

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7256794号

(P7256794)

(45)発行日 令和5年4月12日(2023.4.12)

(24)登録日 令和5年4月4日(2023.4.4)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 0 7 K 14/725 (2006.01)

C 0 7 K 14/725

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

請求項の数 39 (全51頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-516422(P2020-516422)

(86)(22)出願日 平成30年9月19日(2018.9.19)

(65)公表番号 特表2020-534828(P2020-534828
A)

(43)公表日 令和2年12月3日(2020.12.3)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/051641

(87)国際公開番号 WO2019/060349

(87)国際公開日 平成31年3月28日(2019.3.28)

審査請求日 令和3年9月21日(2021.9.21)

(31)優先権主張番号 62/560,930

(32)優先日 平成29年9月20日(2017.9.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 510002280

アメリカ合衆国

アメリカ合衆国、2 0 8 9 2 - 7 7 8 8

メリーランド州、ベセスダ、エムエス

シー 7 7 8 8、ロックレッジ ドライヴ

6 7 0 1、スイート 7 0 0、ナショナル

インスティテュート オブ ヘルス、オ

フィス オブ テクノロジー トランスフ

アー

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

(74)代理人 100136629

弁理士 鎌田 光宜

(74)代理人 100125070

弁理士 土井 京子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異型 R A S に対する H L A クラス I I 拘束性 T 細胞受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離又は精製された T 細胞受容体 (T C R) であって、前記 T C R が、ヒト白血球抗原 (H L A) クラス I I 分子によって提示される変異型ヒト R A S アミノ酸配列に対して抗原特異性を有し、

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト K i r s t e n ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (K R A S)、変異型ヒト H a r v e y ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (H R A S)、又は変異型ヒト神経芽細胞腫ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (N R A S) のアミノ酸配列であり、

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、1 2 位のグリシンが置換されている、野生型ヒト K R A S、野生型ヒト H R A S、又は野生型ヒト N R A S のアミノ酸配列を含み、1 2 位が、前記野生型ヒト K R A S、野生型ヒト H R A S、又は野生型ヒト N R A S のアミノ酸配列を参照することによって定義され；並びに

(a) 前記置換が、1 2 位のグリシンのバリンによる置換であり、及び前記 T C R が：配列番号 1 のアミノ酸配列を含む 鎖の相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3 を含むか、又は

(b) 前記置換が、1 2 位のグリシンのシステインによる置換であり、及び前記 T C R が：

10

20

配列番号 7 のアミノ酸配列を含む 鎖の相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 1、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、及び配列番号 12 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3 を含む T C R。

【請求項 2】

前記 H L A クラス I I 分子が、H L A - D R 分子である、請求項 1 に記載の T C R。

【請求項 3】

前記 H L A クラス I I 分子が H L A - D R B 1 分子である、請求項 1 に記載の T C R。

【請求項 4】

前記 H L A クラス I I 分子が、H L A - D R B 1 * 0 7 : 0 1 分子又は H L A - D R B 1 * 1 1 : 0 1 分子である、請求項 1 に記載の T C R。

【請求項 5】

(i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；
 (i i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；
 (i i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；
 (i v) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；
 (v) 配列番号 1 3 のアミノ酸 2 1 ~ 1 3 1 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；

(v i) 配列番号 1 4 のアミノ酸 1 7 ~ 1 3 2 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；

(v i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸 2 3 ~ 1 3 2 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；

(v i i i) 配列番号 1 6 のアミノ酸 2 2 ~ 1 3 7 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；又は

(i x) (i) 及び (i i) の両方；(i) 及び (v i) の両方；(i i) 及び (v) の両方；(v) 及び (v i) の両方；(i i i) 及び (i v) の両方；(i i i) 及び (v i i i) の両方；(i v) 及び (v i i) の両方；若しくは (v i i) 及び (v i i i) の両方

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 6】

(i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列、
 (i i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列、
 (i i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列、
 (i v) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列、
 (v) 配列番号 1 3 のアミノ酸 2 1 ~ 1 3 1 ；
 (v i) 配列番号 1 4 のアミノ酸 1 7 ~ 1 3 2 ；
 (v i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸 2 3 ~ 1 3 2 ；
 (v i i i) 配列番号 1 6 のアミノ酸 2 2 ~ 1 3 7 ；又は
 (i x) (i) 及び (i i) の両方；(i) 及び (v i) の両方；(i i) 及び (v) の両方；(v) 及び (v i) の両方；(i i i) 及び (i v) の両方；(i i i) 及び (v i i i) の両方；(i v) 及び (v i i) の両方；若しくは (v i i) 及び (v i i i) の両方

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 7】

(a) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖定常領域であって：

(i) 配列番号 3 0 の 4 8 位の X が、T h r 若しくは C y s であり；

(i i) 配列番号 3 0 の 1 1 2 位の X が、S e r、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p であり；

10

20

30

40

50

(i i i) 配列番号 3 0 の 1 1 4 位の X が、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、若しくは T r p であり；かつ

(i v) 配列番号 3 0 の 1 1 5 位の X が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p である 鎖定常領域；

(b) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖定常領域であって、配列番号 3 1 の 5 7 位の X が S e r 若しくは C y s である 鎖定常領域；又は

(c) (a) 及び (b) の両方

を更に含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 8】

(a) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む 鎖定常領域であって：

(i) 配列番号 3 0 の 4 8 位の X が、T h r 若しくは C y s であり；

(i i) 配列番号 3 0 の 1 1 2 位の X が、S e r、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p であり；

(i i i) 配列番号 3 0 の 1 1 4 位の X が、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、若しくは T r p であり；かつ

(i v) 配列番号 3 0 の 1 1 5 位の X が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p である 鎖定常領域；

(b) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む 鎖定常領域であって、配列番号 3 1 の 5 7 位の X が S e r 若しくは C y s である 鎖定常領域；又は

(c) (a) 及び (b) の両方

を更に含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 9】

(a) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖であって：

(i) 配列番号 3 4 の 1 7 9 位の X が、T h r 若しくは C y s であり；

(i i) 配列番号 3 4 の 2 4 3 位の X が、S e r、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p であり；

(i i i) 配列番号 3 4 の 2 4 5 位の X が、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、若しくは T r p であり；かつ

(i v) 配列番号 3 4 の 2 4 6 位の X が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p である 鎖；

(b) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖であって、配列番号 3 5 の 1 8 9 位の X が S e r 若しくは C y s である 鎖；

(c) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖であって：

(i) 配列番号 3 6 の 1 8 0 位の X が、T h r 若しくは C y s であり；

(i i) 配列番号 3 6 の 2 4 4 位の X が、S e r、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p であり；

(i i i) 配列番号 3 6 の 2 4 6 位の X が、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、若しくは T r p であり；かつ

(i v) 配列番号 3 6 の 2 4 7 位の X が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p である 鎖；

(d) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖であって、配列番号 3 7 の 1 9 4 位の X が S e r 若しくは C y s である 鎖；

(e) 配列番号 3 4 のアミノ酸 2 1 ~ 2 6 8 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖であって：

(i) 配列番号 3 4 の 1 7 9 位の X が、T h r 若しくは C y s であり；

(i i) 配列番号 3 4 の 2 4 3 位の X が、S e r、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p であり；

10

20

30

40

50

(i i i) 配列番号 3 4 の 2 4 5 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(i v) 配列番号 3 4 の 2 4 6 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである 鎖；

(f) 配列番号 3 5 のアミノ酸 1 7 ~ 3 0 5 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖であって、配列番号 3 5 の 1 8 9 位の X がSer若しくはCysである 鎖；

(g) 配列番号 3 6 のアミノ酸 2 3 ~ 2 6 9 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖であって：

(i) 配列番号 3 6 の 1 8 0 位の X が、Thr若しくはCysであり；

10

(i i) 配列番号 3 6 の 2 4 4 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(i i i) 配列番号 3 6 の 2 4 6 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(i v) 配列番号 3 6 の 2 4 7 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである 鎖；

(h) 配列番号 3 7 のアミノ酸 2 2 ~ 3 1 0 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む 鎖であって、配列番号 3 7 の 1 9 4 位の X がSer若しくはCysである 鎖；又は

(i) (a) 及び (b) の両方；(a) 及び (f) の両方；(b) 及び (e) の両方；(e) 及び (f) の両方；(c) 及び (d) の両方；(c) 及び (h) の両方；(d) 及び (g) の両方；若しくは (g) 及び (h) の両方を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離又は精製された T C R。

20

【請求項 1 0】

(a) 配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む 鎖であって：

(i) 配列番号 3 4 の 1 7 9 位の X が、Thr若しくはCysであり；

(i i) 配列番号 3 4 の 2 4 3 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(i i i) 配列番号 3 4 の 2 4 5 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

30

(i v) 配列番号 3 4 の 2 4 6 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである 鎖；

(b) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む 鎖であって、配列番号 3 5 の 1 8 9 位の X がSer若しくはCysである 鎖；

(c) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む 鎖であって：

(i) 配列番号 3 6 の 1 8 0 位の X が、Thr若しくはCysであり；

(i i) 配列番号 3 6 の 2 4 4 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(i i i) 配列番号 3 6 の 2 4 6 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

40

(i v) 配列番号 3 6 の 2 4 7 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである 鎖；

(d) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む 鎖であって、配列番号 3 7 の 1 9 4 位の X がSer若しくはCysである 鎖；

(e) 配列番号 3 4 のアミノ酸 2 1 ~ 2 6 8 を含む 鎖であって：

(i) 配列番号 3 4 の 1 7 9 位の X が、Thr若しくはCysであり；

(i i) 配列番号 3 4 の 2 4 3 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(i i i) 配列番号 3 4 の 2 4 5 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

50

(i v) 配列番号 3 4 の 2 4 6 位の X が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p である 鎖；

(f) 配列番号 3 5 のアミノ酸 1 7 ~ 3 0 5 を含む 鎖であって、配列番号 3 5 の 1 8 9 位の X が S e r 若しくは C y s である 鎖；

(g) 配列番号 3 6 のアミノ酸 2 3 ~ 2 6 9 を含む 鎖であって：

(i) 配列番号 3 6 の 1 8 0 位の X が、T h r 若しくは C y s であり；

(i i) 配列番号 3 6 の 2 4 4 位の X が、S e r、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p であり；

(i i i) 配列番号 3 6 の 2 4 6 位の X が、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、若しくは T r p であり；かつ

(i v) 配列番号 3 6 の 2 4 7 位の X が、G l y、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、若しくは T r p である 鎖；

(h) 配列番号 3 7 のアミノ酸 2 2 ~ 3 1 0 を含む 鎖であって、配列番号 3 7 の 1 9 4 位の X が S e r 若しくは C y s である 鎖；又は

(i) (a) 及び (b) の両方；(a) 及び (f) の両方；(b) 及び (e) の両方；(e) 及び (f) の両方；(c) 及び (d) の両方；(c) 及び (h) の両方；(d) 及び (g) の両方；若しくは (g) 及び (h) の両方

を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の単離又は精製された T C R。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の T C R の機能的部分を含む、単離又は精製されたポリペプチドであって、

前記機能的部分が、ヒト白血球抗原 (H L A) クラス I I 分子によって提示される変異型ヒト R A S アミノ酸配列に対して抗原特異性を有し、

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト K i r s t e n ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (K R A S)、変異型ヒト H a r v e y ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (H R A S)、又は変異型ヒト神経芽細胞腫ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (N R A S) のアミノ酸配列であり、

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、1 2 位のグリシンが置換されている、野生型ヒト K R A S、野生型ヒト H R A S、又は野生型ヒト N R A S のアミノ酸配列を含み、1 2 位が、前記野生型ヒト K R A S、野生型ヒト H R A S、又は野生型ヒト N R A S のアミノ酸配列を参照することによって定義され；並びに

(a) 前記置換が、1 2 位のグリシンのバリンによる置換であり、及び前記機能的部分が：配列番号 1 のアミノ酸配列を含む 鎖の相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3 を含むか、又は

(b) 前記置換が、1 2 位のグリシンのシステインによる置換であり、及び前記機能的部分が：

配列番号 7 のアミノ酸配列を含む 鎖の相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 1、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3 を含む

ポリペプチド。

【請求項 1 2】

前記機能的部分が：

(i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；

(i i) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；

(i i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；

(i v) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列；

(v) 配列番号 1 3 のアミノ酸 2 1 ~ 1 3 1 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列；

(v i) 配列番号 14 のアミノ酸 17 ~ 132 に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列；

(v i i) 配列番号 15 のアミノ酸 23 ~ 132 に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列；

(v i i i) 配列番号 16 のアミノ酸 22 ~ 137 に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列；又は

(i x) (i) 及び (i i) の両方；(i) 及び (v i) の両方；(i i) 及び (v) の両方；(v) 及び (v i) の両方；(i i i) 及び (i v) の両方；(i i i) 及び (v i i i) の両方；(i v) 及び (v i i) の両方；若しくは (v i i) 及び (v i i i) の両方

10

を含む、請求項 1.1 に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 13】

前記機能的部分が：

(i) 配列番号 13 のアミノ酸配列、

(i i) 配列番号 14 のアミノ酸配列、

(i i i) 配列番号 15 のアミノ酸配列、

(i v) 配列番号 16 のアミノ酸配列、

(v) 配列番号 13 のアミノ酸 21 ~ 131；

(v i) 配列番号 14 のアミノ酸 17 ~ 132；

(v i i) 配列番号 15 のアミノ酸 23 ~ 132；

(v i i i) 配列番号 16 のアミノ酸 22 ~ 137；又は

(i x) (i) 及び (i i) の両方；(i) 及び (v i) の両方；(i i) 及び (v) の両方；(v) 及び (v i) の両方；(i i i) 及び (i v) の両方；(i i i) 及び (v i i i) の両方；(i v) 及び (v i i) の両方；若しくは (v i i) 及び (v i i i) の両方

20

を含む、請求項 1.1 に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 14】

(a) 配列番号 30 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって：

30

(i) 配列番号 30 の 48 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(i i) 配列番号 30 の 112 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(i i i) 配列番号 30 の 114 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(i v) 配列番号 30 の 115 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 31 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって、配列番号 31 の 57 位の X が Ser 若しくは Cys であるアミノ酸配列；又は

(c) (a) 及び (b) の両方

40

を更に含む、請求項 1.1 ~ 1.3 のいずれか一項に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 15】

(a) 配列番号 30 のアミノ酸配列であって：

(i) 配列番号 30 の 48 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(i i) 配列番号 30 の 112 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(i i i) 配列番号 30 の 114 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(i v) 配列番号 30 の 115 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であるアミノ酸配列；

50

(b) 配列番号 31 のアミノ酸配列であって、配列番号 31 の 57 位の X が Ser 若しくは Cys であるアミノ酸配列；又は

(c) (a) 及び (b) の両方

を更に含む、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の単離又は精製されたポリペプチド。
【請求項 16】

(a) 配列番号 34 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって：

(i) 配列番号 34 の 179 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(ii) 配列番号 34 の 243 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(iii) 配列番号 34 の 245 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(iv) 配列番号 34 の 246 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であるアミノ酸配列；

(b) 配列番号 35 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって、配列番号 35 の 189 位の X が Ser 若しくは Cys であるアミノ酸配列；

(c) 配列番号 36 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって：

(i) 配列番号 36 の 180 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(ii) 配列番号 36 の 244 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(iii) 配列番号 36 の 246 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(iv) 配列番号 36 の 247 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であるアミノ酸配列；

(d) 配列番号 37 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって、配列番号 37 の 194 位の X が Ser 若しくは Cys であるアミノ酸配列；

(e) 配列番号 34 のアミノ酸 21 ~ 268 に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって：

(i) 配列番号 34 の 179 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(ii) 配列番号 34 の 243 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(iii) 配列番号 34 の 245 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(iv) 配列番号 34 の 246 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であるアミノ酸配列；

(f) 配列番号 35 のアミノ酸 17 ~ 305 に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって、配列番号 35 の 189 位の X が Ser 若しくは Cys であるアミノ酸配列；

(g) 配列番号 36 のアミノ酸 23 ~ 269 に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって：

(i) 配列番号 36 の 180 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(ii) 配列番号 36 の 244 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(iii) 配列番号 36 の 246 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(iv) 配列番号 36 の 247 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であるアミノ酸配列；

(h) 配列番号 37 のアミノ酸 22 ~ 310 に対して少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列であって、配列番号 37 の 194 位の X が Ser 若しくは Cys であるアミノ酸配列；

又は

10

20

30

40

50

(i) (a) 及び (b) の両方 ; (a) 及び (f) の両方 ; (b) 及び (e) の両方 ; (e) 及び (f) の両方 ; (c) 及び (d) の両方 ; (c) 及び (h) の両方 ; (d) 及び (g) の両方 ; 若しくは (g) 及び (h) の両方
を含む、請求項 11 ~ 15 のいずれか一項に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 17】

(a) 配列番号 34 のアミノ酸配列であって :

(i) 配列番号 34 の 179 位の X が、Thr 若しくは Cys であり ;

(ii) 配列番号 34 の 243 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり ;

(iii) 配列番号 34 の 245 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり ; かつ

(iv) 配列番号 34 の 246 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であるアミノ酸配列 ;

(b) 配列番号 35 のアミノ酸配列であって、配列番号 35 の 189 位の X が Ser 若しくは Cys であるアミノ酸配列 ;

(c) 配列番号 36 のアミノ酸配列であって :

(i) 配列番号 36 の 180 位の X が、Thr 若しくは Cys であり ;

(ii) 配列番号 36 の 244 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり ;

(iii) 配列番号 36 の 246 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり ; かつ

(iv) 配列番号 36 の 247 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であるアミノ酸配列 ;

(d) 配列番号 37 の 194 位の X が Ser 若しくは Cys である、配列番号 37 のアミノ酸配列 ;

(e) (a) 及び (b) の両方 ; 又は

(f) (c) 及び (d) の両方

を含む、請求項 11 ~ 15 のいずれか一項に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 18】

