

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-532386

(P2018-532386A)

(43) 公表日 平成30年11月8日(2018.11.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z N A Z	4 B 0 6 3
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C O 7 K 14/725 (2006.01)	C O 7 K 14/725	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867 Z	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-512122 (P2018-512122)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月8日 (2016.9.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年4月26日 (2018.4.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/050826
 (87) 国際公開番号 W02017/044661
 (87) 国際公開日 平成29年3月16日 (2017.3.16)
 (31) 優先権主張番号 62/377,276
 (32) 優先日 平成28年8月19日 (2016.8.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/216,099
 (32) 優先日 平成27年9月9日 (2015.9.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514247791
 イミューン デザイン コーポレーション
 アメリカ合衆国 ワシントン 98102
 , シアトル, イーストレイク アベニ
 ュー イー. 1616, 스위트 3
 10
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100123582
 弁理士 三橋 真二
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100141977
 弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NY-ESO-1 特異的 TCR およびそれらの使用方法

(57) 【要約】

本開示は、NY-ESO-1 特異的 TCR アミノ酸配列およびそれらの使用方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a . TCRベータ鎖可変領域、TCRベータ鎖定常領域、ならびに任意に膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含む第1ポリペプチドと；

b . TCRアルファ鎖可変領域、TCRアルファ鎖定常領域、ならびに任意に膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含む第2ポリペプチドと；

を含む、キメラヘテロ二量体T細胞受容体（TCR）ポリペプチドであって、

前記ヘテロ二量体TCRはNY-ESO-1/MHC複合体に特異的に結合し、前記TCRベータ鎖可変領域は配列番号：9に記載のTCRベータ鎖可変領域アミノ酸配列を含み；

前記TCRアルファ鎖可変領域は配列番号：8に記載の同種TCRアルファ鎖可変領域アミノ酸配列を含み；

第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとの間に少なくとも1つのジスルフィド結合が存在する、キメラヘテロ二量体TCR。

【請求項 2】

前記TCRベータ鎖可変領域CDR3が、アミノ酸配列CASRLAGQETQYF（配列番号：4）を含む、請求項 1 に記載のキメラヘテロ二量体TCR。

【請求項 3】

可溶性であり、

第1ポリペプチドおよび第2ポリペプチドが、前記膜貫通ドメインおよび前記細胞質シグナル伝達ドメインを含まない、請求項 1 に記載のキメラヘテロ二量体TCR。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のキメラヘテロ二量体TCRをコードするポリヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 6】

レトロウイルスベクターである、請求項 5 に記載の発現ベクター。

【請求項 7】

レンチウイルスベクターである、請求項 5 に記載の発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 4 に記載の核酸または請求項 5 に記載のベクターを含む、単離細胞。

【請求項 9】

T細胞である、請求項 8 に記載の単離細胞。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のキメラヘテロ二量体TCR、請求項 5 に記載のベクター、請求項 4 に記載の核酸または請求項 9 に記載の単離細胞を含む、医薬組成物。

【請求項 11】

TCRベータ鎖可変領域、TCRアルファ鎖可変領域、定常領域ならびに任意に膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含む一本鎖TCRであって、

前記TCRベータ鎖可変領域CDR3は、CASSLNRDYGTYF（配列番号：2）、CASSLNRDQPQHF（配列番号：3）およびCASRLAGQETQYF（配列番号：4）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、

NY-ESO-1/MHC複合体に特異的である、一本鎖TCR。

【請求項 12】

前記TCRベータ鎖可変領域が配列番号：9に記載のTCRベータ鎖可変領域アミノ酸配列を含み、

前記TCRアルファ鎖可変領域が配列番号：8に記載の同種TCRアルファ鎖可変領域アミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の一本鎖TCR。

【請求項 13】

可溶性であり、

10

20

30

40

50

前記膜貫通ドメインおよび前記細胞質シグナル伝達ドメインを含まない、請求項 1 1 に記載の一本鎖TCR。

【請求項 1 4】

請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の一本鎖TCRをコードするポリヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 1 6】

レトロウイルスベクターである、請求項 1 5 に記載の発現ベクター。

【請求項 1 7】

レンチウイルスベクターである、請求項 1 5 に記載の発現ベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 4 に記載の核酸または請求項 1 6 に記載のベクターを含む、単離細胞。

【請求項 1 9】

T細胞である、請求項 1 8 に記載の単離細胞。

【請求項 2 0】

請求項 1 1 に記載の一本鎖TCR、請求項 1 5 に記載のベクター、請求項 1 4 に記載の核酸または請求項 1 9 に記載の単離細胞を含む、医薬組成物。

【請求項 2 1】

哺乳動物被験体のNY-ESO-1がんの治療方法であって、前記被験体に治療用組成物を投与することを含み、前記組成物が請求項 9 に記載の単離細胞および請求項 1 9 に記載の単離細胞から選択される1つ以上の治療剤を含み；前記治療用組成物が、前記被験体の前記がんを治療するのに有効な量で投与される、方法。

【請求項 2 2】

NY-ESO-1を哺乳動物被験体で発現するがん細胞の増殖の阻害方法であって、前記被験体に請求項 9 に記載の単離細胞または請求項 1 9 に記載の単離細胞から選択される治療を施すことを含み；前記治療用組成物が、前記被験体でNY-ESO-1を発現する前記がん細胞の増殖を阻害するのに有効な量で投与される、方法。

【請求項 2 3】

(a) NY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高い哺乳動物被験体を同定する工程であって、前記哺乳動物被験体からの試料中における以下：

(i) NY-ESO-1に特異的なTCRペータ鎖可変領域相補性決定領域3 (V CDR3) を含むTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記V CDR3がCASSLNDRDXXXXF (配列番号：1)；もしくはCASRLAQGETQYF (配列番号：4) のアミノ酸配列；もしくは両方を含む、ポリヌクレオチド；または

(ii) NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含むTCRポリペプチドであって、前記V CDR3がCASSLNDRDXXXXF (配列番号：1)；もしくはCASRLAQGETQYF (配列番号：4) のアミノ酸配列、もしくは両方を含む、TCRポリペプチド、

の有無を決定することを含む工程であって、

(i) および/または(ii)の存在は、前記被験体が前記NY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高いことを示す、工程と、

(b) 前記NY-ESO-1がん治療を前記哺乳動物被験体に施す工程と、を含む、がんの治療方法。

【請求項 2 4】

前記V CDR3が、CASSLNDRDYGTYF (配列番号：2)、CASSLNDRDQPQHF (配列番号：3) およびCASRLAQGETQYF (配列番号：4) からなる群より選択されるアミノ酸配列か、または前述の1つ以上の任意の組み合わせを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記NY-ESO-1がん治療が、NY-ESO-1ポリペプチドをコードするベクターを投与することを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

前記ベクターが、レトロウイルスベクターを標的とする樹状細胞を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

アジュバントを前記被験体に投与することをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記アジュバントが、グルコピラノシル脂質A (GLA) である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

GLAが安定な水中油型エマルジョン中に製剤化される、請求項 28 に記載の方法。

10

【請求項 30】

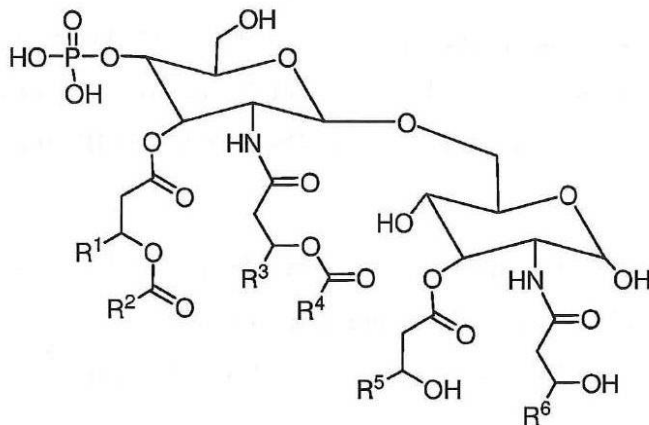
前記ベクターがレンチウイルスベクターである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 31】

前記NY-ESO-1がん治療が、前記被験体にGLAを含む組成物を投与することを含み、前記組成物が以下を含む、請求項 23 に記載の方法：

(a) 以下の式のGLA：

【化 1】



20

30

式中：

R^1 、 R^3 、 R^5 および R^6 は $C_{11} \sim C_{20}$ アルキルであり；

R^2 および R^4 は $C_{12} \sim C_{20}$ アルキルであり；

(b) 薬学的に許容される担体または賦形剤；

ここで、前記組成物は抗原を含まない。

【請求項 32】

R^1 、 R^3 、 R^5 および R^6 がウンデシルであり、 R^2 および R^4 がトリデシルである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 31 に記載の方法。

40

【請求項 34】

前記組成物が水性製剤である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 35】

前記組成物が、水中油型エマルジョン、油中水型エマルジョン、リポソーム、ミセル製剤、または微粒子の形態である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 36】

前記がんが固形腫瘍を含む、請求項 21 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記がんが、肉腫、前立腺がん、子宮がん、甲状腺がん、精巣がん、腎臓がん、膵臓が

50

ん、卵巣がん、食道がん、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、メラノーマ、肝細胞がん、頭頸部がん、胃がん、子宮内膜がん、大腸がん、胆管がん、乳がん、膀胱がん、骨髄性白血病および急性リンパ芽球性白血病からなる群より選択される、請求項 2 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記組成物が、皮下、皮内、筋肉内、腫瘍内、または静脈内注射によって投与される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記組成物が、1つ以上の追加の治療剤または治療と併せて投与される、請求項 2 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 4 0】

前記治療剤が免疫チェックポイント阻害剤である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記治療剤が、共刺激経路を活性化する抗体である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記抗体が抗CD40抗体である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記治療剤ががん治療剤である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記がん治療剤が、タキソテル、カルボプラチン、トラスツズマブ、エピルピシン、シクロホスファミド、シスプラチン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エトポシド、5-FU、ゲムシタピン、メトトレキサート、およびパクリタキセル、ミトキサントロン、エポチロンB、表皮成長因子受容体 (EGFR) 標的化モノクローナル抗体7A7.27、ポリノスタット、ロミデプシン、ドコサヘキサエン酸、ボルテゾミブ、シコニンならびに腫瘍溶解性ウイルスからなる群より選択される、請求項 4 3 に記載の方法。

20

【請求項 4 5】

1つ以上の追加の前記治療が放射線治療である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 6】

(a) 前記哺乳動物被験体からの試料中における以下：

(i) NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含むTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、該V CDR3がCASSLNRDXXXXF (配列番号：1) もしくはCASRLAGQETQYF (配列番号：4) のアミノ酸配列；もしくは両方を含む、ポリヌクレオチド；または

30

(ii) NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含むTCRポリペプチドであって、該V CDR3がCASSLNRDXXXXF (配列番号：1) もしくはCASRLAGQETQYF (配列番号：4) のアミノ酸配列；もしくは両方を含む、TCRポリペプチド、

の有無を決定することを含む工程であって、

(i) および/または(ii)の存在は、前記被験体が前記NY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高いことを示す工程を含む、NY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高い哺乳動物被験体を同定する方法。

【請求項 4 7】

40

前記V CDR3が、CASSLNRDYGTYF (配列番号：2)、CASSLNRDQPQHF (配列番号：3) およびCASRLAGQETQYF (配列番号：4) からなる群より選択されるアミノ酸配列か、または前述の1つ以上の任意の組み合わせを含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

MHC複合体と関連して細胞または組織上に提示されたNY-ESO-1ペプチド抗原を含む前記細胞または組織を検出する方法であって、

a) 前記細胞または組織を、請求項 3 または請求項 1 3 の少なくとも1つの可溶性TCR分子またはその機能的フラグメントと、提示された前記NY-ESO-1ペプチド抗原と前記可溶性TCRまたはフラグメントとの間に特異的結合複合体を形成する条件下で接触させる工程と

50

;

b) 提示された前記ペプチド抗原に結合していない任意の可溶性TCR分子またはフラグメントを除去するのに適切な条件下で前記細胞または組織を洗浄する工程と；

c) 前記特異的結合複合体を、提示された前記ペプチド抗原を含む細胞または組織を示すものとして検出する工程と、を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

がん患者を治療する1つのアプローチは、T細胞を遺伝的に組み換え、養子細胞療法（ACT）のためのキメラ抗原受容体（CAR）または組み換えT細胞受容体（rTCR）の発現によって、腫瘍細胞上に発現される抗原を標的化することである。CARは、ヒト白血球抗原非依存的様式で細胞表面抗原を認識するように設計された抗原受容体である。CARを発現する遺伝子組み換え細胞を使用して特定のタイプのがんを治療する試みは、特にCD19発現液性腫瘍において顕著な成功を収めている。例えば、非特許文献1；非特許文献2を参照。同様に、がん精巢抗原NY-ESO-1に由来するMHC拘束性ペプチドに特異的な組み換えT細胞受容体を発現するように改変された自己T細胞は、近年、多発性骨髄腫および肉腫において優れた臨床効果を示した。例えば、非特許文献3；非特許文献4を参照。

10

【0002】

しかしながら、特にin vitroで増強された親和性を有するrTCRの場合には、行き詰まり、すなわち毒性に直面した（非特許文献5を参照）。したがって、上記の試みにもかかわらず、T細胞を腫瘍または他の目的標的に向け直すためのより効果的で安全な方法が引き続き必要とされている。

20

【0003】

ヒトHLAトランスジェニックマウスの免疫化および患者の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）からのTCRの単離を含む、養子細胞療法用のT細胞受容体の選択のために、いくつかの方法が現在使用されている（例えば、非特許文献6；非特許文献7を参照）。しかしながら、これらの方法は全て、所与のHLAの状況においてのみ機能するTCRを同定する潜在的な欠点を有し、特定の患者集団に対するその有用性を制限する。

【0004】

TCRは、シグナル伝達の仲介に關与するCD3複合体の不変タンパク質に關連する免疫グロブリンスーパーファミリーのヘテロ二量体細胞表面タンパク質である。TCRは α 型および β 型で存在し、構造的には類似しているが、それらを発現するT細胞は全く異なる解剖学的位置および機能を有する。受容体の細胞外部位は、2つの膜近位定常領域、および抗体の相補性決定領域（CDR）に類似した3つの多型ループを有する2つの膜遠位可変領域からなる。TCR分子の結合部位を形成し、ペプチド特異性を決定するのは、これらのループである。特に、CDR1およびCDR2はMHC分子と大抵は相互作用するが、CDR3はMHCによって提示されるペプチドリガンドと特異的に相互作用する（非特許文献8；非特許文献9）。潜在的なTCR多様性の数学的見積もりは $10^{12} \sim 10^{15}$ の異なるTCRの範囲にあるが、自己耐性を促進する上で、胸腺陽性および陰性選択は、個体のナイーブTCRレパートリーの規模を、各ヒトについて約 2×10^7 TCRにまで減少させる（非特許文献10；非特許文献11）。TCRアルファ鎖およびベータ鎖のCDR3領域は、MHC提示ペプチドとの相互作用に特異性を与えるため、CDR3配列変異の特性評価は、抗原選択T細胞レパートリーにおけるT細胞多様性の尺度を提供する（非特許文献12；非特許文献13）。興味深いことに、TCRレパートリーには偏りがあり、多くの場合、同一およびほぼ同一のTCRレパートリー、いわゆる「共有TCR」を、異なる個体にわたって観察することができる（非特許文献14）。これらの共有TCR配列のいくつかの特定の分子的特徴が仮定されている（非特許文献15）。MHCクラスIおよびクラスIIリガンドは、免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質でもあるが、抗原提示に特化しており、APC細胞表面に多種多様な短いペプチドフラグメントを提示することを可能にする多型ペプチド結合部位を有する。

30

40

【0005】

多くの論文は、それぞれのサブユニットを接続する天然のジスルフィド架橋を含むrTCR

50

ヘテロ二量体の産生を記載している（非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18；非特許文献19；非特許文献20；特許文献1）。しかしながら、そのようなTCRは、TCR特異的抗体によって認識され得るが、その天然リガンドを比較的高い濃度以外で認識することを示すものはなかった、および/または安定したものはなかった。

【0006】

特許文献2には、その天然のリガンドを認識することができ、ある期間にわたって安定であり、合理的な量で産生できるように正確に折り畳まれた可溶性TCRが記載されている。このTCRは、ロイシンジッパーなどの一対のC末端二量体化ペプチドによって、それぞれTCR または 鎖細胞外ドメインに二量体化されたTCRアルファ鎖またはガンマ鎖細胞外ドメインを含む。rTCRを生成するこの戦略は、一般に全てのTCRに適用可能である。

10

【0007】

NY-ESO-1での免疫化は、抗体およびCD8+CTL応答の両方を誘導するために使用されてきたが、がんの進行に対する効果はこれらの研究においてほとんど見られなかった（非特許文献21）。高い抗腫瘍活性を有するリンパ球の移入である養子免疫療法は、大きな既存の腫瘍の退縮を媒介することができるが、HLA適合反応性リンパ球の生成は困難で高価であり、労働集約的である（非特許文献22；非特許文献23；非特許文献24；非特許文献25；非特許文献26；非特許文献27）。腫瘍浸潤リンパ球は、細胞移植治療に使用されており、様々なメラノーマ腫瘍関連抗原（TAA）を認識すると示されている。メラノーマにおいて最も一般的に認識されるTAAは、メラノサイト分化抗原であるMART-1であり、それはメラノーマの約90%で発現するが、一方でNY-ESO-1はメラノーマの~34%で発現する（非特許文献28）。

20

【0008】

Zhaoら（非特許文献29）は、NY-ESO-1 CT抗原に特異的なTCRの単離、およびレトロウイルスベクターを構築するためのそれらの使用を記載しており、それらは抗NY-ESO-1エフェクター機能を正常初代ヒトT細胞に移入することが示された。共通TAAに対するrTCR遺伝子ベクターは、各患者独自の抗腫瘍T細胞を同定する必要なしに、多数のがん患者を彼ら自身の形質導入T細胞で治療するために使用される可能性を有する。しかしながら、現在、rTCRに基づいてACTを開発するための全てのアプローチはHLA依存性であり、したがって、特定の患者集団に限定される。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許第6,080,840号明細書

【特許文献2】国際公開第99/60120号パンフレット

【特許文献3】米国特許出願公開第20100113300号明細書

【特許文献4】国際公開第03/020763号パンフレット

【特許文献5】国際公開第99/18129号パンフレット

【特許文献6】米国特許第8,119,772号明細書

【特許文献7】米国特許第5,510,474号明細書

【特許文献8】国際公開第98/32869号パンフレット

40

【特許文献9】米国特許第5,168,062号明細書

【特許文献10】米国特許第4,937,190号明細書

【特許文献11】米国特許第6,218,181号明細書

【特許文献12】国際公開第2012/129514号パンフレット

【特許文献13】米国特許第6,352,694号明細書

【特許文献14】米国特許第6,534,055号明細書

【特許文献15】米国特許第6,905,680号明細書

【特許文献16】米国特許第6,692,964号明細書

【特許文献17】米国特許第5,858,358号明細書

【特許文献18】米国特許第6,887,466号明細書

50

- 【特許文献 1 9】米国特許第6,905,681号明細書
- 【特許文献 2 0】米国特許第7,144,575号明細書
- 【特許文献 2 1】米国特許第7,067,318号明細書
- 【特許文献 2 2】米国特許第7,172,869号明細書
- 【特許文献 2 3】米国特許第7,232,566号明細書
- 【特許文献 2 4】米国特許第7,175,843号明細書
- 【特許文献 2 5】米国特許第5,883,223号明細書
- 【特許文献 2 6】米国特許第6,905,874号明細書
- 【特許文献 2 7】米国特許第6,797,514号明細書
- 【特許文献 2 8】米国特許第6,867,041号明細書 10
- 【特許文献 2 9】米国特許出願公開第20060121005号明細書
- 【特許文献 3 0】米国特許出願公開第2003/0170238号明細書
- 【特許文献 3 1】米国特許第4,690,915号明細書
- 【特許文献 3 2】米国特許第9,044,420号明細書
- 【特許文献 3 3】米国特許出願公開第2008/0131466号明細書
- 【特許文献 3 4】米国特許第7,241,275号明細書
- 【特許文献 3 5】米国特許第7,115,108号明細書
- 【特許文献 3 6】米国特許第7,108,679号明細書
- 【特許文献 3 7】米国特許第7,083,599号明細書
- 【特許文献 3 8】米国特許第7,083,592号明細書 20
- 【特許文献 3 9】米国特許第7,047,070号明細書
- 【特許文献 4 0】米国特許第6,971,999号明細書
- 【特許文献 4 1】米国特許第6,808,506号明細書
- 【特許文献 4 2】米国特許第6,780,171号明細書
- 【特許文献 4 3】米国特許第6,776,776号明細書
- 【特許文献 4 4】米国特許第6,689,118号明細書
- 【特許文献 4 5】米国特許第6,670,349号明細書
- 【特許文献 4 6】米国特許第6,569,143号明細書
- 【特許文献 4 7】米国特許第6,494,865号明細書
- 【特許文献 4 8】米国特許第5,997,501号明細書 30
- 【特許文献 4 9】米国特許第5,848,991号明細書
- 【特許文献 5 0】米国特許第5,328,483号明細書
- 【特許文献 5 1】米国特許第5,279,552号明細書
- 【特許文献 5 2】米国特許第4,886,499号明細書
- 【特許文献 5 3】US8273363611
- 【特許文献 5 4】国際公開第2008/153541号パンフレット
- 【特許文献 5 5】国際公開第2009143457号パンフレット
- 【特許文献 5 6】米国特許第8329162号明細書
- 【特許文献 5 7】米国特許第8372390号明細書
- 【特許文献 5 8】米国特許第8273345号明細書 40
- 【特許文献 5 9】米国特許第8187872号明細書
- 【特許文献 6 0】米国特許第8323662号明細書
- 【特許文献 6 1】国際公開第2013/149167号パンフレット
- 【特許文献 6 2】米国特許第8,273,361号明細書
- 【特許文献 6 3】国際公開第2012/141984号パンフレット
- 【特許文献 6 4】米国特許出願公開第20120328655号明細書
- 【非特許文献】
- 【0 0 1 0】
- 【非特許文献 1】Porter David L, Levine Bruce L, Kalos Michael, Bagg Adam, June Carl H: Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. 50

The New England journal of medicine 365(8): 725-33, Aug 2011

【非特許文献 2】Kalos Michael, Levine Bruce L, Porter David L, Katz Sharyn, Group Stephan A, Bagg Adam, June Carl H: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced Leukemia. *Science translational medicine* 3(95): 95ra73, Aug 2011

【非特許文献 3】Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, Badros AZ, Garfall A, Weiss B, Finklestein J, Kulikovskaya I, Sinha SK, Kronsberg S, Gupta M, Bond S, Melchiori L, Brewer JE, Bennett AD, Gerry AB, Pumphrey NJ, Williams D, Tayton-Martin HK, Ribeiro L, Holdich T, Yanovich S, Hardy N, Yared J, Kerr N, Philip S, Westphal S, Siegel DL, Levine BL, Jakobsen BK, Kalos M, June CH. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med.* 2015 Aug;21(8):914-21

【非特許文献 4】Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Dudley ME, Wunderlich JR, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA. Pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res.* 2015 Mar 1;21(5):1019-27

【非特許文献 5】Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV, Rapoport AP, Levine BL, Emery L, Litzky L, Bagg A, Carreno BM, Cimino PJ, Binder-Scholl GK, Smethurst DP, Gerry AB, Pumphrey NJ, Bennett AD, Brewer JE, Dukes J, Harper J, Tayton-Martin HK, Jakobsen BK, Hassan NJ, Kalos M, June CH. Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood.* 2013 Aug 8;122(6):863-71

【非特許文献 6】Linnemann C, Heemskerk B, Kvistborg P, Kluijn RJ, Bolotin DA, Chen X, Bresser K, Nieuwland M, Schotte R, Michels S, Gomez-Eerland R, Jahn L, Hombink P, Legrand N, Shu CJ, Mamedov IZ, Velds A, Blank CU, Haanen JB, Turchaninova MA, Kerkhoven RM, Spits H, Hadrup SR, Heemskerk MH, Blankenstein T, Chudakov DM, Bendle GM, Schumacher TN. High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med.* 2013 Nov;19(11):1534-41

【非特許文献 7】Rosati SF, Parkhurst MR, Hong Y, Zheng Z, Feldman SA, Rao M, Abate-Daga D, Beard RE, Xu H, Black MA, Robbins PF, Schrum DA, Rosenberg SA, Morgan RA. A novel murine T-cell receptor targeting NY-ESO-1. *J Immunother.* 2014 Apr; 37(3):135-46

【非特許文献 8】Shore DA, Issafras H, Landais E, Teyton L, Wilson IA. The crystal structure of CD8 in complex with YTS156.7.7 Fab and interaction with other CD8 antibodies define the binding mode of CD8 alphabeta to MHC class I. *J Mol Biol.* 2008 Dec 31;384(5):1190-202

【非特許文献 9】Borg NA, Ely LK, Beddoe T, Macdonald WA, Reid HH, Clements CS, Purcell AW, Kjer-Nielsen L, Miles JJ, Burrows SR, McCluskey J, Rossjohn J. The CD R3 regions of an immunodominant T cell receptor dictate the 'energetic landscape' of peptide-MHC recognition. *Nat Immunol.* 2005 Feb;6(2):171-80

【非特許文献 10】Davis, M.M. & Chien, Y.H. in *Fundamental Immunology* 341-366, Lippincott-Raven, Philadelphia 1999

【非特許文献 11】Arstila, T.P. et al., A direct estimate of the human T cell receptor diversity. *Science* 1999: 286958-961

【非特許文献 12】Liaskou E, Henriksen EK, Holm K, Kaveh F, Hamm D, Fear J, Vikein MK, Hov JR, Melum E, Robins H, Olweus J, Karlsen TH, Hirschfield GM. High-throughput T-cell receptor sequencing across chronic liver diseases reveals distinct disease-associated repertoires. *Hepatology.* 2015 Aug 7. doi: 10.1002/hep.28116

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 1 3】Fang H, Yamaguchi R, Liu X, Daigo Y, Yew PY, Tanikawa C, Matsu da K, Imoto S, Miyano S, Nakamura Y. Quantitative T cell repertoire analysis by deep cDNA sequencing of T cell receptor and chains using next-generation sequencing. *Oncoimmunology*. 2015 Jan 7;3(12):e968467
- 【非特許文献 1 4】Miles JJ, Douek DC, Price DA. Bias in the T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. *Immunol Cell Biol*. 2011 Mar;89(3):375-87
- 【非特許文献 1 5】Venturi V, Price DA, Douek DC, Davenport MP. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8(3):231-8
- 【非特許文献 1 6】Garboczi, et al., (1996), *Nature* 384(6605): 134-41 10
- 【非特許文献 1 7】Garboczi, et al., (1996), *J Immunol* 157(12): 5403-10
- 【非特許文献 1 8】Chang et al., (1994), *PNAS USA* 91: 11408-11412
- 【非特許文献 1 9】Davodeau et al., (1993), *J. Biol. Chem.* 268(21): 15455-15460
- 【非特許文献 2 0】Golden et al., (1997), *J. Imm. Meth.* 206: 163-169
- 【非特許文献 2 1】Jager et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:12198
- 【非特許文献 2 2】Rosenberg et al., *N Engl J Med*. 1988;319:1676
- 【非特許文献 2 3】Walter et al., *N Engl J Med*. 1995;333:1038
- 【非特許文献 2 4】Mackinnon et al., *Blood*. 1995;86:1261
- 【非特許文献 2 5】Papadopoulos et al., *N Engl J Med*. 1994;330:1185
- 【非特許文献 2 6】Dudley et al., *J Immunother*. 2003;26:332 20
- 【非特許文献 2 7】Dudley et al., *Nat Rev Cancer*. 2003;3:666
- 【非特許文献 2 8】Chen et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:1914
- 【非特許文献 2 9】Zhao et al, *J. Immunol.*, 2005 Apr 1; 174(7): 4415-4423
- 【非特許文献 3 0】Janeway CA Jr, Travers P, Walport M et al. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. Glossary: Garland Science.
- 【非特許文献 3 1】Weissman, A. et al. *EMBO J*. 8:3651-3656 (1989)
- 【非特許文献 3 2】Bauer, A. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3842-3846 (1991)
- 【非特許文献 3 3】Gross et al., *FASEB J* 6:3370, 1992 30
- 【非特許文献 3 4】Stancovski, I. et al., *J. Immunol*. 151:6577, 1993
- 【非特許文献 3 5】Moritz, D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:4318, 1994
- 【非特許文献 3 6】Hwu et al., *Cancer Res*. 55:3369, 1995
- 【非特許文献 3 7】Weijtens, M. E. et al., *J. Immunol*. 157:836, 1996
- 【非特許文献 3 8】Hekele, A. et al., *Int. J. Cancer* 68:232, 1996
- 【非特許文献 3 9】Boulter et al., *Protein Eng* 2003, 16:707-711
- 【非特許文献 4 0】*Cancer Immunol Immunother*. 2004 Apr;53(4):345-57
- 【非特許文献 4 1】*J Immunol*. 2005 Apr 1;174(7):4381-8
- 【非特許文献 4 2】*Clin Immunol*. 2006 Oct;121(1):29-39
- 【非特許文献 4 3】*Nature*, 515,568-571 (27 November 2014) 40
- 【非特許文献 4 4】Carreno et al., 2015 *Science* 348:803-808
- 【非特許文献 4 5】Ausubel et al, eds, 1994 *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., New York
- 【非特許文献 4 6】*Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane, 1988
- 【非特許文献 4 7】Walchli et al., 2011, *PLoS One* 6:327930
- 【非特許文献 4 8】Engels et al., 2003, *Hum. Gene Ther*. 14:1155-68
- 【非特許文献 4 9】Frecha et al., 2010, *Mol. Ther*. 18:1748-57
- 【非特許文献 5 0】Verhoeyen et al., 2009, *Methods Mol. Biol*. 506:97-114
- 【非特許文献 5 1】*Current Protocols in Molecular Biology* (2015 John Wiley & Sons 50

, Inc)

