【0457】

イルカ/ヒト 1 - 70

g c c c a g a a a g t t a c t c a a g t c c a g c g a g c c a t g t c c a g t
 c a g c t a g g g g a g g c g g t c a c c t t g a g c t g t c a g t a t g a a a
 c a a g c t t g a g c t g g t a c g a t a t t t t t t g g t a t a a g c a g c t
 t c c c a g t g g a g a g a t g a c t t t c c t t a t t c a t c a g a t t t c t
 g a t g a a c a g a a t g c a a a a a g t g g t c g c t a t t c t g t c a a c t
 t c a a g a a a g c a g c g a a a t c c g t c g c c t t a a c c a t t t c a g c
 c t t a c a g c t a g a a g a t t c a g c a a a g t a c t t t t g t g c t c t t
 g g g a c g g g g g t g a g g g g a c t c c a g g a c a c c g a t a a a c t c a
 t c t t t g g a a a a g g a a c c c g t g t g a c t g t g g a a c c a a

10

A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L S C Q Y E T S L S W Y D I F W Y K Q
 L P S G E M T F L I H Q I S D E Q N A K S G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S
 A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 【0458】

イルカ/ヒト 1 - 80

20

g c c c a g a a a g t t a c t c a a g t c c a g c g a g c c a t g t c c a g t
 c a g c t a g g g g a g g c g g t c a c c t t g a g c t g t c a g t a t g a a a
 c a a g c t t g a g c t g g t a c g a t a t t t t t t g g t a t a a g c a g c t
 t c c c a g t g g a g a g a t g a c t t t c c t t a t t c a t c a g a t t t c t
 t c t g a c c a a a a a t g c a a a g a a t g g c c g c t a t t c t g t a a a c t
 t t a a g a a a g c a g c g a a a t c c g t c g c c t t a a c c a t t t c a g c
 c t t a c a g c t a g a a g a t t c a g c a a a g t a c t t t t g t g c t c t t
 g g g a c g g g g g t g a g g g g a c t c c a g g a c a c c g a t a a a c t c a
 t c t t t g g a a a a g g a a c c c g t g t g a c t g t g g a a c c a a

A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L S C Q Y E T S L S W Y D I F W Y K Q
 L P S G E M T F L I H Q I S S D Q N A K N G R Y S V N F K K A A K S V A L T I S
 A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 【0459】

30

イルカ/ヒト 1 - 95

g c c c a g a a a g t t a c t c a a g t c c a g c g a g c c a t g t c c a g t
 c a g c t a g g g g a g g c g g t c a c c t t g a g c t g t c a g t a t g a a a
 c a a g c t t g a g c t g g t a c g a t a t t t t t t g g t a t a a g c a g c t
 t c c c a g t g g a g a g a t g a c t t t c c t t a t t c a t c a g a t t t c t
 t c t g a c c a a a a a t g c a a a g a a t g g c c g c t a t t c t g t a a a c t
 t t c a g g a a a g a c a t a a a t t c a t c a g c c t c a c c a t t t c a g c
 c t t a c a g c t a g a a g a t t c a g c a a a g t a c t t t t g t g c t c t t
 g g g a c g g g g g t g a g g g g a c t c c a g g a c a c c g a t a a a c t c a
 t c t t t g g a a a a g g a a c c c g t g t g a c t g t g g a a c c a a

40

A Q K V T Q V Q R A M S S Q L G E A V T L S C Q Y E T S L S W Y D I F W Y K Q
 L P S G E M T F L I H Q I S S D Q N A K N G R Y S V N F Q E R H K F I S L T I S
 A L Q L E D S A K Y F C A L G T G V R G L Q D T D K L I F G K G T R V T V E P
 【0460】

結果

機能性 T C R 遺伝子を別個の V、D 及び J 領域セグメントから遺伝子組換えによって組み立てる。T C R デルタ鎖遺伝子が組み立てられるとき、D 遺伝子セグメントは J セグメ

50

ントに並置され、これに続いて、組み立てられた下流のD Jセグメントに対してVセグメントの再構成が行われる。TCR鎖の免疫グロブリン様の折りたたみは、各鎖からの3つのループまたは相補性決定領域(CDR)を互いの近傍に配置し、抗原と接触することになる結合面を作り出す。これらのCDRループのうちの2つ、すなわち1及び2は、V遺伝子セグメントによってコードされV 1領域遺伝子セグメントによって提供される多様性のみを有する。3つ目のCDRループは、V(D) Jセグメントの並置によって作り出され、よりはるかに高い多様性を提供し、それは、任意の(D) Jセグメントに対して再構成する各Vセグメントの能力と、コード配列同士の結合が不正確である事実とが合わさった結果である。これらの接合部の各々にヌクレオチドの追加または欠失があってもよい。エピトープ結合特異性はELISAによって示される(図47A~B)。

10

【0461】

本発明者らは、TCR分子の1鎖のフレームワーク領域上の異なるエピトープに結合する活性化物質を同定した。モノクローナル抗体の1つのグループはTCRのデルタ鎖の1可変領域に対して反応性である。詳しくは、本発明は、接合部の多様性(あらゆるTCR構成の並置(D) J1、V(D) J2及びV(D) J3)に関係なく1鎖可変領域に結合するモノクローナル抗体、例えば、d1-08、d1-39、d1-192、d1-201、d1-285を提供する。これらのモノクローナル抗体は、デルタTCRの「可変領域」に対して反応性であり、それゆえ、V領域のエピトープとの反応性を有するモノクローナル抗体である。

【0462】

他の1活性化物質は、1鎖可変領域及び、制限されたV(D) J1セグメントの並置によって作り出されるCDR3ループを特異的に認識する。これらのモノクローナル抗体は、V-DまたはV-D-J領域の連合エピトープにおいてTCRの「可変領域」との反応性を有する：d1-37、d1-113、d1-155、d1-182、d1-183、d1-191、d1-278及びd1-282。

20

【0463】

他の1活性化物質は、1鎖可変領域ならびに、V(D) J3ではなくV(D) J1及びV(D) J1セグメントの並置によって作り出されるCDR3ループを特異的に認識する：d1-35、d1-143、d1-149、d1-203。

【0464】

1に対して特異的である抗体は、以下のエピトープピンに分類される：
 ピン1：VDJ接合部-JH1/JH2：TS-1、及び1-18
 ピン1b：VDJ接合部-J3ではなくJ1、K120T/A突然変異体に対する結合性の喪失：1-37

30

ピン2：(aa11~21)：1-285

ピン2b：(aa11~21)、R16N突然変異体に対する結合性の喪失：R9.12

ピン2c：(aa11~21)、3、4及び5のTCRと交差反応する：

1-39

ピン3：(aa80~95または70~95)：1-08；1-23

ピン4：(aa1~11)、K120T/A突然変異体に対する結合性の喪失：1-35、1-203

40

ピン5：(aa28~47+J1領域)：1-113、1-155、1-183、1-191、1-278、1-282

ピン6：(aa21~28+J1領域)：TS8.2、1-143

ピン7：(aa47~70+J1/J2領域)：1-149、1-253、及び1-257

ピン8：(aa70~80)+J1/J2：1-192

ピン9：(aa80~95)：1-201。

【0465】

Linguitti G. et al., 2016. Genomic and expre

50

ssion analyses of *Tursiops truncatus* T cell receptor gamma (TRG) and alpha/delta (TRA/TRD) loci reveal a similar basic public repertoire in dolphin and human. BMC Genomics. に基づく d1 エピトープ位置特定と同様である。5つの組換えキメラ 2鎖の組をクローニングしてヒト/イルカ 2 - FC TCR 鎖を生じさせた。図 15 に示す T 細胞受容体可変ドメインのための IMGT 独特の付番 (Lefranc et al., Developmental and Comparative Immunology 27 (2003) 55 - 77) によれば、それぞれのイルカ残基はアミノ酸 28 ~ 94、44 ~ 94、72 ~ 94、及び 82 ~ 94 を含んでいた。

10

【0466】

2 / 9 - FC 構築物のトランスフェクション

ヒト TRGV9 - JP - FC

GCAGGTCACCTAGAGCAACCTCAAATTTCCAGTACTAAAACGCTGTCAAAAACAGCCCGCCTGGAATGTGTGGTGTCTGGAATAACAAT
 TTCTGCAACATCTGTATATTGGTATCGAGAGAGACCTGGTGAAGTCATACAGTTCTTGGTGTCCATTTTCATATGACGGCACTGTCAGAA
 AGGAATCCGGCATCCGTCAGGCAAATTTGAGGTGGATAGGATACCTGAAACGCTCTACATCCACTCTCACCATTACAATGTAGAGAAA
 CAGGACATAGCTACCTACTACTGTGCCTTGTGGGAGGTAAAGCAAGAGTTGGGCCAAAAAATCAAGGTATTTGGTCCCGGAACAAAGCT
 TATCATTACAG

AGHLEQPQISSTKLTKTARLECVVSGITISATSVYWRERPEVIQFLVLSISYDGTVRKESGIPSGKFEVDRIPETSTSTLTIHNVK
 QDIATYYCALWEVRQELGKKIKVFPGPKLIIT

20

ヒト V 21J1 - FC

GCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGAAGCGATCGGTAACACTACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCCAAGGTAACACAATGACTTTTCATATACCGAGAAAAGG
 ACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCCAAGGTGACATTTGATATGCAAAGAACCCTGGCTGACTTAAGATACTT
 GCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTGTGACCCCTCTTGGCCGACCCCGGATAAACTCATCTTTGG
 AAAAGGAACCCGTGACTGTGGAACCAA

AIELVPEHQTFVPSIGVPEATLPCSMRGEAIGNYYINWYRKTQGNMTTFIYREKDIYGPGEKDNFQGGIDIAKNLAVLKIL
 APSEPDEGSYYCACDFLGGPPDKLIFGKGRVTVPEP

30

イルカ V 2J1 - FC

GCTGTACGTTGGTGCCTCAAACCAAGCAAGGAGTGTGTCTGTGGGGGAATCTGTACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGACTCCATCAGTAACTATTATACCTTCTGGTACAGGAGAACACCGGGTAACACAATGACTCTCATATACCGAGAAGGGG
 GCACATATGGCCCTGGTTTCAAGACAACCTCCAAGGTGAAATGATTTTTTAAACAACAGGCTGTGCTGAATATCCTG
 GAGGCATCAGAGAGAGATGAAGGATCTTACTACTGTGCCTGTGACCCTCTTGGCCGACCCCGGATAAACTCATCTTTGG
 AAAA
 GGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA

AVTLVPQNQARSVSVGESVTLRCSMKGDSISNYTTFWYRRTPGNTMTLIYREGGTYGPGFEDNLQGEIDFLNNQAVLNIL
 EASERDEGSYYCACDFLGGPPDKLIFGKGRVTVPEP

ヒト/イルカ V 2J1 - FC (28 ~ 94)

GCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGACTCCATCAGTAACTATTATACCTTCTGGTACAGGAGAACACCGGGTAACACAATGACTCTCATATACCGAGAAGGGG
 GCACATATGGCCCTGGTTTCAAGACAACCTCCAAGGTGAAATGATTTTTTAAACAACAGGCTGTGCTGAATATCCTG
 GAGGCATCAGAGAGAGATGAAGGATCTTACTACTGTGCCTGTGACCCTCTTGGCCGACCCCGGATAAACTCATCTTTGG
 AAAA
 GGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA

40

AIELVPEHQTFVPSIGVPEATLPCSMRGEAIGNYYINWYRKTQGNMTTFIYREKDIYGPGEKDNFQGGIDIAKNLAVLNIL
 EASERDEGSYYCACDFLGGPPDKLIFGKGRVTVPEP

ヒト/イルカ V 2J1 - FC (44 ~ 94)

50

GCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGAAGCGATCGGTAACACTACTATATCAACTGGTACAGGAGAACACCCGGGTAAACAATGACTTTCATATACCGAGAAAGG
 GCACATATGGCCCTGGTTTCGAAGACAACCTCCAAGGTGAAATTGATTTTTTAAACAACCAGGCTGTGCTGAATATCCTG
 GAGGCATCAGAGAGAGATGAAGGATCTTACTACTGTGCCTGTGACCCTCTTGGCGGACCCCCCGATAAACTCATCTTTGG
 AAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA

AIELVPEHQTVPVSI GVPATLRCMKGEAIGNYYINWYRRTPGNTMTLIYREGGTYGPGFEDNLQGEIDFLNNQAVLNIL
 EASERDEGSYYCACDPLGGPPDKLIFGKGTRVTVEP

ヒト / イルカ V 2 J 1 - F C (7 2 ~ 9 4)

GCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGAAGCGATCGGTAACACTACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCAAGGTAAACAATGACTTTCATATACCGAGAAAGG
 ACATCTATGGCCCTGGTTTCGAAGACAACCTCCAAGGTGAAATTGATTTTTTAAACAACCAGGCTGTGCTGAATATCCTG
 GAGGCATCAGAGAGAGATGAAGGATCTTACTACTGTGCCTGTGACCCTCTTGGCGGACCCCCCGATAAACTCATCTTTGG
 AAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA

10

AIELVPEHQTVPVSI GVPATLRCMKGEAIGNYYINWYRKTQGNMTFIYREKDIYGPGFEDNLQGEIDFLNNQAVLNIL
 EASERDEGSYYCACDPLGGPPDKLIFGKGTRVTVEP

ヒト イルカ V 2 J 1 - F C (8 2 ~ 9 4)

GCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGAAGCGATCGGTAACACTACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCAAGGTAACACAATGACTTTCATATACCGAGAAAGG
 ACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCCAAGGTGACATTGATTTTTTAAACAACCAGGCTGTGCTGAATATCCTG
 GAGGCATCAGAGAGAGATGAAGGATCTTACTACTGTGCCTGTGACCCTCTTGGCGGACCCCCCGATAAACTCATCTTTGG
 AAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA

20

AIELVPEHQTVPVSI GVPATLRCMKGEAIGNYYINWYRKTQGNMTFIYREKDIYGPGFKDNFQGDIDFLNNQAVLNIL
 EASERDEGSYYCACDPLGGPPDKLIFGKGTRVTVEP

ヒト V 2 1 J 1 - F C (C D R 1 - S)

GCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGAAGCGATCAGTAACACTACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCAAGGTAACACAATGACTTTCATATACCGAGAAAGG
 ACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCCAAGGTGACATTGATATTGCAAAGAACCCTGGCTGTAAGATACTT
 GCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTGTGACCCTCTTGGCGGACCCCCCGATAAACTCATCTTTGG
 AAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA

30

AIELVPEHQTVPVSI GVPATLRCMKGEAISNYYINWYRKTQGNMTFIYREKDIYGPGFKDNFQGDIDIAKNLAVLKIL
 APSERDEGSYYCACDPLGGPPDKLIFGKGTRVTVEP

ヒト V 2 1 J 1 - F C (C D R 2 - G)

GCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGAAGCGATCGGTAACACTACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCAAGGTAACACAATGACTTTCATATACCGAGAAAGG
 GCATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCCAAGGTGACATTGATATTGCAAAGAACCCTGGCTGTAAGATACTT
 GCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTGTGACCCTCTTGGCGGACCCCCCGATAAACTCATCTTTGG
 AAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA

40

AIELVPEHQTVPVSI GVPATLRCMKGEAIGNYYINWYRKTQGNMTFIYREKDIYGPGFKDNFQGDIDIAKNLAVLKIL
 APSERDEGSYYCACDPLGGPPDKLIFGKGTRVTVEP

ヒト V 2 1 J 1 - F C (C D R 3 - S)

50

GCCATTGAGTTGGTGCCTGAACACCAAACAGTGCCTGTGTCAATAGGGGTCCCTGCCACCCTCAGGTGCTCCATGAAAGG
 AGAAGCGATCGGTAACACTATATCAACTGGTACAGGAAGACCCAAGGTAACACAATGACTTTCATATACCGAGAAAAGG
 ACATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCCAAGGTGACATTGATATTGCAAAGAACCTGGCTGTACTTAAGATACTT
 GCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGTCTTACTACTGTGCCTCTGACCCTCTTGGCGGACCCCGATAAACTCATCTTTGG
 AAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACCAA

AIELVPEHQTVFVVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNMTFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLKIL
 APSERDEGSYYCASPDLGGPPDKLIFGKGTRVTVEP

以下のエピトープピン：

| ピン | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----|---------------|-------|---------------|---------------|
| 残基 | 83～94 | 28～38 | 72～83 | 1～27 |
| mAb | $\delta 2-17$ | 15D | $\delta 2-32$ | $\delta 2-14$ |
| | B6 | | | $\delta 2-22$ |
| | | | | $\delta 2-30$ |
| | | | | $\delta 2-31$ |
| | | | | $\delta 2-36$ |
| | | | | $\delta 2-37$ |

10

20

を同定するELISA結果を図48に示す。

【0467】

本発明の好ましい実施形態を本明細書において示し記載してきたが、当業者にはそのような実施形態が単なる例として提供されているに過ぎないことが明らかであろう。今や当業者は、本発明から逸脱することなく数値の変動、変化及び置換を思い付くであろう。本発明の実施において本明細書に記載の本発明の実施形態に対する様々な変更が採用され得ることは理解されるべきである。以下の請求項によって本発明の範囲が画定されること、ならびにそれによってこれらの請求項の範囲内にある方法及び構造体とそれらの均等物とを包含することが意図される。