単離又は精製されたタンパク質であって、

前記タンパク質が、ヒト白血球抗原 (HLA) クラス II 分子によって提示される変異型ヒト RAS アミノ酸配列に対して抗原特異性を有し、

前記変異型ヒト RAS アミノ酸配列が、変異型ヒト Kirsten ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (KRAS)、変異型ヒト Harvey ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (HRAS)、又は変異型ヒト神経芽細胞腫ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (NRAS) のアミノ酸配列であり、

前記変異型ヒト RAS アミノ酸配列が、12 位のグリシンが置換されている、野生型ヒト KRAS、野生型ヒト HRAS、又は野生型ヒト NRAS のアミノ酸配列を含み、12 位が、前記野生型ヒト KRAS、野生型ヒト HRAS、又は野生型ヒト NRAS のアミノ酸配列を参照することによって定義され ; 並びに

(a) 前記置換が、12 位のグリシンのバリンによる置換であり、及び前記タンパク質が : 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む 鎖の相補性決定領域 (CDR) 1、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む 鎖の CDR 2、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む 鎖の CDR 3 を含む第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む 鎖の CDR 1、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む 鎖の CDR 2、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を含む 鎖の CDR 3 を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含むか、又は

(b) 前記置換が、12 位のグリシンのシステインによる置換であり、及び前記タンパク質が :

配列番号 7 のアミノ酸配列を含む 鎖の相補性決定領域 (CDR) 1、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む 鎖の CDR 2、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む 鎖の CDR 3 を含む

10

20

30

40

50

第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 1、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 2、及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む 鎖の C D R 3 を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含むタンパク質。

【請求項 1 9】

(i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(i i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 4 のアミノ酸 1 7 ~ 1 3 2 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(i i i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 4 のアミノ酸 1 7 ~ 1 3 2 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(i v) 配列番号 1 3 のアミノ酸 2 1 ~ 1 3 1 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(v) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(v i) 配列番号 1 5 のアミノ酸 2 3 ~ 1 3 2 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 6 のアミノ酸 2 2 ~ 1 3 7 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(v i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 6 のアミノ酸 2 2 ~ 1 3 7 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；又は

(v i i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸 2 3 ~ 1 3 2 に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含む、請求項 1 8 に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 2 0】

(i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(i i) 配列番号 1 3 のアミノ酸 2 1 ~ 1 3 1 を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 4 のアミノ酸 1 7 ~ 1 3 2 を含む第 2 のポリペプチド鎖

(i i i) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 4 のアミノ酸 1 7 ~ 1 3 2 を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(i v) 配列番号 1 3 のアミノ酸 2 1 ~ 1 3 1 を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(v) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(v i) 配列番号 1 5 のアミノ酸 2 3 ~ 1 3 2 を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 6 のアミノ酸 2 2 ~ 1 3 7 を含む第 2 のポリペプチド鎖；

(v i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 6 のアミノ酸 2 2 ~ 1 3 7 を含む第 2 のポリペプチド鎖；又は

(v i i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸 2 3 ~ 1 3 2 を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含む、請求項 1 8 に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 2 1】

(a) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含

む第1のポリペプチド鎖であって：

- (i) 配列番号30の48位のXが、Thr若しくはCysであり；
- (i i) 配列番号30の112位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；
- (i i i) 配列番号30の114位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ
- (i v) 配列番号30の115位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである第1のポリペプチド鎖；
- (b) 配列番号31のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、配列番号31の57位のXがSer若しくはCysである第2のポリペプチド鎖；又は
- (c) (a) 及び(b) の両方

を更に含む、請求項18～20のいずれか一項に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項22】

- (a) 配列番号30のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって：
- (i) 配列番号30の48位のXが、Thr若しくはCysであり；
- (i i) 配列番号30の112位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；
- (i i i) 配列番号30の114位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ
- (i v) 配列番号30の115位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである第1のポリペプチド鎖；
- (b) 配列番号31のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、配列番号31の57位のXがSer若しくはCysである第2のポリペプチド鎖；又は
- (c) (a) 及び(b) の両方

を更に含む、請求項18～20のいずれか一項に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項23】

- (a) 配列番号34のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって：
- (i) 配列番号34の179位のXが、Thr若しくはCysであり；
- (i i) 配列番号34の243位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；
- (i i i) 配列番号34の245位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ
- (i v) 配列番号34の246位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである第1のポリペプチド鎖；
- (b) 配列番号35のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、配列番号35の189位のXがSer若しくはCysである第2のポリペプチド鎖；
- (c) 配列番号36のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって：

- (i) 配列番号36の180位のXが、Thr若しくはCysであり；
- (i i) 配列番号36の244位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；
- (i i i) 配列番号36の246位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ
- (i v) 配列番号36の247位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである第1のポリペプチド鎖；
- (d) 配列番号37のアミノ酸配列に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、配列番号37の194位のXがSer若しくはCys

である第2のポリペプチド鎖；

(e) 配列番号34のアミノ酸21～268に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって；

(i) 配列番号34の179位のXが、Thr若しくはCysであり；

(ii) 配列番号34の243位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(iii) 配列番号34の245位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(iv) 配列番号34の246位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである第1のポリペプチド鎖；

10

(f) 配列番号35のアミノ酸17～305に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、配列番号35の189位のXがSer若しくはCysである第2のポリペプチド鎖；

(g) 配列番号36のアミノ酸23～269に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって；

(i) 配列番号36の180位のXが、Thr若しくはCysであり；

(ii) 配列番号36の244位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(iii) 配列番号36の246位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

20

(iv) 配列番号36の247位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである第1のポリペプチド鎖；

(h) 配列番号37のアミノ酸22～310に対して少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、配列番号37の194位のXがSer若しくはCysである第2のポリペプチド鎖；又は

(i) (a) 及び (b) の両方；(a) 及び (f) の両方；(b) 及び (e) の両方；(e) 及び (f) の両方；(c) 及び (d) の両方；(c) 及び (h) の両方；(d) 及び (g) の両方；若しくは (g) 及び (h) の両方

を含む、請求項18～22のいずれか一項に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項24】

30

(a) 配列番号34のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって；

(i) 配列番号34の179位のXが、Thr若しくはCysであり；

(ii) 配列番号34の243位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(iii) 配列番号34の245位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(iv) 配列番号34の246位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである第1のポリペプチド鎖；

(b) 配列番号35のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、配列番号35の189位のXがSer若しくはCysである第2のポリペプチド鎖；

40

(c) 配列番号36のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖であって；

(i) 配列番号36の180位のXが、Thr若しくはCysであり；

(ii) 配列番号36の244位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(iii) 配列番号36の246位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(iv) 配列番号36の247位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである第1のポリペプチド鎖；

(d) 配列番号37のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖であって、配列番号37の194位のXがSer若しくはCysである第2のポリペプチド鎖；

50

(e) 配列番号 34 のアミノ酸 21 ~ 268 を含む第 1 のポリペプチド鎖であって：
 (i) 配列番号 34 の 179 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；
 (ii) 配列番号 34 の 243 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；
 (iii) 配列番号 34 の 245 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ
 (iv) 配列番号 34 の 246 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である第 1 のポリペプチド鎖；
 (f) 配列番号 35 のアミノ酸 17 ~ 305 を含む第 2 のポリペプチド鎖であって、配列番号 35 の 189 位の X が Ser 若しくは Cys である第 2 のポリペプチド鎖；
 (g) 配列番号 36 のアミノ酸 23 ~ 269 を含む第 1 のポリペプチド鎖であって：
 (i) 配列番号 36 の 180 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；
 (ii) 配列番号 36 の 244 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；
 (iii) 配列番号 36 の 246 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ
 (iv) 配列番号 36 の 247 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である第 1 のポリペプチド鎖；
 (h) 配列番号 37 のアミノ酸 22 ~ 310 を含む第 2 のポリペプチド鎖であって、配列番号 37 の 194 位の X が Ser 若しくは Cys である第 2 のポリペプチド鎖；又は
 (i) (a) 及び (b) の両方；(a) 及び (f) の両方；(b) 及び (e) の両方；(e) 及び (f) の両方；(c) 及び (d) の両方；(c) 及び (h) の両方；(d) 及び (g) の両方；若しくは (g) 及び (h) の両方
 を含む、請求項 18 ~ 22 のいずれか一項に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 11 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 18 ~ 24 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸。

【請求項 26】

請求項 25 に記載の核酸を含む、組み換え発現ベクター。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の組み換え発現ベクターを含む、単離又は精製された宿主細胞。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の宿主細胞を含む、単離又は精製された細胞の集団。

【請求項 29】

(a) 請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 11 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 18 ~ 24 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 25 に記載の核酸、請求項 26 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 27 に記載の宿主細胞、又は請求項 28 に記載の細胞の集団と、(b) 薬学的に許容し得る担体と、を含む医薬組成物。

【請求項 30】

哺乳動物におけるがんの検出、治療又は予防において使用するための、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 11 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 18 ~ 24 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 25 に記載の核酸、請求項 26 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 27 に記載の宿主細胞、請求項 28 に記載の細胞の集団、又は請求項 29 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

前記がんが、膵臓、結腸直腸、肺、子宮内膜、卵巣又は前立腺のがんである、哺乳動物におけるがんの検出、治療又は予防において使用するための、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 11 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1

10

20

30

40

50

8 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 2 5 に記載の核酸、請求項 2 6 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 2 7 に記載の宿主細胞、請求項 2 8 に記載の細胞の集団、又は請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

哺乳類におけるがんの検出、治療又は予防のための医薬組成物であって、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1 8 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 2 5 に記載の核酸、請求項 2 6 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 2 7 に記載の宿主細胞、又は請求項 2 8 に記載の細胞の集団を含む、医薬組成物。

【請求項 3 3】

前記がんが、変異型ヒト R A S アミノ酸配列を発現し、前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト K R A S、変異型ヒト H R A S、又は変異型ヒト N R A S のアミノ酸配列である、請求項 3 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、12 位のグリシンが置換されている、野生型ヒト K R A S、野生型ヒト H R A S、又は野生型ヒト N R A S のアミノ酸配列を含み、12 位が、前記野生型ヒト K R A S、野生型ヒト H R A S、又は野生型ヒト N R A S のアミノ酸配列をそれぞれ参照することによって定義される、請求項 3 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 5】

前記置換が、12 位のグリシンのバリン又はシステインによる置換である、請求項 3 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 6】

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト K i r s t e n ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (K R A S) アミノ酸配列である、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト神経芽細胞腫ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (N R A S) アミノ酸配列である、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 8】

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト H a r v e y ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (H R A S) アミノ酸配列である、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 9】

前記がんが、膵臓、結腸直腸、肺、子宮内膜、卵巣、又は前立腺のがんである、請求項 3 2 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この特許出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2017年9月20日出願の米国仮特許出願第62/560,930号の利益を主張する。

【0002】

連邦支援の研究又は開発に関する記述

本発明は、米国国立衛生研究所、国立がん研究所によって、プロジェクト番号BC010984の下、政府の支援を受けて成された。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

電子的に提出された文献の参照による援用

本明細書と同時に提出され、以下の通り特定されるコンピュータ可読ヌクレオチド/ア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列表は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる：2018年9月5日付の「739664__ST25.txt」という名称の59,753バイトのASCII（テキスト）ファイル。

【背景技術】

【0004】

幾つかのがんは、特に該がんが転移性かつ切除不能になったとき、非常に限られた治療法の選択肢しか有しない場合がある。例えば、外科手術、化学療法、及び放射線療法等の治療法の進歩にもかかわらず、多くのがん、例えば、膵臓、結腸直腸、肺、子宮内膜、卵巣、及び前立腺のがんの予後は不良である場合がある。従って、がんの更なる治療法に対するアンメットニーズが存在する。

10

【発明の概要】

【0005】

本発明の実施形態は、単離又は精製されたT細胞受容体（TCR）であって、該TCRが、ヒト白血球抗原（HLA）クラスII分子によって提示される変異型ヒトRasアミノ酸配列に対して抗原特異性を有し、該変異型ヒトRASアミノ酸配列が、変異型ヒトKirstenラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ（KRAS）、変異型ヒトHarveyラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ（HRAS）、又は変異型ヒト神経芽細胞腫ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ（NRAS）のアミノ酸配列であるTCRを提供する。

【0006】

20

本発明の別の実施形態は、本発明のTCRの機能的部分を含む単離又は精製されたポリペプチドであって、該機能的部分が、（a）配列番号1～3の全て、（b）配列番号4～6の全て、（c）配列番号7～9の全て、（d）配列番号10～12の全て、（e）配列番号1～6の全て、又は（f）配列番号7～12の全てのアミノ酸配列を含むポリペプチドを提供する。

【0007】

本発明の更に別の実施形態は、本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む単離又は精製されたタンパク質を提供する。

【0008】

本発明の実施形態は、更に、本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質に関連する核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、及び医薬組成物を提供する。

30

【0009】

更に、本発明の実施形態によって、哺乳類におけるがんの存在を検出する方法及び哺乳類におけるがんを治療又は予防する方法も提供される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】フローサイトメトリーによる、アイソタイプ（対照）について染色された細胞又はPD-1及び/若しくはOX40の発現について染色された細胞の検出を示す実験データ（ドットプロット）を示す。ヒストグラム中の数字は、PD-1を発現している細胞の百分率を表す。

40

【図2】プールしたエフェクタ自己T細胞の培養物（培養物番号W1～W16）を、表示した25merペプチド（PP）のプール又は様々な腫瘍特異的変異を包含する25merタンデムミニ遺伝子（TMG）によってコードされているペプチドのプールをパルスした標的DCと共培養した際に検出された、1ウェルあたりのインターフェロンガンマ（IFN γ ）陽性スポットの数を示すグラフである。単独で、ジメチルスルホキシド（DMSO）と共に、又はOKT3抗体と共に培養した自己T細胞が対照の役割を果たした。四角で囲まれた記号（ ）は、それからTCRを単離した、プールした培養物（7及び8）を示す。

【図3】培養物番号7（W7）の自己T細胞を、ペプチドプール1（PP1）由来のペプチド1～17（P1～P17）のそれぞれをパルスした自己DCと共培養した際に検出さ

50

れた、 2×10^4 ($2E4$) 細胞あたりの IFN 陽性スポットの数を示すグラフである。ジメチルスルホキシド (DMSO) と共に又は OKT3 抗体と共に培養した自己 T 細胞が対照の役割を果たした。

【図 4】HLA 遮断抗体 W6/32 (抗 HLA-A、-B、-C)、IVA12 (汎特異的、抗 HLA クラス II)、B7/21 (抗 HLA-DP)、HB55 (抗 HLA-DR)、又は SPV-L3 (HLA-DQ) (標的細胞) の存在下で、KRAS G12V ペプチド (1 ng/mL) をパルスした標的自己 APC と共培養した際に 4-1BB を発現した、実施例 2 の TCR を形質導入したエフェクタ T 細胞の百分率を示すグラフである。単独で、DMSO と共に、又は酢酸ミリスチン酸ホルボール (PMA) と共に培養したエフェクタ形質導入細胞が対照の役割を果たした。 1 ng/mL KRAS G12V ペプチドをパルスした標的自己 APC と共培養した、空ベクターを形質導入したエフェクタ細胞 (モック) が更に別の対照の役割を果たした。

10

【図 5】実施例 2 の TCR を形質導入した T 細胞を自己 APC (4148MB) と、又は KRAS G12V ペプチド若しくは WT KRAS ペプチドをパルスした DRB1 01:01 若しくは DRB1 07:01 ハプロタイプを有するドナー由来の APC と共培養した際の、(i) ELISPOT によって測定された 2×10^4 細胞あたりの IFN 数、及び (ii) フローサイトメトリーによって測定された mTCR + CD8 + 4-1BB + 細胞の百分率を示すグラフである。エフェクタ細胞を、対照としての HLA-DRB1 陽性ドナー由来の APC (「DRB 不一致」) と共培養した。単独で、DMSO と共に、又は酢酸ミリスチン酸ホルボール - イオノマイシン (PMA: Ionon) と共に培養したエフェクタ細胞が更なる対照の役割を果たした。

20

【図 6】実施例 2 の TCR を形質導入した T 細胞を、以下の KRAS G12 変異: G12R、G12C、G12D、又は G12V のうちの 1 つを発現している腫瘍細胞株の細胞溶解物をパルスした自己 DC と共培養した際の、i) ELISPOT によって測定された 2×10^4 細胞あたりの IFN 数 (網掛けバー)、並びに (ii) フローサイトメトリーによって測定された 4-1BB 及び / 又は OX40 を発現している細胞の百分率 (黒色バー) を示すグラフである。WT KRAS を発現している腫瘍細胞株の細胞溶解物をパルスした自己 DC と共培養した形質導入細胞が対照の役割を果たした。単独で、又は PMA と共に、又は DMSO と共に培養した形質導入細胞が更なる対照の役割を果たした。

【図 7】一晚共培養した実施例 2 の TCR を形質導入した T 細胞を、表示した濃度の KRAS G12V ペプチド (三角形) 又は WT KRAS ペプチド (四角形) をパルスした自己 DC と共培養した際の、フローサイトメトリーによって測定された mTCR + CD8 + 4-1BB + 細胞の百分率を示すグラフである。

30

【図 8】実施例 2 の TCR を形質導入した T 細胞を、表示した濃度の表 9 のペプチドをパルスした自己 DC と共培養した際の、ELISPOT によって測定された 2×10^4 細胞あたりの IFN 数を示すグラフである。

