

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6686008号
(P6686008)

(45) 発行日 令和2年4月22日 (2020.4.22)

(24) 登録日 令和2年4月3日 (2020.4.3)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 14/725 (2006.01)

C O 7 K 14/725

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/85 (2006.01)

C 1 2 N 15/85 Z

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 Z

請求項の数 17 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-517662 (P2017-517662)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月2日 (2014.10.2)
 (65) 公表番号 特表2017-531640 (P2017-531640A)
 (43) 公表日 平成29年10月26日 (2017.10.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/058796
 (87) 国際公開番号 W02016/053338
 (87) 国際公開日 平成28年4月7日 (2016.4.7)
 審査請求日 平成29年9月22日 (2017.9.22)

特許法第30条第2項適用 2014年 (平成26年)
 4月7日 米国癌学会 (A A C R) の会議にて発表

(73) 特許権者 510002280
 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208
 92-7660 ベトヘスダ エムエスシ
 ー7660 スイテ325 エクエクトイ
 ブ ボウレバルド 6011 ナショナル
 インスティテュート オブ ヘルス オ
 フィス オブ テクノロジー トランスフ
 ァー
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がん特異的突然変異に対し抗原特異性を有するT細胞受容体を単離する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するT細胞受容体 (T C R) 又はその抗原結合部分を単離する方法であって、それぞれの遺伝子が、突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含有する、患者のがん細胞の核酸中1以上の遺伝子を同定すること；患者の自己抗原提示細胞 (A P C) を、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導すること；

患者の自己T細胞と、突然変異アミノ酸配列を提示する自己A P Cとを共培養すること；
 (a) 突然変異アミノ酸配列を提示する自己A P Cと共培養されて、且つ (b) 患者によって発現される主要組織適合性複合体 (M H C) 分子の関係で提示される突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、自己T細胞を選択すること；及び
 選択された自己T細胞から、T C R 又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を単離することを含み、T C R 又はその抗原結合部分は、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、方法。

【請求項2】

患者の自己A P Cを、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導することが、突然変異アミノ酸配列を含むペプチド又はペプチドプールでA P Cをパルスすることを含み、プール中の各ペプチドは異なる突然変異アミノ酸配列を含む、請求項1の方法。

【請求項3】

患者の自己 A P C を、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導することが、突然変異アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を A P C に導入することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

自己 A P C に導入されるヌクレオチド配列がタンデムミニ遺伝子 (T M G) コンストラクトであり、各ミニ遺伝子が異なる遺伝子を含み、各遺伝子が突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含む、請求項 3 の方法。

【請求項 5】

患者由来の腫瘍の複数断片を提供すること、該複数断片からの自己 T 細胞のそれぞれを別々に、突然変異アミノ酸配列を提示する自己 A P C と共培養すること、及び複数断片のそれぞれからの T 細胞を、突然変異アミノ酸配列に対する抗原特異性に関して別々に評価することを更に含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項の方法。

10

【請求項 6】

突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己 T 細胞を選択することが、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己 T 細胞を選択的に増殖させることを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 7】

突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己 T 細胞を選択することが、プログラム細胞死 1 (P D - 1)、リンパ球活性化遺伝子 3 (L A G - 3)、T 細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン 3 (T I M - 3)、4 - 1 B B、O X 4 0、及び C D 1 0 7 a のいずれか 1 以上を発現する T 細胞を選択することを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項の方法。

20

【請求項 8】

突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己 T 細胞を選択することが、(i) 突然変異アミノ酸配列を提示する A P C との共培養に際して、ネガティブコントロールによって分泌される 1 以上のサイトカインの量と比較して、より多くの量の 1 以上のサイトカインを分泌するか、又は (i i) 突然変異アミノ酸配列を提示する A P C との共培養に際して、1 以上のサイトカインを分泌するネガティブコントロール T 細胞の数と比較して、少なくとも 2 倍の多さの数の T 細胞が 1 以上のサイトカインを分泌する T 細胞を選択することを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項の方法。

30

【請求項 9】

1 以上のサイトカインが、インターフェロン (I F N) - 、インターロイキン (I L) - 2、腫瘍壊死因子アルファ (T N F -)、顆粒球 / 単球コロニー刺激因子 (G M - C S F)、I L - 4、I L - 5、I L - 9、I L - 1 0、I L - 1 7 及び I L - 2 2 を含む、請求項 8 の方法。

【請求項 1 0】

がん細胞の核酸中の 1 以上の遺伝子を同定することが、がん細胞の全エクソーム、全ゲノム、又は全トランスクリプトームを配列決定することを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項の方法。

【請求項 1 1】

がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する T C R 又はその抗原結合部分を発現する細胞集団を調製する方法であって、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項の方法により、T C R 又はその抗原結合部分を単離すること、及び単離された T C R 又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を末梢血単核細胞 (P B M C) に導入して、T C R 又はその抗原結合部分を発現する細胞を得ることを含む、方法。

40

【請求項 1 2】

T C R 又はその抗原結合部分を発現する P B M C の数を増幅することを更に含む、請求項 1 1 の方法。

50

【請求項 13】

哺乳動物におけるがんの治療又は予防のための医薬の製造方法であって、
請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項の方法により、T 細胞受容体 (TCR) 又はその抗原結合部分を単離すること；又は
請求項 11 ~ 12 のいずれか 1 項の方法により、TCR 又はその抗原結合部分を発現する細胞集団を調製すること
を含む、方法。

【請求項 14】

がんが上皮癌である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

がんが胆管がん、黒色腫、結腸がん又は直腸がんである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

PBMC が患者に対して自己である、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

PBMC が患者に対して同種異系である、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

電子提出された物件の参照による組み込み

本明細書と同時提出され、且つ、以下の通り識別されるコンピューター可読のヌクレオチド/アミノ酸の配列表が、参照により、本明細書中にその全体が組み込まれる：2014年9月15日付ファイル名「718291ST25.TXT」、29,577バイトのASCII (テキスト) ファイル1件。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

抗がん抗原 T 細胞受容体 (TCR) を発現するよう遺伝学的に操作された細胞を用いる養子細胞療法 (ACT) は、一部のがん患者において有益な臨床反応をもたらす得る。それにもかかわらず、がんや他の病気を、TCR を操作した細胞を使用して、首尾よく広範に治療することへの障害が残っている。例えば、がん抗原を特異的に認識する TCR は、同定すること及び/又は患者から単離することが困難であり得る。従って、がん反応性 TCR を得る方法の改善についてのニーズがある。

【発明の概要】

【0003】

発明の要旨

本発明の一実施形態は、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する TCR 又はその抗原結合部分を単離する方法であって、それぞれの遺伝子が、突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含有する、患者のがん細胞の核酸中の 1 以上の遺伝子を同定すること；患者の自己抗原提示細胞 (APC) を、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導すること；患者の自己 T 細胞と、突然変異アミノ酸配列を提示する自己 APC とを共培養すること；(a) 突然変異アミノ酸配列を提示する自己 APC と共培養されて、且つ (b) 患者によって発現される主要組織適合性複合体 (MHC) 分子の関係で提示される突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、自己 T 細胞を選択すること；及び選択された自己 T 細胞から、TCR 又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を単離することを含み、TCR 又はその抗原結合部分は、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、方法を提供する。

【0004】

本発明の別の実施形態は、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸

10

20

30

40

50

配列に対し抗原特異性を有する、T C R又はその抗原結合部分を発現する細胞集団を調製する方法であって、それぞれの遺伝子が、突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含有する、患者のがん細胞の核酸中の1以上の遺伝子を同定すること；患者の自己A P Cを、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導すること；患者の自己T細胞と、突然変異アミノ酸配列を提示する自己A P Cとを共培養すること；(a)突然変異アミノ酸配列を提示する自己A P Cと共培養されて、且つ(b)患者によって発現されるM H C分子の関係で提示される突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、自己T細胞を選択すること；選択された自己T細胞から、T C R又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を単離すること(T C R又はその抗原結合部分は、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する)；及び単離されたT C R又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を末梢血単核細胞(P B M C)に導入し、T C R又はその抗原結合部分を発現する細胞を得ることを含む、方法を提供する。

10

【0005】

本発明のさらなる実施形態は、関連する細胞集団、T C R又はその抗原結合部分、医薬組成物、及びがんを治療又は予防する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1Aは、3737-T I Lと、O K T 3、又は緑色蛍光タンパク質(G F P) R N A若しくは表示したタンデムミニ遺伝子(T M G)コンストラクトをトランスフェクションした樹状細胞(D C)との、20時間の共培養後に、インターフェロン(I F N)-酵素結合免疫吸着スポット(E L I S P O T)アッセイによって測定した、 1×10^3 ($1e3$)細胞あたりのスポット数を示すグラフである。「>」は、 1×10^3 細胞あたり500超のスポットを示す。モックトランスフェクションした細胞は、核酸の添加なしで、トランスフェクション試薬のみで処理した。図1Bは、O K T 3或いはG F P R N A、T M G-1、又は表示した野生型(w t)遺伝子A L K、C D 9 3、E R B B 2 I P、F C E R 1 A、G R X C R 1、K I F 9、N A G S、N L R P 2、若しくはR A C 3をトランスフェクションしたD Cとの共培養後の、O X 4 0+である、C D 4+の3737-T I Lのパーセンテージを示すグラフである。モックトランスフェクションした細胞は、核酸の添加なしで、トランスフェクション試薬のみで処理した。

20

30

【図2】図2A~2Cは、何もなしでか、又は表示したH L A遮断抗体(M H C-1、M H C-I I、H L A-D P、H L A-D Q、若しくはH L A-D R)と前培養していた、T M G-1をトランスフェクションしたD C(A)又は624-C I I T A細胞((B)及び(C))と共培養した3737-T I L(A)、D M F 5 T細胞(B)、又はT 4 T細胞(C)について、20時間目において、I F N-E L I S P O Tアッセイによって測定した、 1×10^3 ($1e3$)細胞あたりのスポット数を示すグラフである(A~C)。図2Dは、D M S O、突然変異(m u t)A L K又はm u t E R B B 2 I Pの25アミノ酸(-A A)長ペプチドで一晩パルスした、自己D Q-0301/-0601B細胞(灰色の棒)又はH L A-D Q 05/0601遺伝子座(黒色の棒)若しくはH L A-D Q-0201/0301遺伝子座(斜線なしの棒)において一部適合する同種異系E B V-B細胞と共培養した3737-T I Lについて、20時間目においてI F N-E L I S P O Tアッセイによって測定した、 1×10^3 ($1e3$)細胞あたりのスポット数を示すグラフである。E T G H L E N G N K Y P N L E(配列番号53)；図2Eは、m u t E R B B 2 I Pの25アミノ酸ペプチドT S F L S I N S K E E T G H L E N G N K Y P N L E(配列番号73)又は表示した、切断型m u t E R B B 2 I PペプチドF L S I N S K E E T G H L E N G N K Y P N L E(配列番号30)、S I N S K E E T G H L E N G N K Y P N L E(配列番号31)、N S K E E T G H L E N G N K Y P N L E(配列番号32)、K E E T G H L E N G N K Y P N L E(配列番号33)、E T G H L E N G N K Y P N L E(配列番号53)、T S F L S I N S K E E T G H L(配列番号34)、T S F L S I N S K E E T G H L E N(配列番号35)、T S F L S I N S K E E T G H L E

40

50

NGN (配列番号 36)、TSFLSINSKEETGHLENGKNKY (配列番号 37)、若しくは TSFLSINSKEETGHLENGKNKYPN (配列番号 38) で一晩パルスした自己 B 細胞と共培養した 3737-TIL について、20 時間目において、IFN-ELISPOT アッセイにより測定した 1×10^3 ($1e3$) 細胞あたりのスポット数を示すグラフである。

【図 3】図 3A は、生きている、CD4+ (陰影付き) T 細胞又は CD8+ (陰影なし) T 細胞にゲートしたフローサイトメトリーによって測定した、3737-TIL 中の様々な TCRV クローン型のパーセンテージを示すグラフである。図 3B は、3737-TIL の養子細胞移入 0 日目 (矢印で表示) 前後の、表示した日数で測定した、患者 3737 の血清サンプル中で検出した IFN-量 (pg/ml) を示すグラフである。エラーバーは平均の標準誤差 (SEM) である。図 3C は、細胞移入 0 日目 (矢印で表示) に対する、表示した月数での全腫瘍負荷 (丸) (前処置基準の % として測定) 又は肺 (三角) 若しくは肝臓 (四角) における腫瘍負荷を示すグラフである。図 3D は、フローサイトメトリーによって測定した、CD4+V22-OX40+ の 3737-TIL における、種々の TCRV クローン型のパーセンテージを示すグラフである。

【図 4】図 4A 及び 4B は、3737-TIL を用いた養子細胞移入前後 (細胞移入前の腫瘍 (菱形) 及び細胞移入後の種々の腫瘍 (Tu-1-Post (四角)、Tu-2-Post ()、及び Tu-3-Post ()) の様々な時点で、患者 3737 の血液 (丸) 中の、2 の ERBB2IP 突然変異特異的 TCR - CDR3 クローン型、V22+ (A) 及び V5.2+ (B) の頻度を示すグラフである。陰影付きの棒は、移入細胞 (3737-TIL) における 2 の ERBB2IP - 突然変異特異的 TCR - CDR3 クローン型、V22+ (A) 及び V5.2+ (B) の頻度を示す。「X」は「検出なし」を示す。図 4C は、3737-TIL (T 細胞) 及び種々の養子細胞移入前 (Tu-Pre) 及び後 (Tu-1-post、Tu-2-post 及び Tu-3-post) の腫瘍における、ACTB と比した ERBB2IP の発現を示すグラフである。図 4D は、細胞移入 (矢印で表示) に対する、表示した月数における全腫瘍負荷 (丸) (前処置基準の % として測定) 又は肺 (三角) 若しくは肝臓 (四角) における腫瘍負荷を示すグラフである。

【図 5A】図 5A は、同定した、突然変異した 6 アミノ酸残基 (その N- 及び C- 末端に、両側の 12 アミノ酸が隣接する) を含有するポリペプチドをコードするタンデムミニ遺伝子 (TMG) コンストラクトの一例の模式図である。突然変異 KIF2C 配列は、DSSLQARLFPGLTIKIQRSNGLIHS (配列番号 57) である。

【図 5B】図 5B は、自己メラニン細胞又は HLA-A*0205 及び TMG コンストラクト RJ-1 (図 9A に示す構造)、RJ-2、RJ-3、RJ-4、RJ-5、RJ-6、RJ-7、RJ-8、RJ-9、RJ-10、RJ-11、RJ-12、若しくは空のベクターを共トランスフェクションした COS-7 細胞と一晩共培養した TIL2359 T 細胞によって分泌される IFN-量 (pg/mL) を示すグラフである。

【図 5C】図 5C は、HLA-A*0205 及び RJ-1 変異体をトランスフェクションした COS-7 細胞と共培養した TIL2359 によって分泌された IFN-量 (pg/mL) を示すグラフである (表中、「wt」と表示した遺伝子を、WT 配列に再変換した)。KIF2C WT 配列は DSSLQARLFPGLAIKIQRSNGLIHS (配列番号 65) である。

【図 5D】図 5D は、HLA cDNA コンストラクト (左から右の各棒で特定される): HLA-A*0101 (陰影なしの棒)、HLA-A*0201 (灰色の棒)、又は HLA-A*0205 (黒色の棒) と共に、空のベクター、KIF2C WT、又は突然変異 KIF2C の cDNA コンストラクトをトランスフェクションした COS-7 細胞と共培養した TIL2359 によって分泌された IFN-量 (pg/mL) を示すグラフである。

【図 5E】図 5E は、種々の濃度 (μM) の KIF2C₁₀₋₁₉ WT (RLFPGLAIKI; 配列番号 58) (グラフ中の下の線) 又は突然変異 KIF2C₁₀₋₁₉ (R

10

20

30

40

50

L F P G L T I K I ; 配列番号 59) (グラフ中の上の線) でパルスした、H L A - A * 0205 を安定に発現する H E K 293 細胞と一晚共培養した T I L 2359 T 細胞によって分泌された I F N - 量 (p g / m L) を示すグラフである。

【図 6 A】図 6 A は、自己メラニン細胞又は、空のベクター若しくは D W - 1 ~ D W - 37 から成る群から選択された T M G コンストラクトをトランスフェクションした、H L A - C * 0701 を安定に発現する H E K 293 細胞と共培養した T I L 2591 T 細胞によって分泌される I F N - 量 (p g / m L) を示すグラフである。

【図 6 B】図 6 B は、T M G コンストラクト D W - 6 の構造を示す模式図である。突然変異 P O L A 2 配列は、T I I E G T R S S G S H F V F V P S L R D V H H E (配列番号 64) である。

【図 6 C】図 6 C は、H L A - C * 0701 及び D W - 6 変異体をトランスフェクションした C O S - 7 細胞と共培養した T I L 2591 によって分泌された I F N - 量 (p g / m L) を示すグラフである (表中、「w t」と表示した遺伝子を、W T 配列に再変換した)。P O L A 2 W T 配列は、T I I E G T R S S G S H L V F V P S L R D V H H E (配列番号 66) である。

【図 6 D】図 6 D は、H L A c D N A コンストラクト (左から右の各バーで特定される) : H L A - C * 0401 (陰影なしの棒)、H L A - C * 0701 (灰色の棒)、又は H L A - C * 0702 (黒色の棒) と共に、空のベクター、P O L A 2 W T、又は突然変異 P O L A 2 の c D N A コンストラクトをトランスフェクションした C O S - 7 細胞と共培養した T I L 2591 によって分泌された I F N - 量 (p g / m L) を示すグラフである。

【図 6 E】図 6 E は、種々の濃度 (μ M) の P O L A 2₄₁₃₋₄₂₂ W T (T R S S G S H L V F ; 配列番号 67) (グラフ中の下の線) 又は突然変異 P O L A 2₄₁₃₋₄₂₂ (T R S S G S H F V F ; 配列番号 68) (グラフ中の上の線) でパルスした、H L A - C * 0701 を安定に発現する H E K 293 細胞と、一晚共培養した T I L 2591 T 細胞によって分泌された I F N - 量 (p g / m L) を示すグラフである。

【図 7】図 7 A ~ 7 F は、突然変異反応性細胞の第 2 回投与前 (A ~ C) 及び 6 ヶ月後 (D ~ F) に撮影した、患者 3737 の肺のコンピューター断層撮影 (C T) スキャンである。矢印はがん病変を指す。

【発明を実施するための形態】

【0007】

発明の詳細な説明

本発明の一実施形態は、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する T C R 又はその抗原結合部分を単離する方法を提供する。本発明は多くの利点を提供する。例えば、本発明の方法は、患者の全 M H C 分子拘束性の多数の突然変異を、一度に迅速に評価し得、患者の突然変異反応性 T 細胞の全レパートリーを同定し得る。更に、本発明の方法は、免疫原性がん突然変異を、(a) がん特異的サイレント突然変異 (突然変異アミノ酸配列をコードしない) 及び (b) 非免疫原性アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異と区別することにより、T C R 又はその抗原結合部分によって標的とされ得る 1 以上のがん特異的突然変異アミノ酸配列を同定し得る。更に、本発明は、患者に特有のがん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する T C R 又はその抗原結合部分を提供し得、それにより、患者のがんを治療又は予防するのに有用であり得る、「個人向け」の T C R 又はその抗原結合部分を提供する。本発明の方法はまた、例えば c D N A ライブラリーを用いるもの等の、がん抗原を同定する従来の方法における固有の技術的バイアスを回避し得、それらの方法よりも時間と労力が少ない場合もある。例えば、本発明の方法は、T 細胞と、特に上皮がん (例) に関して作製が困難であり得る腫瘍細胞株とを共培養することなく、突然変異応答性 T 細胞を選択し得る。特定の理論又はメカニズムには縛られないが、本発明の方法は、正常な非がん性細胞の破壊を最少化又は回避し、それによって毒性を低減又は除去しつつ、がん細胞の破壊を目的とする T C R 又はその抗原結合部分を同定及び単離し得ると考

10

20

30

40

50

えられる。従って、本発明はまた、例えば、化学療法単独、外科手術又は放射線等の他のタイプの治療に反応しないがん等のがんを、首尾よく治療又は予防する T C R 又はその抗原結合部分を提供し得る。

【 0 0 0 8 】

該方法は、それぞれの遺伝子が、突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含有する、患者のがん細胞の核酸中の 1 以上の遺伝子を同定することを含み得る。がん細胞は、腫瘍細胞又はがん細胞を含有するか、又は含有することが予想される患者由来の任意の身体試料から得られ得る。身体試料は、血液、原発腫瘍から若しくは転移腫瘍から得られた組織サンプル等の任意の組織サンプル、又は腫瘍若しくはがん細胞を含有する他の任意のサンプルであり得る。がん細胞の核酸は、D N A であっても R N A であってもよい。

10

【 0 0 0 9 】

がん特異的突然変異を同定するために、該方法は、正常な非がん性細胞の D N A 又は R N A 等の核酸を配列決定し、がん細胞の配列を正常な非がん性細胞の配列と比較することを更に含み得る。正常な非がん性細胞は、患者又は異なる個体から得られ得る。