- 【非特許文献 5 2】Thomsen et al., PNAS 81:659, 1984
- 【非特許文献 5 3】Gunning et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4831-4835
- 【非特許文献 5 4】Adra et al. 1987 Gene 60:65-74
- 【非特許文献 5 5】Singer-Sam et al. 1984 Gene 32:409-417
- 【非特許文献 5 6】Dobson et al. 1982 Nucleic Acids Res. 10:2635-2637
- 【非特許文献 5 7】Paule and White, Nucleic Acids Research., Vol. 28, pp 1283-1298 (2000)
- 【非特許文献 5 8】Ohkawa and Taira, Human Gene Therapy, Vol. 11, pp 577-585 (2000)
- 【非特許文献 5 9】Meissner et al. Nucleic Acids Research, Vol. 29, pp 1672-1682 (2001)
- 【非特許文献 6 0】Boshart et al. Cell, 41:521, 1985
- 【非特許文献 6 1】Zufferey et al. 1999. J. Virol. 74:3668-3681
- 【非特許文献 6 2】Deglon et al. 2000. Hum. Gene Ther. 11:179-190
- 【非特許文献 6 3】Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004
- 【非特許文献 6 4】Pardoll, 2012 Nature 12:252
- 【非特許文献 6 5】Chen and Mellman 2013 Immunity 39:1
- 【非特許文献 6 6】de Felipe et al. 2004. Traffic 5: 616-626
- 【非特許文献 6 7】Fang et al. 2005. Nat. Biotech 23: 584-590
- 【非特許文献 6 8】Szymczak et al. 2004. Nat. Biotechnol. 22: 589-594
- 【非特許文献 6 9】Macejak et al., Nature, 35390-4, 1991
- 【非特許文献 7 0】Oh et al., Genes Dev. 6:1643-53, 1992
- 【非特許文献 7 1】Ye et al., Mol. Cell Biol., 17:1714-21, 1997
- 【非特許文献 7 2】Vagner et al., Mol. Cell Biol., 15:35-44, 1995
- 【非特許文献 7 3】Gan et al., J. Biol. Chem. 273:5006-12, 1998
- 【非特許文献 7 4】Nanbru et al., J. Biol. Chem., 272:320.1~6, 1995; Stoneley, Oncogene, 16:423-8, 1998
- 【非特許文献 7 5】Stein et al., Mol. Cell Biol., 18:3112-9, 1998
- 【非特許文献 7 6】Schatzlein AG. (2001. Non-Viral Vectors in Cancer Gene Therapy : Principles and Progresses. Anticancer Drugs
- 【非特許文献 7 7】Graham et al. (1973. Virol. 52:456
- 【非特許文献 7 8】Wigler et al. (1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA76:1373-76)
- 【非特許文献 7 9】Liu et al., Cell 66:807-815, 1991
- 【非特許文献 8 0】Henderson et al., Immun 73:316-321, 1991
- 【非特許文献 8 1】Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993
- 【非特許文献 8 2】Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998
- 【非特許文献 8 3】Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999
- 【非特許文献 8 4】Garland et al., J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999
- 【非特許文献 8 5】Ausubel et al, eds, 2015 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., New York
- 【非特許文献 8 6】Banchereau et al. Cell 106, 271-274 (2001) incorporated by reference in its entirety
- 【非特許文献 8 7】Turner, et al, Nature Review Immunology 2006
- 【非特許文献 8 8】Madi, et al, Genome Research, 2014
- 【非特許文献 8 9】Walchli, et al, (2011) A Practical Approach to T-Cell Receptor Cloning and Expression. PLoS ONE 6(11): e27930
- 【非特許文献 9 0】Chen, J.L. et al. (2000) J. Immunol., 165, 948-955

【非特許文献 9 1】Robert, et al, Clin Can Res, 2014

【発明の概要】

【0011】

本開示の一態様は、以下を含む、キメラヘテロ二量体T細胞受容体(TCR)ポリペプチドを提供する：a) TCR 鎖可変領域、TCR 鎖定常領域、ならびに任意に膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含む第1ポリペプチド；b) TCRアルファ鎖可変領域、TCRアルファ鎖定常領域、ならびに任意に膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含む第2ポリペプチド；ここで、ヘテロ二量体TCRはNY-ESO-1/MHC複合体に特異的に結合し、TCRベータ鎖可変領域は配列番号：9に記載のTCRベータ鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%の同一性を有するその機能的変異体を含み；TCRアルファ鎖可変領域は配列番号：8に記載の同種TCRアルファ鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%の同一性を有するその機能的変異体を含み；第1ポリペプチドと第2ポリペプチドとの間に少なくとも1つのジスルフィド結合が存在する。キメラTCRの特定の実施形態では、ベータ鎖可変領域CDR3は、アミノ酸CASRLAGQETQYF(配列番号：4)を含む。本明細書に記載のキメラヘテロ二量体TCRの特定の他の実施形態では、第1ポリペプチドならびに第2ポリペプチドは、膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含まず、したがってキメラヘテロ二量体TCRは可溶性である。本開示は、本明細書に記載のキメラヘテロ二量体TCRをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸も提供する。他の実施形態では、本開示は、本明細書に記載のキメラヘテロ二量体TCRをコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。特定の実施形態では、発現ベクターは、レンチウイルスなどのレトロウイルスベクターである。特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載の核酸または本明細書に記載のキメラヘテロ二量体TCRなどの改変TCRのいずれかをコードする本明細書に記載のベクターを含む単離細胞も提供する。特定の実施形態では、単離細胞はT細胞である。

10

20

【0012】

本開示は、キメラヘテロ二量体TCR、もしくは本明細書に記載の他の改変TCRのいずれか、または本明細書に記載のキメラヘテロ二量体TCRを発現するベクター、もしくは本明細書に記載のキメラヘテロ二量体TCRをコードする核酸、もしくは本明細書に記載のキメラヘテロ二量体TCRを発現するように改変された単離細胞のいずれかを含む医薬組成物も提供する。

30

【0013】

本開示の別の態様は、TCRベータ鎖可変領域、TCRアルファ鎖可変領域、定常領域ならびに任意に膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含む一本鎖TCRを提供し；ここでTCRベータ鎖可変領域CDR3は、CASSLNRDYGYTF(配列番号：2)、CASSLNRDQPQHF(配列番号：3)およびCASRLAGQETQYF(配列番号：4)からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み；一本鎖TCRはNY-ESO-1/MHC複合体に特異的である。一本鎖TCRの特定の実施形態では、TCRベータ鎖可変領域は配列番号：9に記載のTCRベータ鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%の同一性を有するその機能的変異体を含み；TCRアルファ鎖可変領域は配列番号：8に記載の同種TCRアルファ鎖可変領域アミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも85%の同一性を有するその機能的変異体を含む。

40

【0014】

特定の実施形態では、一本鎖TCRは可溶性一本鎖TCRである。これに関して、一本鎖TCRは、膜貫通ドメインおよび細胞質シグナル伝達ドメインを含まない。

【0015】

本発明の別の態様は、本明細書に記載の一本鎖TCRをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。特定の実施形態では、核酸は発現ベクターに含まれる。特定の実施形態では、発現ベクターは、レンチウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターである。本開示は、本明細書に記載の一本鎖TCRをコードする核酸またはベクターを含む単離細胞も提供する。特定の実施形態では、単離細胞はT細胞である。本開示は、本明細書に記載の一本鎖TCR、一本鎖TCRをコードするか、さもなければ発現するベクター、一本鎖

50

TCRをコードする核酸、および/または一本鎖TCRを発現する単離細胞を含む医薬組成物も提供する。

【0016】

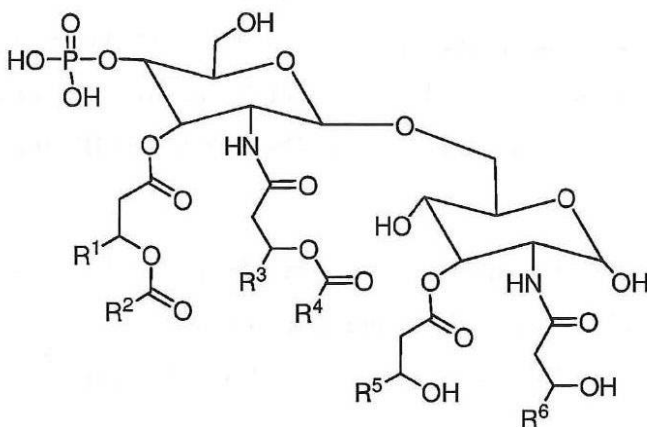
本発明の別の態様は、哺乳動物被験体のNY-ESO-1がんの治療方法または増殖阻害方法であって、被験体に治療用組成物を投与することを含み、前記組成物が、本明細書に記載のキメラヘテロ二量体TCRまたは一本鎖TCRなどの改変TCRを発現する単離細胞を含み；治療用組成物は、被験体のがんを治療するのに有効な量で投与される方法を提供する。

【0017】

本開示の別の態様は、以下を含む治療方法を提供する：(a) NY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高い哺乳動物被験体を同定する工程であって、哺乳動物被験体からの試料中における以下の有無を決定することを含む工程：(i) NY-ESO-1に特異的なTCRベータ鎖可変領域相補性決定領域3 (V CDR3)を含むTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF (配列番号：1)もしくはCASRLAGQETQYF (配列番号：4)のアミノ酸配列、もしくは両方を含む、ポリヌクレオチド；または(ii) NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含むTCRポリペプチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF (配列番号：1)もしくはCASRLAGQETQYF (配列番号：4)のアミノ酸配列、もしくは両方を含む、TCRポリペプチド；ここで、(i)および/または(ii)の存在は、被験体がNY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高いことを示す；ならびに(b) NY-ESO-1がん治療を哺乳動物被験体に施す工程。本方法の特定の実施形態では、V CDR3は、CASSLNRDYGTYF (配列番号：2)、CASSLNRDQPQHF (配列番号：3)もしくはCASRLAGQETQYF (配列番号：4)からなる群より選択されるアミノ酸配列か；または前述のV CDR3の2つ以上の組み合わせを含む。特定の実施形態では、NY-ESO-1がん治療は、NY-ESO-1ポリペプチドをコードするベクターを投与することを含む。特定の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターを標的とする樹状細胞を含む。さらなる実施形態では、本方法は、アジュバントを被験体に投与することをさらに含む。これに関して、アジュバントは、グルコピラノシル脂質A (GLA)であってもよい。特定の実施形態では、GLAは、安定な水中油型エマルジョン中に製剤化されるか、または水性製剤中に存在し得る。特定の実施形態では、NY-ESO-1がん治療は、GLAを含む組成物を被験体に投与することを含み、前記組成物は以下を含む：

(a) 以下の式のGLA：

【化1】



式中：

R^1 、 R^3 、 R^5 および R^6 は $C_{11} \sim C_{20}$ アルキルであり；および

R^2 および R^4 は $C_{12} \sim C_{20}$ アルキルである；ならびに

(b) 薬学的に許容される担体または賦形剤；

ここで、組成物は抗原を含まない。特定の実施形態では、 R^1 、 R^3 、 R^5 および R^6 はウンデシ

ルであり、R²およびR⁴はトリデシルである。本明細書の方法は、任意の哺乳動物、特にヒト被験体の治療に使用され得る。特定の実施形態では、GLA組成物は水性製剤である。他の実施形態では、組成物は、水中油型エマルジョン、油中水型エマルジョン、リポソーム、ミセル製剤、または微粒子の形態である。一実施形態では、本方法によって治療されるがんは、固形腫瘍を含む。これに関して、がんは、肉腫、前立腺がん、子宮がん、甲状腺がん、精巣がん、腎臓がん、膵臓がん、卵巣がん、食道がん、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、メラノーマ、肝細胞がん、頭頸部がん、胃がん、子宮内膜がん、大腸がん、胆管がん、乳がん、膀胱がん、骨髄性白血病および急性リンパ芽球性白血病からなる群より選択され得る。特定の実施形態では、組成物は、皮下、皮内、筋肉内、腫瘍内、または静脈内注射によって投与される。特定の実施形態では、組成物は、1つ以上の追加の治療剤または治療と併せて投与される。一実施形態では、治療剤は免疫チェックポイント阻害剤である。他の実施形態では、治療剤は、抗CD40抗体などの、共刺激経路を活性化する抗体である。他の実施形態では、治療剤はがん治療剤であり、例えばがん治療剤は、タキソテル、カルボプラチン、トラスツズマブ、エピルピシン、シクロホスファミド、シスプラチン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エトポシド、5-FU、ゲムシタビン、メトトレキサート、およびパクリタキセル、ミトキサントロン、エポチロンB、表皮成長因子受容体(EGFR)標的化モノクローナル抗体7A7.27、ポリノスタット、ロミデプシン、ドコサヘキサエン酸、ボルテゾミブ、シコニンならびに腫瘍溶解性ウイルスからなる群より選択される。別の実施形態では、1つ以上の追加の治療的処置は、放射線治療である。

10

20

【0018】

本開示の別の態様は、以下を含む、NY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高い哺乳動物被験体を同定する方法を提供する：(a)哺乳動物被験体からの試料中における以下の有無を決定する工程：(i)NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含むTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF(配列番号：1)もしくはCASRLAGQETQYF(配列番号：4)のアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド；または(ii)NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含むTCRポリペプチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF(配列番号：1)もしくはCASRLAGQETQYF(配列番号：4)のアミノ酸配列を含む、TCRポリペプチド；ここで、(i)および/または(ii)の存在は、被験体がNY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高いことを示す。本方法の特定の実施形態では、V CDR3は、CASSLNRDYGTYF(配列番号：2)、CASSLNRDQPQHF(配列番号：3)およびCASRLAGQETQYF(配列番号：4)からなる群より選択されるアミノ酸配列か；または前述のV CDR3の2つ以上の組み合わせを含む。

30

40

【0019】

本発明のさらなる態様は、MHC複合体と関連して細胞または組織上に提示されたNY-ESO-1ペプチド抗原を含む細胞または組織を検出する方法を提供し、本方法は、a)細胞または組織を、本明細書に記載の少なくとも1つの可溶性TCR分子またはその機能的フラグメントと、提示されたNY-ESO-1ペプチド抗原と可溶性TCRまたはフラグメントとの間に特異的結合複合体を形成する条件下で接触させる工程；b)提示されたペプチド抗原に結合していない可溶性TCR分子またはフラグメントを除去するのに適切な条件下で細胞または組織を洗浄する工程；ならびにc)特異的結合複合体を、提示されたペプチド抗原を含む細胞または組織を示すものとして検出する工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】LV305による治療は、ポリクローナルNY-ESO-1特異的T細胞応答の親和性の増加をもたらす。Tx前およびTx後白血球アフェレーシス試料からの凍結保存されたPBMCを解凍し、ELISPOTアッセイをセットアップするために使用した。200,000個の細胞を、ELISPOTプレートの各ウェルにプレATINGした。11個のアミノ酸がオーバーラップする15merのペプチドを43個含む、異なる濃度のNY-ESO-1ペプチド混合物で、細胞を処理した。試験したペプチドの濃度は、2.5ug/mL(1670nM)、0.5ug/mL(334nM)、0.1ug/mL(60nM)、お

50

よび0.02ug/mL (12nM)であった。細胞をペプチドまたは対照処理培地と共に40時間インキュベートした。C.T.L Technologiesの自動スポットカウンターを用い、スポットを数えた。データシンボルは、Tx前試料(白丸)またはTx後試料(黒四角)において試験された各濃度での100万PBMC当たりのスポット形成単位(SFU)の平均数を表す。エラーバーは、各処理条件での標準偏差を表す。

【図2】腫瘍抗原特異的TCR配列は、Tx前PBMCと比較して、Tx後PBMCで富化される。この研究では、LV305処理前およびLV305での3回のワクチン接種後に、PBMCを患者から採取した。治療前腫瘍試料も患者から採取した。PBMCおよび腫瘍試料を、DNA抽出およびその後のT細胞受容体(TCR)ベータ鎖の配列決定分析にかけた。Tx前PBMCとTx後PBMCとの間の配列類似性を散乱プロットを用いて分析し、腫瘍試料から得られたTCR配列も、類似性について患者Tx前およびTx後PBMCと比較した。結果は、腫瘍抗原を認識する腫瘍浸潤リンパ球を含む腫瘍試料由来のTCR配列は、Tx前PBMCと比較して、患者のTx後PBMCにおいて富化されていることを示した。

10

【図3】NY-ESO-1特異的Tに対して高度に富化されたin vitro培養(IVS)によるTx後PBMCからのオリゴクローナル培養物の樹立。LV305で3回ワクチン接種した後、患者Pt151006からPBMCを採取した。PBMCを、OpTmizer T細胞増殖培地中(Invitrogen、カールズバッド、カリフォルニア州)、NY-ESO-1重複ペプチド(0.5 μg/mL、JPT Technologies、ベルリン、ドイツ)と共に、IL-2およびIL-7(10ng/mL)の存在下で培養した。反復刺激後、ELISPOTアッセイで測定したところ、PBMC培養物は、NY-ESO-1特異的T細胞について高度に富化されていた。(A)NY-ESO-1ペプチドプールで刺激した際の、オリゴクローナルT細胞のIFN- γ の分泌を示す代表的なELISPOT。細胞(10K/ウェル)を、抗IFN γ 捕捉抗体(MabTech)でプレコーティングしたELISPOTプレートに3連でプレーティングした。細胞をNY-ESO-1ペプチドプール(2.5 μg/mL)または対照培地(Agなし)で処理し、CO₂インキュベーター中で40時間インキュベートした。次いで細胞を洗い流し、TMB基質を添加する前に、プレートをHRP複合二次抗体と共に2時間インキュベートした。1ウェルあたりのスポット形成単位(SFU)の数を、自動プレートリーダーで計数した。示されているのは、Agなし処理の3つのウェル(上段)およびNY-ESO-1処理の3つのウェル(下段)の画像である。(B)Agなし対照およびNY-ESO-1ペプチド混合処理ウェルにおける1ウェルあたりのSFUの数を示す概要グラフ。棒は、各群の平均 \pm SEMを表す。(C)示されているのは、TCR ディープシーケンシング分析によって決定されたオリゴクローナル培養由来の上位クローンである。各棒は、特有のTCR CDR3配列を有する1つのクローンを表す。y軸は、オリゴクローナル培養物からの全配列読み取りの間の各クローンの相対頻度(パーセンテージ)を示す。上位6クローンは全TCRの90%以上を占め、その培養物は高度にオリゴクローナルであることを示している。

20

30

【図4】オリゴクローナル培養物中のいくつかの高頻度TCR CDR3配列は、Tx前PBMCと比較して、Tx後PBMCにおいて富化されている。示されているのは、NY-ESO-1特異的オリゴクローナル培養物が由来するTx前PBMCにおけるTCR配列(x軸)を、同じ患者のTx後PBMC(y軸)と比較する対数目盛りの散布図である。オリゴクローナル培養物からの配列をPBMC配列上に重ねた。y軸にかけて重複配列の傾斜があり、NY-ESO-1特異的配列がTx前PBMCよりもTx後PBMCにおいてより頻繁に見られることを示しており、LV305がNY-ESO-1特異的T細胞応答を誘導したことの指標となる。

40

【図5】PT151006のIVS3では20.5%の頻度を有するTCR CDR3クローンは、PT151016のTx後PBMCにおいて検出することができる。示されているのは、PT151006のIVS3からのオリゴクローナル培養物のTCR配列(y軸)を、第2の患者PT151016からのTx後PBMCで検出されたTCR配列と比較する対数目盛りの散布図である。IVS3では高い頻度を有する2つのクローンは、PT151016からのTx後試料でも検出可能である。散布図内の四角は、TCR CDR3領域のアミノ酸配列ならびにPT151016のTx後PBMCにおける頻度の百分率(0.000298)およびIVS3における頻度の百分率(20.5)を示す。同様の分析は、この配列がPT151016からのTx前PBMCでは検出不可能であることを示した。

【図6】PT151006のIVS3では8.5%の頻度を有するTCR CDR3クローンは、PT151016のTx後P

50

BMCでは検出することができる。示されているのは、PT151006のIVS3からのオリゴクローナル培養物のTCR配列（y軸）を、第2の患者PT151016からのTx後PBMCにおける配列と比較する対数目盛りの散布図を示す。IVS3では高い頻度を有する2つのクローンは、PT151016からのTx後試料でも検出可能である。散布図内の四角は、TCRのCDR3領域のアミノ酸配列ならびにPT151016のTx後PBMCにおける頻度の百分率（0.000642）およびIVS3における頻度の百分率（8.52）を示す。同様の分析は、この配列がPT151016からのTx前PBMCでは検出不可能であることを示した。

【図7】PT151006のIVS3では26.2%の頻度を有するTCR CDR3クローンは、PT151014のTx後PBMCでは検出することができる。示されているのは、PT151006のIVS3からのオリゴクローナル培養物のTCR配列（Y軸）を、PT151014からのTx後PBMCにおける配列と対比する対数目盛りの散布図である。IVS3では最も高い頻度（26.2%）を有するクローンは、PT151014からのTx後試料でも検出可能である。散布図内の四角は、TCRのCDR3領域のアミノ酸配列ならびにPT151014のTx後PBMCにおける頻度の百分率（0.00076）およびIVS3における頻度の百分率（26.2）を示す。同様の分析は、この配列がPT151014からのTx前PBMCでは検出不可能であることを示した。

10

【図8】8人の肉腫患者からのTx前およびTx後PBMCにおける3つの公開TCR CDR3配列の頻度を示す。棒グラフは、8人の試験された患者のそれぞれからのTx前（斜線棒）およびTx後（黒棒）PBMCにおける公開TCRの頻度を示す。全ての患者はLV305治療を受けている。関連するTCR CDR3のアミノ酸配列は、各グラフの上部に含まれる。表1~3も参照。

【図9】患者間で共有される公開TCRは、各個体において異なるヌクレオチド配列を有する。示されているのは、3人の患者からの3つの公開TCRのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列である。配列がアミノ酸レベルで同じであっても、異なる患者間のヌクレオチドレベルで完全な相同性はない。これは、公開TCRの生成について提唱されている収束組み換えの概念と一致する（非特許文献15）。

20

【図10】公開TCR CDR3配列は、VJD接合領域において、より短くより少ない非鋳型ヌクレオチド付加を有する。（A）示されているのは、IVS3（黒色カラム）におけるTCR CDR3の長さ分布、Pt151006からのオリゴクローナルNY-ESO-1特異的T細胞in vitro培養、および同じ患者からのTx後PBMCにおけるTCR CDR3長さ分布（斜線棒）である。（B）3つの公開TCRのヌクレオチド配列（CDR3をコードする配列に下線を引く）およびCDR3のアミノ酸配列。接合領域における欠失および付加の数を、各TCRについても列挙する。3つの公開TCRは全て同じCDR3ヌクレオチド長（n=39）を有する。これらのTCRはまた、比較的少ない鋳型なしヌクレオチド付加を接合領域に有する。発明者らが同定した公開TCRの1つであるCASRLAGQETQYF（配列番号：4）は、N1(VD)およびN2(DJ)挿入部位のいずれでもヌクレオチド付加を有していなかった。より短いCDR3長および制限されたnt付加は、これらのTCRが公開TCRであるという結論を支持する。

30

【図11】完全なTCR（配列番号：8）および同定された公開TCR CDR3 CASRLAGQETQYF（配列番号：4）の1つに対するTCR（配列番号：9）可変領域の配列。このCDR3配列は、IVS3では26.2%の頻度を有し、表3に示すように、PT151014およびPT151050においても共有されている。表示の注釈は、IMGTデータベース（The international ImMunoGeneTics information system；インターネットアドレスIMGT.org）から入手可能な標準注釈である。TCR配列のBLAST検索は、既知のNY-ESO-1特異的TCR配列との相同性を示す。

40

【図12】異なるがん患者から同定された公開TCR CDR3をコードするポリヌクレオチド配列のアラインメントは、同じCDR3アミノ酸配列をコードする異なる患者からの異なる核酸配列を示す。配列番号：1のヌクレオチド配列は以下の通りである：第1公開TCR CDR3 - PT006：配列番号：5；PT016：配列番号：10；PT050：配列番号：11；第2公開TCR CDR3 - PT 006：配列番号：6；PT 016：配列番号：12；PT 050；配列番号：13；第3公開TCR CDR3 - PT006：配列番号：7；PT 016：配列番号：14；PT 050：配列番号：15。（図9も参照）

【図13】がん患者からのPBMCから拡大されたNY-ESO-1拡大T細胞培養物（IVS3）から同定されたTCR鎖（配列番号：16）のアミノ酸配列を示す。配列を実施例11に記載のよ

50

うに単離した。

【図14】MCC患者G2はNY-ESO-1を発現し、発現レベルはG100での治療後に減少する。腫瘍生検は、腫瘍内G100治療の前およびG100での治療の4週間後のベースラインで採取した。瞬間凍結生検組織からRNAを抽出し、200ngのRNAを、ヒトpanCancer Immune Profiling キットを使用するnanosttring遺伝子発現分析に用いた。示されているのは、がん精巢抗原であるNY-ESO1をコードするCTAG1B遺伝子の発現である。Y軸は、遺伝子の発現レベルを反映する結合密度を示す。発現レベルは、ベースラインと比較して、G100後の試料においてより低かった。

【図15】公開TCRを有するT細胞は、MCC患者G2のリンパ節生検のG100での治療後に検出可能である。腫瘍生検は、腫瘍内G100治療の前およびG100での治療の4週間後のベースラインで採取した。瞬間凍結生検組織からDNAを抽出し、TCRベータ鎖のCDR3領域のディープシーケンシング分析に使用した。示されているのは、患者G2からの腫瘍生検と、LV305試験において患者151006から得られたオリゴクローナルNY-ESO-1刺激T細胞培養物から単離されたTCRとの間の配列重複を示す2つの散布図である。グラフ(A)は、G100前試料(X軸)と、LV305患者151006からのNY-ESO-1特異的TCR(Y軸)との相関を示す。グラフ(B)は、G100後試料(X軸)と、LV305患者151006からのNY-ESO-1特異的TCR(Y軸)との相関を示す。G100前のMCC罹患リンパ節生検で検出できなかった2つの公開CDR3配列は、G100治療後の流入領域リンパ節の生検で検出可能であった。

【図16】3つの公開TCR CDR3配列は、抗CTLA4臨床試験からの患者において検出された。示されたのは、抗CTLA4試験の21人の患者における3つの公開CDR3アミノ酸配列の頻度である。X軸の数字は患者番号を表す。各番号には2つの棒が関連付けられている。左の棒は、Tx前PBMCにおける頻度を示す。右の棒は、Tx後PBMCにおける頻度を示している。

【図17】患者151006および患者151119は、同じCDR3配列、CASSLNDRDQPQHF(配列番号:3)に対して、異なるTCR V遺伝子を使用する。TCR の大部分は、V07-07遺伝子を使用する。しかしながら、TCR 受容体のごく一部は、V07-08、V07-06、V07-09、V07-02、V07-03、V07-04、またはV11-02を使用する。患者151119では、V07-08のみがこのTCR CDR3に使用される。どちらの患者も同じTCR J遺伝子J01-05を使用する。

【図18】この図は、公開TCR CDR3のCASSLNDRDQPQHF(配列番号:3)の1つが、患者PT151006で少なくとも3つの異なるヌクレオチド配列によってコードされていることを示す。ポリヌクレオチド配列は、配列番号:で与えられる。

【図19】異なる臨床試験からの患者は、同じCDR3アミノ酸配列について異なるヌクレオチド配列および異なるTCR V遺伝子使用を有する。最初の公開TCR、CASSLNDRDYGTYF(配列番号:2)について、PT151006(LV305試験から)およびC131-001(C131試験から)および患者G2-C1W4B(G100-MCC試験から)は、TCR V07-08、TCR V02-01、およびTCR V28-01をそれぞれを使用する。第2公開TCR、CASSLNDRDQPQHF(配列番号:3)について、PT151006はTCR V07-07を使用する。患者131-013は、3つの異なるTCR V、V05-08、V13-01、およびV05-05を使用する。第3公開TCR、CASRLAGQETQYF(配列番号:4)について、PT151006、C131-001、およびG2-C1W4Bは、TCR V28-01、TCR V06-06、およびTCR V25-01をそれぞれ使用する。

【図20】PT151006(IVS3)からのNY-ESO-1特異的T細胞培養物は、CD4 T細胞である。示されているのは、IVS3細胞培養物(下段)の、正常ドナーからのPBMC(上段)との隣接染色である。細胞を、抗CD3-パシフィックブルー(PB)、抗CD4-FITC、抗CD8-PerCP、および抗CD56-APCで染色した。試料をBD LSR II フローサイトメーターで取得した。データ分析は、FlowJoソフトウェアを使用して行った。リンパ球集団を最初にFSC/SSCプロット上でゲーティングし、CD4 T細胞をCD3+CD4+リンパ球としてゲーティングし、CD8 T細胞をCD3+CD8+リンパ球としてゲーティングした。NK細胞は、CD3-CD56+リンパ球としてゲーティングした。対照ドナーPBMCは、健全なドナーPBMC(上段)で通常観察されるように、CD4、CD8 T細胞およびNK細胞の予想パーセンテージを有する。対照的に、PT151006-IVS3からの培養細胞は、NK細胞およびCD8 T細胞の欠如を示し、CD4 T細胞のみを含む(下段)。

【0021】

(配列識別子の簡単な説明)

配列番号：1は、公開TCR CDR3コンセンサス配列CASSLNDRXXXXFのアミノ酸配列である。

配列番号：2は、第1公開TCR CDR3 CASSLNDRDYGTYFのアミノ酸配列である。

配列番号：3は、第2公開TCR CDR3 CASSLNDRDQPQHFのアミノ酸配列である。

配列番号：4は、第3公開TCR CDR3 CASRLAGQETQYFのアミノ酸配列である。

配列番号：5は、配列番号：2に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である。

配列番号：6は、配列番号：3に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である。

配列番号：7は、配列番号：4に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である。

配列番号：8は、図11に示すような公開TCRのアルファ鎖のアミノ酸配列である。

配列番号：9は、図11に示すような公開TCRのベータ鎖可変領域のアミノ酸配列である。

この公開TCRは、配列番号：4に示されるようにV CDR3配列を有する。

配列番号：10は、配列番号：2に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である(図9を参照)。

配列番号：11は、配列番号：2に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である(図9を参照)。

配列番号：12は、配列番号：3に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である(図9を参照)。

配列番号：13は、配列番号：3に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である(図9を参照)。

配列番号：14は、配列番号：4に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である(図9を参照)。

配列番号：15は、配列番号：4に記載のCDR3アミノ酸配列を含むTCR V領域をコードするポリヌクレオチド配列である(図9を参照)。

配列番号：16は、実施例11に記載のように、がん患者からのPBMCから拡大されたNY-ESO-1拡大T細胞培養物(IVS3)から同定されたTCR鎖のアミノ酸配列である。配列は図13に示され、IMGTデータベースウェブサイトで概説された方法に従って注釈される。