【図 9】KRAS G12C TCR をコードしている MSGV-1 レトロウイルスを形質導入した細胞を、DMSO (対照) 又は表示した濃度の表示した WT KRAS 若しくは KRAS G12C のペプチドをロードした DC と共培養した後の、マウス TCR ベータ鎖及び 4-1BB を発現している細胞の百分率を示す実験データ (ドットプロット) を示す。ドットプロットは、以下の通り、mTCR + / 4-1BB - (左上象限 (Q1)) ; mTCR + / 4-1BB + (右上象限 (Q2)) ; mTCR - / 4-1BB + (右下象限 (Q3)) ; mTCR - / 4-1BB - (左下象限 (Q4)) である細胞の百分率を示す (括弧内は百分率) : DMSO : Q1 (71.0)、Q2 (0.96)、Q3 (0.20)、Q4 (27.9)。WT $10 \mu\text{g/mL}$: Q1 (64.5)、Q2 (4.27)、Q3 (0.43)、Q4 (30.8)。WT $1 \mu\text{g/mL}$: Q1 (70.6)、Q2 (1.13)、Q3 (0.20)、Q4 (28.1)。G12C $10 \mu\text{g/mL}$: Q1 (13.6)、Q2 (51.7)、Q3 (1.61)、Q4 (33.0)。G12C $1 \mu\text{g/mL}$: Q1 (19.7)、Q2 (46.9)、Q3 (1.67)、Q4 (31.7)。

40

【図 10】HLA-DQ、DR、DP に対する抗体又は HLA-DQ、DR、及び DP の

50

全てに対する抗体を用いてその膜MHC - II分子を遮断した後に、KRAS^{G12CTC}Rを形質導入したT細胞を、自己DC又はKRAS^{G12C24-mer}ペプチドをパルスした単一のHLA - DRB15:01若しくはHLA - DRB11:01のアリルに一致する同種DCと共培養した後の、CD3及び4 - 1BBを発現している細胞の百分率を示すグラフである。WT KRASペプチドをパルスしたDCと共培養した形質導入細胞が対照の役割を果たした。PMA / イオノマイシン (PMA / ion) と共培養した形質導入細胞が更なる対照の役割を果たした。

【発明を実施するための形態】

【0011】

RASファミリーのタンパク質は、低分子GTPaseの大きなファミリーに属する。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、変異したとき、RASタンパク質は、多くのヒトがんの発がん初期におけるシグナル伝達に関与する可能性があると考えられる。単一のアミノ酸置換が、タンパク質を活性化させ得る。変異型RASタンパク質産物は、構成的に活性化され得る。変異型RASタンパク質は、例えば、膵臓がん（例えば、膵がん）、結腸直腸がん、肺がん（例えば、肺腺がん）、子宮内膜がん、卵巣がん（例えば、上皮性卵巣がん）、及び前立腺がんなどの様々なヒトのがんのいずれかで発現し得る。ヒトRASファミリーのタンパク質としては、Kirstenラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (KRAS)、Harveyラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (HRAS)、及び神経芽細胞腫ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (NRAS) が挙げられる。

【0012】

KRASは、GTPase KRas、V - Ki - Ras2 Kirstenラット肉腫ウイルスがん遺伝子、又はKRAS2とも称される。KRASには2つの転写物バリエーションが存在する：KRASバリエーションA及びKRASバリエーションB。野生型 (WT) KRASバリエーションAは、配列番号17のアミノ酸配列を有する。野生型 (WT) KRASバリエーションBは、配列番号18のアミノ酸配列を有する。以後、「KRAS」（変異型又は非変異型 (WT)）に対する言及は、特に規定のない限り、バリエーションA及びバリエーションBの両方を指す。活性化されたとき、変異型KRASは、グアノシン - 5' - リン酸 (GTP) に結合し、そして、GTPをグアノシン5' - リン酸 (GDP) に変換する。

【0013】

HRASは、RASタンパク質ファミリーの別のメンバーである。また、HRASは、Harveyラット肉腫ウイルスがんタンパク質、V - Ha - Ras Harveyラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ、又はRasファミリー低分子GTP結合タンパク質H - Rasとも称される。WT HRASは、配列番号19のアミノ酸配列を有する。

【0014】

NRASは、RASタンパク質ファミリーの更に別のメンバーである。NRASは、GTPase NRas、V - Ras神経芽細胞腫RASウイルスがん遺伝子ホモログ、又はNRAS1とも称される。WT NRASは、配列番号20のアミノ酸配列を有する。

【0015】

本発明の実施形態は、ヒト白血球抗原 (HLA) クラスII分子によって提示される変異型ヒトRASアミノ酸配列（以後、「変異型RAS」）に対して抗原特異性を有する、単離又は精製されたTCRであって、該変異型ヒトRASアミノ酸配列が、変異型ヒトKRAS、変異型ヒトHRAS、又は変異型ヒトNRASのアミノ酸配列であるTCRを提供する。以後、「TCR」に対する言及は、特に規定のない限り、TCRの機能的部分及び機能的バリエーションも指す。

【0016】

本発明のTCRは、任意の変異型ヒトRASのタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドのアミノ酸配列に対する抗原特異性を有し得る。本発明の実施形態では、変異型ヒトRASアミノ酸配列は、変異型ヒトKRASアミノ酸配列、変異型ヒトHRASアミノ酸配列、又は変異型ヒトNRASアミノ酸配列である。WTヒトのKRAS、NRAS、及び

H R A S のタンパク質のアミノ酸配列は、それぞれ、188～189アミノ酸残基長を有し、互いに対して高度の同一性を有する。例えば、WTヒトN R A S タンパク質のアミノ酸配列は、WTヒトK R A S タンパク質のアミノ酸配列と86.8%同一である。WTヒトN R A S タンパク質及びWTヒトK R A S タンパク質のアミノ酸残基1～86は、100%同一である。WTヒトH R A S タンパク質のアミノ酸配列は、WTヒトK R A S タンパク質のアミノ酸配列と86.3%同一である。WTヒトH R A S タンパク質及びWTヒトK R A S タンパク質のアミノ酸残基1～94は、100%同一である。以後、「R A S」（変異型又は非変異型（WT））に対する言及は、特に規定のない限り、まとめてK R A S、H R A S、及びN R A S を指す。

【0017】

本発明の実施形態では、変異型ヒトR A S アミノ酸配列は、12位のグリシンが置換されているWT R A S アミノ酸配列を含み、12位は、それぞれ、WT R A S タンパク質を参照して定義される。WT R A S タンパク質は、WT K R A S タンパク質（配列番号17又は18）、WT H R A S タンパク質（配列番号19）、又はWT N R A S タンパク質（配列番号20）のいずれであってもよいが、その理由は、上に説明した通り、WTヒトN R A S タンパク質及びWTヒトK R A S タンパク質のアミノ酸残基1～86が100%同一であり、WTヒトH R A S タンパク質及びWTヒトK R A S タンパク質のアミノ酸残基1～94も100%同一であるためである。従って、WT K R A S、WT H R A S、及びWT N R A S のタンパク質のそれぞれの12位のアミノ酸残基は同じ、すなわち、グリシンである。

【0018】

WT R A S アミノ酸配列の12位のグリシンは、グリシン以外の任意のアミノ酸残基で置換され得る。本発明の実施形態では、該置換は、WT R A S アミノ酸配列の12位のグリシンのバリン又はシステインによる置換である。これに関して、本発明の実施形態は、G12V変異又はG12C変異を有する任意のWT R A S のタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドのアミノ酸配列に対して抗原特異性を有するT C Rを提供する。

【0019】

R A S の変異及び置換は、本明細書では、WT R A S タンパク質のアミノ酸配列を参照して定義される。従って、R A S の変異及び置換は、本明細書では、WT R A S タンパク質の特定の位置に存在するアミノ酸残基、続いて、位置番号、続いて、検討中の特定のR A S アミノ酸配列（例えば、R A S ペプチド）は、完全長のWT R A S タンパク質の全アミノ酸残基よりも少ないアミノ酸を含み得る。従って、R A S アミノ酸配列の具体例では対応する残基の実際の位置が異なる場合もあるという理解の下、本明細書では、12位は、WT完全長R A S タンパク質（すなわち、配列番号17～20のいずれか1つ）を参照して定義される。位置が配列番号17～20のいずれか1つによって定義される通りである場合、用語「G12」とは、配列番号17～20のいずれか1つの12位に通常存在するグリシンを指し、「G12V」は、配列番号17～20のいずれか1つの12位に通常存在するグリシンがバリンに置き換わっていることを示す。例えば、R A S アミノ酸配列の具体例が、例えば、

【0020】

【化1】

TEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI

【0021】

（配列番号29）（配列番号17の連続アミノ酸残基2～24に対応する例示的なWT K R A S ペプチド）である場合、「G12V」とは、たとえ配列番号29における下線付きグリシンの実際の位置が11であろうと、配列番号29における下線付きのグリシンの

バリリンによる置換を指す。

【 0 0 2 2 】

G 1 2 V 又は G 1 2 C の変異を有する完全長 R A S タンパク質の例を、以下の表 1 に記載する。

【 0 0 2 3 】

【表 1】

表 1

| 変異型完全長RASタンパク質 | 配列番号 |
|-----------------|------|
| G12V KRASバリエントA | 21 |
| G12V KRASバリエントB | 22 |
| G12V HRAS | 23 |
| G12V NRAS | 24 |
| G12C KRASバリエントA | 25 |
| G12C KRASバリエントB | 26 |
| G12C HRAS | 27 |
| G12C NRAS | 28 |

【 0 0 2 4 】

本発明の実施形態では、T C R は、上記 G 1 2 V 変異又は G 1 2 C 変異を有する R A S ペプチドに対して抗原特異性を有し、該変異型 R A S ペプチドは、任意の長さを有する。本発明の実施形態では、変異型 R A S ペプチドは、本明細書に記載の H L A クラス I I 分子のいずれかに結合するのに好適な任意の長さを有する。例えば、T C R は、G 1 2 V 変異又は G 1 2 C 変異を有する R A S ペプチドであって、約 1 1 ~ 約 3 0 アミノ酸残基、約 1 2 ~ 約 2 4 アミノ酸残基、又は約 1 8 ~ 約 2 0 アミノ酸残基の長さを有する R A S ペプチドに対して抗原特異性を有し得る。変異型 R A S ペプチドは、G 1 2 V 又は G 1 2 C の変異を有する変異型 R A S タンパク質の任意の連続アミノ酸残基を含み得る。本発明の実施形態では、T C R は、G 1 2 V 変異又は G 1 2 C 変異を有する R A S ペプチドであって、約 3 0 アミノ酸残基、約 2 9 アミノ酸残基、約 2 8 アミノ酸残基、約 2 7 アミノ酸残基、約 2 6 アミノ酸残基、約 2 5 アミノ酸残基、約 2 4 アミノ酸残基、約 2 3 アミノ酸残基、約 2 2 アミノ酸残基、約 2 1 アミノ酸残基、約 2 0 アミノ酸残基、約 1 9 アミノ酸残基、約 1 8 アミノ酸残基、約 1 7 アミノ酸残基、約 1 6 アミノ酸残基、約 1 5 アミノ酸残基、約 1 4 アミノ酸残基、約 1 3 アミノ酸残基、約 1 2 アミノ酸残基、約 1 1 アミノ酸残基、又は上記値のうちのいずれか 2 つの範囲の長さを有する変異型 R A S ペプチドに対して抗原特異性を有し得る。本発明の G 1 2 V T C R によって認識され得る、それぞれが G 1 2 V 変異を有する特異的ペプチドの例を表 9 に記載する。

【 0 0 2 5 】

本発明の実施形態では、本発明の T C R は、H L A クラス I I 分子によって提示される変異型 R A S を認識することができる。これに関して、T C R は、H L A クラス I I 分子の枠内で変異型 R A S に結合した際に免疫応答を惹起し得る。本発明の T C R は、H L A クラス I I 分子によって提示される変異型 R A S を認識することができ、変異型 R A S に加えて H L A クラス I I 分子にも結合することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明の実施形態では、H L A クラス I I 分子は、H L A - D R 分子である。H L A - D R 分子は、鎖と鎖とのヘテロ二量体である。H L A - D R の鎖は、H L A - D R A 遺伝子によってコードされていてよい。H L A - D R の鎖は、H L A - D R B 1 遺伝子、H L A - D R B 3 遺伝子、H L A - D R B 4 遺伝子、又は H L A - D R B 5 遺伝子によってコードされていてよい。H L A - D R 分子は、任意の H L A - D R 分子であってよい。H L A - D R 分子の例としては、H L A - D R 1、H L A - D R 2、H L A - D R 3、H L A - D R 4、H L A - D R 5、H L A - D R 6、H L A - D R 7、H L A - D R 8、H L A - D R 9、H L A - D R 1 0、H L A - D R 1 1、H L A - D R 1 2、H L A -

DR13、HLA-DR14、HLA-DR15、及びHLA-DR16を挙げることができるが、これらに限定されない。好ましくは、HLA-DR分子は、HLA-DR7又はHLA-DR11である。

【0027】

本発明の実施形態では、HLAクラスII分子は、HLA-DRB1分子である。HLA-DRB1分子は、任意のHLA-DRB1分子であってよい。HLA-DRB1分子の例としては、HLA-DRB1*01:01、HLA-DRB1*01:02、HLA-DRB1*01:03、HLA-DRB1*03:01、HLA-DRB1*04:01、HLA-DRB1*04:02、HLA-DRB1*04:03、HLA-DRB1*04:04、HLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*04:07、HLA-DRB1*07:01、HLA-DRB1*08:01、HLA-DRB1*08:03、HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*10:01、HLA-DRB1*11:01、HLA-DRB1*11:03、HLA-DRB1*11:04、HLA-DRB1*12:01、HLA-DRB1*13:01、HLA-DRB1*13:02、HLA-DRB1*13:03、HLA-DRB1*14:01、HLA-DRB1*15:01、HLA-DRB1*15:02、及びHLA-DRB1*16:01を挙げることができるが、これらに限定されない。好ましくは、HLAクラスII分子は、HLA-DRB1*07:01分子又はHLA-DRB1*11:01分子である。

【0028】

本発明のTCRは、養子細胞移入に使用される細胞によって発現された場合を含む、様々な利点のうちのいずれか1つ以上を提供し得る。変異型RASは、がん細胞で発現し、正常非がん細胞では発現しない。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、本発明のTCRは、有利には、がん細胞の破壊を標的とするが、一方、例えば毒性を最小化又は排除することによって、正常非がん細胞の破壊を最小化又は排除し、それによって、低減すると考えられる。更に、本発明のTCRは、有利には、例えば化学療法、外科手術、又は放射線照射等の他の種類の治療には応答しない変異型RAS陽性がんを成功裏に治療又は予防することができる。例えば、KRAS G12V変異は、膵臓及び結腸直腸のがんの患者のそれぞれ約27%及び約8%で発現し、KRAS G12C変異は、肺がんの患者の約15%で発現する。更に、本発明のTCRは、操作されていない腫瘍細胞（例えば、インターフェロン（IFN）- で処理されていない、変異型RAS及びHLA-DRB1*07:01の一方又は両方、変異型RAS及びHLA-DRB1*11:01の一方又は両方をコードしているベクターをトランスフェクトしていない、G12V変異を有するRASペプチドをパルスしていない、G12C変異を有するRASペプチドをパルスしていない、又はこれらの組み合わせの腫瘍細胞）を認識する能力を提供し得る、変異型RASの高い結合活性での（highly avid）認識を提供することができる。更に、HLA-DRB1*07:01及びHLA-DRB1*11:01のアリルは、それぞれ、米国における白人の民族性を有する個体の約25%及び約10.5%で発現する。従って、本発明のTCRは、他のMHC分子によって提示されるRASを認識するTCRを使用する免疫療法の適格性を有しない場合がある、HLA-DRB1*07:01及びHLA-DRB1*11:01アリルの一方又は両方を発現する患者を含めるように、免疫療法適格性がん患者の数を増加させることができる。

【0029】

語句「抗原特異性」とは、本明細書で使用する時、TCRが、高い結合活性で変異型RASに特異的に結合し、免疫学的に認識できることを意味する。例えば、TCRは、（a）低濃度の変異型RASペプチド（例えば、約0.05 ng/mL～約10 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、8 ng/mL、10 ng/mL、又は上記値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）をパルスした抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞又は（b）標的細胞が変異型RASを発現するように該変異型RASをコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共培養した際に、該TCRを発現している約 1×10^4 ～約 1×10^5 個のT細胞

胞が少なくとも約200 pg/mL以上（例えば、200 pg/mL以上、300 pg/mL以上、400 pg/mL以上、500 pg/mL以上、600 pg/mL以上、700 pg/mL以上、1000 pg/mL以上、5,000 pg/mL以上、7,000 pg/mL以上、10,000 pg/mL以上、20,000 pg/mL以上、又は上記値のうちのいずれか2つによって規定される範囲）のIFN- γ を分泌した場合、変異型RASについて「抗原特異性」を有するとみなしてよい。本発明のTCRを発現している細胞は、より高濃度の変異型RASペプチドをパルスした抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共培養した際にもIFN- γ を分泌することができる。HLAクラスII分子は、本明細書に記載のHLAクラスII分子のいずれか（例えば、HLA-DRB1*07:01分子又はHLA-DRB1*11:01分子）であってよい。

10

【0030】

あるいは又は更に、TCRは、ネガティブコントロールが発現するIFN- γ の量と比較して、(a)低濃度の変異型RASペプチドをパルスした抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞又は(b)標的細胞が変異型RASを発現するように該変異型RASをコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共培養した際に、該TCRを発現しているT細胞が少なくとも2倍多いIFN- γ を分泌した場合、変異型RASについて「抗原特異性」を有するとみなしてよい。ネガティブコントロールは、例えば、(i)(a)同濃度の無関係のペプチド（例えば、変異型RASペプチドとは異なる配列を有する幾つかの他のペプチド）若しくは(b)標的細胞が無関係のペプチドを発現するように該無関係のペプチドをコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共培養した、該TCRを発現しているT細胞、又は(ii)(a)同濃度の変異型RASペプチドをパルスした抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞若しくは(b)標的細胞が変異型RASを発現するように該変異型RASをコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共培養した、形質導入されていないTCR細胞（例えば、該TCRを発現しないPBMC由来）であってよい。ネガティブコントロールの標的細胞が発現するHLAクラスII分子は、試験するT細胞と共培養した標的細胞が発現するのと同じHLAクラスII分子である。HLAクラスII分子は、本明細書に記載のHLAクラスII分子のいずれか（例えば、HLA-DRB1*07:01分子又はHLA-DRB1*11:01分子）であってよい。IFN- γ 分泌は、当技術分野において公知の方法、例えば、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)によって測定することができる。