【 0 0 1 0 】

がん特異的突然変異は、突然変異アミノ酸配列（「非サイレント突然変異」とも言われる）をコードし、がん細胞において発現するが、正常の非がん性細胞ではない任意の遺伝子における任意の突然変異であり得る。本発明の方法において同定され得るがん特異的突然変異の非限定的な例としては、ミスセンス、ナンセンス、挿入、欠失、重複、フレームシフト及びリピート伸長変異（repeat expansion mutation）が挙げられる。本発明の一実施形態においては、該方法は、突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含有する、少なくとも 1 の遺伝子を同定することを含む。しかし、本発明の方法を用いて同定され得る、かかるがん特異的突然変異を含有する遺伝子の数は限定されず、1 超（例えば、約 2、約 3、約 4、約 5、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 20、約 25、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 80、約 90、約 100、約 150、約 200、約 400、約 600、約 800、約 1000、約 1500、約 2000 若しくはそれ以上、又は上記の値のうちの任意の 2 つによって規定される範囲）の遺伝子が挙げられ得る。同様に、本発明の一実施形態においては、該方法は、突然変異アミノ酸配列をコードする、少なくとも 1 のがん特異的突然変異を同定することを含む。しかし、本発明の方法を用いて同定され得る、かかるがん特異的突然変異の数は限定されず、1 超（例えば、約 2、約 3、約 4、約 5、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 20、約 25、約 30、約 40、約 50、約 60、約 70、約 80、約 90、約 100、約 150、約 200、約 400、約 600、約 800、約 1000、約 1500、約 2000 若しくはそれ以上、又は上記の値のうちの任意の 2 つによって規定される範囲）のがん特異的突然変異が挙げられ得る。1 超のがん特異的突然変異が同定される実施形態においては、がん特異的突然変異は、同一の遺伝子又は異なる遺伝子中に位置し得る。

20

30

【 0 0 1 1 】

一実施形態においては、がん細胞の核酸中の 1 以上の遺伝子を同定することは、がん細胞の全エクソーム、全ゲノム、又は全トランスクリプトームを配列決定することを含む。配列決定は、当該技術分野で公知の、任意の好適な状態で行われ得る。本発明の方法において有用であり得る配列決定技術の例としては、次世代配列決定（N G S）（「大規模並列配列決定技術」とも言われる）又は第 3 世代配列決定（Third Generation Sequencing）が挙げられる。N G S は、非サンガーベースのハイスループット D N A 配列決定技術を指す。N G S により、数百万又は数十億の D N A 鎖が並行して配列決定され得、相当に高いスループットをもたらす、ゲノムのサンガー配列決定によく用いられる、フラグメントクロニング法に対する必要性を最小限に抑える。N G S においては、ゲノム全体を小断片に分割することによって、核酸テンプレートが、ゲノム全体にわたって、並行してランダムに読み取られ得る。N G S は、好都合なことに、非常に

40

50

短い期間、例、約1～約2週以内、好ましくは約1～約7日以内、又は、最も好ましくは24時間未満の時間内に、ゲノム、エクソーム又はトランスクリプトーム全体の核酸配列情報を提供し得る。市販されているか、又は文献に記載されている複数のNGSプラットフォームが、本発明の方法に関連して用いられ得る(例、Zhang et al., J. Genet. Genomics, 38(3):95-109(2011)及びVoelkerding et al., Clinical Chemistry, 55:641-658(2009)に記載されたもの)。

【0012】

NGSの技術及びプラットフォームの非限定的な例としては、(GS-FLX 454 ゲノムシーケンサー, 454 Life Sciences (Branford, CT)、ILLUMINA SOLEXAゲノムアナライザー (Illumina Inc., San Diego, CA)、若しくはILLUMINA HISEQ 2000ゲノムアナライザー (Illumina)を用いて(例)、又はRonaghi et al., Science, 281(5375):363-365(1998)(例)に記載の通りに、行われるような)1塩基合成(sequencing-by-synthesis)(「パイロシーケンシング」としても知られる)、(SOLIDプラットフォーム (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA)又はPOLONATOR G.007プラットフォーム (Dover Systems, Salem, NH)を用いて(例)行われるような)シーケンシング・パイライゲーション(sequencing-by-ligation)、(PACBIO RS system (Pacific Biosciences (Menlo Park, CA)又はHELISCOPE platform (Helicos Biosciences (Cambridge, MA)を用いて(例)行われるような)単一分子配列決定、(Oxford Nanopore Technologies (Oxford, UK)のGRIDIONプラットフォーム、Nabsys (Providence, RI)によって開発されたハイブリダイゼーション・アシステッドナノポアシーケンシング (HANS)プラットフォーム、プローブ・アンカーライゲーション(cPAL)と呼ばれるDNAナノボール(DNB)テクノロジーによる、リガーゼベースのDNA配列決定プラットフォームを用いて(例)行われるような)単一分子配列決定のための技術、単一分子配列決定のための電子顕微鏡ベースの技術、及びイオン半導体シーケンシングが挙げられる。

【0013】

該方法は、患者の自己抗原提示細胞(APC)を、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導することを含み得る。APCとしては、それらの細胞表面上の主要組織適合複合体(MHC)分子と関係して、タンパク質のペプチド断片を提示する任意の細胞が挙げられ得る。APCとしては、例えば、マクロファージ、DC、ランゲルハンス細胞、Bリンパ球及びT細胞のうちの任意の1以上が挙げられ得る。好ましくは、APCはDCである。本発明の方法は、患者からの自己APCを用いることによって、好都合なことに、患者に発現するMHC分子の関係で提示されるがん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するTCR又はその抗原結合部分を同定し得る。MHC分子は、MHCクラスI、MHCクラスII、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DM、HLA-DO、HLA-DP、HLA-DQ及びHLA-DR分子が挙げられるが、これらに限定されない、患者によって発現される任意のMHC分子であり得る。本発明の方法は、例えば、いくつかのMHCクラスI対立遺伝子を選択する(select few MHC class I alleles)ためのみに有用であり得、突然変異反応性T細胞を選択するための試薬(例えば、MHCテトラマーの不完全なセット)の入手が限られていることによって制約され得る、MHC分子又は突然変異アミノ酸配列を同定するためのエピトープ予測アルゴリズムを用いることなく、患者によって発現される任意のMHC分子の関係で提示される突然変異アミノ酸配列を、好都合に同定し得る。従って、本発明の一実施形態においては、本発明の方法は、患者によって発現さ

れる任意のMHC分子の関係において提示される突然変異アミノ酸配列を、好都合に同定し、任意の特定のMHC分子に制限されない。好ましくは、自己APCは、抗原陰性自己APCである。

【0014】

患者の自己APCを、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導することは、当該技術分野で公知の、任意の好適な方法を用いて行われ得る。本発明の一実施形態においては、患者の自己APCを、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導することは、突然変異アミノ酸配列を含むペプチド又はペプチドプールで自己APCをパルスすることを含み、プール中の各ペプチドは、異なる突然変異アミノ酸配列を含む。プール中の突然変異アミノ酸配列の各々は、がん特異的突然変異を含有する遺伝子によってコードされ得る。これに関して、自己APCは、APCがペプチド(複数可)を内在化させ、MHC分子に結合した突然変異アミノ酸配列(複数可)を細胞膜上に提示するような状態で、突然変異アミノ酸配列を含むペプチド又はペプチドのプールと共に培養され得る。1超の遺伝子が同定され、各遺伝子が突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含有する実施形態においては、該方法は、プール中の各ペプチドが異なる突然変異アミノ酸配列を含むペプチドプールで、自己APCをパルスすることを含み得る。APCをパルスする方法は、当該技術分野で公知であり、Solheim(Ed.), Antigen Processing and Presentation Protocols (Methods in Molecular Biology), Human Press, (2010) (例)に記載の通りである。APCをパルスするために使用されるペプチド(複数可)としては、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸(複数可)が挙げられ得る。ペプチド(複数可)は、突然変異アミノ酸(複数可)のカルボキシル側及びアミノ側のそれぞれに、同定された遺伝子によってコードされる内因性タンパク質由来の、任意の好適な数の、連続したアミノ酸を更に含み得る。突然変異の各側に隣接する、内因性タンパク質由来の連続したアミノ酸の数は限定されず、例えば、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、又は上記の値のいずれか2つによって規定される範囲であり得る。好ましくは、ペプチド(複数可)は、突然変異アミノ酸(複数可)の各側に、内因性タンパク質由来の約12の連続したアミノ酸を含む。

【0015】

本発明の一実施形態においては、患者の自己APCを、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導することは、突然変異アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、APCに導入することを含む。ヌクレオチド配列はAPCに導入され、APCは突然変異アミノ酸配列を発現し、MHC分子に結合させて、細胞膜上に提示する。突然変異アミノ酸をコードするヌクレオチド配列は、RNAであってもDNAであってもよい。APCへのヌクレオチド配列の導入は、Solheim et al. (上記)(例)に記載の通りに、当該技術分野で公知の、異なる様々な方法のいずれかで行われ得る。APCへのヌクレオチド配列の導入に有用な技術の非限定的な例としては、形質転換、形質導入、トランスフェクション、及びエレクトロポレーションが挙げられる。1超の遺伝子が同定される実施形態においては、該方法は、それぞれが、異なる遺伝子によってコードされる突然変異アミノ酸配列をコードする、1超のヌクレオチド配列を調製すること、及び各ヌクレオチド配列を自己APCの、異なる集団に導入することを含み得る。これに関して、各集団が、異なる突然変異アミノ酸配列を発現し提示する、自己APCの複数の集団が得られ得る。

【0016】

1超の遺伝子が同定され、各遺伝子が突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含有する実施形態においては、該方法は、1超の遺伝子をコードするヌクレオチド配列を導入することを含み得る。これに関して、本発明の一実施形態においては、自己APCに導入されるヌクレオチド配列は、TMGコンストラクトであり、各ミニ遺伝子は異なる遺伝子を含み、各遺伝子は突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含む。各ミニ遺伝子は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通り、本発明

の方法によって同定された１の突然変異（突然変異の各側に、同定された遺伝子によってコードされる内在性タンパク質からの、任意の好適な数の連続したアミノ酸が隣接する）をコードし得る。コンストラクト中のミニ遺伝子の数は限定されず、例えば、約５、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約２０、約２５若しくはそれ以上、又は上記の値のうちの任意の２つにより規定される範囲が挙げられ得る。ＡＰＣは、ＴＭＧコンストラクトによってコードされる突然変異アミノ酸配列を発現し、ＭＨＣ分子に結合した突然変異アミノ酸配列を細胞膜上に提示する。一実施形態においては、該方法は、各コンストラクトが、異なる遺伝子によってコードされた突然変異アミノ酸配列の異なるセットをコードする、１超のＴＭＧコンストラクトを調製すること、及び各ＴＭＧコンストラクトを自己ＡＰＣの異なる集団に導入することを含む。これに関して、各集団が、異なるＴＭＧコンストラクトによってコードされる突然変異アミノ酸配列を発現し提示する、自己ＡＰＣの複数の集団が得られ得る。

【００１７】

該方法は、患者の自己Ｔ細胞と、突然変異アミノ酸配列を提示する自己ＡＰＣとを培養することを含み得る。Ｔ細胞は、腫瘍、血液、骨髄、リンパ節、胸腺、又は他の組織若しくは体液が挙げられるがこれらに限定されない、患者中の多くのソースから得られ得る。Ｔ細胞には、ＣＤ４＋／ＣＤ８＋二重陽性Ｔ細胞、ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞（例、Ｔ_h１細胞及びＴ_h２細胞）、ＣＤ８＋Ｔ細胞（例、細胞傷害性Ｔ細胞）、腫瘍浸潤細胞（例、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ））、末梢血Ｔ細胞、記憶Ｔ細胞、ナイーブＴ細胞などが挙げられるが、これらに限定されない、任意のタイプのＴ細胞が含まれ得、任意の発生段階のものであり得る。Ｔ細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４＋Ｔ細胞、又はＣＤ４＋及びＣＤ８＋両方のＴ細胞であり得る。該方法は、自己Ｔ細胞が、ＡＰＣによって提示された突然変異アミノ酸配列に特異的に結合し、免疫学的に認識するような状態で、Ｔ細胞がＡＰＣによって提示される突然変異アミノ酸配列に遭遇するように、自己Ｔ細胞と自己ＡＰＣとを共培養することを含み得る。本発明の一実施形態においては、自己Ｔ細胞は、直接自己ＡＰＣに接触して共培養される。

【００１８】

該方法は、（ａ）突然変異アミノ酸配列を提示する自己ＡＰＣと共培養されて、且つ（ｂ）患者によって発現されるＭＨＣ分子の関係で提示される突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、自己Ｔ細胞を選択することを含み得る。語句「抗原特異性」は、本明細書で用いる場合、自己Ｔ細胞によって発現されるＴＣＲ又はその抗原結合部分が、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に特異的に結合し得、免疫学的に認識し得ることを意味する。選択することは、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するＴ細胞を同定し、それらを、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有さないＴ細胞から分離することを含み得る。突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己Ｔ細胞を選択することは、任意の好適な方法で行われ得る。本発明の一実施形態においては、該方法は、例えば、自己Ｔ細胞の選択に先立って、インターロイキン（ＩＬ）－２又はＩＬ－１５等のＴ細胞増殖因子と共培養することによって、又は本発明の他の態様に関して本明細書に記載の通りに、自己Ｔ細胞の数を増幅することを含む。本発明の一実施形態においては、該方法は、自己Ｔ細胞の選択に先立って、ＩＬ－２又はＩＬ－１５等のＴ細胞増殖因子で、自己Ｔ細胞の数を増幅することを含まない。

【００１９】

例えば、自己Ｔ細胞と、突然変異アミノ酸配列を提示するＡＰＣとの共培養の際に、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するＴ細胞は、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するこれらのＴ細胞を同定するために用いられ得る、様々なＴ細胞活性化マーカーのうちの任意の１以上を発現し得る。かかるＴ細胞活性化マーカーとしては、プログラム細胞死１（ＰＤ－１）、リンパ球活性化遺伝子３（ＬＡＧ－３）、Ｔ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン３（ＴＩＭ－３）４－１ＢＢ、ＯＸ４０、及びＣＤ１０７ａが挙げられ得るが、これらに限定されない。従って、本発明の一実施形態においては、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己Ｔ細胞を選択することは、ＰＤ－１、Ｌ

10

20

30

40

50

AG-3、TIM-3、4-1BB、OX40、及びCD107aのうちの任意の1以上を発現するT細胞を選択することを含む。1以上のT細胞活性化マーカーを発現する細胞は、例えば、マーカーの発現に基づいて、Turcott et al., Clin. Cancer Res., 20(2):331-43(2013)及びGros et al., J. Clin. Invest., 124(5):2246-59(2014)(例)に記載の通りに、蛍光活性化細胞選別(FACS)又は磁気活性化細胞選別(MACS)等の、当該技術分野で公知の、様々な技術のいずれかを用いて選別され得る。

【0020】

本発明の別の実施形態においては、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己T細胞を選択することが、(i)突然変異アミノ酸配列を提示するAPCとの共培養に際して、ネガティブコントロールによって分泌される1以上のサイトカインの量と比較して、より多くの量の1以上のサイトカインを分泌するか、又は(ii)突然変異アミノ酸配列を提示するAPCとの共培養に際して、1以上のサイトカインを分泌するネガティブコントロールT細胞の数と比較して、少なくとも2倍の多さの数のT細胞が1以上のサイトカインを分泌する、T細胞を選択することを含む。1以上のサイトカインは、T細胞によるその分泌がT細胞の活性化(例、突然変異アミノ酸配列に特異的に結合し免疫学的に認識するT細胞に発現するTCR)に特徴的である、任意のサイトカインを含み得る。分泌がT細胞活性化に特徴的であるサイトカインの非限定的な例としては、IFN-、IL-2、及び腫瘍壊死因子(TNF-)、顆粒球/単球コロニー刺激因子(GM-CSF)、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-17、及びIL-22が挙げられる。

【0021】

例えば、TCR若しくはその抗原結合部分、又はTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞は、(a)ある濃度の、突然変異アミノ酸配列を含むペプチド(例、約0.05 ng/mL~約10 µg/mL(例、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、100 ng/mL、1 µg/mL、5 µg/mL又は10 µg/mL))でパルスした、抗原陰性APC、又は(b)突然変異アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が導入されたAPCとの共培養の際に、ネガティブコントロールによって分泌されるIFN-の量と比較して、T細胞又はTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞が、IFN-を、少なくとも2倍多く分泌する場合、突然変異アミノ酸配列に対する「抗原特異性」を有すると考えられ得る。ネガティブコントロールは、例えば、(i)(a)同濃度の関係性のないのペプチド(例、野生型アミノ酸配列、又は突然変異アミノ酸配列と異なる配列を有する他の何らかのペプチド)でパルスした抗原陰性APC、又は(b)関係性のないペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が導入されたAPCと共培養された、TCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞、或いは(ii)(a)同濃度の、突然変異アミノ酸配列を含むペプチドでパルスされた抗原陰性APC又は(b)突然変異アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が導入されたAPCと共培養された(例、TCR又はその抗原結合部分を発現しないPBMcに由来する)非形質導入T細胞であり得る。TCR若しくはその抗原結合部分又はTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞はまた、T細胞又はTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞が、突然変異アミノ酸を含む、より高濃度のペプチドでパルスした抗原陰性APCと共培養した際、ネガティブコントロール(例えば上記のネガティブコントロールのいずれか)と比較して、T細胞又はTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞が、より多くの量のIFN-を分泌する場合、TCR若しくはその抗原結合部分、又はTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞は、また、突然変異アミノ酸配列に対し「抗原特異性」を有し得る。IFN-分泌は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)等の、当該技術分野で公知の方法によって測定され得る。

【0022】

代替的に、又は追加的に、TCR若しくはその抗原結合部分、又はTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞は、(a)ある濃度の突然変異アミノ酸配列を含むペプチ

ドでパルスした抗原陰性APC、又は(b)IFN- γ を分泌するネガティブコントロールT細胞の数と比較して、突然変異アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が導入されたAPCとの共培養の際に、少なくとも2倍の多さの数のT細胞又はTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞がIFN- γ を分泌する場合、突然変異アミノ酸配列に対する「抗原特異性」を有すると考えられ得る。ペプチド及びネガティブコントロールの濃度は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載された通りであり得る。IFN- γ を分泌する細胞の数は、例えば、ELISPOT等の、当該技術分野で公知の方法によって測定され得る。

【0023】

本発明の一実施形態においては、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するT細胞は、(1)本明細書に記載の、任意の1以上のT細胞活性化マーカーの発現、(2)より多くの量の、本明細書に記載の通りの1以上のサイトカインの分泌、を両方し得るが、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するT細胞は、より多くの量の、1以上のサイトカインを分泌することなく、任意の1以上のT細胞活性化マーカーを発現し得るか、又は任意の1以上のT細胞活性化マーカーを発現することなく、より多くの量の、1以上のサイトカインを分泌し得る。

【0024】

本発明の別の実施形態においては、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己T細胞を選択することは、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する自己T細胞を選択的に増殖させることを含む。これに関して、該方法は、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有さないT細胞よりも、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するT細胞の増殖が有利になるような様態で、自己T細胞と自己APCとを共培養することを含み得る。従って、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有さないT細胞と比較して、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するT細胞の割合が高い、T細胞の集団が提供される。

【0025】

本発明の一実施形態においては、該方法は、複数の腫瘍断片を患者から得ること、該複数断片からの自己T細胞のそれぞれを別々に、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通りに、突然変異アミノ酸配列を提示する自己APCと共培養すること、及び複数断片のそれぞれからのT細胞を、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通りに、突然変異アミノ酸配列に対する抗原特異性に関して別々に評価することを更に含む。

【0026】

T細胞が、複数の突然変異アミノ酸配列(例、TMGコンストラクトによってコードされた複数の突然変異アミノ酸配列又は自己APC上にパルスされたペプチドプール中の複数の突然変異アミノ酸配列)を発現する自己APCと共培養される本発明の実施形態においては、自己T細胞を選択することは、自己T細胞を、複数の各突然変異アミノ酸配列に対する抗原特異性に関して、別々に評価することを更に含み得る。例えば、本発明の方法は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通り(例えば、各々が、コンストラクトによってコードされる(又はプール中に含まれる)異なる突然変異アミノ酸配列を提示する、別々のAPC集団を提供することにより)、患者の自己APCを、コンストラクトによってコードされる(又はプール中に含まれる)各突然変異アミノ酸配列を提示するよう、別々に誘導することを更に含み得る。該方法は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通り、患者の自己T細胞と、各突然変異アミノ酸配列を提示する、異なる自己APC集団とを、別々に、共培養することを更に含み得る。該方法は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通り、(a)突然変異アミノ酸配列を提示する自己APCと共培養されて、且つ(b)患者によって発現されるMHC分子の関係で提示される突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、自己T細胞を、別々に選択することを更に含み得る。これに関して、該方法は、複数の突然変異アミノ酸配列をコードするTMGコンストラクトによってコードされる(又はプール中に含まれる)どの突然変異アミノ酸配列が、自己T細胞によって免疫学的に(例、除去プロセスによって)認識されるのか

10

20

30

40

50

を決定することを含み得る。

【0027】

該方法は、TCR又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を、選択された自己T細胞から単離することを更に含み得、TCR又はその抗原結合部分は、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する。本発明の一実施形態においては、TCR又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を単離する前に、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、選択された自己T細胞の数が増幅され得る。T細胞の数の増幅は、例えば、米国特許第8,034,334号；米国特許第8,383,099号；米国特許出願公開第2012/0244133号；Dudley et al., J. Immunother., 26:332-42 (2003)；及びRiddell et al., J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990)に記載の通りの、当該技術分野で公知の、多くの方法のいずれかによって達成され得る。本発明の別の実施形態においては、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、選択された自己T細胞の数は、TCR又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を単離する前に増幅されない。