配列番号：17~23は、図19に示すように、患者C131-001、G2-C1WB4、C131-013からの公開TCR CDR3配列をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号：24~26は、図18に示すように、PT151006からのヌクレオチド配列であり、全て公開TCR CDR3配列CASSLNDRDQPQHF(配列番号：3)をコードする。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本開示は、異なるMHCクラスIハプロタイプのがん患者の間で共有される公開NY-ESO-1特異的TCRアミノ酸配列のパネルの発見に部分的に基づく。本明細書で用いられる用語「公開TCR」は、TCR配列、特にTCR鎖可変領域CDR3(V CDR3)アミノ酸配列を指し、複数の個体間で共有される(非特許文献15)。実施例に示されるように、同定された公開TCRの頻度は、NY-ESO-1特異的治療免疫による治療後ならびに合成TLR4アゴニストであるG100での治療後に増加した。

【0023】

(改変TCR)

TCRは、不変CD3鎖分子との複合体の一部として発現される高度に可変なアルファ()およびベータ()鎖を含む膜アンカー型ヘテロ二量体タンパク質である。非特許文献30。T細胞受容体の各鎖は、2つの細胞外ドメイン：可変(V)領域および定常(C)領域からなる。定常領域は細胞膜の近位にあり、続いて膜貫通領域および短い細胞質尾部があり、一方で可変領域はペプチド/MHC複合体に結合する。TCR鎖および鎖の両方の可変ドメインは、それぞれ、3つの超可変または相補性決定領域(CDR)を有するが、対して鎖の可変領域は、通常は抗原と接触しないため、したがってCDRとはみなされない超可

10

20

30

40

50

変領域 (HV4) の追加領域を有する。TCRは膜結合型であるが、その短い細胞質尾部のためにシグナル伝達自体を媒介することができないため、TCRはCD3およびゼータがシグナル伝達を行うことを必要とする。

【0024】

本発明は、NY-ESO-1/MHC複合体に特異的な改変T細胞受容体、および本明細書に記載の改変T細胞受容体を発現する単離細胞を提供する。本明細書に記載の特定の実施形態では、改変TCRは、配列番号：8および9にそれぞれ与えられるアルファ鎖可変領域およびベータ鎖可変領域を含む。本明細書に記載の他の実施形態では、改変TCRは、配列番号：9で与えられるベータ鎖可変領域およびアルファ鎖対を、アルファ/ベータ対がMHCに関連してN YES01エピトープを認識する機能的TCRを形成するように含む。特定の実施形態では、本明細書に記載の改変TCRのV CDR3は、CASSLNDRXXXXFを含むアミノ酸配列を含み、ここでXは任意のアミノ酸 (配列番号：1) である。いくつかの実施形態では、V CDR3は、CASSLNDR YGYTF (配列番号：2) およびCASSLNDRQDPQHF (配列番号：3) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、それらのそれぞれは、配列番号：1のコンセンサス配列内にある配列の例である。別の実施形態では、V CDR3は、配列番号：4に記載のアミノ酸配列を含む。

10

【0025】

本発明の一態様では、改変TCRはヘテロ二量体TCRである。ヘテロ二量体TCRは、少なくとも1つのジスルフィド結合によって連結された2つのポリペプチドを含む。ヘテロ二量体TCR中の1つのポリペプチドは、アルファ鎖可変領域およびアルファ鎖定常領域を含む。一実施形態では、アルファ鎖ポリペプチドは、任意に膜貫通ドメインを含む。特定の実施形態では、アルファ鎖ポリペプチドは、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン (例えば、CD3ゼータ鎖シグナル伝達ドメインなどの細胞内シグナル伝達ドメインおよび任意に共刺激ドメイン) を任意に含む。ヘテロ二量体TCR中の第2ポリペプチドは、ベータ鎖可変領域およびベータ鎖定常領域、ならびに任意に膜貫通ドメインを含む。ヘテロ二量体TCRにおける特定の実施形態では、第2ポリペプチドは、ベータ鎖可変領域およびベータ鎖定常領域、ならびに任意に膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン (例えば、細胞内シグナル伝達ドメインおよび任意に共刺激ドメイン) を含む。ヘテロ二量体TCRの第1および第2ポリペプチドが膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン (例えば、細胞内シグナル伝達ドメイン) を含まない実施形態では、ヘテロ二量体TCRは可溶性ヘテロ二量体である。一実施形態では、ヘテロ二量体TCRは、発現を安定化させ、宿主細胞中に存在し得る天然のTCRとの相互作用を最小限にするための1つ以上の修飾を含み得る。特定の実施形態では、ヘテロ二量体TCRはキメラヘテロ二量体TCRである。

20

30

【0026】

本発明の一態様では、改変T細胞受容体はキメラT細胞受容体 (TCR) である。本明細書で使用する用語「キメラ」は、異なる起源の部分から構成される分子、例えばTCRを指す。キメラ分子を含む部分は天然に存在し得るが、全体としてのキメラ分子は天然に存在せず、例えば合成または組み換え体である。

【0027】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示の改変TCRはキメラヘテロ二量体TCRである。キメラヘテロ二量体TCRは、少なくとも1つのジスルフィド結合によって連結された2つのポリペプチドを含む。ヘテロ二量体TCR中の1つのポリペプチドは、アルファ鎖可変領域およびアルファ鎖定常領域を含む。アルファ鎖ポリペプチドは任意に、膜貫通ドメイン、または任意に膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン (例えば、CD3ゼータ鎖シグナル伝達ドメインなどの、共刺激ドメインを有するまたは有さない細胞内シグナル伝達ドメイン) を含む。キメラヘテロ二量体TCR中の第2ポリペプチドは、ベータ鎖可変領域およびベータ鎖定常領域、ならびに任意に膜貫通ドメイン、または任意に膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン (例えば、共刺激ドメインを有するまたは有さない細胞内シグナル伝達ドメイン) を含む。キメラヘテロ二量体TCRの第1および第2ポリペプチドが膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含まない実施形態では、キメラヘテロ二量体TCRは可溶性キメラヘテロ二量体である。

40

50

【0028】

TCRのポリペプチド鎖は、当該技術分野で知られている。

【0029】

本明細書に記載の改変TCRは、ベータ鎖可変領域の少なくとも一部およびアルファ鎖可変領域の少なくとも一部から通常構成される抗原結合ドメインを含み、ここで抗原結合ドメインはNY-ESO-1/MHCに特異的であるか、特異的に結合する。本明細書で使用する用語「特異的に結合する」は、MHCに関連して特定の抗原を認識するが、試料中の無関係な抗原/MHCを実質的に認識または結合しないTCRの能力を指す。いくつかの例では、用語「特異的に結合」または「特異的に結合する」は、タンパク質またはペプチドの第2の化学種との相互作用に関して、相互作用が化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存することを意味するために使用され得る；例えば、抗体は、タンパク質全体ではなく、特定のタンパク質構造を認識し、結合する。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、エピトープA（または遊離の非標識A）を含有する分子が標識「A」および抗体を含む反応中に存在すると、抗体に結合した標識Aの量は減少する。

10

【0030】

一本鎖TCR（例えば、特許文献3を参照）も検討される。簡潔に述べると、一本鎖（「sc-」）TCR分子は、適切なペプチドリinker配列を介して共有結合したアルファ鎖可変領域（V_α）およびベータ鎖可変領域（V_β）を含む。例えば、V_αは、V_αのC末端およびV_βのN末端に融合した適切なペプチドリinker配列を介して、V_βに共有結合することができる。本発明のscTCRは、構造V_α-L-V_βを有してもよく、または他の配向、例えばV_β-L-V_αであってもよい。特定の実施形態では、scTCRは、定常ドメイン（定常領域とも称される）をさらに含む。さらなる実施形態では、scTCRは、定常ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインをさらに含む。一実施形態では、細胞質ドメインは、共刺激ドメインを有するまたは有さない細胞内シグナル伝達ドメインを含む。sc-TCR融合タンパク質のV_αおよびV_βは、一般に長さが約200~400アミノ酸、または長さが約300~350アミノ酸であり、NY-ESO-1/MHC複合体に特異的である本明細書で提供されるV_αおよびV_βアミノ酸配列などの天然に存在するTCRのV_αおよびV_βと少なくとも90%同一であり、好ましくは100%同一である。用語「同一」は、V_αまたはV_βのアミノ酸が対応する天然に存在するTCR V_αまたはV_βと100%同一であることを意味する。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の改変TCRは、細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ゼータ鎖シグナル伝達ドメイン）を含む。本明細書に記載の改変TCRの、細胞質シグナル伝達ドメインとも呼ぶことができる細胞内シグナル伝達ドメインは、改変TCRを発現する免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に参与する。用語「エフェクター機能」は、細胞の特殊な機能を指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。したがって、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」または「細胞質シグナル伝達ドメイン」は、エフェクター機能シグナルを形質導入し、細胞に特殊な機能を行わせるタンパク質の部位を指す。通常、細胞内シグナル伝達ドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、シグナル伝達ドメイン全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断部位が使用される範囲内において、そのような切断部位は、それがエフェクター機能シグナルを形質導入する限り、インタクトな全長シグナル伝達ドメインの代わりに使用され得る。したがって、用語細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを形質導入するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインの切断部位を含むことを意味する。

30

40

【0032】

本明細書に記載の改変TCRで使用される細胞内シグナル伝達ドメインの例には、および協調して作用し、抗原受容体連結後にシグナル伝達を開始するT細胞受容体（TCR）および共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の誘導体または変異体、および同じ機能的な能力を有する任意の合成配列が挙げられる。本明細書では、NKシグナル伝達分子も検討されている。したがって、細胞内シグナル伝達ドメインとして本明細書での使用が検討される

50

ものは、シグナル伝達に關与するCD3複合体を構成するポリペプチド、例えば、
、
、
および CD3鎖である。TCR/CD3 (T細胞の主要なシグナル伝達受容体複合体) のポリ
ペプチドの中で、特に有望なのは、ホモまたはヘテロSS結合二量体として現れるゼータお
よびそのエータアイソフォーム鎖であり、リガンドのTCR認識によって誘発される細胞活
性化プログラムの少なくとも一部を仲介する役割を担う (非特許文献 3 1 ; 非特許文献 3
2)。本明細書で使用する細胞内シグナル伝達ドメインのさらなる例には、MB1鎖 (CD79A
)、B29、Fc RIIIおよびFc RIなどが挙げられる。活性化タンパク質ファミリーの他のメン
バーの細胞内シグナル伝達部分、例えばFc RIIIおよびFc RIも使用することができる
。非特許文献 3 3 ; 非特許文献 3 4 ; 非特許文献 3 5 ; 非特許文献 3 6 ; 非特許文献 3 7
; 非特許文献 3 8 を、本明細書での使用が検討されている種々の代替膜貫通ドメインおよ
び細胞内ドメインの開示のために参照。さらなる例には、IL-2受容体 (IL-2R) p55 (.アル
ファ.) または p75 (.ベータ.) または .ガンマ. 鎖のいずれか1つの細胞内シグナル伝達
ドメイン、特にT細胞およびNK増殖のシグナル伝達を担うp75および .ガンマ. サブユニット
が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0033】

TCR単独で生成されたシグナルは、T細胞の完全な活性化には不十分であり、二次シグナ
ルまたは共刺激シグナルも必要であることが知られている。したがって、T細胞活性化は
、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列、すなわちTCR (一次細胞質シグナル伝達
配列) を介して抗原依存性一次活性化を開始するものと、抗原非依存的に作用し、二次ま
たは共刺激シグナル (二次細胞質シグナル伝達配列) を与えるものによって媒介されると
言える。

【0034】

一次細胞質シグナル伝達配列は、刺激性様式または抑制性様式のいずれかで、TCR複合
体の一次活性化を調節する。刺激性様式で作用する一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫
受容体チロシン活性化モチーフすなわちITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含み
得る。

【0035】

本明細書における細胞内シグナル伝達ドメインとして特に有用である一次細胞質シグナ
ル伝達配列を含むITAMの例には、

TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ ,

CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66d由来のものが挙げら
れる。ある特定の実施形態では、本明細書で使用する改変TCRにおける細胞質シグナル伝
達ドメインは、CD3ゼータに由来する細胞質シグナル伝達配列を含む。本明細書において
有用なゼータ鎖部分配列は、細胞内ドメインを含む。ヒトCD3ゼータ鎖のアミノ酸残基52
~163に及ぶこのドメインは、標準的な分子生物学技術を用いて増幅することができる。

【0036】

いくつかの実施形態では、改変TCRの細胞質ドメインは、CD3-ゼータシグナル伝達ドメ
インを単独で、または本明細書で使用するTCRに関連して有用な任意の他の所望の細胞質
ドメイン (単数または複数) と組み合わせて含むように設計され得る。「共刺激シグナル
伝達領域」または「共刺激ドメイン」は、共刺激分子の細胞内ドメインまたはその機能的
フラグメントを含む改変TCRの一部を指す。したがって、本明細書に記載の改変TCRの細
胞質ドメインは、細胞内シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメインを含み得る。

【0037】

「共刺激リガンド」には、T細胞上の同種の共刺激分子に特異的に結合し、それにより
、例えばTCR/CD3複合体の、ペプチドで負荷したMHC分子との結合によって与えられる一次
シグナルに加えて、増殖、活性化、分化などを含むがこれらに限定されないT細胞応答を
媒介するシグナルを与える抗原提示細胞上 (例えば、aAPC、樹状細胞、B細胞など) の分
子が挙げられ。共刺激リガンドには、限定されないが、CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86
)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、誘導性共刺激リガンド (ICOS-L)、細胞間接着分子

(ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、リンホトキシンベータ受容体、3/TR6、ILT3、ILT4、HVEM、Tollリガンド受容体に結合するアゴニストまたは抗体およびB7-H3と特異的に結合するリガンドを挙げることができる。とりわけ、共刺激リガンドは、限定されないが、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3などのT細胞上に存在する共刺激分子と特異的に結合する抗体、およびCD83と特異的に結合するリガンドも包含する。

【0038】

共刺激分子は、リンパ球の抗原に対する効率的な応答に必要な抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。そのような分子の例には、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40L、PD-1、DAP-10、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するリガンドなどが含まれる。本明細書に記載のTCRと共に使用することが意図される具体的な例示としての共刺激ドメインは、4-1BBおよびCD28に由来するが、他の共刺激分子に由来する他の共刺激ドメインも本発明の範囲内である。

10

【0039】

本明細書に開示の改変TCRの細胞質ドメイン内の細胞内シグナル伝達配列および共刺激配列は、各部位が適切にシグナル伝達するように機能する任意の順序で互いに連結され得る。特定の実施形態では、共刺激領域は、存在する場合、TMドメインの細胞質側にちょうど存在し、シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3ゼータのシグナル伝達ドメイン)が続く。他の実施形態では順序が逆転し、TMドメインのすぐ隣にシグナリング部位があり、存在する場合には共刺激ドメインが続く。場合により、特定の実施形態では、長さが約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15アミノ酸の短いオリゴまたはポリペプチドリンカーは、結合を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適切なリンカーを提供する。種々のリンカーのいずれかを使用することができ、それらは当業者に知られている。

20

【0040】

本明細書に記載されるように、改変TCRは、いくつかの実施形態では、それらを宿主細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の表面に固定する膜貫通(TM)ドメインも含む。TMは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、CD3ゼータ鎖由来であり得るか、またはCD28またはCD4などの別の膜貫通分子由来であり得る。当業者に認識されるように、キメラ受容体を膜に固定するために適切に機能するTMドメインを使用することができる。膜貫通ドメインに関して、キメラTCRは、キメラTCRの細胞外ドメインに融合した膜貫通ドメインを含むように設計することができる。一実施形態では、キメラTCR中のドメインの1つに天然に付随する膜貫通ドメインが使用される。いくつかの例では、膜貫通ドメインを選択またはアミノ酸置換によって修飾し、そのようなドメインが同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインと結合するのを避け、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えることができる。

30

【0041】

膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源から誘導され得る。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。本発明において特に有用な膜貫通領域は、T細胞受容体、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154のアルファ、ベータまたはゼータ鎖に由来し得る(すなわち、少なくともそれらの膜貫通領域(単数または複数)を含む)。あるいは、膜貫通ドメインは合成であってもよく、この場合、それはロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含み得る。特定の実施形態では、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが合成膜貫通ドメインの各末端に見られる。場合により、特定の実施形態では、長さが1または2~約10、11、12、13、14、または15アミノ酸の短いリンカーは、キメラTCRの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間に結合を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に

40

50

適切なリンカーを提供する。

【0042】

特定の実施形態では、キメラTCRの膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインである。いくつかの例では、本明細書で使用するキメラTCRの膜貫通ドメインは、CD8ヒンジドメインを含む。特定の実施形態では、膜貫通ドメインはCD28膜貫通ドメインであり、共刺激領域がCD28に由来する実施形態では特にそうであり、体部分が、実施される必要がある増幅/クローニング工程の数を最小にすることが便宜上の問題であるためである。したがって、ある実施形態では、TMドメインは、キメラTCRの共刺激または細胞内シグナル伝達ドメインと同じ分子に由来し得る。しかし、これは必須ではなく、TMドメインは、CD8およびCD3ゼータ膜貫通ドメインを含むが、これに限定されない任意の適切な膜貫通タンパク質に由来し得る。

10

【0043】

TCR定常ドメイン：本発明の改変TCRで使用される定常ドメインは、TCRアルファ鎖またはTCRベータ鎖に由来し得る。そのような定常ドメインは当該技術分野で知られており、公開配列データベースから入手可能である。

【0044】

特定の実施形態では、1つ以上のジスルフィド結合は、本発明の改変TCRに含まれる定常ドメイン配列のアミノ酸残基を連結し得る。一実施形態では、ジスルフィド結合は、天然TCRにおいてベータ炭素原子が0.6nm未満で離れているアミノ酸残基に対応するシステイン残基間にある。例えば、ジスルフィド結合は、TRAC*01のエクソン1のThr 48およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエクソン1のSer 57またはその非ヒト等価物に対して置換されたシステイン残基間にあってもよい。システインが導入され、ジスルフィド結合を形成し得る他の部位は、TCR.アルファ.鎖のTRAC*01ならびにTCR.ベータ.鎖のTRBC1*01またはTRBC2*01のエクソン1における以下の残基である。

20

【表1】

TCRアルファ鎖	TCRベータ鎖	天然ベータ炭素間隔 (nm)
Thr 45	Ser 77	0.533
Tyr 10	Ser 17	0.359
Thr 45	Asp 59	0.560
Ser 15	Glu 15	0.59

30

【0045】

上記で言及された非天然ジスルフィド結合に加えて、本発明のTCRの二量体TCRまたはscTCR形態は、天然TCR中のジスルフィド結合によって連結されたものに対応する残基間のジスルフィド結合を含み得る。

【0046】

(可溶性TCR)

いくつかの実施形態では、改変TCRは可溶性TCRである。一般に、「可溶性TCR」は、その膜貫通領域を除去するように切断されたTCR鎖を含む。例えば、特許文献4には、切断型TCR鎖の会合を促進するための非天然ジスルフィド鎖間結合を有する可溶性TCRの生成および試験が記載されている。他の潜在的に適切な可溶性TCR設計の詳細は、鎖の会合を容易にするためにそのC末端に融合した異種ロイシンジッパーを利用する非ジスルフィド結合切断型TCR鎖の生成を記載した特許文献2、およびペプチドリンカーを介してTCRV鎖に共有結合したTCRV鎖を含む一本鎖可溶性TCRの生成を記載している特許文献5で見ることができる。Boulterらは、可溶性の機能的かつ安定なTCRヘテロ二量体の製造方法も記載している(非特許文献39を参照)。さらなる実施形態では、本明細書に記載の可溶性

40

50

TCRは、例えば、IL-2または他のサイトカインなどの異種タンパク質、抗体のFcドメインなどに融合したキメラであり得る。例示的な可溶性TCR融合タンパク質は、例えば、非特許文献40；非特許文献41；非特許文献42に記載されている。

【0047】

(改変TCRの機能的変異体および部位)

本明細書に記載のTCRの機能的変異体も検討される。本明細書で使用する用語「機能的変異体」は、親TCRと実質的または有意な配列同一性または類似性を有するTCRを指し、機能的変異体は、親TCRの生物学的活性を保持するが、そのTCRは変異体である。機能的変異体は、例えば、親TCRが抗原特異性を有するか、または親ポリペプチドまたはタンパク質が特異的に結合するNY-ESO-1ポリペプチド/MHC複合体に、親TCRと同程度、同じ程度、またはより高い程度で特異的に結合する能力を保持する本明細書に記載のTCRの変異体を包含する。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、本明細書で提供される配列表に記載のベータ鎖可変ドメインアミノ酸配列などの親TCRのベータ鎖可変ドメインアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むベータ鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、機能的変異体は、配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3に記載のV CDR3アミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるV CDR3アミノ酸配列を含む。

10

【0048】

いくつかの実施形態では、機能的変異体は、親TCRのアルファ鎖可変ドメインアミノ酸配列、例えば本明細書で提供される配列表に記載のアルファ鎖可変ドメインアミノ酸配列などと少なくとも50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むアルファ鎖可変ドメインを含む。

20

【0049】

いくつかの実施形態では、機能的変異体のアミノ酸配列は、例えば、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する親TCRのアミノ酸配列を含むことができる。保存的アミノ酸置換は当該技術分野で知られており、特定の物理的および/または化学的性質を有する1つのアミノ酸を同じ化学的または物理的性質を有する別のアミノ酸と交換するアミノ酸置換を含む。例えば、保存的アミノ酸置換は、酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸（例えば、AspまたはGlu）での置換、非極性側鎖を有するアミノ酸の非極性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val、など）での置換、塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸（Lys、Arg、など）での置換、極性側鎖を有するアミノ酸の極性側鎖を有する別のアミノ酸（Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr、など）での置換などが挙げられる。

30

【0050】

代替的または追加的に、機能的変異体は、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を有する親TCRのアミノ酸配列を含むことができる。この場合、非保存的アミノ酸置換は、機能的変異体の生物学的活性を妨害または阻害しないことが好ましい。好ましくは、非保存的アミノ酸置換は、親TCR、ポリペプチド、またはタンパク質と比較して機能的変異体の生物学的活性が増加するように、機能的変異体の生物学的活性を増強する。

40

【0051】

機能的変異体のアミノ酸配列のアミノ酸置換（単数または複数）は、アミノ酸配列の任意の領域内にあり得る。例えば、いくつかの実施形態では、アミノ酸置換（単数または複数）は、機能的変異体の可変領域または定常領域をコードするアミノ酸配列の領域内に位置する。アミノ酸置換（単数または複数）が可変領域をコードするアミノ酸配列（例えば、配列番号：1などのV CDR3アミノ酸配列）の領域内に位置する場合、アミノ酸置換（単数または複数）は、親TCRが抗原特異性を有するペプチド-MHC複合体に結合する機能的変異体の能力を有意に減少させないことが理解される。

50

【 0 0 5 2 】

改変TCRの機能的部位も提供される。いくつかの実施形態では、機能的部位は、機能的部位が配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含むV鎖の一部を含むという条件で、親TCRの連続アミノ酸を含む任意の部位を含むことができる。用語「機能的部位」は、TCRに関して使用される場合、TCRの一部（親TCR）の生物学的活性を保持する、本発明のTCRの任意の部位またはフラグメントを指す。機能的部位は、例えば、NY-ESO-1ペプチド-MHC複合体に、親TCRとして特異的に結合する能力を保持するTCRの部位を包含する。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態では、機能的部位は、TCR部位の生物学的機能を妨げない部分のアミノ末端もしくはカルボキシ末端、または両末端に追加のアミノ酸を含む。

10

【 0 0 5 4 】

本明細書に記載のTCR（機能的部位および機能的変異体を含む）は、1つ以上の天然に存在するアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を任意に含む。そのような合成アミノ酸は、当該技術分野で知られており、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノ-n-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、トランス-3-およびトランス-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 β -フェニルセリン、 β -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 β -ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リシン、N',N'-ジベンジル-リシン、6-ヒドロキシリシン、オルニチン、 γ -アミノシクロペンタンカルボン酸、 γ -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 γ -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 γ -(2-アミノ-2-ノルボルナン)カルボン酸、 γ -ジアミノ酪酸、 γ -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、および-tert-ブチルグリシンが挙げられる。

20

【 0 0 5 5 】

本明細書に記載のTCR（機能的部位および機能的変異体を含む）は、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、N-アシル化、例えばジスルフィド架橋を介して環化することができ、もしくは酸付加塩に変換することができ、および/または任意に二量化もしくは重合、もしくは共役させることができる。

30

【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態では、NY-ESO-1/MHC複合体に特異的な本明細書に記載のCDR3配列を含むTCRの存在を同定することが望ましい。TCRの存在を同定する方法には、Adaptive Bio technologies（シアトル、ワシントン州）から市販されているIMMUNOSEQ（登録商標）などのディープシーケンシング戦略が挙げられる。非特許文献43；非特許文献44を参照。IMMUNOSEQを実施例2～7で使用し、本明細書中のTCR CDR3配列を発見したが、本明細書に記載のCDR3配列の存在を検出する方法はこの方法に限定されない。TCR CDR3配列をコードする特定のヌクレオチド配列の有無を検出する任意の技術が、本明細書での使用に検討される。さらに、本明細書に記載のV CDR3アミノ酸配列を有する公開TCRは、この目的のために開発されたモノクローナル抗体を用いるイムノアッセイによって直接検出され得る。使用され得るイムノアッセイには、限定されないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素アッセイ、ゲル拡散沈降アッセイ、免疫放射線測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質A、イムノアッセイ、および補体結合アッセイなどの技術を用いる競合アッセイシステムが挙げられる。そのようなアッセイは型どおりであり、当該技術分野で知られている（例えば、非特許文献45を参照）。さらに、非特許文献46に記載されているような型どおりの交差ブロッキングアッセイを行うことができる。核酸ベースのアッセイまたはタンパク質ベースの検出アッセイのいずれかを用いて、個体において、本明細書に記載のV CDR3アミノ酸配列を含むTCRを有するT細胞の有無を決定することができる。

40

【 0 0 5 7 】

50

(核酸、ベクターおよび細胞)

本明細書に記載の改変TCR(またはその機能的部位および機能的変異体)のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸も検討される。

【0058】

本明細書で使用する「核酸」は、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸分子」を含み、一般にDNAまたはRNAのポリマーを意味し、それは一本鎖または二本鎖、合成された、または天然源から得られた(例えば、単離および/もしくは精製された)ものであってよく、天然の、非天然のまたは改変されたヌクレオチドを含有することができ、天然の、非天然のまたは改変されたヌクレオチド間結合、例えばホスホロアミデート結合またはホスホロチオエート結合などを、未修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間に見られるホスホジエステルの代わりに含有することができる。核酸がいかなる挿入、欠失、逆位および/または置換も含まないことが一般に好ましい。しかしながら、場合によっては、本明細書で考察されるように、核酸が1つ以上の挿入、欠失、逆位、および/または置換を含むことが適切な場合がある。

10

【0059】

好ましくは、本明細書に記載の核酸は組み換え体である。本明細書で使用する用語「組み換え」は、(i)天然または合成の核酸セグメントを、生細胞内で複製することができる核酸分子に結合させることによって生細胞の外で構築される分子、または(ii)上記(i)に記載されたものの複製から生じる分子を指す。本明細書の目的のために、複製はin vitro複製またはin vivo複製であり得る。

20

【0060】

核酸は、当該技術分野で知られている手順または市販されている(例えば、Genscript、Thermo Fisherおよび同様の会社からの)手順を用いる化学合成および/または酵素ライゲーション反応に基づいて構築することができる。例えば、上記のSambrookら、および上記のAusubelらを参照。例えば、天然に存在するヌクレオチドまたは分子の生物学的安定性を増加させるために、もしくはハイブリダイゼーション時に形成される二本鎖の物理的安定性を増加させるように設計された種々の修飾ヌクレオチド(例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチド)を用いて、核酸を化学的に合成することができる。核酸を生成するために使用され得る修飾ヌクレオチドの例には、限定されないが、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-置換アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、および2,6-ジアミノプリンが挙げられる。あるいは、本発明の核酸の1つ以上は、Macro molecular Resources(フォートコリンズ、コロラド州)およびSynthegen(ヒューストン、テキサス州)などの会社から購入することができる。

30

40

【0061】

核酸は、改変TCR、ポリペプチド、もしくはタンパク質、またはそれらの機能的部位もしくは機能的変異体のいずれかをコードする任意のヌクレオチド配列を含むことができる。

【0062】

本開示は、単離または精製された核酸の変異体も提供し、ここで変異体核酸は、親TCR

50

をコードするヌクレオチド配列と少なくとも75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態では、本開示は、本明細書の配列表に提供されるヌクレオチド配列と少なくとも75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヌクレオチド配列を含む単離または精製された核酸を提供し、ここでそのような変異体ヌクレオチド配列は、少なくとも親TCRだけでなく、その同種MHC-ペプチド複合体（例えば、NY-ESO-1ペプチド/MHC複合体）を特異的に認識する機能的TCRをコードする。

【0063】

本開示はまた、本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、またはストリンジェントな条件下で本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む単離または精製された核酸を提供する。

10

【0064】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列は、好ましくは高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。「高ストリンジェンシー条件」とは、ヌクレオチド配列が、非特異的ハイブリダイゼーションよりも強く検出できるほどの量で標的配列（本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列）に特異的にハイブリダイズすることを意味する。高ストリンジェンシー条件は、正確に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、またはごく少数の散在したミスマッチを含むポリヌクレオチドを、ヌクレオチド配列と一致する少数の小さな領域（例えば、3~10塩基）を有するランダム配列から区別する条件が含まれる。そのような小さな領域の相補性は、14~17塩基以上の完全長の相補鎖よりも容易に融解し、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションによりそれらを容易に区別することができる。比較的高いストリンジェンシー条件には、例えば、約0.02~0.1M NaClまたは等価物によって、約50~70の温度で提供されるような、低塩および/または高温条件が含まれる。そのような高ストリンジェンシー条件は、ヌクレオチド配列と鋳型または標的鎖との間のミスマッチを、もしあっても、ほとんど許容せず、本明細書に記載のTCRのいずれかの発現を検出するのに特に適している。さらなる量のホルムアミドの添加により、条件をより厳しくすることができることは一般的に理解されている。