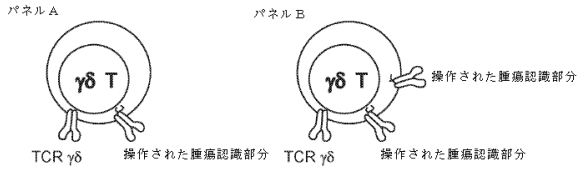
30

40

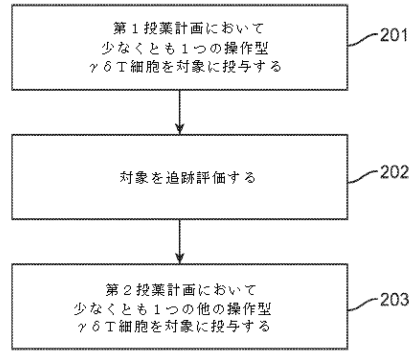
50

【図面】

【図 1】

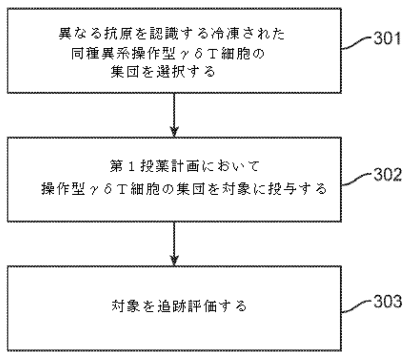


【図 2】

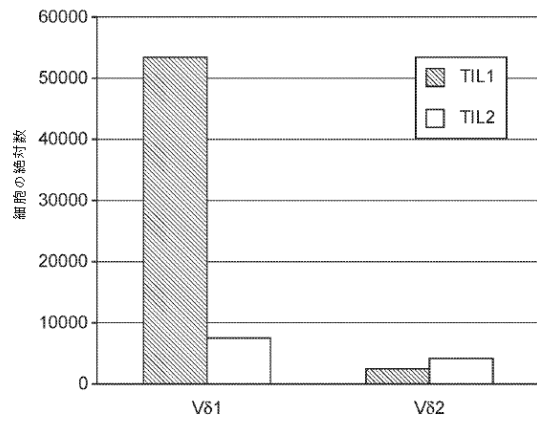


10

【図 3】



【図 4】



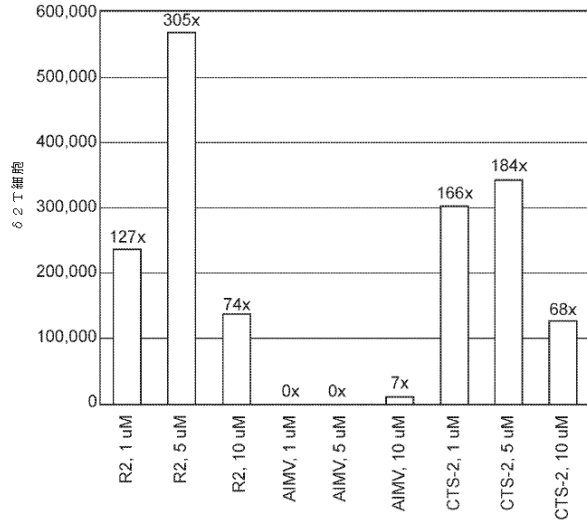
20

30

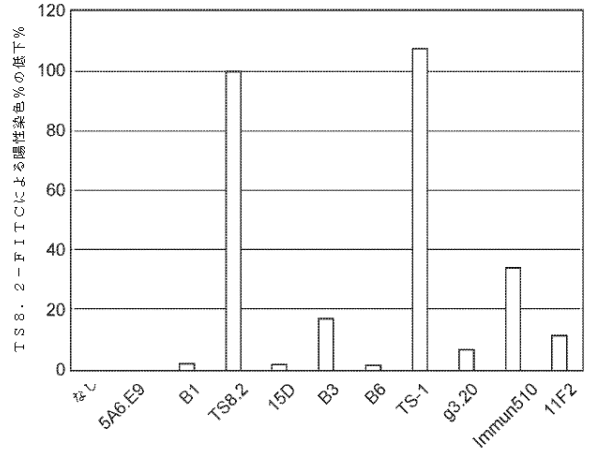
40

50

【 図 5 】

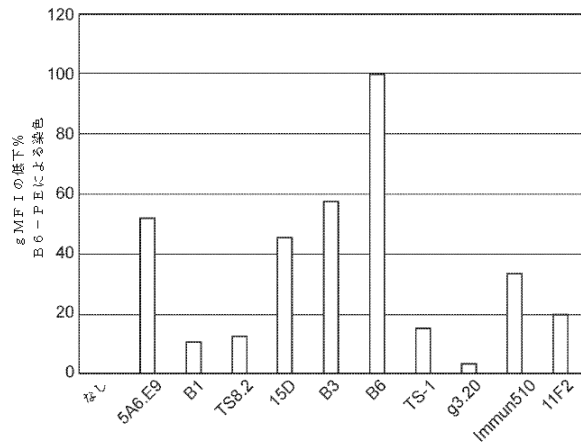


【 図 6 】

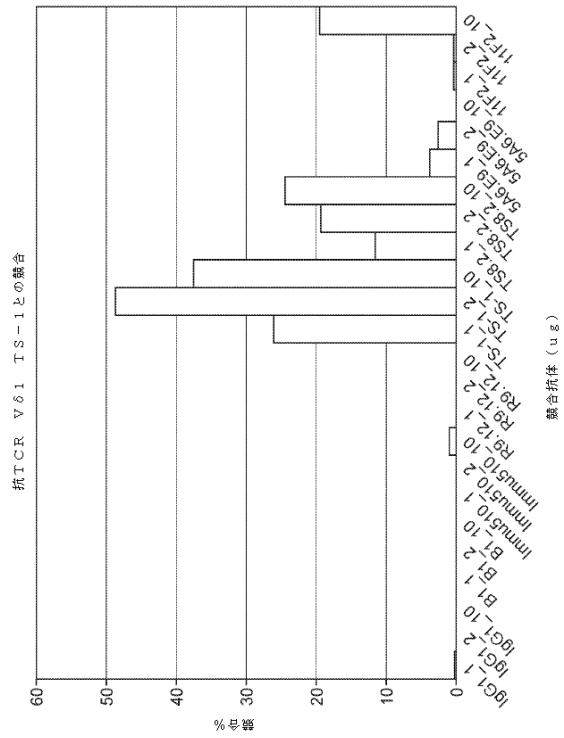


10

【 図 7 】



【 図 8 】



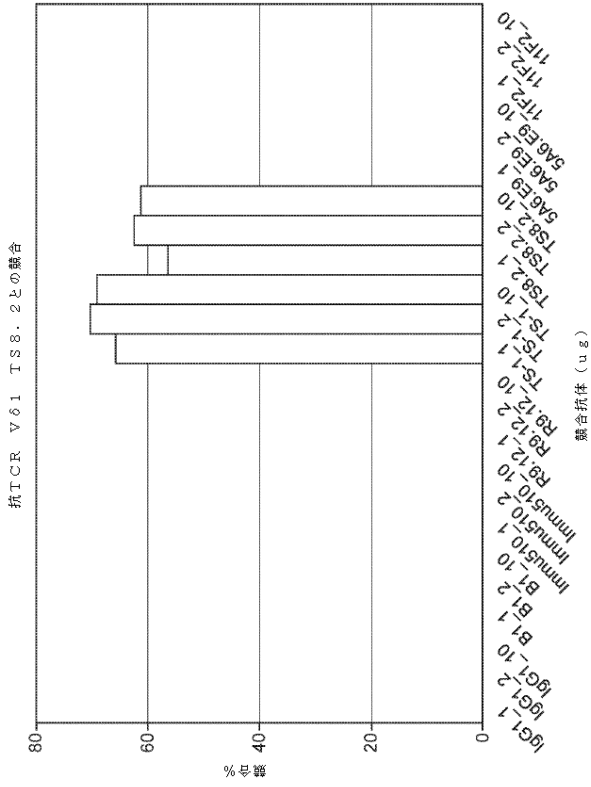
20

30

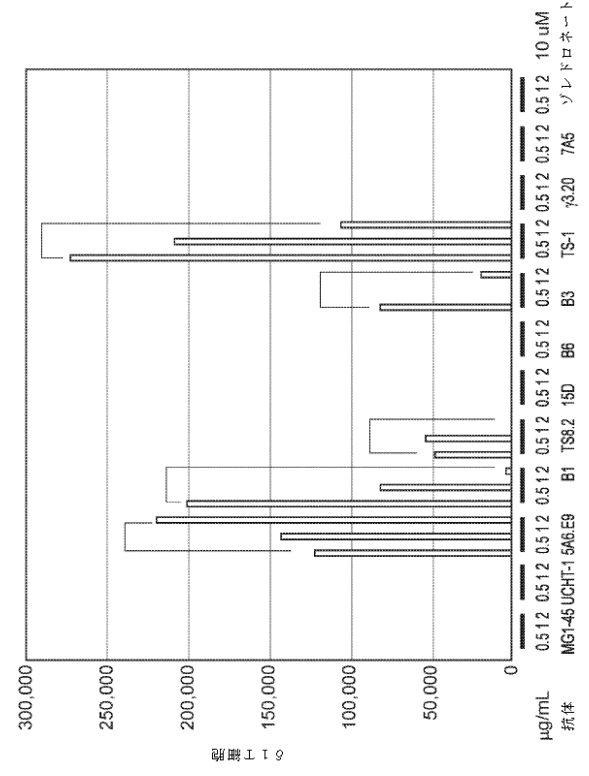
40

50

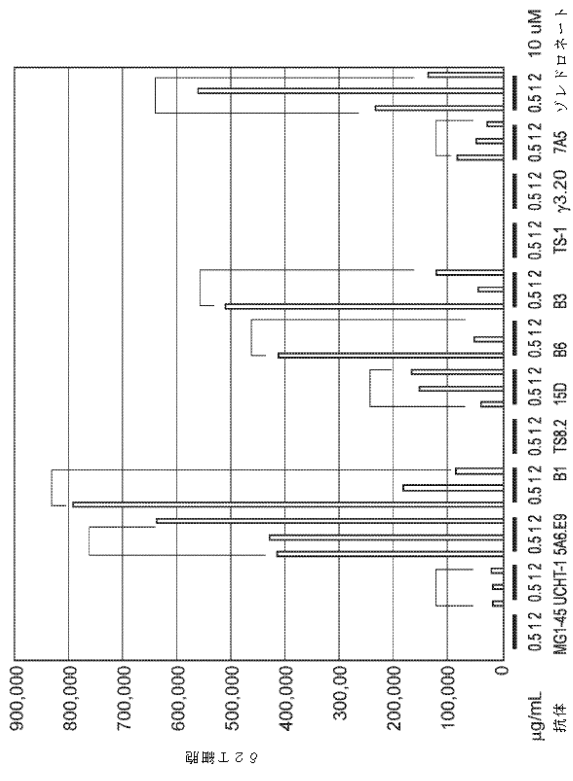
【 9 】



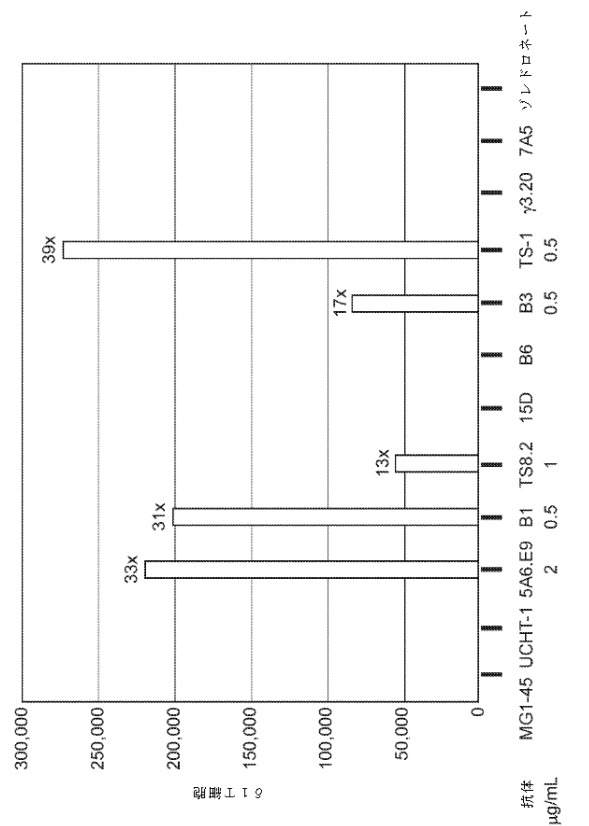