10

【0028】

TCRの「抗原結合部分」は、本明細書中で用いられる場合、抗原結合部分が、本発明の他の態様に関して本明細書中に記載される通り、同定された遺伝子によってコードされた突然変異アミノ酸配列に特異的に結合するならば、それが一部であるTCRの、連続するアミノ酸を含む任意の部分を目指す。用語「抗原結合部分」は、本発明のTCRの任意の部分又は断片（該部分又は断片は、その部分であるTCR（親TCR）の生物学的活性を保持する）を目指す。抗原結合部分は、例えば、突然変異アミノ酸配列に特異的に結合する能力を保持するか、又はがんを検出、治療、又は予防する能力を保持するそれらのTCRの部分、を、親TCRと比較して、類似程度、同程度、又はそれを上回る程度包含する。親TCRに関して、機能的部分は、例えば、親TCRの約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%又はそれ以上を含み得る。

20

【0029】

抗原結合部分は、本発明のTCRの鎖及び/又は鎖の可変領域（複数可）の相補性決定領域（CDR）1、CDR2、及びCDR3の1以上を含む部分等の、本発明のTCRの鎖及び鎖のいずれか又は両方の抗原結合部分、を含み得る。本発明の一実施形態においては、抗原結合部分は、鎖のCDR1（CDR1）、鎖のCDR2（CDR2）、鎖のCDR3（CDR3）、鎖のCDR1（CDR1）、鎖のCDR2（CDR2）、鎖のCDR3（CDR3）、又はそれらの任意の組合せのアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、抗原結合部分は、本発明のTCRの、CDR1、CDR2、及びCDR3のアミノ酸配列；CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列；又はCDR1、CDR2、CDR3、CDR1、CDR2及びCDR3のすべてのアミノ酸配列を含む。

30

【0030】

本発明の一実施形態においては、抗原結合部分は、例えば、上記のCDR領域の組み合わせを含む、本発明のTCRの可変領域を含み得る。これに関して、抗原結合部分は、本発明のTCRの、鎖の可変領域（V）のアミノ酸配列、鎖の可変領域（V）のアミノ酸配列、又はV及びVの両方のアミノ酸配列を含み得る。

40

【0031】

本発明の一実施形態においては、抗原結合部分は、可変領域と定常領域との組み合わせを含み得る。これに関して、抗原結合部分は、本発明のTCRの鎖若しくは鎖、又は鎖及び鎖の両方の全長を含み得る。

【0032】

選択された自己T細胞からの、TCR又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列の単離は、当該技術分野で公知の任意の好適な状態で行われ得る。例えば、該方法は、例えば、TCR鎖及びTCR鎖の定常プライマーを用いた、cDNA末端の5'迅速

50

速増幅 (R A C E) ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 等の、確立された分子クローニング技術及び試薬を用いて、自己T細胞からRNAを単離し、TCR又はその抗原結合部分を配列決定することを含み得る。

【 0 0 3 3 】

本発明の一実施形態においては、該方法は、TCR又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を、Green et al. (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th Ed. (2012) (例)に記載の通りの、確立された分子クローニング技術を用いて、組換え発現ベクターにクローニングすることを含み得る。本明細書の目的のためには、用語「組換え発現ベクター」は、コンストラクトがmRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、該ベクターが、mRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを細胞内で発現させるのに十分な条件下で細胞と接触させられる場合、mRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドの、宿主細胞による発現を可能にする、遺伝学的に改変されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドコンストラクトを意味する。本発明のベクターは、全体として天然には存在しない。しかしながら、ベクターの一部は天然に存在し得る。組換え発現ベクターは、一本鎖又は二本鎖の、一部が天然のソースから合成され又は得られる、天然の、非天然の、又は改変されたヌクレオチドを含有し得る、DNA及びRNAが挙げられるが、これらに限定されない、任意のタイプのヌクレオチドを含み得る。組換え発現ベクターは、天然に存在するヌクレオチド間結合、天然に存在しないヌクレオチド間結合、又は両方のタイプの結合を含み得る。好ましくは、天然に存在しない、又は改変されたヌクレオチド又はヌクレオチド間結合は、ベクターの転写又は複製を妨害しない。

【 0 0 3 4 】

本発明の組換え発現ベクターは、任意の好適な組換え発現ベクターであり得、任意の好適な宿主細胞を形質転換又はトランスフェクションするために用いられ得る。好適なベクターとしては、プラスミド及びウイルス等の、増殖及び増幅のため、若しくは発現又は両方のために設計されたものが挙げられる。ベクターは、トランスポゾン/トランスポザーゼ、pUCシリーズ (Fermentas Life Sciences)、pBlue scriptシリーズ (Stratagene, La Jolla, CA)、pETシリーズ (Novagen, Madison, WI)、pGEXシリーズ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 及びpEXシリーズ (Clontech, Palo Alto, CA) から成る群から選択され得る。GT10、GT11、ZapII (Stratagene)、EMBL4、及びNM1149等のバクテリオファージベクターも用いられ得る。植物の発現ベクターの例としては、pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121及びpBIN19 (Clontech) が挙げられる。動物の発現ベクターの例としては、pEUK-C1、pMAM及びpMAMneo (Clontech) が挙げられる。好ましくは、組換え発現ベクターは、ウイルスベクター (例、レトロウイルスベクター) である。

【 0 0 3 5 】

本発明の方法により単離されたTCR又はその抗原結合部分は、養子細胞療法のための細胞を調製するのに有用であり得る。これに関して、本発明の実施形態は、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するTCR又はその抗原結合部分を発現する細胞集団を調製する方法を提供し、該方法は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通り、TCR又はその抗原結合部分を単離し、単離されたTCR又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列をPBMCに導入して、TCR、又はその抗原結合部分を発現する細胞を得ることを含む。

【 0 0 3 6 】

PBMCに、単離されたTCR又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列 (例、組換え発現ベクター) を導入することは、Green et al. (上記) (例)

10

20

30

40

50

に記載通りの、当該技術分野で公知の、異なる様々な方法のいずれかで行われ得る。P B M C にヌクレオチド配列を導入するのに有用な技術の非限定的な例としては、形質転換、形質導入、トランスフェクション、及びエレクトロポレーションが挙げられる。

【 0 0 3 7 】

本発明の一実施形態においては、該方法は、単離された T C R 又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を、患者に対して自己の P B M C に導入することを含む。これに関して、本発明の方法によって同定及び単離された T C R 又はその抗原結合部分は、各患者個人向けにされ得る。しかしながら、別の実施形態においては、本発明の方法は、再発する（「ホットスポット」とも呼ばれる）がんの特異的な突然変異によりコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する T C R 又はその抗原結合部分を同定及び単離し得る。これに関して、該方法は、単離された T C R 又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を、患者に対して同種異系である P B M C に導入することを含み得る。例えば、該方法は、単離された T C R 又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を、腫瘍が、同一 M H C 分子に関して同一の突然変異を発現する別の患者の P B M C に導入することを含み得る。

10

【 0 0 3 8 】

本発明の一実施形態においては、P B M C として T 細胞が挙げられる。T 細胞は、任意のタイプの T 細胞、例えば、本発明の他の態様に関して本明細書中に記載されるもののいずれかであり得る。特定の理論又はメカニズムには縛られないが、より分化していない「より若い」T 細胞は、より分化した「より老いた」T 細胞と比較して、より高い、*i n v i v o*での持続性、増殖及び抗腫瘍活性のいずれか 1 以上に関連し得ると考えられている。従って、本発明の方法は、好都合なことに、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する、T C R 又はその抗原結合部分を同定及び単離し得、該 T C R 又はその抗原結合部分を、T C R 又はその抗原結合部分が単離され得る「より老いた」T 細胞（例、患者の腫瘍におけるエフェクター細胞）と比較して、*i n v i v o*で、より高い持続性、増殖及び抗腫瘍活性のいずれか 1 以上を提供し得る「より若い」T 細胞に導入し得る。

20

【 0 0 3 9 】

本発明の一実施形態においては、該方法は、T C R 又はその抗原結合部分を発現する P B M C の数を増幅することを更に含む。P B M C の数は、例えば、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通り、増幅され得る。これに関して、本発明の方法は、好都合なことに、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有する T 細胞を多数作製し得る。

30

【 0 0 4 0 】

本発明の別の実施形態は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される方法のいずれかによって単離された T C R 又はその抗原結合部分を提供する。本発明の一実施形態は、T C R のアルファ（ ）鎖、T C R のベータ（ ）鎖、T C R のガンマ（ ）鎖、T C R のデルタ（ ）鎖、又はそれらの組み合わせ等の、2 ポリペプチド（即ち、ポリペプチド鎖）を含む T C R を提供する。本発明の別の実施形態は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される通り、T C R の、1 以上の C D R 領域、1 以上の可変領域、又は 鎖及び 鎖の一方若しくは両方を含む、T C R の抗原結合部分を提供する。本発明の T C R 又はその抗原結合部分のポリペプチドは、T C R 又はその抗原結合部分が、がん特異的な突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するならば、任意のアミノ酸配列を含み得る。

40

【 0 0 4 1 】

本発明の別の実施形態は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載される方法のいずれかに従って調製された、単離された細胞集団を提供する。細胞集団は、少なくとも 1 の他の細胞（例、単離された T C R 又はその抗原結合部分を発現しない宿主細胞（例、P B M C ）又は T 細胞以外の細胞（例、B 細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋肉細胞、脳細胞等）に加えて、単離された T C R 又はその抗原結合部分を発現する P B M C を含む不均一集団であり得る。或いは、細胞集団は、集団が、単離された T C R 又はその抗原結合部分を発現する P B M C を主に含む（例、実質的にそ

50

れからなる)、実質的に均一な集団であり得る。集団はまた、集団の全ての細胞が、単離されたTCR又はその抗原結合部分を発現するように、集団の全ての細胞が、単離されたTCR又はその抗原結合部分を発現する単一のPBMCのクローンである、細胞のクローン集団であり得る。本発明の一実施形態においては、細胞集団は、本明細書に記載の単離されたTCR又はその抗原結合部分を発現するPBMCを含むクローン集団である。PBMCに、単離されたTCR又はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を導入することにより、本発明の方法は、好都合なことに、単離されたTCRを発現し、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するPBMC細胞を高い割合で含む、細胞集団を提供する。本発明の一実施形態においては、細胞集団のうちの約1%~約100%、例えば約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、若しくは約100%、又は上記の値のいずれか2つによって規定される範囲が、単離されたTCRを発現し、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するPBMC細胞を含む。特定の理論又はメカニズムには縛られないが、単離されたTCRを発現し、突然変異アミノ酸配列に対し抗原特異性を有するPBMC細胞を、高い割合で含む細胞集団では、PBMCの機能(例、PBMCが、がん細胞の破壊を目的とする能力、及び/又はがんを治療若しくは予防する能力)を妨げ得る、不適切な細胞の割合が低いと考えられる。

【0042】

本発明のTCR、若しくはその抗原結合部分、及び細胞集団は、医薬組成物等の組成物へと製剤化され得る。これに関して、本発明は、本発明のTCR、若しくはその抗原結合部分、又は細胞集団のいずれか及び医薬的に許容可能な担体を含む、医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、本発明のTCR、若しくはその抗原結合部分、又は細胞集団を、化学療法剤等、別の医薬的に活性な物質(複数可)又は薬剤(複数可)(例、アスパラギナーゼ(asparaginase)、ブスルファン(busulfan)、カルボプラチン(carboplatin)、シスプラチン(cisplatin)、ダウノルビシン(daunorubicin)、ドキシソルビシン(doxorubicin)、フルオロウラシル(flourouracil)、ゲムシタピン(gemcitabine)、ヒドロキシウレア(hydroxyurea)、メトトレキサート(methotrexate)、パクリタキセル(paclitaxel)、リツキシマブ(rituximab)、ビンブラスチン(vinblastine)、ビンクリスチン(vincristine)など)と組み合わせて含み得る。

【0043】

好ましくは、担体は医薬的に許容可能な担体である。医薬組成物に関して、担体は、考慮中の、特定の本発明のTCR、若しくはその抗原結合部分、又は細胞集団のために従来用いられているもののいずれかであり得る。かかる医薬的に許容可能な担体は、当業者に周知であり、公衆にとって容易に入手可能である。医薬的に許容可能な担体は、使用条件下で有害な副作用又は毒性を有さないものであることが好ましい。

【0044】

担体の選択は、特定の本発明のTCR、その抗原結合部分、又は細胞集団によって、及び本発明のTCR、その抗原結合部分、又は細胞集団を投与するために用いられる特定の方法によって、ある程度決定される。従って、多様な、本発明の医薬組成物の好適な製剤がある。好適な製剤としては、経口、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内及び腹腔内投与のための、いずれかの製剤が挙げられ得る。本発明のTCR又は細胞集団を投与するために、1超の経路が用いられ得、特定の例においては、特定の経路が、別の経路よりも迅速且つ効果的な反応をもたらし得る。

【0045】

好ましくは、本発明のTCR、その抗原結合部分、又は細胞集団は、注射により静脈内(例)に投与される。本発明の細胞集団が投与される場合、注射用の細胞のための医薬上許容される担体は、任意の等張性の担体、例えば、通常の生理食塩水(水中約0.90%

w/vのNaCl、水中約300mOsm/LのNaCl、又は水1リットル当たり約9.0gのNaCl)、NORMOSOL R電解質溶液(Abbott, Chicago, IL)、PLASMA-LYTE A(Baxter, Deerfield, IL)、水中約5%のデキストロース、又は乳酸リンゲル液等が挙げられ得る。一実施形態においては、医薬上許容される担体には、ヒト血清アルブミンが添加される。

【0046】

本発明のTCR、その抗原結合部分、細胞集団及び医薬組成物は、がんを治療又は予防する方法において用いられ得ると考えられる。特定の理論又はメカニズムには縛られないが、本発明のTCR又はその抗原結合部分は、TCR又はその抗原結合部分が、細胞に発現する場合、突然変異アミノ酸配列を発現する標的細胞に対する免疫応答を媒介することができるよう、がん特異的突然変異によってコードされる突然変異アミノ酸配列に、特異的に結合すると考えられる。これに関して、本発明は、哺乳動物におけるがんを治療又は予防する方法であって、哺乳動物におけるがんを治療又は予防するための有効量の、本明細書に記載の医薬組成物、TCR、その抗原結合部分又は細胞集団のいずれかを、哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。

【0047】

用語「治療する」及び「予防する」並びにそれらの派生語は、本明細書で用いる場合、100%の、又は完全な治療又は予防を必ずしも意味しない。むしろ、当業者が潜在的な利益又は治療効果を有すると認識する、様々な程度の治療又は予防が存在する。これに関して、本発明の方法は、任意のレベルの任意の量の、哺乳動物におけるがんの治療又は予防を提供し得る。更に、本発明の方法により提供される治療又は予防は、治療又は予防されている1以上の状態又はがんの症状の治療又は予防を含み得る。例えば、治療又は予防は、腫瘍の退行を促進することを含み得る。また、本明細書の目的のために、「予防」は、がんの発症、又はその症状若しくは状態を遅延させることを包含し得る。

【0048】

本発明の目的のために、投与される本発明のTCR、その抗原結合部分、細胞集団又は医薬組成物の量又は用量(例、本発明の細胞集団が投与される場合、細胞数)は、例えば、哺乳動物において、適切な期間にわたって治療的又は予防的反応をもたらすのに十分であるべきである。例えば、本発明のTCR、その抗原結合部分、細胞集団又は医薬組成物の用量は、がん特異的突然変異によりコードされる突然変異アミノ酸配列と結合するのに、又は、投与時から約2時間以上、例えば、12~24時間以上という期間でがんを検出、治療若しくは予防するのに十分でなければならない。いくつかの実施形態においては、該期間はもっと長くなり得る。用量は、投与される特定の発明のTCR、その抗原結合部分、細胞集団又は医薬組成物の有効性、及び動物(例、ヒト)の状態、及び治療される動物(例、ヒト)の体重によって決定される。

【0049】

投与量を決定するための多くのアッセイが、当該技術分野において公知である。本発明の目的のために、それぞれ異なる用量のT細胞を与えられる哺乳動物の1群のうちのある哺乳動物に、所与の用量のかかるT細胞を投与した際、標的細胞が溶解される程度、又は、本発明のTCR若しくはその抗原結合部分を発現するT細胞によってIFN- γ が分泌される程度を比較することを含むアッセイが用いられ、哺乳動物に投与される開始用量が決定され得る。一定用量の投与の際の、標的細胞が溶解する程度、又はIFN- γ が分泌される程度は、当該技術分野において公知の方法によりアッセイされ得る。

【0050】

本発明のTCR、その抗原結合部分、細胞集団又は医薬組成物の用量はまた、本発明の特定のTCR、その抗原結合部分、細胞集団又は組成物の投与に伴い得る、任意の不都合な副作用の存在、性質及び程度によって決定される。典型的には、主治医は、年齢、体重、身体全体の健康、食事、性別、投与される本発明のTCR、その抗原結合部分、細胞集団又は医薬組成物、投与経路、及び治療される状態の重症度等の種々の要因を考慮して、個々の患者のそれぞれを治療する、本発明のTCR、その抗原結合部分、細胞集団又は医

薬組成物の投与量を決定する。

【0051】

本発明の細胞集団が投与される実施形態においては、投与される注入当たりの細胞数は、例えば、100万～1000億細胞の範囲で変わり得る；しかしながら、この例示的な範囲を下まわるか、又は上まわる量は、本発明の範囲内である。例えば、本発明の宿主細胞の1日用量は、約100万～約1500億細胞（例、約500万細胞、約2500万細胞、約5億細胞、約10億細胞、約50億細胞、約200億細胞、約300億細胞、約400億細胞、約600億細胞、約800億細胞、約1000億細胞、約1200億細胞、約1300億細胞、約1500億細胞又は上記の値のいずれか2つによって規定される範囲）、好ましくは約1000万～約1300億細胞（例、約2000万細胞、約3000万細胞、約4000万細胞、約6000万細胞、約7000万細胞、約8000万細胞、約9000万細胞、約100億細胞、約250億細胞、約500億細胞、約750億細胞、約900億細胞、約1000億細胞、約1100億細胞、約1200億細胞、約1300億細胞又は上記の値のいずれか2つによって規定される範囲）、より好ましくは約1億細胞～約1300億細胞（例、約1億2000万細胞、約2億5000万細胞、約3億5000万細胞、約4億5000万細胞、約6億5000万細胞、約8億細胞、約9億細胞、約30億細胞、約300億細胞、約450億細胞、約500億細胞、約750億細胞、約900億細胞、約1000億細胞、約1100億細胞、約1200億細胞、約1300億細胞（又は上記の値のいずれか2つによって規定される範囲）であり得る。

10

【0052】

細胞集団が投与される、本発明の方法の目的のために、細胞は、哺乳動物に対して同種異系又は自己の細胞であり得る。好ましくは、細胞は、哺乳動物に対して自己である。

20

【0053】

本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の、哺乳動物におけるがんの治療又は予防において使用するための、TCR、その抗原結合部分、単離された細胞集団又は医薬組成物のいずれかを提供する。

【0054】

がんは、好都合には、急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、胞巣性横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門、肛門管又は肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢又は胸膜のがん、鼻、鼻腔、又は中耳のがん、口腔のがん、膣のがん、外陰部のがん、胆管がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、胃腸カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、中咽頭がん、卵巣がん、陰茎のがん、膵臓がん、腹膜、大網及び腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、皮膚がん、小腸がん、軟部組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮のがん、尿管がん、膀胱がん、固形腫瘍及び液性腫瘍を含む任意の腫瘍であり得る。好ましくは、がんは上皮がんである。一実施形態においては、がんは、胆管がん、黒色腫、結腸がん、又は直腸がんである。

30

【0055】

本発明の方法において言及される哺乳動物は、任意の哺乳動物であり得る。用語「哺乳動物」は、本明細書で用いる場合、マウス及びハムスター等のネズミ目の哺乳動物、及びウサギ等のウサギ目の哺乳動物を含むが、これらに限定されない任意の哺乳動物を指す。哺乳動物が、ネコ科の動物（ネコ）及びイヌ科の動物（イヌ）を含むネコ目由来であることが好ましい。好ましくは、哺乳動物は、ウシ科の動物（ウシ）及びイノシシ科の動物（ブタ）を含むウシ目、又はウマ科の動物（ウマ）を含むウマ目（*Perissodactyla*）由来である。好ましくは、哺乳動物は、霊長目、セボイド（*Ceboids*）目若しくはシモイド（*Simoids*）目（サル）又は、類人（*Anthropoids*）目（ヒト及び類人猿）である。より好ましい哺乳動物は、ヒトである。特に好ましい実施形態においては、哺乳動物は、がん特異的突然変異を発現する患者である。

40

【0056】

50

以下の実施例は、本発明を更に説明するが、もちろん、決してその範囲を限定するものとして解釈すべきではない。

【実施例】

【0057】

実施例1～7に関して、材料及び方法を以下に示す。

【0058】

全エクソーム配列決定

Jones et al., Science 330:228-231 (2010)に記載の通り、凍結保存した腫瘍組織(OCTに包埋)及び正常末梢血細胞の全エクソーム配列決定を、Personal Genome Diagnostics (PGDx, Baltimore, MD)により行った。配列の、それぞれの塩基での、明確で質の高い平均読み取り数は、腫瘍及び正常の(PBMCの)DNAについて、それぞれ155及び160であった。

【0059】

患者の治療及び養子細胞療法のための腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の作製

患者3737を、制度審査委員会(IRB)承認のプロトコル:「転移性消化管がんにおけるリンパ球枯渇療法後の、短期間培養自己腫瘍浸潤リンパ球を用いた第II相試験(治験登録ID:NCT01174121)」に登録した。該プロトコルは、消化管がん患者における、ex vivoで増幅した自己腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の養子移入の安全性と有効性を評価するために計画した。