20

30

【0065】

特定の実施形態では、本明細書に記載の核酸を、様々な異なるタイプのベクターのいずれかに組み込むことができる。これに関して、本開示は、本明細書に記載の任意の1つ以上の核酸を含む1つ以上の組み換え発現ベクターを提供する。本明細書の目的のために、用語「組み換え発現ベクター」は、構築物がmRNA、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む場合、宿主細胞によるmRNA、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの発現を可能にする遺伝子改変オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド構築物を意味し、ベクターを、細胞内で発現するmRNA、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを有するのに十分な条件下で細胞と接触させる。本明細書に記載のベクターは、全体としては天然に存在しない。しかしながら、ベクターの一部は天然に存在し得る。本明細書に記載の組み換え発現ベクターは、限定されないが、DNAおよびRNAを含む任意のタイプのヌクレオチドを含むことができ、それは一本鎖または二本鎖、合成された、または天然源から部分的に得られたものであってよく、天然の、非天然のまたは改変されたヌクレオチドを含有することができる。組み換え発現ベクターは、天然に存在する、天然に存在しないヌクレオチド間結合、または両方のタイプの結合を含むことができる。好ましくは、非天然もしくは改変ヌクレオチドまたはヌクレオチド間結合は、ベクターの転写または複製を妨害しない。

40

【0066】

本明細書に記載の組み換え発現ベクターは、任意の適切な組み換え発現ベクターであってよく、任意の適切な宿主を形質転換、トランスフェクトまたは形質導入するために使用

50

され得る。適切なベクターには、増殖および拡大のために、もしくは発現のために、またはその両方のために設計された、プラスミドおよびウイルスなどのベクターが挙げられる。ベクターは、pUCシリーズ (Fermentas Life Sciences)、pBluescriptシリーズ (Stratagene、ラホヤ、カリフォルニア州)、pETシリーズ (Novagen、マディソン、ウィスコンシン州)、pGEXシリーズ (Pharmacia Biotech、ウプサラ、スウェーデン)、およびpEXシリーズ (Clontech、パロアルト、カリフォルニア州) および他の市販のプラスミドベクターからなる群より選択することができる。G10、GT11、ZapII (Stratagene)、EMBL4、および NM1149などのバクテリオファージベクターも使用することができる。植物発現ベクターの例としては、pBI101、pBI101.2、pBI101.3、pBI121およびpBIN19 (Clontech) が挙げられる。動物発現ベクターの例には、pEUK-C1、pMAMおよびpMAMneo (Clontech) が挙げられる。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、本明細書で用いるベクターはウイルスベクターであり、例えば、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターなどのレトロウイルスベクターである。「レンチウイルス」は、分裂細胞および非分裂細胞に感染することができるレトロウイルス属を指す。レンチウイルスのいくつかの例には、HIV (ヒト免疫不全ウイルス: HIV1型およびHIV2型を含む) ; ウマ伝染性貧血ウイルス; ネコ免疫不全ウイルス (FIV) ; ウシ免疫不全ウイルス (BIV) ; およびサル免疫不全ウイルス (SIV) が挙げられる。

【0068】

例示的なレンチウイルスベクターには、限定されないが、HIV-1、HIV-2、FIV、ウマ感染性貧血ウイルス、SIVおよびマエディノビスナウイルス由来のベクターが挙げられる。TCR導入遺伝子を含むウイルス粒子で哺乳動物標的細胞を形質導入するために、ウイルスベクター、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターならびにパッケージング細胞を使用する方法は当該技術分野でよく知られており、これまでに、例えば、特許文献6 ; 非特許文献47 ; 非特許文献29 ; 非特許文献48 ; 非特許文献49 ; 非特許文献50に記載されている。レトロウイルスおよびレンチウイルスベクター構築物ならびに発現系も市販されている。

20

【0069】

組み換え発現ベクターは、例えば、非特許文献51または上記のSambrookらおよび上記のAusubelらに記載の標準組み換えDNA技術を用いて調製することができる。環状または線状である発現ベクターの構築物は、原核または真核宿主細胞において機能的な複製系を含むように調製することができる。複製系は、例えば、ColE1、2 μ プラスミド、SV40、ウシパピローマウイルスなどから誘導することができる。

30

【0070】

いくつかの実施形態では、組み換え発現ベクターは、必要に応じてベクターがDNAベースであるかRNAベースであるのかを考慮して、ベクターが導入される宿主のタイプ (例えば、細菌、真菌、植物、または動物) に特異的な転写および翻訳開始ならびに終止コドンなどの調節配列を含む。

【0071】

組み換え発現ベクターは、形質転換またはトランスフェクトされる宿主の選択を可能にする1つ以上のマーカー遺伝子を含むことができる。マーカー遺伝子は、殺生剤耐性、例えば、抗生物質、重金属などに対する耐性、栄養要求性宿主において原栄養性を提供する相補性などを含む。本発明の発現ベクターに適切なマーカー遺伝子には、例えば、ネオマイシン/G418耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、およびアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。

40

【0072】

組み換え発現ベクターは、改変TCR、ポリペプチド、もしくはタンパク質 (その機能的部位および機能的変異体を含む) をコードするヌクレオチド配列に、または機能的TCRをコードする変異体ヌクレオチド配列に、または修飾TCR、ポリペプチド、もしくはタンバ

50

ク質をコードするヌクレオチド配列に相補的であるかまたはそれにハイブリダイズするヌクレオチド配列に作動可能に連結された天然または非天然プロモーターを含むことができる。例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的および発生特異的なプロモーターの選択は、当業者の通常の技術の範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモーターとの組み合わせも当業者の技術の範囲内である。プロモーターは、非ウイルスプロモーターもしくはウイルスプロモーター、例えばサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター、EF1 プロモーター、ユビキチンプロモーター、MHCクラスIもしくはIIプロモーター、T細胞特異的プロモーター、サイトカインプロモーター、またはネズミ幹細胞ウイルスの長末端反復に見られるプロモーターであり得る。特定の実施形態では、プロモーターは合成プロモーターである。

10

【0073】

本明細書で論じるように、ウイルスベクターが使用されるそれらの実施形態では、ウイルスベクターゲノムは、標的細胞において発現するのが望ましい目的の配列を含む。レトロウイルスベクターに関して、典型的には、目的の配列 (例えば、本明細書に記載の改変TCRをコードする核酸) は、5'LTRと3'LTR配列 (または特定の実施形態において使用され得るような部分的5'および3'LTR配列) との間に位置する。特定の実施形態では、目的の配列は、他の遺伝子要素、例えばプロモーターまたはエンハンサーを含む転写調節配列と機能的関係にあり、特定の様式で目的の配列の発現を調節する。いくつかの例では、有用な転写調節配列は、活性に関して、時間的および空間的に高度に調節されるものである。要素の発現を調節するために使用され得る発現制御要素は、当該技術分野で知られており、限定されないが、誘導性プロモーター、構成的プロモーター、分泌シグナル、エンハンサーおよび他の調節要素を含む。

20

【0074】

目的の配列および任意の他の発現可能な配列は、典型的には、内部プロモーター/エンハンサー調節配列と機能的関係にある。「内部」プロモーター/エンハンサーは、ウイルスベクター構築物中の5'LTRと3'LTR配列 (またはそれらの部分配列) との間に位置し、目的の配列に作動可能に連結されたものである。内部プロモーター/エンハンサーは、それが機能的関係にある核酸の発現を増加させることが知られている任意のプロモーター、エンハンサーまたはプロモーター/エンハンサーの組合せであり得る。「機能的関係」および「作動可能に連結された」とは、プロモーターおよび/またはエンハンサーが適切な分子と接触した際に目的の配列が発現されるプロモーターおよび/またはエンハンサーに対して、配列が正確な位置および方向にあることを意味するが、これに限定されない。

30

【0075】

内部プロモーター/エンハンサーの選択は、目的の配列の所望の発現パターンおよび既知のプロモーター/エンハンサーの特異的特性に基づく。したがって、内部プロモーターは構成的に活性であり得る。使用され得る構成的プロモーターの非限定的な例には、ユビキチンのプロモーター (特許文献7; 特許文献8、その各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、CMV (非特許文献52; 特許文献9、その各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、ベータ-アクチン (非特許文献53、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) およびpgk (例えば、非特許文献54; 非特許文献55; および非特許文献56を参照、前述の各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。いくつかの実施形態では、ベクター (例えば、偽型レトロウイルスベクターゲノム) にコードされる目的の配列 (例えば、本明細書に記載の改変TCR) の発現を制御するために使用されるプロモーターは、イントロン欠損プロモーターである。いくつかの実施形態では、ヒトユビキチン-C (UbiC) プロモーターを使用し、ウイルスベクターゲノムにコードされるTCRの発現を制御する。様々な実施形態では、UbiCプロモーターはイントロンを除去するように修飾されており、すなわち、プロモーターはイントロン欠損である。全長UbiCプロモーターは1250ヌクレオチドである。イントロンは412から始まり、終わりまで及ぶ (412~1250)。この領域は、異種ウイルスゲノム転写物を最小限に抑える目的で削除することができる。HIVウイルスゲノムはその中に天然イントロンを有する。した

40

50

がって、UbiCプロモーターを含むレンチウイルスは、レンチウイルスゲノム中に合計2つのイントロンを有するであろう。UbiCイントロンは、スプライシングされた形態とスプライシングされていない形態の両方で存在することができる。UbiCイントロンの欠失は、異種ウイルス転写物の可能性を排除し、送達された偽型レンチウイルス粒子の同質性を確実にする。

【0076】

あるいは、プロモーターは、組織特異的プロモーターであってもよい。いくつかの好ましい実施形態では、プロモーターは標的細胞特異的プロモーターである。例えば、プロモーターは、樹状細胞、T細胞、NK細胞によって発現される任意の産物からのものであってよく、限定されないが、IL-2、IL-2R、インターフェロン、MHCクラスI、MHCクラスII、CD3、CD11c、CD103、TLR、DC-SIGN、BDCA-3、DEC-205、DCIR2、マンノース受容体、デクチン-1、Clec9Aが挙げられる。さらに、目的の配列の誘導発現を可能にするためにプロモーターを選択してもよい。誘導可能な発現の多くの系が当該技術分野で知られており、テトラサイクリン応答系、lacオペレーター-リプレッサー系、ならびに様々な環境または生理学的変化に応答するプロモーター、例えば熱ショック、金属イオンではメタロチオネインプロモーターなど、インターフェロン、低酸素症、ステロイドではプロゲステロンまたはグルココルチコイド受容体プロモーターなど、放射線ではVEGFプロモーターなどが挙げられる。目的の遺伝子の所望の発現を得るために、プロモーターの組み合わせを使用してもよい。当業者は、目的の生物または標的細胞における遺伝子の所望の発現パターンに基づいてプロモーターを選択することができるであろう。

10

20

【0077】

ウイルスゲノムは、少なくとも1つのRNAポリメラーゼIIまたはIII応答性プロモーターを含み得る。このプロモーターは目的の配列に作動可能に連結することができ、終止配列に連結することもできる。さらに、1つより多くのRNAポリメラーゼIIまたはIIIプロモーターが組み込まれ得る。RNAポリメラーゼIIおよびIIIプロモーターは、当業者によく知られている。RNAポリメラーゼIIIプロモーターの適切な範囲は、例えば、非特許文献57において見ることができ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。RNAポリメラーゼIIまたはIIIプロモーターは、RNAポリメラーゼIIまたはIIIに下流のRNAコード配列を転写させることができる任意の合成または改変DNAフラグメントも含む。さらに、RNAポリメラーゼIIまたはIII (Pol IIもしくはIII) プロモーターまたはウイルスベクターゲノムの一部として使用されるプロモーターは、誘導性であり得る。任意の適切な誘導性Pol IIまたはIIIプロモーターが、本開示の方法と共に使用され得る。特に適切なPol IIまたはIIIプロモーターには、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる非特許文献58および非特許文献59で提供されるテトラサイクリン応答性プロモーターが含まれる。

30

【0078】

内部エンハンサーはウイルス構築物中に存在し、目的の遺伝子の発現を増加させてもよい。例えば、CMVエンハンサー（非特許文献60；参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を使用してもよい。HIV、CMV、および哺乳動物ゲノムなどのウイルスゲノムの多くのエンハンサーが同定され、特性評価されている（GenBank参照）。エンハンサーは、異種プロモーターと組み合わせて使用されてよい。当業者は、所望の発現パターンに基づいて適切なエンハンサーを選択することができるであろう。

40

【0079】

ウイルスベクターゲノムは、追加の遺伝的要素も含み得る。構築物に含まれ得る要素のタイプは、決して限定されず、特定の結果を達成するために選択され得る。例えば、標的細胞におけるウイルスゲノムの核内進入を促進するシグナルが含まれ得る。そのようなシグナルの例は、HIV-1 cPPT/CTSである。さらに、標的細胞におけるプロウイルス組み込み部位の特性評価を容易にする要素が含まれていてもよい。例えば、tRNAアンバーサプレッサー配列が構築物に含まれていてもよい。例えば、ニワトリ-グロビン由来のインスレーター配列もウイルスゲノム構築物に含まれ得る。この要素は、メチル化およびヘテロクロマチン化効果のために、標的細胞中の統合されたプロウイルスをサイレンシングする機

50

会を減少させる。さらに、インスレーターは、内部エンハンサー、プロモーターおよび外因性遺伝子を、染色体上の組み込み部位における周囲のDNAからのポジティブまたはネガティブな位置効果から遮蔽することができる。さらに、ベクターゲノムは、目的の遺伝子の発現を増強するように設計された1つ以上の遺伝子要素を含み得る。例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス応答要素（WRE）が構築物中に入れられてもよい（非特許文献61；非特許文献62、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【0080】

ウイルスベクターゲノムは、典型的には、パッケージング細胞またはプロデューサー細胞株にトランスフェクトされ得るプラスミド形態で構築される。プラスミドは、一般に、細菌におけるプラスミドの複製に有用な配列を含む。そのようなプラスミドは、当該技術分野でよく知られている。さらに、原核生物の複製起点を含むベクターは、その発現が薬剤耐性などの検出可能なまたは選択可能なマーカーを付与する遺伝子も含み得る。典型的な細菌薬剤耐性産物は、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対する耐性を与えるものである。

【0081】

本発明の組み換え発現ベクターを、一過性発現のために、安定した発現のために、またはその両方のために設計することができる。また、組み換え発現ベクターを、構成的発現または誘導発現のために作製することができる。

【0082】

さらに、組み換え発現ベクターを、自殺遺伝子を含むように作製することができる。本明細書において使用される用語「自殺遺伝子」は、自殺遺伝子を発現する細胞を死滅させる遺伝子を指す。自殺遺伝子は、薬剤、例えば薬物に対する感受性を、遺伝子が発現される細胞に付与する遺伝子であってもよく、細胞が薬剤に接触またはさらされた場合に細胞を死滅させる。自殺遺伝子は当該技術分野で知られており（例えば、非特許文献63を参照）、例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、およびニトロレダクターゼが挙げられる。

【0083】

本明細書に記載の組み換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞も提供される。本明細書で使用される用語「宿主細胞」は、本発明の組み換え発現ベクターを含み得る任意のタイプの細胞を指す。宿主細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、菌類、もしくは藻類であってもよく、または原核細胞、例えば、細菌または原生動物であってもよい。宿主細胞は、培養細胞または初代細胞であってもよく、すなわち、生物、例えばヒトから直接単離されてもよい。宿主細胞は、付着細胞または懸濁細胞、すなわち、懸濁液中で増殖する細胞であり得る。適切な宿主細胞は当該技術分野で知られており、例えば、DH5 大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、サルVERO細胞、COS細胞、HEK293細胞、293F、293T細胞などが挙げられる。特に、本明細書に記載のTCRの送達のためにウイルス粒子を生成する目的で、293Fおよび293T宿主細胞が使用され得る。組み換え発現ベクターを増幅または複製する目的で、宿主細胞は原核細胞、例えば、DH5 細胞であってもよい。組み換え修飾TCR、ポリペプチド、またはタンパク質を産生する目的のために、宿主細胞は哺乳動物細胞であってもよい。特定の実施形態では、宿主細胞はヒト細胞である。宿主細胞は、任意の細胞型であり得るか、任意のタイプの組織に由来し得るか、任意の発生段階であり得る。特定の実施形態では、宿主細胞は末梢血リンパ球（PBL）である。特定の実施形態では、宿主細胞はT細胞である。

【0084】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のベクターは、本明細書に記載のTCR（または機能的変異体もしくは部位）をコードする。これに関して、TCRがヘテロ二量体TCRである実施形態では、TCRベータ鎖およびTCRアルファ鎖の両方を同じベクターから発現させてもよく、または同じ宿主細胞内の異なるベクターから発現させ、機能的二量体TCRが細胞の表面で発現されるようにしてもよい。TCRが一本鎖TCRである他の実施形態では、本明細

10

20

30

40

50

書に記載のベクターは、本明細書に記載の一本鎖TCRまたは他の形態のTCRをコードする核酸を含む。

【0085】

さらなる実施形態では、本明細書に記載のベクターは、1つより多くの産物をコードし得る。この点に関して、送達される配列は、本明細書に記載のTCRをコードする核酸を、少なくとも1つのタンパク質、少なくとも1つのsiRNA、少なくとも1つのマイクロRNA、少なくとも1つのdsRNAもしくは少なくとも1つのアンチセンスRNA分子またはそれらの任意の組み合わせをコードする複数の遺伝子をコードする目的の他の核酸に加えて含むことができる。例えば、送達される配列は、1つ以上のTCRをコードする1つ以上の遺伝子を含むことができる。1つ以上のTCRは、単一の疾患または障害と関連し得るか、またはそれらは、複数の疾患および/または障害と関連し得る。いくつかの例では、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を、本明細書に記載のTCRをコードする遺伝子と共に含むことができ、その組み合わせは、所望の方向および大きさに対する免疫応答を誘発および調節することができる。他の例では、siRNA、マイクロRNA、dsRNAまたはアンチセンスRNA分子をコードする配列は、本明細書に記載のTCRをコードする遺伝子で構築することができ、その組み合わせは免疫応答の範囲を調節することができる。産物は、コード配列が1つのプロモーターと機能的関係にある最初の融合産物として産生され得る。あるいは、産物は、別々にコードされてもよく、各コード配列はプロモーターと機能的関係にあるものであってもよい。プロモーターは同一であっても異なってもよい。

10

【0086】

いくつかの実施形態では、ベクターは、免疫調節分子をコードするポリヌクレオチド配列を含む。例示的な免疫調節分子には、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、インターフェロンガンマ、TNF、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40、CD40リガンド(CD40L)、薬物誘導性CD40(iCD40)など、またはそれらに結合するリガンドもしくは一本鎖抗体が挙げられる。これらのポリヌクレオチドは、典型的には、宿主細胞におけるコード配列の発現を導く1つ以上の調節要素の制御下にある。

20

【0087】

特定の実施形態では、本明細書に記載のベクターは、チェックポイント阻害剤を発現し得る。チェックポイント阻害剤は、本明細書に記載のTCRと同じベクターから、または別個のベクターから発現され得る。免疫チェックポイントは、自己寛容を維持し、免疫応答の持続時間および振幅を調節するのに重要な免疫系の様々な阻害経路を指す。腫瘍は、特定の免疫チェックポイント経路を、特に腫瘍抗原に特異的なT細胞に対する免疫抵抗性の主要なメカニズムとして使用する。(例えば、非特許文献64;非特許文献65を参照)。本開示は、本明細書に記載の発現ベクターから、本明細書に記載のTCRと一緒に発現され得る免疫チェックポイント阻害剤を提供する。例示的なチェックポイント阻害剤には、免疫チェックポイント受容体に結合し、遮断もしくは阻害する抗体、もしくはその抗原結合フラグメント、または免疫チェックポイント受容体リガンドに結合し、遮断もしくは阻害する抗体もしくはその抗原結合フラグメントが挙げられる。遮断または阻害の標的とすることができる例示的な免疫チェックポイント分子には、限定されないが、CTLA-4、4-1BB(CD137)、4-1BBL(CD137L)、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4(CD2ファミリーの分子に属し、全NK、および記憶CD8⁺()T細胞上に発現する)、CD160(BY55とも呼ばれる)ならびにCGEN-15049が挙げられる。免疫チェックポイント阻害剤には、CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、TIM3、B7H3、B7H4、VISTA、KIR、2B4、CD160およびCGEN-15049の1つ以上に結合し、それらの活性を遮断もしくは阻害する抗体、またはその抗原結合フラグメント、または他の結合タンパク質が挙げられる。例示的な免疫チェックポイント阻害剤には、トレメリムマブ(CTLA-4遮断抗体)、抗OX40、PD-L1モノクローナル抗体(抗B7-H1;MED14736)、MK-3475(PD-1遮断剤)、ニボルマブ(抗PD1抗体)、CT-011(抗PD1抗体)、BY55モノクローナル抗体、AMP224(抗PDL1抗体)、BMS-936559(抗PDL1抗体)、MPLDL3280A(抗PDL1抗体)、MSB0010718C(抗PDL1抗体)およびY

30

40

50

ervoy / イピリムマブ (抗CTLA-4チェックポイント阻害剤) が挙げられる。

【0088】

本明細書のTCRを発現するための発現ベクター (例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター) は、一度に1つより多くの、例えば、2つ、3つ、または4つの目的の配列を発現するように操作することができる。単一のベクターから同時に1つより多くの配列を発現させるためのいくつかの方法が当該技術分野で知られている。例えば、ベクターは、コード配列のオープンリーディングフレーム (ORF) に融合した複数のプロモーター、コード配列間のスプライシングシグナルの挿入、その発現が単一プロモーターによって駆動される目的の配列の融合、コード配列間のタンパク質分解切断部位の挿入、コード配列間の内部リボソーム進入部位 (IRES) の挿入、コード配列間の二方向性プロモーターの挿入、および / または「自己切断」2Aペプチドを含むことができる。マルチシストロン性発現ベクターで発現される各成分は、例えば内部リボソーム進入部位 (IRES) 要素またはウイルス2A要素によって分離され、同じプロモーターからの様々なタンパク質の別個の発現を可能にする。IRES要素および2A要素は、当該技術分野で知られている (特許文献10; 非特許文献66、各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。一実施形態では、口蹄疫ウイルス (FMDV; F2A)、プタテッシュウコウイルス-1 (P2A)、ウマ鼻炎Aウイルス (ERAV; E2A)、およびthosea asignaウイルス (TaV; T2A) 由来の2A様配列と連結したフーリン切断部位配列 (RAKR) (非特許文献67、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) をコードするオリゴヌクレオチド (非特許文献68、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) を使用して、マルチシストロン性ベクター中の遺伝子要素を分離する。特定のマルチシストロン性ベクターの有効性は、標準的なプロトコールを用いて各遺伝子の発現を検出することによって容易に試験することができる。

【0089】

目的の2つ以上の配列 (例えば、TCRアルファ鎖およびTCRベータ鎖をコードする配列; 一本鎖TCRおよび免疫調節分子) の発現は、内部リボソーム進入部位 (IRES) を用いて達成することもできる。IRESは、真核生物のリボソームが5'm⁷G-キャップ構造以外の位置でmRNAに結合しスキャンすることを可能にする。内部に、例えば第1コード領域 (またはシストロン) の3'に位置する場合、IRESは同じ転写物内の第2コード領域の翻訳を可能にする。第2コード領域は、IRES後に遭遇する最初のATGによって同定される。例示的なIRES要素には、ピコルナウイルスIRESおよびカルディオウイルスIRESなどのウイルスIRES (例えば、特許文献10を参照) および5'UTRに見られる非ウイルス性IRES要素 (例えば、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP) をコードする転写物の要素 (非特許文献69); *Drosophila Antennapedia* (非特許文献70) および*Ultrabithorax* (非特許文献71); 線維芽細胞成長因子2 (非特許文献72); 開始因子eIF4G (非特許文献73); プロトオンコジーン*c-myc* (非特許文献74); および血管内皮成長因子 (VEGF) (非特許文献75) が挙げられる。

【0090】

2つ以上の目的の配列の発現は、双方向性プロモーター、すなわち、プロモーター領域または2つのバックツーバッククロニングされたプロモーターを使用して達成ことができ、その読み取り方向は互いから離れており、そこからプロモーター領域に隣接する2つのオープンリーディングフレームが転写される。そのようなプロモーターの例には、PDGF-A、神経栄養性JCウイルス、BRCA1、トランスコパラミンII、およびジペプチジルペプチダーゼIVプロモーターが挙げられる。

【0091】

(レンチウイルス粒子の産生)

特定の実施形態では、レトロウイルスベクターを用いてT細胞を形質導入し、T細胞を改造して本発明のTCRおよび本明細書に記載の他の目的の配列を発現させる。当該技術分野で既に知られている様々な方法のいずれかを使用して、そのゲノムがウイルスベクターゲノムのRNAコピーを含む感染性ウイルス、例えば、レトロウイルスおよびレンチウイルスの粒子が産生され得る。1つの方法では、ウイルスベクターゲノムは、ウイルスベクター

ゲノムから転写されたウイルスゲノムRNAをウイルス粒子にパッケージングするために必要な全成分を含むパッケージング細胞株に導入される。あるいは、ウイルスベクターゲノムは、1つ以上の目的の配列に加えて、ウイルス成分をコードする1つ以上の遺伝子を含み得る。しかしながら、標的細胞中のゲノムの複製を防止するために、複製に必要とされる内因性ウイルス遺伝子は通常除去され、パッケージング細胞株に別々に提供される。

【0092】

一般に、レトロウイルスベクター粒子は、粒子を生成するのに必要な成分を含む1つ以上のプラスミドベクターでトランスフェクトされた細胞株によって産生される。これらのレトロウイルスベクター粒子は、典型的には複製可能ではない、すなわち、それらは一回の感染のみが可能である。多くの場合、複数のプラスミドベクターを利用して、ベクター粒子を生成する様々な遺伝子成分を分離し、主に、複製可能ウイルスを生成する可能性のある組み換え事象の機会を減少させる。しかしながら、レトロウイルス成分の全てを有する単一プラスミドベクターを必要であれば使用することができる。複数のプラスミドベクターを使用する系の一例として、LTR、シス作用性パッケージング配列、および異種プロモーターに作動可能に連結されている目的の配列（単数または複数）を含むウイルスベクターゲノムを含む少なくとも1つのプラスミド（すなわちベクターゲノムプラスミド）、ウイルス酵素的および構造的成分をコードする少なくとも1つのプラスミド（すなわち、GagおよびPolなどの成分をコードするパッケージングプラスミド）、ならびにエンベロープ糖タンパク質（例えば、レトロウイルスに由来するエンベロープタンパク質、またはVSV G、シンドビスエンベロープ、麻疹ウイルスエンベロープなどの他の適切なエンベロープ糖タンパク質）をコードする少なくとも1つのエンベローププラスミドで、細胞株はトランスフェクトされる。本明細書に記載され、当該技術分野で知られているように、追加のプラスミド、例えばRev発現プラスミドを使用し、レトロウイルス粒子産生を増強することができる。ウイルス粒子は細胞膜を貫通して芽を出し、目的の配列およびエンベロープ糖タンパク質を含有するゲノムを含むコアを含む。

10

20

【0093】

パッケージング細胞の本開示のプラスミドベクターでのトランスフェクションは、よく知られている方法で行うことができ、使用方法は決して限定されない。多くの非ウイルス送達システムが当該技術分野で知られており、例えば、エレクトロポレーション、リポソームを含む脂質ベースの送達システム、「裸の」DNAの送達、およびポリシクロデキストリン化合物を用いた送達、Schatzlein AG（非特許文献76、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどが挙げられる。陽イオン性脂質または塩処理法が典型的に使用され、例えば、非特許文献77；非特許文献78を参照、前述の各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。リン酸カルシウム沈殿法が最もよく用いられる。しかし、核マイクロインジェクションおよび細菌プロトプラスト融合を含む、ベクターを細胞に導入するための他の方法も使用され得る。

30

【0094】

パッケージング細胞株は、ウイルス調節および構造タンパク質を含む成分を提供し、それらはトランスにおいてウイルスゲノムRNAのレトロウイルス（例えば、レンチウイルス）ベクター粒子へのパッケージングのために必要とされる。パッケージング細胞株は、レンチウイルスタンパク質を発現し、機能的レンチウイルスベクター粒子を産生することができる任意の細胞株であり得る。いくつかの適切なパッケージング細胞株には、293（ATCC CCL X）、293T、HeLa（ATCC CCL 2）、D17（ATCC CCL 183）、MDCK（ATCC CCL 34）、BHK（ATCC CCL-10）およびCf2Th（ATCC CRL 1430）細胞が挙げられる。パッケージング細胞株は、必要なウイルスタンパク質を安定に発現し得る。そのようなパッケージング細胞株は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる特許文献11に記載されている。あるいは、パッケージング細胞株は、ウイルスベクターゲノムとともに、1つ以上の必要なウイルスタンパク質をコードする核酸分子で一時的にトランスフェクトされ得る。得られたウイルス粒子を回収し、標的細胞に感染させるために使用する。エンベロープ糖タンパク質をコードする遺伝子（単数または複数）は、通常、pcDNA3（Invitrogen、カ

40

50

リフォルニア州、アメリカ)などの発現ベクターにクローン化される。真核生物細胞発現ベクターは当該技術分野で知られており、多くの商業的供給源から入手可能である。次いで、293T細胞などのパッケージング細胞を、目的の配列をコードするウイルスベクターゲノム(典型的には抗原をコードする)、ウイルスパッケージング成分をコードする少なくとも1つのプラスミド、および標的分子の発現のためのベクターで同時トランスフェクトする。エンベロープは、パッケージング細胞の膜上に発現され、ウイルスベクターに組み込まれる。