20

30

【0031】

あるいは又は更に、TCRは、IFN- γ を分泌するネガティブコントロールT細胞の数と比較して、(a)低濃度の変異型RASペプチドをパルスした抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞又は(b)標的細胞が変異型RASを発現するように該変異型RASをコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共培養した際に、少なくとも2倍多い数の該TCRを発現しているT細胞がIFN- γ を分泌した場合、変異型RASについて「抗原特異性」を有するとみなしてよい。HLAクラスII分子、ペプチドの濃度、及びネガティブコントロールは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載の通りであってよい。IFN- γ を分泌する細胞の数は、当技術分野において公知の方法、例えば、ELISPOTによって測定することができる。

40

【0032】

あるいは又は更に、TCRは、変異型RASを発現している標的細胞で刺激した後に例えばフローサイトメトリーによって測定したとき、該TCRを発現しているT細胞が1つ以上のT細胞活性化マーカーの発現をアップレギュレートした場合、変異型RASについて「抗原特異性」を有するとみなしてよい。T細胞活性化マーカーの例としては、4-1BB、OX40、CD107a、CD69、及び抗原刺激した際にアップレギュレートされるサイトカイン（例えば、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン(IL)-2等）が挙げられる。

【0033】

50

本発明の実施形態は、例えば、TCRのアルファ()鎖、TCRのベータ()鎖、TCRのガンマ()鎖、TCRのデルタ()鎖、又はこれらの組み合わせ等の2つのポリペプチド(すなわち、ポリペプチド鎖)を含むTCRを提供する。本発明のTCRのポリペプチドは、TCRが変異型RASに対して抗原特異性を有する限り、任意のアミノ酸配列を含んでいてよい。

【0034】

本発明の実施形態では、TCRは、TCRの相補性決定領域(CDR)1、CDR2、及びCDR3を含む可変領域をそれぞれ含む、2本のポリペプチド鎖を含む。本発明の実施形態では、TCRは、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1(鎖のCDR1)、配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR2(鎖のCDR2)、及び配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR3(鎖のCDR3)を含む第1のポリペプチド鎖と、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR1(鎖のCDR1)、配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR2(鎖のCDR2)、及び配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR3(鎖のCDR3)を含む第2のポリペプチド鎖とを含む。

10

【0035】

本発明の別の実施形態では、TCRは、配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR1(鎖のCDR1)、配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR2(鎖のCDR2)、及び配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR3(鎖のCDR3)を含む第1のポリペプチド鎖と、配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR1(鎖のCDR1)、配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR2(鎖のCDR2)、及び配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR3(鎖のCDR3)を含む第2のポリペプチド鎖とを含む。

20

【0036】

これに関して、本発明のTCRは、配列番号1~12からなる群から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ以上を含み得る。本発明の実施形態では、TCRは、(a)配列番号1~3の全て、(b)配列番号4~6の全て、(c)配列番号7~9の全て、(d)配列番号10~12の全て、(e)配列番号1~6の全て、又は(f)配列番号7~12の全てのアミノ酸配列を含む。特に好ましい実施形態では、TCRは、(i)配列番号1~6の全て又は(ii)配列番号7~12の全てのアミノ酸配列を含む。

【0037】

本発明の実施形態では、TCRは、上記CDRを含むTCRの可変領域のアミノ酸配列を含む。これに関して、TCRは、配列番号13(鎖の可変領域)；配列番号14(鎖の可変領域)；配列番号15(鎖の可変領域)；配列番号16(鎖の可変領域)；配列番号13及び14の両方；又は配列番号15及び16の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、TCRは、(i)配列番号13及び14の両方又は(ii)配列番号15及び16の両方のアミノ酸配列を含む。

30

【0038】

本発明のTCRは、鎖定常領域及び鎖定常領域を更に含み得る。定常領域は、例えばヒト又はマウス等の任意の好適な種に由来していてよい。本発明の実施形態では、TCRは、マウスの鎖及び鎖定常領域又はヒトの鎖及び鎖定常領域を更に含む。本明細書で使用する時、用語「マウス」又は「ヒト」は、本明細書に記載のTCR又はTCRの任意の構成要素(例えば、相補性決定領域(CDR)、可変領域、定常領域、鎖、及び/又は鎖)に言及するとき、それぞれマウス又はヒト由来のTCR(又はその構成要素)、すなわち、それぞれマウスT細胞又はヒトT細胞を起源とするか又は該細胞によってかつて発現されたTCR(又はその構成要素)を意味する。

40

【0039】

本発明の実施形態は、ヒト可変領域及びマウス定常領域を含むキメラTCRであって、HLAクラスII分子によって提示される変異型ヒトRASアミノ酸配列に対して抗原特異性を有するTCRを提供する。マウス定常領域は、任意の1つ以上の利点を提供し得る。例えば、マウス定常領域は、本発明のTCRが導入される宿主細胞の内因性TCRと本発明のTCRとの不対合を減少させることができる。あるいは又は更に、マウス定常領域

50

は、ヒト定常領域を有する同じTCRと比較して、本発明のTCRの発現を増加させることができる。キメラTCRは、配列番号32（野生型（WT）マウス 鎖定常領域）、配列番号33（WTマウス 鎖定常領域）、又は配列番号32及び33の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、本発明のTCRは、配列番号32及び33の両方のアミノ酸配列を含む。キメラTCRは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載のCDR領域のいずれかと組み合わせて、本明細書に記載のマウス定常領域のいずれかを含み得る。これに関して、TCRは、（a）配列番号1～3及び32の全て；（b）配列番号4～6及び33の全て；（c）配列番号7～9及び32の全て；（d）配列番号10～12及び33の全て；（e）配列番号1～6及び32～33の全て；又は（f）配列番号7～12及び32～33の全てのアミノ酸配列を含み得る。本発明の別の実施態様では、キメラTCRは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載の変領域のいずれかと組み合わせて、本明細書に記載のマウス定常領域のいずれかを含み得る。これに関して、TCRは、（i）配列番号13及び32の両方；（ii）配列番号14及び33の両方；（iii）配列番号15及び32の両方；（iv）配列番号16及び33の両方；（v）配列番号13～14及び32～33の全て；又は（vi）配列番号15～16及び32～33の全てのアミノ酸配列を含み得る。

10

【0040】

本発明の別の実施形態では、TCRは、配列番号38（WTマウス定常領域を含む 鎖）、配列番号39（WTマウス定常領域を含む 鎖）、配列番号40（WTマウス定常領域を含む 鎖）、配列番号41（WTマウス定常領域を含む 鎖）、配列番号38～39の両方、又は配列番号40～41の両方のアミノ酸配列（複数可）を含む。

20

【0041】

本発明の実施形態では、TCRは、可変領域及び定常領域を含む 鎖と、可変領域及び定常領域を含む 鎖とを含む。これに関して、TCRは、（a）（i）配列番号34の179位のXが、Thr若しくはCysであり；（ii）配列番号34の243位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；（iii）配列番号34の245位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；（iv）配列番号34の246位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号34のアミノ酸配列を含む 鎖；（b）配列番号35の189位のXがSer若しくはCysである、配列番号35のアミノ酸配列を含む 鎖；（c）（i）配列番号36の180位のXが、Thr若しくはCysであり；（ii）配列番号36の244位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；（iii）配列番号36の246位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；（iv）配列番号36の247位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号36のアミノ酸配列を含む ；（d）配列番号37の194位のXがSer若しくはCysである、配列番号37のアミノ酸配列を含む 鎖；（e）（a）及び（b）の両方；又は（f）（c）及び（d）の両方を含み得る。

30

【0042】

本発明の実施形態では、TCRは、置換定常領域を含む。これに関して、TCRは、鎖及び 鎖の一方又は両方の定常領域に1、2、3、又は4つのアミノ酸置換（複数可）を含む、本明細書に記載のTCRのいずれかのアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、TCRは、鎖及び 鎖の一方又は両方のマウス定常領域に1、2、3、又は4つのアミノ酸置換（複数可）を含むマウス定常領域を含む。特に好ましい実施形態では、鎖のマウス定常領域に1、2、3、又は4つのアミノ酸置換（複数可）を含み、鎖のマウス定常領域に1つのアミノ酸置換を含む、マウス定常領域を含む。幾つかの実施形態では、置換定常領域を含むTCRは、有利には、非置換（野生型）定常領域を含む親TCRと比較して、変異型RAS⁺標的の認識の増大、宿主細胞による発現の増加、内因性TCRとの誤対合の減少、及び抗腫瘍活性の増大のうちの1つ以上を提供する。一般に、TCRの 鎖

40

50

及び鎖の Maus 定常領域の置換されたアミノ酸配列、それぞれ配列番号 30 及び 31 は、それぞれ配列番号 32 及び 33 の非置換 Maus 定常領域アミノ酸配列の全て又は一部に対応し、配列番号 30 は、配列番号 32 と比較して 1、2、3、又は 4 つのアミノ酸置換（複数可）を有し、配列番号 31 は、配列番号 33 と比較して 1 つのアミノ酸配列を有する。これに関して、本発明の実施形態は、(a) (i) 48 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；(ii) 112 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；(iii) 114 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；(iv) 115 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である配列番号 30（鎖の定常領域）；(b) 57 位の X が Ser 若しくは Cys である配列番号 31（鎖の定常領域）；又は (c) 配列番号 30 及び 31 の両方のアミノ酸配列を含む TCR を提供する。本発明の実施形態では、配列番号 30 を含む TCR は、配列番号 32（鎖の非置換 Maus 定常領域）を含まない。本発明の実施形態では、配列番号 31 を含む TCR は、配列番号 33（鎖の非置換 Maus 定常領域）を含まない。

10

【0043】

本発明の実施形態では、置換定常領域は、システイン置換 TCR を提供するために、鎖及び鎖の一方又は両方の定常領域にシステイン置換を含む。鎖及び鎖における対向するシステインは、置換された TCR の鎖及び鎖の定常領域を互いに連結させ、非置換 Maus 定常領域を含む TCR には存在しない、ジスルフィド結合を提供する。これに関して、TCR は、配列番号 32 の 48 位のネイティブな Thr (Thr 48) 及び配列番号 33 の 57 位のネイティブな Ser (Ser 57) の一方又は両方が Cys で置換されていてよい、システイン置換 TCR であり得る。好ましくは、配列番号 32 のネイティブな Thr 48 及び配列番号 33 のネイティブな Ser 57 が Cys で置換されている。システイン置換 TCR の定常領域配列の例を表 2 に記載する。本発明の実施形態では、システイン置換 TCR は、(i) 配列番号 30、(ii) 配列番号 31、又は (iii) 配列番号 30 及び 31 の両方を含み、配列番号 30 及び 31 はいずれも表 2 に定義される通りである。本発明のシステイン置換 TCR は、本明細書に記載の CDR 又は可変領域のいずれかに加えて、置換定常領域を含み得る。

20

【0044】

本発明の実施形態では、システイン置換キメラ TCR は、完全長アルファ鎖及び完全長ベータ鎖を含む。システイン置換キメラ TCR のアルファ鎖及びベータ鎖の配列の例を表 2 に記載する。本発明の実施形態では、TCR は、(i) 配列番号 34、(ii) 配列番号 35、(iii) 配列番号 36、(iv) 配列番号 37、(v) 配列番号 34 及び 35 の両方、又は (vi) 配列番号 36 及び 37 の両方を含み、配列番号 34 ~ 37 は全て表 2 に定義される通りである。

30

【0045】

40

50

【表 2】

表 2

| 配列番号 | 「X」の定義 |
|---|--|
| 配列番号 3 0 (α 鎖の定常領域) | 4 8 位の X、C y s であり、 1 1 2 位の X が、S e r であり、 1 1 4 位の X が、M e t であり、かつ 1 1 5 位の X が、C y s である。 |
| 配列番号 3 1 (β 鎖の定常領域) | 5 7 位の X が、C y s である。 |
| 配列番号 3 4 (α 鎖の RAS ^{G12V} - HLA-DR B1*07:01) | 1 7 9 位の X、C y s であり、 2 4 3 位の X が、S e r であり、 2 4 5 位の X が、M e t であり、かつ 2 4 6 位の X が、C y s である。 |
| 配列番号 3 5 (β 鎖の RAS ^{G12V} - HLA-DR B1*07:01) | 1 8 9 位の X が、C y s である。 |
| 配列番号 3 6 (α 鎖の RAS ^{G12C} - HLA-DR B1*11:01) | 1 8 0 位の X が、C y s であり、 2 4 4 位の X が、S e r であり、 2 4 6 位の X が、M e t であり、かつ 2 4 7 位の X が、C y s である。 |
| 配列番号 3 7 (β 鎖の RAS ^{G12C} - HLA-DR B1*11:01) | 1 9 4 位の X が、C y s である。 |

10

20

【0046】

本発明の実施形態では、置換されたアミノ酸配列は、疎水性アミノ酸で置換された T C R (本明細書では「L V L 修飾 T C R」とも称される)を提供するために、鎖及び鎖の一方又は両方の定常領域の膜貫通(T M)ドメインにおける1、2、又は3つのアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換を含む。T C RのT Mドメインにおける疎水性アミノ酸置換(複数可)は、T Mドメインに疎水性アミノ酸置換(複数可)を有しないT C Rと比較して、T C RのT Mドメインの疎水性を増大させることができる。これに関して、T C Rは、配列番号32のネイティブなS e r 1 1 2、M e t 1 1 4、及びG l y 1 1 5のうちの1、2、又は3つが、独立して、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、又はT r p;好ましくはL e u、I l e、又はV a lで置換されていてよい、L V L 修飾 T C Rである。好ましくは、配列番号32のネイティブなS e r 1 1 2、M e t 1 1 4、及びG l y 1 1 5の3つ全てが、独立して、A l a、V a l、L e u、I l e、P r o、P h e、M e t、又はT r p;好ましくはL e u、I l e、又はV a lで置換されていてよい。本発明の実施形態では、L V L 修飾 T C Rは、(i)配列番号30、(i i)配列番号31、又は(i i i)配列番号30及び31の両方を含み、配列番号30及び31はいずれも表3に定義される通りである。本発明のL V L 修飾 T C Rは、本明細書に記載のC D R又は可変領域のいずれかに加えて、置換定常領域を含み得る。

30

40

【0047】

本発明の実施形態では、L V L 修飾キメラT C Rは、完全長アルファ鎖及び完全長ベータ鎖を含む。L V L 修飾 T C Rのアルファ鎖及びベータ鎖の配列の例を表3に記載する。本発明の実施形態では、L V L 修飾 T C Rは、(i)配列番号34、(i i)配列番号35、(i i i)配列番号36、(i v)配列番号37、(v)配列番号34及び35の両方、又は(v i)配列番号36及び37の両方を含み、配列番号34~37は全て表3に定義される通りである。

【0048】

50

【表 3 - 1】

表 3

| 配列番号 | 「X」の定義 |
|----------------------------|--|
| 配列番号 30 (α 鎖の定常領域) | 48位のXが、Thrであり、 112位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、112位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、112位のXが、Leuであり； 114位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり； 好ましくは、114位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、114位のXが、Ileであり；かつ 115位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、115位のXが、Leu、Ile、又はValであり； |

10

【 0 0 4 9 】

20

30

40

50

【表 3 - 2】

| 配列番号 | 「X」の定義 |
|---|--|
| | 特に好ましくは、115位のXが、Valであり； 配列番号30は、配列番号32（アルファ鎖の非置換定常領域）を含まない。 |
| 配列番号31（β鎖の定常領域） | 57位のXが、Serである。 |
| 配列番号34（α鎖のRAS ^{G12V} -HLA-DR B1*07:01） | 179位のXが、Thrであり、 243位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、243位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、243位のXが、Leuであり； 245位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり； 好ましくは、245位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、245位のXが、Ileであり；かつ 246位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、246位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、246位のXが、Valであり； 配列番号34は、配列番号38（非置換アルファ鎖）を含まない。 |
| 配列番号35（β鎖のRAS ^{G12V} -HLA-DR B1*07:01） | 189位のXが、Serである。 |
| 配列番号36（α鎖のRAS ^{G12C} -HLA-DR B1*11:01） | 180位のXが、Thrであり、 244位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、244位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、244位のXが、Leuであり； 246位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり； 好ましくは、246位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、246位のXが、Ileであり；かつ 247位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、247位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、247位のXが、Valであり； 配列番号36は、配列番号40（非置換アルファ鎖）を含まない。 |
| 配列番号37（β鎖のRAS ^{G12C} -HLA-DR B1*11:01） | 194位のXが、Serである。 |

【0050】

本発明の実施形態では、置換されたアミノ酸配列は、鎖及び鎖の一方又は両方の定常領域の膜貫通（TM）ドメインにおける1、2、又は3つのアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換（複数可）と組み合わせて、鎖及び鎖の一方又は両方の定常領域にシステイン置換を含む（本明細書では、「システイン置換LVL修飾TCR」とも称される）。これに関して、TCRは、配列番号32のネイティブなThr48がCysで置換されており；配列番号32のネイティブなSer112、Met114、及びGly115のうちの1、2、又は3つが、独立して、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrp；好ましくはLeu、Ile、又はValで置換されており；配列

番号33のネイティブなSer57がCysで置換されている、システイン置換LVL修飾キメラTCRである。好ましくは、配列番号32のネイティブなSer112、Met114、及びGly115の3つ全てが、独立して、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrp；好ましくはLeu、Ile、又はValで置換されていてよい。本発明の実施形態では、システイン置換LVL修飾TCRは、(i)配列番号30、(ii)配列番号31、又は(iii)配列番号30及び31の両方を含み、配列番号30及び31はいずれも表4に定義される通りである。本発明のシステイン置換LVL修飾TCRは、本明細書に記載のCDR又は可変領域のいずれかに加えて、置換定常領域を含み得る。