【0060】

患者の最初の治療に用いるTILを、Jin et al., J. Immunother., 35:283-292 (2012)に記載の通り作製した。簡潔に述べると、切除した腫瘍を、約1～2mmの断片に細かく刻み、個々の断片を、高用量IL-2(6000 IU/ml, Chiron, Emeryville, CA)を含有する2mlの完全培地(CM)を含有する、24ウェルプレートのウェルに入れた。CMは、当所(in-house)10%ヒト血清、2mM L-グルタミン、25mM HEPES及び10µg/mlゲンタマイシンを添加したRPMIから成っていた。更に、混合腫瘍消化物も、高用量のIL-2と共にCM中で培養した。T細胞の初期増殖(2～3週の間)の後、選択培養物からの 5×10^6 のT細胞を、放射線照射した同種異系PBMCを用いて、ガス透過性G-Rex100フラスコ中で、5%ヒトAB血清、3000 IU/mlのIL-2、及び30ng/mlのOKT3抗体(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を添加した400mlの50/50培地中で、1対100の比で急速増幅した。50/50培地は、CMとAIM-V培地との1対1の混合物で構成されていた。全細胞を37℃、5%CO₂で培養した。注入に先立ち、細胞数を2週間急速増幅させた。患者3737は、高用量IL-2の4回投与と合わせて、全部で424億のT細胞を受容するのに先立ち、シクロホスファミド及びフルダラビンで構成される非骨髄破壊性リンパ枯渇療法(lymphodepleting regimen)を受けた。

【0061】

2回目の患者治療に用いたTILは、最初の治療と同様の方法で、以下の変更を伴って作製した。最初の治療用生成物(患者3737-TIL)は、5の個別TIL培養物の組み合わせで構成された。これら5培養物を、CD4及びV α 22の発現及び突然変異ERBB2IPに対する反応性について個々に評価し、1の培養物が、V α 22+ERBB2IP突然変異反応性CD4+T細胞に非常に富んでいることが見出された。次いで、この1のTIL培養物(高用量IL-2による初期増殖後)を上記の通り急速増幅させた。患者は、高用量IL-2の4回投与と合わせて、全部で1260億のT細胞を受容するのに先立ち、最初の治療と同じ非骨髄破壊的リンパ枯渇療法を受けた。

【0062】

TMGコンストラクトの作製

簡潔に述べると、全エクソーム配列決定によって同定された各非同義置換突然変異について、対応するアミノ酸の変異（野生型タンパク質配列の12アミノ酸が隣接する）をコードする、「ミニ遺伝子」コンストラクトを作製した。複数のミニ遺伝子を遺伝学的に融合させて、TMGコンストラクトを作製した。これらのミニ遺伝子コンストラクトは、コドン最適化し、DNA String construct (Life Technologies, Carlsbad CA) として合成した。次いで、TMGを、In-Fusion technology (Clontech, Mountain View, CA) を用いて p cDNA3.1 ベクターにクローニングした。部位特異的突然変異誘発を用いて、9つの「野生型復帰」TMG-1コンストラクト (Gene Oracle, Mountain View, CA) を作製した。標準的サンガー配列決定 (Macro 10
gen and Gene Oracle) により、全TMGのヌクレオチド配列を確認した。

【0063】

自己APCの作製

単球由来の未成熟DCを、プラスチック付着法を用いて作製した。簡潔に述べると、自己フェレーシス試料を融解し、洗浄し、純粋なAIM-V培地 (Life Technologies) を用いて $5 \sim 10 \times 10^6$ 細胞/ml に設定し、次いで、適切なサイズの組織培養フラスコ中、約 1×10^6 細胞/cm² で、37、5%CO₂ でインキュベーションした。90分後、非接着細胞を回収し、フラスコをAIM-V培地でしっかり洗浄し、次いでAIM-V培地で更に60分間インキュベーションした。次いで、フラスコを 20
AIM-V培地で再びしっかり洗浄し、次いで、付着細胞をDC培地でインキュベーションした。DC培地は、5%ヒト血清（当所で回収、処理）、100U/ml ペニシリン及び100µg/ml ストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、800IU/ml GM-CSF並びに800U/ml IL-4を含有するRPMIで構成されていた（培地サプリメントはLife Technologiesから、サイトカインはPeprotechから）。3日目に、新しいDC培地を培養物に加えた。フレッシュな、又は凍結/融解したDCを、最初の刺激後5～7日目の実験に用いた。全実験において、フローサイトメトリーを用いて、CD11c、CD14、CD80、CD86、及びHLA-DR（すべてBD Bioscienceから）の発現について細胞を表現型解析し、細胞が 30
主に未成熟DC（CD11c⁺、CD14⁻、CD80^{low}、CD86⁺、及びHLA-DR⁺；データは示さず）であることを確認した。

【0064】

抗原提示B細胞は、CD40L及びIL-4刺激法を用いて作製した。簡潔に述べると、ヒトCD19マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて、自己フェレーシス試料から陽性のB細胞を選択した。次いで、CD19⁺細胞を、CD40L（3T3-CD40L）を安定に発現する放射線照射（6000rad）3T3細胞と共に、B細胞培地中で約1：1の比で培養した。B細胞培地は、7.5～10%のヒト血清（当所）、100U/mlのペニシリン及び100µg/ml ストレプトマイシン (Life Technologies)、10µg/ml ゲンタマイシン (CellGro, Manassas, VA)、2mM L-グルタミン (Life Technologies) 及び200U/ml IL-4 (Peprotech) を添加したIMDM培地 (Life Technologies) で構成されていた。3日目からフレッシュなB細胞培地を加え、その後2～3日ごとに培地を添加又は交換した。放射線照射3T3-CD40Lフィーダー細胞も必要に応じて更に添加した。抗原提示B細胞は、通常、最初の刺激後2～3週の実験において用いた。

【0065】

in vitro 転写RNA (IVT) RNAの生成

タンデムミニ遺伝子をコードするプラスミドを、制限酵素SacIIで線状化した。GFPをコードする、コントロールのp cDNA3.1/V5-His-TOPOベクターを、NotIで線状化した。制限消化を、EDTA、酢酸ナトリウム及びエタノール沈殿 50

で終結させた。プラスミドの完全消化を、標準的なアガロースゲル電気泳動によって確認した。message machine T7 Ultra kit (Life Technologies) を用い、製造業者による指示の通り、約 $1 \mu\text{g}$ の線状化プラスミドを、IVT RNA の生成に用いた。LiCl₂ 法を用いて RNA を沈殿させ、RNA の純度及び濃度を、NanoDrop 分光光度計を用いて評価した。次いで、RNA をマイクロチューブに等分し、使用するまで - 80 で保存した。

【0066】

RNA トランスフェクション

APC (DC 又は B 細胞) を回収し、PBS で 1 回洗浄し、次いで Opti-MEM (Life Technologies) に $10 \sim 30 \times 10^6$ 細胞 / ml で再懸濁した。IVT RNA ($4 \mu\text{g}$ 又は $8 \mu\text{g}$) をギャップ 2 mm のエレクトロポレーションキュベットの底に等分して入れ (aliquoted to the bottom)、 $50 \mu\text{l}$ 又は $100 \mu\text{l}$ の APC をキュベットに直接加えた。従って、エレクトロポレーションで使用する RNA 終濃度は $80 \mu\text{g} / \text{ml}$ であった。エレクトロポレーションは、BTX - 830 矩形波エレクトロポレーターを用いて行った。DC は 150 V、10 ミリ秒、1 パルスでエレクトロポレーションし、B 細胞は 150 V、20 ミリ秒、1 パルスでエレクトロポレーションした。これらの設定を用いたトランスフェクション効率は、GFP RNA で評価したところ、決まって 70 ~ 90 % の間であった (データ示さず)。全工程を室温で行った。エレクトロポレーション後直ちに、細胞を、適切なサイトカインを添加した DC 培地又は B 細胞培地を含有するポリプロピレンチューブに移した。トランスフェクションした細胞を、37、5 % CO₂ で一晩 (12 ~ 14 時間) インキュベーションした。共培養アッセイにおける使用に先立ち、細胞を、PBS で 1 回洗浄した。

【0067】

ペプチドパルス

自己 B 細胞を回収し、洗浄し、次いで、IL - 4 を添加した B 細胞培地に 1×10^6 細胞 / ml で再懸濁し、次いで、 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の 25 マーペプチドで、一晩 (12 ~ 14 時間)、37、5 % CO₂ でインキュベーションした。一晩パルスした後、次いで、B 細胞を PBS で 2 回洗浄し、次いで T 細胞培地に再懸濁し、直ちに共培養アッセイに用いた。用いたペプチドは：突然変異 ERBB2IP (

【0068】

【化 1】

TSFLSINSKEETGHLNGNKYPNLE

【0069】

(配列番号 73)) ; 野生型 ERBB2IP (

【0070】

【化 2】

TSFLSINSKEETEHLENGNKYPNLE

【0071】

(配列番号 45)) ; ネガティブコントロールとして、突然変異 ALK (RV L K G G S V R K L R H A K Q L V L E L G E E A (配列番号 46)) であった。突然変異 ERBB2IP ペプチドは異なる 3 ソース (GenScript, Piscataway, NJ、Peptide 2.0, Chantilly, VA 及び Selleck Chem, Houston TX) から購入し、全て同じ in vitro の結果をもたらした。一方、野生型 ERBB2IP ペプチド及び突然変異 ALK ペプチドは Peptide 2.0 から購入した。同種異系 EBV - B 細胞を培養するためには、B 細胞培地の代わりに、10 % FBS、100 U / ml ペニシリン及び $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ ストレプトマイシン (Life

e Technologies)、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン (CellGro) 並びに 2 mM L-グルタミンを含有する RPMI 培地を用いた。

【0072】

T細胞の選別、増幅、及びクローニング

細胞選別を必要とする全実験において、BD FACS Aria IIu 及び BD FACS Jazz を用いた。表示した実験においては、選別した T 細胞を、 $30 \text{ ng}/\text{ml}$ 抗 CD3 抗体 (OKT3) 及び $3000 \text{ IU}/\text{ml}$ IL-2 を含有する $50/50$ 培地中の過剰放射線照射 (4000 rad) 同種異系フィーダー細胞 (ドナーが異なる3種類の白血球除去輸血サンプルのプール) を用いて増幅した。限界希釈クローニングを、 96 ウェル丸底プレート中で、1 ウェルあたり 5×10^4 フィーダー細胞及び 1 ウェルあたり 1 ~ 2 T 細胞で、上記の刺激条件を用いて行った。培地を、刺激後約 1 週間から始めて、その後一日おきに、又は必要に応じて、交換した。細胞は、通常、最初の刺激の約 2 ~ 3 週後に、アッセイにおいて用いるか、又は更に増幅させた。

【0073】

共培養アッセイ: IFN- ELISPOT 及び ELISA、細胞表面活性化マーカーについてのフローサイトメトリー、及び細胞内サイトカイン染色 (ICS)

APC として DC を使用する場合、 96 ウェル平底又は丸底のプレート 1 ウェル当たり、約 $3.5 \times 10^4 \sim 7 \times 10^4$ の DC を用いた。APC として B 細胞を使用する場合、 96 ウェル丸底プレート 1 ウェル当たり、約 2×10^5 の細胞を用いた。ELISPOT アッセイにおいては、1 ウェルあたり $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ のエフェクター T 細胞を用い、フローサイトメトリーアッセイにおいては、1 ウェルあたり 1×10^5 のエフェクター T 細胞を用いた。T 細胞は、通常解凍し、IL-2 を含有する $50/50$ 培地 ($3000 \text{ IU}/\text{ml}$ IL-2) 中に 2 日間静置 (rest) し、次いで、共培養アッセイに先立ち、PBS で (3 回) 洗浄した。共培養は、すべて、外的に添加されたサイトカインの非存在下で行った。すべてのアッセイについて、ポジティブコントロールとして、プレート結合 OKT3 ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 又は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を用いた。

【0074】

HLA 遮断抗体を含む実験においては、以下の抗体を用いた: 汎クラス II (クローン: IVA12)、汎クラス I (クローン: W6/32)、HLA-DR (クローン: HB55)、HLA-DP (クローン: B7/21)、及び HLA-DQ (クローン: SPV-L3)。T 細胞との共培養に先立ち、細胞を、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ で 1 ~ 2 時間、表示した抗体 $20 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ でブロッキングした。T4 は、チロシナーゼ中のエピトープに対して反応性である、HLA-DR4 拘束性 TCR で形質導入した T 細胞である。DMF5 は、MART-1 に対して反応性の HLA-A2 拘束性 T 細胞株である。624-CIIITA は、CIIITA (クラス II、MHC、トランスアクチベーター) の異所的発現により MHC-II を安定に発現する、HLA-A2 及び HLA-DR4 陽性黒色腫細胞株であり、MART-1 及びチロシナーゼの発現について陽性である。

【0075】

IFN- ELISPOT アッセイに関しては、簡潔に述べると、ELISPOT プレート (Millipore、MAIPSWU) を 1 ウェルあたり $50 \mu\text{l}$ の 70% エタノールで 2 分間前処理し、PBS で 3 回洗浄し、次いで、 $50 \mu\text{l}$ の $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ IFN- 捕捉抗体 (Mabtech、クローン: 1-D1K) でコーティングし、冷蔵庫中で一晩インキュベーションした。OKT3 コントロールについては、ウェルを、IFN- 捕捉抗体 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 及び OKT3 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) の混合物でコーティングした。共培養に先立ち、プレートを PBS で 3 回洗浄し、続いて、 $50/50$ 培地で、室温 (RT) で少なくとも 1 時間、ブロッキングした。20 ~ 24 時間共培養後、プレートをはいて細胞を取り出し (cells were flicked out of the plate)、PBS ($0.05\% \text{ Tween}-20$ (PBS-T) 添加) で 6 回洗浄し、次いで、室温で 2 時間、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルの、 $0.22 \mu\text{m}$ で濾過した $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ビオチン化抗ヒト IFN- 検出抗体溶液 (Mabtech、クローン: 7-B6-1)

でインキュベーションした。次いで、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、続いて100 µl/ウェルのストレプトアビジン-ALP (Mabtech、Cincinnati、OH、1:3000に希釈)で1時間インキュベーションした。次いで、プレートをPBSで6回洗浄し、続いて100 µl/ウェルの、0.45 µmで濾過したBCIP/NBT基質溶液 (KPL, Inc.)で発色させた。冷水道水で十分にすすぐことにより反応を停止させた。ELISPOTプレートを、ImmunoSpotプレートリーダー及び関連ソフトウェア (Cellular Technologies, Ltd、Shaker Heights, OH)を用いてスキャンし、計数した。

【0076】

T細胞活性化マーカーOX40及び4-1BBの発現を、フローサイトメトリーにより、刺激後約t = 22 ~ 26時間で評価した。簡潔に述べると、細胞をペレット化し、FACS緩衝液 (1% FBS及び2 mM EDTAを添加した1×PBS)で洗浄し、次いで、暗所中4で約30分間、適切な抗体で染色した。BD FACSCanto IIフローサイトメーターでの取得に先立ち、細胞を、FACS緩衝液で少なくとも1回洗浄した。データは、すべて、生きている単細胞 (PI陰性)にゲートした。

【0077】

サイトカイン産生を、細胞内サイトカイン染色 (ICS) 及びフローサイトメトリーを用いて評価した。簡潔に述べると、標的細胞及びエフェクター細胞を、96ウェルプレートのウェル中に混合した後、GolgiStop及びGolgiPlugの両方を培養物に添加した (BD Biosciences)。GolgiStop及びGolgiPlugは、製造業者が推奨する濃度の1/2で用いた。刺激のt = 6時間後に、Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて、製造業者の指示書に従って細胞を処理した。簡潔に述べると、細胞をペレット化し、FACS緩衝液で洗浄し、次いで細胞表面マーカー (上記)について染色した。次いで、固定及び透過処理に先立ち、細胞を、FACS緩衝液で2回洗浄した。次いで、細胞を、Perm/Wash緩衝液で洗浄し、暗所中4で30分間、サイトカインに対する抗体で染色した。FACSCanto IIフローサイトメーターでの取得に先立って、細胞を、Perm/Wash緩衝液で2回洗浄し、FACS緩衝液に再懸濁した。フローサイトメトリーデータは、すべて、FLOWJOソフトウェア (TreeStar Inc)を用いて解析した。

【0078】

human IFN-ELISA kitを用いて、血清試料中のIFN-を、製造業者 (Thermo Scientific, Waltham, MA)の指示通りに検出した。

【0079】

フローサイトメトリー抗体

力価を測定した、以下の抗ヒト抗体を細胞表面染色に用いた: CCR7-FITC (クローン: 150503)、CD45RO-PE-Cy7 (クローン: UCHL1)、CD62L-APC (クローン: DREG-56)、CD27-APC-H7 (クローン: M-T271)、CD4-eFluor 605NC (クローン: OKT4)、CD57-FITC (クローン: NK-1)、CD28-PE-Cy7 (クローン: CD28.2)、CD127-APC (クローン: eBioRDR5)、CD3-AF700 (クローン: UCHT1)、CD4-FITC、PE-Cy7、APC-H7 (クローン: SK3)、CD8-PE-Cy7 (クローン: SK1)、V22-PE (クローン: IMMU546)、V5.2-PE (クローン: 36213)、OX40-PE-Cy7又はFITC (クローン: Ber-ACT35)、4-1BB-APC (クローン: 4B4-1)、及びCD107a-APC-H7 (クローン: H4A3)。CD4-eFluor605NC (eBioscience)、V22-PE及びV5.2-PE (Beckman Coulter)並びに4-1BB-APC及びOX40-PE-Cy7 (BioLegend)を除いて、抗体はすべてBD Biosciences由来であった。

10

20

30

40

50

細胞内サイトカイン染色のために、適切に力価測定した、以下：IFN- γ -FITC（クローン：4S.B3）、IL-2-APC（クローン：MQ1-17H12）、TNF-PerCP-Cy5.5又はAPC（クローン：MAb11）、IL-17-PE（クローン：eBio64DEC17）、及びIL-4-PE-Cy7（クローン：8D4-8）の抗ヒト抗体を用いた。IL-4-PE-Cy7（BD Bioscience）以外のICS抗体は、すべて、eBioscience由来であった。IO Mark Mark TCR V kitを用いて、TCR-V のレパートリーを評価した（Beckman Coulter）。

【0080】

ERBB2 IP 突然変異の配列決定

10

サンガー配列決定を用いて、全エクソーム配列決定によって見出されたERBB2 IP 突然変異を検証した。RNeasy Mini kit（Qiagen）を用いて、スナップ凍結したT細胞又は腫瘍組織（OCTブロック）から全RNAを抽出した。次いで、全RNAを、オリゴdTプライマー（Life Technologies）と共にThermoScript 逆転写酵素を用いてcDNAに逆転写した。次いで、正常cDNA及び腫瘍cDNAを、突然変異に隣接する以下のERBB2 IPプライマー：ERBB2 IP Seq Forward：5'-TGT TGA CTC AAC AGC CAC AG-3'（配列番号47）及びERBB2 IP Seq Reverse：5'-CTG GAC CAC TTT TCT GAG GG-3'（配列番号48）を用いたPCRにおいて、鋳型として用いた。Phusion DNAポリメラーゼ（Thermo Scientific）を、推奨される3ステッププロトコル（58 のアニーリング温度（15秒）及び72 の伸長（30秒）を伴う）で用いた。標準的なアガロースゲル電気泳動及びゲル抽出（Clontech）により、PCR産物を単離した。同一のPCRプライマー（Macrogen）を用いて、産物を直接配列決定した。

20

【0081】

定量的PCR

RNeasy Mini kit（Qiagen, Venlo, Netherlands）を用いて、スナップ凍結したT細胞又は腫瘍組織（OCTブロック）から全RNAを抽出した。次いで、全RNAを、qScript cDNA Supermix（Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD）を用いてcDNAに逆転写した。遺伝子特異的Taqmanプライマー並びに、ヒト- β -アクチン（カタログ番号：401846）及びERBB2 IP（カタログ番号：4331182）に対するプローブセットは、Life Technologiesから購入した。定量的PCRは、7500 Fast Real Time PCR機を用い、Taqman Fast Advanced Master Mix（いずれもApplied Biosystemsから）を用いて行った。標準的なアガロースゲル電気泳動により、増幅産物の特異性を確認した。算出された閾値サイクル（Ct）はすべて30以下であった。

30

【0082】

TCR-V ディープシーケンシング

DNeasy blood and tissue kit（Qiagen）を用いて、末梢血、T細胞及び凍結した腫瘍組織から単離したゲノムDNAに対して、immunoSEQ, Adaptive Biotechnologies（Seattle, WA）により、TCR-V ディープシーケンシングを行った。サンプル当たりの、実益性のある（productive）TCRの読み取り総数は、279,482～934,672の範囲であった。TCR頻度の算出においては、TCRの、実益性のある再配列のみを用いた。

40

【0083】

TCR配列決定及びERBB2 IP 突然変異反応性TCRの構築

T細胞をペレット化し、全RNAを単離した（RNeasy Mini kit, Qiagen）。次いで、TCRの α 鎖及び β 鎖の定常プライマーを用いて、全RNAで、製