【 10 】



【 11 】



【 12 】



10

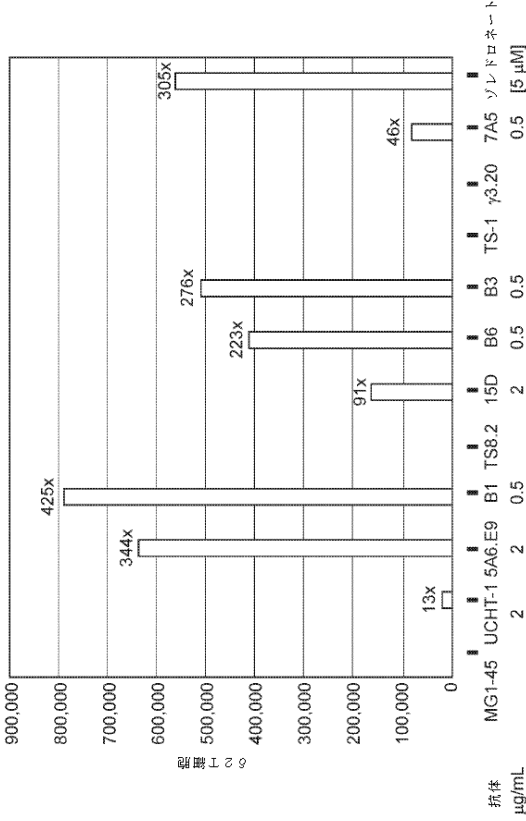
20

30

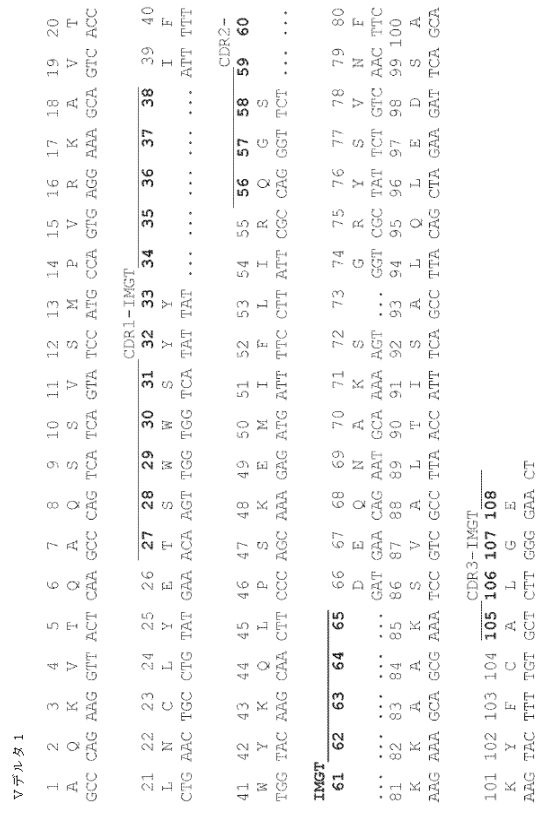
40

50

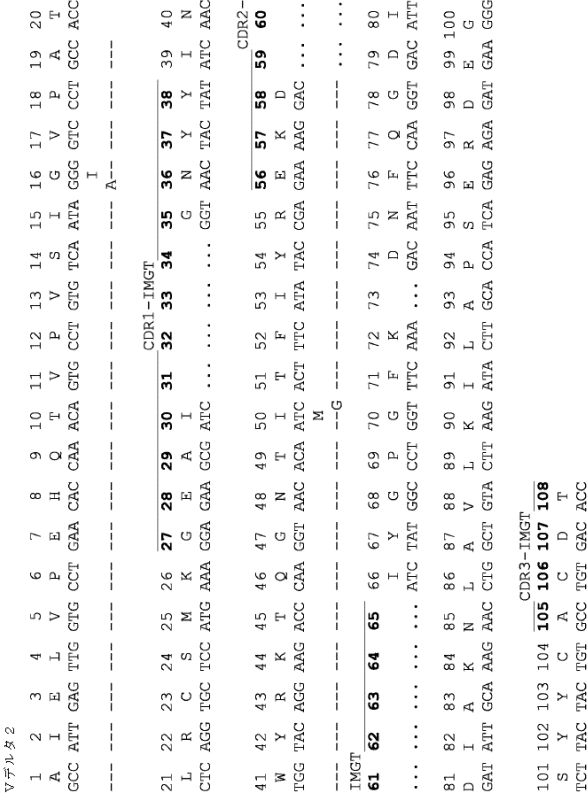
【図 1 3】



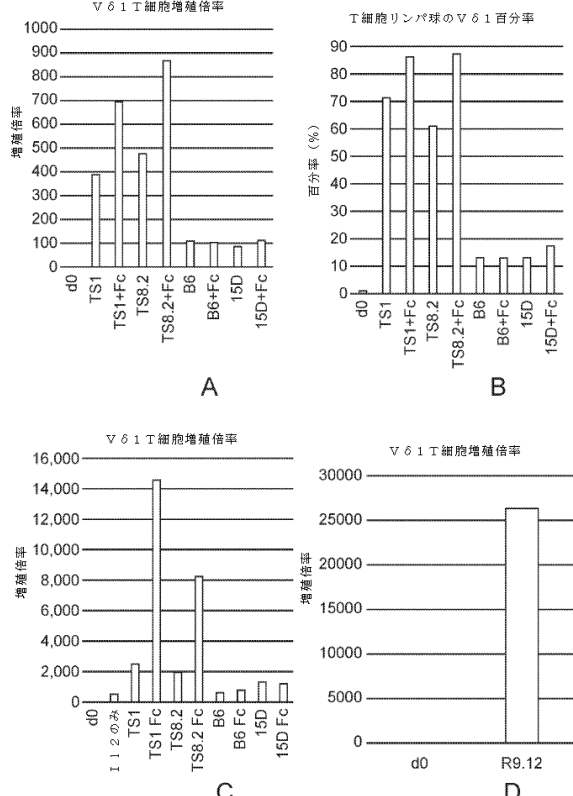
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

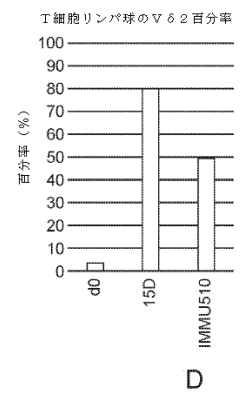
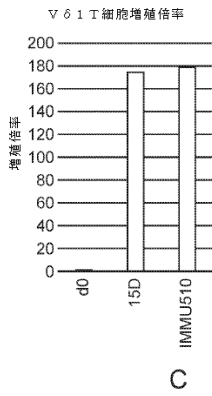
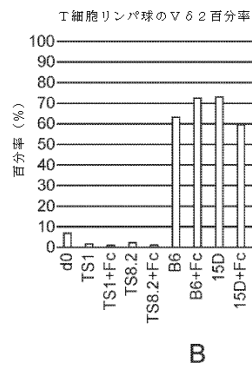
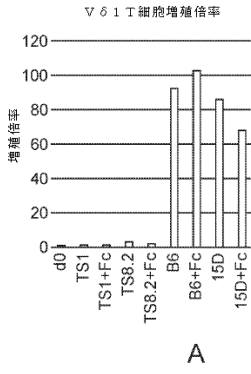
20

30

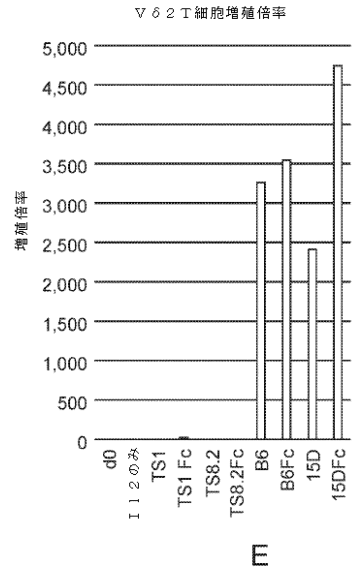
40

50

【図 17 - 1】



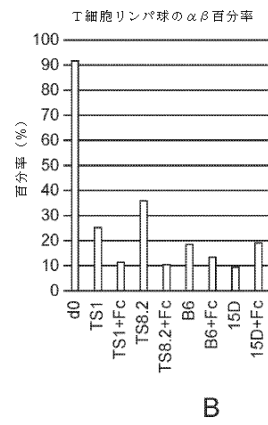
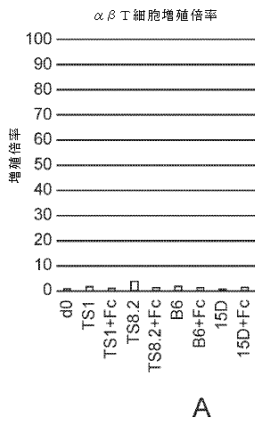
【図 17 - 2】