【0051】

実施形態では、システイン置換LVL修飾TCRは、完全長アルファ鎖及び完全長ベータ鎖を含む。本発明の実施形態では、システイン置換LVL修飾TCRは、(i)配列番号34、(ii)配列番号35、(iii)配列番号36、(iv)配列番号37、(v)配列番号34及び35の両方、又は(vi)配列番号36及び37の両方を含み、配列番号34～37は全て表4に定義される通りである。

【0052】

【表4 - 1】

表4

| 配列番号 | 「X」の定義 |
|---------------------------|---|
| 配列番号30 (α 鎖の定常領域) | 48位のXが、Cysであり； 112位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、112位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、112位のXが、Leuであり； 114位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり； 好ましくは、114位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、114位のXが、Ileであり；かつ 115位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； |

【0053】

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

| 配列番号 | 「X」の定義 |
|--|--|
| | <p>好ましくは、115位のXが、Leu、Ile、又はValであり；</p> <p>特に好ましくは、115位のXが、Valであり；</p> <p>配列番号30は、112位のSer、114位のMet、及び115位のGlyの全てを同時には含まない。</p> |
| 配列番号31（β鎖の定常領域） | 57位のXが、Cysである。 |
| 配列番号34（α鎖のRAS ^{G12V} -HLA-DRB1*07:01） | <p>179位のXが、Cysであり；</p> <p>243位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり；</p> <p>好ましくは、243位のXが、Leu、Ile、又はValであり；</p> <p>特に好ましくは、243位のXが、Leuであり；</p> <p>245位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり；</p> <p>好ましくは、245位のXが、Leu、Ile、又はValであり；</p> <p>特に好ましくは、245位のXが、Ileであり；かつ</p> <p>246位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり；</p> <p>好ましくは、246位のXが、Leu、Ile、又はValであり；</p> <p>特に好ましくは、246位のXが、Valであり；</p> <p>配列番号34は、243位のSer、245位のMet、及び246位のGlyの全てを同時には含まない。</p> |
| 配列番号35（β鎖のRAS ^{G12V} -HLA-DRB1*07:01） | 189位のXが、Cysである。 |
| 配列番号36（α鎖のRAS ^{G12C} -HLA-DRB1*11:01） | <p>180位のXが、Cysであり；</p> <p>244位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり；</p> <p>好ましくは、244位のXが、Leu、Ile、又はValであり；</p> <p>特に好ましくは、244位のXが、Leuであり；</p> <p>246位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり；</p> <p>好ましくは、246位のXが、Leu、Ile、又はValであり；</p> <p>特に好ましくは、246位のXが、Ileであり；かつ</p> <p>247位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり；</p> <p>好ましくは、247位のXが、Leu、Ile、又はValであり；</p> <p>特に好ましくは、247位のXが、Valであり；</p> <p>配列番号36は、244位のSer、246位のMet、及び247位のGlyの全てを同時には含まない。</p> |
| 配列番号37（β鎖のRAS ^{G12C} -HLA-DRB1*11:01） | 194位のXが、Cysである。 |

10

20

30

40

【0054】

また、本明細書に記載のTCRのいずれかの機能的部分を含むポリペプチドが本発明によって提供される。用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用する時、オリゴペプチドを含み、そして、1つ以上のペプチド結合によって連結された一本鎖のアミノ酸を指す。

【0055】

本発明のポリペプチドに関して、機能的部分は、変異型RASに特異的に結合する限り、該機能的部分がその一部であるTCRの連続アミノ酸を含む任意の部分であってよい。用語「機能的部分」は、TCRに関連して使用されるとき、本発明のTCRの任意の部分又は断片であって、該部分又は断片がその一部であるTCR（親TCR）の生物活性を保

50

持している部分又は断片を指す。機能的部分は、例えば、親TCRと同様の程度、同一程度、又はより高程度、（例えば、HLA-DRB1*07:01分子又はHLA-DRB1*11:01分子の枠内で）変異型RASに特異的に結合するか又はがんを検出、治療、若しくは予防する能力を保持しているTCRの部分を含む。親TCRに関連して、機能的部分は、例えば、親TCRの約10%、約25%、約30%、約50%、約68%、約80%、約90%、約95%、又はそれ以上を構成し得る。

【0056】

機能的部分は、該部分のアミノ若しくはカルボキシ末端又は両末端に、親TCRのアミノ酸配列にはみられない追加のアミノ酸を含んでいてもよい。望ましくは、追加のアミノ酸は、例えば、変異型RASに特異的に結合する、及び/又はがんを検出する、がんを治療若しくは予防する能力を有する等の機能的部分の生物学的機能に干渉しない。より望ましくは、追加のアミノ酸は、親TCRの生物活性と比較して、生物活性を増強する。

10

【0057】

ポリペプチドは、本発明のTCRの鎖及び鎖のいずれか又は両方の機能的部分、例えば、本発明のTCRの鎖及び/又は鎖の可変領域（複数可）のCDR1、CDR2、及びCDR3のうちの1つ以上を含む機能的部分を含み得る。本発明の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号1（鎖のCDR1）、配列番号2（鎖のCDR2）、配列番号3（鎖のCDR3）、配列番号4（鎖のCDR1）、配列番号5（鎖のCDR2）、配列番号6（鎖のCDR3）、又はこれらの組み合わせのアミノ酸配列を含み得る。本発明の別の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号7（鎖のCDR1）、配列番号8（鎖のCDR2）、配列番号9（鎖のCDR3）、配列番号10（鎖のCDR1）、配列番号11（鎖のCDR2）、配列番号12（鎖のCDR3）、又はこれらの組み合わせのアミノ酸配列を含み得る。

20

【0058】

これに関して、本発明のポリペプチドは、配列番号1～12からなる群から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ以上を含み得る。本発明の実施形態では、TCRは、（a）配列番号1～3の全て、（b）配列番号4～6の全て、（c）配列番号7～9の全て、（d）配列番号10～12の全て、（e）配列番号1～6の全て、又は（f）配列番号7～12の全てのアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態では、ポリペプチドは、（i）配列番号1～6の全て又は（ii）配列番号7～12の全てのアミノ酸配列を含む。

30

【0059】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えば、上記CDR領域の組み合わせを含む本発明のTCRの可変領域を含み得る。これに関して、ポリペプチドは、（i）配列番号13（鎖の可変領域）、（ii）配列番号14（鎖の可変領域）、（iii）配列番号13及び14の両方、（iv）配列番号15（鎖の可変領域）、（v）配列番号16（鎖の可変領域）、又は（vi）配列番号15及び16の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、ポリペプチドは、（i）配列番号13及び14の両方、又は（ii）配列番号15及び16の両方のアミノ酸配列を含む。

【0060】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、上記本発明のTCRの定常領域を更に含み得る。これに関して、ポリペプチドは、配列番号32（鎖のWTマウス定常領域）、配列番号33（鎖のWTマウス定常領域）、配列番号30（鎖の置換マウス定常領域）、配列番号31（鎖の置換マウス定常領域）、配列番号32及び33の両方、又は配列番号30及び31の両方のアミノ酸配列を更に含み得る。好ましくは、ポリペプチドは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載のCDR領域又は可変領域のいずれかと組み合わせて、配列番号30及び31の両方又は配列番号32及び33の両方のアミノ酸配列を更に含む。本発明の実施形態では、ポリペプチドの配列番号30及び31の一方又は両方は、表2～4のいずれか1つに定義される通りである。

40

【0061】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載のTCRの鎖又は

50

鎖の全長を含み得る。これに関して、本発明のポリペプチドは、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、及び配列番号 37 のアミノ酸配列を含み得る。あるいは、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載の T C R の両鎖を含み得る。

【0062】

例えば、本発明のポリペプチドは、(a)(i) 配列番号 34 の 179 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；(ii) 配列番号 34 の 243 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；(iii) 配列番号 34 の 245 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；(iv) 配列番号 34 の 246 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である、配列番号 34 のアミノ酸配列；(b) 配列番号 35 の 189 位の X が Ser 若しくは Cys である、配列番号 35 のアミノ酸配列；(c)(i) 配列番号 36 の 180 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；(ii) 配列番号 36 の 244 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；(iii) 配列番号 36 の 246 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；(iv) 配列番号 36 の 247 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である、配列番号 36 のアミノ酸配列；(d) 配列番号 37 の 194 位の X が Ser 若しくは Cys である、配列番号 37 のアミノ酸配列；(e)(a) 及び (b) の両方；又は (f)(c) 及び (d) の両方を含み得る。本発明の実施形態では、ポリペプチドの配列番号 34 ~ 37 のうちのいずれか 1 つ以上は、表 2 ~ 4 のいずれか 1 つに定義される通りである。

【0063】

本発明は、更に、本明細書に記載のポリペプチドのうちの少なくとも 1 つを含むタンパク質を提供する。「タンパク質」とは、1 本以上のポリペプチド鎖を含む分子を意味する。

【0064】

実施形態では、本発明のタンパク質は、(a) 配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；又は (b) 配列番号 7 ~ 9 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 10 ~ 12 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含み得る。

【0065】

本発明の別の実施形態では、タンパク質は、(i) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 14 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖；又は (ii) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 16 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含み得る。

【0066】

本発明のタンパク質は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載の定常領域のいずれかを更に含み得る。これに関して、本発明の実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 30 又は配列番号 32 のアミノ酸配列を更に含み得、第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 31 又は配列番号 33 のアミノ酸配列を更に含み得る。本発明の実施形態では、タンパク質の配列番号 30 及び 31 の一方又は両方は、表 2 ~ 4 のいずれか 1 つに定義される通りである。

【0067】

あるいは又は更に、本発明の実施形態のタンパク質は、(a)(i) 配列番号 34 の 179 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；(ii) 配列番号 34 の 243 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；(iii) 配列番号 34 の 245 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；(iv) 配列番号 34 の 246 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である、配列番号 34 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖；(b) 配列番号 35 の 189 位の X が Ser 若しくは Cys である、配列番号 35 のアミノ酸配列を含む第 2

のポリペプチド鎖；(c)(i)配列番号36の180位のXが、Thr若しくはCysであり；(ii)配列番号36の244位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；(iii)配列番号36の246位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；(iv)配列番号36の247位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号36のアミノ酸配列を含む第1のポリペプチド鎖；(d)配列番号37の194位のXがSer若しくはCysである、配列番号37のアミノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖；(e)(a)及び(b)の両方；又は(f)(c)及び(d)の両方を含み得る。本発明の実施形態では、配列番号34～37のうちの1つ以上は、表2～4のいずれか1つに定義される通りである。

10

【0068】

本発明のタンパク質は、TCRであってよい。あるいは、例えば、タンパク質が配列番号34及び35の両方、配列番号36及び37の両方のアミノ酸配列を含む1本のポリペプチド鎖を含む場合、又はタンパク質の第1の及び/若しくは第2のポリペプチド鎖(複数可)が、他のアミノ酸配列、例えば、免疫グロブリン若しくはその一部をコードしているアミノ酸配列を更に含む場合、本発明のタンパク質は、融合タンパク質であってもよい。これに関して、本発明は、また、少なくとも1つの他のポリペプチドと共に、本明細書に記載の本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む融合タンパク質を提供する。他のポリペプチドは、融合タンパク質の別々のタンパク質として存在してもよく、又は本明細書に記載の本発明のポリペプチドのうちの1つとインフレームで(タンデムに)発現するポリペプチドとして存在してもよい。他のポリペプチドは、免疫グロブリン、CD3、CD4、CD8、MHC分子、CD1分子、例えば、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d等が挙げられるがこれらに限定されない、任意のペプチド性若しくはタンパク質性の分子、又はこれらの一部をコードしてよい。

20

【0069】

融合タンパク質は、1コピー以上の本発明のポリペプチド及び/又は1コピー以上の他のポリペプチドを含み得る。例えば、融合タンパク質は、1、2、3、4、5、又はそれ以上のコピーの本発明のポリペプチド及び/又は他のポリペプチドを含み得る。融合タンパク質を作製する好適な方法は、当技術分野において公知であり、例えば、組み換え法が

30

【0070】

本発明の幾つかの実施形態では、本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質は、鎖及び鎖を連結するリンカーペプチドを含む単一のタンパク質として発現し得る。これに関して、本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質は、リンカーペプチドを更に含み得る。リンカーペプチドは、有利には、宿主細胞における組み換え体のTCR、ポリペプチド、及び/又はタンパク質の発現を促進し得る。リンカーペプチドは、任意の好適なアミノ酸配列を含み得る。例えば、リンカーペプチドは、配列番号54のアミノ酸配列を含むフーリン-SGSG-P2Aリンカーであってよい。リンカーペプチドを含むコンストラクトが宿主細胞によって発現されたら、リンカーペプチドを切断してもよく、その結果、分離された鎖及び鎖が得られる。本発明の実施形態では、TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、完全長鎖、完全長鎖、及び鎖と鎖との間に位置するリンカーペプチドを含むアミノ酸配列を含み得る。

40

【0071】

本発明のタンパク質は、本明細書に記載の本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む、組み換え抗体又はその抗原結合部分であってよい。本明細書で使用するとき、「組み換え抗体」とは、本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1つ、及び抗体のポリペプチド鎖、又はその抗原結合部分を含む組み換え(例えば、遺伝的に操作された)タンパク質を指す。抗体のポリペプチド又はその抗原結合部分は、抗体の重鎖、軽鎖、重鎖若しくは軽鎖の可変領域若しくは定常領域、単鎖可変領域(scFv)、又はFc、Fab

50

、若しくは $F(a b)_2'$ の断片であってよい。抗体のポリペプチド鎖又はその抗原結合部分は、組み換え抗体の別々のポリペプチドとして存在してよい。あるいは、抗体のポリペプチド鎖又はその抗原結合部分は、本発明のポリペプチドとインフレームで（タンデムに）発現するポリペプチドとして存在してもよい。抗体のポリペプチド又はその抗原結合部分は、本明細書に記載の抗体及び抗体断片のいずれかを含む、任意の抗体又は任意の抗体断片のポリペプチドであってよい。

【0072】

本明細書に記載の本発明の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質の機能的バリエーションは、本発明の範囲に含まれる。用語「機能的バリエーション」とは、本明細書で使用する時、親の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質に対して実質的な又は著しい配列の同一性又は類似性を有する TCR、ポリペプチド、又はタンパク質を指し、該機能的バリエーションは、該バリエーションがそのバリエーションである TCR、ポリペプチド、又はタンパク質の生物活性を保持している。機能的バリエーションは、例えば、親の TCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質と同様の程度、同一程度、又はより高程度、親 TCR が抗原特異性を有するか又は親のポリペプチド若しくはタンパク質が特異的に結合する変異型 RAS に特異的に結合する能力を保持している、本明細書に記載の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質（親の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質）のバリエーションを包含する。親の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質に関連して、機能的バリエーションは、例えば、それぞれ親の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質に対してアミノ酸配列が少なくとも約 30%、約 50%、約 75%、約 80%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、又はそれ以上同一であってよい。

【0073】

機能的バリエーションは、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の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質のアミノ酸配列を含み得る。保存的アミノ酸置換は、当技術分野において公知であり、特定の物理的及び/又は化学的特性を有するあるアミノ酸が、同じ化学的又は物理的特性を有する別のアミノ酸に交換され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 又は Glu）による置換、非極性側鎖を有するアミノ酸の、別の非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val 等）による置換、塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸（Lys、Arg 等）による置換、極性側鎖を有するアミノ酸の、別の極性側鎖を有するアミノ酸（Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr 等）による置換等であってよい。

【0074】

あるいは又は更に、機能的バリエーションは、少なくとも 1 つの非保存的アミノ酸置換を有する親の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質のアミノ酸配列を含み得る。この場合、非保存的アミノ酸置換が機能的バリエーションの生物活性に干渉もせず、阻害も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機能的バリエーションの生物活性を増強することができ、その結果、機能的バリエーションの生物活性が、親の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質と比べて増大する。

【0075】

TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、本明細書に記載の特定のアミノ酸配列（複数可）から本質的になっていてよく、その結果、該 TCR、ポリペプチド、又はタンパク質の他の構成要素、例えば、他のアミノ酸が、該 TCR、ポリペプチド、又はタンパク質の生物活性を実質的に変化させることはない。これに関して、本発明の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、例えば、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 34 ~ 35 の両方、又は配列番号 36 ~ 37 の両方のアミノ酸配列から本質的になっていてよい。また、例えば、本発明の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、(i) 配列番号 13、(ii) 配列番号 14、(iii) 配列番号 15、(iv) 配列番号 16、(v) 配列番号 13 及び 14 の両方、又は (vi) 配列番号 15 及び 16 の両方のアミノ酸配列（複数可）から本質的になっていてよい。更に、本発明の TCR、

ポリペプチド、又はタンパク質は、(a) 配列番号 1 ~ 12 のいずれか 1 つ以上；(b) 配列番号 1 ~ 3 の全て；(c) 配列番号 4 ~ 6 の全て；(d) 配列番号 7 ~ 9 の全て；(e) 配列番号 10 ~ 12 の全て；(f) 配列番号 1 ~ 6 の全て；又は (g) 配列番号 7 ~ 12 の全てのアミノ酸配列から本質的になってよい。

【0076】

本発明の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、任意の長さであってよい、すなわち、該 TCR、ポリペプチド、又はタンパク質が、その生物活性、例えば、変異型 RAS に特異的に結合する；哺乳類におけるがんを検出する；又は哺乳類におけるがんを治療若しくは予防する能力等を保持している限り、任意の数のアミノ酸を含み得る。例えば、ポリペプチドは、約 50 ~ 約 5000 アミノ酸長の範囲、例えば、約 50、約 70、約 75、約 100、約 125、約 150、約 175、約 200、約 300、約 400、約 500、約 600、約 700、約 800、約 900、約 1000 又はそれ以上のアミノ酸長であってよい。これに関して、本発明のポリペプチドは、オリゴペプチドも含む。