50

造業者 (SMARTer RACE cDNA amplification kit, Clontech) による指示通りに、5' RACEを行った。キットのプログラム1を、伸長時間を変更(3分ではなく2分)して、PCRに用いた。鎖及び鎖定常プライマーの配列は、TCR-、5'-GCC ACA GCA CTG TGC TCT TGA AGT CC-3'(配列番号49); TCR-、5'-CAG GCA GTA TCT GGA GTC ATT GAG-3(配列番号50)である。次いで、標準的なアガロースゲル電気泳動及びゲル抽出(Clontech)により、TCRのPCR産物を単離した。その後、産物は直接配列決定したか、又はTOPO-TAクローニングした後、個々のコロニーの配列決定を行った(Macrogen)。既知のV22+T細胞クローンの配列決定のために、qScript cDNA Supermix(Quanta Biosciences)を用いて、RNAからcDNAを生成した。次いで、これらのcDNAを、TCR-定常プライマー(上記)及びV22特異的プライマー:5'-CAC CAT GGA TAC CTG GCT CGT ATG C-3'(配列番号51)を用いるPCRにおいて鋳型として用いた。標準的なアガロースゲル電気泳動及びゲル抽出(Clontech)により、PCR産物を単離した。TCR-定常鎖のネステッドプライマー:5'-ATT CAC CCA CCA GCT CAG-3'(配列番号52)を用いて、産物を直接配列決定した(Macrogen)。

【0084】

V22+ERBB2IP-突然変異TCRの構築は、V22+TCR-のV-D-J領域を、マウスTCR-定常鎖に、及びV22+TCR-V-D-J領域を、マウスTCR-定常鎖に融合させることにより行った。及び鎖は、フリンSGSGP2Aリンカー(furinSGSGP2A linker)によって隔てた。マウスTCR定常領域の使用により、導入TCRの対形成が促進され、フローサイトメトリーによる、マウスTCR-鎖に特異的な抗体(eBioscience)を用いた、確かに形質導入されたT細胞の同定が容易になる。TCRコンストラクトを合成し、MSGV1レトロウイルスベクター(Gene Oracle)にクローニングした。

【0085】

末梢血T細胞のTCR形質導入

自己フェレーシス試料を解凍し、5%の当所ヒト血清、10µg/mlゲンタマイシン(CellGro)、100U/mlペニシリン及び100µg/mlストレプトマイシン、1.25µg/mlアンフォテリシンB(Fungizone)並びに2mM L-グルタミン(いずれもLife Technologiesから)を添加した、RPMI及びAIM-V培地の50/50混合物からなるT細胞培地中、 2×10^6 細胞/mlに設定した。 2×10^6 細胞(1ml)を、レトロウイルスによる形質導入前の2日間、50ng/mlの可溶性OKT3(Miltenyi Biotec)及び300IU/ml rhIL-2(Chiron)を含む24ウェルプレート中で刺激した。一過性レトロウイルス上清を生成するために、リポフェクタミン2000(Life Technologies)を用いて、V22陽性ERBB2IP突然変異特異的TCRをコードするレトロウイルスベクターMSGV1(1.5µg/ウェル)及びエンベロープをコードするプラスミドRD114(0.75µg/ウェル)を、レトロウイルスパッケージング細胞株293GP(6ウェルのポリ-D-リジンコーティングプレート1ウェル当たり 1×10^6 細胞、トランスフェクションの前日にプレーティング)に共トランスフェクションした。トランスフェクション後42~48時間で、レトロウイルス上清を回収し、DMEM培地で1:1に希釈し、レトロネクチンでコーティングした(10µg/ml, Takara)非組織培養処理6ウェルプレートに向けて、32で2時間、2,000gで遠心分離した。次いで、活性化T細胞(ウェル当たり 2×10^6 、IL-2を含有するT細胞培地中 0.5×10^6 細胞/ml)を、レトロウイルスプレートへ、300gで10分間スピンした。活性化T細胞を、一晚形質導入し、プレートから取り出し、IL-2を含有するT細胞培地中で更に培養した。GFP及びモックの形質導入コントロールを

、形質導入実験に含めた。細胞は、通常、レトロウイルス形質導入の10～14日後にアッセイした。

【0086】

実施例1

本実施例は、それぞれの遺伝子が、突然変異アミノ酸配列をコードするがん特異的突然変異を含有する、患者のがん細胞の核酸中の1以上の遺伝子を同定する方法を実例で示す。

【0087】

複数の化学療法レジメンを通して進行した広範転移性胆管がんを伴った、43歳の女性（患者（Pt.）3737）を、消化管（GI）がん患者のための、TILベースの養子細胞療法（ACT）プロトコルに登録した。患者3737の臨床的特徴を表1に示す。

【0088】

【表1】

表1

性別	年齢	原発性	転移部位	以前の治療	以前のIL-2	回収部位*	ECOG [†] ステータス	HLA-I	HLA-II
女性	43	肝内胆管癌（低分化型）	肺、肝臓	シスプラチン、ゲムシタビン、ゲムシタビン、タキセル	なし	肺	0	A*26 B*38 B*52 C*12	DRB1*0405 DRB1*1502 DQB1*0301 DQB1*0601 DPB1*0401 DPB1*10401

* TIL作製のため及び全エクソーム配列決定のための回収部位

[†] パフォーマンスステータス：ECOG、米国東海岸がん臨床試験グループ（Eastern Cooperative Oncology Group）

【0089】

肺転移を切除し、全エクソーム配列決定用及び治療用T細胞作製のソースとして用いた。表2は、患者3737からの転移性肺結節の全エクソーム配列決定によって同定された体細胞突然変異を示す。腫瘍結節は、ヘマトキシリン及びエオジン（H&E）染色切片の病理学的解析により、約70%が腫瘍であると推定された。全エクソーム配列決定により、26の非同義突然変異が明らかになった（表2）。

【0090】

10

20

30

【 表 2 - 1 】

表 2

遺伝子記号	遺伝子の説明	転写産物の アクセシヨ ン	突然変異位置		突然変 異の タイプ	結果	%突然変 異体読 み取り*
			ヌクレオチド (ゲノム)	アミノ酸 (タ ンパク質)			
ALK	未分化リンパ腫受容体チロシンキナーゼ	CCDS33172.1	chr2_29996620- 29996620_C_T	137R>H	置換	非同義コード	30%
AR	アンドロゲン受容体	CCDS14387.1	chrX_66858483- 66858483_C	NA	挿入	フレームシフト	31%
CD93	CD93 分子	CCDS13149.1	chr20_23012929- 23012929_C_T	634R>Q	置換	非同義コード	26%
DIP2C	DIP2 disco-相互作用タンパク質 2 ホモロ グ C (Drosophila)	CCDS7054.1	chr10_365545- 365545_C_T	NA	置換	スプライス部位 アクセプター	25%
ERBB2IP	erbb2 相互作用タンパク質	CCDS3990.1	chr5_65385316- 65385316_A_G	805E>G	置換	非同義コード	59%
FCER1A	IgE の Fc 断片;高親和性 I; α ポリペプチ ドの受容体	CCDS1184.1	chr1_157544227- 157544227_G_C	219D>H	置換	非同義コード	30%
GRXCR1	グルタレドキシニン; システインリッチ 1	CCDS43225.1	chr4_42590102- 42590102_C_T	21A>V	置換	非同義コード	18%
HLA-DOA	HLA クラス II 組織適合性抗原, DO α 鎖 前駆体	CCDS4763.1	chr6_33085209- 33085209_C_T	NA	置換	スプライス部位 ドナー	36%
KIF9	キネシンファミリーメンバー9	CCDS2752.1	chr3_47287859- 47287859_T_C	155T>A	置換	非同義コード	20%

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

【 2 - 2 】

遺伝子記号	遺伝子の説明	転写産物の アクセッション	突然変異位置		突然変 異の タイプ	結果	%突然変 異体読 み取り*
			ヌクレオチド (ゲノム)	アミノ酸 (タ ンパク質)			
KLHL6	kelch 様 6 (Drosophila)	CCDS3245.2	chr3_184692410- 184692413_CAGA_	NA	欠失	フレームシフト	20%
LHX9	LIM ホモオボックス 9	CCDS1393.1	chr1_196164923- 196164923_A_	NA	欠失	フレームシフト	21%
LONRF3	LON ペプチダーゼ N-末端ドメイン及び リンゲフィンガー3	CCDS35374.1	chrX_118007666- 118007666_A_C	NA	置換	スプライス部位 ドナー	10%
NAGS	N-アセチルグルタミン酸シンターゼ	CCDS11473.1	chr17_39440355- 39440355_G_A	412R>H	置換	非同義コード	29%
NLRP2	NLR ファミリー; ピリンドメイン含有 2	CCDS12913.1	chr19_60186650- 60186650_G_T	591S>I	置換	非同義コード	32%
PDZD2	PDZ ドメイン含有 2	CCDS34137.1	chr5_32124833- 32124833_A_	NA	欠失	フレームシフト	30%
POU5F2	POU ドメイン, クラス 5, 転写因子 2	NM_153216	chr5_93102847- 93102847_A_C	60V>G	置換	非同義コード	34%
RAC3	Ras 関連 C3 ボツリヌストキシン基質 3 (rho ファミリー; 低分子量 GTP 結合 タンパク質 Rac3)	CCDS11798.1	chr17_77584690- 77584690_C_A	125T>N	置換	非同義コード	27%
RAP1GDS1	RAP1; GTP-GDP 解離刺激因子 1	CCDS43253.1	chr4_99532209- 99532209_C_A	198L>I	置換	非同義コード	19%
RASA1	RAS p21 タンパク質活性化因子(GTP アーゼ活性化タンパク質)1	CCDS34200.1	chr5_86703757- 86703757_C_T	589R>C	置換	非同義コード	63%
RETSAT	レチノールサチュラーゼ(オールトランス-	CCDS1972.1	chr2_85424308-	553R>K	置換	非同義コード	11%

【 0 0 9 2 】

10

20

30

40

【 表 2 - 3 】

遺伝子記号	遺伝子の説明	転写産物の アクセッション	突然変異位置		突然変 異の タイプ	結果	%突然変 異体読 み取り*
			ヌクレオチド (ゲノム)	アミノ酸 (タ ンパク質)			
	レチノール 13;14-レダクターゼ)	CCDS1972.1	85424308_C_T			コード	
SEC24D	SEC24 ファミリー; メンバーD (S. cerevisiae)	CCDS3710.1	chr4_119872085- 119872085_A_G	901M>T	置換	非同義コード	18%
SENP3	SUMO1/セントリン/SMT3 特異的ペ プチダーゼ 3	ENST00000321337	chr17_7408824- 7408824_A_G	292M>V	置換	非同義コード	33%
SLIT1	slit ホモログ 1 (Drosophila)	CCDS7453.1	chr10_98753840- 98753840_G_C	1280N>K	置換	非同義コード	45%
TARBP1	TAR (HIV-1) RNA 結合タンパク質 1	CCDS1601.1	chr1_232649342- 232649342_C_A	655G>V	置換	非同義コード	18%
TGM6	トランスグルタミナーゼ 6	CCDS13025.1	chr20_2332325- 2332325_G_A	398D>N	置換	非同義コード	51%
TTC39C	テトラトリコペプチド回復ドメイン 39C	CCDS32804.1	chr18_19966475- 19966475_A_C	503N>T	置換	非同義コード	24%

【 0 0 9 3 】

実施例 2

本実施例は、患者の自己 A P C を、突然変異アミノ酸配列を提示するよう誘導する方法；患者の自己 T 細胞集団と、突然変異アミノ酸配列を提示する自己 A P C とを共培養する方法；及び (a) 突然変異アミノ酸配列を提示する自己 A P C と共培養されて、(b) 患者によって発現される M H C 分子の関係で提示される突然変異アミノ酸配列に対し抗原特

10

20

30

40

50

異性を有する、自己T細胞を選択する方法を実例で示す。

【0094】

実施例1で同定された各突然変異について、内因性タンパク質由来の12アミノ酸が各側に隣接する、突然変異アミノ酸をコードするミニ遺伝子コンストラクトを設計した。複数のミニ遺伝子をタンデムで合成し、タンデムミニ遺伝子(TMG)コンストラクトを作製した(表3)。表3において、下線は、点突然変異又はヌクレオチドの挿入若しくは欠失によってコードされる突然変異アミノ酸及び新規配列を示す。スプライス部位ドナー突然変異(splice-site donor mutation)(HLA-DOA及びLONRF3)については、その部位で突然変異がスプライシングを妨げるという仮定に基づいて、下流のイントロンに入って次の終止コドンまで続く突然変異ミニ遺伝子転写産物を設計した。DIP2Cにおけるスプライス部位アクセプター突然変異(splice-site acceptor mutation)は評価しなかった。

【0095】

【表 3】

表 3

TMG	突然変異遺伝子	ミニ遺伝子突然変異アミノ酸配列	TMG アミノ酸配列
1	ALK	RVLKGGSVRKLRLHAKQLVLELGEEA (配列番号 1)	RVLKGGSVRKLRLHAKQLVLELGEEAQNAADSYSWVPEQ AESRAMENQYSPTSFLSINSKEETGHLNGKNYPNLEFIP LLVVILFAVHTGLFISTQQQVTESDRPRKVRFRIVSSHSGR VLKEVYEIYNESLFDLLSALPYVGPSVTPMTGKKLRDDYL ASLHPRLHSIYVSEGYPDIKQELLRCDIICKGGHSTVTDLQ VGTKDLRDDKDNIERLRDKKLAPI (配列番号 26)
	CD93	QNAADSYSWVPEQAESRAMENQYSP (配列番号 2)	
	ERBB2IP	TSFLSINSKEETGHLNGKNYPNLE (配列番号 3)	
	FCER1A	FIPLLVVILFAVHTGLFISTQQQVT (配列番号 4)	
	GRXCR1	ESDRPRKVRFRIVSSHSGRVLKEVY (配列番号 5)	
	KIF9	EIYNESLFDLLSALPYVGPSVTPMT (配列番号 6)	
	NAGS	GKKLRDDYLASLHPRLHSIYVSEGY (配列番号 7)	
	NLRP2	PDIKQELLRCDIICKGGHSTVTDLQ (配列番号 8)	
	RAC3	VGTKDLRDDKDNIERLRDKKLAPI (配列番号 9)	
2	RAP1GDS1	VKLLGIHCQNAAITEMCLVAFGNLA (配列番号 10)	VKLLGIHCQNAAITEMCLVAFGNLANLRKSSPGTSNKC LQVSSSLVHIELGRHLPCVMASLKAQSPIPNLYLTGLLPIH TLDVKSTLPAAVRCSESRLMTDNFGKHLYTLKSEAPLY VGGMPVMTDNFGKHLYTLKSEAPLYVGGMPVHDGPF VFAEVNANYITWLWHEDESRQAKEDFSGYDFETRLHVR IHAALASPAVRPGICPGPDGWRIPLGPLPHEF (配列番号 27)
	RASA1	NLRKSSPGTSNKLQVSSSLVHIE (配列番号 11)	
	RETSAT	LGRLHPCVMASLKAQSPIPNLYLTG (配列番号 12)	
	SEC24D	LLPIHTLDVKSTLPAAVRCSESRL (配列番号 13)	
	SLIT1	MTMDNFGKHLYTLKSEAPLYVGGMPV (配列番号 14)	
	TARBP1	AVDVEGMKTQYSVKQRTENVLRIFL (配列番号 15)	
	TGM6	HDGPFVFAEVNANYITWLWHEDESR (配列番号 16)	
	TTC39C	QAKEDFSGYDFETRLHVRIHAALAS (配列番号 17)	
	POU5F2	PAVRPGICPGPDGWRIPLGPLPHEF (配列番号 18)	
3	SEN3	VAQELFQGSDDLGVAAEAERPGEKAG (配列番号 19)	VAQELFQGSDDLGVAAEAERPGEKAGGTATTTLDTNPLS LTHIRRVPGAVSDGRMGSWRAPPTLSVPASPLTLQSH FRQQARVRHLSQEFGLQITPPGIPVHESTATLQHYSS GWAESKILSPDSKIQMVSSSQKRALLCLIALSRKQTW KIRTCLRRVRQKCFLLSPQEAGATKDECEGEEGAAGSR DLRSWVTEETGMPNKASKQGPSTQREGSLEEIPGLT NIYKLLTSVWGLLRLLVWGPALAFSTCVTSEIAMRLL (配列番号 28)
	LHX9	GTATTLDTNPLLSL (配列番号 20)	
		THIRRVPGAVSDGRMGSWRAPPTLSVPASPLTLQSHFRQQARV (配列番号 21)	
	KLHL6	RHLSQEFGLQITPPGIPVHESTATLQH YSSGWAESKIL (配列番号 22)	
	AR	SPDSKIQMVSSSQKRALLCLIALSRKQT WKIRTCLRRVRQKCF (配列番号 23)	
	PDZD2	WKIRTCLRRVRQKCF (配列番号 23)	
	HLA-DOA	TLLSPQEAGATKDECEGEEGAAGSRDLR SWVT (配列番号 24)	
	LONRF3	EETGMPNKASKQGPSTQREGSLEEIPG LTNIYKLLTSVWGLLRLLVWGPALAFST CVTSEIAMRLL (配列番号 25)	

10

20

30

40

【 0 0 9 6 】

次いで、TMGコンストラクトを、*in vitro*転写 (IVT) RNAの生成用の鋳型として用いた。次いで、これらのIVT TMG RNAの各々を、自己APC (DC) に個別にトランスフェクションし、続いてTILとの共培養を行い、処理され、提示された突然変異抗原のいずれがTILによって認識されたかを決定した。3737-TILは、TMG-1に存在するが、TMG-2やTMG-3には存在しない突然変異抗原に

50

対して反応性であることが観察された（図 1 A）。更に、活性化マーカー O X 4 0 及び 4 - 1 B B の上方制御により実証される通り（表 4 A 及び 4 B）、C D 4 + T 細胞集団において反応性が優勢であった。表 4 A 及び 4 B は、非特異的刺激剤 O K T 3 と共に培養した D C、又は緑色蛍光タンパク質（G F P）R N A 若しくは、全エクソーム配列決定によって同定された種々の突然変異をコードする、表示したタンデムミニ遺伝子（T M G）コンストラクトをトランスフェクションした D C との共培養後に、フローサイトメトリーによる検出で、表示した表現型を有するとされた 3 7 3 7 - T I L のパーセンテージを示す。モックトランスフェクションした細胞は、核酸の添加なしで、トランスフェクション試薬のみで処理した。データを、生きている C D 3 + 細胞にゲートした。

【 0 0 9 7 】

10

【表 4】

表 4 A

	4-1BB-/CD4-	4-1BB+/CD4-	4-1BB-/CD4+	4-1BB+/CD4+
モック	49	0	51	0
GFP	49	0	51	0
TMG-1	47	4	38	11
TMG-2	47	0	53	0
TMG-3	48	0	52	0
OKT3	4	41	23	32

【 0 0 9 8 】

20

【表 5】

表 4 B

	OX40-/CD4-	OX40+/CD4-	OX40-/CD4+	OX40+/CD4+
モック	49	0	51	0
GFP	48	0	51	1
TMG-1	49	2	16	33
TMG-2	47	0	53	0
TMG-3	48	0	52	0
OKT3	38	6	11	45

【 0 0 9 9 】

30

C D 4 陰性（C D 8 +）T 細胞集団で、いくらかの 4 - 1 B B 上方制御が観察されたが、これらの細胞は、選別されるも、T M G に対する反応性は見出されなかった。T M G - 1 における 9 突然変異のうち、いずれが 3 7 3 7 - T I L によって認識されていたかを決定するために、それぞれが、野生型配列へ復帰させた突然変異のうちの 1 つを含有する、T M G - 1 の更なる 9 コンストラクトを合成した。E R B B 2 相互作用タンパク質（E R B B 2 I P）突然変異が野生型配列に復帰した場合にのみ、3 7 3 7 - T I L の T M G - 1 への反応性が消滅し、T I L が、E R B B 2 I P^{E 8 0 5 G} 突然変異を特異的に認識することが示された（図 1 B）。

【 0 1 0 0 】

40

E R B B 2 I P 突然変異反応性 T 細胞応答を、分子的に特性解析した。I F N - E L I S P O T アッセイを行い、20 時間目に結果を測定した。患者 3 7 3 7 - T I L と、何も添加しないでか、又は表示した（M H C - I、M H C - I I、H L A - D P、H L A - D Q、又は H L A - D R に対する）H L A 遮断抗体を添加してプレインキュベーションした、T M G - 1 をトランスフェクションした D C とを共培養した（図 2 A）。抗体ブロッキングに対するコントロールとして、H L A - A 2 拘束性 M A R T 反応性 T 細胞 D M F 5（図 2 B）及び H L A - D R 拘束性チロシナーゼ反応性 T 細胞 T 4（図 2 C）と、何も添加しないでか、又は表示された H L A 遮断抗体を添加してプレインキュベーションした、M A R T 及びチロシナーゼ陽性 6 2 4 - C I I T A 黒色腫細胞株とを共培養した。3 7 3 7 - T I L の応答は、抗 H L A - D Q 抗体によって遮断された（図 2 A）。

【 0 1 0 1 】

50

別のIFN-ELISPOTアッセイを行い、20時間目に結果を測定した。患者3737-TILと、DMSO、突然変異(mut)ALK又は突然変異ERBB2IPの25アミノ酸長ペプチドで一晩パルスした、自己B細胞又はHLA-DQ遺伝子座が一部適合する、同種異系EBV-B細胞とを共培養した(図2D)。

【0102】

別のIFN-ELISPOTアッセイを行い、20時間目で結果を測定した。患者3737-TILと、mutERBB2IPの25アミノ酸ペプチド又は表示した切断型mutERBB2IPペプチドで一晩パルスした自己B細胞とを共培養した(図2E)。

【0103】

図2A~2Eに示す通り、3737-TILの応答はHLA-DQB1*0601対立遺伝子拘束性であり、最小エピートープは13アミノ酸配列、NSKEETGHLENGN(配列番号29)内に位置した。

【0104】

実施例3

本実施例は、実施例2で同定したERBB2IP特異的CD4+T細胞のTCR-V22鎖で(その鎖と対応させて)遺伝的に改変した自己オープンレパートリー末梢血T細胞(autologous open repertoire peripheral blood T cells)が、突然変異ERBB2IPペプチドに対する特異的反応性を付与したことを示す。

