

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号
特願2023-52688
(P2023-52688A)

(43)公開日 令和5年4月11日(2023.4.11)

(51)国際特許分類		F I			
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	
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	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17		
		審査請求 有	請求項の数 1	O L	(全24頁) 最終頁に続く
(21)出願番号 特願2023-10833(P2023-10833)			(71)出願人 506258073		
(22)出願日 令和5年1月27日(2023.1.27)			イマティクス バイオテクノロジーズ ゲー		
(62)分割の表示 特願2019-529260(P2019-529260)			ーエムベーハー		
)の分割			ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン,		
原出願日 平成29年12月6日(2017.12.6)			パウル・エンリヒ・シュトラッセ 1 5		
(31)優先権主張番号 102016123893.7			(74)代理人 100145403		
(32)優先日 平成28年12月8日(2016.12.8)			弁理士 山尾 憲人		
(33)優先権主張国・地域又は機関			(74)代理人 100122301		
ドイツ(DE)			弁理士 富田 憲史		
(31)優先権主張番号 62/497,895			(74)代理人 100157956		
(32)優先日 平成28年12月8日(2016.12.8)			弁理士 稲井 史生		
(33)優先権主張国・地域又は機関			(74)代理人 100170520		
米国(US)			弁理士 笹倉 真奈美		
			(74)代理人 100221545		
			弁理士 白江 雄介		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 対合が改善された T 細胞受容体 T 細胞

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 T C R の誤対合を効果的に回避するためのアプローチを提供する。

【解決手段】 非修飾鎖の I M G T 番号付けによる 4 4 位のアミノ酸が、修飾 α 鎖または β 鎖と望まれない α または β 鎖との対合を減少させる、別の適切なアミノ酸で置換されている、抗原-M H C 複合体に結合する能力を維持する、修飾 T 細胞受容体 (T C R) α 鎖もしくは β 鎖、またはその断片もしくは誘導体を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非修飾鎖の I M G T 番号付けによる 4 4 位のアミノ酸が、修飾 α 鎖または β 鎖と望まれない α または β 鎖との対合を減少させる、別の適切なアミノ酸で置換されている、抗原－M H C 複合体に結合する能力を維持する、修飾 T 細胞受容体（T C R）α 鎖もしくは β 鎖、またはその断片もしくは誘導体。

【請求項 2】

前記望まれない α 鎖または β 鎖が修飾されていない、請求項に記載の 1 修飾 T 細胞受容体（T C R）α 鎖または β 鎖。

【請求項 3】

前記可変ドメイン中の 4 4 位の前記アミノ酸が、アミノ酸 Q、R、D、E、K、L、W、および V からなる群から選択されるアミノ酸によって置換されている、請求項 1 または 2 に記載の修飾 T 細胞受容体（T C R）α 鎖または β 鎖。

【請求項 4】

前記修飾 α 鎖が、配列番号 1 または 3 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列のフレームワーク領域を少なくとも含んでなる可変ドメイン配列を有し、および／または前記修飾 β 鎖が、配列番号 2 または 4 と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列のフレームワーク領域を含んでなる可変ドメイン域配列を有する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の修飾 T 細胞受容体（T C R）α 鎖または β 鎖。

【請求項 5】

前記 T C R が抗原－M H C 複合体と結合する能力を維持する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の修飾 α 鎖および／または修飾 β 鎖、またはその断片もしくは誘導体を含んでなる、組換え T 細胞受容体（T C R）ヘテロ二量体。

【請求項 6】

前記 α および／または β 鎖の前記修飾が、Q、R、D、E、K、L、W、および V からなる群から選択されるアミノ酸による 4 4 位の置換から選択される、請求項 5 に記載の組換え T 細胞受容体（T C R）ヘテロ二量体。

【請求項 7】

前記 α 鎖および β 鎖の前記修飾が、α Q 4 4 D／β Q 4 4 R；α Q 4 4 R／β Q 4 4 D；α Q 4 4 E／β Q 4 4 K；α Q 4 4 K／β Q 4 4 E；α Q 4 4 D／β Q 4 4 K；α Q 4 4 K／β Q 4 4 D；α Q 4 4 E／β Q 4 4 R；α Q 4 4 R／β Q 4 4 E；α Q 4 4 L／β Q 4 4 W；α Q 4 4 W／β Q 4 4 L；α Q 4 4 V／β Q 4 4 W；α Q 4 4 W／β Q 4 4 V；α W 4 4 D／β Q 4 4 R；α W 4 4 R／β Q 4 4 D；α W 4 4 E／β Q 4 4 K；α W 4 4 K／β Q 4 4 E；α W 4 4 D／β Q 4 4 K；α W 4 4 K／β Q 4 4 D；α W 4 4 E／β Q 4 4 R；α W 4 4 R／β Q 4 4 E；α W 4 4 L／β Q 4 4 W；α W 4 4／β Q 4 4 L；α W 4 4 V／β Q 4 4 W；α W 4 4／β Q 4 4 V；α H 4 4 D／β Q 4 4 R；α H 4 4 R／β Q 4 4 D；α H 4 4 E／β Q 4 4 K；α H 4 4 K／β Q 4 4 E；α H 4 4 D／β Q 4 4 K；α H 4 4 K／β Q 4 4 D；α H 4 4 E／β Q 4 4 R；α H 4 4 R／β Q 4 4 E；α H 4 4 L／β Q 4 4 W；α H 4 4 W／β Q 4 4 L；α H 4 4 V／β Q 4 4 W；α H 4 4 W／β Q 4 4 V；α K 4 4 D／β Q 4 4 R；α K 4 4 R／β Q 4 4 D；α K 4 4 E／β Q 4 4 K；α K 4 4／β Q 4 4 E；α K 4 4 D／β Q 4 4 K；α K 4 4／β Q 4 4 D；α K 4 4 E／β Q 4 4 R；α K 4 4 R／β Q 4 4 E；α K 4 4 L／β Q 4 4 W；α K 4 4 W／β Q 4 4 L；α K 4 4 V／β Q 4 4 W；α K 4 4 W／β Q 4 4 V；α E 4 4 D／β Q 4 4 R；α E 4 4 R／β Q 4 4 D；α E 4 4／β Q 4 4 K；α E 4 4 K／β Q 4 4 E；α E 4 4 D／β Q 4 4 K；α E 4 4 K／β Q 4 4 D；α E 4 4／β Q 4 4 R；α E 4 4 R／β Q 4 4 E；α E 4 4 L／β Q 4 4 W；α E 4 4 W／β Q 4 4 L；α E 4 4 V／β Q 4 4 W；α E 4 4 W／β Q 4 4 V；α Q 4 4 D／β R 4 4；α Q 4 4 R／β R 4 4 D；α Q 4 4 E／β R 4 4 K；α Q 4 4 K／β R 4 4 E；α Q 4 4 D／β R 4 4 K；α Q 4 4 K／β R 4 4 D；α Q 4 4 E／β R 4 4；α Q 4 4 R／β R 4 4 E；α Q 4 4 L／β R 4 4 W；α Q 4 4 W／β R 4 4 L；α Q 4 4 V／β R 4 4 W；α Q 4 4 W／β R 4 4 V；α W 4 4 D／β