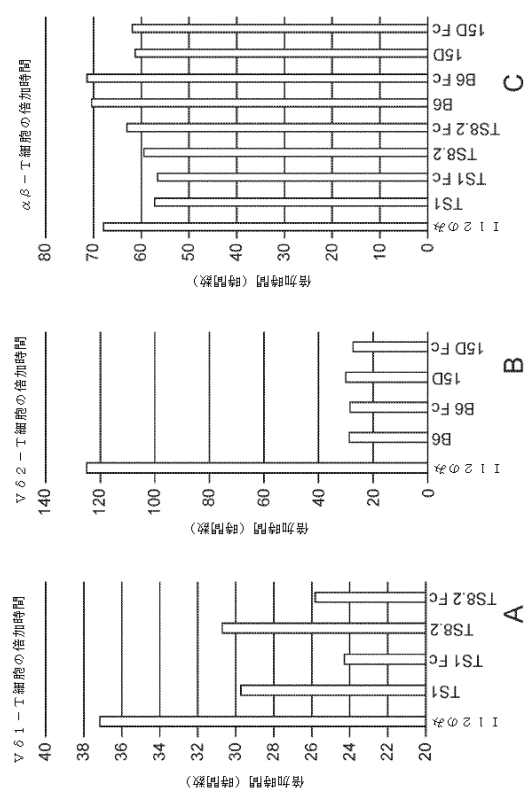
10

20

【図 18】



【図 19】

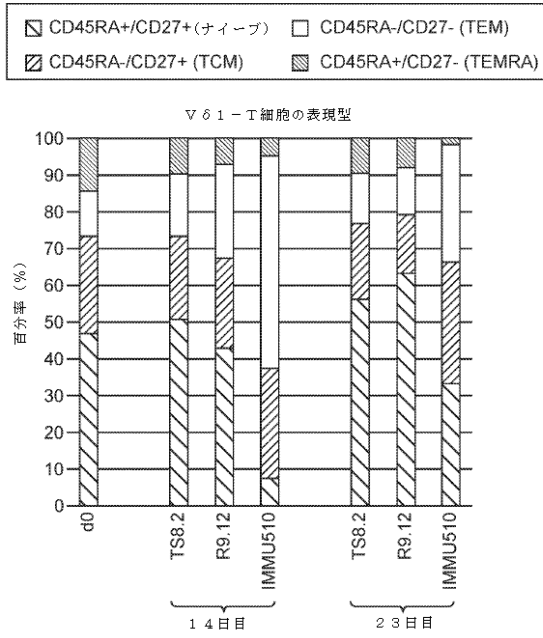


30

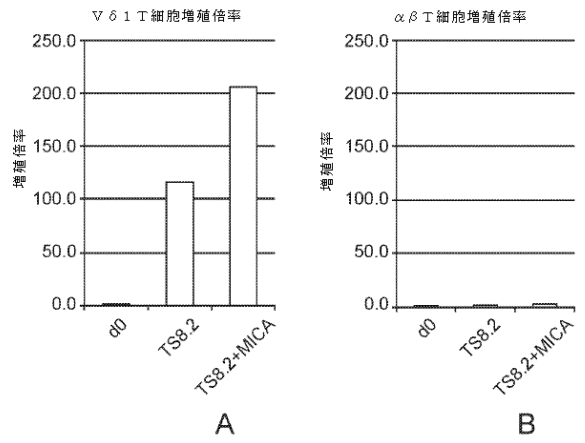
40

50

【図 2 0】



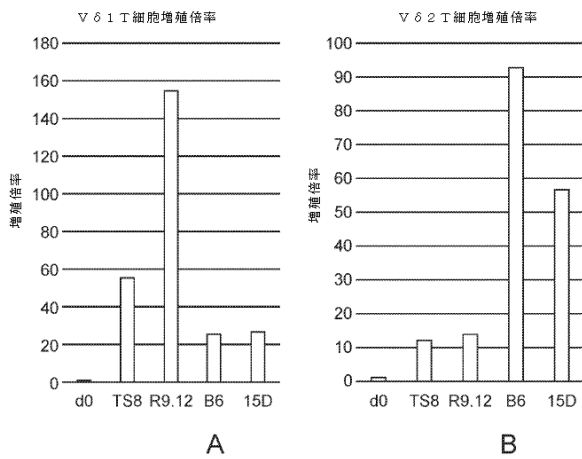
【図 2 1】



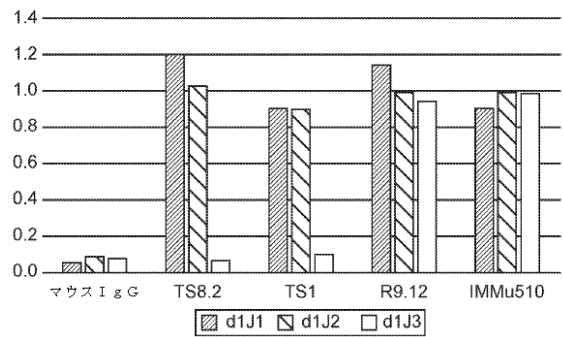
10

20

【図 2 2】



【図 2 3】



30

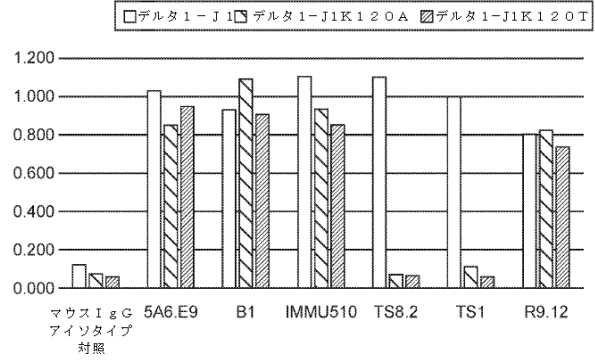
40

50

【 2 4 】

| V61 | N-D-N | J | TS1 TS8.2 R9.12 |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| BE-13 | AKYFCALG--TGVRLGD---TDKLIIFG | AKYFCALG--TGVRLGD---TDKLIIFG | + |
| ΔJ1 | AKYFCALLPFLPSDWGIP--VTDKLIIFG | AKYFCALLPFLPSDWGIP--VTDKLIIFG | + |
| ΔJ2 | AKYFCALG-EAPSAWGKH--ITAQLIFG | AKYFCALG-EAPSAWGKH--ITAQLIFG | + |
| ΔJ3 | AKYFCALG-EAPSAWGKHSWDTROMFFG | AKYFCALG-EAPSAWGKHSWDTROMFFG | - |
| 部位特異的変異導入 | | | |
| BE-13 | AKYFCALG--TGVRLGD---TDKLIIFG | AKYFCALG--TGVRLGD---TDKLIIFG | - |
| ΔJ3 | AKYFCALG-EAPSAWGKHSWDTROMFFG | AKYFCALG-EAPSAWGKHSWDTROMFFG | + |

【 2 5 】



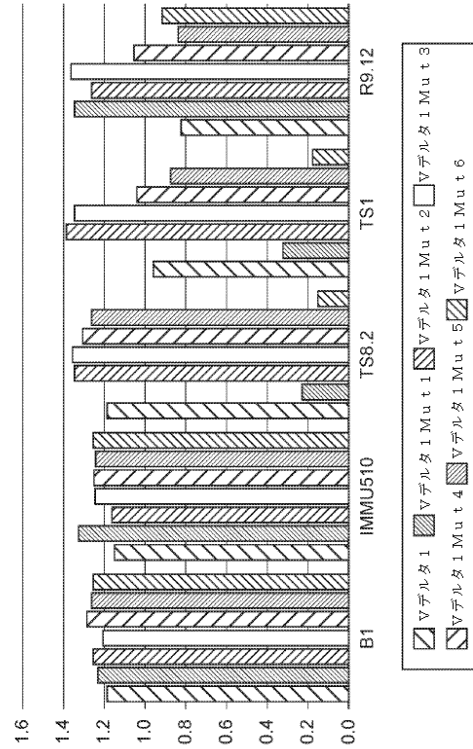
10

20

【 2 6 】

| | |
|-------------|--|
| レトVδ1 | AGKVTQAQSSVMPVRKAVTLINCLYETSWSYIIFWKQLPSEKEMIFLIR |
| レトVδ1 Mut 1 | AGKVTQAQSSVMPVRKAVTLINCLYETSWSYIIFWKQLPSEKEMIFLIR |
| レトVδ1 Mut 2 | AGKVTQAQSSVMPVRKAVTLINCLYETSWSYIIFWKQLPSEKEMIFLIR |
| レトVδ1 Mut 3 | AGKVTQAQSSVMPVRKAVTLINCLYETSWSYIIFWKQLPSEKEMIFLIR |
| レトVδ1 Mut 4 | AGKVTQAQSSVMPVRKAVTLINCLYETSWSYIIFWKQLPSEKEMIFLIR |
| レトVδ1 Mut 5 | AGKVTQAQSSVMPVRKAVTLINCLYETSWSYIIFWKQLPSEKEMIFLIR |
| レトVδ1 Mut 6 | AGKVTQAQSSVMPVRKAVTLINCLYETSWSYIIFWKQLPSEKEMIFLIR |
| レトVδ1 | QGSDFONAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGTGVRGL |
| レトVδ1 Mut 1 | QGSDFONAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGTGVRGL |
| レトVδ1 Mut 2 | QGSDFONAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGTGVRGL |
| レトVδ1 Mut 3 | QGSDFONAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGTGVRGL |
| レトVδ1 Mut 4 | QGSDFONAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGTGVRGL |
| レトVδ1 Mut 5 | QGSDFONAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGTGVRGL |
| レトVδ1 Mut 6 | QGSDFONAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGTGVRGL |

【 2 7 】

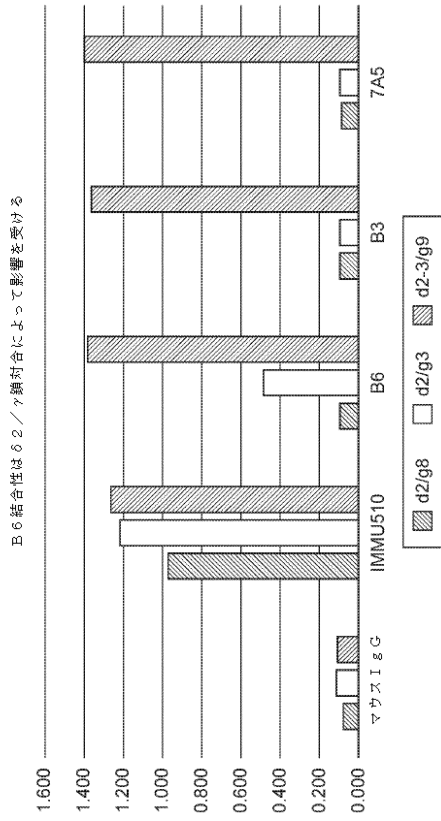


30

40

50

【図 28】



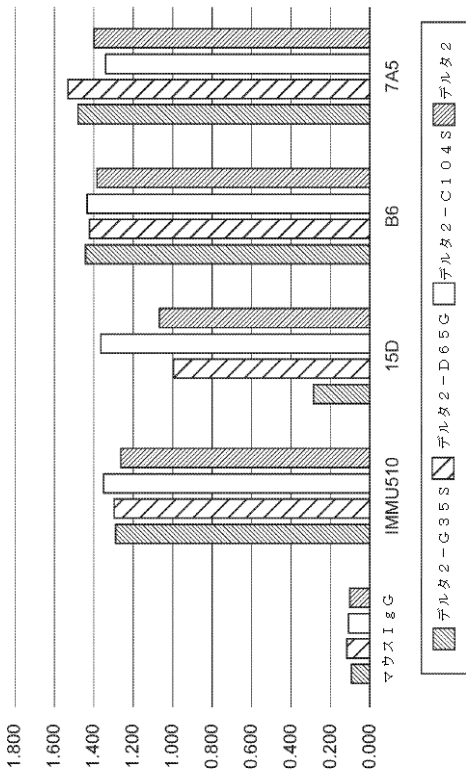
【図 29】



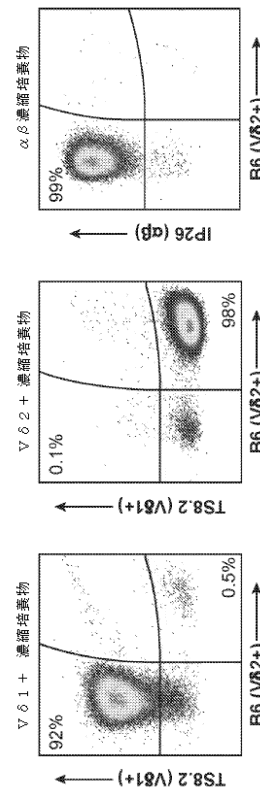
10

20

【図 30】



【図 31】

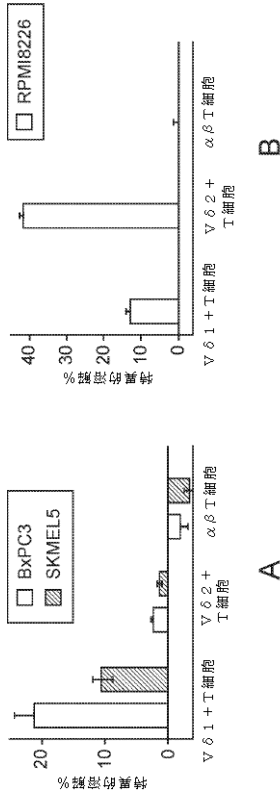


30

40

50

【 図 3 2 】



【 図 3 3 - 1 】

| mAb | FW1 | CDRH1 | FW2 | CDRH2 |
|--------|--------------------------------|--------|----------------|--------------------|
| 81-05 | DVQLQESGGGKPKGSLSLTCTVIGYSIT | GGVDWH | WLRHPPGNLEWMA | YISYSGSDYNSFLKS |
| 81-08 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DYEVY | WVKQTPVHGLEWIG | ALDP2GTGRTAYNQRFG |
| 81-18 | EVQLQESGPELVRFPGASVTLSCASGYTF | DYVMD | WVKQSHGRSLEWIG | YIYPKNVGISYVNRKFG |
| 81-22 | QVQLQESGPELVRFPGASVTLSCASGYTF | SYVDIN | WVKQREGGLEWIG | WLYPGDGTIYVNRKFG |
| 81-26 | SDVQLQESGPELVRFPGASVTLSCASGYTF | SGYHWN | WIRQPPGNLEWMA | YIHSYSGSDYNSFLKS |
| 81-35 | EVQLQESGPELVRFPGASVTLSCASGYTF | TYVNH | WVKQREGGLEWIG | ALYVNSGDTYVNRKFG |
| 81-37 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | SYVMD | WVKQREGGLEWIG | KIDP2YDSETHYVNRKFG |
| 81-39 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | SYVNH | WVKQREGGLEWIG | VLDP2YDSETHYVNRKFG |
| 81-113 | EVLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFS | DANWD | WVRSPEKGLEWVA | EIRASANNHATYVNSVVG |
| 81-143 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DYVMD | WVKQREGGLEWIG | TIDP2YDSVAYNQRFG |
| 81-149 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DSEMY | WVKQTPVHGLEWIG | ALDP2GTGRTAYNQRFG |
| 81-155 | EVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DDYMH | WVKQREGGLEWIG | WLDP2YDSVAYNQRFG |
| 81-182 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DYEMH | WVKQTPVHGLEWIG | DLDP2GTGRTAYNQRFG |
| 81-183 | EVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DDYMH | WVKQREGGLEWIG | WLDP2YDSVAYNQRFG |
| 81-191 | EVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DDYMH | WVKQREGGLEWIG | WLDP2YDSVAYNQRFG |
| 81-192 | QIQLVDSGPELVRFPGASVTLSCASGYTF | TYGMS | WVKQAPGKLEWMA | WINTYSGVPTVYADDFRG |
| 81-195 | EVVFTESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFS | DANWD | WVRSPEKGLEWVA | EIRASANNHATYVNSVVG |
| 81-197 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DYEMH | WVKQTPVHGLEWIG | ALDP2GTGRTAYNQRFG |
| 81-199 | EVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DDYMS | WVKQREGGLEWIG | WLDP2YDSVAYNQRFG |
| 81-201 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DYEMH | WVKQTPVHGLEWIG | ALDP2GTGRTAYNQRFG |
| 81-203 | SDVQLQESGPELVRFPGASVTLSCASGYTF | SGYHWN | WIRQPPGNLEWMA | YIHSYSGSDYNSFLKS |
| 81-239 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DSEMY | WVKQTPVHGLEWIG | ALDP2GTGRTAYNQRFG |
| 81-253 | EVQLQESGPELVRFPGASVTLSCASGYTF | DYVNH | WVKQSHGRSLEWIG | HINPYNGGTSYVNRKFG |
| 81-257 | QVQLQESGAEIVRFPGASVTLSCASGYTF | DYEMH | WVKQTPVHGLEWIG | ALDP2GTGRTAYNQRFG |
| 81-278 | SDVQLQESGPELVRFPGASVTLSCASGYTF | SDYHWN | WIRQPPGNLEWMA | YIYVNSGDTYVNRKFG |
| 81-282 | EVLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFS | DSEMY | WVKQTPVHGLEWIG | YIYVNSGDTYVNRKFG |
| 81-285 | EVVLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFS | DYGMH | WVRSPEKGLEWVA | YIYVNSGDTYVNRKFG |

10

20

【 図 3 3 - 2 】

| FW3 | CDRH3 | FW4 |
|------------------------------------|------------------|------------|
| RISVTHDTSKNLFLNLTSTVEDTATYYCAR | EGGRGFAY | WGQGLTVTVA |
| KAILTPTDKSSSTAYMELRLTSEDSAVYYCAR | LKSGRYGDLFAY | WGQGLTVTVA |
| KATLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCAR | SLLWDALDY | WGQGSVTVSS |
| KATLTVDTSSSAYMELHSLTSEDSAVYYCAR | MDDYDDGGAMDY | WGQGSVTVSS |
| RISITRDTSKNQFFLQNLNSVTTEDTATYYCVA | YYSNSREFWAY | WGQGLTVTVA |
| KAKLTAVTSASTAYMELSSLTSEDSAVYYCTY | GYVVDYIAMDY | WGQGSVTVSS |
| KAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR | GGDNDYDPFAY | WGQGLTVTVA |
| KATLTVDTSSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR | SDDYDEGYFFDQ | WGQGLTVTVA |
| RFTISRDDSKSRVFLQMSLRAEDTGIYYCTG | LDYGSIGFAY | WGQGLTVTVA |
| KATLTVDTSSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCAR | ESNDVCWYFDV | WGACTVTVSS |
| KATLTVSDKSSSTAYMELRLTSEDSAVYYCTR | AVPPWFAY | WGQGLTVTVA |
| KATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNY | YGFYD | WGQGLTVTVA |
| KAILTADKSSSTAYMELRLTSEDSAVYYCTV | WSADF | WGQGSVTVSS |
| KATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTY | YAMDY | WGQGSVTVSS |
| KATLTVDTSSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYYCTE | LGFDY | WGQGLTVTVA |
| RFAPFLETSASTAYLQNLNSVTTEDTATYYFCAR | SSYDYDDAMDY | WGQGSVTVSS |
| RFTISRDDSKSRVFLQMSLRAEDTGIYYCTG | LDYGSVGFAY | WGQGLTVTVA |
| KATLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCIR | PRGGSHFDY | WGQGLTVTVA |
| KATITADTSSNTAYLRLSSLTSEDTAVYYCTE | LGFDY | WGQGLTVTVA |
| KATLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCTR | PRGGSHFDH | WGQGLTVTVA |
| RISITRDTSKNQFFLQNLNSVTTEDTATYYCAS | VYYGDYEVWYTY | WGQGLTVTVA |
| KATLTVSDKSSSTAYMELRLTSEDSAVYYCTR | AVPPWFAY | WGQGLTVTVA |
| KATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAR | NHYYVDDGGYFYAMDY | WGQGSVTVSS |
| KAKLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCTR | GYGIQFPY | WGQGLTVTVA |
| RISITRDTSKNQFFLQNLNSVTTEDTATYYCAR | DDGYFDY | WGQGSVTVSS |
| RFTISRDNKAKTLYLQMSRLKSEDTAMYYCAS | RGYY | WGQGSVTVSS |
| RFTISRDNKAKTLYLQMSRLKSEDTAMYYCAR | EGAYSSFYD | WGQGLTVTVA |

【 図 3 4 - 1 】

| mAb | FW1 | CDRL1 | FW2 |
|--------|----------------------------|------------------|-----------------|
| 81-05 | NIVLVTSQSPASLAVSLGQRATITSC | RASESVYDYGNSFMH | WYQKPKGPPKLLIY |
| 81-08 | QIVLTQSPFALMSASPGKVTMTIC | SASSSVSYMY | WYQKPRSSPKPWYI |
| 81-18 | DIQMTQSPASLSVSVGTEVTITIC | RASENYSNLA | WYQKQKSPQLLIY |
| 81-22 | DVVMTQTFLLSLVSVVGGQASISIC | KSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-26 | DIVMSQSPFSLAVSVGKVTMISC | KSSQSLVHNSGNTYLN | WYQKPKGQSPKLLIY |
| 81-35 | DIVMTQSHKFMSTVSGDRVSTIC | KASQVSDVA | WYQKPKGQSPKLLIY |
| 81-37 | DIQMTQSPASLSVSVGTEVTITIC | RASENYSNLA | WYQKQKSPQLLIY |
| 81-39 | DVVMTQTFLLSLVSVVGGQASISIC | KSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-113 | DVIMTQTFLLSLVSVLGDQASISIC | RSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-143 | DIQMTQTFLLSLVSVLGDQASISIC | RASQSLVHNSGNTYLN | WYQKPKGQSPKLLIY |
| 81-149 | QIVLTQSPFALMSASPGKVTMTIC | SASSSVSYMY | WYQKPRSSPKPWYI |
| 81-155 | DVIMTQTFLLSLVSVLGDQASISIC | RSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-182 | SDVVRPTEFLSLVSVLGDQASISIC | RSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-183 | DVVMTQIVFVSLPVTLDGQASISIC | RSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-191 | AVVMTQTFLLSLVSVLGDQASISIC | RSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-192 | DVQITQSPFSLVLAASPGKVTMTIC | RTSKLSKYL | WYQKPKGQSPKLLIY |
| 81-195 | DVIMTQTFLLSLVSVLGDQASISIC | RSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-197 | QIVLSQSPFALMSASPGKVTMTIC | RASSSVSYMY | WYQKPRSSPKPWYI |
| 81-199 | AVVMTQTFLLSLVSVLGDQASISIC | RSSQSLVHNSGNTYLN | WYLQKPGQSPKLLIY |
| 81-201 | QIVLSQSPFALMSASPGKVTMTIC | RASSSVSYMY | WYQKPRSSPKPWYI |
| 81-203 | DIVMSQSPFSLAVSVGKVTMISC | KSSQSLVHNSGNTYLN | WYQKPKGQSPKLLIY |
| 81-239 | QIVLTQSPFALMSASPGKVTMTIC | SASSSVSYMY | WYQKPRSSPKPWYI |
| 81-253 | NIVLVTSQSPASLAVSLGQRATITSC | RASESVYDYGNSFMH | WYQKPKGPPKLLIY |
| 81-257 | QIVLSQSPFALMSASPGKVTMTIC | RASSSVSYMY | WYQKPRSSPKPWYI |
| 81-278 | QIVLSQSPFALMSASPGKVTMTIC | RASSSVSYMY | WYQKPRSSPKPWYI |
| 81-282 | DIVLTQSPFSLAVSLGQRATITSC | KASQVSDYDGSYMN | WYQKPKGQSPKLLIY |
| 81-285 | DIVLTQSPFALMSASPGKVTMTIC | KASQVSDYDGSYMN | WYQKPKGQSPKLLIY |