【0105】

活性化マーカーとしてOX40を用い、実施例2で同定した、突然変異ERBB2IP特異的CD4+T細胞のクローン性を、それらを抗原特異的活性化後に選別することにより特性解析した。次いで、これらの細胞を、バルクで増幅し、限界希釈によりクローニングした。フローサイトメトリーに基づく、TCR-Vレパートリーの調査により、バルク増幅集団の>95%がV22+であり、評価したクローンの10/11が、純粋にV22+であることが実証された。TCR配列解析により、試験したV22+クローンの6/6において、TCR-V-D-J配列が同一なことを明らかにし(表5)、ERBB2IP突然変異反応性T細胞の大部分が、支配的なV22+T細胞クローンから構成されることが示された。

【0106】

【表6】

表5

TCR Vβ	V-D-J 核酸配列 (下線は CDR3)	V-D-J アミノ酸配列 (下線は CDR3)	表示された V-D-J を含む Vβ22 (TRBV2) クローンの数
Vβ22 (TRBV2)	GAACCTGAAGTCACCCAGACTCCCAGCCATCAGGT CACACAGATGGGACAGGAAGTGATCTTGCGCTGT GTCCCCATCTCTAATCACTTATACTTCTATTGGTACA GACAAATCTTGGGGCAGAAAGTCGAGTTTCTGGTT TCCTTTTATAATAATGAAATCTCAGAGAAGTCTGAA ATATTCGATGATCAATTCTCAGTTGAAAGGCCTGAT GGATCAAATTTCACTCTGAAGATCCGGTCCACAAA GCTGGAGGACTCAGCCATGTACTTCTGT <u>GCCAGC</u> <u>AGCCTGGGTGACAGGGTAATGAAAACTGT</u> <u>TTTTTGGCAGTGGAACCCAGCTCTGTCTTGG</u> (配列番号 39)	EPEVTQTPSHQVTQMG QEVLRCVPISNHLFYFYR QILGQKVEFLVSFYNNNEIS EKSEIFDDQFSVERPDGS NFTLKIRSTKLEDSAMYF <u>CASSLGDRGNEKLFFGS</u> GTQLSVL (配列番号 40)	6/6

【0107】

このV22 TCRを発現するT細胞クローンは、突然変異ERBB2IPペプチドによる刺激に際して、サイトカインIFN-を特異的に産生した(表6)。CD4+V22+クローンと、OKT3又は野生型(wt)ERBB2IP、突然変異(mut)

ALK、若しくはmutERBB2IPの25アミノ酸長ペプチドで一晩パルスした自己B細胞とを、6時間共培養した。表6は、フローサイトメトリーによって測定した、共培養後に細胞内IFN- γ を産生する(IFN- γ +)か、又は細胞内IFN- γ を産生しない(IFN- γ -)、CD4+でV β 22+及びV β 22-のクローンのパーセンテージを示す。データは、同一のTCR-V β 配列を共に有する2クローンのうちの代表例である。

【0108】

【表7】

表6

	IFN- γ -/V β 22-	IFN- γ +/V β 22-	IFN- γ -/V β 22+	IFN- γ +/V β 22+
mutALK	1	0	98	1
wtERBB2IP	1	0	99	0
mutERBB2IP	1	0	19	80
OKT3	3	4	59	34

10

【0109】

更に、このTCR-V β 22鎖を、その鎖(表7)と対応させて遺伝学的に改変した自己オープンレパートリー末梢血T細胞は、突然変異ERBB2IPペプチド(表8A及び8B)に対する特異的反応性を付与した。このことは、このTCRが、ERBB2IP^{E805G}突然変異を特異的に認識することを実証した。自己オープンレパートリー末梢血T細胞を、V β 22+クローン由来のTCRで形質導入(Td)し(表8A)、又は核酸の添加なしで形質導入試薬のみで処理し(Mock)(表8B)、次いで、反応性に関して、表6に記載の通り評価した。内因性V β 22+TCR定常領域を、マウス定常領域と交換し、マウスTCR定常領域(mTCR)に対する抗体を用いた導入TCRの検出を可能にした。全てのアッセイにおいて、プレート結合OKT3をコントロールとして用いた。表8A及び8Bは、フローサイトメトリーによって測定される、細胞内IFN- γ を産生する(IFN- γ +)か、又は細胞内IFN- γ を産生しない(IFN- γ -)、mTCR+及びmTCR-の細胞のパーセンテージを示す。

20

【0110】

【表8】

表7

TCR V α	V-J 核酸配列 (下線は CDR3)	V-J アミノ酸配列 (下線は CDR3)
TRAV26-2	GATGCTAAGACCACACAGCCAAATTCAATGGAG AGTAACGAAGAAGAGCCTGTTCACTTGCCTTGTA ACCACTCCACAATCAGTGGAACTGATTACATACA TTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCAGGGTCCAGAG TACGTGATTCATGGTCTTACAAGCAATGTGAACA ACAGAATGGCCTCTCTGGCAATCGCTGAAGACA GAAAGTCCAGTACCTTGATCCTGCACCGTGCTAC CTTGAGAGATGCTGCTGTGTACTACTGCATCCT <u>GAGACGTCTTAACGACTACAAGCTCAGCTTT</u> GGAGCCGGAACCACAGTAACTGTAAGAGCAA (配列番号 41)	DAKTTQPNSMESNEEPPVHLP CNHSTISGTDYIHWYRQLPSQ GPEYVIHGLTSNVNNRMA SLAIAEDRKSSTLILHRATLRDA AVYYC <u>ILRRLNDYKLS</u> FGAGT TVTVRA (配列番号 42)

30

40

【0111】

【表 9】

表 8 A

	IFN- γ -/mTCR β -	IFN- γ +/mTCR β -	IFN- γ -/mTCR β +	IFN- γ +/mTCR β +
mutALK	16	0	84	0
wtERBB2IP	15	0	85	0
mutERBB2IP	19	0	69	12
OKT3	14	2	74	10

【0112】

【表 10】

10

表 8 B

	IFN- γ -/mTCR β -	IFN- γ +/mTCR β -	IFN- γ -/mTCR β +	IFN- γ +/mTCR β +
mutALK	99	1	0	0
wtERBB2IP	100	0	0	0
mutERBB2IP	100	0	0	0
OKT3	83	17	0	0

【0113】

実施例 4

本実施例は、実施例 2 で同定した自己細胞を用いて、がんを治療する方法を実例で示す

20

【0114】

患者 3737 は、CD4 + ERBB2IP 突然変異反応性 T 細胞を含有する 424 億の TIL を養子移入後、T 細胞の増殖及び機能を増強するために、IL-2 の投与を 4 回受けた。患者 3737 は、治療のために肺病変の切除を受けた。次いで、腫瘍を小断片に細かく切り、高用量の IL-2 でインキュベーションして、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を増幅した。IL-2 中での、最初の細胞数の増幅後、選択した TIL 培養物の数を、放射線照射同種異系末梢血フィーダー細胞、OKT3 及び IL-2 を含む急速増幅プロトコル (REP) を用いて、更に 2 週間増幅した。細胞注入に先立ち、患者を、シクロホスファミド (CTX: 60 mg/kg, 1 日 1 回 2 日間)、続いてフルダラビン (Flu: 25 mg/m², 5 日間) でプレコンディショニングした。患者 3737 - TIL は、100 億 (25%) 超の ERBB2IP 突然変異反応性 T 細胞を含有する 424 億の TIL を含み、0 日目に投与し、続いて IL-2 (アルデスロイキン, 7.2 e5 IU/kg) を 8 時間ごとに投与した。患者は IL-2 の投与を合計 4 回受けた。

30

【0115】

3737 - TIL と、TMG-1 又は野生型 (wt) 復帰 ERBB2IP をコードする TMG-1 をトランスフェクションした DC とを共培養し、フローサイトメトリーを用いて、刺激後 24 時間で、CD4 + T 細胞上の OX40 及び V₂₂ の発現を評価した。プレート結合 OKT3 の刺激をポジティブコントロールとして用いた。フローサイトメトリー解析により、投与した 3737 - TIL 産物全体の約 25% が、V₂₂ + 突然変異反

40

【0116】

3737 - TIL の養子細胞移入前及び後に、患者 3737 の血清試料に対して、IFN- γ ELISA アッセイを行った。結果を図 3B に示す。図 3B に示す通り、患者血清において、細胞注入後最初の 5 日間に、IFN- γ のレベル上昇が検出された。

【0117】

患者は、細胞注入前には、明らかな進行性疾患の兆候を有していたが、2 ヶ月の追跡調

50

査により腫瘍退縮が観察され、肺及び肝臓の標的病変は、全て退行し続け、治療7ヶ月後には、最大の30%減退に達した(図3C)。患者は、細胞注入後約13ヶ月間、疾患の安定化を経て、その後、疾患の進行は肺のみで認められ、肝臓では認められなかった。

【0118】

【表11】

表9

	Vβ22-/OX40-	Vβ22-/OX40+	Vβ22+/OX40-	Vβ22+/OX40+
TMG-1 wtERBB2IP	45	0	55	0
TMG-1	33	12	3	52
OKT3	19	31	6	44

10

【0119】

実施例5

本実施例は、実施例4の細胞の、*in vitro*の表現型及び機能を実例で示す。

【0120】

CD4+ERBB2IP突然変異反応性T細胞が、疾患の安定化における役割を果たす証拠があるか否かを判定するために、細胞の、*in vitro*の表現型及び機能の評価した。3737-TILと、野生型(wt)ERBB2IP、突然変異型(mut)ALK又はmutERBB2IPの25アミノ酸長ペプチドで一晩パルスした自己B細胞とを、6時間共培養した。フローサイトメトリーを用いて、V22の発現を評価し、CD4+集団におけるIFN- (表10A)、腫瘍壊死因子(TNF)(表10B)、及びIL-2(表10C)の細胞内産生を検出した。表示した表現型を有する細胞のパーセンテージを表10A~10Cに示す。表10Dは、表示した数のサイトカインを発現したV22+細胞のパーセンテージを示す。突然変異ERBB2IPペプチドによる刺激は、IFN-、TNF及びIL-2の確固とした共発現を誘導した(表10A~10C)が、IL-4又はIL-17はほとんど又は全くされなかったため、V22+ERBB2IP突然変異反応性CD4+T細胞が、多機能性Th1細胞であることが見出された。

20

【0121】

【表12】

表10A

	Vβ22-/IFN-γ-	Vβ22-/IFN-γ+	Vβ22+/IFN-γ-	Vβ22+/IFN-γ+
mutALK	45	0	55	0
wtERBB2IP	44	0	56	0
mutERBB2IP	40	8	6	47
OKT3	29	33	24	14

30

【0122】

【表13】

表10B

	Vβ22-/TNF-	Vβ22-/TNF+	Vβ22+/TNF-	Vβ22+/TNF+
mutALK	45	0	55	0
wtERBB2IP	43	1	56	0
mutERBB2IP	37	10	3	50
OKT3	10	52	6	32

40

【0123】

【表 1 4】

表 1 0 C

	Vβ22-/IL-2-	Vβ22-/IL-2+	Vβ22+/IL-2-	Vβ22+/IL-2+
mutALK	45	0	55	0
wtERBB2IP	43	1	56	0
mutERBB2IP	38	10	5	47
OKT3	27	36	23	14

【 0 1 2 4】

【表 1 5】

表 1 0 D

サイトカインの数 (Vβ22+にゲート)	mutALK	wtERBB2IP	OKT3	mutERBB2IP
0	99%	98%	12%	11%
1+	1%	2%	30%	
2+	なし	なし	24%	
3+	なし	なし	34%	89%

10

【 0 1 2 5】

表現型の更なる特性解析により、これらの細胞が、主に、細胞溶解能を有するエフェクター記憶CD4+T細胞であることが明らかとなった(表11及び12)。Vβ22(ERBB2IP突然変異反応性T細胞に相当する)及びT細胞分化マーカーCD28、CD45RO、CD57、CCR7、CD127、CD62L及びCD27の発現について、患者3737-TILを、フローサイトメトリーにより評価した。データを、生きているCD3+CD4+細胞にゲートした。アイソタイプ染色した細胞又は非染色細胞を用いて、正及び負の象限ゲートを設定した。表示した表現型を有する細胞のパーセンテージを表11に示す。ヒト末梢血細胞(すべての分化段階のT細胞を含有する)を実験に含め、抗体が作用していることを確認した。

20

【 0 1 2 6】

【表 1 6】

表 1 1

Vβ22-/CD28-	Vβ22-/CD28+	Vβ22+/CD28-	Vβ22+/CD28+
1	56	1	42
Vβ22-/CD45RO-	Vβ22-/CD45RO+	Vβ22+/CD45RO-	Vβ22+/CD45RO+
0	57	0	43
Vβ22-/CD57-	Vβ22-/CD57+	Vβ22+/CD57-	Vβ22+/CD57+
48	9	42	1
Vβ22-/CCR7-	Vβ22-/CCR7+	Vβ22+/CCR7-	Vβ22+/CCR7+
57	0	43	0
Vβ22-/CD127-	Vβ22-/CD127+	Vβ22+/CD127-	Vβ22+/CD127+
25	32	21	22
Vβ22-/CD62L-	Vβ22-/CD62L+	Vβ22+/CD62L-	Vβ22+/CD62L+
49	8	42	1
Vβ22-/CD27-	Vβ22-/CD27+	Vβ22+/CD27-	Vβ22+/CD27+
57	0	43	0

30

40

【 0 1 2 7】

患者3737-TILと、OKT3又は野生型(wt)ERBB2IP、突然変異型(mut)ALK若しくはmutERBB2IPの25アミノ酸長ペプチドで一晩パルスした自己B細胞とを、6時間共培養した。共培養開始時に、脱顆粒マーカーCD107aに対して特異的な抗体を加えた。フローサイトメトリーを用いて、Vβ22の発現を評価し

50

、CD107aの細胞表面移動化 (cell surface mobilization) を検出した。データをCD4+集団にゲートした。表示した表現型を有する細胞のパーセンテージを表12に示す。

【0128】

【表17】

表12

	Vβ22-/CD107a-	Vβ22-/CD107a+	Vβ22+/CD107a-	Vβ22+/CD107a+
mutALK	51	0	48	1
wtERBB2IP	51	1	48	0
mutERBB2IP	53	6	19	22
OKT3	42	19	26	13

10

【0129】

3737-TIL中に存在する、多機能性、Vβ22陰性で、ERBB2IP突然変異反応性の、少数のCD4+T細胞集団もあるようであった(表9及び10)。これらのVβ22陰性細胞を、野生型(wt)ERBB2IP、突然変異型(mut)ALK又はmutERBB2IPの25アミノ酸長ペプチドで一晩パルスした自己B細胞と共培養する前に、FACSで選別し、次いで、IL-2含有培地中で2日間静置した(rest)。フローサイトメトリーを用いて、Vβ22の発現を評価し、刺激後6時間(h)の、CD4+集団におけるIL-2(表13C)、TNF(表13B)、及びIFN-γ(表13A)の細胞内産生を検出した。表示した表現型を有する細胞のパーセンテージを表13A~13Cに示す。

20

【0130】

【表18】

表13A

	Vβ22-/IFN-γ-	Vβ22-/IFN-γ+	Vβ22+/IFN-γ-	Vβ22+/IFN-γ+
mutALK	99	0	1	0
wtERBB2IP	99	0	1	0
mutERBB2IP	85	14	0	1
OKT3	50	49	0	1

30

【0131】

【表19】

表13B

	Vβ22-/TNF-	Vβ22-/TNF+	Vβ22+/TNF-	Vβ22+/TNF+
mutALK	99	0	1	0
wtERBB2IP	97	2	1	0
mutERBB2IP	78	21	0	1
OKT3	9	90	0	1

40

【0132】

【表20】

表13C

	Vβ22-/IL-2-	Vβ22-/IL-2+	Vβ22+/IL-2-	Vβ22+/IL-2+
mutALK	99	0	1	0
wtERBB2IP	97	2	1	0
mutERBB2IP	78	21	0	1
OKT3	36	63	0	1

【0133】

50

フローサイトメトリーを用いて、CD4⁺集団におけるOX40及びV β 22の発現 (expression OX40 and V β 22) を、刺激後24時間目に評価した。OX40を上方制御した細胞を選別し、細胞の数を増幅し、TCR-V β レパートリーを、フローサイトメトリーにより解析した。結果を図3Dに示す。V β 22陰性細胞を選別し、続いてこれらの細胞を活性化すると、3737-TIL中に、このエピトープに対して反応性の更なるクローン型が1以上存在し(表13A~13C)、そのうち最も優占的なクローン型が、V β 5.2である(図3D)ことが明らかになった。

【0134】

選別された、図3Dに記載の細胞と、wtERBB2IP、mutALK又はmutERBB2IPの25アミノ酸長ペプチドで一晩パルスした自己B細胞とを、6時間共培養した。フローサイトメトリーを用いて、V β 5.2の発現を評価し、CD4⁺集団におけるIL-2(表14C)、TNF(表14B)、及びIFN- γ (表14A)の細胞内産生を検出した。表15は、表示した数のサイトカインを発現したV β 5.2⁺細胞のパーセンテージを示す。

【0135】

【表21】

表14A

	V β 5.2-/IFN- γ -	V β 5.2-/IFN- γ +	V β 5.2+/IFN- γ -	V β 5.2+/IFN- γ +
mutALK	51	0	49	0
wtERBB2IP	54	0	46	0
mutERBB2IP	42	13	20	25
OKT3	28	23	25	24

【0136】

【表22】

表14B

	V β 5.2-/TNF-	V β 5.2-/TNF+	V β 5.2+/TNF-	V β 5.2+/TNF+
mutALK	50	2	48	0
wtERBB2IP	52	2	46	0
mutERBB2IP	33	21	3	43
OKT3	5	46	3	46

【0137】

【表23】

表14C

	V β 5.2-/IL-2-	V β 5.2-/IL-2+	V β 5.2+/IL-2-	V β 5.2+/IL-2+
mutALK	51	1	48	0
wtERBB2IP	54	1	45	0
mutERBB2IP	38	17	14	31
OKT3	31	21	27	21

【0138】

【表 2 4】

表 1 5

サイトカイン数 (Vβ5.2+にゲート)	mutALK	wtERBB2IP	mutERBB2IP	OKT3
0	98%	98%	3%	6%
1+	2%	2%	11%	25%
2+	なし	なし	36%	36%
3+	なし	なし	50%	33%

【0 1 3 9】

10

突然変異 E R B B 2 I P による刺激に際して、O X 4 0 を上方制御した V 2 2 陰性細胞を選別し、細胞数を増幅した。次いで、これらの細胞からの RNA を単離し、T C R - 定常鎖プライマーを用いて 5 ' 相補的 DNA 末端の迅速増幅 (5 ' R A C E) を行い、発現した T C R - V 配列を同定した。ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 産物に対して T O P O - T A クローニングを行い、次いで、個々のコロニーで配列決定した。フローサイトメトリーは、これらの T 細胞の 4 0 ~ 5 0 % が V 5 . 2 (T R B V 5 - 6) であることを実証した。サンガー配列決定によると、T O P O - T A コロニーの 3 / 7 が、表 1 6 に示す配列を有する V 5 . 2 (T R B V 5 - 6) であった。表 1 6 に、V 2 2 陰性 E R B B 2 I P 突然変異反応性 T 細胞の、最も高頻度な T C R V - D - J 配列を示す。

【0 1 4 0】

20

【表 2 5】

表 1 6

TCR Vβ	V-D-J 核酸配列 (下線は CDR3)	V-D-J アミノ酸配列 (下線は CDR3)	表示した V-D-J を有する TOPO- TA クローン数
Vβ5.2 (TRBV5-6)	GACGCTGGAGTCACCCAAAGTCCACACACCTGAT CAAACGAGAGGACAGCAAGTGACTCTGAGATGC TCTCCTAAGTCTGGGCATGACACTGTGTCCTGGTAC CAACAGGCCCTGGGTCAGGGGCCCCAGTTTATCTT TCAGTATTATGAGGAGGAAGAGAGACAGAGAGGC AACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTCACCAAGTTCCT AACTATAGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCCTTGT GCTGGGGGACTCGGCCCTCTATCTCTGT <u>GCCAGCA</u> <u>GCAAAGGCCCGGGAGGCAACTACGAGCAGTACTT</u> CGGGCCGGGCACCAAGGCTCACGGTCACAG (配列 番号 43)	DAGVTQSPTHLIKTR GQQVTLRCSPKSGHD TVSWYQQALGQGPQ FIFQYEEEEERQGNF PDRFSGHQFPNYSSE LNVNALLGDSALYLC <u>ASSKGPGGNYEQYFG</u> PGTRLTVT (配列番 号 44)	3/7

30

【0 1 4 1】

大部分の V 5 . 2 + 細胞が、抗原特異的様態で、複数のサイトカインを産生した (表 1 4 A ~ 1 4 C 、 1 5 及び 1 6) 。突然変異 E R B B 2 I P を認識する、少数の、V 5 . 2 陰性 (及び V 2 2 陰性) C D 4 + T 細胞の集団も存在するようであった (表 1 4 A ~ 1 4 C 及び 1 5) 。従って、患者 3 7 3 7 を治療するために用いた T I L は、E R B B 2 I P において同一の突然変異を認識する、異なる多機能性 C D 4 + T 細胞を少なくとも 3 クローン含有し、この突然変異が、高度に免疫原性であることを示した。

40

【0 1 4 2】

実施例 6

本実施例は、実施例 4 の細胞の i n v i v o での持続性を実証する。

【0 1 4 3】

C D 4 + E R B B 2 I P 突然変異反応性 T 細胞が、疾患の安定化における役割を果たす証拠があるか否かを判定するために、細胞の、i n v i v o での持続性を評価した。T C R - V ディープシーケンシングにより、これらのクローン型は、A C T の前では末