【0095】

本明細書で提供される目的のために、本明細書のTCRは、T細胞またはNK細胞または免疫系の他の適切な細胞で発現され得る。T細胞は、培養T細胞、例えば初代T細胞、または培養T細胞株、例えばJurkat、SupT1などからのT細胞、または哺乳動物から得られたT細胞などの、任意のT細胞であり得る。哺乳動物から得られた場合、T細胞は、限定されないが、血液、末梢血単核細胞(PBMC)、末梢血白血球(PBL)、アフエレーシス試料、骨髄、リンパ節、胸腺、または他の組織もしくは体液を含む多くの供給源から得ることができる。T細胞は富化されていても精製されていてもよい。いくつかの実施形態では、T細胞はヒトT細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は、ヒトから単離されたT細胞である。T細胞は、任意のタイプのT細胞であってよく、CD4+/CD8+二重陽性T細胞、CD4+ヘルパーT細胞、例えば、Th1およびTh2細胞、CD8+T細胞(例えば、細胞傷害性T細胞)、腫瘍浸潤細胞(TIL)、記憶T細胞、ナイーブT細胞などが挙げられる。

10

【0096】

また、本明細書に記載の少なくとも1つの細胞を含む細胞の集団が本開示によって提供される。細胞の集団は、記載の組み換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を、組み換え発現ベクターも、T細胞以外の細胞、例えば、B細胞、NK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、脳細胞などのいずれも含まない少なくとも1つの他の細胞(例えば、T細胞)に加えて含む、不均一な集団であってよい。あるいは、細胞の集団は、組み換え発現ベクターを含む(例えば、本質的にそれらからなる)細胞で集団が主に構成される、実質的に均質な集団であってよい。集団はまた、集団の全細胞が組み換え発現ベクターを含むように、集団の全細胞が組み換え発現ベクターを含む単一細胞のクローンである、細胞のクローン集団であり得る。本発明の一実施形態では、細胞の集団は、本明細書に記載の組み換え発現ベクターを含む細胞を含むクローン集団である。

20

30

【0097】

(T細胞のex vivo遺伝子改変)

上記のように、特定の実施形態では、T細胞をex vivoで遺伝子改変するために本明細書に開示のウイルスベクターを使用することが望ましい場合がある。これに関して、T細胞の供給源、T細胞の培養および増殖が記載される。

【0098】

T細胞の増殖および遺伝子改変の前に、被験体からT細胞源を得る。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む多くの供給源から得ることができる。本発明の特定の実施形態では、当該技術分野で利用可能な任意の数のT細胞株が使用され得る。本発明の特定の実施形態では、T細胞は、被験体から採取された血液の単位から、FICOLL(商標)分離などの当業者に知られている任意の数の技術を使用して得ることができる。一実施形態では、個体の循環血液からの細胞は、アフエレーシスによって得られる。アフエレーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含むリンパ球、赤血球および血小板を含有する。一実施形態では、アフエレーシスによって収集された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、その後の処理工程のために細胞を適切な緩衝液または培地に入れることができる。本発明の一実施形態では、細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄する。代替的な実施形態では、洗浄溶液はカルシウムを欠き、マグネシウムを欠いていてもよく、または全てではないにしても多くの二価陽イオンを欠いていてもよい。再び、驚くべ

40

50

きことに、カルシウムの非存在下での最初の活性化段階は、活性化を拡大させる。当業者であれば容易に理解されるように、洗浄工程は、製造元の指示に従って半自動「フロースルー」遠心分離機（例えば、Cobe 2991細胞プロセサー、Baxter CytoMate、またはHaemonetics Cell Saver 5）を用いるなど、当業者に知られている方法によって行われ得る。洗浄後、細胞を、様々な生体適合性緩衝液、例えば、Ca²⁺を含まない、Mg²⁺を含まないPBS、PlasmaLyte A、または緩衝液を含むまたは含まないその他の生理食塩水に再懸濁することができる。あるいは、アフエーシス試料の望ましくない成分を除去し、細胞を培地に直接再懸濁してもよい。

【0099】

別の実施形態では、T細胞は、赤血球を溶解し、例えばPERCOLL（商標）勾配による遠心分離または向流遠心分離による単球の枯渇により、末梢血リンパ球から単離される。CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+、およびCD45RO+T細胞などのT細胞の特定の亜集団を、陽性または陰性選択技術によってさらに単離することができる。例えば、一実施形態では、所望のT細胞の陽性選択に十分な時間の、DYNABEADS（商標）M-450 CD3/CD28 Tなどの抗CD3/抗CD28（すなわち、3X28）共役ビーズとのインキュベーションによってT細胞を単離する。一実施形態では、時間は約30分である。さらなる実施形態では、時間は、30分～36時間またはそれ以上、およびその間の全ての整数値に及ぶ。さらなる実施形態では、時間は少なくとも1、2、3、4、5、または6時間である。さらに別の好ましい実施形態では、時間は10～24時間である。好ましい一実施形態では、インキュベーション時間は24時間である。白血病患者からのT細胞の単離のために、より長いインキュベーション時間、例えば24時間の利用は、細胞収量を増加させることができる。腫瘍組織または免疫不全個体から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を単離する場合など、他の細胞タイプと比較してT細胞が少ない任意の状況において、より長いインキュベーション時間を利用してT細胞を単離してもよい。さらに、より長いインキュベーション時間の利用は、CD8+T細胞の捕捉効率を増加させることができる。したがって、T細胞がCD3/CD28ビーズに結合する時間を単純に短縮または延長することにより、および/またはT細胞に対するビーズの比を増加または減少させることにより（本明細書にさらに記載されるように）、T細胞の亜集団を、培養開始時またはプロセス中の他の時点で、優先的に取捨選択することができる。さらに、ビーズまたは他の表面上の抗CD3および/または抗CD28抗体の比率を増加または減少させることによって、T細胞の亜集団を、培養開始時または他の所望の時点で、優先的に取捨選択することができる。当業者であれば、本発明の文脈において複数回の選択を用いることも認識するであろう。特定の実施形態では、選択手順を実行し、活性化および拡張プロセスにおいて「選択されていない」細胞を使用することが望ましい場合がある。「選択されていない」細胞は、さらなる回数を選択を受けることもできる。

【0100】

陰性選択によるT細胞集団の富化は、陰性選択細胞に特有の表面マーカーに向けられる抗体の組み合わせによって達成することができる。1つの方法は、陰性磁気免疫接着または陰性選択された細胞上に存在する細胞表面マーカーに向けられたモノクローナル抗体のカクテルを用いるフローサイトメトリーによる細胞選別および/もしくは選択である。例えば、陰性選択によりCD4+細胞を富化するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、およびCD8に対する抗体を含む。特定の実施形態では、CD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+、およびFoxP3+を典型的に発現する制御性T細胞を富化するか、または陽性選択することが望ましい場合がある。あるいは、特定の実施形態では、T制御細胞は、抗CD25結合ビーズまたは他の同様の選択方法によって枯渇される。

【0101】

陽性選択または陰性選択によって所望の細胞集団を単離するために、細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の濃度を変えることができる。特定の実施形態では、ビーズおよび細胞と一緒に混合される体積を大幅に減少させ（すなわち、細胞の濃度を増加させ）、細胞およびビーズの最大の接触を確実にすることが望ましい場合がある。例えば、一実施形態では、20億細胞/mlの濃度が使用される。一実施形態では、10億細胞/mlの濃度が

10

20

30

40

50

使用される。さらなる実施形態では、1億細胞/ml超が使用される。さらなる実施形態では、1千万、1.5千万、2千万、2.5千万、3千万、3.5千万、4千万、4.5千万、または5千万細胞/mlの細胞濃度が使用される。さらに別の実施形態では、7.5千万、8千万、8.5千万、9千万、9.5千万、または1億細胞/mlの細胞濃度が使用される。さらなる実施形態では、1.25億または1.5億細胞/mlの濃度を使用することができる。高濃度を使用すると、細胞収量、細胞活性化、および細胞増殖の増加につながり得る。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの、目的の標的抗原を弱く発現し得る細胞を、または腫瘍細胞が多く存在する試料（すなわち、白血病血液、腫瘍組織など）からより効率的に捕捉することを可能にする。そのような細胞の集団は治療的価値がある場合があり、得るのが望ましいであろう。例えば、高い細胞濃度を使用することにより、通常弱いCD28発現を有するCD8+T細胞のより効率的な選択が可能になる。

10

【0102】

特定の実施形態では、例えば、その開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる特許文献12に記載されているような方法を用いて、T細胞の特定のサブタイプは単離され、本明細書に記載のレンチウイルスベクター粒子で遺伝子改変され得る。

【0103】

関連する実施形態では、より低い細胞濃度を使用することが望ましい場合がある。T細胞および表面（例えば、ビーズなどの粒子）の混合物を大幅に希釈することによって、粒子と細胞との間の相互作用が最小限に抑えられる。これは、粒子に結合する所望の抗原を大量に発現する細胞を選択する。例えば、CD4+T細胞は、より高レベルのCD28を発現し、CD8+T細胞よりもより効率的に希薄濃度で捕捉される。一実施形態では、使用する細胞の濃度は 5×10^6 /mlである。他の実施形態では、使用する濃度は、約 1×10^5 /ml ~ 1×10^6 /ml、およびその間の任意の整数値であり得る。

20

【0104】

他の実施形態では、細胞を、ローテーター上で、様々な長さの時間、可変速度で、2~10 または室温でインキュベートすることができる。

【0105】

刺激のためのT細胞はまた、洗浄工程後に凍結され得る。理論に拘束されないことを望むが、凍結およびその後の解凍工程は、顆粒球およびある程度の単球を細胞集団から除去することにより、より均一な産物を提供する。血漿および血小板を除去する洗浄工程の後、細胞を凍結溶液中に懸濁させてもよい。多くの凍結溶液およびパラメーターが当該技術分野で知られており、これに関して有用であるが、1つの方法は、20%DMSOおよび8%ヒト血清アルブミンを含むPBS、または10%デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5%DMSO、または31.25%Plasmalyte-A、31.25%デキストロース5%、0.45%NaCl、10%デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミン、および7.5%DMSOを含む培地、または、例えば、HespanおよびPlasmaLyte Aを含む他の適切な細胞凍結培地を使用することを伴い、細胞をその後毎分1 の速度で-80 に凍結させ、液体窒素貯蔵タンクの蒸気相に保存する。制御された凍結の他の方法を、-20 または液体窒素中での制御されない瞬間凍結と同様に使用することができる。

30

【0106】

特定の実施形態では、凍結保存された細胞を本明細書に記載のように解凍および洗浄し、1時間室温で静置してから本発明の方法を用いて活性化させる。

40

【0107】

本明細書に記載のように増殖された細胞が必要とされる前の時間における被験体由来の血液試料またはアフレーシス産物の採取も、本発明の文脈において検討される。このように、増殖させる細胞の供給源は、任意の必要な時点で収集することができ、T細胞などの所望の細胞は、本明細書に記載のように、T細胞治療から恩恵を受け得る任意の数の疾患または状態に対する後のT細胞療法での使用のために単離および凍結される。一実施形態では、血液試料またはアフレーシスは、通常健康な被験体から採取される。特定の実施形態では、血液試料またはアフレーシスは、疾患を発症する危険性があるが、まだ疾

50

患を発症していない通常健康な被験体から採取され、目的の細胞は、後の使用のために単離および凍結される。特定の実施形態では、T細胞を増殖、凍結させ、後で使用することができる。特定の実施形態では、試料は、本明細書に記載のような特定の疾患の診断の直後であるが、任意の治療の前に患者から収集される。さらなる実施形態では、細胞は、ナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法剤、放射線、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノラート、およびFK506、抗体、または他の免疫抑制剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、サイトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、および照射を含むが、これに限定されない任意の数の関連治療様式の前に、被験体由来の血液試料またはアフレーシスから単離される。これらの薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリン（シクロスポリンおよびFK506）を阻害するか、または成長因子誘導シグナル伝達（ラパマイシン）にとって重要なp70S6キナーゼを阻害する（非特許文献79；非特許文献80；非特許文献81）。さらなる実施形態では、細胞は患者から単離され、骨髄もしくは幹細胞移植と、フルダラビン、外照射療法（XRT）、シクロホスファミドなどの他の化学療法剤、またはOKT3もしくはCAMPATHなどの抗体のいずれかを用いたT細胞アブレーション療法と（例えば、前に、同時に、または後に）後に併用するために凍結される。別の実施形態では、細胞を事前に単離し、CD20、例えばリツキサンと反応する薬剤などのB細胞アブレーション治療後の治療で、後で使用するために凍結することができる。

10

20

30

40

50

【0108】

さらなる実施形態では、治療後すぐに患者からT細胞を得る。これに関して、ある種のがん治療後、特に免疫系に損傷を与える薬物による治療後、患者が通常は治療から回復している期間の治療の直後に、得られたT細胞の質が最適であり得ること、またはex vivoで増殖する能力が改善されていることが観察されている。同様に、本明細書に記載の方法を用いたex vivo操作後、これらの細胞は、生着の増強およびin vivo増殖に好ましい状態にあり得る。したがって、本発明の文脈内では、T細胞、樹状細胞、または造血系の他の細胞を含む血液細胞を、この回復期の間に採取することが意図される。さらに、特定の実施形態では、動員（例えば、GM-CSFでの動員）およびコンディショニングレジメンを使用して、被験体において、特定の細胞タイプの再増殖、再循環、再生および/または増殖が好ましい状態を、特に治療後の規定された時間枠の間に作り出すことができる。例示的な細胞種には、T細胞、B細胞、樹状細胞、および免疫系の他の細胞が挙げられる。

【0109】

目的の配列を発現するT細胞のex vivoでの遺伝子改変の前または後に関わらず、T細胞を当該技術分野で一般に知られている方法を用いて活性化および増殖することができる。T細胞を活性化および増殖するための例示的な方法は、例えば、特許文献13；特許文献14；特許文献15；特許文献16；特許文献17；特許文献18；特許文献19；特許文献20；特許文献21；特許文献22；特許文献23；特許文献24；特許文献25；特許文献26；特許文献27；特許文献28；ならびに特許文献12および特許文献29に記載されており、それらの開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0110】

特定の実施形態では、T細胞を、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する薬剤およびT細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドを付着させた表面と接触させることによって増殖させてもよい。特に、T細胞集団は、抗CD3抗体、もしくはその抗原結合フラグメント、または表面上に固定化された抗CD2抗体との接触により、またはプロテインキナーゼC活性化剤（例えば、プリオスタチン）とのカルシウムイオノフォアと併せての接触によるなど、本明細書に記載されるように刺激され得る。T細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞の増殖を刺激するのに適切な条件下で、T細胞の集団を抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。CD4+T細胞またはCD8+T細胞のいずれかの増殖を刺激するために、抗CD3抗体および抗CD28抗体。抗CD28抗体の例には、9.3、B-T3、XR-CD28（Diaclone、プザンソ

ン、フランス)が挙げられるが、当該技術分野で一般に知られている他の方法(非特許文献82;非特許文献83;非特許文献84)として使用することができる。

【0111】

特定の実施形態では、一次活性化シグナルは、抗CD3抗体またはその抗原結合フラグメントであり、共刺激シグナルを提供する薬剤は、抗CD28抗体またはその抗原結合フラグメントであり;両薬剤が同じビーズに分子当量で共固定化される。

【0112】

特定の実施形態では、細胞対粒子の比は、1:100~100:1の範囲、およびその間の任意の整数値であり、さらなる実施形態では、この比は1:9~9:1およびその間の任意の整数値を含み、T細胞を刺激するために使用することもできる。T細胞刺激をもたらす抗CD3および抗CD28結合粒子対T細胞の比は、上記のように変化し得るが、ある好ましい値には、1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、および15:1が挙げられ、1つの好ましい比はT細胞あたり少なくとも1:1粒子である。一実施形態では、1:1以下の粒子対細胞の比が使用される。特定の一実施形態では、好ましい粒子:細胞比は1:5である。さらなる実施形態では、粒子対細胞の比は、刺激の日に応じて変化させることができる。

10

【0113】

T細胞培養に適切な条件には、血清(例えば、ウシ胎仔またはヒト血清)、インターロイキン-2(IL-2)、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β およびTNF- α または当業者に知られている細胞の成長のための任意の他の添加剤を含む、増殖および生存に必要な因子を含み得る適切な培地(例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640またはX-vivo 15(Lonza))が挙げられる。細胞の成長のための他の添加剤には、限定されないが、界面活性剤、プラスマネート、およびN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤が挙げられる。培地は、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15およびX-Vivo 20、Optimizerを、添加アミノ酸、ビルビン酸ナトリウムおよびビタミンと共に、無血清またはT細胞の成長および増殖に十分な適量の血清(または血漿)もしくは所定のホルモンセットならびに/またはサイトカイン(単数または複数)の量を補充して含むことができる。抗生物質、例えばペニシリンおよびストレプトマイシンは、被験体に注入される細胞の培養物ではなく、実験用培養物にのみ含まれる。標的細胞は、成長を支えるために必要な条件下で、例えば適切な温度(例えば、37 $^{\circ}$ C)および大気(例えば、空気および5%CO₂)で維持される。

20

30

【0114】

異なる刺激時間にさらされたT細胞は、異なる特性を示し得る。例えば、典型的な血液またはアフレーシス末梢血単核細胞産物は、細胞傷害性またはサプレッサーT細胞集団(Tc、CD8+)よりも大きいヘルパーT細胞集団(TH、CD4+)を有する。CD3およびCD28受容体を刺激することによるT細胞のex vivoでの増殖は、約8~9日前は主にTH細胞からなるT細胞集団を産生し、約8~9日後は、T細胞の集団はTC細胞の集団を徐々に多く含むようになる。したがって、治療の目的に応じて、主にTH細胞から構成されるT細胞集団を被験体に注入することが有利であり得る。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットが単離されている場合、このサブセットをより大きく増殖させることが有益であり得る。

40

【0115】

さらに、CD4およびCD8マーカーに加えて、他の表現型マーカーは大きく変化するが、大部分は、細胞増殖プロセスの過程で再現可能に変化する。したがって、そのような再現性は、活性化T細胞産物を特定の目的のために調整する能力を可能にする。

【0116】

特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載のTCRを安定に発現するように遺伝子改変されたT細胞の使用を検討する。改変TCRを発現するT細胞は、本明細書ではキメラTCR改変T細胞と呼ばれる。好ましくは、細胞を、その表面に抗体結合ドメインを安定に発現し、MHC非依存性の新規な抗原特異性を付与するように遺伝子改変することができる。

50

【0117】

(改変T細胞を含む組成物および改変T細胞の投与)

特定の実施形態では、本開示は、本明細書に記載のレンチウイルスベクター粒子を用いて、本明細書に記載の改変TCRなどの目的の導入遺伝子を発現するように改変されたT細胞を含む組成物を提供する。そのような組成物は、本明細書にさらに記載されるように本開示の方法において被験体に投与することができる。

【0118】

本明細書に記載の改変T細胞を含む組成物は、本開示に基づいて当業者に明らかである既知の技術またはそれらのパリエーションに従って、養子免疫療法のための方法および組成物において利用され得る。例えば、Gruenbergらの特許文献30を参照；特許文献31も参照。

【0119】

いくつかの実施形態では、細胞を、最初にそれらの培地からそれらを採用し、次いで、細胞を洗浄し、投与に適した培地および容器系(「薬学的に許容される」担体)で治療有効量で富化することによって製剤化する。適切な注入媒体は、任意の等張培地製剤、典型的には通常の生理食塩水、Normosol R (Abbott) またはPlasma-Lyte A (Baxter) であり得るが、水中の5%デキストロースまたは乳酸リンゲル液も利用することができる。注入培地にヒト血清アルブミンを補充することができる。

【0120】

組成物中の治療有効量の細胞は、典型的には 10^2 細胞より大きく、最大 10^6 、最大 10^8 または 10^9 細胞を含み、 10^{10} 細胞超であり得る。細胞の数は、その中に含まれる細胞のタイプと同様に、組成物が意図される最終的な使用に依存する。例えば、特定の抗原に特異的な細胞が望ましい場合、集団は、そのような細胞を70%超、一般に80%、85%および90~95%超で含む。本明細書で提供される使用については、細胞は一般に1リットル以下の容量であり、500ml以下、さらには250mlまたは100ml以下であり得る。したがって、所望の細胞の密度は、典型的には 10^6 細胞/mlより大きく、一般的には 10^7 細胞/mlより大きく、一般的には 10^8 細胞/ml以上である。当該技術分野の臨床医によって決定されるように、臨床的意義がある免疫細胞の数を、 10^9 、 10^{10} もしくは 10^{11} 細胞または免疫細胞の適切な数に累積的に等しくなるかそれを超える複数回の注入に分配することができる。

【0121】

(診断方法および治療方法)

また、本明細書では、改変TCR(例えば、本明細書に記載の可溶性TCR、およびその融合タンパク質またはキメラタンパク質)を含む組成物；改変TCRをコードする配列を含むウイルスベクター粒子を含む組成物；またはがん(例えば、NY-ESO-1がん)を治療する方法における使用のための、もしくはNY-ESO-1を発現するがん細胞の増殖を阻害する使用のための本明細書に記載の改変TCRを発現する細胞、特にT細胞を含む組成物が提供される。

【0122】

これに関して、本明細書に記載されるのは、哺乳動物被験体におけるNY-ESO-1発現に関連するがんの治療方法であって、被験体に治療組成物を投与することを含み、前記組成物が、以下からなる群より選択される1つ以上の治療剤を含む、方法である：(a)本明細書に記載の改変TCR；(b)本明細書中に開示の改変TCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離細胞；(c)可溶性TCR、またはMHC分子に関してNY-ESO-1に特異的な可溶性TCRを含むキメラまたは融合ポリペプチド；(d)改変TCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；(e)MHC分子に関してNY-ESO-1に特異的な可溶性TCRをコードするポリヌクレオチド；(f)NY-ESO-1/MHC複合体に特異的な、本明細書の改変TCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むウイルスベクター；ここで、治療用組成物は、被験体のがんを治療するのに有効な量で被験体に投与される。本明細書に記載の治療方法およびがんの増殖を阻害する方法における使用のための本明細書に記載の改変TCRで使用する例示的なTCR配列は配列表に与えられ、配列番号：9で与えられるベータ鎖可変領域、配列番号：8で与えられるアルファ鎖可変領域を含む。

10

20

30

40

50

【0123】

これに関して、本明細書に記載されるのは、哺乳動物被験体におけるNY-ESO-1発現に関連するがんの治療方法であって、被験体に治療組成物を投与することを含み、前記組成物が、以下からなる群より選択される1つ以上の治療剤を含む、方法である：(a) NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含む改変TCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離細胞であって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含むか；またはベータ鎖可変領域が配列番号：9与えられているものであり、アルファ鎖可変領域が配列番号：8で与えられているものである、単離細胞；(b) MHC分子に関してNY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含む可溶性TCR、または可溶性TCRを含むキメラもしくは融合ポリペプチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む可溶性TCR、または可溶性TCRを含む、キメラもしくは融合ポリペプチド；(c) NY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含むキメラTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、またはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド；(d) MHC分子に関してNY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含む可溶性TCRをコードするポリヌクレオチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXFのアミノ酸配列（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、またはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド；(e) NY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含むキメラTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、ベクター；および(f) MHC分子に関してNY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含むベクター；ここで、治療用組成物は、被験体のがんを治療するのに有効な量で被験体に投与される。本明細書に記載の特定の実施形態では、改変TCRは、それぞれ配列番号：8および9で与えられるアルファ鎖可変領域およびベータ鎖可変領域を含む。

10

20

【0124】

本明細書で使用する用語「NY-ESO-1がん」および「NY-ESO-1を発現するがん細胞」は、NY-ESO-1腫瘍抗原を発現する細胞を含む腫瘍を指す。そのようながんは当該技術分野で知られており、特定のがんにおけるNY-ESO-1の発現は、当業者によって測定され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。例示的なNY-ESO-1がんには、限定されないが、肉腫（例えば、軟部組織の肉腫）、メラノーマ、リンパ腫、前立腺がん、子宮がん、甲状腺がん、精巣がん、腎臓がん、膵臓がん、卵巣がん、食道がん、非小細胞肺癌ん、非ホジキンリンパ腫、NHL（DLCL）、多発性骨髄腫、肝細胞がん、頭頸部がん、胃がん、子宮内膜がん、腎臓がん、大腸がん、胆管がん、乳がん、膀胱がん、神経芽細胞腫、骨髄性白血病および急性リンパ芽球性白血病が挙げられる。

30

【0125】

また、本明細書に記載されるのは、哺乳動物被験体においてNY-ESO-1を発現するがん細胞の増殖を阻害する方法であって、被験体に、以下からなる群より選択される1つ以上の治療剤を含む治療用組成物を投与することを含む：(a) NY-ESO-1に特異的なV 鎖相補性決定領域3（CDR3）を含むキメラTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離細胞であって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、単離細胞；(b) MHC分子に関してNY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含む可溶性TCRであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、可溶性TCR；(c) NY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含むキメラTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、またはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド；(d) MHC分子に関してNY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含む可溶性TCRをコードするポリヌクレオチドであって、V CDR3がCASSLNRDXXXXFのアミノ酸配列（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、またはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド；(e) NY-ESO-1に特異的なV

40

50

鎖CDR3を含むキメラTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、ベクター；および(f) MHC分子に関してNY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含む、ベクター；ここで、治療用組成物は、被験体におけるがん細胞の増殖を阻害するのに有効な量で被験体に投与される。本明細書に記載の特定の実施形態では、改変TCRは、それぞれ配列番号：8および9で与えられるアルファ鎖可変領域およびベータ鎖可変領域を含む。

【0126】

本明細書で使用する用語「治療有効量」または「有効量」は、治療的または予防的有効性を提供する量を意味する。

【0127】

本明細書に記載の組成物などの治療用組成物での治療から恩恵を受ける可能性が高い被験体を同定する方法も検討される。この点に関して、本方法は以下を含む：(a) NY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高い哺乳動物被験体を同定する工程であって、哺乳動物被験体からの試料中における以下の有無を決定することを含む工程：(i) NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含むTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、V鎖がCASSLNDRXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド；または(ii) NY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含むTCRポリペプチドであって、V 鎖がCASSLNDRXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、TCRポリペプチド；ここで、(i) および/または(ii)の存在は、被験体がNY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高いことを示す。

【0128】

さらなる実施形態では、治療から恩恵を受ける可能性が高い被験体として同定された被験体の治療方法も本明細書において検討される。この点に関して、治療方法は以下を含む：(a) NY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高い哺乳動物被験体を同定する工程であって、哺乳動物被験体からの試料中における以下の有無を決定することを含む工程：(i) NY-ESO-1に特異的なV CDR3を含むTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、V 鎖がCASSLNDRXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、ポリヌクレオチド；または(ii) NY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含むTCRポリペプチドであって、V 鎖がCASSLNDRXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含む、TCRポリペプチド；ここで、(i) および/または(ii)の存在は、被験体がNY-ESO-1がん治療から恩恵を受ける可能性が高いことを示す；ならびに(b) NY-ESO-1がん治療を哺乳動物被験体に施す工程。

【0129】

NY-ESO-1に特異的なV 鎖CDR3を含むTCRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、V 鎖がCASSLNDRXXXXF（配列番号：1）のアミノ酸配列を含むか、もしくはVベータCDR3が配列番号：2～4に記載のアミノ酸配列を含むポリヌクレオチドの有無は、例えば、Adaptive Biotechnologies（シアトル、ワシントン州）から市販され、実施例2～7に記載のようなディープシーケンシング法によって決定することができる。マルチプレックスPCRを含む他の方法、および特定のヌクレオチド配列の有無を検出する当該技術分野で知られている他の技術も利用することができる。さらに、TCRポリペプチドは、この目的のために開発された適切な四量体またはモノクローナル抗体でのイムノアッセイによって直接検出され得る。使用され得るイムノアッセイには、限定されないが、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素アッセイ、ゲル拡散沈降アッセイ、免疫放射線測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質A、イムノアッセイ、プラズモン表面共鳴、および補体結合アッセイなどの技術を用いる競合アッセイシステムが挙げられる。そのようなアッセイは型どおりであり、当該技術分野で知られている（例えば、非特許文献85を参照）。さらに、非特許文献46に記載されているような型どおりの交差ブロッキングアッセイを行うことができる。核酸ベースまたはタンパク質ベースのアッセイのいずれかで、本明細書に記載の

CDR3アミノ酸配列を保有するV鎖を含むTCRを持つ個体を、診断用クローンタイプを保有していない個体から高い頻度で識別することができる。

【0130】

本明細書で検討される治療方法には、NY-ESO-1特異的がん療法、特に免疫療法が挙げられる。一実施形態では、本明細書に記載の公開TCRを発現する患者に有用な治療方法は、特許文献32に記載のようなものである。いくつかの実施形態では、NY-ESO-1がん治療は、NY-ESO-1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを被験体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、NY-ESO-1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、NY-ESO-1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

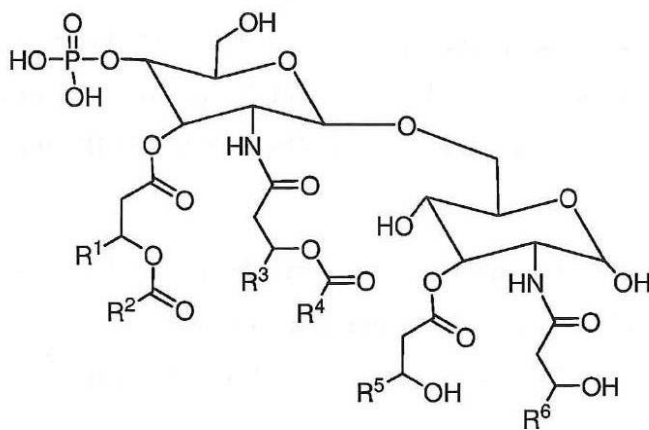
10

【0131】

いくつかの実施形態では、NY-ESO-1がん療法は、GLAを含む有効量の組成物を被験体に投与することを含み、前記組成物は以下を含む：

(a) 式(1)のGLA：

【化2】



20

30

式中：R¹、R³、R⁵およびR⁶はC₁₁~C₂₀アルキルであり；およびR²およびR⁴はC₁₂~C₂₀アルキルである；ならびに

(b) 薬学的に許容される担体または賦形剤；ここで、組成物は抗原を含まない。本明細書に記載の方法の一実施形態では、R¹、R³、R⁵およびR⁶はウンデシルであり、R²およびR⁴はトリデシルである。本明細書に記載の方法の別の実施形態では、哺乳動物はヒトである。さらに別の実施形態では、組成物は水性製剤であり、特定の実施形態では、組成物は水中油型エマルション、油中水型エマルション、リポソーム、ミセル製剤、または微粒子の形態である。