10

20

30

40

50

R 4 4 ; α W 4 4 R / β R 4 4 D ; α W 4 4 E / β R 4 4 K ; α W 4 4 K / β R 4 4 E ;
 α W 4 4 D / β R 4 4 K ; α W 4 4 K / β R 4 4 D ; α W 4 4 E / β R 4 4 ; α W 4 4 R
/ β R 4 4 E ; α W 4 4 L / β R 4 4 W ; α W 4 4 / β R 4 4 L ; α W 4 4 V / β R 4 4
W ; α W 4 4 / β R 4 4 V ; α H 4 4 D / β R 4 4 ; α H 4 4 R / β R 4 4 D ; α H 4 4
E / β R 4 4 K ; α H 4 4 K / β R 4 4 E ; α H 4 4 D / β R 4 4 K ; α H 4 4 K / β R
4 4 D ; α H 4 4 E / β R 4 4 ; α H 4 4 R / β R 4 4 E ; α H 4 4 L / β R 4 4 W ; α
H 4 4 W / β R 4 4 L ; α H 4 4 V / β R 4 4 W ; α H 4 4 W / β R 4 4 V ; α K 4 4 D
/ β R 4 4 ; α K 4 4 R / β R 4 4 D ; α K 4 4 E / β R 4 4 K ; α K 4 4 / β R 4 4 E
; α K 4 4 D / β R 4 4 K ; α K 4 4 / β R 4 4 D ; α K 4 4 E / β R 4 4 ; α K 4 4 R
/ β R 4 4 E ; α K 4 4 L / β R 4 4 W ; α K 4 4 W / β R 4 4 L ; α K 4 4 V / β R 4
4 W ; α K 4 4 W / β R 4 4 V ; α E 4 4 D / β R 4 4 ; α E 4 4 R / β R 4 4 D ; α E
4 4 / β R 4 4 K ; α E 4 4 K / β R 4 4 E ; α E 4 4 D / β R 4 4 K ; α E 4 4 K / β
R 4 4 D ; α E 4 4 R / β R 4 4 E ; α E 4 4 L / β R 4 4 W ; α E 4 4 W / β R 4 4 L
; α E 4 4 V / β R 4 4 W ; および α E 4 4 W / β R 4 4 V からなる群の置換対から選択
され、好ましくは α 4 4 D / β 4 4 R ; α 4 4 R / β 4 4 D ; α 4 4 E / β 4 4 K ; α 4
4 K / β 4 4 E ; α 4 4 D / β 4 4 K ; α 4 4 K / β 4 4 D ; α 4 4 E / β 4 4 R ; およ
び α 4 4 R / β 4 4 E からなる群から選択される、請求項 5 または 6 に記載の組換え T 細
胞受容体 (T C R) ヘテロ二量体。

10

【請求項 8】

前記 T C R の前記 α 鎖が、配列番号 1 または 3 と少なくとも 95 % の配列同一性を有す
る配列のフレームワーク領域を少なくとも含んでなる可変ドメイン配列を有し、および/
または前記 T C R の前記 β 鎖が、配列番号 2 または 4 と少なくとも 95 % の配列同一性を
有する配列のフレームワーク領域を含んでなる可変ドメイン配列を有する、請求項 5 ~ 7
のいずれか一項に記載の組換え T 細胞受容体 (T C R) ヘテロ二量体。

20

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の修飾 T 細胞受容体 (T C R) α 鎖または β 鎖、お
よび/または請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の組換え T 細胞受容体 (T C R) ヘテロ
二量体をコードする核酸分子。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の核酸分子の少なくとも 1 つを含んでなる、プラスミドまたは発現ベク
ター。

30

【請求項 11】

請求項 9 に記載の 1 つまたは複数の核酸分子、または請求項 10 に記載のプラスミドも
しくは発現ベクターで、対象補助から得られた T 細胞を形質導入または形質移入するステ
ップを含んでなる、修飾 T 細胞を調製する方法。

【請求項 12】

請求項 11 に従って生成される、修飾 T 細胞。

【請求項 13】

それを必要とする対象の自己由来 T 細胞療法で使用するための、請求項 12 に記載の修
飾 T 細胞。

40

【請求項 14】

前記それを必要とする対象に、前記修飾 T 細胞を含んでなる製剤を投与するステップを
含んでなる、新生物疾患、炎症性疾患、感染性疾患もしくは自己免疫疾患に罹患している
、またはそれらを発症するリスクがある、および/またはそれらであると診断された、治
療を必要とする対象の治療で使用するための請求項 12 に記載の修飾 T 細胞。

【請求項 15】

請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の組換え T 細胞受容体 (T C R) ヘテロ二量体であ
って、前記 T C R が M H C 複合体によって提示される抗原に特異的に結合し、前記抗原が
腫瘍関連抗原 (T A A) のエピトープから選択される、組換え T 細胞受容体 (T C R) ヘ
テロ二量体。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、修飾T細胞受容体（TCR） α 鎖もしくは β 鎖、または同鎖を含んでなるヘテロ二量体に関し、前記修飾 α 鎖もしくは β 鎖の可変ドメインにおいて、IMGT番号による44位のアミノ酸は、所望の鎖の対合を改善するために別の適切なアミノ酸で置換されている。

【背景技術】

【0002】

適応免疫系は、抗体、B細胞、ならびにCD4⁺およびCD8⁺細胞からなる。これらは、特定の免疫原性標的に対する非常に特異的な応答を可能にする。T細胞受容体（TCR）は、T細胞の表面のインバリエント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性のアルファ（ α ）およびベータ（ β ）鎖から通常なる、ジスルフィド結合膜固定型ヘテロ二量体タンパク質である。TCRヘテロ二量体を形成するプロセスにおける重要なステップは、「対合」と称される。対合受容体を発現するT細胞は α ： β （または α β ）T細胞と称されるが、少数のT細胞は可変ガンマ（ γ ）およびデルタ（ δ ）鎖によって形成される代替の受容体を発現し、 γ δ T細胞と称される。

【0003】

TCRはT細胞の表面に位置し、抗原受容体分子は、抗原提示細胞（APC）の表面の主要組織適合性複合体（MHC）分子によってT細胞に提示される適切にプロセスされた抗原の認識に関与するので、T細胞の活性化および抗原に対する免疫応答を潜在的にもた

【0004】

TCRの各鎖は、どちらも免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）ドメイン形成逆平行 β シートに属する、可変（V）領域および定常（C）領域の2つの細胞外ドメインから構成される。定常領域は細胞膜に近接し、膜貫通領域および短い細胞質尾部がそれに続く一方、可変領域は、抗原提示細胞のペプチド／MHC複合体に結合する。

【0005】

TCR α 鎖および β 鎖の双方の可変ドメインは、抗原結合部位を形成する3つの超可変または相補性決定領域（CDR）をそれぞれ有する。 β 鎖の可変領域は、いわゆる超可変性（HV4）のさらなる領域を有し、それは通常、抗原と接触せず、したがってCDRとは見なされない。重要なことには、双方の鎖のCDR1および2が生殖系列コードされる一方で、CDR3 α および β は大部分がテンプレートコード化されておらず、体細胞組換えによって産生される（Davis & Bjorkman 1988）。ヒトでは、TCR分子の多様性は、47のV α および54のV β 配列からなるセットの α β 対合によって達成され、それらはCDR3の長さおよび配列の最終的な多様性を達成するために組み合わせられる。

【0006】

CDR3は前記プロセスされた抗原の認識に関与する主要CDRであるが、 α 鎖のCDR1が、抗原性ペプチド（Cole et al. 2009）のN末端部分と相互作用することが示されているのに対し、 β 鎖のCDR1は、時折ペプチドC末端部分とのみ相互作用する。

【0007】

CDR2は、主にMHCを認識すると考えられてる。 β 鎖のHV4領域は抗原認識に関与するとは考えられていないが、いわゆる超抗原と相互作用することが示されている（Liet al. 1998）。CDR1およびCDR2が主にMHCに結合し、CDR3が抗原性ペプチドに結合するという一般的に認められているパラダイムにもかかわらず、いくつかの研究は、全てのCDR領域が時折、抗原およびMHCの双方と相互作用し得ることを示すことによって、TCRによる抗原認識の真の複雑さを明らかにした（Burrows et al. 2010、Roomp et al. 2011）。

【0008】

養子免疫伝達アプローチは、がん治療の機序を用いるために開発され（Rosenberg et al., 1988）、それによって腫瘍特異的T細胞受容体（TCR）のα鎖およびβ鎖をコードする遺伝子で形質導入されたT細胞が、患者において抗腫瘍免疫を媒介する。近年、このアプローチが注目を集めている。1つの戦略として、TCR遺伝子治療は、遺伝子組換えTCR鎖で遺伝子操作された自己由来T細胞を患者に提供する。この技術は、がんおよび腫瘍の治療のための有望なアプローチを提供する。そうするために、特異的抗原-MHC複合体を検出／結合するTCRα鎖およびβ鎖が、患者から採取された野生型T細胞にクローン化される。次に、遺伝子組換えT細胞が生体外で増殖され、例えば、腫瘍に対する免疫応答を提供するために、増殖した細胞が患者に戻される。