50

梢血においてまれであるか、又は検出されないことが明らかとなった（図 4 A 及び 4 B）。A C T の 1 0 日後、両クローンは、末梢血中の全 T 細胞の 2 % 超存在したが、細胞注入後 3 4 日目までに 0 . 3 % 未満に減少した（図 4 A 及び 4 B）。A C T の約 1 年半後に切除された 3 例の肺転移は、E R B B 2 I P 突然変異反応性 T 細胞によって浸潤されており（図 4 A 及び 4 B）、これらの細胞が、がんの退縮及び疾患の安定化に寄与することが示された。V 2 2 + E R B B 2 I P 突然変異反応性クローンは、腫瘍結節 3（T u - 3 - P o s t）で検出された、最も高頻度なクローンであり、腫瘍中の全 T 細胞の約 8 % に相当した（図 4 A 及び 4 B）が、このクローンは、腫瘍結節 1 及び 2 中、頻度の高さがそれぞれ 2 番目及び 1 2 番目だった。V 5 . 2 + E R B B 2 I P 突然変異反応性クローンも、その血中頻度と比較して、3 腫瘍結節全てにおいて濃縮されていた（図 4 A 及び 4 B）。従って、患者 3 7 3 7 は、転移病巣に浸潤して持続する 1 0 0 億超の E R B B 2 I P 突然変異特異的多機能性 T h 1 細胞を受容した後、1 年超の間、疾患の安定化を伴う腫瘍退縮を経た。

【 0 1 4 4 】

患者 3 7 3 7 - T I L（T 細胞）、及び養子細胞移入の前（T u - P r e）後の腫瘍中の、E R B B 2 I P 発現の定量的逆転写酵素 P C R（R T - q P C R）解析を行った。細胞注入の約 1 7 ヶ月後に、肺の、転移性の別個の 3 病変（T u - 1、- 2、- 3 - P o s t）を切除した。結果を、 β -アクトニン（A C T B）と相対的に、図 4 C に示す。突然変異を含有する、E R B B 2 I P 遺伝子の 3 5 0 塩基対（b p）セグメントを、図 4 C に記載した c D N A サンプルから P C R 増幅し、サンガー配列決定した。突然変異の位置は、アミノ酸配列の 8 0 5 位の変化に対応する、コード配列の 2 4 1 4 位のヌクレオチドであった。定量的 R T - P C R によって決定された通り、元の肺病変及び再発肺病変の両方において、比較的高レベルの E R B B 2 I P 発現が観察され（図 4 C）、サンガー配列決定により、すべての腫瘍病変において、E R B B 2 I P 突然変異の存在が確認された。

【 0 1 4 5 】

A C T 前後の T 細胞浸潤及び M H C 発現の、免疫組織化学的解析を行った。A C T 後の腫瘍は、最初の A C T の約 1 7 ヶ月後に回収した。陽性対照（扁桃）を全ての染色についてに含めた。i n s i t u での、腫瘍の T 細胞浸潤及び M H C 発現を、それぞれ表 1 7 及び 1 8 に要約する。

【 0 1 4 6 】

【表 2 6】

表 1 7

腫瘍結節	CD3		CD8		CD4	
	腫瘍	間質	腫瘍	間質	腫瘍	間質
Pre-1A	0-1	1	0-1	1	0-1	1
Pre-2A	0-1	1	0-1	1	0	0
Pre-3A	0	0-1	0	0-1	0	0
Pre-3B	0-1	1	0-1	0-1	0-1	1
Post-1A	1	1	1	1	0-1	1
Post-1B	1	2	1-2	2	1	2
Post-2A	0-1	1	0-1	1	0-1	0-1

0、浸潤なし

1、希薄

2、中程度の密度

3、高密度

【 0 1 4 7 】

【表 27】

表 18

腫瘍結節	HLA-I	HLA-II (HLA-DR)
Pre-1A	1-2、>50%	0
Pre-2A	1-2、>50%	0
Pre-3A	1、>50%	0
Pre-3B	2、>50%	0
Post-1A	2-3、>50%	0
Post-1B	3、>50%	0
Post-2A	2、>50%	0

>50%は、腫瘍細胞の 50%超が陽性であることを表す。

- 0、陰性
1、陽性度弱
2、陽性度中
3、陽性度強

【0148】

実施例 7

本実施例は、突然変異反応性 T h 1 細胞の、実施例 4 の抗腫瘍応答への寄与を実証する

。

【0149】

突然変異反応性 T h 1 細胞の、i n v i v o での抗腫瘍応答への寄与を特異的に評価するために、>95%が V 22 + E R B B 2 I P 突然変異反応性 T h 1 細胞（約 1200 億の突然変異反応性細胞）で構成される T I L 産物を作製し、患者 3737 に養子移入した。

【0150】

再治療に用いた T I L 産物のフローサイトメトリー解析を行った。表 19 は、C D 3 にゲートした後、97%が C D 4 + / C D 8 - であり、これらのうち 98%が、C D 4 + 細胞に更にゲートした後に V 22 + であったことを示す（表 20）。再治療 T I L と、野生型（w t）又は突然変異型（m u t）E R B B 2 I P の 25 アミノ酸長ペプチドで一晩パルスした自己 B 細胞とを、6 時間共培養した。フローサイトメトリーを用いて、C D 4 + の集団における細胞内 T N F 産生を検出した（表 20）。

【0151】

【表 28】

表 19

CD8-/CD4-	CD8-/CD4+	CD8+/CD4-	CD8+/CD4+
0	97	3	0

【0152】

【表 29】

表 20

	Vβ22-/TNF-	Vβ22-/TNF+	Vβ22+/TNF-	Vβ22+/TNF+
wtERBB2IP	2	0	98	0
mutERBB2IP	1	3	3	93

【0153】

患者は、再度標的病変の減少を経たが、最初の治療とは異なり、腫瘍退縮が、最初の 1 ヶ月目の追跡調査でも認められ、2 回目の治療後 4 ヶ月目の追跡調査において続いていた（図 4 D）。2 回目の治療後 8 ヶ月目の追跡調査時に、腫瘍退縮が継続していた。

【0154】

突然変異反応性細胞の2回目の投与後6ヶ月に、患者3737の、肺のコンピューター断層撮影(CT)スキャンを撮影した。得られた画像を図7A~Cに示す。これらの画像を、突然変異反応性細胞の第2回投与に先立って撮影したもの(図7D~7F)と比較した。図7A~7Fに示す通り、約36%のがん性病変の減少が観察され、固形がんの治療効果判定のための(RECIST)基準に基づく、部分反応(PR)がもたらされた。

【0155】

2回目の、突然変異反応性細胞投与の8ヶ月後、患者3737の、肝臓及び肺の陽電子放出断層撮影(PET)スキャンを撮影した。標的病変の継続的な収縮が観察された。腫瘍の代謝活性を測定するために、放射性標識グルコースアナログ、FDG(フルオロデオキシグルコース)を投与して、腫瘍によるグルコースの取り込みを評価した。PETスキャンでは、肝臓の2病変ではグルコース取り込みが示されず、肺病変では一部の取り込みが示されたのみであった。

【0156】

実施例8~10

実施例8~10についての材料及び方法を以下に示す。

【0157】

患者材料及び細胞株

すべての患者の材料は、国立がん研究所の施設内治験審査委員会が承認した臨床試験の過程で得た。患者2359及び患者2591を、Dudley et al., J. Clin. Oncol., 26:5233-9(2008)に記載されている臨床試験(それぞれ、試験登録ID:NCT00096382及びID:NCT00335127)に登録した。患者に切除術を施し、それからTIL株と腫瘍細胞株の両方を樹立した。本研究に使用するTILは、Dudley et al., J. Immunother., 26:332-42(2003)に記載の方法により作製した。簡潔に述べると、腫瘍断片を切除し、IL-2含有培地中で培養した。増幅したTIL培養物の数を、自己又はHLA適合腫瘍の認識についてスクリーニングし、急速増幅プロトコル(REP)(Riddell et al., Science, 257:238-41(1992))を用いて、反応性TILの数を、IL-2、抗CD3抗体及び放射線照射したフィーダー細胞により、患者注入用に大量増幅した(Riddell et al., Science, 257:238-41(1992))。一部少数のTILに第2のREPを施した。T細胞及び腫瘍細胞を、共培養アッセイ用に、200µLの培地(5%ヒト血清を添加したAIM-V培地)を含む96ウェルプレート中1:1の割合で、16時間(hr)培養した。

【0158】

臨床活性を有するTILの抗原反応性を評価するために、養子TIL療法による持続的完全寛解を経た、2名の転移性黒色腫患者を調査した。患者2359は、右膝に、大腿、腸骨及び鼠径リンパ節に転移した、原発性皮膚黒色腫を有していた。この個人は、治療後8年間超にわたって進行中であった、自己TILの移入に反応して、全転移性病変の完全退縮を経た。患者2591は、腹壁、腸間膜リンパ節、右結腸及び鎖骨上リンパ節に転移した原発性背部黒色腫(back melanoma)を有していた。この個人は、自己TIL移入に反応して、全転移性病変の完全退縮を経、治療後9年間無疾患であった。

【0159】

全エクソーム配列決定

該方法は、Robbins et al., Nat. Med., 19:747-52(2013)に記載されている。ゲノムDNA精製、ライブラリー構築、約20,000のコード遺伝子のエクソーム捕獲(capture)、並びに腫瘍試料及び正常試料の次世代配列決定を、Personal Genome Diagnostics(Baltimore, MD)で行った。要約すると、腫瘍試料及び正常試料由来のゲノムDNAを断片化し、Illumina TRUSEQ library construction(Illumina, San Diego, CA)に用いた。エクソン領域は、Agil

ent SURESELECT 50Mb kit (version 3) を、製造業者の指示書 (Agilent, Santa Clara, CA) に従って溶液中に捕捉した。HISEQ 2000 Genome Analyzer (Illumina) を用いて、各フラグメントの各末端から 100 塩基を得るペアエンド配列決定を行った。配列データを、参照用のヒトゲノム配列にマッピングし、配列改変を、5,000 万塩基超の腫瘍 DNA 及び正常 DNA の比較によって決定した。各試料について 80 億塩基超の配列データを得たが、該塩基の多くは、捕獲されたコード領域由来であった。腫瘍試料及び正常試料において、4300 万塩基超の標的 DNA を解析し、正常 DNA 試料及び腫瘍 DNA 試料における各塩基で、平均 42 ~ 51 の読み取りを得た。

【0160】

生物情報科学的解析は、ワシントン大学医学部の個人ゲノム診断及びゲノム技術アクセスセンター、ゲノミクス及び病理学部門が行った。タグを、CASAVA 1.6 ソフトウェア (Illumina) の ELAND アルゴリズムを用いて、ヒトゲノム参照用配列 (hg18) と整列させた。その後の解析用の配列読み取りを、Illumina の BASECALL software の純度フィルターを用いて選択した。次いで、CASAVA 1.6 ソフトウェアの ELAND v2 algorithm を適用して、点突然変異及び小規模な挿入及び欠失を同定した。dbSNP に記録された既知の多型を、解析から除外した。起こり得る体細胞突然変異を、Jones et al., Science, 330:228-31 (2010) に記載の通りにフィルターにかけ、目視で検証した。

【0161】

タンデムミニ遺伝子ライブラリーの構築

黒色腫試料由来の非同義突然変異を、全エクソーム配列決定データから同定した。同定された突然変異アミノ酸 6 残基 (その N - 及び C - 末端両側に、両側の 12 アミノ酸が隣接する) を含有するポリペプチドをコードするタンデムミニ遺伝子コンストラクトを合成し (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa)、次いで、IN-FUSION Advantage PCR Cloning Kit (Clontech) を用い、製造業者の指示書に従って、pcDNA3.1 発現ベクターにクローニングした。

【0162】

IFN - ELISPOT アッセイ

腫瘍細胞株及びペプチドでパルスした標的細胞に対する応答を、15 µg/ml の抗 IFN - モノクローナル抗体 1D1K (Mabtech, Inc., Cincinnati, OH) でコーティングした 96 ウェル PVDf 膜フィルタープレート (EMD Millipore, Billerica, MA) を用いて、IFN - ELISPOT アッセイで定量した。結合したサイトカインを、1 µg/ml のビオチン化抗 IFN - 抗体 7-B6-1 (Mabtech) を用いて検出した。HLA - A*0201、HLA - A*0205 又は HLA - C*0701 を発現する HEK293 細胞を、ペプチドで、37 °C で 2 時間パルスした。以下のペプチド: MART-1: AAGIGILT V (配列番号 54)、突然変異 KIF2C: RLFPGLTIKI (配列番号 55)、突然変異 POLA2: TRSSGSHFVF (配列番号 56) を使用した。T 細胞を、標的細胞又は 50 ng/ml PMA 及び 1 µM イオノマイシンを含有する培地 (PMA/I) と一晩共培養した。10⁵ T 細胞あたりのスポット数を算出した。

【0163】

実施例 8

本実施例は、TIL2359 が、ミニ遺伝子ライブラリースクリーニングによって評価される通り、突然変異抗原を認識することを実例で示す。

【0164】

TIL2359 の反応性を、腫瘍 DNA 及び正常 DNA のエクソーム解析によって同定された非同義突然変異に基づき作製した TMG コンストラクトを用いて評価した。各 TMG コンストラクトは、正常遺伝子産物中に存在する更なる 12 コドンがいずれの側にも隣

10

20

30

40

50

接する突然変異コドンに対応する、個別のミニ遺伝子断片を、最大6つコードした。1例を図5Aに示す。

【0165】

Me12359から同定された非同義点突然変異を含有するエクソームDNA配列に基づいた71ミニ遺伝子をコードする、タンデムの12ミニ遺伝子群の個々の1つを、別々に、COS-7細胞に一過的にトランスフェクションした。これらのCOS-7細胞に、このTILによる自己腫瘍細胞認識用に用いられる支配的なHLA拘束性要素である、HLA-A*0205もトランスフェクションした。これらのトランスフェクタントとTIL2359との共培養により、TMGの12コンストラクトのうちの1つ、RJ-1の認識がもたらされた(図5B)。図5Aに示す通り、RJ-1は、EPHB2、KIF2C、SLC44A5、ABCA4、DENND4B、及びEPRS遺伝子の突然変異断片をコードしていた。続いて、RJ-1変異体の6コンストラクト(各々が、6ミニ遺伝子のうちの1つにおいて、存在する突然変異残基の代わりに、WTをコードする)を作製した(図5C)。TIL2359は、HLA-A*0205と、個別にトランスフェクションされたRJ-1の6変異体のうちの5つとを共トランスフェクションしたCOS-7細胞を認識したが、WT KIF2C配列をコードする変異体では認識できなかった。このことは、このミニ遺伝子が、TIL2359が認識した突然変異エピトープをコードすることを示した(図5C)。この観察を更に検証するために、COS-7細胞に、HLA-A*0101、HLA-A*0201又はHLA-A*0205のcDNAのいずれかとともに、Me12359から増幅されたWT又は突然変異全長KIF2C cDNA転写産物のいずれかを共トランスフェクションした。共培養実験により、TIL2359 T細胞は、突然変異KIF2C遺伝子産物と共トランスフェクションしたCOS-7細胞を、HLA-A*0205拘束性様態で認識するが、WT KIF2C遺伝子産物とはそうしないことを示した(図5D)。

【0166】

突然変異KIF2Cコード領域は、天然のKIF2Cタンパク質中の16位のアラニンの、トレオニンへの置換をもたらす、ヌクレオチド46での、CからAへのシングルトランスバージョンを含有していた。エクソーム配列決定の結果により、Me12359由来のDNAは、46位で、もっぱら突然変異残基に合致するが、正常な残基にはしないことが示され、Me12359 DNAの直接的サンガー配列決定により、結果を確認した。このことにより、この遺伝子座でのヘテロ接合性の喪失が示された。TIL2359によって認識される突然変異KIF2Cエピトープを同定するための試みにおいて、高親和性でHLA-A*0205に結合すると予測された、KIF2C突然変異を包含するペプチドを合成し(Hoof et al., Immunogenetics, 61:1-13 (2009))、HLA-A*0205を安定して発現するHEK293細胞にパルスした(表21)。残基10~19に対応するデカマーでパルスしたHEK293-A*0205細胞は、TIL2359 T細胞から多量のIFN- γ の放出を促進し、該ペプチドは、最低濃度0.1 nMで認識された。対照的に、対応するWTペプチドは、10 μ Mで、有意なIFN- γ 放出を誘導しなかった(図5E)。

【0167】

【表 30】

表 21

アミノ酸位置	突然変異ペプチド	予想 HLA-A*0205 結合活性(nM)	共培養結果 [IFN- γ (pg/mL)]
10-19	RLFPGLTIKI (配列番号 59)	55.21	10690
10-17	RLFPGLTI (配列番号 60)	132.35	121.5
15-25	LTIKIQRSNGL (配列番号 61)	251.33	31.5
7-17	LQARLFPGLTI (配列番号 62)	293.83	27
7-16	LQARLFPGLT (配列番号 63)	1549.33	24

10

【0168】

実施例 9

本実施例は、TIL2591が、ミニ遺伝子ライブラリースクリーニングにより同定された突然変異抗原を認識することを実例で示す。

20

【0169】

TIL2591によって認識される突然変異T細胞抗原は、Me12591から同定された非同義点突然変異を含有するエクソームDNA配列に基づいて、217ミニ遺伝子をコードする37個のTMGコンストラクトを合成することによって同定した。TIL2591は、複数のHLA拘束性エレメントとの関係で自己腫瘍細胞を認識した。従って、Me12591から単離したMHCクラスI HLA6分子のそれぞれを安定して発現するHEK293細胞株に、37のTMGコンストラクトを個別に、一過的にトランスフェクションし、続いてTIL2591との一晩の共培養を行った。初期の結果により、TIL2591が、ミニ遺伝子DW-6を一過的にトランスフェクションしたHLA-C*0701*HEK293細胞(HEK293-C*0701)(HLA-C*0701*HEK293 cells(HEK293-C*0701) cells)を認識するが、他のミニ遺伝子コンストラクトには有意に反応しないことが示された(図6A)。次いで、DW-6タンデムコンストラクト(図6B)における個々の突然変異6ミニ遺伝子のそれぞれを、別々にWT配列に復帰させた(図6C)。WT変異体に対する応答の評価により、TIL2591が、DW-6変異体の各々(WT POLA2断片をコードするコンストラクトを除く)をトランスフェクションしたCOS-7細胞を認識することが示された(図6C)。これらの知見を検証するために、COS-7細胞に、HLA-C*0401、HLA-C*0701又はHLA-C*0702 cDNAと共に、WT又は突然変異の全長POLA2 cDNAコンストラクトのいずれかをトランスフェクションした。TIL2591 T細胞は、HLA-C*0701と突然変異POLA2コンストラクトをトランスフェクションした標的細胞のみを認識し、対応するWT転写産物ではなかった(図6D)。POLA2コード領域のヌクレオチド1258における、CからTへのシングルの変化により、WT POLA2タンパク質の420位での、フェニルアラニンのロイシンへの置換がもたらされた。サンガー配列決定により、ゲノムDNA及びMe12591 RNAに由来するcDNAの両方が、1258位にWT及び突然変異ヌクレオチドの両方を含有する一方、患者2591のPBMCから単離したゲノムDNAは、WT配列に対応することが示された、このことにより、これが、Me12591細胞におけるヘテロ接合性体細胞突然変異を表すことが示された。

30

40

【0170】

次いで、HLA-C*0701結合アルゴリズムを用いて、420位の突然変異ロイシ

50

ン残基とオーバーラップするPOLA2ペプチドの候補を同定した(表22)。共培養の結果により、突然変異POLA2の残基413～422に対応するデカマーでパルスしたHLA-C*0701+HEK293細胞が、最低濃度10nMで、TIL2591T細胞からのIFN- γ の放出を刺激することが示された。対照的に、対応するWTペプチドでは、高濃度10 μ Mで、有意なIFN- γ 放出が誘導されなかった(図6E)。

【0171】

【表31】

表22

アミノ酸位置	突然変異ペプチド	予想 HLA-C*0701 結合親和性(nM)	共培養結果 [IFN- γ (pg/mL)]
413-422	TRSSGSHFVF (配列番号 68)	147.35	1106
413-423	TRSSGSHFVFV (配列番号 69)	280.38	50
413-421	TRSSGSHFV 配列番号 70)	285.90	60
413-420	TRSSGSHF (配列番号 71)	518.82	48
420-429	FVFVPSLRDV (配列番号 72)	599.44	39

【0172】

次いで、TIL2359及び2591における、突然変異したKIF2C及びPOLA2をそれぞれ認識するT細胞の割合を、IFN- γ 酵素結合免疫吸着スポット(ELISPOT)アッセイを用いて推定した。TIL2359は、自己黒色腫に应答して観察されたのと同様、突然変異KIF2CエピトープでパルスしたHLA-A*0205+細胞に应答して、100,000T細胞あたり約2,000スポットを生成した(表23)。TIL2591は、HLA-A2拘束性MART-1エピトープに应答して7000超のスポットを生成したが、HLA-C*0701拘束性突然変異POLA2エピトープに対して反応したT細胞はほんのわずかであった(表23)。

【0173】

【表32】

表23

	TIL 2359 1 x 10⁵ 細胞当たりのスポット
Mel 2359	1698
293-A*0205	189
293-A*0205 + KIF2Cmut	2057
	TIL 2591 1 x 10⁵ 細胞当たりのスポット
Mel 2591	11344
293-A*02	999
293-A*02 + MART-1	7404
293-C*0701	906
293-C*0701 + POLA2 mut	1280