【0132】

特許文献33は、水性製剤(AF)および安定なエマルション製剤(SE)などの製剤をGLA化合物用に提供し、これらの製剤が式(1)の化合物のいずれかに使用され得る。

40

【0133】

本明細書に記載のGLAは、組成物中に0.1~10 µg/用量、もしくは0.1~20 µg/用量、0.1~30 µg/用量、0.1~40 µg/用量、もしくは0.1~50 µg/用量、または1~20 µg/用量、もしくは1~30 µg/用量、もしくは1~40 µg/用量、または1~50 µg/用量、または0.2~5 µg/用量、または0.5~2.5 µg/用量、もしくは0.5~8 µg/用量もしくは0.5~15 µg/用量の量で存在する。用量は、例えば、0.5 µg/用量、0.6 µg/用量、0.7 µg/用量、0.8 µg/用量、0.9 µg/用量、1.0 µg/用量、2.0 µg/用量、3.0 µg/用量、3.5 µg/用量、4.0 µg/用量、4.5 µg/用量、5.0 µg/用量、5.5 µg/用量、6.0 µg/用量、6.5 µg/用量、7.0 µg/用量、7.5 µg/用量、8.0 µg/用量、9.0 µg/用量、10.0 µg/用量、11.0 µg/用量、12.0 µg/用量、13

50

.0 µg/用量、14.0 µg/用量、または15.0 µg/用量であり得る。用量は、体重、体面積、体重、被験体の血液量、または送達経路に応じて調整され得る。一実施形態では、1ml中2 µg、3 µg、4 µg、5 µg、6 µg、7 µg、8 µg、9 µg、10 µg、11 µg、または12 µgのGLAを腫瘍内投与する。これに関して、GLAの1mL用量を、腫瘍の複数の領域に等量で注射してもよい。特定の実施形態では、約0.01 µg/kg ~ 約100mg/kg体重のGLAは、典型的には皮内、腫瘍内、皮下、筋肉内もしくは静脈内経路によって、または他の経路によって投与される。特定の実施形態では、GLAの投与量は約0.1 µg/kg ~ 約1mg/kgであり、特定の実施形態では、約0.1 µg/kg、0.2 µg/kg、0.3 µg/kg、0.4 µg/kg、0.5 µg/kg、0.6 µg/kg、0.7 µg/kg、0.8 µg/kg、0.9 µg/kg、1 µg/kg、2 µg/kg、3 µg/kg、4 µg/kg、5 µg/kg、6 µg/kg、7 µg/kg、8 µg/kg、9 µg/kg、10 µg/kg ~ 約200 µg/kgに及ぶ。投与の回数および頻度は宿主の応答に依存することは、当業者には明らかであろう。本明細書に記載のように、適切な用量は、患者の（例えば、ヒトの）状態、すなわち、疾患の段階、全般的な健康状態、ならびに年齢、性別、および体重、および医学分野の当業者によく知られている他の因子にも依存し得る。本明細書の他の箇所に記載のように、本明細書に記載のGLA組成物は抗原を含まない。

10

【0134】

（レンチウイルス粒子の送達）

本明細書に記載の改変TCRの送達のためのウイルス粒子（例えば、レトロウイルス、レンチウイルスまたは他のウイルス粒子）は、目的のポリヌクレオチドの送達が望ましいとされる、標的細胞、例えばT細胞、NK細胞または樹状細胞にウイルスが接触することを可能にする任意の方法で標的細胞に送達され得る。時には、適当量のウイルスが、ヒトまたは他の動物に直接（*in vivo*で）、例えば体内への注射を介して導入される。適切な動物には、限定されないが、ウマ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリまたは他の鳥類が挙げられる。ウイルス粒子は、静脈内、皮内、皮下、リンパ節内、腹腔内、または粘膜などの多くの経路によって注射され得る。その全てが、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる特許文献34、特許文献35、特許文献36、特許文献37、特許文献38、特許文献39、特許文献40、特許文献41、特許文献42、特許文献43、特許文献44、特許文献45、特許文献46、特許文献47、特許文献48、特許文献49、特許文献50、特許文献51、特許文献52に開示の装置などの皮下注射装置を用いて、ウイルスは送達され得る。標的細胞を含む臓器への直接注入など、他の注入位置も適している。例えば、リンパ節内注射、脾臓内注射、または骨髄内注射を使用し、それぞれリンパ節、脾臓および骨髄にウイルスを送達してもよい。特定の状況および標的細胞の性質に応じて、例えば吸入、または上皮組織、例えば眼、口もしくは皮膚の上皮組織との直接接触を含む他の手段を介して、導入を行うことができる。

20

30

【0135】

あるいは、標的細胞を供給し、培養プレート中などの*in vitro*でウイルスと接触させる。標的細胞は、典型的には、健全な被験体もしくは治療を必要とする被験体から得られたか、または抗原に対する免疫応答を刺激することが望ましい樹状細胞またはT細胞を含む細胞の集団である。被験体から細胞を得る方法は当該技術分野で知られており、静脈切開、外科的切除、および生検が挙げられる。ヒトDCは、CD34 +ヒト造血前駆細胞を得ること、および他の箇所で記載されているような*in vitro*培養方法を使用することによっても生成され得る（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる非特許文献86）。

40

【0136】

ウイルスを培地中に懸濁し、培養プレートのウェル、チューブまたは他の容器に添加してもよい。ウイルスを含む培地は、細胞のプレートの前に、または細胞がプレートの形質導入が起こるように培地中のウイルスの適切な濃度を可能にする適切な量の培地中でインキュベートされる。細胞は、好ましくは、ウイルスが細胞に感染するのを可能にするのに十分な時間、ウイルスと共にインキュベートされる。好ましくは、細胞を少なくと

50

も1時間、少なくとも5時間または少なくとも10時間ウイルスと共にインキュベートする。

【0137】

In vivoおよびin vitro送達の両方において、所望の標的細胞を感染させるのに十分な数を含むウイルス粒子のアリコートを使用してよい。標的細胞を培養する場合、ウイルス粒子の濃度は一般に、少なくとも1IU/μL、より好ましくは少なくとも10IU/μL、さらにより好ましくは少なくとも300IU/μL、さらにより好ましくは少なくとも 1×10^4 IU/μL、さらにより好ましくは少なくとも 1×10^5 IU/μL、さらにより好ましくは少なくとも 1×10^6 IU/μL、またはさらにより好ましくは少なくとも 1×10^7 IU/μLである。

【0138】

In vitroでのウイルス感染後、標的細胞をヒトまたは他の動物に導入（または再導入）することができる。細胞は、真皮、真皮下、または末梢血流に導入することができる。動物に導入される細胞は、好ましくは、有害な免疫応答を回避するために、その動物に由来する細胞である。類似の免疫背景を有するドナー由来の細胞を使用してもよい。同様に使用することができる他の細胞には、有害な免疫応答を回避するように設計された細胞が含まれる。

10

【0139】

標的細胞は、例えば、目的の配列または遺伝子（単数または複数）の統合、転写および/または発現、遺伝子組み込みのコピー数、ならびに組み込みの位置について分析される。そのような分析は、任意の時点で実施してもよく、当該技術分野で知られている任意の方法によって実施してもよい。

20

【0140】

ウイルスまたはウイルス感染T細胞が投与される被験体を、当該技術分野で知られている任意の方法によって、感染細胞の位置、ウイルス送達されたポリヌクレオチドまたは目的の遺伝子の発現、免疫応答の刺激について分析し、疾患または障害に関連する症状を観察することができる。

【0141】

本明細書に開示の細胞を感染させる方法は、細胞の個々の特徴に依存しない。結果として、それらは様々な動物種にまで容易に拡張される。いくつかの例では、ウイルス粒子はヒトまたはヒトT細胞に送達され、他の場合には、マウス、ウマ、イヌ、ネコ、またはマウスなどの動物、または鳥類に送達される。本明細書中で議論されるように、ウイルスベクターゲノムは、それに広範な宿主範囲ならびに標的細胞特異性を与えるためにシールドタイプ化される。当業者は、特定の動物種において目的の配列の所望の発現を達成するのに適切な内部プロモーターおよび他の要素も知っているであろう。したがって、当業者は、任意の種からの樹状細胞を感染させる方法を修正することができるであろう。

30

【0142】

（併用療法）

本明細書に記載の治療組成物を、1つ以上の他の治療剤の投与と同時に、投与の前に、または投与後に投与してもよい。そのような併用療法は、本明細書に記載の治療組成物および1つ以上の追加の活性剤を含む単一の医薬剤形の投与、ならびに組成物（例えば、本明細書に記載の改変TCRを含む組成物、または本明細書に記載の改変TCRをコードする配列を含むレンチウイルスベクター粒子を含む組成物、または本明細書に記載の改変TCRを発現するように改変された単離T細胞を含む組成物）および各活性剤のそれ自体で別個の医薬剤形中での投与を含んでもよい。例えば、本明細書に記載の治療用組成物および他の活性剤を、哺乳動物被験体に、錠剤またはカプセルなどの単一の経口剤形組成物中で一緒に投与するか、または各薬剤を別個の経口投与剤形で投与することができる。同様に、本明細書に記載の組成物（例えば、本明細書に記載の改変TCRをコードする配列を含むレンチウイルスベクター粒子、またはそのような粒子でex vivoで修飾されたT細胞を含む組成物、または改変TCRを含む組成物）および他の活性剤を、哺乳動物被験体に、生理食塩水または他の生理学的に許容される溶液中などの単一の非経口投与組成物中で一緒に投与するか、または各薬剤を別個の非経口剤形で投与することができる。別個の剤形が使用される

40

50

場合、本明細書に開示の組成物および1つ以上の追加の活性剤を、本質的に同時に、すなわち同時に、または別個に時間をずらして、すなわち逐次的に任意の順序で投与することができる；併用療法は、これらのレジメンの全てを含むと理解される。したがって、特定の実施形態では、1つ以上の他の治療剤と組み合わせ、本明細書に開示の1つ以上の組成物の投与も検討される。そのような治療剤は、がんの標準治療として当該技術分野で受け入れられてもよい。検討される例示的な治療剤には、サイトカイン、成長因子、免疫チェックポイント阻害剤、グルコピラノシル脂質アジュバント（GLA）などのTLR4アゴニストを含むTLRアゴニスト（例えば、その開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる特許文献53、特許文献54および特許文献55に記載されているように）、ステロイド、NSAID、DMARD、抗炎症剤、化学療法剤、放射線治療剤、または他の活性剤および補助剤が挙げられる。

10

【0143】

特定の実施形態では、本明細書に開示の治療用組成物は、任意の数の免疫チェックポイント阻害剤と併用投与されてもよい。免疫チェックポイント阻害剤には、CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、およびGAL9の1つ以上に結合してその活性を遮断または阻害する抗体、またはその抗原結合フラグメントが挙げられる。例示的な免疫チェックポイント阻害剤には、トレメリムマブ（CTLA-4遮断抗体）、抗OX40、PD-L1モノクローナル抗体（抗B7-H1；MED14736）、イピリムマブ、MK-3475（PD-1遮断剤）、ニボルマム（抗PD1抗体）が挙げられる。

20

【0144】

特定の実施形態では、本明細書に開示の組成物は、任意の数の化学療法剤と併用投与されてもよい。化学療法剤の例には、以下が挙げられる：チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN（商標））などのアルキル化剤；プスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリメチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロールメラミンを含むエチレンイミンおよびメチルアメラミン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソ尿素；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシンス、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ズルピシンなどの抗生物質；メトトレキセートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）などの抗代謝物質；デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤；フロリン酸などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラシル；ピスアントレン；エダトレキセート；デホファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルホルミチン；エリプチニウム酢酸；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンティナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダモール；ニト

30

40

50

ラシン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）；ラゾキサソ；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばパクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Oncology、プリンストン、ニュージャージー州）およびドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhne-Poulenc Rorer、アントニー、フランス）；クロラムブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金類似体；ピンプラスチン；白金；エトボシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロン酸塩；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオミチン（DMFO）；タルグレチン（商標）（ベキサロテン）、パンレチン（商標）（アリトレチノイン）などのレチノイン酸誘導体；ONTAK（商標）（デニロイキン・ジフチトクス）；エスペラミシン；カペシタピン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体。また、この定義には、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン（フェアストン）を含む抗エストロゲンなどの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤が含まれる；およびフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン剤；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体。

【0145】

特定の実施形態では、本開示は、NY-ESO-1発現に関連するがん罹患している哺乳動物被験体に、治療有効量の本明細書に開示の改変TCR、本明細書に開示の改変TCRをコードする核酸を含むレンチウイルスベクター、またはex vivoでそのような粒子で改変されたT細胞を含む組成物を投与し、次いで、樹状細胞を標的とし、そのため樹状細胞ワクチン接種に使用され得るエンベロープを含む偽型レンチウイルスベクター粒子を含む組成物を被験体にさらに投与することによって、NY-ESO-1発現に関連するがんを治療する方法、その進行を阻害する方法または予防する方法を提供する（例えば、特許文献56；特許文献57；特許文献58；特許文献59；特許文献60；および特許文献61を参照）。このようにして、抗原特異的T細胞を、本明細書に記載のレンチウイルスベクターを用いてin vivoまたはex vivo遺伝子改変を介して生成し、次いで、DC指向性レンチウイルスベクターを用いて樹状細胞の能動免疫化を介してin vivoで活発化させる。

【0146】

別の実施形態では、本開示は、NY-ESO-1がん罹患している哺乳動物被験体に、本明細書に開示の改変TCRを含む治療有効量の組成物、本明細書に開示の改変TCRをコードする核酸を含むレンチウイルスベクターを含む組成物、またはex vivoでそのような粒子で改変されたT細胞を含む組成物を投与し、次いで、グルコピラノシル脂質A（GLA）などのTLR4アゴニストを含む組成物を患者に投与することによって免疫応答をさらに活発化させることによって、NY-ESO-1がんを治療する方法、その進行を阻害する方法または予防する方法（例えば、特許文献62ならびに特許文献63および特許文献64を参照）を、抗原の有無にかかわらず提供する。このようにして、抗原特異的T細胞を、本明細書に記載のレンチウイルスベクターを用いてin vivoまたはex vivo遺伝子改変を介して生成し、次いで、樹状細胞の活性化を介してin vivoで活発化させる。

【0147】

宿主細胞または細胞集団が被験体に投与される本発明の方法の目的のために、細胞は、宿主に対して同種または自己である細胞であり得る。好ましくは、細胞は被験体に対して自己である。

10

20

30

40

50

【0148】

本明細書で言及される被験体は、任意の被験体であり得る。好ましくは、被験体は哺乳動物である。本明細書で使用する用語「哺乳動物」は、マウスおよびハムスターなどのネズミ目の哺乳動物、およびウサギなど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。哺乳動物は、ネコ科（ネコ）およびイヌ科（イヌ）を含むネコ目由来であることが好ましい。哺乳動物は、ウシ属（ウシ）およびイノシシ属（ブタ）を含むウシ目由来の哺乳動物またはウマ科（ウマ）を含むウマ目の哺乳動物であることがより好ましい。哺乳動物は、サル目、セボイド、もしくはシモイド（サル）、または真猿亜目（ヒトおよび類人猿）であることが最も好ましい。特に好ましい哺乳動物はヒトである。

10

【0149】

（医薬組成物およびキット）

また、本明細書で検討されるのは、1つ以上の（1）本明細書に記載の改変TCR；（2）改変TCRをコードする核酸を含むウイルス粒子；（3）本明細書に記載の改変TCRを発現するように改変された、T細胞またはNK細胞などの免疫細胞；（4）本明細書に記載の改変TCRをコードする核酸を含む医薬組成物およびキットである。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の改変TCRをコードするヌクレオチド配列を含むレンチウイルスベクター粒子を含む組成物（または本明細書に記載のベクター粒子を用いて改変され、改変TCRを発現するT細胞）を提供する。そのような組成物は、本明細書にさらに記載されるように、本開示の方法において被験体に投与することができる。

20

【0150】

本明細書に記載の改変T細胞を含む組成物を、本開示に基づいて当業者に明らかである既知の技術またはそれらのパリエーションに従って、養子免疫療法の方法および組成物において利用することができる。例えば、Gruenbergらの特許文献30を参照；特許文献31も参照、これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0151】

いくつかの実施形態では、細胞を、最初にそれらの培地からそれらを採取し、次いで、細胞を洗浄し、投与に適した培地および容器系（「薬学的に許容される」担体）で治療有効量で富化することによって製剤化する。適切な注入媒体は、任意の等張培地製剤、典型的には通常の生理食塩水、Normosol R（Abbott）またはPlasma-Lyte A（Baxter）であり得るが、水中の5%デキストロースまたは乳酸リンゲル液も利用することができる。注入培地にヒト血清アルブミンを補充することができる。

30

【0152】

組成物中の治療有効量の細胞は、典型的には 10^2 細胞より大きく、最大 10^6 、最大 10^8 または 10^9 細胞を含み、 10^{10} 細胞超であり得る。細胞の数は、その中に含まれる細胞のタイプと同様に、組成物が意図される最終的な使用に依存する。例えば、特定の抗原に特異的な細胞が望ましい場合、集団は、そのような細胞を70%超、一般に80%、85%および90~95%超で含む。本明細書で提供される使用については、細胞は一般に1リットル以下の容量であり、500ml以下、さらには250mlまたは100ml以下であり得る。したがって、所望の細胞の密度は、典型的には 10^6 細胞/mlより大きく、一般的には 10^7 細胞/mlより大きく、一般的には 10^8 細胞/ml以上である。臨床的意義がある免疫細胞の数を、 10^9 、 10^{10} もしくは 10^{11} 細胞に累積的に等しくなるかそれを超える複数回の注入に分配することができる。

40

【0153】

本明細書で提供される医薬組成物は、様々な形態、例えば、固体、液体、粉末、水性または凍結乾燥形態であり得る。適切な医薬担体の例は、当該技術分野で知られている。そのような担体および/または添加剤は、従来の方法によって製剤化することができ、適切な用量で被験体に投与することができる。脂質、ヌクレアーゼ阻害剤、ポリマー、およびキレート剤などの安定化剤は、組成物を体内分解から防ぐことができる。注射での投与が意図される組成物では、界面活性剤、防腐剤、湿潤剤、分散剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定化剤および等張剤の1つ以上を含んでよい。

50

【0154】

本明細書に記載の改変TCR、または本明細書に提供される改変TCRをコードするヌクレオチド配列を含むウイルスベクター粒子は、キットとしてパッケージ化することができる。キットは、使用説明書、器具、および追加の試薬などの1つ以上の部品、ならびに、チューブ、容器およびシリンジなどの、本方法の実施のための部品を任意に含むことができる。例示的なキットは、本明細書で提供される改変TCRをコードする核酸、改変TCRポリペプチド、またはウイルスを含むことができ、使用説明書、被験体におけるウイルスを検出するための器具、組成物を被験体に投与するための器具、および組成物を被験体に投与するための器具を任意に含むことができる。

【0155】

目的の遺伝子（例えば改変TCR）をコードするポリヌクレオチドを含むキットも、本明細書において検討される。目的の配列（例えば、改変TCR）をコードするウイルスベクターおよび任意に免疫チェックポイント阻害剤をコードするポリヌクレオチド配列を含むキットも、本明細書において検討される。

【0156】

本明細書で検討されるキットは、本明細書に開示の公開TCRV CDR3配列のいずれか1つ以上をコードするポリヌクレオチドの存在を検出する方法を実施するためのキットも含む。特に、そのような診断キットは、本明細書に開示の公開TCRV CDR3配列をコードするポリヌクレオチドを検出するディープシーケンシングを実施するための適切な増幅プライマーおよび検出プライマーならびに他の関連試薬のセットを含んでもよい。さらなる実施形態では、本明細書のキットは、TCRV CDR3を含むTCRポリペプチドを検出するための試薬、例えば抗体または他の結合分子を含んでもよい。診断キットはまた、公開TCRV CDR3配列をコードするポリヌクレオチドの存在を決定するため、または本明細書に開示の公開TCRV CDR3を含むTCRポリペプチドの存在を決定するための説明書も含んでよい。

【0157】

キットは説明書も含んでよい。説明書には、典型的には、ウイルスを記述する具体的な表現、および、任意に、キットに含まれる他の部品、および、被験体の適切な状態、適切な投与量、および適切な投与方法を決定する方法、ウイルスの投与方法を含む投与方法が含まれる。説明書は、治療期間にわたって被験者を観察するための指針も含むことができる。

【0158】

本明細書で提供されるキットは、本明細書に記載の組成物を被験体に投与するための器具も含むことができる。当該技術分野で知られている医薬品またはワクチンを投与するための様々な器具のいずれも、本明細書で提供されるキットに含めることができる。例示的な器具には、限定されないが、皮下注射針、静脈注射針、カテーテル、無針注射器、吸入器、および点眼薬などの液体ディスペンサーが挙げられる。典型的には、キットのウイルスを投与するための器具は、キットのウイルスと適合性がある；例えば、高圧注入器などの無針注射器は、高圧注射によって損傷を受けないウイルスのキットには含めることができるが、典型的には、高圧注入によって損傷を受けるウイルスのキットには含まれない。

【0159】

本明細書で提供されるキットは、T細胞活性化剤もしくは刺激剤などの化合物、またはTLR4アゴニストなどのTLRアゴニスト（例えば、その開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる特許文献62を参照）を被験体に投与するための器具も含むことができる。当該技術分野で知られている、薬剤を被験体に投与するための様々な器具のいずれかを、本明細書で提供されるキットに含めることができる。例示的な器具には、皮下注射針、静脈注射針、カテーテル、無針注射器、限定されないが、皮下注射針、静脈注射針、カテーテル、無針注射器、吸入器、および点眼薬などの液体ディスペンサーが挙げられる。典型的には、キットの化合物を投与するための器具は、化合物の所望の投与方法に適合する。

【0160】

以下の実施例は例示の目的で提供されるものであり、本発明を限定するものではない。

【実施例】

【0161】

(実施例1：LV305での治療は、治療後NY-ESO-1特異的T細胞のポリクローナル親和性を増加させた)

この実施例は、LV305での治療が、ELISPOTによって測定されるように、NY-ESO-1腫瘍抗原を認識するポリクローナル親和性T細胞を増加させることを実証する。

【0162】

LV305についてのこの研究では、患者は、NY-ESO-1腫瘍抗原をコードする樹状細胞向性レンチベクターLV305での注射を3回受けた。ワクチン接種前(Tx前)およびワクチン接種後(Tx後)のPBMC試料におけるNY-ESO-1に対するT細胞応答をELISPOTによって測定し、この場合、細胞をNY-ESO-1ペプチド混合物で40時間刺激し、IFN- γ を分泌したT細胞の数を、抗IFN- γ 抗体でプレコーティングしたプレート中のスポットを計数することによって測定した。

【0163】

図1に示すように、Tx後T細胞は、試験した全てのNY-ESO-1濃度(1670、334、60、および12nM)において、NY-ESO-1ペプチド混合物に対する応答がTx前T細胞よりも高かった。発明者らが試験した2つのより低い濃度(12および60nM)では、Tx前試料で検出可能なT細胞応答はなかったが、Tx試料後で有意なT細胞応答があった。これらのデータは、LV305での治療がNY-ESO-1に対するT細胞応答を増強させ、より高い親和性のNY-ESO-1特異的T細胞をもたらし、低濃度のNY-ESO-1ペプチドで抗原を認識することを実証する。

【0164】

(実施例2：腫瘍抗原特異的TCR配列は、Tx前PBMCと比較して、Tx後PBMCにおいて富化される)

この実施例は、LV305での治療が、NY-ESO-1特異的TCR配列の末梢血における富化をもたらすことを実証する。

【0165】

この研究では、LV305治療前およびLV305での3回のワクチン接種後に、患者からPBMCを採取した。患者からTx前腫瘍試料も採取した。PBMCおよび腫瘍試料を、T細胞受容体(TCR)ベータ鎖のDNA抽出およびその後の配列決定分析にかけた。Tx前PBMCとTx後PBMCとの間の配列類似性を、散布図を用いて分析した。次いで、腫瘍試料由来のTCR配列も、類似性について、Tx前およびTx後PBMCと比較した。その結果は、腫瘍試料に浸潤するT細胞からのTCR配列が、Tx前PBMCと比較して、Tx後PBMCにおいて富化されることを示した。

【0166】

(実施例3：NY-ESO-1特異的T細胞について高度に富化されたオリゴクローナル培養物は、Tx後PBMCから樹立された)

この実施例は、NY-ESO-1特異的T細胞について高度に富化されたオリゴクローナル培養物が、Tx後PBMCから樹立されたことを実証する。LV305ワクチン接種後の患者からのPBMCを用いて培養を開始した。PBMCを、OpTmizer T細胞増殖培地中(Invitrogen、カールズバッド、カリフォルニア州)、NY-ESO-1重複ペプチド(0.5 μ g/mL、JPT Technologies、ベルリン、ドイツ)とともに、IL-2およびIL-7(10ng/mL)の存在下で培養した。反復刺激および長期培養(>3ヶ月)の後、PBMC培養物を、NY-ESO-1特異的T細胞について高度に富化した。図3に示されるように、富化されたT細胞は、NY-ESO-1ペプチドによる刺激の際に、大量のIFN- γ を分泌した。TCR配列決定分析は、培養物が、上位6クローンが全T細胞の90%以上を占めるように、非常にオリゴクローナルであることを示した。

【0167】

(実施例4：オリゴクローナル培養におけるTCR CDR3配列は、Tx前PBMCと比較して、Tx後PBMCで富化される)

この実施例は、NY-ESO-1で刺激されたオリゴクローナル培養物(PT151006のIVS3)からのTCR配列が、Tx前PBMCと比較してTx後PBMCで富化されることを実証する。Tx前PBMCとTx

10

20

30

40

50

後PBMCとの間の配列類似性を、散布図を用いて分析した(図4)。次に、PT151006のIVS3からの上位6TCR配列を、類似性に関してTx前およびTx後PBMCと比較した。その結果は、PT151006のIVS3からのTCR配列が、Tx前PBMCと比較して、Tx後PBMCで富化されることを示した。

【0168】

(実施例5：PT151006のIVS3で20.5%の頻度を有するTCR CDR3クローンは、PT151016 Tx後PBMCで検出することができる)

この実施例は、PT151006のIVS3由来の第2優性クローンが、PT151016のTx後PBMCでも検出されることを実証する(図5)。注目すべきは、2人の患者が異なるクラスI HLAバックグラウンドを有することである(表4を参照)。IVS3由来の第2優性クローン(20.5%頻度)のTCR鎖のCDR3配列はCASSLNRDYGYTF(配列番号：2)である。図5に示すように、このアミノ配列は、PT151016由来のTx後PBMCでは0.0003%の頻度で検出されるが、PT151016由来のTx前PBMCでは検出されない。

10

【0169】

(実施例6：PT151006のIVS3で頻度8.5%のTCR CDR3クローンは、PT151016のTx後PBMCで検出することができる)

この実施例は、PT151006IVS3由来の第5優性クローンが、PT151016のTx後PBMCでも検出されることを実証する。IVS3由来の第5優性クローン(頻度8.5%)のTCRベータ鎖のCDR3配列は、CASSLNRDQPHF(配列番号：3)である。図6に示すように、このアミノ配列は、PT151016由来のTx後PBMCでは0.0006%の頻度で検出されるが、PT151016由来のTx前PBMCでは検出されない。

20

【0170】

(実施例7：PT151006のIVS3で頻度26.2%のTCR CDR3クローンは、PT151014のTx後PBMCで検出することができる)

この実施例は、PT151006のIVS3由来の優性クローン(26.2%頻度)が、PT151014のTx後PBMCでも検出されることを実証する。このクローンのCDR3配列は、CASRLAQGETQYF(配列番号：4)である。図7に示すように、このアミノ配列は、PT151014由来のTx後PBMCでは0.00762%の頻度で検出されるが、PT151014由来のTx前PBMCでは検出されない。

30

【0171】

(実施例8：上位6TCR CDR3クローンのうち3つのクローンは、1人より多くの患者の間で共有される公開クローンである)

この実施例は、本発明者らが発見した3つの公開配列が、異なるHLAバックグラウンドを有する複数の患者において検出され、LV305治療後にサンプリングされたPBMCにおける頻度が増加することを実証する。

【0172】

TCRの最初の公開CDR3配列は、CASSLNRDYGYTF(配列番号：2)である。表1に示すように、この配列は、PT151006からのTx前PBMCでは0.001%で検出され、同じ患者からのTx後PBMCでは0.003%に増加した。この配列は、PT151016由来のTx前PBMCでは検出不可能(0%)であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.0003%で検出することができる。この配列は、PT151050由来のTx前PBMCでは検出不可能(0%)であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.0003%で検出することができる。

40

【表 2】

表 1：第 1 公開 TCR β CDR3 配列、CASSLNRDYGYTF の、8 人の患者における頻度								
PT:	151006	151014	151016	151035	151039	151050	151119	151070
Tx 前 PBMC	0.001%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Tx 後 PBMC	0.003%	0%	0.0003%	0%	0%	0.0003%	0%	0%
PT151006 からの IVS3	20.5%							

10

表1：8人の患者からのTx前およびTx後PBMC試料における第1公開TCR CDR3配列の頻度。この表は、LV305での治療の前または後のいずれかに採取した異なる患者PBMC試料における、CDR3配列、CASSLNRDYGYTF（配列番号：2）の頻度を示す。例えば、この配列は、PT151006由来のTx前PBMCでは0.001%で検出され、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.003%に増加する。この配列は、PT151016由来のTx前PBMCでは検出不可能（0%）であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.0003%で検出することができる。この配列は、PT151050由来のTx前PBMCでは検出不可能（0%）であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.0003%で検出することができる。