10

【0077】

本発明の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、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含んでいてもよい。このような合成アミノ酸は、当技術分野において公知であり、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-及びトランス-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、 α -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、 α -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-リジン、N',N'-ジベンジル-リジン、6-ヒドロキシリジン、オルニチン、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 α -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 α -アミノシクロヘプタンカルボン酸、(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 α -ジアミノ酪酸、 β -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、及び tert-ブチルグリシンが挙げられる。

20

【0078】

本発明の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質を、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、又は酸付加塩に変換、及び/又は任意で二量体化若しくは多量体化、又はコンジュゲートしてもよい。

30

【0079】

本発明の TCR、ポリペプチド、及び/又はタンパク質は、当技術分野において公知の方法、例えば、デノボ合成によって得ることができる。また、ポリペプチド及びタンパク質は、標準的な組み換え法を使用し、本明細書に記載の核酸を使用して組み換え的に生成することができる。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) を参照。あるいは、例えば、Synpep (Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD)、及び Multiple Peptide Systems (San Diego, CA) 等の企業が、本明細書に記載の TCR、ポリペプチド、及び/又はタンパク質を商業的に合成することもできる。これに関して、本発明の TCR、ポリペプチド、及びタンパク質は、合成であってもよく、組み換え体であってもよく、単離されていてもよく、及び/又は精製されていてもよい。

40

【0080】

本発明の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質（これらの機能的部分又はバリエーションのいずれかを含む）、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、又は宿主細胞の集団、又

50

は抗体若しくはその抗原結合部分のいずれかを含有するコンジュゲート、例えばバイオコンジュゲートも本発明の範囲に含まれる。コンジュゲート、及び一般にコンジュゲートを合成する方法は、当技術分野において公知である。

【0081】

本発明の実施形態は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のいずれかをコードしているヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。「核酸」は、本明細書で使用する時、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、及び「核酸分子」を含み、一般的に、DNA又はRNAのポリマーを意味し、これらは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、天然の、非天然の、又は改変されたヌクレオチドを含有していてもよく、そして、改変されていないオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間にみられるホスホジエステルの代わりに、天然の、非天然の、又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又はホスホロチオエート結合を含有していてもよい。実施形態では、核酸は、相補的DNA(cDNA)を含む。核酸は、任意の挿入、欠失、逆位、及び/又は置換を含まないことが一般に好ましい。しかし、幾つかの例では、本明細書で論じた通り、核酸が1つ以上の挿入、欠失、逆位、及び/又は置換を含むことが好適である場合もある。

10

【0082】

好ましくは、本発明の核酸は、組み換え体である。本明細書で使用する時、用語「組み換え体」とは、(i)天然若しくは合成の核酸セグメントを生細胞で複製可能な核酸分子に連結させることによって生細胞の外部で構築される分子、又は(ii)上記(i)に記載されているものの複製によって得られる分子を指す。本明細書における目的のために、複製は、インビトロ複製であってもインビボ複製であってもよい。

20

【0083】

核酸は、当技術分野において公知の手順を使用して、化学合成及び/又は酵素ライゲーション反応に基づいて構築され得る。例えば、Green及びSambrookら、前記を参照。例えば、核酸は、天然に存在するヌクレオチド、又は分子の生物学的安定性を増大させるか若しくはハイブリダイゼーションの際に形成される二本鎖の物理的安定性を増大させるために設計された様々に改変されたヌクレオチド(例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチド)を使用して、化学的に合成することができる。

30

核酸を作製するために使用することができる改変ヌクレオチドの例としては、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、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-ガラクトシルキューエオシン、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-マンノシルキューエオシン、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、プソイドウラシル、キューエオシン、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、及び2,6-ジアミノプリンが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、本発明の核酸のうちの1つ以上は、Macromolecular Resources(Fort Collins, CO)及びSynthegen(Houston, TX)等の企業から購入することができる。

40

【0084】

核酸は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のいずれかをコードしている任意のヌクレオチド配列を含み得る。本発明の実施形態では、配列番号42~4

50

5のいずれか1つのヌクレオチド配列を含み得る(表5)。本発明の実施形態では、核酸は、配列番号42~43の両方又は配列番号アミノ酸配列44~45の両方のヌクレオチド配列を含む。

【0085】

【表5-1】

表5

| TCR ID | TCR鎖 | ヌクレオチド配列 |
|---|--------------------|----------|
| RAS ^{G12V} -HL A-DRB1*07: 01 | アルファ (TRAV13-1) | 配列番号42 |
| | ベータ (TRBV20-1) | 配列番号43 |

10

【0086】

【表5-2】

| TCR ID | TCR鎖 | ヌクレオチド配列 |
|---|-------------------|----------|
| RAS ^{G12C} -HL A-DRB1*11: 01 | アルファ (TRAV24) | 配列番号44 |
| | ベータ (TRBV12-4) | 配列番号45 |

20

【0087】

本発明の実施形態では、核酸は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のいずれかをコードしている、コドン最適化されたヌクレオチド配列を含む。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、ヌクレオチド配列のコドン最適化は、mRNA転写物の翻訳効率を増大させると考えられる。ヌクレオチド配列のコドン最適化は、ネイティブなコドンを、同じアミノ酸をコードしているが細胞内でより容易に利用可能なtRNAによって翻訳され得る別のコドンで置換し、それによって、翻訳効率を増大させることを伴い得る。また、ヌクレオチド配列の最適化は、翻訳に干渉するmRNAの二次構造を低減し、それによって、翻訳効率を増大させることもできる。

30

【0088】

また、本発明は、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対して相補的なヌクレオチド配列、又は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ストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

【0089】

ストリンジент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ентな条件下でハイブリダイズする。「高ストリンジентな条件」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検出可能に多い量で、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ентな条件は、正確な相補的配列を有するポリヌクレオチド又は幾つかの散在している不一致しか含有していないものを、該ヌクレオチド配列に一致している幾つかの小さな領域(例えば、3~10塩基)を偶然有するランダム配列と識別する条件を含む。このような相補的な小さな領域は、14~17又はそれ以上の塩基の完全長相補体よりも容易に融解するので、高ストリンジентなハイブリダイゼーションによって容易に識別可能になる。比較的高ストリンジентな条件は、例えば、約0.02~0.1M NaCl又は当量、約50~70の温度によって提供されるもの等の低塩及び/又は高温条件を含む。このような高ストリンジентな条件は、ヌクレオチド配列とテンプレート又は標的鎖との間の(もし存在するとしても)わずかな不一致しか許容せず、本発明のTCRのいずれかの発現を検出するのに特に好適である。一般的に

40

50

、漸増量のホルムアミドを添加することによって、条件をよりストリンジントにすることができると理解される。

【 0 0 9 0 】

また、本発明は、本明細書に記載の核酸のいずれかと少なくとも約 7 0 % 以上、例えば、約 8 0 %、約 9 0 %、約 9 1 %、約 9 2 %、約 9 3 %、約 9 4 %、約 9 5 %、約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、又は約 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。これに関して、核酸は、本明細書に記載のヌクレオチド配列のいずれかから本質的になっ

【 0 0 9 1 】

ていてよい。本発明の核酸は、組み換え発現ベクターに組み込むことができる。これに関して、本発明は、本発明の核酸のいずれかを含む組み換え発現ベクターを提供する。本発明の実施形態では、組み換え発現ベクターは、鎖、鎖、及びリンカーペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 9 2 】

本明細書における目的のために、用語「組み換え発現ベクター」は、コンストラクトが m R N A、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドをコードしているヌクレオチド配列を含み、宿主細胞内で該 m R N A、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドを発現させるのに十分な条件下でベクターを該細胞と接触させたときに、該細胞に該 m R N A、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドを発現させる、遺伝的に改変されたオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドのコンストラクトを意味する。本発明のベクターは、全体として天然には存在しない。しかし、ベクターの一部が天然に存在していてもよい。本発明の組み換え発現ベクターは、任意の種類のヌクレオチドを含んでいてよく、D N A 及び R N A が挙げられるがこれらに限定されず、該 D N A 及び R N A は、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、合成されても天然源から部分的に入手されてもよく、天然の、非天然の、又は改変されたヌクレオチドを含有していてもよい。組み換え発現ベクターは、天然に存在するヌクレオチド間結合、天然には存在しないヌクレオチド間結合、又は両方の種類の結合を含んでいてよい。好ましくは、天然には存在しないか又は改変されたヌクレオチド又はヌクレオチド間結合は、ベクターの転写も複製も妨げない。

20

【 0 0 9 3 】

本発明の組み換え発現ベクターは、任意の好適な組み換え発現ベクターであってよく、任意の好適な宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために使用することができる。好適なベクターとしては、プラスミド及びウイルス等、伝播及び増殖用、若しくは発現用、又は両方のために設計されたものが挙げられる。ベクターは、p U C シリーズ (F e r m e n t a s L i f e S c i e n c e s)、p B l u e s c r i p t シリーズ (S t r a t a g e n e , L a J o l l a , C A)、p E T シリーズ (N o v a g e n , M a d i s o n , W I)、p G E X シリーズ (P h a r m a c i a B i o t e c h , U p p s a l a , S w e d e n)、及び p E X シリーズ (C l o n t e c h , P a l o A l t o , C A) からなる群から選択され得る。G T 1 0、G T 1 1、Z a p I I (S t r a t a g e n e)、E M B L 4、及び N M 1 1 4 9 等のバクテリオファージベクターを使用してよい。植物発現ベクターの例としては、p B I 0 1、p B I 1 0 1 . 2、p B I 1 0 1 . 3、p B I 1 2 1、及び p B I N 1 9 (C l o n t e c h) が挙げられる。動物発現ベクターの例としては、p E U K - C 1、p M A M、及び p M A M n e o (C l o n t e c h) が挙げられる。好ましくは、組み換え発現ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターである。特に好ましい実施形態では、組み換え発現ベクターは、M S G V 1 ベクターである。

30

40

【 0 0 9 4 】

本発明の組み換え発現ベクターは、例えば、G r e e n 及び S a m b r o o k ら、前記に記載されている標準的な組み換え D N A 技術を使用して調製することができる。環状又は線状である発現ベクターのコンストラクトは、原核又は真核の宿主細胞において機能する複製系を含有するように調製することができる。複製系は、例えば、C o l E 1、2 μ

50

プラスミド、
、SV40、ウシパピローマウイルス等に由来してよい。

【0095】

望ましくは、組み換え発現ベクターは、必要に応じて、そして、ベクターがDNAベースであるかRNAベースであるかを考慮して、ベクターが導入される宿主細胞の種類（例えば、細菌、真菌、植物、又は動物）に特異的な転写の、並びに翻訳の開始及び終止のコドン等の、調節配列を含む。

【0096】

組み換え発現ベクターは、形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞の選別を可能にする1つ以上のマーカー遺伝子を含んでいてよい。マーカー遺伝子は、殺生物剤耐性、例えば、抗生物質、重金属等に対する耐性、原栄養性を与えるための栄養要求性宿主における補完等を含む。本発明の発現ベクターに好適なマーカー遺伝子は、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、及びアンピシリン耐性遺伝子を含む。

【0097】

組み換え発現ベクターは、TCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質をコードしているヌクレオチド配列に、又はTCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質をコードしているヌクレオチド配列に相補的であるか若しくはハイブリダイズするヌクレオチド配列に動作可能に連結しているネイティブ又は非ネイティブのプロモータを含んでいてよい。例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的、及び発生段階特異的なプロモータの選別は、当業者の技能の範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモータとの組み合わせも当業者の技能の範囲内である。プロモータは、非ウイルスプロモータであってもよく、ウイルスプロモータ、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモータ、SV40プロモータ、RSVプロモータ、及びマウス幹細胞ウイルスの末端反復配列にみられるプロモータであってもよい。

【0098】

本発明の組み換え発現ベクターは、一過的発現用、安定的発現用、又は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は、構成的発現用又は誘導性発現用に作製することができる。

【0099】

更に、組み換え発現ベクターは、自殺遺伝子を含むように作製してもよい。本明細書で使用するとき、用語「自殺遺伝子」とは、自殺遺伝子を発現している細胞を死に至らしめる遺伝子を指す。自殺遺伝子は、該遺伝子が発現する細胞に対して剤、例えば薬物に対する感受性を付与し、そして、該細胞が該剤と接触したとき又は該剤に曝露されたときに該細胞を死に至らしめる遺伝子であってもよい。自殺遺伝子は、当技術分野において公知であり、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、ニトロレダクターゼ、及び誘導性カスパーゼ9遺伝子系を含む。

【0100】

本発明の別の実施形態は、更に、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を提供する。本明細書で使用するとき、用語「宿主細胞」とは、本発明の組み換え発現ベクターを含有し得る任意の種類の細胞を指す。宿主細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、真菌、又は藻類であってもよく、原核細胞、例えば、細菌又は原生動物であってもよい。宿主細胞は、培養細胞又は初代細胞、すなわち、生物、例えばヒトから直接単離された細胞であってもよい。宿主細胞は、接着細胞又は懸濁細胞、すなわち、懸濁液中で成長する細胞であってもよい。好適な宿主細胞は、当技術分野において公知であり、例えば、DH5大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巢細胞、サルVERO細胞、COS細胞、HEK293細胞等が挙げられる。組み換え発現ベクターを増幅又は複製する目的のために、宿主細胞は、好ましくは、原核細胞、例えばDH5細胞である。組み換え体のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質を生成する目的のために、宿主細胞は、好ましくは、哺乳類細胞である。最も好ましくは、宿主細胞は、ヒト細胞である。宿主細胞

10

20

30

40

50

は、任意の細胞型であってよく、任意の種類の組織に由来してよく、任意の発生段階であってよいが、宿主細胞は、好ましくは、末梢血リンパ球（PBL）又は末梢血単核細胞（PBMC）である。より好ましくは、宿主細胞は、T細胞である。

【0101】

本明細書における目的のために、T細胞は、任意のT細胞、例えば、培養T細胞、例えば初代T細胞、又は培養T細胞株由来のT細胞、例えばJurkat、SupT1等、又は哺乳類から得られたT細胞であってよい。哺乳類から得られる場合、T細胞は、血液、骨髓、リンパ節、胸腺、又は他の組織若しくは流体を含むがこれらに限定されない多数の供給源から得ることができる。また、T細胞は、濃縮又は精製されていてもよい。好ましくは、T細胞は、ヒトT細胞である。T細胞は、任意の種類のT細胞であってよく、任意の発生段階であってよく、CD4⁺/CD8⁺二重陽性T細胞、CD4⁺ヘルパーT細胞、例えば、Th₁及びTh₂細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、メモリT細胞（例えば、セントラルメモリT細胞及びエフェクタメモリT細胞）、ナイーブT細胞等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0102】

また、本明細書に記載の少なくとも1つの宿主細胞を含む細胞の集団が本発明によって提供される。細胞の集団は、組み換え発現ベクターのいずれも含まない少なくとも1つの他の細胞、例えば宿主細胞（例えば、T細胞）、又はT細胞以外の細胞、例えばB細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋肉細胞、脳細胞等に加えて、記載される組み換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を含む不均質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、から本質的になる）宿主細胞を主に含む、実質的に均質な集団であってよい。また、集団は、該集団の全ての細胞が、組み換え発現ベクターを含む1つの宿主細胞のクローンであり、その結果、該集団の全ての細胞が組み換え発現ベクターを含む、細胞のクローン集団であってよい。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宿主細胞を含むクローン集団である。

20

【0103】

本発明の実施形態では、集団内の細胞数を、急速に拡大させることができる。T細胞数の拡大は、例えば、米国特許第8,034,334号、同第8,383,099号、米国特許出願公開第2012/0244133号、Dudley et al., J. Immunother., 26:332-42(2003)、及びRiddell et al., J. Immunol. Methods, 128:189-201(1990)に記載されている通り、当技術分野において公知の多数の方法のいずれかによって実現することができる。実施態様では、T細胞数の拡大は、該T細胞をOKT3抗体、IL-2、及びフィーダーPBMC（例えば、放射線照射された同種PBMC）と共に培養することによって実施される。

30

【0104】

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、及び宿主細胞（その集団を含む）は、単離及び/又は精製されてもよい。用語「単離された」は、本明細書で使用するとき、その天然環境から取り出されていることを意味する。用語「精製された」は、本明細書で使用するとき、純度が増大したことを意味し、「純度」は相対的な用語であり、必ずしも絶対純度と解釈される訳ではない。例えば、純度は、少なくとも約50%であってよく、約60%超、約70%超、約80%超、約90%超、約95%超であってよく、約100%であってよい。

40

【0105】

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、及び宿主細胞（その集団を含む）（以後、これらの全てをまとめて「本発明のTCR材料」と称する）は、医薬組成物等の組成物に製剤化してもよい。これに関して、本発明は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、発現ベクター、及び宿主細胞（その

50

集団を含む)のいずれかと、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物を提供する。本発明のTCR材料のいずれかを含有する本発明の医薬組成物は、1つを超える本発明のTCR材料、例えば、ポリペプチド及び核酸又は2つ以上の異なるTCRを含んでいてもよい。あるいは、医薬組成物は、別の薬学的活性剤(複数可)又は薬物(複数可)、例えば、化学療法剤、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、ビンクリスチン等と組み合わせて、本発明のTCR材料を含み得る。

【0106】

好ましくは、担体は、薬学的に許容し得る担体である。医薬組成物に関して、担体は、検討中の具体的な本発明のTCR材料に従来使用されているもののいずれかであってよい。投与可能な組成物を調製する方法は、当業者に公知であるか又は明らかであり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Ed., Pharmaceutical Press (2012)により詳細に記載されている。薬学的に許容し得る担体は、使用条件下で有害な副作用も毒性も有しないものであることが好ましい。

10

【0107】

担体の選択は、具体的な本発明のTCR材料によって、並びに本発明のTCR材料を投与するために使用される具体的な方法によって部分的に決定される。従って、本発明の医薬組成物の様々な好適な製剤が存在する。好適な製剤は、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、腫瘍内、又は腹腔内に投与するもののいずれかを含み得る。1つを超える経路を使用して本発明のTCR材料を投与してよく、特定の例では、特定の経路が別の経路よりも即時かつより有効な応答を提供し得る。