10

【0009】

実質的に、このようにして生成された導入遺伝子T細胞は、野生型α鎖およびβ鎖を有する野生型TCRと、それぞれの組換え抗原-MHC複合体に特異的なα鎖およびβ鎖を有する遺伝子組換えTCRの双方を発現する。野生型α鎖およびβ鎖ならびに遺伝子組換えα鎖およびβ鎖はどちらも、通常は、依然として互いに対合できる（Shao et al., 2010）。この望まれない可能性は「TCR誤対合」と称され、TCR（遺伝子）療法の分野において認識されている問題である。

【0010】

遺伝子組換えTCRα鎖またはβ鎖と内在性TCRβ鎖またはα鎖との間の誤対合および不正確な対合はそれぞれ、遺伝子組換えTCRαβヘテロ二量体の表面発現の低下をもたらし、それは次に修飾T細胞の機能的結合活性を低下させる。さらに、誤対合TCRを発現し高IL-2条件下で増殖したT細胞は、前臨床モデルにおいて、移植片対宿主病（GVHD）を誘発することが実証された（Bendle et al., 2009）。

20

【0011】

治療用T細胞の機能的結合活性を増強するために、遺伝子組換えTCRαおよびβ対合を最適化するためのいくつかの戦略が、例えば、Govers et al.（2010）などで論じられている。

【0012】

誤対合を回避するためのこれらの可能性には、次のものがある。

30

1. マウス化TCR：このアプローチでは、ヒトTCRαおよびβ定常鎖が、対応するマウスドメインによって置換される。ヒトおよびマウスのTCR-Cドメインは高度な相同性を示すが、わずかな相違が、TCR／CD3相互作用の安定性、したがってTCR表面発現レベルに影響を及ぼす。

2. システイン修飾TCR：このアプローチは、構造的に好ましい位置にシステインアミノ酸を導入し、それ故、さらなるジスルフィド架橋の形成を可能にして、2つのTCR鎖間の正しい対合を促進する。TCRα定常鎖におけるT48CおよびTCRβ定常鎖におけるS57Cなどの部位特異的変異は、2つの鎖間結合によって連結されたTCRヘテロ二量体をもたらした（すなわち導入されたジスルフィド架橋と内在性膜貫通ジスルフィド架橋（α定常ドメインの95位およびβ定常ドメインの131位）。

40

3. ドメイン交換：定常ドメインを腫瘍特異的T細胞受容体のα鎖とβ鎖との間で交換し、ドメイン交換（ds）TCRを作り出す。正しく対合した場合、これらのdsTCR鎖は、CD3タンパク質を動員してT細胞表面上で発現して標的抗原との係合時に機能的T細胞応答を媒介するのに必要である、全てのドメインを保持する。対照的に、1本のdsTCR鎖と1本の野生型TCR鎖を含有する誤対合TCRは、CD3の動員、搬出、およびシグナル伝達に必要な重要なドメインを欠いており、したがって有害な自己免疫を媒介できない。

4. 排他的TCRヘテロ二量体：このアプローチでは、立体力と静電気力を利用してTCRαおよびβ導入遺伝子間の正しい対合を容易にし、同時に、外在性および内在性のTCRα鎖およびβ鎖間のペアリングを阻害する。一例では、必要な静電荷の変化を得るため

50

に、部位特異的変異を用いて S 8 5 R が α 定常ドメインに、R 8 8 G が β 定常ドメインに導入され、したがって相互の「ノブ-イン-ホール」配置が生成し、これは二次および三次構造を最小限に歪めるとされる。

5. 各 T C R 鎖が C D 3 ζ 分子に融合している、キメラ T C R - C D 3 ζ 鎖の使用。

6. 規定の T C R の V α が、可撓性のペプチドリンカーを使用して β 鎖に融合している、一本鎖 T C R の使用。

7. 内在性 T C R の発現をノックダウンするための s h R N A 配列またはジンクフィンガーヌクレアーゼの使用。

【0013】

別のアプローチが O' Shea et al. (1993) によって提案され、彼らは「ベルクロ」と称される一対のペプチドを設計し、それらは、ヘテロ二量体状態における好ましい静電相互作用のために、互いに対合できた。著者らは、2つのペプチドが単離形態では主に折り畳まれていないが、混合されると優先的に会合し、安定な平行コイルドコイルヘテロ二量体を形成することを実証した。このアプローチはまた、Chang et al. (1994) によって可溶性 T C R を生成するために適用され、その中では、ペプチドをそれぞれ切断型 α 鎖および β 鎖に融合させることで、ヘテロ二量体複合体が支持された。

10

【0014】

国際公開第 2014/153470 A 2 号パンフレットは、ヌクレアーゼ（ジンクフィンガーヌクレアーゼまたは T A L ヌクレアーゼ）を使用して、標的指向性中断によって T C R 遺伝子を修飾する、T C R 遺伝子を修正するための方法および組成物を開示する。

20

【0015】

国際公開第 2014/083173 号パンフレットは、免疫療法、特に養子 T 細胞移入における有害事象のリスクを低減させる、新規 T 細胞受容体を製造する方法に関する。

【0016】

国際公開第 2016/071343 A 1 号パンフレットは、修飾 T 細胞受容体 (T C R) と、特に T リンパ球を移入するための養子細胞療法 (A C T) におけるそれらの使用とに関する。T C R は α 鎖および β 鎖の膜貫通領域において変異され、変異は正しい T C R 鎖対合に有利である。

30

【0017】

上記アプローチは有望ではあるが、外在性 T C R の適切な発現をはじめとするいくつかのハードルが、それらの臨床的影響を妨げている。不十分な臨床的奏効は、数多くの問題が未だに解決されていないことを示す。T 細胞機能的結合活性は、主に T C R 親和性および発現される T C R 分子数の双方によって決定されるので、(a) T C R 親和性の改善、および (b) T C R 発現の増強の 2 つの重要なアプローチを用いて、T C R 操作細胞におけるこれらの生物物理学的性質を改善するための多大な努力が払われている。T C R 親和性を改善するために、高親和性受容体を選択すること、または点変異によって転移受容体の親和性を高めることが試みられてきた。代案としては、形質導入細胞の表面上の T C R の数を増やすために、様々なアプローチが考案されている。これらとしては、発現ベクターの操作、コドン最適化 T C R 配列の使用、グリコシル化部位の排除、および導入された T C R 鎖の対合の改善が挙げられる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

したがって、T C R の誤対合を効果的に回避するためのアプローチを提供する必要性が依然としてある。

【課題を解決するための手段】

【0019】

これらのさらなるアプローチは、正しく対合した T C R ヘテロ二量体、すなわち遺伝子組換え α 鎖および β 鎖の対のそれぞれ修飾された T 細胞中の存在量を増加させる一方で、

50

導入が容易であるべきで、誤対合 T C R ヘテロ二量体の発生を効率的に低下させるべきである。また、T C R 鎖および宿主 T 細胞の最小限の操作を必要とする方法論が望ましいであろう。

【発明を実施するための形態】

【0020】

これらの目的およびさらなる目的は、本発明による方法および手段によって解決される。

【0021】

本発明の第1の態様によれば、抗原-MHC複合体に結合する能力を維持する、修飾 T 細胞受容体 (T C R) α 鎖もしくは β 鎖、またはその断片もしくは誘導体が提供され、その中では、前記修飾 α 鎖または β 鎖の可変ドメインにおいて、IMGT 番号付けによる 44 位の Q または任意のその他のアミノ酸が、その他の適切なアミノ酸で置換されている。以下にも示されるように、適切なアミノ酸は、修飾された T C R α 鎖および β 鎖の対合特異性を維持しながら、例えば、非修飾鎖などの望まれない α 鎖または β 鎖との対合を減少させる。

【0022】

44 位は F R 2 領域に位置するので、それは T C R 結合部位の標的と直接接触しないことが知られている。したがって、44 位における置換は、特定の標的エピトープ認識にとって決定的に重要でなく、および／またはそれを妨害しないと想定される。