20

【 0 1 7 3 】

TCR の第2公開CDR3配列は、CASSLNRDQPQHF（配列番号：3）である。表2に示すように、この配列は、PT151006由来のTx前PBMCでは0.0058%で検出され、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.017%に増加した。その配列は、この患者由来のTx前腫瘍生検（0.06%）および同じ患者由来の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）培養物、TIL-PC12-04A1中0.002%で検出することもできる。この配列は、PT151014由来のTx前PBMCでは検出不可能（0%）であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.000109%で検出することができる。この配列は、PT151050由来のTx前PBMCでは検出不可能（0%）であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.0012%で検出することができる。全体として、このTCRは、8人の患者のうち6人で検出可能であり、5人/8人の患者においてTx後試料で頻度が増加し、1人/8人の患者で減少した。

30

【 0 1 7 4 】

【表 3】

表 2 : 第 2 公開 TCR β CDR3 配列、CASSLNDRQPQHF の、8 人の患者における頻度								
PT:	151006	151014	151016	151035	151039	151050	151119	151070
Tx 前 PBMC	0.0058%	0%	0%	0.001%	0%	0%	0%	0%
Tx 後 PBMC	0.017%	0.000109%	0.0012%	0%	0%	0.0006%	0.000893%	0%
PT151006 からの IVS3	8.5%							
PT151006 からの TIL	0.002%							
PT151006 からの固 定腫瘍	0.06%							

10

20

表2：8人の患者からのTx前およびTx後PBMC試料における第2公開TCR CDR3配列の頻度。この表は、LV305での治療の前または後のいずれかに採取した異なる患者PBMC試料における、CDR3配列、CASSLNDRQPQHF（配列番号：3）の頻度を示す。例えば、この配列は、PT151006由来のTx前PBMCでは0.0058%で検出され、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.017%に増加する。この配列は、この患者からの固定腫瘍（0.06%）およびこの患者のTIL培養物（0.000647%）から検出することもできる。この配列は、PT151016由来のTx前PBMCでは検出不可能（0%）であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.0006%で検出することができる。この配列は、PT151050由来のTx前PBMCでは検出不能（0%）であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.0012%で検出することができる。

30

【 0 1 7 5 】

TCR の第3公開CDR3配列は、CASRLAGQETQYF（配列番号：4）である。表3に示すように、この配列は、PT151006由来のTx前PBMCでは0%であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.000196%に増加した。この配列は、PT151-014由来のTx前PBMCでは検出不可能（0%）であり、同じ患者由来のTx後PBMCでは0.000761%で検出することができる。この配列はまた、PT151050由来のTx前PBMCでは0.000274%で検出される。

【 0 1 7 6 】

【表 4】

PT:	151006	151014	151016	151035	151039	151050	151119	151070
Tx 前 PBMC	0%	0%	0%	0%	0%	0.000274%	0%	0%
Tx 後 PBMC	0.000196%	0.00076%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
IVS3 PT151006	26%							

10

20

30

40

50

表 3：8 人の患者からの Tx 前および Tx 後 PBMC 試料における第 3 公開 TCR CDR3 配列の頻度。この表は、LV305 での治療の前または後のいずれかに採取した異なる患者の PBMC 試料における、CDR3 配列、CASRLAGQETQYF（配列番号：4）の頻度を示す。この配列は、PT151006 に加えて、PT151014 および PT151050 でも検出することができる。

【 0 1 7 7 】

8 人の患者からの Tx 前および PBX 後における 3 つの同定された公開 TCR の頻度を、図 8 に要約する。

【 0 1 7 8 】

（実施例 9：3 つの同定された公開 TCR の CDR3 は、公開 TCR の典型的な特徴を有する）

この実施例は、同定された TCR CDR3 配列が公開 TCR の典型的な以下の特徴を有することを実証する：（1）異なる患者の異なるヌクレオチド配列によってコードされている；（2）CDR3 の長さが比較的短い；（3）比較的限られた非定型ヌクレオチド付加を有する。これらの特徴は全て公開 TCR 配列の特徴である（非特許文献 15）。

【 0 1 7 9 】

TCRV および V 遺伝子セグメントの多様化は、異なる CDR1 および CDR2 領域（異なる V 遺伝子セグメントにコードされる）の使用によって決まる。CDR3 は、体細胞組み換え後の異なる V(D)J 生殖系列セグメントの並置によって作製され、ナイーブ TCR レパトリーの多様性は、V(D)J 遺伝子再構成中の精度の欠如によって、および非鋳型のコード化されたヌクレオチド（N）の V(D)J 接合部への付加によって、さらに増加する（非特許文献 87）。

【 0 1 8 0 】

公開 TCR が生成される 1 つの可能な方法は、収束組み換えによるものである。すなわち、多くの異なる V(D)J 組み換えイベントは、「収束」して同じヌクレオチド配列を生成し、多くの異なるヌクレオチド配列は、「収束」して同じアミノ酸配列をコードする（非特許文献 15）。図 9 および図 12 に示すように、本発明者らが同定した公開 TCR 配列は、異なる個体において異なるヌクレオチド配列を有する。

【 0 1 8 1 】

個人の TCR と比較して、共有 TCR CDR3aa 配列は、平均して約 1aa 残基短くなる傾向があると報告されており、さらに、VD および DJ 接合におけるヌクレオチド（nt）挿入の数が有意に少ないことが示されている（非特許文献 88）。IVS3 における TCR CDR3 の長さ分布を比較すると、IVS3（図 10 A、黒色棒）の T 細胞は、Tx 後 PBMC（図 10 A、斜線棒）の非刺激 T 細胞よりも比較的短い CDR3 領域を有することが示された。図 10 B に示すように、3 つの公開 TCR は全て同じ CDR3 長（n=39 ヌクレオチド）を有する。これらの TCR はまた、接合領域（0~2 のヌクレオチド付加）において、比較的少量の非鋳型（NT）ヌクレオチド（nc）付加を有する。本発明者らが同定した公開 TCR の 1 つである CASRLAGQETQYF（配列番号：4

) は、N1(VD)挿入部位にNT nc付加をもち、N2(DJ)挿入部位にもNT付加をもちなかつた。より短い長さおよび限定された数のNT nc付加の表現型の特徴は、これらのTCR CDR3配列が公開TCR配列であるという結論を支持する。

【 0 1 8 2 】

(実施例10 : LV305で治療された患者のHLA組織タイピング結果)

患者試料を、市販のHLA組織タイピングサービスに送った。結果を以下の表4に要約し、公開TCR CDR3を共有する患者間のHLA-AまたはHLA-B対立遺伝子に重複がないことを確認する。HLA-DR、DPまたはDQ対立遺伝子も患者間で異なる。

【表 5】

表 4 : LV305 で治療した 4 人の患者の HLA 組織タイピング結果

PT151006		
HLA-A	*02:01	*24:02
HLA-B	*13:02P	*35:01
HLA-C	*04:01	*06:02
HLA-DRB1	*11:01	*13:01
HLA-DRB3	*02:02	-
HLA-DRB4	-	-
HLA-DRB5	-	-
HLA-DQB1	*03:01	*06:03P
HLA-DPB1	*04:01	-
HLA-DQA1	*01:03/10	*05:01:01G
HLA-DPA1	*01:03P	-
PT151016		
HLA-A	*01:01	*29:02
HLA-B	*40:01	*57:01
HLA-C	*03:04	*06:02
HLA-DRB1	*04:01	*07:01P
HLA-DRB3	-	-
HLA-DRB4	*01:01	*01:03
HLA-DRB5	-	-
HLA-DQB1	*03:01	*03:03
HLA-DPB1	*04:01	*04:02
HLA-DQA1	*02:01	*03:01:01G
HLA-DPA1	*01:03P	-
PT151014		
HLA-A	*02:01	*03:01
HLA-B	*15:01	*40:01
HLA-C	*03:04	-
HLA-DRB1	*04:01	*08:01
HLA-DRB3	-	-
HLA-DRB4	*01:01	-
HLA-DRB5	-	-
HLA-DQB1	*03:02	*04:02
HLA-DPB1	*02:01P	*03:01:01G
HLA-DQA1	*03:01:01G	*04:01:01G
HLA-DPA1	*01:03P	-
PT151050		
HLA-A	*33:03	*74:01
HLA-B	*39:10	*58:01
HLA-C	*07:01	*12:03
HLA-DRB1	*01:02P	*15:03P
HLA-DRB3	-	-
HLA-DRB4	-	-
HLA-DRB5	*01:01P	-
HLA-DQB1	*05:01	*06:02
HLA-DPB1	この試料では、HLA-DPB タイプは得られなかった。rPCR-SSOP からのプローブ反応性は、任意の記載された HLA-DPB 対立遺伝子 (単数または複数) とは関連していない。	この試料では、HLA-DPB タイプは得られなかった。rPCR-SSOP からのプローブ反応性は、任意の記載された HLA-DPB 対立遺伝子 (単数または複数) とは関連していない。
HLA-DQA1	*01:01	*01:02
HLA-DPA1	*01:03P	*02:01P

10

20

30

40

(実施例 1 1 : LV305で治療した患者由来の公開TCRのTCR およびTCR 可変領域の配列決定)

5'-RLM-RACE (Ambion、オースティン、テキサス州) をTCRクローニングに用いた。この方法は、可変ドメイン配列の予備知識なしにTCRを同定することを可能にする。つまり、Trizol (登録商標) 抽出を用いてNY-ESO-1特異的T細胞からRNAを単離した。次いで精製RNAを脱リン酸化し、タバコ酸ピロホスファターゼを用いて脱キャップし、5'アダプターに連結した。次に、M-MLV逆転写酵素 (Ambion、オースティン、テキサス州) を使用し、ランダムデカマーで製造者の指示に従い、RNAからcDNAを調製した。次に、cDNAをPCRに使用した。PCRを、TCR またはTCR のいずれかの5'アダプターおよび定常領域にアニーリングするプライマーを用いて実施した (例示的なプライマーならびにpCa1およびpCb1などの配列は、非特許文献 8 9 に記載されている ; しかし、クローニング目的の制限部位を付加するように改変されている)。次いで、アンプリコンを消化し、ゲル精製し、PCRプライマーに組み込まれた制限部位を用いて調製したベクターにクローニングした。次に、コロニーを含む寒天プレートを、クローニングしたTCR mRNAの配列決定のために送り出した。

【 0 1 8 4 】

151クローンを、TCR についての2回の別々のPCRから配列決定した。2つの異なるTCR 可変領域配列が高頻度で生じることが見出され、そのうちの1つは、以前に同定され、配列番号 : 4で与えられた公開V CDR3配列を含んでいた。配列番号 : 4の公開V CDR3を含む完全長TCR 可変領域配列は、配列番号 : 9で与えられており、図 1 1 に示されている。他のTCR 可変領域配列は配列番号 : 16で与えられており、図 1 3 に示されている (この配列には注釈をつけてもよく、TCRの異なる領域はIMGTデータベースウェブサイトに記載のような標準的方法論を用いて同定されてもよい)。2回の別々のPCRからのおよそ100個のクローンを、TCR について配列決定した。単一のTCR 鎖可変領域が同定され、配列番号 : 8で与えられ、図 1 1 に示されている。TCR 配列のBLAST検索は、既知のNY-ESO-1特異的TCR 配列との相同性を示す (非特許文献 3 9 ; 非特許文献 9 0)。配列番号 : 9のTCR 配列を用いた同様の検索では、既知の一致は同定されなかった。

【 0 1 8 5 】

(実施例 1 2 : 公開TCRを有するNY-ESO-1特異的T細胞は、G100での治療後に腫瘍に浸潤する)

この実施例は、安定なエマルジョン (GLA-SE) におけるグルコピラノシル脂質アジュバントの腫瘍内注射であるG100を用いた2つの異なる臨床試験から、LV305免疫療法試験において肉腫患者から最初に同定された公開TCR CDR3配列を検出することができることを実証する。最初のG100試験 (NCT02035657) は、メルケル細胞腫 (MCC) 患者のGLA-SEの概念実証試験である。第2のG100試験 (NCT02180698) は、転移性または手術で除去できない軟部組織肉腫を有する患者の治療におけるTLR4アゴニストGLA-SEおよび放射線療法である。腫瘍部位または排液リンパ節における生検を、G100の投与の前後に行った。生検組織および末梢血からDNAを抽出し、TCR CDR3領域のディープシーケンシングを実施し、T細胞レパトリーの多様性を評価した。予想外に、LV305患者PT151006から同定されたいくつかの公開TCRは、照射と組み合わせた腫瘍内G100治療によって局所免疫調節を受けたメルケル細胞腫 (MCC) および肉腫患者においても検出された。表5 ~ 表7は、1人のMCC患者ならびに2人の肉腫患者におけるG100前およびG100後PBMCおよび生検試料中の3つの公開TCRの頻度を列挙する。第1公開TCR CDR3、CASSLNDRDYGYTF (配列番号 : 2) は、MCC患者G2および肉腫患者P13において検出可能であった。第2公開TCR CDR3、CASSLNDRDQPQHF (配列番号 : 3) は、MCC患者G2および肉腫患者P12において検出可能であった。第3公開TCR CDR3、CASRLAGQETQYF (配列番号 : 4) は、MCC患者G2において検出可能であった。

【 0 1 8 6 】

【表 6】

表 5 : 第 1 公開 TCR β CDR3 配列、CASSLNRYDGYTF の、G100 患者における頻度						
患者	G100-MCC-G2		G100-肉腫-P12		G100-肉腫-P13	
	G2-PBMC	G2-生検	P12-PBMC	P12-生検	P13-PBMC	P13-生検
G100 前	0%	0%	0%	0%	0.000069%	0%
G100 後	0%	0.000442%	0%	0%	0%	0

10

表 5 : G100 患者における第 1 公開 TCR CDR3 配列、CASSLNRYDGYTF (配列番号 : 2) の頻度。G100-MCC 患者 (G100-MCC-G2) ならびに 2 人の G100-肉腫患者 (G100-肉腫-P12 および G100-肉腫-P13) からの G100 前または G100 後 PBMC および腫瘍生検における公開 TCR の存在 (頻度) を示す。この配列は、患者 G2 由来の Tx 後生検では 0.000442% で検出されたが、Tx 前生検または PBMC 試料では検出できなかった。

【 0 1 8 7 】

20

【表 7】

表 6 : 第 2 公開 TCR β CDR3 配列、CASSLNRDQPQHF の、G100 患者における頻度						
患者	G100-MCC-G2		G100-肉腫-P12		G100-肉腫-P13	
	G2-PBMC	G2-生検	P12-PBMC	P12-生検	P13-PBMC	P13-生検
G100 前	0.000421%	0%	0.000154%	0%	0%	0%
G100 後	0%	0%	0%	0%	0%	0%

30

表 6 : G100 患者における第 2 公開 TCR CDR3 配列、CASSLNRDQPQHF の頻度。G100-MCC 患者 (G100-MCC-G2) ならびに 2 人の G100-肉腫患者 (G100-肉腫-P12 および G100-肉腫-P13) からの G100 前または G100 後 PBMC および腫瘍生検における公開 TCR の存在 (頻度) を示す。この配列は、G2 および P12 由来の Tx 前 PBMC で検出された。

【 0 1 8 8 】

【表 8】

表7：第3公開 TCR β CDR3 配列、CASRLAGQETQYF の、G100 患者における頻度						
患者	G100-MCC-G2		G100-肉腫-P12		G100-肉腫-P13	
	G2-PBMC	G2-生検	P12-PBMC	P12-生検	P13-PBMC	P13-生検
G100 前	0%	0%	0%	0%	0%	0%
G100 後	0%	0.000442%	0%	0%	0%	0%

10

表7：G100患者における第3公開TCR TCRB CDR3配列、CASRLAGQETQYFの頻度。G100-MCC患者（G100-MCC-G2）ならびに2人のG100-肉腫患者（G100-肉腫-P12およびG100-肉腫-P13）からのG100前またはG100後PBMCおよび腫瘍生検における公開TCRの存在（頻度）を示す。この配列は、患者G2由来のTx後生検では0.000442%で検出されたが、Tx前生検またはPBMC試料では検出されなかった。

【0189】

20

G2は、腫瘍内G100治療後に完全応答があったNY-ESO-1発現腫瘍を患うMCC患者である。図14に示すように、この患者からのG100前生検はNY-ESO-1発現を示し、それはG100後生検では約3倍減少し、サイトケラチン（CK20）陽性腫瘍細胞のG100治療後の消失と一致した（データは示さず）。図15に示すように、G100前生検で検出されなかった2つの公開TCR CDR3は、G100後生検で検出可能となった。これらのデータは、G100での腫瘍微小環境の調節が、公開TCRを持つ抗原特異的T細胞を、末梢血からの腫瘍へ向かわせた可能性があることを示唆している。これらの知見は、NY-ESO-1特異的免疫療法のバイオマーカーとしての公開TCR 配列のさらなる探索を支持する。

【0190】

30

（実施例13：LV305臨床試験の患者において同定された公開TCR CDR3配列は、C131臨床試験の患者においても検出することができる）

この実施例は、LV305試験の患者（NCT02122861）であるPT151006から同定された3つの公開TCR CDR3配列が、異なる臨床試験であるC131の患者（NCT02387125）においても検出され得ることを実証する。

【0191】

40

C131は、NY-ESO-1を発現する局所進行性、再発性または転移性がんを患う患者におけるCMB305の第1b相安全性試験である（逐次投与されるLV305およびG305（G305は、グルコピラノシル脂質A（GLA）と呼ばれる合成小分子とともに製剤化された組み換えNY-ESO-1タンパク質、TLR4アゴニストからなり、抗原特異的CD4「ヘルパー」T細胞の誘導を介してCTL応答を活性化するように設計されている）。本発明者らは、PT151006から同定された公開配列を用いて、13人のC131患者からのTCR CDR3レパートリーを調べた。表8に示すように、最初の公開TCR CDR3配列であるCASSLNRDYGTYF（配列番号：2）が、C131患者13人のうち3人で検出された；表9に示すように、第2公開TCR CDR3配列であるCASSLNRDQPQHF（配列番号：3）が、C131患者13人のうち6人で検出された；表10に示すように、第3公開TCR CDR3配列であるCASRLAGQETQYF（配列番号：4）も、C131患者13人のうち6人で検出された。これらのデータは、PT151006からのCDR3配列が、異なる試験の患者において共有されたことを示した。4人の患者では、これらの公開TCRは、CMB305レジメンの投与後に検出されたため、治療によって誘導される可能性が高い。

【0192】

【表 9】

表 8 : 第 1 公開 TCR β CDR3 配列、CASSLNRDYGTYF は、C131 患者 13 人のうち 3 人で検出することができる													
	C131 -001	C131 -002	C131 -003	C131 -007	C131 -009	C131 -010	C131 -011	C131 -012	C131 -013	C131 -017	C131 -018	C131 -020	C131 -026
Tx 前 PBMC	6.71E- 04%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5.20E- 04%	0%	0%	0%	0%	0%
Tx 後 PBMC	6.94E- 04%	0%	0%	0%	0.00116 2%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
PT1510 06 か らの IVS3	20%												

10

表 8 : C131 試験の 13 人の患者由来の Tx 前および Tx 後 PBMC 試料における第 1 公開 TCR CDR3 配列の頻度。この表は、CMB305 での治療の前または後のいずれかに採取した 13 人の患者の PBMC 試料における、CDR3 配列、CASSLNRDYGTYF (配列番号 : 2) の頻度を示す。この配列は、患者 13 人のうち 3 人で検出することができる。

【 0 1 9 3 】

20

【表 1 0】

表 9 : 第 2 公開 TCR β CDR3 配列、CASSLNRDQPQHF は、C131 患者 13 人のうち 6 人で検出することができる													
	C131 -001	C131 -002	C131 -003	C131 -007	C131 -009	C131 -010	C131- 011	C131 -012	C131 -013	C131 -017	C131 -018	C131 -020	C131- 026
Tx 前 PBMC	0%	0%	0%	0%	4.85E- 04%	0%	0.00186 9%	2.85E- 04%	0.00133 %	0%	5.00E- 04%	0%	7.92E- 04%
Tx 後 PBMC	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.00115 3%
PT1510 06 か らの IVS3	8.5%												

30

表 9 : C131 試験の患者 13 人からの Tx 前および Tx 後 PBMC 試料における第 2 公開 TCR CDR3 配列の頻度。この表は、CMB305 による治療の前または後のいずれかに採取した患者 13 人の PBMC 試料における、CDR3 配列、CASSLNRDQPQHF (配列番号 : 3) の頻度を示す。この配列は、患者 13 人のうち 6 人で検出することができる。

【 0 1 9 4 】

40

【表 1 1】

表 10：第 13 公開 TCR β CDR3 配列、CASRLAGQETQYF は、C131 患者 13 人のうち 6 人で検出することができる													
	C131-001	C131-002	C131-003	C131-007	C131-009	C131-010	C131-011	C131-012	C131-013	C131-017	C131-018	C131-020	C131-026
Tx 前 PBMC	0.00336%	0.000407%	0%	0%	0.000485%	0%	0%	0%	0.000771%	0%	0%	0%	0%
Tx 後 PBMC	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0.000344%	0.000429%	0%	0%
PT151006 からの IVS3	26%												

10

表10：C131試験の患者13人からのTx前およびTx後PBMC試料の第3公開TCR CDR3配列の頻度。この表は、CMB305での治療の前または後のいずれかに採取した患者13人のPBMC試料における、CDR3配列、CASRLAGQETQYF（配列番号：4）の頻度を示す。この配列は、患者13人のうち6人で検出することができる。

20

【0195】

（実施例14：LV305臨床試験から同定された3つの公開TCRのCDR3を、抗CTLA-4試験の患者において検出することができる）

この実施例は、LV305試験から同定された公開TCR CDR3配列が、トレメリムマブでの抗CTLA4 mAb治療を受けた患者でも検出され得ることを実証する（非特許文献91）。

【0196】

トレメリムマブを用いたこの試験では、ベースライン時およびトレメリムマブ投与後30～60日目にPBMCを採取した。次世代シーケンシングを用いてTCRのCDR3領域を研究した。21人の患者からの配列データは、Adaptive ImmunoSEQ Analyzerソフトウェアを介してアクセス可能なオンラインデータベースに寄託されていた。PT151006-IVS3由来のCDR3配列と抗CTLA4治療を受けている21人の患者の配列とを比較したデータベースクエリーは、PT151006から同定された3つの公開配列が、CTLA4治療中のこれらの患者においても検出され得ることを示した（図16）。

30

【0197】

CTLA4遮断療法を受けた患者では、TCRV-ベータCDR3の豊富さの増加およびシャノン指数の多様性が観察された（非特許文献91）。公開TCRの頻度に関しては、抗CTLA4療法後に頻度が増減するかどうかの明確な傾向はなく、患者によって異なる。注目すべきは、CTLA4試験、GA18からの完全応答（CR）があった患者3人のうちの1人において、3つの公開配列は全てTx後PBMCでは検出されたが、Tx前PBMCでは検出されなかった。治療応答のためのバイオマーカーとしてのこれらの公開CDR3配列の潜在的な使用をさらに調査する必要がある。

40

【0198】

（実施例15：同じまたは異なる患者の同じCDR3に対する異なるTCRVの使用）

この実施例は、同じCDR3領域が、異なる患者において、または同じ患者においてさえも、異なるTCRV遺伝子と対合し得ることを実証する。

【0199】

図17は、ディープシーケンシング解析によって同じCDR3と関連することが検出された異なるTCRV遺伝子使用を列挙する。CASSLNRDQPQHF（配列番号：3）は、PT151006およびPT151119の両方で検出された第2公開CDR3である。このCDR3は、主にPT151006においてTCRV07-07を使用する。また、PT151006においてTCRV07-08、TCRV07-06、TCRV07-0

50

9、TCR V07-02、TCR V07-03、およびTCR V07-04も使用する。PT151119では、TCR V07-08のみがこのCDR3に用いられる。これは、異なるTCR V遺伝子ファミリーが異なる患者によって同じCDR3について使用され、異なるTCR V遺伝子が同じ患者内で同じCDR3について使用され得ることを示す。注目すべきは、J遺伝子の使用（TCR J01-05）は、両患者で同じであることである。

【0200】

図19は、異なる試験からの患者のTCR のヌクレオチド配列、CDR3アミノ酸配列、ならびにV遺伝子およびJ遺伝子を列挙する。PT151006はLV305臨床試験に由来する；C131-001およびC131-013はCMB305試験からのものであり；G2-C1W4BはG100試験からのものである。この図のデータは、異なる試験からの患者が同じCDR3アミノ酸配列を有するが、異なるヌクレオチド配列を有し、異なるTCR V遺伝子を使用することを示した。患者C131-013の場合、3つの異なるヌクレオチド配列が、同じCDR3、CASSLNRDQPQHF（配列番号：3）を、異なるTCR V遺伝子を使用してコードすることが見出された。これは、図17および図18に示されるように、PT151006についての観察と同様である。

10

【0201】

（実施例16：公開CDR3は、NY-ESO-1特異的CD4 T細胞から同定される）

この実施例は、公開TCR CDR3を同定するために使用された、in vitroで生成された細胞培養物が、CD4 T細胞から構成されたことを示す。

【0202】

PT151006-IVS3 T細胞培養の表現型を特性評価するために、培養した細胞を、正常なドナーからの未培養PBMCと並べて染色した。T細胞マーカー（CD3、CD4、およびCD8）ならびにNK細胞マーカー（CD56）に対するモノクローナル抗体で、蛍光色素結合モノクローナル抗体を用いて細胞を染色し、BD LSR IIフローサイトメーターで分析した。FlowJoソフトウェアを使用してデータ解析を行った。図20に示すように、リンパ球集団を最初にFSC/SSCプロットでゲーティングし、次いでCD4 Tリンパ球をCD3⁺CD4⁺リンパ球としてゲーティングし、CD8 T細胞をCD3⁺CD8⁺リンパ球としてゲーティングした。NK細胞は、CD3⁻CD56⁺リンパ球としてゲーティングした。対照ドナーPBMCは、健常ドナーPBMCでは通常観察されるように、CD4、CD8 T細胞およびNK細胞の予想パーセンテージを有する。対照的に、PT151006-IVS3由来の培養細胞は、NK細胞およびCD8 T細胞の欠如を示し、CD4 T細胞のみを含む。このデータは、PT151006から培養されたNY-ESO-1特異的T細胞株がCD4 T細胞であり、公開TCRがCD4 TCRであることを示した。

20

30

【0203】

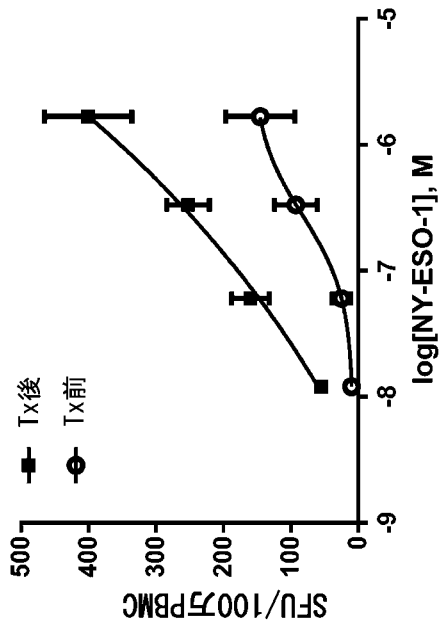
上述の様々な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。本明細書で言及され、および/または出願データシートに列挙された全ての米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願ならびに非特許刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。実施形態の態様を、必要に応じて様々な特許、出願、および刊行物の概念を採用するように変更し、さらなる実施形態を提供することができる。

【0204】

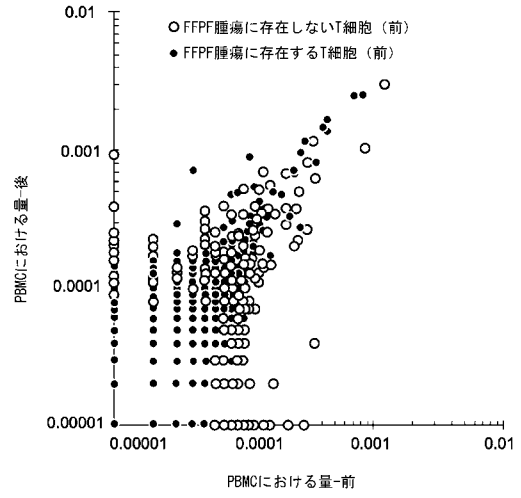
上記および詳細な説明に照らして、これらのおよび他の変更を実施形態に加えることができる。一般に、以下の特許請求の範囲において、使用される用語は、特許請求の範囲を、本明細書および本特許請求の範囲に開示される特定の実施形態に限定するものと解釈されるべきではなく、全ての可能な実施形態を、そのような請求項が権利を与えられる等価物の全範囲と共に含むと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示によって制限されない。