30

40

50

【 3 4 - 2 】

| CDRL2 | FW3 | CDRL3 | FW4 |
|---------|----------------------------------|------------|------------|
| LASNLES | GVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEISDDAATYYC | QQNEDPFT | FGGSKLEIK |
| FTSNLAS | GVPARFSGSGSSTSYSLTISMEAEADAATYYC | QQWSSNPLT | FGAGTKLEIK |
| AATYLAD | GVPSRFSGSGGTQYSLKINSLQSEDFGYYC | QHFHGIPTT | FGGSKLEIK |
| LVSKLES | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | LQATHFPLT | CGAGTKLEIK |
| WASTRES | GVPDFRFGSGSSTDFLTISSVKAEDLAVYYC | QQDYSYPL | TFGGTKLEIK |
| SASYRYT | GVPDFRFGSGSSTDFLTISSVKAEDLAVYYC | QQHYSIPT | FGGSKLEIK |
| GARNLAD | GVPSRFSGSGGTQYSLKINSLQSEDFGYYC | QHFHDTFTT | FGGSKLEIK |
| LVSQVES | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | LQVTHFPLT | FGAGTKLEIK |
| KVSNRFS | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | FGGSHVPTT | FGGSKLEIKR |
| YTSRLHS | GVPSRFSGSGSSTDFLTISSVKAEDLAVYYC | QQQNTLRT | FGGSKLEIK |
| LTSNLA | GVPARFSGSGSSTSYSLTISMEAEADAATYYC | QQWSSDPTT | FGGSKLEIKR |
| KVSNRFS | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | FGGSHVPTT | FGGSKLEIKR |
| KVSNRFS | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | SGSTHVPPWT | FGGSKLEIK |
| KVSNRFS | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | SGSTHVPPWT | FGGSKLEIK |
| KVSNRFS | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | SHSTHVPTT | FGGSKLEIKR |
| SGSTLQS | GVPSRFSGSGSSTDFLTISSVKAEDLAVYYC | QHFHDTFTT | FGGSKLEIKR |
| KVSNRFS | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | FGGSHVPTT | FGGSKLEIKR |
| ATSNLAS | GVPARFSGSGSSTSYSLTISMEAEADAATYYC | QQWSSDPTT | FGAGTKLEIK |
| KVSNRFS | GVPDFRFGSGSSTDFLTKISRVEADLGYYC | SHSTHVPTT | FGGSKLEIKR |
| ATSNLAS | GVPARFSGSGSSTSYSLTISMEAEADAATYYC | QQWSSDPTT | FGAGTKLEIK |
| WASTRES | GVPDFRFGSGSSTDFLTISSVKAEDLAVYYC | QQDYSYPLT | FGGSKLEIK |
| LTSNLA | GVPARFSGSGSSTSYSLTISMEAEADAATYYC | QQWSSDPTT | FGGSKLEIKR |
| LASNLES | GVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEISDDAATYYC | QQNEDPWT | FGGSKLEIK |
| GTSNLAS | GVPARFSGSGSSTSYSLTISMEAEADAATYYC | QQWSSDPTT | FGGSKLEIK |
| GTSNLAS | GVPARFSGSGSSTSYSLTISMEAEADAATYYC | QQWSSNPTT | FGAGTKLEIK |
| GASNLES | GVPARFSGSGSSTDFLTISSVKAEDLAVYYC | QQSNEDPWT | FGGSKLEIK |
| AASNLES | GVPARFSGSGSSTDFLTISSVKAEDLAVYYC | QQSNEDPWT | FGGSKLEIK |

【 3 5 - 1 】

| mAb | FW1 | CDRH1 | FW2 | CDRH2 |
|-------|--------------------------------|-------|------------------|--------------------|
| 62-14 | EVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYST | GYYN | WVKQSPKSLLEWIG | EINPSTGGTTYNOKFOA |
| 62-17 | SDVQLQSGSGELVTFSGQSLSVTVGYSIT | SGSYW | WIKQPPGKRLKLEWIG | YIHNSGSTTYNPSLRS |
| 62-30 | QVQLQSGAEIWRPGASVLSCTSSGTFPT | SYWQ | WVKQPPGKRLKLEWIG | EIPFGTGTYYNENKFKG |
| 62-31 | QVQLQSGAEIWRPGASVLSCTSSGTFPT | NFWIN | WVKQPPGKRLKLEWIG | NIPFGSSSPNYNENKFKS |
| 62-32 | EVQLVDSGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTPT | DYMS | WVKQPPGKRLKLEWIG | FIRNKANGYTTESASVKG |
| 62-33 | EVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYST | GYYN | WVKQSPKSLLEWIG | EINPSTGGTTYNOKFOA |
| 62-35 | DVQLVDSGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTPT | SYMS | WVKQPPGKRLKLEWIG | TISNSGGSTYYNENKFKG |
| 62-36 | QVQLQSGAEIWRPGASVLSCTSSGTFPT | NFWIN | WVKQPPGKRLKLEWIG | NIPFGSSSPNYNENKFKF |
| 62-37 | QVQLQSGAEIWRPGASVLSCTSSGTFPT | NHWIS | WVKQPPGKRLKLEWIG | NIPFGSSSPNYNENKFKS |

10

20

【 3 5 - 2 】

| FW3 | CDRH3 | FW4 |
|----------------------------------|---------------|------------|
| KATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDAVYYCSR | GEDDGYFPYSMDP | WQVGSVTVSS |
| RISITRPTSKNQFELQLNSVTTEDEAFYYCAR | STGPPFTY | WQVGLVTVSA |
| KAPLTVRSTSSSTAYMQLSLSLSEDAVYYCAR | RGVPGMYAMY | WQVGSVTVSS |
| KATLTVDISSTAYMQLSLSLSEDAVYYCAR | YGSYGNWYFDV | WQVGSVTVSS |
| RFTISRDNQSLYLQWVLRADSAFYYCAS | SKPGWYFDV | WQVGSVTVSS |
| KATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDAVYYCSR | GEDDGYFPYSMDP | WQVGSVTVSS |
| RFTISRDNARNTLYQLSLSLSEDAVYYCSR | EYDFGDFPDY | WQVGLVTVSS |
| KATLTVDISSTAYMQLSLSLSEDAVYYCAR | YGSYGNWYFDV | WQVGSVTVSS |
| KATLTVRSTSSSTAYMQLSLSLSEDAVYYCTR | WVWYGYAMY | WQVGSVTVSS |
| | | |
| | | |

【 3 6 - 1 】

| mAb | FW1 | CDRL1 | FW2 | CDRL2 |
|-------|--------------------------|-----------------|----------------|---------|
| 62-14 | DIVLIQSPATLSVTPFGDSVLSLC | RAQSINNNLH | WYQKSHESPRLLIK | YVQSIS |
| 62-17 | NIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCS | RASESVDNYGNSFMH | WYQKPPGKPKLLIY | LASNLES |
| 62-22 | DIQMTQSPASLSVSGEVTVITTC | RASENIYSNLA | WYQKQKSPQLLYY | AATNLAG |
| 62-30 | DIQMTQSPASLSVSGEVTVITTC | RASENIYSNLA | WYQKQKSPQLLYY | AATNLAD |
| 62-31 | DIQMTQSPASLSVSGEVTVITTC | RAQDINGFLS | WYQKPPGKPKLLIY | PANRLVD |
| 62-32 | DIQMTQSPASLSVSGEVTVITTC | RASEDINRRLA | WYQKPPGKPKLLIY | GATSLA |
| 62-33 | DIVLIQSPATLSVTPFGDSVLSLC | RAQSINNNLH | WYQKSHESPRLLIK | YVQSIS |
| 62-35 | DVWMTQSPSLPVSLSGDSVLSLC | RSQSLVHNSGNTYLA | WYQKPPGKPKLLIY | KVSNRFS |
| 62-36 | DIQMTQSPASLSVSGEVTVITTC | RAQDINRFLS | WYQKPPGKPKLLIY | PANRLVD |
| 62-37 | QIVLTQSPAIMSASLGEIITTC | SASSPNNYH | WYQKSHESPRLLIK | STSNLAS |

30

40

50

【 図 3 6 - 2 】

| FW3 | CDRL3 | FW4 |
|-----------------------------------|-----------|-------------|
| GIPTRFSGSGSDFTLSINSVETEDFGMYFC | QQSNSNPLT | FGAGTKLELK |
| GVPARFSGSGSRDFTLTIIDPVEADDAATYYC | QQNEDPT | FGSGTKLEMK |
| GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGSIYC | QHFVGTPT | FGSGTKLEIK |
| GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGSIYC | QHFVGTPT | FGSGTKLEIKR |
| GVPSRFSGSGSGQDYSLTSSLEYEDMGIIYC | LQSDPEPPT | IGGGTKLEYKR |
| GVPSRFSGSGSGNDYLSITSLQTEIDVATYYC | QQVWYTPWT | FGGGTKLEIK |
| GIPTRFSGSGSDFTLSINSVETEDFGMYFC | QQSNSNPLT | FGAGTKLELK |
| GVPTDFSGSGSDFTLTKISRVEAEDLGIIYC | QSQPHVPT | FGGGTKLEIKR |
| GVPSRFSGSGSGQDYSLTSSLEYEDMGIIYC | LQSDPEPPT | IGGGTKLEIKR |
| GVPSRFSGSGSGTFTLSITISVEAEDAATYYC | HWSSSYPT | FGGGTKLEIK |