【0023】

本発明によるアミノ酸は、生物において使用される 20 種の α -アミノ酸 (L-アミノ酸) から選択され得る。「適切な」アミノ酸は、これらのアミノ酸 (すなわち生物において使用される 20 種の α -アミノ酸および L-アミノ酸)、ならびに「珍しい」アミノ酸 (例えば s-アミノ酸、もしくは D-アミノ酸) または修飾アミノ酸の双方を含むものとする。生物において使用される 20 種の α -アミノ酸が好ましい。

【0024】

T C R α 鎖および β 鎖中のアミノ酸残基の番号付けは、L e f r a n c e t a l . (2001) で開示されるような IMGT 規格に従う。IMGT 規格は、T C R α および β 可変鎖をはじめとする免疫グロブリン分子中のアミノ酸残基に、明白な数を割り当てるための一般的な規則体系である。IMGT 番号付け (太字) と K a b a t 番号付けの比較については、図 1 A ~ C を参照されたい。図 1 B では、 α 鎖 (T R A V) および β 鎖 (T R B V) 中の Q 44 が、灰色で標識されている。IMGT 規格による番号付けは、図 1 A ~ C に見られるように、特に C D R 配列中の空白のために、T C R 可変ドメインの所与のアミノ酸配列の単純な番号付けから逸脱することがある。

【0025】

IMGT 番号付けによる Q 44 は、フレームワーク 2 (F R 2) 領域における高度に保存された残基であり、T R A V 2、T R A V 24、T R A V 29 / D V 5、および T R A V 40 を除くほぼ全ての T C R α 鎖によって共有され、T R B V 14 Q 44 を除く全ての T C R β 遺伝子によって共有される (L e f r a n c e t a l . , 2001、S t r o n g e t a l . , 1999)。さらに、Q 44 は W Y X Q を含んでなる 4 A A モチーフの一部であることが非常に多く、X は例えば、R、V、K または Q である (L e f r a n c e t a l . , 2001)。

【0026】

K n i e s e t a l . (2016) は、バルク内在性 T C R α / β -陽性 T 細胞のための安全な養子免疫療法を達成するために、最適化された一本鎖 T C R (s c T C R) が残りの T C R 誤対合を阻害することを記述する。3 ドメイン s c T C R において、V α ドメインと、V β に近接したリンカーの 3'-尾部との間に設計された新規人工ジスルフィド結合によって、残りの誤対合の防止が達成された。

【0027】

H o f f m a n n e t a l . (2015) は、V α / V β 相対角度および可撓性に

10

20

30

40

50

焦点を合わせた、結合および非結合TCR分子の構造特性の系統的バイオインフォマティクス解析を記述する。いくつかの異なる $V\alpha/V\beta$ 角度に基づく構造クラスターが観察され得て、結合TCRよりも非結合TCRに対してより大きい角度柔軟性が存在することから、彼らの結果は、シグナル伝達に対するこの角度の重要性を実証した。特有の回転中心が同定され、この点周辺のコア領域は、 $V\alpha$ ドメインと $V\beta$ ドメインとの間の中心に位置し、 $V\alpha$ および $V\beta$ 双方の44位に非常に近い。

【0028】

本発明の文脈における置換は、例えば、コードDNAもしくはcDNAの部位特異的変異誘発もしくはランダム変異誘発、またはCRISPR Cas、TALEN、ZFN、アルゴノート(NgAgg)またはCRISPR Cpf1のようなゲノム編集技術のような、タンパク質変異誘発の標準法を用いて生成され得る。さらに、このような置換は、コード遺伝子、cDNAまたはmRNAを単に合成することによって行われ得る。現今では、サービス提供会社が、所与の配列の核酸の合成を提供している。

10

【0029】

部位特異的アミノ酸置換をもたらす、ランダム変異誘発または部位特異的変異誘発の方法は当業者に周知であり、例えば、Labrou et al. (2010) および Trehan et al. (2016) で開示されている。

【0030】

所与のアミノ酸配列を修飾するためのゲノム編集の方法(例えば、CRISPR Cas、TALEN、ZFN、アルゴノート(NgAgg)またはCRISPR Cpf1)は当業者に周知であり、例えば、Maeder & Gersbach (2016) で開示されている。遺伝子の合成法は当業者に周知であり、例えば、Hughes et al. (2011) で開示されている。これらの参考文献の開示は、その全体が参照により本明細書に援用されると見なされるものとする。

20

【0031】

上で考察されるように、いくつかの先行技術の方法は、マウス定常鎖を導入することによる、TCR α 鎖および/または β 鎖の修飾を示唆している。このアプローチは、非ヒト配列に起因する免疫原性増大のリスクを有し、これは本発明の方法および生成物によって回避される。

【0032】

さらに、本発明者らは、44位の置換が、標的ペプチドへの結合(すなわち標的抗原/MHC複合体への親和性)に中程度の影響を及ぼし得ることを示し、それは、 α および β 可変ドメインの三次構造において、Q44が、CDRによって形成される領域から最大限離れているという事実に起因するようである。

30

【0033】

一実施形態によれば、同定および/または単離されたそれぞれの未修飾受容体と比較して、修飾 α 鎖および β 鎖は、それらの定常ドメインおよび/またはそれらの膜貫通ドメイン中にいかなる置換も有しない。定常ドメインは、TCR α 鎖と β 鎖との間の大きくかつ高度に保存された境界面を含むことから、可変ドメインにおける位置の置換と比較して、対合挙動、安定性、および免疫原性に関して、わずかな修飾でさえも影響を回避することは困難である。

40

【0034】

一実施形態によれば、44位の置換を有する α 鎖は、可変ドメイン中の44位が適切なアミノ酸で置換されているT細胞受容体(TCR) β 鎖と対合することが好ましい。同様に、別の実施形態では、44位の置換を有する β 鎖は、44位が適切なアミノ酸によって置換されている可変ドメイン中のT細胞受容体(TCR) α 鎖と対合することが好ましい。

【0035】

それ故、特許請求された置換を有する第2の異種または遺伝子組換えTCRを発現するように修飾されたT細胞において、遺伝子組換え α 鎖と内在性 β 鎖との間の誤対合、また

50

はその逆は減少または回避さえされる。

【0036】

このようにして、正しく対合した遺伝子組換えTCR α/β ヘテロ二量体の存在量の増加が達成され得て、それは修飾T細胞の全体的な結合活性を改善し、移植片対宿主病の誘発のような有害反応を回避する(Bendle et al., 2009)。

【0037】

前記組換えT細胞受容体(TCR)ヘテロ二量体の一実施形態によれば、少なくとも α 鎖または β 鎖において、可変ドメインの44位に存在するアミノ酸は、Q、R、D、E、K、L、W、およびVからなる群から選択される1つのアミノ酸で置換されている。

【0038】

さらなる一実施形態によれば、 α 鎖は、配列番号1または3と少なくとも95%の配列同一性を共有する(有する)配列のフレームワーク領域を含んでなる可変ドメイン配列を少なくとも有し、その中ではその可変ドメイン中の44位に存在するQまたは任意のその他のアミノ酸が、本明細書で開示されるような別の適切なアミノ酸によって置換されており、または β 鎖は、配列番号2または4と少なくとも95%の配列同一性を共有する(有する)配列のフレームワーク領域を含んでなる可変ドメイン配列を有し、その中では可変ドメイン中の44位に存在するQまたは任意のその他のアミノ酸が、本明細書で開示されるような別の適切なアミノ酸によって置換されている。

【0039】

好ましくは、前記 α もしくは β 鎖は、それぞれ、配列番号1もしくは3、または配列番号2もしくは4と、少なくとも96%、より好ましくは97%、なおもより好ましくは少なくとも98%、なおもより好ましくは少なくとも99%、または最も好ましくは100%の配列同一性を共有する(有する)配列のフレームワーク領域を少なくとも含んでなる、可変ドメイン配列を有する。

【0040】

配列番号1は、TCR R7P1D5 (TRAV5としても知られている、Lefranc et al., 2001)のTCR α 鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。配列番号2は、R7P1D5 (TRBV12-4としても知られている、Lefranc et al., 2001)のTCR β 鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。R7P1D5は、その内容が参照により本明細書に援用される、米国仮特許出願第62/308,944号明細書で開示される。R7P1D5は、MHCに結合すると、例えば、抗原提示細胞の「MAG-003」と称されるペプチドに結合する。MAG-003は、以下の一般式Iによるアミノ酸配列を含んでなる：