40

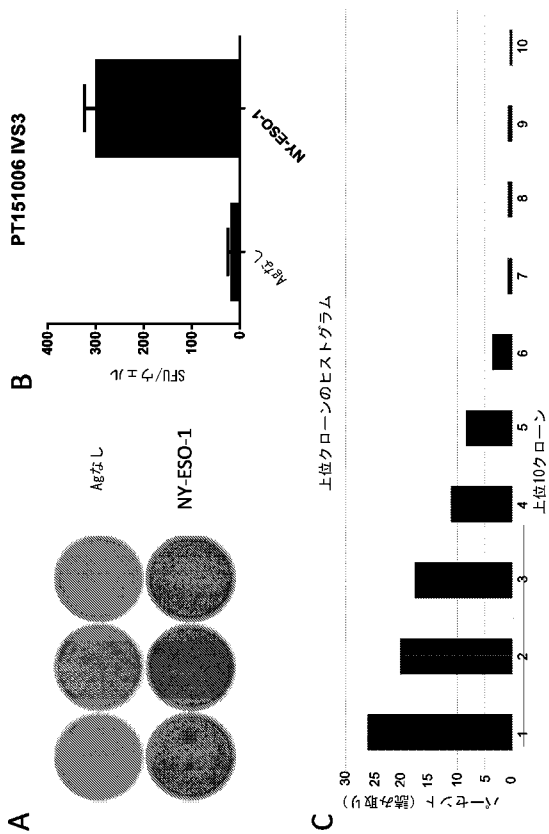
【 図 1 】



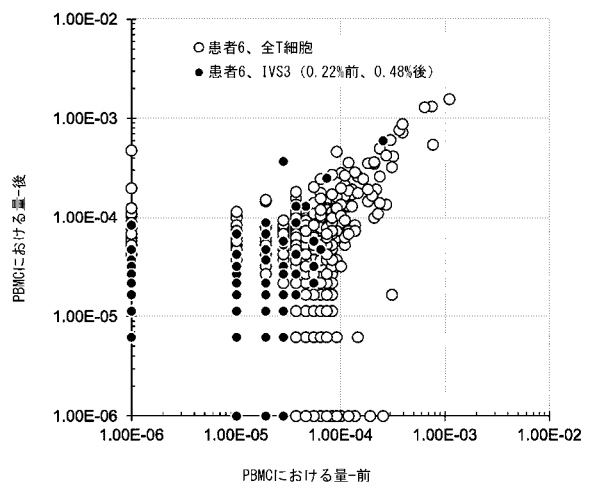
【 図 2 】



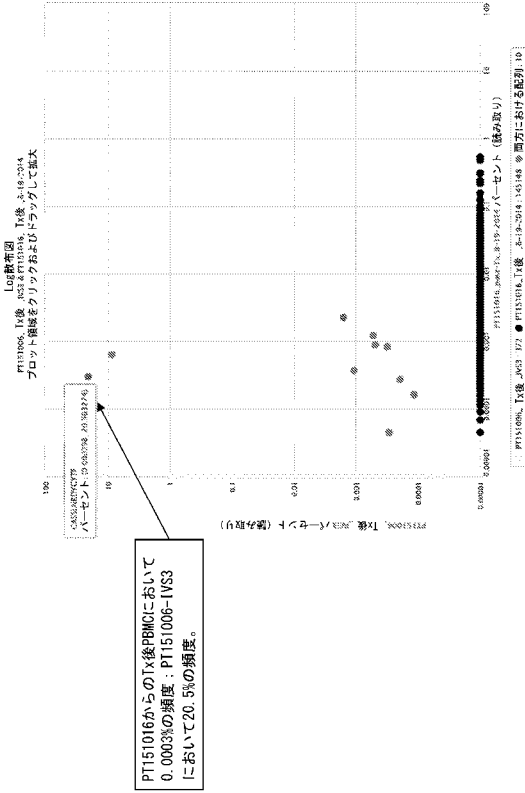
【 図 3 】



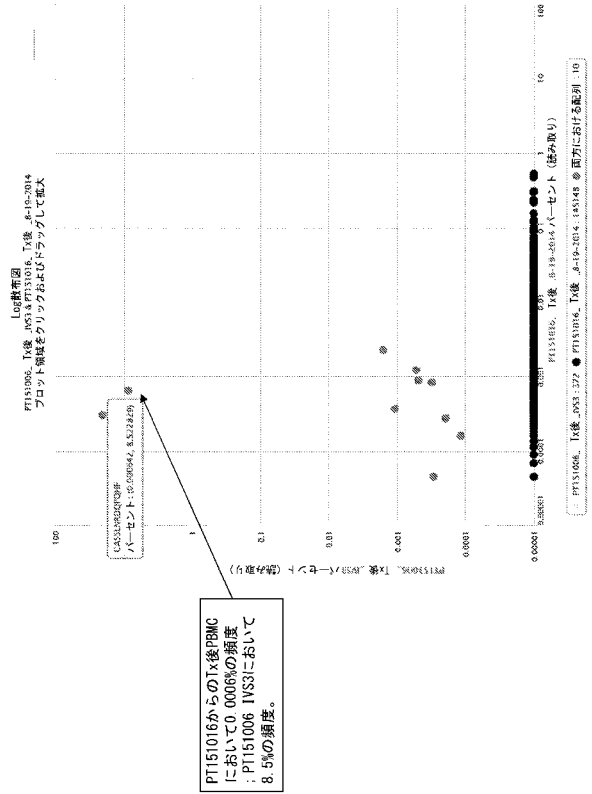
【 図 4 】



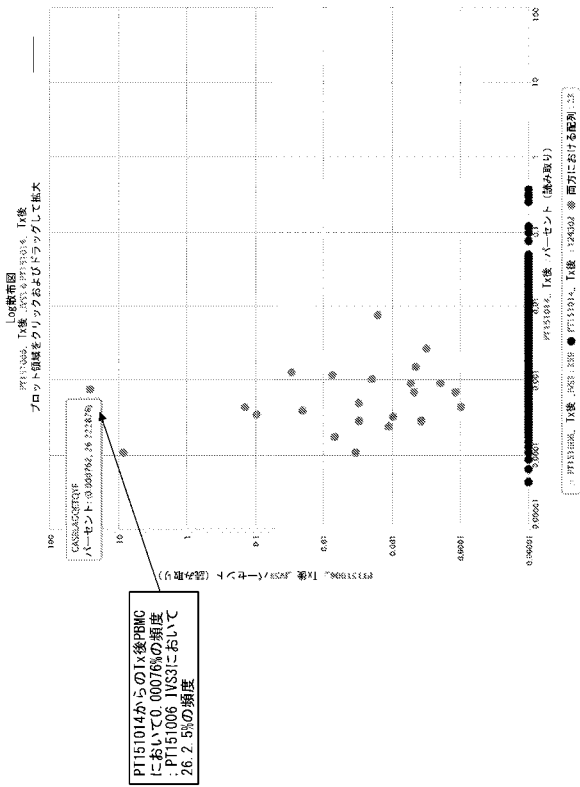
【 図 5 】



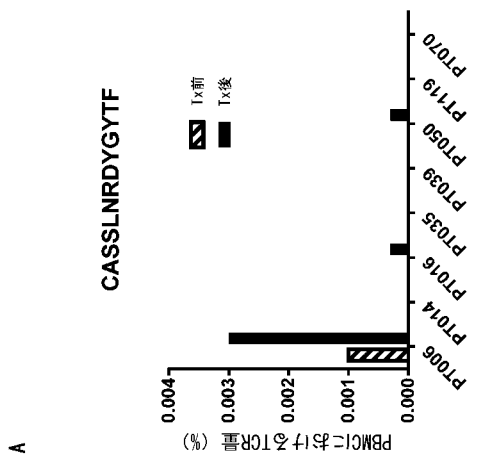
【 図 6 】



【 図 7 】

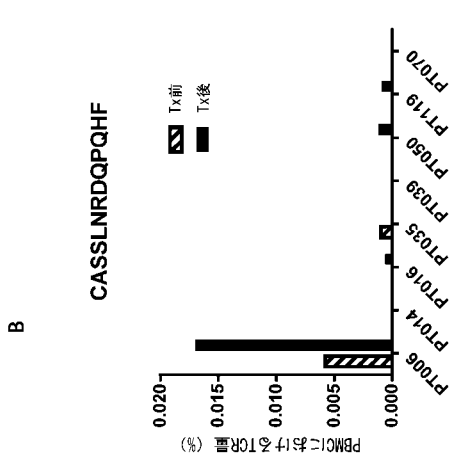


【 図 8 A 】

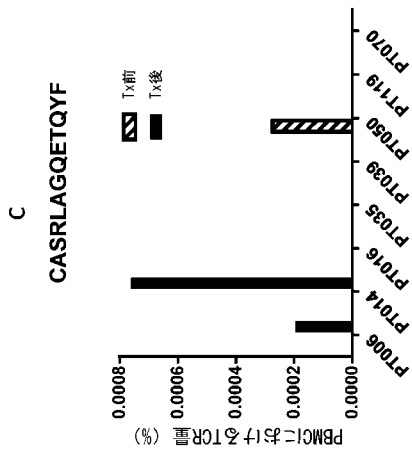


A

【 図 8 B 】



【 図 8 C 】



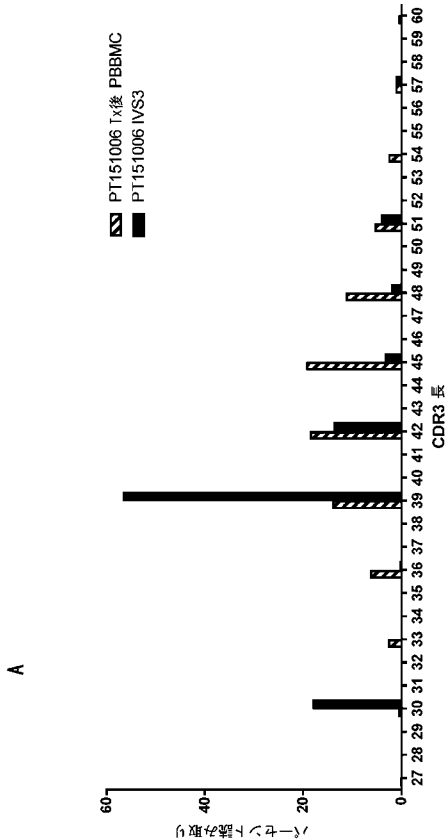
【 図 9 】

患者ID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列
PT151006	AAGATCCAGGCAACAGAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGC TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:5)	CASSLNRDQYTF (配列番号:2)
PT151016	AAGATCCAGGCAACAGAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGT TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:10)	CASSLNRDQYTF (配列番号:2)
PT151050	AAGATCCAGGCAACAGAGGAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGC TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:11)	CASSLNRDQYTF (配列番号:2)

患者ID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列
PT151006	ACCATTACAGCCGCAAGAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGC TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:6)	CASSLNRDQPQHF (配列番号:3)
PT151016	GAGATCCAGGCAACAGAGGAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGC TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:12)	CASSLNRDQPQHF (配列番号:3)
PT151050	AATGTGACCCCTTGGAGCTGGAGCTGGAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGC TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:13)	CASSLNRDQPQHF (配列番号:3)

患者ID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列
PT151006	ATTCGTGAGTCCGCGCAGCAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGC TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:7)	CASRLAGQETQYF (配列番号:4)
PT151014	AGGCTGAGTCCGCGCAGCAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGC TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:14)	CASRLAGQETQYF (配列番号:4)
PT151050	AATGTGACCCCTTGGAGCTGGAGGAGGACTCCGCCGTGTATCTCTGTGCCAGCAGC TTGAGACGGGACTATGGCTACAGCTTGGTTGG (配列番号:15)	CASRLAGQETQYF (配列番号:4)

【 図 10 A 】



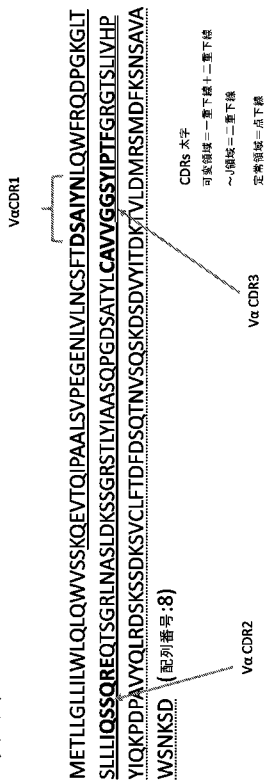
【 図 1 0 B 】

B

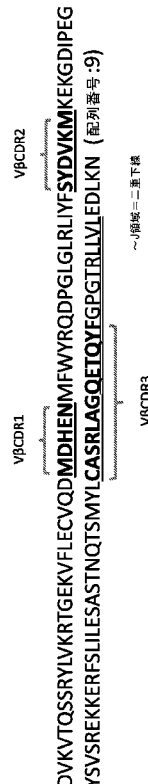
PT151006 ヌクレオチド配列	アミノ酸	CD43 nt 長	V 遺伝子名	D 遺伝子名	J 遺伝子名	V 変換	N1 挿入	D3 変換	N2 挿入	J 変換
AGATCCAGCGCACAGCAGG AGCACTCCGCGTATCTCTGT SCGACGAGCTTGAGAGGAGCT ATGCTACAGCTTCGTTGG (配列番号:5)	CASSINRDYQTF (配列番号:7)	39	TCRBV07- 08	TCRB001- 01	TCRB001- 02	3	2	3	0	3
AGCATTACGCGCAGAGAGC EGCACTACGCAAGTATCTCTGT SCGACGAGCTTGAGAGGAGCT ATGCTACAGCTTCGTTGG (配列番号:3)	CASSINRDQQHF (配列番号:3)	39	TCRBV07- 07	TCRB001- 01	TCRB001- 05	3	2	3	2	7
ATTCGAGAGCGACAGCA NATTCGAGAGCGACAGCA SAAATTTATCTCTGTCCAGCA SACTAGGCGGAGAGAGCCAGT CTTGGGCGCA (配列番号:7)	CASRLAGDQTF (配列番号:4)	39	TCRBV28- 01	TCRB002- 01	TCRB02- 05	6	0	3	0	2

【 図 1 1 】

TCRアルファ:



TCRベータ可変領域:



【 図 1 2 】

第1公報TCRベータCDR3

C A S L N R D Y G Y T F
 PT006 T G T G C C A G C A G C T T G A A C A G G G A C T A T G G C T A C A C C T T C
 PT016 T G T G C C A G C A G I T T G A A C E G G A C T A T G G C T A C A C C T T C
 PT050 T G T G C C A G C A G C T T A A C A G G G A C T A T G G C T A C A C C T T C

第2公報TCRベータCDR3

C A S S L N R D Q P Q H F
 PT006 T G T G C T A G C A G C T T G A A C A G G G A C C A G C C C A G C A T T T
 PT016 T G T G C C A G C A G C T T A A C E G G A C C A G C C C C A G C A T T T
 PT050 T G T G C C A G C A G C T T G A A I E G I G A I C A G C C C C A G C A T T T

第3公報TCRベータCDR3

C A S R L A G Q E T Q Y F
 PT006 T G T G C C A G C A G A C T A G C G G G A C A G A G A C C C A G T A C T T C
 PT014 T G T G C C A G C A G A C T A G C G G G C A A G A G A C C C A G T A C T T C
 PT050 T G E G C C A G C A G A C T A G C G G G G C A A G A G A C C C A G T A C T T C

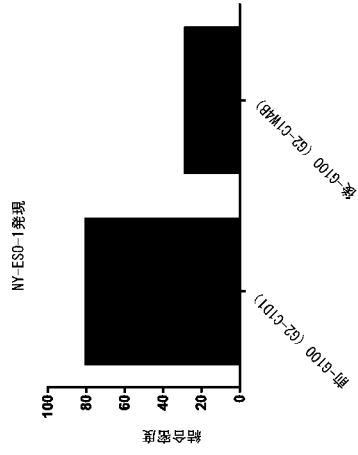
【 図 1 3 】

MEAVTTLREGGVRPSRKMILLILLPGSGGLGAVVSOHPS
 WYICKGTSVKIECRSLDFQATTFWYRQPKQSLMLMATSN
 EGSKATYEQGVKDKFLINHASLTLTSAHPEDSSFFYCSA
 RKGLAGREIQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE

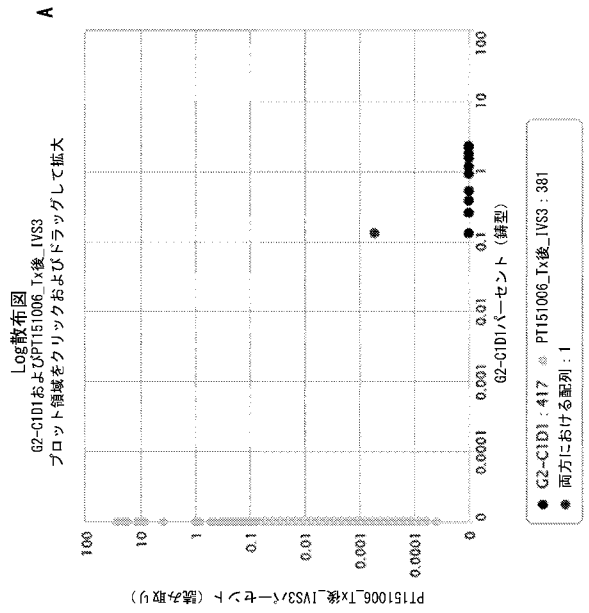
配列番号: 16

CDR3 - 太字
可変領域 (VDJ) - 下線

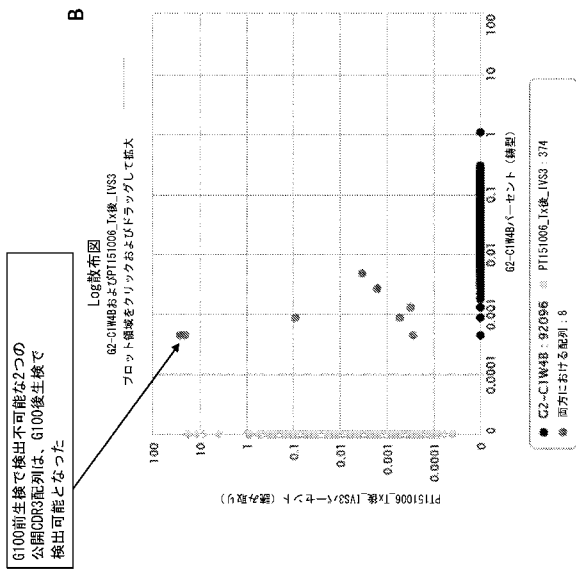
【 図 1 4 】



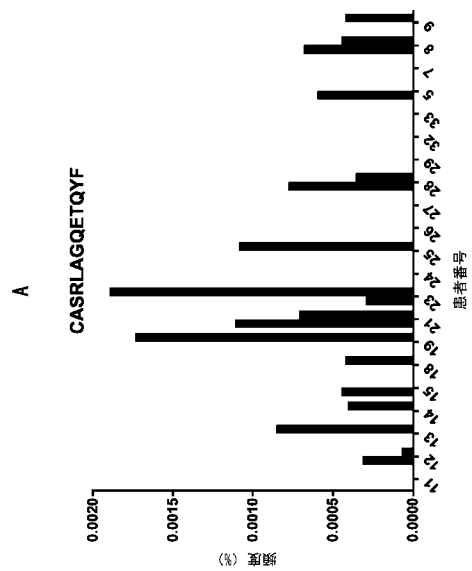
【 図 1 5 A 】



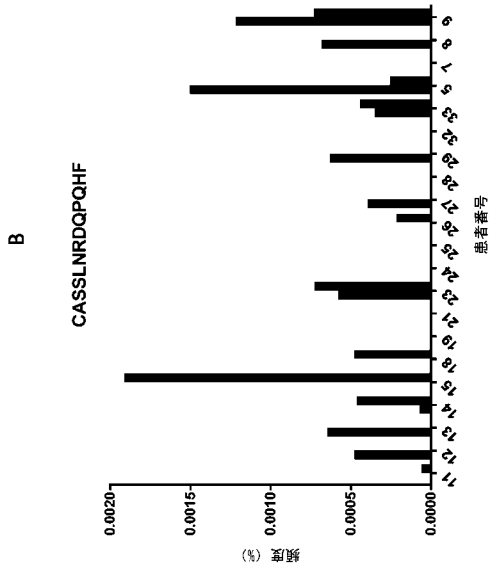
【 図 1 5 B 】



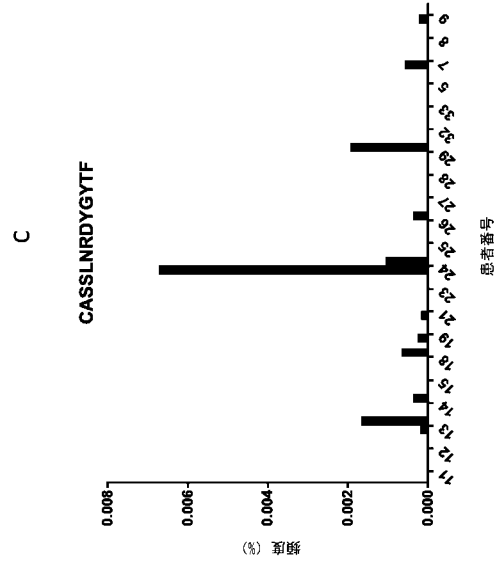
【 図 1 6 A 】



【 図 1 6 B 】



【 図 1 6 C 】



【 図 1 7 】

小遺伝子	合計	PH51006-1 後_NGS頻度	PH51019-1 後頻度
TCRB07-01	43464	6.41014328278972 %	0 %
TCRB07-06	1929	0.087413853330154 %	0.0036237267316026 %
TCRB07-09	14	0.02288107381779015 %	0 %
TCRB07-09	37	0.01686863152321422 %	0 %
TCRB07-09	56	0.00714320263416765 %	0 %
TCRB07-09	76	0.01519225471387 %	0 %
TCRB07-09	16	0.0030956591417612316 %	0 %
TCRB07-32	0	0.001183653029314036 %	0 %

【 図 1 8 】

C A S S L N R D Q P Q H F
 TCRB07-07 T G T G C T A G C A G C T T G A A C A G G A C C A G C C C C A G C A T T T
 TCRB07-09 T G T G C A G C A G C T T A A C A G G A C C A G C C C C A G C A T T T
 TCRB07-09 T G T G C A G C A G C T T A A C A G G A C C A G C C C C A G C A T T T

Figure 18

【 図 1 9 】

患者ID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列番号2	V 遺伝子	J 遺伝子
PT151006	AAAGTCCAGCGCACAGCAGAGGAGCTCCGCGTGTATCTCTGTGCCAGCA GCTTGAACAAGGGAGACTATGGCTACACCTTCGGTTGG (配列番号5)	CASSINRDYGYTF	TCRBV07-08	TCRB101-02
C131-001	AAAGTCCGGTCCACAAAGCTGGAGGACTCAGGCATGTACTTCTGTGCCAGCA GTCTAAACAGGGAGACTATGGCTACACCTTCGGTTGG (配列番号17)	CASSINRDYGYTF	TCRBV02-01	TCRB101-02
G2-C1W4B	ATTCTGGAGTCCCGCAGCACCACCAAGCATCTATGTACCTGTGTGCCAGCAG TTTAAACCGGGATATGGCTACACCTTCGGTTGG (配列番号18)	CASSINRDYGYTF	TCRBV28-01	TCRB101-02

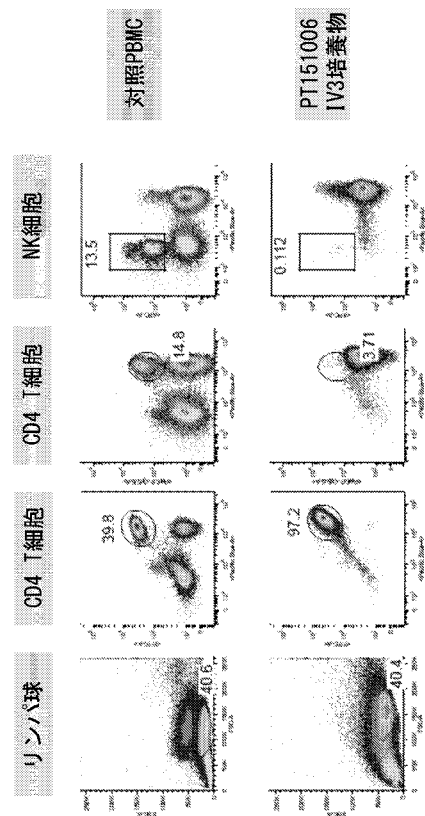
患者ID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列番号3	V 遺伝子	J 遺伝子
PT151006	ACGATTCAGCGCACAGCAGAGGAGCTCAGCCATGTATCTCTGTGCCAGCA GCTTGAACAAGGGAGACTATGGCTACACCTTCGGTTGG (配列番号6)	CASSINRDQPQHF	TCRBV07-07	TCRB101-05
C131-013	AAATGAAAGCCCTTGGAGCTGGAGGACTCAGGCCTGTATCTCTGTGCCAGCAG CTTGAACAGGGATCAGCCCGCAGCATTITGGTGT (配列番号19)	CASSINRDQPQHF	TCRBV05-08	TCRB101-05
C131-013	AAATGAAAGCCCTTGGAGCTGGAGGACTCAGGCCTGTATCTCTGTGCCAGCAG CTTGAACAGGGATCAGCCCGCAGCATTITGGTGT (配列番号20)	CASSINRDQPQHF	TCRBV13-01	TCRB101-05
C131-013	AAATGAAAGCCCTTGGAGCTGGAGGACTCAGGCCTGTATCTCTGTGCCAGCAG CTTGAACAGGGATCAGCCCGCAGCATTITGGTGT (配列番号21)	CASSINRDQPQHF	TCRBV05-05	TCRB101-05

患者ID	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列番号4	V 遺伝子	J 遺伝子
PT151006	ATTTCTGGAGTCCCGCAGCACCACAGACATCTATGTACCTGTGTGCCAGCAE ACTTGAACAGGGAGACTATGGCTACACCTTCGGTTGG (配列番号7)	CASRLAQQTQYF	TCRBV28-01	TCRB102-05
C131-001	AGGCTTGAAGTTCGGCTCTCTCTCCAGACATCTGTGTGTGCCAGCAE ACTTGAACAGGGAGACTATGGCTACACCTTCGGTTGG (配列番号22)	CASRLAQQTQYF	TCRBV06-06	TCRB102-05
G2-C1W4B	ACTTGGAGTCTGGAGGACTCAGCCAGCATTITGGTGT CTAAGGGAGCAGGAGAGCAGTACTTTCGGGCCA (配列番号23)	CASRLAQQTQYF	TCRBV25-01	TCRB102-05

【 配列表 】

2018532386000001.app

【 図 2 0 】



染色ハネル: CD3-PB, CD4-FITC, CD8-PerCP, CD56-APC

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/050826

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 C07K14/725 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHAO YANGBING ET AL: "Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines", 1 April 2005 (2005-04-01), THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, PAGE(S) 4415 - 4423, XP002343301, ISSN: 0022-1767 cited in the application page 4418, left-hand column, paragraph 2 - page 4420, right-hand column, paragraph 1 -----	1-48
A	WO 2007/131092 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; MORGAN RICHARD A [US]; COHEN CYRILLE) 15 November 2007 (2007-11-15) figures 1, 3; example 2 -----	1-48
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 November 2016		Date of mailing of the international search report 13/02/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Barnas, Christoph

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/050826

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007131092 A2	15-11-2007	AT 550356 T	15-04-2012
		AU 2007248019 A1	15-11-2007
		CA 2651174 A1	15-11-2007
		DK 2016102 T3	02-07-2012
		EP 2016102 A2	21-01-2009
		ES 2382777 T3	13-06-2012
		PT 2016102 E	15-05-2012
		US 2009304657 A1	10-12-2009
		US 2013116167 A1	09-05-2013
		WO 2007131092 A2	15-11-2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/050826

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 2 0 6
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 38/10 (2006.01)	A 6 1 K 38/10	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	
A 6 1 K 31/513 (2006.01)	A 6 1 K 31/513	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	Y
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	G 0 1 N 33/574	A
	C 1 2 Q 1/6869	Z

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100166165
弁理士 津田 英直

(72) 発明者 ヘイリング ルー
アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 1 5 シアトル フォーティサード アベニュー ノース
イースト 6 8 3 8

(72) 発明者 ジャン ヘンリック テル メーレン
アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 0 4 0 マーサー アイランド ウェスト マーサー ウェ
イ 3 8 4 2

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QQ79 QR36 QR48
QR72 QS15 QS31 QS33 QS36 QX01 QX02
4B065 AA93X AA94X AA94Y AA97X AB01 AC12 AC14 AC20 BA01 BA02
CA24 CA44
4C084 AA13 AA19 BA01 BA08 BA18 BA23 MA02 MA05 MA22 MA24
NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272

专利名称(译)	NY-ESO-1特异性TCR及其使用方法		
公开(公告)号	JP2018532386A	公开(公告)日	2018-11-08
申请号	JP2018512122	申请日	2016-09-08
申请(专利权)人(译)	免疫设计公司		
[标]发明人	ジャンヘンリックテルメーレン		
发明人	ヘイリングルー ジャンヘンリックテルメーレン		
IPC分类号	C12N15/62 C07K19/00 C07K14/725 C12N15/12 C12N15/867 C12N5/0783 C12N5/10 C12Q1/68 C12Q1/04 A61K35/17 A61K35/76 A61K48/00 A61K31/7088 A61K38/10 A61K39/39 A61K33/24 A61K31 /282 A61K39/395 A61K31/704 A61K31/675 A61K31/337 A61K31/7048 A61K31/513 G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/6869		
CPC分类号	C07K14/7051 A61K9/0019 A61K31/7016 A61K38/1774 A61K45/06 A61P35/00 C07K2319/03 C07K2319/035 G01N33/57492		
FI分类号	C12N15/62.ZNA.Z C07K19/00 C07K14/725 C12N15/12 C12N15/867.Z C12N5/0783 C12N5/10 C12Q1 /68.Z C12Q1/04 A61K35/17 A61K35/76 A61K48/00 A61K31/7088 A61K38/10 A61K39/39 A61K33/24 A61K31/282 A61K39/395.N A61K31/704 A61K31/675 A61K31/337 A61K31/7048 A61K31/513 G01N33 /53.D G01N33/53.Y G01N33/574.A C12Q1/6869.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063 /QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QS15 4B063/QS31 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AA97X 4B065/AB01 4B065/AC12 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084 /AA13 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/MA02 4C084/MA05 4C084/MA22 4C084/MA24 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C085/AA14 4C085/AA38 4C085/FF14 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BA02 4C086 /BC43 4C086/DA35 4C086/EA10 4C086/EA11 4C086/EA16 4C086/HA12 4C086/MA22 4C086/MA24 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087 /MA02 4C087/MA05 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/BA16 4C206/KA01 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/BA41 4H045 /CA40 4H045/DA50 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	62/377276 2016-08-19 US 62/216099 2015-09-09 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及NY-ESO-1特异性TCR氨基酸序列及其使用方法。

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z N A Z 4 B 0 6 3
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C O 7 K 14/725 (2006.01)	C O 7 K 14/725	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/867 (2006.01)	C 1 2 N 15/867	Z 4 C 0 8 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-512122 (P2018-512122)	(71) 出願人	514247791
(86) (22) 出願日	平成28年9月8日 (2016. 9. 8)		イミュン デザイン コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成30年4月26日 (2018. 4. 26)		アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/050826		, シアトル, イーストレイク アベニ
(87) 国際公開番号	W02017/044661		ュー イー. 1 6 1 6, スイート 3
(87) 国際公開日	平成29年3月16日 (2017. 3. 16)		1 0
(31) 優先権主張番号	62/377, 276	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成28年8月19日 (2016. 8. 19)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100123582
(31) 優先権主張番号	62/216, 099		弁理士 三橋 真二
(32) 優先日	平成27年9月9日 (2015. 9. 9)	(74) 代理人	100117019
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N Y - E S O - 1 特異的 T C R およびそれらの使用方法