【0174】

実施例 10

本実施例は、ミニ遺伝子ライブラリースクリーニングにより同定した、消化管（GI）がんが存在する突然変異抗原に対して反応性のT細胞を同定する方法を実例で示す。

【0175】

GIがん患者からの転移性病変について、全エクソーム配列決定を行って突然変異を同定した。次に、各突然変異をコードするミニ遺伝子コンストラクトを作製し、自己APCにトランスフェクションして、腫瘍に発現するすべての突然変異のプロセッシング及び提示を可能にした。次いで、これらのAPCと腫瘍浸潤リンパ球（TIL）とを共培養し、突然変異に対するT細胞反応性を、IFN-ELISPOT及びフローサイトメトリーに基づく、4-1BB及びOX40上方制御によって測定した。

10

【0176】

1結腸がん患者において、119の突然変異を、突然変異反応性について評価した。全てではないが、いくつかのTIL培養物が、割合が非常にばらついた、CASP8（67FV）での突然変異を特異的に認識するCD8+T細胞を含有することが見出された。*in vitro*で更に増幅する際には、培養物中の他の細胞が、これらの突然変異反応性CD8+T細胞よりも、著しく増殖した。約0.31%（約1億2700万）の突然変異反応性細胞を含有すると推定された 40.3×10^9 TILの、患者への投与によって、細胞の投与後約6週間の、最初の追跡において、臨床反応がもたらされなかった。患者は約6週間後に死亡した。特定の理論又はメカニズムに縛られることはないが、治療前に、疾患が非常に後期の段階であること、患者の全体的な状態が不良であること、及び患者の、養子細胞療法に先立って施されるリンパ球枯渇化学療法への耐性が不良なことのいずれか1以上が、患者の死因に寄与した可能性があると考えられる。突然変異したCASP8に対して反応性のTCRをTILから単離し、該TCRを発現するよう形質導入したT細胞は、突然変異CASP8でパルスしたDCに対して反応性であった。

20

【0177】

別の直腸がん患者においては、突然変異反応性について、155の突然変異を評価した。少なくとも3通りの、異なる突然変異反応性が見出され、2通りが、CD8+T細胞応答、1通りがCD4+応答を含んでいた。患者への、突然変異反応性TILの投与により、最初は、治療後約1.5ヶ月で混合応答が生じたが、その後、治療後約3.5ヶ月で、患者は進行性疾患を発症した。CD4+TIL及びCD8+TILから、突然変異反応性TCRの候補を単離した。

30

【0178】

第3の患者（胆管がん）においては、試験した38の突然変異に対して、反応性のT細胞は検出されなかった。この患者については、「突然変異コール」の閾値が低下したので、更に125の推定突然変異（an additional 125 putative mutations）が評価される。「突然変異コール」は、配列が、生物情報学を用いて突然変異として同定される、任意に設定された閾値である。この場合、第1パスとしては、閾値は比較的高かった（例えば、同定された突然変異が真の突然変異であるという、高水準の信頼性を提供した）。次いで、閾値が低下し、同定された突然変異が真の突然変異であるという信頼性の水準は低くなったが、同定された突然変異が真の突然変異である可能性は残った。

40

【0179】

これらのデータにより、転移性消化管がんにおける体細胞突然変異に対してT細胞応答を開始するヒト免疫系の能力は、珍しいイベントではない可能性があることが示される。この研究は進行中である。

【0180】

刊行物、特許出願及び特許を含む、本明細書中に引用した全ての参考文献は、それぞれの参考文献が参照によって組み込まれることが個々に且つ具体的に示されているのと同程度及びその全体が本明細書中に記載されているのと同程度まで、参照によって本明細書中に組み込まれる。

50

【 0 1 8 1 】

本発明の説明に関して（特に、以下の特許請求の範囲に関して）、用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1の」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中に特記しないか文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方をカバーすると解釈すべきである。1以上の事項の列挙の後での用語「少なくとも1の」の使用（例えば、「A及びBのうち少なくとも1の」）は、本明細書中に特記しない又は文脈と明らかに矛盾しない限り、列挙した事項（A若しくはB）から選択された1の事項又は列挙した事項（A及びB）のうち2以上の任意の組み合わせを意味すると解釈されるべきである。用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」及び「含有する（containing）」は、特記しない限り、オープンエンドの用語（即ち、「～を含むがそれらに限定されない」を意味する）と解釈すべきである。本明細書中の値の範囲の記述は、本明細書中に特記しない限り、その範囲内に入る各個別の値に個々に言及する省略方法として働くことのみを意図しており、各個別の値は、それが本明細書中に個々に記述されているかのように本明細書中に組み込まれる。本明細書中に記載される全ての方法は、本明細書中に特記しない又は文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施できる。本明細書中に提供される任意の及び全ての例又は例示的語句（例、「等（such as）」）の使用は、本発明をよりよく説明することのみを意図しており、特段特許請求されない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中の全ての語句は、特許請求されていない任意の要素を本発明の実施に必須のものとして示していると解釈すべきではない。

10

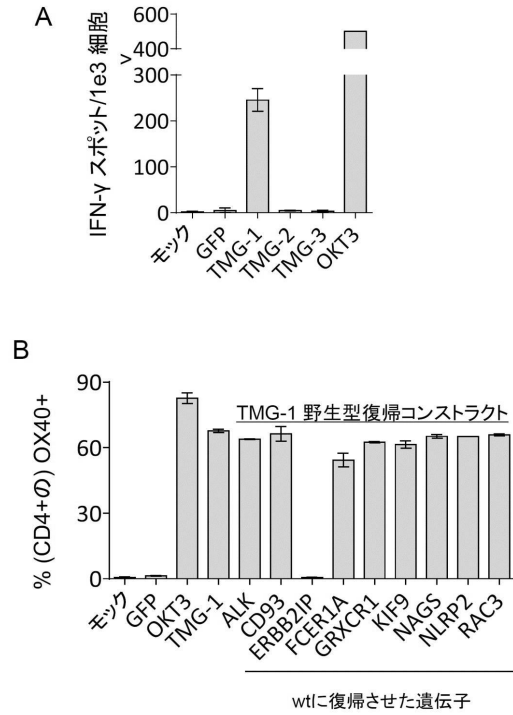
20

【 0 1 8 2 】

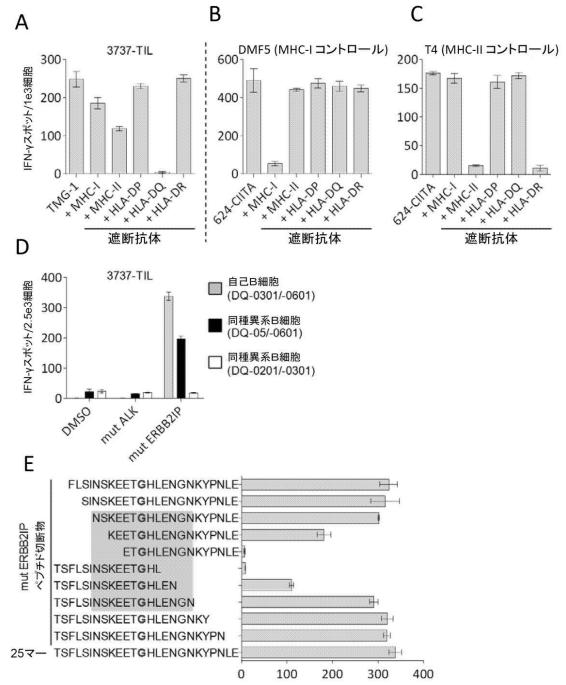
発明を実施するための、発明者が知る最良の形態を含む、本発明の好ましい実施形態が本明細書中に記載されている。これらの好ましい実施形態のバリエーションは、上述の説明を読めば当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者がかかるバリエーションを適宜使用することを予期しており、本発明者らは、本明細書中に具体的に記載されたのとは異なる方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明は、適用法によって許容されるとおり、本明細書中に添付した特許請求の範囲に記載される対象の全ての改変及び均等物を含む。更に、その全ての可能なバリエーションでの上記要素の任意の組合せが、本明細書中に特記しない限り又は文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。

30

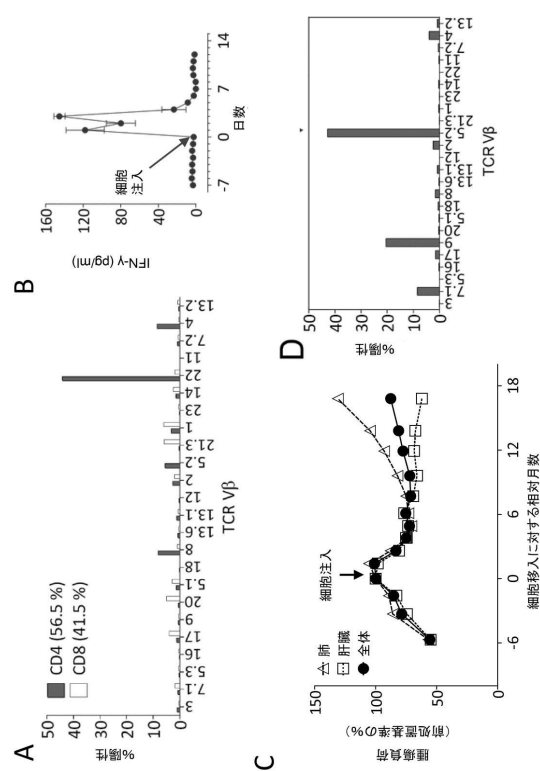
【図 1】



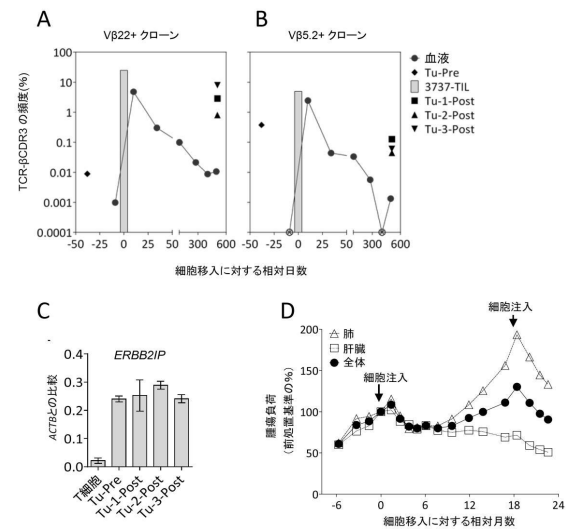
【図 2】



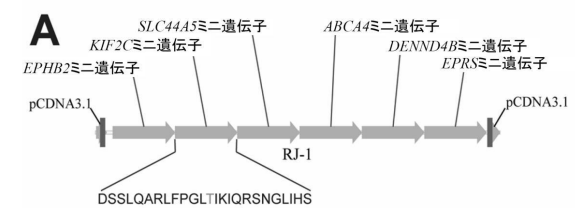
【図 3】



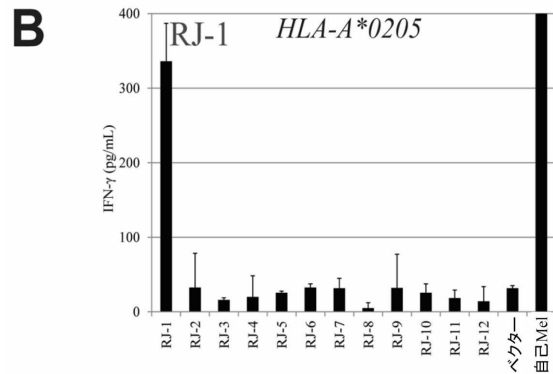
【図 4】



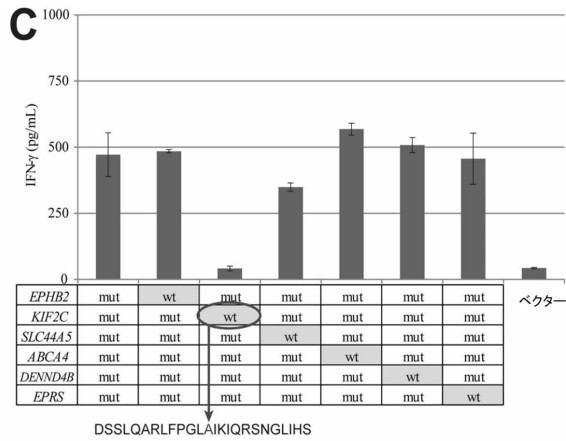
【図 5 A】



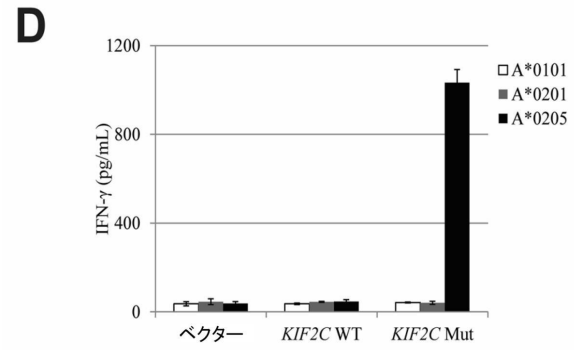
【図 5 B】



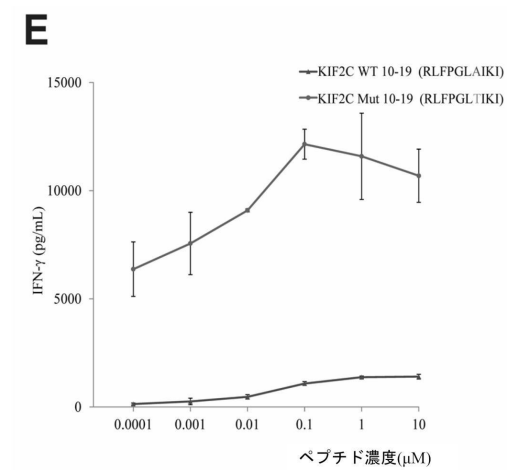
【図 5 C】



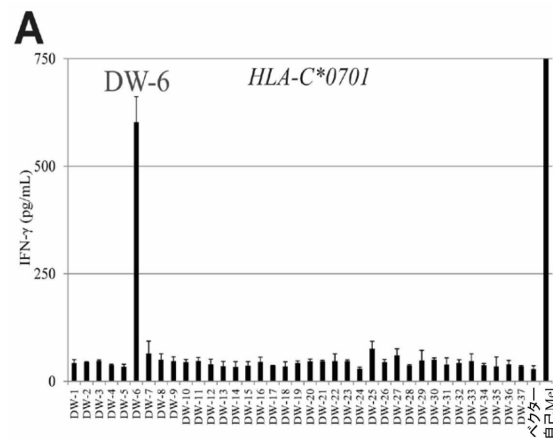
【図 5 D】



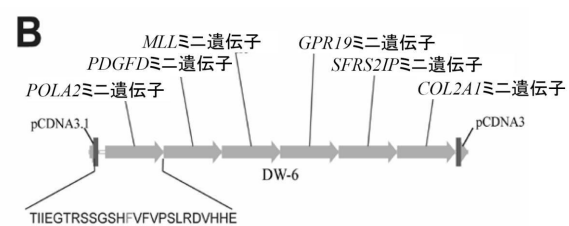
【図 5 E】



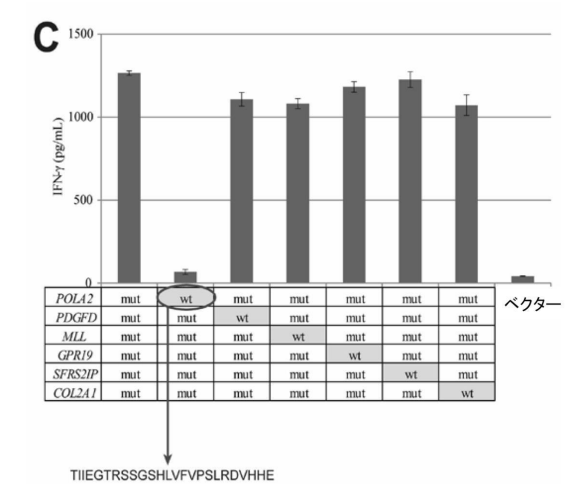
【図 6 A】



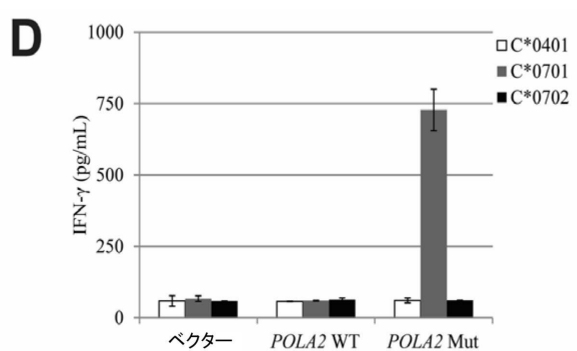
【図 6 B】



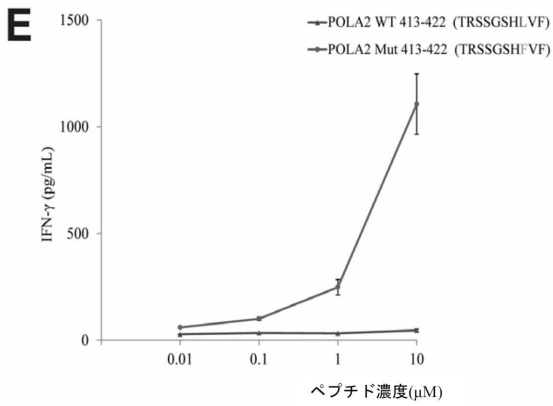
【図 6 C】



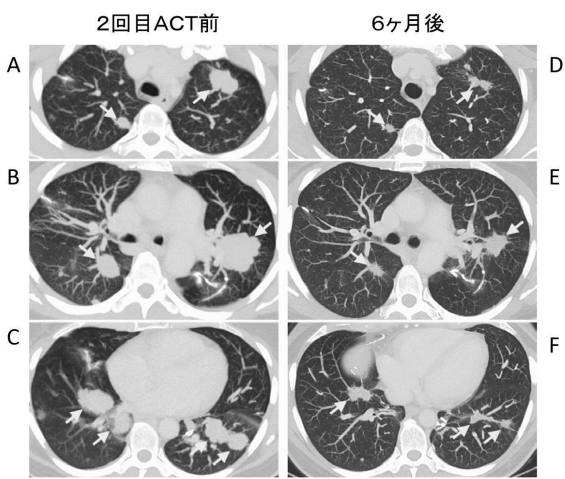
【図 6 D】



【図 6 E】



【図 7】



【配列表】

0006686008000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 35/17	(2015.01)	A 6 1 K 35/17	A
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 N 5/0783	(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	

特許法第30条第2項適用 2014年(平成26年)5月8日 <http://www.nytimes.com/2014/05/09/health/doctors-use-patients-immune-cells-to-shrink-cancer-tumors.html> を通じて発表

特許法第30条第2項適用 2014年(平成26年)5月8日 <https://www.wsj.com/articles/patients-immune-system-harnessed-to-attack-cancer-1399579965?KEYWORDS=Patient%27s%20Cells%20Battle%20Tumors&mg=reno64-wsj&tesla=y> を通じて発表

特許法第30条第2項適用 2014年(平成26年)5月8日 <http://www.cancer.gov/newscenter/newsfromnci/2014/ACTepithelial> を通じて発表

特許法第30条第2項適用 2014年(平成26年)5月8日 <http://www.nbcnews.com/health/cancer/new-immune-therapy-approach-tackles-womans-rare-cancer-n100811> を通じて発表

特許法第30条第2項適用 2014年(平成26年)5月9日 Science(2014)Vol.344, pp.641-645 <<http://science.sciencemag.org/content/344/6184/641.full>> を通じて発表

特許法第30条第2項適用 2014年(平成26年)7月1日 Clinical Cancer Research(2014)Vol.20, pp.3401-3410 <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/20/13/3401.full> <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/20/13/3401.full-text.pdf>> を通じて発表

特許法第30条第2項適用 2014年(平成26年)7月19日 Oncotarget(2014)Vol.5, No.13, pp.4579-4580 <<http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=2234>> を通じて発表

(74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 トラン、エリック
アメリカ合衆国、メリーランド州 20852、ノース ベセスダ、マグラス ブールヴァード 5411、アパートメント 1212

(72)発明者 ル、ヨング・チェン
アメリカ合衆国、メリーランド州 20852、ロックヴィル、イースト ジェファークソン ストリート 1649、アパートメント 202

(72)発明者 ロビンズ、ポール エフ.

アメリカ合衆国、メリーランド州 20815、チェヴィー チェース、グレンデール ロード
7907
(72)発明者 ロゼンバーグ、ステーション エー .
アメリカ合衆国、メリーランド州 20854 ポトマック、アイアン ゲート ロード 101
04

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 国際公開第2014/043441(WO, A1)
特開2012-213402(JP, A)
国際公開第2014/133567(WO, A1)
国際公開第2013/039889(WO, A1)
国際公開第2014/133568(WO, A1)
特表2013-507986(JP, A)
特開2014-023445(JP, A)
The Journal of Immunology (2013) Vol.190, pp.6034-6042
Nature Reviews Immunology (2012) Vol.12, pp.269-281
ROBBINS P., Use of high throughput sequencing methods to identify cancer immunotherapy
targets, 日本免疫学会総会・学術集会記録 (2013) Vol.42, p.12, S7-2
Journal of Virology (1997) Vol.71, No.3, pp.2292-2302
Nature Medicine (2013) Vol.19, No.6, pp.747-752
Nature Medicine (2013) Vol.19, No.11, pp.1542-1546, Supplementary Figures and Tables

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

PubMed