$X_1X_2LEHVVXR_3$

式中、 X_1 はアミノ酸KおよびYから選択され、 X_2 はアミノ酸V、L、およびAから選択され、 X_3 はV、L、A、およびIから選択される。

【0041】

配列番号3は、TCR α 鎖可変ドメインTRAV8-6のアミノ酸配列を示す(Lefranc et al., 2001)。配列番号4は、TCR β 鎖可変ドメインTRBV6-5のアミノ酸配列を示す(Lefranc et al., 2001)。

【0042】

図1および3では、配列はIMGT番号付けで示されており、これは配列表中のそれぞれの配列の単純な番号付けから逸脱することに留意されたい。図3中の波状の下線は、アミノ酸残基によって占有されていないが、IMGT番号付けにおいて考慮される空白を示す。Q44は、添付の配列表から導き出されるような番号付けではなく、図1および3に示されるようなIMGT番号付けを指すものと理解される。

【0043】

α 鎖および β 鎖を有するR7P1D5 (TRAV5およびTRBV12-4)、ならびにTRAV8-6およびTRBV6-5は、本発明の文脈において使用され得るTCR可変ドメインの単なる4つの例である。その他のTRAVおよびTRBVサブグループは、

10

20

30

40

50

I G M T ウェブサイトで開示されている。T R A V および T R B V は、特に C D R 配列の適切な適応によって、異なる標的エピトープ／M H C 複合体に対する特異性を取り入れ得ることに留意されたい。

【 0 0 4 4 】

上記の配列はシグナル配列なしで示されており、時には配列データベースは、わずかに逸脱した配列を示すことにも留意されたい。例えば、U n i p r o t データベースでは、T R A V 8 - 6 が配列番号 3 ならびに図 1 に示される N 末端 A を欠く一方で、T R B V 6 - 5 は配列番号 4 ならびに図 1 に示される N 末端 N および A を欠く。

【 0 0 4 5 】

本発明の組換え T 細胞受容体 (T C R) ヘテロ二量体の別の実施形態によれば、T C R は、以下のリストから選択される好ましい置換対の 1 つを含む。

α Q 4 4 D / β Q 4 4 R ; α Q 4 4 R / β Q 4 4 D ; α Q 4 4 E / β Q 4 4 K ; α Q 4 4 K / β Q 4 4 E ; α Q 4 4 D / β Q 4 4 K ; α Q 4 4 K / β Q 4 4 D ; α Q 4 4 E / β Q 4 4 R ; α Q 4 4 R / β Q 4 4 E ; α Q 4 4 L / β Q 4 4 W ; α Q 4 4 W / β Q 4 4 L ; α Q 4 4 V / β Q 4 4 W ; および α Q 4 4 W / β Q 4 4 V ;
 α W 4 4 D / β Q 4 4 R ; α W 4 4 R / β Q 4 4 D ; α W 4 4 E / β Q 4 4 K ; α W 4 4 K / β Q 4 4 E ; α W 4 4 D / β Q 4 4 K ; α W 4 4 K / β Q 4 4 D ; α W 4 4 E / β Q 4 4 R ; α W 4 4 R / β Q 4 4 E ; α W 4 4 L / β Q 4 4 W ; α W 4 4 / β Q 4 4 L ; α W 4 4 V / β Q 4 4 W ; および α W 4 4 / β Q 4 4 V ;
 α H 4 4 D / β Q 4 4 R ; α H 4 4 R / β Q 4 4 D ; α H 4 4 E / β Q 4 4 K ; α H 4 4 K / β Q 4 4 E ; α H 4 4 D / β Q 4 4 K ; α H 4 4 K / β Q 4 4 D ; α H 4 4 E / β Q 4 4 R ; α H 4 4 R / β Q 4 4 E ; α H 4 4 L / β Q 4 4 W ; α H 4 4 W / β Q 4 4 L ; α H 4 4 V / β Q 4 4 W ; および α H 4 4 W / β Q 4 4 V ;
 α K 4 4 D / β Q 4 4 R ; α K 4 4 R / β Q 4 4 D ; α K 4 4 E / β Q 4 4 K ; α K 4 4 K / β Q 4 4 E ; α K 4 4 D / β Q 4 4 K ; α K 4 4 / β Q 4 4 D ; α K 4 4 E / β Q 4 4 R ; α K 4 4 R / β Q 4 4 E ; α K 4 4 L / β Q 4 4 W ; α K 4 4 W / β Q 4 4 L ; α K 4 4 V / β Q 4 4 W ; および α K 4 4 W / β Q 4 4 V ;
 α E 4 4 D / β Q 4 4 R ; α E 4 4 R / β Q 4 4 D ; α E 4 4 / β Q 4 4 K ; α E 4 4 K / β Q 4 4 E ; α E 4 4 D / β Q 4 4 K ; α E 4 4 K / β Q 4 4 D ; α E 4 4 / β Q 4 4 R ; α E 4 4 R / β Q 4 4 E ; α E 4 4 L / β Q 4 4 W ; α E 4 4 W / β Q 4 4 L ; α E 4 4 V / β Q 4 4 W ; および α E 4 4 W / β Q 4 4 V ;
 α Q 4 4 D / β R 4 4 ; α Q 4 4 R / β R 4 4 D ; α Q 4 4 E / β R 4 4 K ; α Q 4 4 K / β R 4 4 E ; α Q 4 4 D / β R 4 4 K ; α Q 4 4 K / β R 4 4 D ; α Q 4 4 E / β R 4 4 ; α Q 4 4 R / β R 4 4 E ; α Q 4 4 L / β R 4 4 W ; α Q 4 4 W / β R 4 4 L ; α Q 4 4 V / β R 4 4 W ; および α Q 4 4 W / β R 4 4 V ;
 α W 4 4 D / β R 4 4 ; α W 4 4 R / β R 4 4 D ; α W 4 4 E / β R 4 4 K ; α W 4 4 K / β R 4 4 E ; α W 4 4 D / β R 4 4 K ; α W 4 4 K / β R 4 4 D ; α W 4 4 E / β R 4 4 ; α W 4 4 R / β R 4 4 E ; α W 4 4 L / β R 4 4 W ; α W 4 4 / β R 4 4 L ; α W 4 4 V / β R 4 4 W ; および α W 4 4 / β R 4 4 V ;
 α H 4 4 D / β R 4 4 ; α H 4 4 R / β R 4 4 D ; α H 4 4 E / β R 4 4 K ; α H 4 4 K / β R 4 4 E ; α H 4 4 D / β R 4 4 K ; α H 4 4 K / β R 4 4 D ; α H 4 4 E / β R 4 4 ; α H 4 4 R / β R 4 4 E ; α H 4 4 L / β R 4 4 W ; α H 4 4 W / β R 4 4 L ; α H 4 4 V / β R 4 4 W ; および α H 4 4 W / β R 4 4 V ;
 α K 4 4 D / β R 4 4 ; α K 4 4 R / β R 4 4 D ; α K 4 4 E / β R 4 4 K ; α K 4 4 K / β R 4 4 E ; α K 4 4 D / β R 4 4 K ; α K 4 4 / β R 4 4 D ; α K 4 4 E / β R 4 4 ; α K 4 4 R / β R 4 4 E ; α K 4 4 L / β R 4 4 W ; α K 4 4 W / β R 4 4 L ; α K 4 4 V / β R 4 4 W ; および α K 4 4 W / β R 4 4 V ;
 α E 4 4 D / β R 4 4 ; α E 4 4 R / β R 4 4 D ; α E 4 4 / β R 4 4 K ; α E 4 4 K / β R 4 4 E ; α E 4 4 D / β R 4 4 K ; α E 4 4 K / β R 4 4 D ; α E 4 4 R / β R 4 4 E ; α E 4 4 L / β R 4 4 W ; α E 4 4 W / β R 4 4 L ; α E 4 4 V / β R 4 4 W ; およ

10

20

30

40

50

び α E 4 4 W / β R 4 4 V。

【0046】

上記において、例えば、「 α Q 4 4 R / β Q 4 4 D」は、例えば、 α 鎖の可変ドメインで Q 4 4 が R によって置換されている一方で、 β 鎖の可変ドメインでは Q 4 4 が D によって置換されていることを意味するものとする。