【 図 3 7 】

| 変異区応性 | 81y8 | | 82y9 | | 83y2 | | 84y8 | | 85y3 | | 87y8 | | 88y8 | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 | 値 |
| TS-1 | 1.754 | 0.080 | 0.061 | 0.064 | 0.059 | 0.067 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 | 0.066 |
| d1-08 | 2.198 | 0.089 | 0.084 | 0.084 | 0.081 | 0.038 | 0.040 | 0.040 | 0.040 | 0.040 | 0.040 | 0.040 | 0.040 | 0.040 |
| d1-18 | 1.790 | 0.044 | 0.045 | 0.049 | 0.046 | 0.042 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 |
| d1-26 | 2.099 | 0.051 | 0.048 | 0.051 | 0.053 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 |
| d1-35 | 1.081 | 0.048 | 0.051 | 0.983 | 0.043 | 0.043 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 |
| d1-37 | 1.491 | 0.051 | 0.048 | 0.872 | 0.052 | 0.037 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 |
| d1-39 | 1.387 | 0.097 | 0.059 | 0.054 | 0.062 | 0.043 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 |
| その他 | 1.587 | 0.128 | 0.078 | 0.067 | 0.069 | 0.041 | 0.043 | 0.043 | 0.043 | 0.043 | 0.043 | 0.043 | 0.043 | 0.043 |
| B1 | 1.278 | 0.084 | 0.048 | 1.249 | 0.044 | 0.053 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 |
| その他 | 1.741 | 0.062 | 0.052 | 1.005 | 0.052 | 0.043 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 | 0.044 |
| B1 | 1.525 | 0.052 | 0.044 | 0.043 | 0.043 | 0.056 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 |
| その他 | 2.013 | 0.052 | 0.050 | 0.051 | 0.057 | 0.039 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 | 0.038 |
| B1 | 1.167 | 0.072 | 0.734 | 0.824 | 0.646 | 0.076 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 | 0.067 |
| その他 | 1.282 | 0.080 | 0.758 | 0.694 | 0.469 | 0.044 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 |
| その他 | 2.263 | 1.307 | 1.711 | 1.582 | 1.381 | 1.922 | 1.828 | 1.828 | 1.828 | 1.828 | 1.828 | 1.828 | 1.828 | 1.828 |
| その他 | 2.117 | 1.668 | 1.669 | 1.722 | 1.176 | 0.644 | 1.604 | 1.604 | 1.604 | 1.604 | 1.604 | 1.604 | 1.604 | 1.604 |

【 図 3 8 】

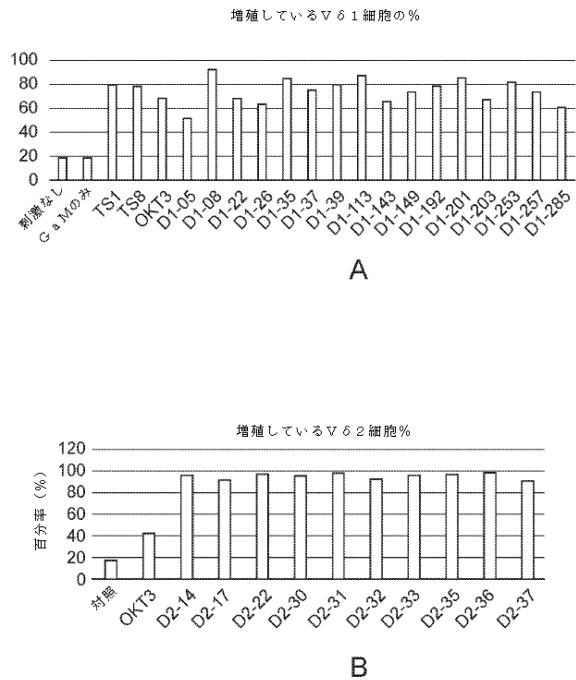
ヒトVd1
イルカVd1

CDR1
AQRVTAQSSVSMPEKAVTLNCLYE[TSWASXY]LFWYKQLPSKEMILIR
-----V-RAM-SQLGE-----S-Q-----LSW-D-----G-T-----H

ヒトVd1
イルカVd1

CDR2
[GG]DEQNAKSGRYSVNFKRAKVAITISALQLEDSAKYFCALGE-----
-I-SD-----N-----QERH-FIS-----LV-----N-----TGYRGL

【 図 3 9 】



10

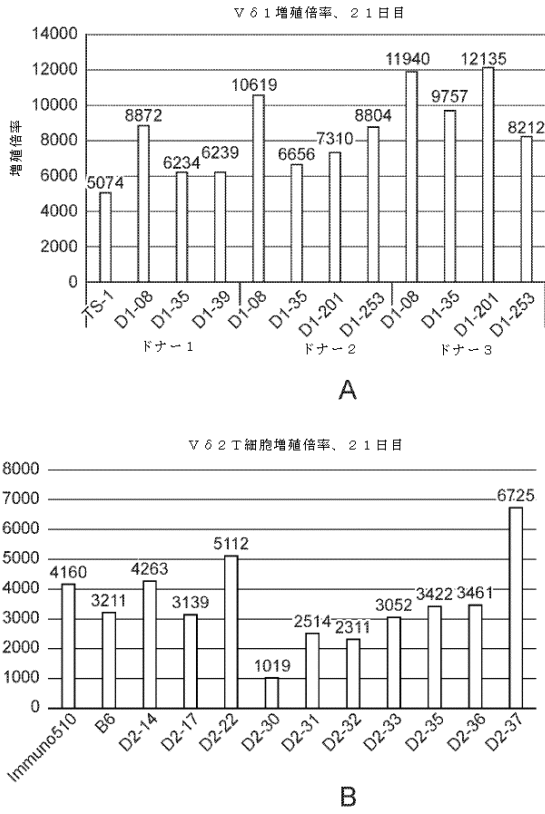
20

30

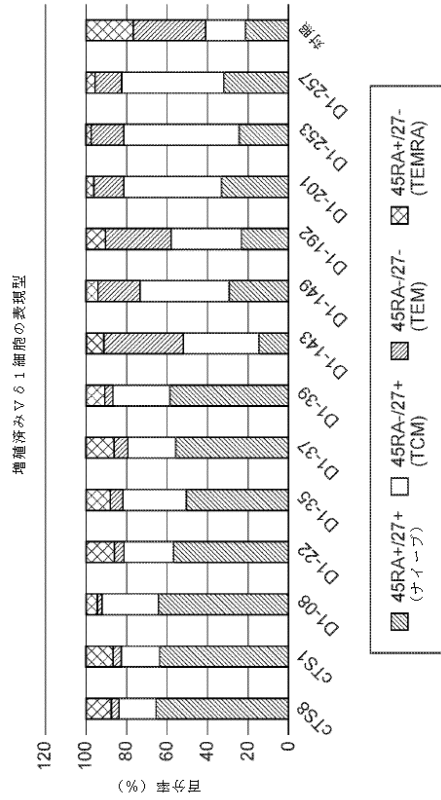
40

50

【図 4 0】



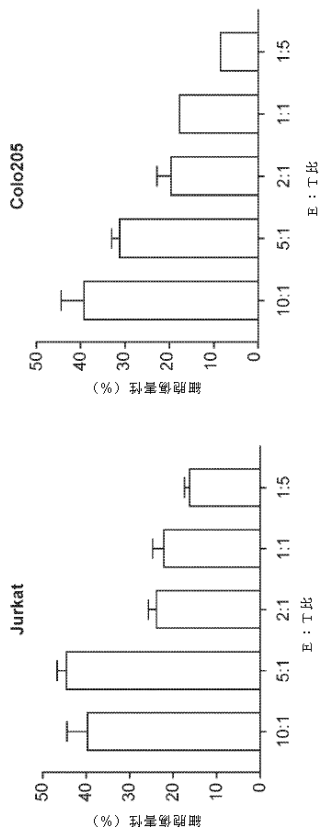
【図 4 1】



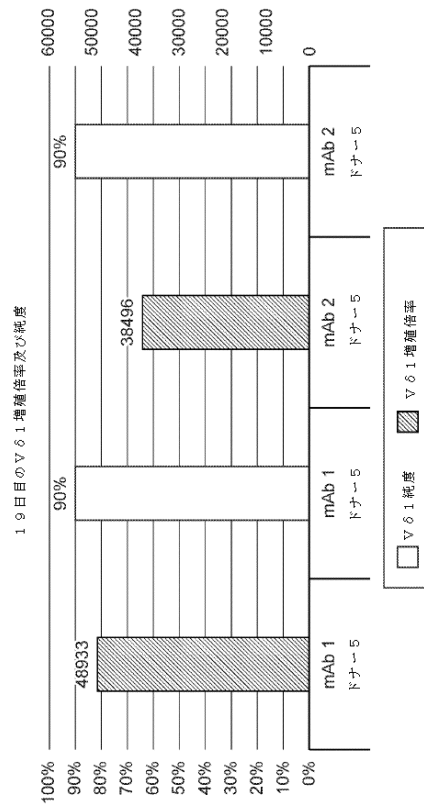
10

20

【図 4 2】



【図 4 3】



30

40

50

【配列表】

0007210286000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 K 35/17 Z

レーン 7 1 2

(72)発明者

リン, アンディ アン - デ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 6 , パロ アルト, ダンカン プレイス 3 9 3 4

(72)発明者

サンタギダ, マリアヌ テリーサ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 2 , ベルモント, パイン ノール ドライブ 1 7 0 6

(72)発明者

デサイ, ラディカ チェタン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 5 , ブリズベーン, サン ベニート ロード 2 6 3

(72)発明者

ジン, イフォン フランク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 5 , フリーモント, アウニング テラス 3 4 8 4 7

(72)発明者

サトパエフ, ダウレット カディル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 1 , レッドウッド シティ, ファーム ヒル ブールバ
 ード 3 5 7 3 2 0 番

(72)発明者

リー, ヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0 , サン カルロス, シカモア ストリート 4 2 9

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 6 / 1 9 8 4 8 0 (W O , A 1)

特表 2 0 1 4 - 5 1 5 2 5 9 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 7 2 7 3 9 (U S , A 1)

Immunol. Res. , 2013年, Vol. 56 , pp. 172-180

Oncolmmunology , 2015年, Vol. 4, No. 3 , e992749 (pp. 1-13)

Clinical Cancer Research , 2014年06月, Vol. 20, No. 22 , pp. 5720-5732

(58)調査した分野

(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d