20

【0108】

好ましくは、本発明のTCR材料は、例えば静脈内に注射することによって投与される。本発明のTCR材料が、本発明のTCRを発現している宿主細胞(又はその集団)であるとき、注射用の細胞のための薬学的に許容し得る担体は、任意の等張担体、例えば、通常生理食塩水(水中約0.90%w/v NaCl、水中約300mOsm/L NaCl、又は水1リットルあたり約9.0g NaCl)、NORMOSOL R電解質溶液(Abbott, Chicago, IL)、PLASMA-LYTE A(Baxter, Deerfield, IL)、水中約5%デキストロース、又は乳酸リンゲル液を含んでいてよい。実施形態では、薬学的に許容し得る担体にヒト血清アルブメン(albumen)を補給する。

30

【0109】

本発明の目的のために、投与される本発明のTCR材料の量又は用量(例えば、本発明のTCR材料が1つ以上の細胞である場合は細胞数)は、適切な時間枠にわたって被験体又は動物において例えば治療的又は予防的応答をもたらすのに十分でなければならない。例えば、本発明のTCR材料の用量は、投与時点から約2時間以上、例えば、12~24時間又はそれ以上の期間、がん抗原(例えば、変異型RAS)に結合するか又はがんを検出、治療、若しくは予防するのに十分でなければならない。特定の実施形態では、期間は更に長くてもよい。用量は、具体的な本発明のTCR材料の有効性及び動物(例えば、ヒト)の状態、並びに治療される動物(例えば、ヒト)の体重によって決定される。

40

【0110】

投与される用量を決定するための多くのアッセイが、当技術分野において公知である。本発明の目的のために、例えば、それぞれ異なる用量のT細胞を与えた哺乳類のセットの中で、所与の用量の本発明のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質を発現しているT細胞を哺乳類に投与した際にこのようなT細胞によって標的細胞が溶解する又はIFN- γ が分泌される程度を比較することを含むアッセイを使用して、哺乳類に投与する開始用量を決定することができる。特定の用量を投与した際に標的細胞が溶解する及び/又はIFN- γ が分泌される程度は、当技術分野において公知の方法によってアッセイすることが

50

できる。

【0111】

本発明のTCR材料の用量は、具体的な本発明のTCR材料の投与に付随し得る任意の有害な副作用の存在、性質、及び程度によっても決定される。典型的には、主治医は、様々な要因、例えば、年齢、体重、全体的な健康状態、食生活、性別、投与される本発明のTCR材料、投与経路、及び治療されるがんの重篤度を考慮して、各個々の患者を治療するための本発明のTCR材料の投与量を決定する。本発明のTCR材料が細胞の集団である実施形態では、注入1回あたりに投与される細胞数は、例えば、約 1×10^6 ~ 約 1×10^{12} 細胞又はそれ以上で変動し得る。特定の実施形態では、 1×10^6 細胞未満を投与してもよい。

10

【0112】

当業者は、本発明のTCR材料を任意の数の方法で修飾してよく、その結果、該修飾を通して本発明のTCR材料の治療又は予防の有効性が増大することを容易に理解するであろう。例えば、本発明のTCR材料を、直接又は架橋を介して間接的に化学療法剤にコンジュゲートしてもよい。化合物の化学療法剤へのコンジュゲートの実施は、当技術分野において公知である。当業者は、架橋及び/又は化学療法剤が本発明のTCR材料に結合した時点で本発明のTCR材料の機能、すなわち、変異型RASに結合するか又はがんを検出、治療、若しくは予防する能力には干渉しない限り、本発明のTCR材料の機能に必須ではない本発明のTCR材料の部位が、架橋及び/又は化学療法剤を結合させるのに好適な部位であることを認識する。

20

【0113】

本発明の医薬組成物、TCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、及び細胞の集団は、がんを治療又は予防する方法において使用できることが企図される。特定の理論に縛られるものではないが、本発明のTCRは変異型RASに特異的に結合し、その結果、TCR（又は関連する本発明のポリペプチド若しくはタンパク質）は、細胞によって発現されたとき、変異型RASを発現している標的細胞に対する免疫応答を媒介することができると考えられる。これに関して、本発明は、哺乳類におけるがんを治療又は予防する方法であって、本明細書に記載の医薬組成物、TCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれか、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、タンパク質のいずれかをコードしているヌクレオチド配列を含む任意の核酸若しくは組み換え発現ベクター、又は本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれかをコードしている組み換えベクターを含む任意の宿主細胞若しくは細胞の集団を、哺乳類におけるがんを治療又は予防するのに有効な量、該哺乳類に投与することを含む方法を提供する。

30

【0114】

本発明の実施形態は、哺乳類におけるがんの治療又は予防において使用するための、本明細書に記載の医薬組成物、TCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれか、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、タンパク質のいずれかをコードしているヌクレオチド配列を含む任意の核酸若しくは組み換え発現ベクター、又は本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれかをコードしている組み換えベクターを含む任意の宿主細胞若しくは細胞の集団を提供する。

40

【0115】

用語「治療する」及び「予防する」、並びにそれから派生する語は、本明細書で使用するとき、必ずしも100%、すなわち、完全な治療又は予防を意味するものではない。どちらかといえば、当業者が潜在的な利点又は治療効果を有すると認識する、様々な程度の治療又は予防が存在する。これに関して、本発明の方法は、哺乳類における任意の量の任意のレベルのがんの治療又は予防を提供することができる。更に、本発明の方法によって提供される治療又は予防は、治療又は予防されるがんの1つ以上の病態又は症状の治療又は予防を含み得る。例えば、治療又は予防は、腫瘍の退縮を促進することを含み得る。また、本明細書における目的のために、「予防」は、がん又はその症状若しくは病態の発生

50

を遅らせることを包含し得る。あるいは又は更に、「予防」は、がん又はその症状若しくは病態の再発を防ぐ又は遅らせることを包含し得る。

【0116】

また、哺乳類におけるがんの存在を検出する方法も提供される。方法は、(i)本明細書に記載の本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、又は医薬組成物のいずれかを、哺乳類由来の1つ以上の細胞を含むサンプルと接触させ、それによって、複合体を形成させることと、該複合体を検出することを含み、該複合体の検出が、哺乳類におけるがんの存在を示す。

【0117】

哺乳類におけるがんを検出する本発明の方法に関して、細胞のサンプルは、全細胞、その溶解物、又は全細胞溶解物の画分、例えば、核若しくは細胞質の画分、全タンパク質画分、又は核酸画分を含むサンプルであってよい。

【0118】

がんを検出する本発明の方法の目的のために、接触は、哺乳類に対してインビトロ又はインビボで行ってよい。好ましくは、インビトロで接触させる。

【0119】

また、複合体の検出は、当技術分野において公知の任意の数の方法を通して行うことができる。例えば、本明細書に記載の本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、又は細胞の集団を、検出可能な標識、例えば、放射性同位体、フルオロフォア（例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリトリン(PE))、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ）、及び元素粒子（例えば、金粒子）等で標識してよい。

【0120】

宿主細胞又は細胞の集団が投与される本発明の方法の目的のために、細胞は、哺乳類に対して同種又は自己である細胞であってよい。好ましくは、細胞は、哺乳類に対して自己である。

【0121】

本発明の方法に関して、がんは、急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門、肛門管、又は肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢、又は胸膜のがん、鼻、鼻腔、又は中耳のがん、口腔のがん、膣のがん、外陰部のがん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、中咽頭のがん、卵巣がん、陰茎のがん、膵臓がん、腹膜、網、及び腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮のがん、尿管がん、並びに膀胱がんのいずれかを含む任意のがんであってよい。好ましいがんは、膵臓、結腸直腸、肺、子宮内膜、卵巣、又は前立腺のがんである。好ましくは、肺がんは肺腺がんであり、卵巣がんは上皮性卵巣がんであり、膵臓がんは膵臓腺がんである。本発明の実施形態では、がんは、変異型ヒトRASアミノ酸配列を発現し、該変異型ヒトRASアミノ酸配列は、変異型ヒトKRAS、変異型ヒトHRAS、又は変異型ヒトNRASのアミノ酸配列である。がんが発現する変異型ヒトKRAS、変異型ヒトHRAS、及び変異型ヒトNRASは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載の通りであってよい。

【0122】

本発明の方法において言及される哺乳類は、任意の哺乳類であってよい。本明細書で使用する時、用語「哺乳類」とは、げっ歯目の哺乳類、例えばマウス及びハムスター、並びにウサギ目の哺乳類、例えばウサギを含むがこれらに限定されない任意の哺乳類を指す。哺乳類は、ネコ及びイヌを含む食肉目の哺乳類であることが好ましい。哺乳類は、ウシ及びブタを含む偶蹄目、又はウマを含む奇蹄目の哺乳類であることがより好ましい。哺乳

10

20

30

40

50

類は、霊長目、サル目（C e b o i d s又はS i m o i d s）（サル）、又は真猿亜目（ヒト及び類人猿）の哺乳類であることが最も好ましい。特に好ましい哺乳類は、ヒトである。

【実施例】

【0123】

以下の実施例は、本発明を更に説明するが、無論、いかなる方法でもその範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0124】

実施例 1

この実施例は、H L A - D R B 1 * 0 7 : 0 1によって提示されるG 1 2 V変異を有するヒトK R A Sに対して抗原特異性を有するT C Rの単離を示す。

10

【0125】

H L A - D R B 1 * 0 7 : 0 1分子によって提示されるG 1 2 V変異を有するヒトK R A Sに対する抗原特異性を有するT C Rを、患者由来の子宮内膜腫瘍サンプルから単離した。簡潔に述べると、腫瘍サンプルを刻み、消化させ、冷凍した。細胞選別前に、腫瘍消化物を解凍し、サイトカイン無しで一晩静置した。F A C Sを使用し、P D - 1及び/又はO X 4 0の発現に基づいて、腫瘍消化物からT細胞を選別した（P I - （生細胞）> C D 3 +でゲートをかけた）。F A C S結果を図1に示す。アイソタイプについて染色された細胞が対照の役割を果たした。

【0126】

20

3 . 5週間にわたる急速拡大プロトコル（R E P）に従って、選別された細胞の数を拡大させた。R E Pのために、O K T 3抗体、I L - 2、及び放射線照射された同種P B M Cの存在下で9 6ウェルマイクロタイタープレート（3細胞/ウェル）内においてT細胞を培養した。

【0127】

拡大した数の細胞をプールし、プールされた2 5 m e rのペプチド又は患者の腫瘍で検出された様々な腫瘍特異的変異を包含する2 5 m e rのタンデムミニ遺伝子（T M G）によってコードされているペプチドをパルスした自己樹状細胞（D C）に対する反応性について試験した。各プールは、1 7 ~ 2 1のペプチド又はT M Gをそれぞれ含んでいた。酵素免疫スポットアッセイ（E L I S P O T）によってインターフェロン - ガンマ（I F N - ）分泌を測定した。結果を図2に示す。図2に示す通り、培養物番号7及び8のプールされたエフェクタ自己T細胞は、ペプチドプール1（P P 1）及びペプチドプール2（P P 2）をパルスした標的D Cを認識した。

30

【0128】

変異反応性T細胞培養物を、関係するペプチドプール由来の各単一ペプチドをパルスした自己D Cに対して試験した。図3は、培養物番号7の自己T細胞（W 7）を、ペプチドプール1（P P 1）由来のペプチド1 ~ 1 7（P 1 ~ P 1 7）のそれぞれをパルスした自己D Cと共培養した際に得られた結果を示す。図3に示す通り、培養物番号7のT細胞は、ペプチドP 1 7に対して高い特異性を示した。ペプチド1 7（P 1 7）は、K R A S^{G 1 2 V}変異をコードしている。

40

【0129】

培養物番号7の自己T細胞（W 7）の細胞から全R N Aを単離した。次いで、T C Rのアルファ及びベータ鎖の定常プライマーを使用して5 '相補的D N A末端の迅速増幅（5 ' R A C E）に該全R N Aを供した。次いで、標準的なアガロースゲル電気泳動及びゲル抽出によって、T C RのP C R産物を単離した。生成物を直接シーケンスした。T C Rのアルファ及びベータ鎖の可変領域のヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号4 2及び4 3であった。T C Rのアルファ及びベータ鎖の可変領域のアミノ酸配列を表6に示す。相補性決定領域（C D R）に下線を引く。

【0130】

50

【表 6】

表 6

| TCR ID | TCR鎖 | アミノ酸配列 相補性決定領域（CDR）に下線を引く。 |
|---|--------------------|--|
| KRAS ^{G12V} - H LA-DRB1*07 :01 | アルファ (TRAV13-1) | MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYS ^{DS} SASNYFPWKQEL GKGPQLIID <u>IRS</u> NVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFS ^{SL} LHITETQPEDSAVYFCAASTGGG ^{NK} <u>LT</u> FGTGTQLKVEL (配列番号 1 3) |
| | ベータ (TRBV20-1) | MLLLLLLLGPAGSGLGAVVSQHPSRVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSL MLMATSNEGSKATYEQGV ^{ED} KDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYIC ^S SAREGAGGM <u>GT</u> QYFGPGTRLLVL (配列番号 1 4) |

10

【0131】

実施例 2

この実施例は、実施例 1 で単離した TCR が、HLA-DR 分子の枠内で提示される KRAS G12V ペプチド抗原を認識することを示す。

20

【0132】

実施例 1 の単離された G12V 反応性 TCR をコードしており（配列番号 42 及び配列番号 43 のヌクレオチド配列を含む）、システイン置換 LVL 修飾マウス定常領域を含む核酸配列を、レトロウイルス発現ベクターにクローニングした。鎖マウス定常領域は、48 位の X が Cys であり、112 位の X が Leu であり、114 位の X が Ile であり、115 位の X が Val である配列番号 30 のアミノ酸配列を含んでいた。鎖定常領域は、57 位の X が Cys である配列番号 31 のアミノ酸配列を含んでいた。配列番号 54 のアミノ酸配列を含むリンカーは、鎖定常領域と鎖定常領域との間に位置していた。同種 T 細胞にレトロウイルス発現ベクターを形質導入した。

【0133】

形質導入された細胞（エフェクタ細胞）を、HLA 遮断抗体 W6/32（抗 HLA-A、-B、-C）、IVA12（汎特異的、抗 HLA クラス II）、B7/21（抗 HLA-DP）、HB55（抗 HLA-DR）、又は SPV-L3（HLA-DQ）（標的細胞）と共に、KRAS^{G12V} ペプチド（1 ng/mL）をパルスした標的自己抗原提示細胞（APC）と共培養した。単独で、DMSO と共に、又は酢酸ミリスチン酸ホルボール（PMA）と共に培養したエフェクタ形質導入細胞が対照の役割を果たした。1 ng/mL KRAS G12V ペプチド（配列番号 53）をパルスした標的自己 APC と共培養した空ベクターを形質導入したエフェクタ細胞（モック）が更に別の対照の役割を果たした。

30

【0134】

標的細胞に対するエフェクタ細胞の反応性を、フローサイトメトリー（CD3 + mTCR ベータ鎖 + 細胞でゲートをかけた）によって検出された 4-1BB 発現によって測定した。結果を図 4 に示す。図 4 に示す通り、IVA12 及び HB55 の抗体は、標的細胞に対するエフェクタ細胞の反応性を遮断し、このことは、形質導入されたエフェクタ細胞が、HLA-DR 分子の枠内で提示される KRAS G12V ペプチド抗原を認識したことを示す。

40

【0135】

実施例 3

この実施例は、実施例 2 の TCR が、HLA-DRB1*7:01 分子の枠内で提示される KRAS G12V ペプチド抗原を認識することを示す。

【0136】

50

実施例 2 の T C R が形質導入された同種 T 細胞 (エフェクタ細胞) を、実施例 1 の患者の自己 A P C 又は D R B 1 0 1 : 0 1 若しくは D R B 1 0 7 : 0 1 のハプロタイプを有するドナー由来の A P C (標的細胞) と共培養した。標的細胞に、K R A S ^{G 1 2 V} ペプチド (配列番号 5 3) 又は W T K R A S ペプチド (配列番号 5 5) をパルスした。エフェクタ細胞を、対照としての H L A - D R B 1 陽性ドナー (ドナーのアリルの一方が D R B 1 * 0 7 : 0 1 であるが、両方がそうではない) (「D R B 不一致」) 由来の A P C と共培養した。単独で、D M S O と共に、又は P M A - イオノマイシンと共に培養したエフェクタ細胞が更なる対照の役割を果たした。I F N - 分泌を E L I S P O T によって測定した。陽性ウェルの数をカウントした。結果を表 7 及び図 5 に示す。表 7 中、「T N T C」は、「多すぎてカウントできない」を意味する。4 - 1 B B を発現する m T C R 発現細胞の百分率もフローサイトメトリーによって測定した。結果を図 5 に示す。結果は、H L A - D R B * 0 7 : 0 1 によって提示される変異型 K R A S に対して T C R が特異的に反応することを示す。

【 0 1 3 7 】

【表 7】

表 7

| | 自己 (患者 4148) | DRB1 01:01 ドナー | DRB1 7:01 ドナー | HLA-DRB1 不一致ドナー |
|-----------|--------------|----------------|---------------|-----------------|
| KRAS WT | 約 (〜) 354 | 2 | 〜291 | 58 |
| KRAS G12V | TNTC | 27 | TNTC | 41 |
| DMSO | 102 | 2 | 123 | 〜180 |
| 細胞のみ | 12 | 3 | 1 | 1 |
| OKT3 | 〜1122 | 〜1019 | 〜1007 | 〜983 |

【 0 1 3 8 】

実施例 4

この実施例は、H L A - D R B 1 * 1 1 : 0 1 分子によって提示される G 1 2 C 変異を有するヒト K R A S に対して抗原特異性を有する T C R の単離を示す。

【 0 1 3 9 】

K R A S ^{G 1 2 C} 発現腫瘍を有する卵巣がん患者由来の末梢血 T 細胞サブセットの反復体外感作 (I V S) を使用して、K R A S ^{G 1 2 C} 反応性 T C R を同定した。