【0047】

前記組換え T 細胞受容体 (TCR) ヘテロ二量体の好ましい実施形態によって、

- a) 修飾 α 鎖は、可変ドメインの 4 4 位に Q または任意のその他の適切なアミノ酸を有する非修飾 β 鎖と比較して、好ましくは修飾 β 鎖と対合し、および / または
- b) 修飾 β 鎖は、可変ドメイン中の 4 4 位に Q または任意のその他の適切なアミノ酸を有する非修飾 α 鎖と比較して、好ましくは修飾 α 鎖と対合する。

【0048】

本発明の別の態様によると、上記の説明による修飾 T 細胞受容体 (TCR) α または β 鎖をコードする核酸分子、および / または上記の説明による組換え T 細胞受容体 (TCR) ヘテロ二量体が提供される。一実施形態では、核酸分子は、

前記 1 つまたは複数のコード核酸分子に作動可能に連結されるプロモーター、および / または

前記 1 つまたは複数のコード核酸分子に作動可能に連結されるシグナル配列

の少なくとも 1 つをさらに含んでなる。

【0049】

シグナル配列は、 α 鎖または β 鎖を T 細胞の細胞表面に誘導するシグナルペプチドをコードし、T 細胞中では、それはその膜貫通ドメインによって固定され、 α 鎖および β 鎖は細胞外表面に提示される。異なる α 鎖および β 鎖の可変ドメインサブタイプのシグナル配列が、当該技術分野で開示されている。

【0050】

本発明の別の態様によると、上に記載される核酸分子の 1 つを少なくとも含んでなるプラスミドまたはベクターが提供される。

【0051】

一実施形態では、前記ベクターは、好ましくはウイルスベクター、好ましくは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である。ウイルスベクターを用いて α または β T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を T 細胞に形質導入する方法は、例えば、P o g u l i s and P e a s e (1998)、または Z o n g et al. (2010) で開示されている。ヒト T 細胞への遺伝子移入のためのレンチウイルスベクターの使用が、V e r h o e y e n et al. (2009) で開示されている。

【0052】

その他の一実施形態では、前記ベクターはピギーバック (p i g g y b a c k) または眠れる森の美女 (s l e e p i n g b e a u t y) のようなトランスポゾンを含んでなり、それは次にそれぞれの核酸を T 細胞に輸送できる。T 細胞を遺伝的に操作するためにトランスポゾンを使用する方法は、例えば、H u a n g et al. (2008) で開示されている。

【0053】

別の実施形態では、T 細胞は、例えば、エレクトロポレーションによって、例えば、 α 鎖および β 鎖をコードする 1 つ以上の RNA を導入することによって、一過性に形質移入され得る。このような方法は、例えば、K i m and E b e r w i n e (2010) で開示されている。

【0054】

本発明の別の態様によると、修飾 T 細胞を調製する方法が提供され、前記方法は、対象から T 細胞を得るステップと、

前記 T 細胞を本発明による 1 つまたは複数の核酸分子で、または本発明によるプラスミドもしくはベクターで、形質導入または形質移入するステップと

10

20

30

40

50

を含んでなる。

【0055】

好ましい態様では、前記T細胞は、HLA対立遺伝子陰性ドナーから得られた。例えば、修飾T細胞が、HLA-A*02血清型APCによって提示される抗原を検出することが意図される場合、修飾されることが意図される起源は、好ましくはHLA-A*02血清型陰性ドナーから得られる。このようにして、内在性TCRと標的抗原/MHC複合体との交差反応性は減少するか、または回避すらされる。

【0056】

好ましくは、このようにして得られた修飾T細胞は、前記対象の自己T細胞療法に適している。

【0057】

本発明の別の態様によると、上記の説明による組換えT細胞受容体(TCR)ヘテロ二量体のα鎖およびβ鎖をコードする核酸のセットを保有する、修飾T細胞が提供される。

【0058】

一実施形態では、前記細胞は、上記の説明による方法によって調製された。

【0059】

本発明の別の態様によると、新生物疾患、炎症性疾患、感染性疾患または自己免疫疾患に罹患している、発症するリスクがある、および／またはそれらであると診断された患者を治療するための上記の説明の修飾T細胞の使用が提供され、その使用は、それを必要とする患者に前記修飾T細胞を含んでなる調製物を提供または投与することを含んでなる。

【0060】

代案としては、上記の説明による修飾T細胞を用いて、新生物疾患、炎症性疾患、感染性疾患または自己免疫疾患に罹患している、発症するリスクがある、および／またはそれらであると診断された患者を治療する方法が提供され、その方法は、前記修飾T細胞を含んでなる調製物をそれを必要とする患者に提供または投与することを含んでなる。

【0061】

この文脈では、抗原提示細胞のMHCによって提示された抗原を検出するために、それぞれの修飾TCR、またはそれぞれの修飾T細胞の特異性が、α鎖およびβ鎖の可変ドメイン中のCDR配列に依存することを理解することが重要である。

【0062】

Lo set et al. (2014)に記載されるように、特異的抗原-MHC複合体のT細胞受容体は、T細胞関連ファージディスプレイによって得られ得る。このようなアプローチでは、α鎖およびβ鎖の可変ドメインにおけるQ44置換は、ファージディスプレイの基礎を形成するライブラリーの全構成員において達成され得るか、またはその後、すなわちひとたび特異的抗原-MHC複合体を検出する特有のTCRが見いだされたら、導入され得る。

【0063】

本発明のさらなる態様によると、上記の説明による、使用、方法、T細胞またはT細胞受容体(TCR)ヘテロ二量体が提供され、T細胞受容体によって検出されたMHC複合体によって提示される抗原は、がん特異的腫瘍関連抗原(TAA)ペプチドエピトープから選択される。これらのペプチドは当該技術分野で公知であり、一例として、実施例で使用されたペプチドMAG-003を含んでなる。これらのペプチドは、例えば、エピトープデータベース(<http://www.iedb.org/>)など、または好ましくは、国際公開第2016/177784号パンフレット；国際公開第2016/170139号パンフレット；国際公開第2016/156230号パンフレット；国際公開第2016/156202号パンフレット；国際公開第2016/146751号パンフレット；国際公開第2016/102272号パンフレット；国際公開第2016/107740号パンフレット；国際公開第2015/193359号パンフレット；国際公開第2015/169945号パンフレット；国際公開第2015/063302号パンフレット；国際公開第2015/018805号パンフレット；国際公開第2012/06946

10

20

30

40

50

2号パンフレット；国際公開第2012/079878号パンフレット；国際公開第2012/038463号パンフレット；国際公開第2011/151403号パンフレット；国際公開第2011/128448号パンフレット；国際公開第2011/113882号パンフレット；国際公開第2011/113872号パンフレット；国際公開第2011/113819号パンフレット；国際公開第2011/073215号パンフレット；国際公開第2010/037514号パンフレット；国際公開第2009/138236号パンフレット；国際公開第2007/028574号パンフレット；国際公開第2007/028573号パンフレット；国際公開第2006/114307号パンフレット；国際公開第2005/116051号パンフレット；国際公開第2005/076009号パンフレット；国際公開第2004/085461号パンフレット；国際公開第03/100432号パンフレット；国際公開第03/102023号パンフレット；国際公開第2009/015843号パンフレット；国際公開第2009/015842号パンフレット；国際公開第2009/015841号パンフレット；国際公開第2016/202963号パンフレット；国際公開第2016/207164号パンフレット；国際公開第2017/001491号パンフレット；国際公開第2017/005733号パンフレット；国際公開第2017/021527号パンフレット；国際公開第2017/036936号パンフレット；国際公開第2017/060169号パンフレット；国際公開第2017/060201号パンフレット；国際公開第2017/097602号パンフレット；国際公開第2017/097699号パンフレット；国際公開第2017/108345；または国際公開第2017/009400号パンフレットのいずれかで開示されるような文献に見いだされ得る（開示されるペプチドに関して、全て参照により本明細書に援用される）。

10

20

【0064】

本発明を図面および前述の説明において詳細に図示および説明してきたが、このような図示および説明は例示的または例証的であり、限定的ではないと見なされるべきであり；本発明は、開示される実施形態に限定されない。開示された実施形態に対するその他のバリエーションは、特許請求される発明を実施する際に、および／または図面、開示、および添付の特許請求の範囲の検討から、当業者によって理解され達成され得る。

【0065】

記載された装置もしくは組成物の特定の構成部分もしくは構造的特徴、または記載された方法の工程段階は変動することもあるので、本発明はこのような装置および方法に限定されないことが、さらに理解されるものとする。本明細書で使用する用語法は、特定の実施形態のみを記述することを目的としており、制限は意図されないこともまた理解されるものとする。特定の手段が、相互に異なる従属請求項に列挙されているという単なる事実は、これらの手段の組み合わせが有利に使用され得ないことを示すものではない。請求項中のいかなる参照符号も、範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。本明細書および添付の特許請求範囲の用法では、文脈上例外が明記されていない限り、単数形「a」、「an」、および「the」は、複数指示対象を含むことに留意すべきである。さらに、特許請求の範囲において、「含んでなる」という単語は、その他の要素またはステップを排除しない。特定の手段が、相互に異なる従属請求項に列挙されているという単なる事実は、これらの手段の組み合わせが有利に使用され得ないことを示すものではない。数値で区切られたパラメータ範囲が与えられている場合、その範囲は、これらの限界値を含むと見なされると、さらに理解されるものとする。

30

40

【0066】

本明細書で開示される実施形態は、互いに関係しない個々の実施形態として理解されることは意図されないと、さらに理解されるものとする。一実施形態で論じられた特徴は、本明細書で示されたその他の実施形態に関連してもまた、開示されることが意図される。ある場合、特定の特徴が一実施形態では開示されないが、別の実施形態で開示される場合、当業者は、それが必ずしも、前記特徴が前記他の実施形態と共に開示されることを意図しないわけではないことを理解するであろう。当業者は、他の実施形態についてもまた前

50

記特徴を開示することが本出願の要旨であるが、単に明確さの目的のためにそして明細書を扱いやすい量に保つために、それが行われていないことを理解するであろう。

【0067】

本明細書で開示される全てのアミノ酸配列は、N末端からC末端方向で示されており；本明細書で開示される全ての核酸配列は、5'→3'方向で示されている。本発明の目的で、本明細書で引用される全ての参考文献は、その内容全体が参照により援用される。これは、特に、標準的なまたは日常的な方法を開示する、先行技術の文書について言及している。その場合、参照による援用は、開示を実施可能にするのに十分なものを提供し、長い繰り返しを避けることを主な目的とする。

【図面の簡単な説明】

【0068】

図面および添付の配列表において、

【図1A】TCRα鎖およびβ鎖の可変ドメインのアミノ酸残基の番号付けを示す。図は、LeFranc et al. (2003) から採用され修正されている。配列は、TRAV8-6 (遺伝子ID: 28680) (α鎖) およびTRBV6-5 (遺伝子ID: 28602) (β鎖) の例に示される。α鎖およびβ鎖中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabatt番号付けと比較して、IMGT標準 (太字) に従う。

【図1B】α鎖 (TRAV) およびβ鎖 (TRBV) 中のQ44が、灰色のアンダークロスで標識される。IMGT番号付けによるQ44は、フレームワーク2 (FR2) 領域内の高度に保存された残基であり、1G4 (pdb ID: 2BNR (Chen et al., 2005)) ; TRAV8-6 (遺伝子ID: 28680) (α鎖) およびTRBV6-5 (遺伝子ID: 28602)、(β鎖) およびR7P1D5 (TRAV5およびTRBV12-4を含んでなる、LeFranc et al., 2001) をはじめとする、全TCR遺伝子の約80%によって共有される (Strong et al., 1999)。Q44は、WYXQを含んでなる4つのAAモチーフの一部であることが非常に多く、Xは、例えば、R、VまたはKなどの任意のアミノ酸である。W41は、TCRαおよびβ鎖中でさらに高度に保存されている (>95%) (Strong et al., 1999)。

【図1C】同上

【図2】A: TCR 1G4 (pdb ID: 2BNR (Chen et al., 2005)) の可変ドメインからのαQ44/βQ44の構造的モチーフを示す。B: 1G4 TCRの結晶構造に基づく、コンピュータシミュレーションによる二重変異体を示す。本発明者らは、立体的および/または電荷の対称性を破る一方で、野生型αQ44/βQ44対から、高レベルの分子接触 (極性または無極性) を維持する可能な対を手動で選択して操作した。変異体は、UCSFキメラを用いて作製された (Petterson et al., 2004)。図面全体にわたり、TCRのα鎖およびβ鎖が、それぞれ暗青色およびシアンのリボンで表される。関心のある側鎖はマゼンタで強調表示され、全ての重原子が示される。

【図3】MHCに結合した場合、MAG-003と称されるペプチドを検出する、TCR変異型R7P1D5αおよびβ鎖 (TRAV5およびTRBV12-4) ; TRAV8-6 (α鎖可変ドメイン) ; およびTRBV6-5 (β鎖可変ドメイン) の配列を示す。灰色のアンダークロスは、フレームワーク領域FR1、FR2、およびFR3と共に、CDR1、CDR2、およびCDR3のおよその位置を標識する。見られるように、Q44はFR2に位置する。TR4V6-6およびTRBV6-5と同様に、Q44は、その他のTCR変異体においても保存されていることに留意されたい。後者と同様に、Q44は、WYXQを含んでなる4つのAAモチーフのR7P1D5部分にある。標的化されるそれぞれの抗原次第で、CDR配列はもちろん変化し得る。

【図4A】選択されたコンピュータシミュレーションによる操作された変異体について、計算された変異エネルギーを示す。その結果生じるTRAV/TRBV界面における形状および/または電荷相補性について、二重変異が選択される。荷電アミノ酸 (D、E、K

10

20

30

40

50

、R)の選択を示す。

【図4B】中性アミノ酸(W、V、L)の選択を示す。提案された各対の相補的変異について、本発明者らは、二重変異体(緑色)ならびに個々の単一変異体(オレンジ色)を試験し、操作された鎖と野生型鎖との対合を模倣した。 0.5 kcal/mol より高い変異エネルギーは不安定化させると考えられ、 -0.5 kcal/mol より低い変異エネルギーは安定化させると考えられ、 $-0.5 \sim 0.5 \text{ kcal/mol}$ の間の変異エネルギーは中性であると考えられる(赤い線の間—ソフトウェアデフォルトパラメータ)。変異は、Discovery Studio (Dassault Systemes, BIOVIA, 2017)およびSpassov and Yan (2013)によって記載された変異エネルギーアルゴリズムを用いて、1G4 TCRの可変ドメイン(Chen et al., 2005)に対して行われた。

10

【図5】TCR R7P1D5の野生型および変異体の α 鎖および β 鎖RNAで電気穿孔されたCD8+T細胞のMAG-003(例示的ペプチド):HLA-A*02四量体またはNYESO1-001(対照ペプチド):HLA-A*02四量体染色をそれぞれ示す。R7P1D5は、MHCと結合するとMAG-003ペプチドを検出するが、NYESO1ペプチドは検出しない。模擬電気穿孔CD8+T細胞(TCRなし)が、対照の役割を果たした。ドナー(左側パネル:ドナーA、右側パネル:ドナーB)。

【図6】TCR R7P1D5の野生型および変異体の α 鎖および β 鎖RNAで電気穿孔されたCD8+T細胞の文脈における、HLA-A*02の例示的ペプチドとしてのMAG-003によるIFN放出を示す。全ての変異体(α Q44R/ β Q44D、 α Q44E/ β Q44K、 α Q44K/ β Q44E、 α Q44D/ β Q44K、 α Q44K/ β Q44D、 α Q44E/ β Q44R)は未修飾R7P1D5野生型と比較した場合に、改善されたMAG-003認識を示す。

20

【図7】PRAME-004特異的TCR R11AおよびR17Aならびにそれらの対応する α 44K/ β 44E変異体は、それぞれレンチウイルス移入を通じてヒトT細胞に形質導入された。TCR形質導入T細胞の活性は、漸減濃度のPRAME-004ペプチドが負荷されたT2細胞との同時インキュベーションによって評価された。変異体TCR R11KEAは、未修飾R11 TCRと比較した場合に、大幅に改善されたPRAME-004認識を示す。