【 0 1 4 0 】

自己 D C に G 1 2 C 変異型ペプチド (配列番号 5 6) をパルスし、選別された T 細胞サブセットと 1 0 日間共培養し、次いで、実施例 1 に記載の通り反応性を試験した。

【 0 1 4 1 】

反応性細胞を更に濃縮するために、K R A S 変異型ペプチドに対する反応性画分を 4 - 1 B B / O X 4 0 発現に基づいて選別し、変異型ペプチドで再度刺激した。反応性 T 細胞を 4 - 1 B B / O X 4 0 発現に基づいて選別し、シーケンスした。

【 0 1 4 2 】

細胞から全 R N A を単離した。次いで、T C R のアルファ及びベータ鎖の定常プライマーを使用して 5 ' 相補的 D N A 末端の迅速増幅 (5 ' R A C E) に該全 R N A を供した。次いで、標準的なアガロースゲル電気泳動及びゲル抽出によって、T C R の P C R 産物を単離した。生成物を直接シーケンスした。T C R のアルファ及びベータ鎖の可変領域のヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号 4 4 及び 4 5 であった。T C R のアルファ及びベータ鎖の可変領域のアミノ酸配列を表 8 に示す。相補性決定領域 (C D R) に下線を引く。

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8

| TCR ID | TCR鎖 | アミノ酸配列 相補性決定領域（CDR）に下線を引く。 |
|---|-------------------|--|
| KRAS ^{G12C} - H LA-DRB1*11 :01 | アルファ (TRAV24) | MEKNPLAAPLLILWFHLCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTNFTCSFP <u>SSNFYALHWYR</u> WETAKSPEALFV <u>MTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLC</u> AFTTGN QFYFGTGTSLTVIP (配列番号 15) |
| | ベータ (TRBV12-4) | MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPIS <u>SGHDYLFWYRQTMM</u> RGLELLIY <u>FNNNVPI</u> DDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFC <u>ASSSYGG</u> YSNPQHFGDGTRLSEILED (配列番号 16) |

10

【0144】

実施例 5

この実施例は、実施例 4 で単離した TCR が、HLA-DR 分子の枠内で提示される KRAS^{G12C} ペプチド抗原を認識することを示す。

20

【0145】

実施例 4 の単離された G12C 反応性 TCR をコードしており（配列番号 44 及び配列番号 45 のヌクレオチド配列を含む）、システイン置換 LVL 修飾マウス定常領域を含む核酸配列を、レトロウイルス発現ベクターにクローニングした。鎖マウス定常領域は、48 位の X が Cys であり、112 位の X が Leu であり、114 位の X が Ile であり、115 位の X が Val である配列番号 30 のアミノ酸配列を含んでいた。鎖定常領域は、57 位の X が Cys である配列番号 31 のアミノ酸配列を含んでいた。配列番号 54 のアミノ酸配列を含むリンカーは、鎖定常領域と鎖定常領域との間に位置していた。同種 T 細胞にレトロウイルス発現ベクターを形質導入した。

【0146】

30

HLA-DQ、HLA-DR、若しくは HLA-DP に対する抗体、又は HLA-DP、HLA-DR、及び HLA-DQ の全てに対する汎特異的抗体を使用して、その膜 MHC クラス II 分子を遮断した後、標的自己 DC、又は KRAS^{G12C} 24-mer ペプチド（配列番号 56）をパルスした単一の HLA-DRB15:01 若しくは HLA-DRB11:01 のアリルに一致する同種 DC と、形質導入された細胞（エフェクタ細胞）を共培養した。酢酸ミリスチン酸ホルボール（PMA）又は WT KRAS（配列番号 55）と共に培養したエフェクタ形質導入細胞が、対照の役割を果たした。

【0147】

標的細胞に対するエフェクタ細胞の反応性を、フローサイトメトリー（CD3+mTCR ベータ鎖 + 細胞でゲートをかけた）によって検出された 4-1BB 発現によって測定した。結果を図 10 に示す。図 10 に示す通り、TCR は、HLA-DRB*11:01 によって提示される KRAS^{G12C} に対して特異的に反応する。

40

【0148】

実施例 6

この実施例は、実施例 5 の KRAS^{G12C} TCR を形質導入した PBMC が、KRAS^{G12C} ペプチドをパルスした自己 DC を認識することを示す。

【0149】

実施例 5 の KRAS^{G12C} TCR をコードしている MSGV-1-レトロウイルスを用いて、同種 T 細胞を遺伝的に操作した。自己 DC に WT KRAS（配列番号 55）又は KRAS^{G12C} ペプチド（配列番号 56）をロードし、TCR 形質導入細胞と 18 時間共

50

培養し、続いて、4 - 1 B B のアップレギュレートについてフローサイトメトリー解析した。結果を図 9 に示す。図 9 に示す通り、実施例 5 の K R A S ^{G 1 2 C} T C R を形質導入した P B M C は、K R A S ^{G 1 2 C} ペプチドをパルスした自己 D C を認識した。

【 0 1 5 0 】

実施例 7

この実施例は、K R A S ^{G 1 2 V} 変異型タンパク質が、D C によってプロセッシング及び提示され、実施例 2 の T C R によって認識されることを示す。

【 0 1 5 1 】

実施例 2 の G 1 2 V - D R B 1 * 0 7 : 0 1 が形質導入された同種 T 細胞を、以下の K R A S ^{G 1 2} 変異 : G 1 2 R、G 1 2 C、G 1 2 D、又は G 1 2 V のうちの 1 つを発現する腫瘍細胞株の細胞溶解物をパルスした自己 D C と一晩共培養した。W T K R A S を発現する腫瘍細胞株の細胞溶解物をパルスした自己 D C と共培養した形質導入細胞が対照の役割を果たした。単独で、又は P M A と共に、又は D M S O と共に培養した形質導入細胞が更なる対照の役割を果たした。4 - 1 B B 及び / 又は O X 4 0 をアップレギュレートする細胞の百分率をフローサイトメトリーによって測定した。I F N を発現している細胞数 (2 × 1 0 ⁴ 細胞あたりのスポット) を E L I S P O T によって測定した。結果を図 6 に示す。図 6 に示す通り、K R A S ^{G 1 2 V} 変異型タンパク質は、D C によってプロセッシング及び提示され、実施例 2 の T C R によって認識される。

【 0 1 5 2 】

実施例 8

この実施例は、実施例 2 の G 1 2 V - D R B 1 * 0 7 : 0 1 T C R を形質導入した細胞が、K R A S ^{G 1 2 V} ペプチドを特異的に認識することを示す。

【 0 1 5 3 】

実施例 2 の G 1 2 V - D R B 1 * 0 7 : 0 1 T C R が形質導入された同種 T 細胞を、様々な濃度の 2 4 - m e r ペプチド K R A S ^{G 1 2 V} (配列番号 5 3) 又は W T K R A S (配列番号 5 5) をパルスした自己 D C と一晩共培養した。m T C R + C D 8 + 4 - 1 B B + 細胞の百分率をフローサイトメトリーによって測定した。結果を図 7 に示す。図 7 に示す通り、実施例 2 の G 1 2 V - D R B 1 * 0 7 : 0 1 T C R を形質導入した細胞は、K R A S ^{G 1 2 V} ペプチドを特異的に認識した。

【 0 1 5 4 】

実施例 9

実施例 2 の G 1 2 V - D R B 1 * 0 7 : 0 1 T C R を形質導入した細胞は、様々な K R A S ^{G 1 2 V} ペプチドを特異的に認識する。

【 0 1 5 5 】

実施例 2 の G 1 2 V - D R B 1 * 0 7 : 0 1 T C R が形質導入された同種 T 細胞を、様々な濃度の以下の表 9 に列挙するペプチドをパルスした自己 D C と一晩共培養した。I F N 分泌を E L I S P O T によって測定した。結果を図 8 に示す。図 8 に示す通り、実施例 2 の G 1 2 V - D R B 1 * 0 7 : 0 1 T C R を形質導入した細胞は、K R A S ^{G 1 2 V} ペプチドの全てを特異的に認識したが、配列番号 5 2 が最良であった。

【 0 1 5 6 】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9

| 名称 | 配列 | 配列番号 |
|-------------------|--------------------------|------|
| KRAS G12V 11mer | LVVVGAVGVGK | 46 |
| KRAS G12V 12mer_1 | KLVVVGAVGVGK | 47 |
| KRAS G12V 12mer_2 | LVVVGAVGVGKS | 48 |
| KRAS G12V 13mer_1 | YKLVVVGAVGVGK | 49 |
| KRAS G12V 13mer_2 | KLVVVGAVGVGKS | 50 |
| KRAS G12V 13mer_3 | LVVVGAVGVGKSA | 51 |
| KRAS G12V 15mer_3 | EYKLVVVGAVGVGKS | 52 |
| KRAS G12V 24mer | MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLI | 53 |

【0157】

本明細書に引用した刊行物、特許出願、及び特許を含む全ての参照文献は、各参照文献が個々にかつ具体的に参照によって組み入れられると示されており、その全体が本明細書に記載されているかのように、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0158】

本発明の説明に関連して（特に以下の特許請求の範囲に関連して）用語「a」及び「an」及び「the」及び「少なくとも1つ」、並びに類似の参照対象の使用は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、単数形及び複数形の両方を網羅すると解釈されるべきである。1つ以上の項目のリストの後の用語「少なくとも1つ」の使用（例えば、「A及びBのうちの少なくとも1つ」）は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、列挙される項目から選択される1つの項目（A又はB）又は列挙される項目のうちの2つ以上の任意の組み合わせ（A及びB）を意味すると解釈されるべきである。用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」、及び「含有する（containing）」は、特に断らない限り、オープンエンドな用語である（すなわち、「含むがこれらに限定されない」を意味する）と解釈されるべきである。本明細書における値の範囲の列挙は、本明細書において他の指定がない限り、単に、範囲内の各別個の値を個々に参照する省略法として機能することを意図し、各別個の値が、本明細書に個々に列挙されているかのように明細書に組み込まれる。本明細書に記載の全ての方法は、本明細書において他の指定がない限り又は文脈から明らかに矛盾していない限り、任意の好適な順序で実施することができる。本明細書に提供される任意の及び全ての例又は例示的な表現（例えば、「など」）の使用は、特に主張しない限り、単に本発明をより深く解明することを意図し、本発明の範囲の限定を提起するものではない。明細書中の表現はいずれも、任意の請求されていない要素が本発明の実施に必須であることを示すと解釈されるべきではない。

【0159】

本発明の好ましい実施形態は、本発明を実施するための本発明者らに公知の最良の形態を含む、本明細書に記載される。好ましい実施形態の変形は、前述の記載を読んだときに当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者がこのような変形を適宜使用すると予想し、そして、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されているのとは別の方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明は、準拠法によって認められている通り、本明細書に添付される特許請求の範囲に列挙される発明主題の全ての変形及び等価物を含む。更に、その全ての可能な変形における上記要素の任意の組み合わせは、本明細

【図 5】

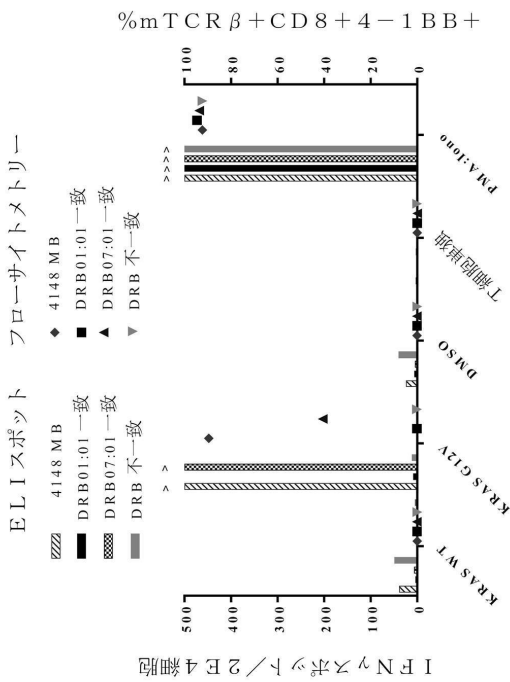


図 5

【図 6】

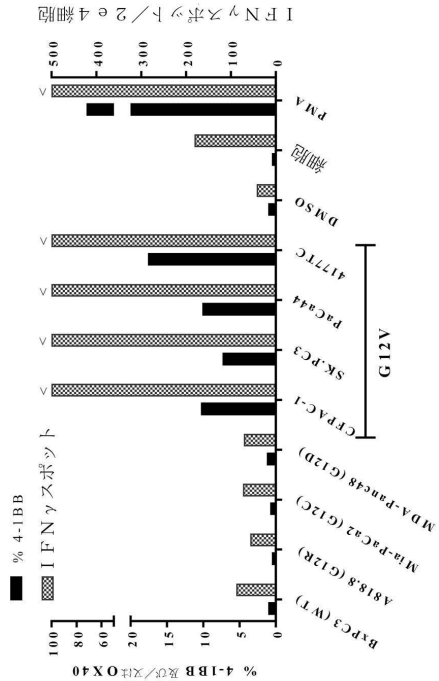


図 6

【図 7】

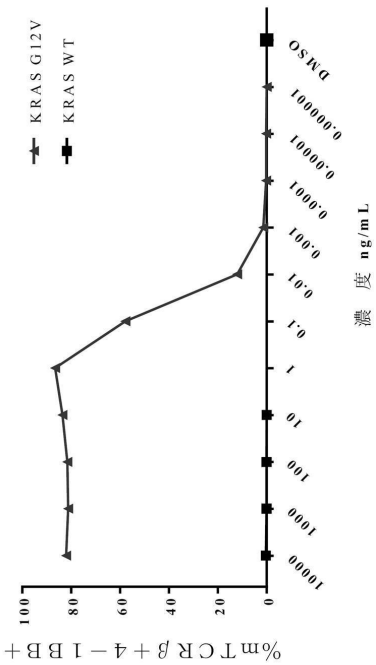


図 7

【図 8】

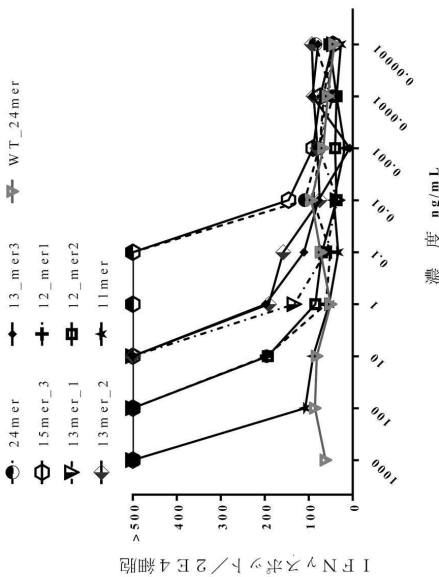


図 8

10

20

30

40

50

【図 9】

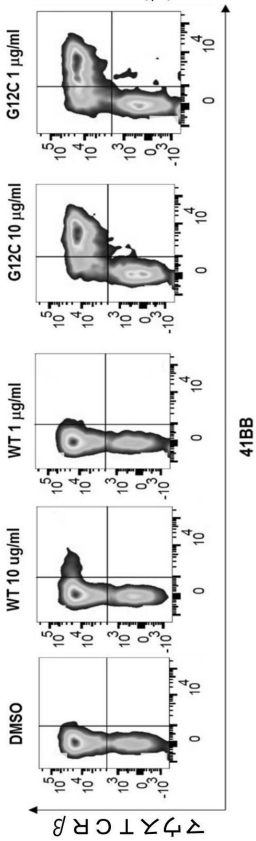


図 9

【図 10】

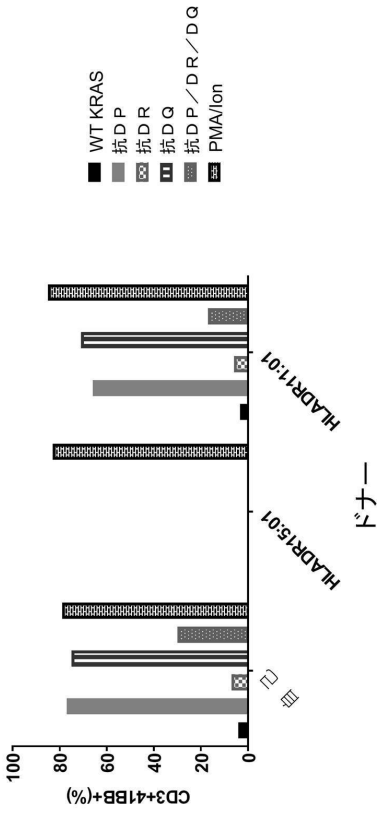


図 10

【配列表】

0007256794000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

Z N A

(74)代理人 100121212

弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 ヨセフ、ラミ

アメリカ合衆国、2 0 8 5 0 メリーランド州、ロックヴィル、エルムクロフト ブールヴァード
6 4 0、アパートメント 1 4 0 9

(72)発明者 カフリ、ガル

アメリカ合衆国、2 0 8 5 2 メリーランド州、ロックヴィル、コングレッショナル レーン 3 0 5

(72)発明者 ロビンズ、ポール エフ.

アメリカ合衆国、2 0 8 1 5 メリーランド州、チェヴィー チェイス、グレンデール ロード 7
9 0 7

(72)発明者 ローゼンバーグ、スティーヴン エー.

アメリカ合衆国、2 0 8 5 4 メリーランド州、ポトマック、アイアン ゲイト ロード 1 0 1 0 4

審査官 林 康子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 0 8 5 9 0 4 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 4 8 5 9 3 (W O , A 1)

Wang QJ et al , Identification of T-cell receptors targeting KRAS-mutated human tumors ,
Cancer Immunology Research , 2016年 , Vol 4 No 3 , 204-214Tran E et al , Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers , Sci
ence , 2015年 , Vol 350 No 6266 , 1387-1390

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 4 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q