【図8】PRAME-004特異的TCR R17AおよびR11Aならびにその対応する44K/44E変異体(R11KEA)は、レンチウイルス移入を通じて2人のドナーのヒトT細胞に形質導入された。PRAME-004を発現する腫瘍細胞株A375およびU2OSに対する形質導入T細胞の細胞傷害性は、Incucyteイメージングシステムを通じて評価された。MAG-003特異的TCRが、対照として使用された(A375およびU2OSは、MAG-003もまた発現する)。未修飾R11A TCRと比較した場合、変異体TCR R11KEAは、PRAME-004陽性細胞株の殺傷率の増加を示す。

30

【実施例】

【0069】

IMGT規格による番号付けは、図1A~Cに見られるように、特にCDR配列中の空白のために、TCR可変ドメインの所与のアミノ酸配列の単純な番号付けから逸脱することがあることに留意されたい。これは、例えば、TRAV8-6およびTRBV6-5に適用され、波状の下線は、アミノ酸残基によって占有されていないが、IMGT番号付けにおいて考慮される空白を示す。これらの配列は例としてのみ提供され、好ましくあるものの、特許請求を特定の実施態様に限定しないものとする。これは、本発明の教示が、特に可変ドメインに、特にCDRにその他の配列を有する、その他のTCR α 鎖および β 鎖、またはTCR $\alpha\beta$ ヘテロ二量体に適用可能であることを意味する。

40

【0070】

さらに、本発明の教示は、好ましくは、しかしそれだけではないが、天然のQ44アミノ酸を含んでなる場合、好ましくはそれらがWYXQモチーフを含んでなる場合に、その

50

他の標的抗原／MHC複合体に結合するその他のTCR α 鎖および β 鎖またはTCR $\alpha\beta$ ヘテロ二量体にも適用できる。標的化されるそれぞれの抗原次第で、CDR配列は変化してもよい。

【0071】

一般に、T細胞受容体のクローニングおよび発現方法は、Walchli et al. (2011)で開示される。部位特異的アミノ酸置換をもたらすランダム変異誘発または部位特異的変異誘発の方法は、当業者に周知であり、例えば、Labrou (2010)およびTrehan et al. (2016)で開示されている。

【0072】

所与のアミノ酸配列を修飾するためのゲノム編集の方法（例えば、CRISPR Cas、TALEN、ZFN、アルゴノート（Ng Ago）またはCRISPR Cpf1）は当業者に周知であり、例えば、Maeder and Gersbach (2016)で開示されている。遺伝子の合成法は当業者に周知であり、例えば、Hughes et al. (2011)で開示されている。これらの参考文献の開示は、それらの全体が参照により援用される。

【0073】

コンピュータシミュレーションによる方法

1G4 TCRの可変ドメイン（pdb ID: 2BNR (Chen et al., 2005)）を目視検査することによって、本発明者らは、立体的および／または電荷の対称性を破る一方で、潜在的に高レベルの分子接触（極性または無極性）を維持するであろう変異の対を $\alpha 44/\beta 44$ モチーフについて手動で選択した。変異対は、(i) 対の総電荷がゼロであり、(ii) 2つのアミノ酸が、潜在的に良好な形状相補性を示しおよび／または水素結合および／または塩橋を形成し、(iii) 2つのアミノ酸が異なる分子量を有する（すなわち1つの大型アミノ酸と1つの小型アミノ酸）ように選択した。Discovery Studioソフトウェア（Dassault Systemes, BIOVIA, 2017）を用いて、操作された位置がTCRの $\alpha\beta$ 対合に及ぼす影響をさらに調べた。Spassov et al. (Spassov and Yan, 2013)によって記載されたアルゴリズムを用いて変異エネルギーを計算し、抗体のコンピュータシミュレーションによる設計を行った。変異エネルギーは、野生型モチーフ $\alpha Q44/\beta Q44$ との比較で、変異の効果を反映すると予測された。本発明者らは、二重変異体ならびに野生型鎖と対合した各単一変異体を試験し、

- 二重変異体の場合、変異エネルギーは中立でありまたは安定化することが予測され、
- 野生型鎖と対合する単一変異体の場合、変異エネルギーは2つの側面の少なくとも1つで不安定化することが予測された。

【0074】

ヒト初代CD8⁺T細胞を、RNAなし（TCRなし）で、またはその野生型（R7P1D5 TCR wt）の、またはTCR α 可変ドメインにQ44D変異を組み込みTCR β 可変ドメインにQ44R変異を組み込む変異型（R7P1D5 TCR α Q44D/ β Q44R）の、ペプチド特異的（例えばMAG-00、例えばWu et al. Scandianavian journal of immunology 74:6 2011 Dec pages 561-7で開示されるペプチド「p286」）T細胞受容体鎖 α および β をコードする同量のRNAと共に、電気穿孔した。一晚培養した後、T細胞をMAG-003:HLA-A*02四量体の結合（図5、上列）および無関係のペプチドNYESO1-001:HLA-A*02対照四量体の結合（図5、下列）（上記のようなエピトープデータベース中のペプチドNYESO-001；エピトープID59283）について分析した。四量体陽性T細胞の比率は、2人の個々のドナーについて示される（図5左側パネル：ドナーA、右側パネル：ドナーB）。

【0075】

腫瘍特異的TCR- α 鎖およびTCR- β 鎖をコードするTCR R7P1D5を、健常ドナーのT細胞から単離し増幅した。健常ドナー由来の細胞を以前記載された方法に従

10

20

30

40

50

って生体外で刺激し (Walter et al., 2003)、HLA-A*02多量体を用いて標的特異的細胞を単細胞ソートし、次に引き続くTCR単離のために使用した。例えば、Molecular Cloning a laboratory manual fourth edition by Green and Sambrookに記載されるように、標準法によって5'RACEを通じてTCR配列を単離した。TCR R7P1D5の α および β 可変領域を配列決定し、さらなる機能特性解析のためにクローン化した。TCR R7P1D5は、HLA-A*02陽性ドナーに由来する。

【0076】

引用された参考文献：

- Davis MM, Bjorkman PJ T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. (1988). 334(6181), 395~402. 10
- Cole DK et al. Germ line-governed recognition of a cancer epitope by an immunodominant human T-cell receptor. (2009). 284(40), 27281~27289.
- Li H et al. Structure-function studies of T-cell receptor-superantigen interactions. (1998). 163, 177~186.
- Burrows SR Hard wiring of T cell receptor specificity for the major histocompatibility complex is underpinned by TCR adaptability. (2010). 107(23), 10608~10613.
- Roop K Domingues FS (2011). Predicting interactions between T-cell receptors and MHC-peptide complexes. Mol Immunol 48:553~562. 20
- Rosenberg SA et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N Engl J Med 319:1676~1680.
- Shao H et al. TCR mispairing in genetically modified T cells was detected by fluorescence resonance energy transfer. (2010). 37(8), 3951~3956.
- Lefranc MP et al. IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev. Comp. Immunol. (2003) 27, 55-77
- Lefranc MP et al. The T cell receptor facts book. (2001)
- Bendle GM et al. Preclinical development of T cell receptor gene therapy. Curr. Opin. Immunol. (2009). 21, 209~214 30
- Pogulis RJ, Pease LR. A retroviral vector that directs simultaneous expression of α and β T cell receptor genes. Hum Gene Ther. (1998) Oct 10;9(15): 2299-304.
- Zhong S et al. Retroviral Transduction of T-cell Receptors in Mouse T-cells J Vis Exp. (2010); (44): 2307
- Wälchli S et al. A Practical Approach to T-Cell Receptor Cloning and Expression. PLOS ONE (2011) 6(11): e27930
- O'Shea EK et al. Peptide "Velcro": design of a heterodimeric coiled coil. (1993). 3(10), 658~667. 40
- Chang HC et al. A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments. (1994). 91(24), 11408~11412.
- Varriale S et al. An evolutionary conserved motif is responsible for immunoglobulin heavy chain packing in the B cell membrane. (2010).
- Govers C et al. T cell receptor gene therapy: strategies for optimizing transgenic TCR pairing. Trends Mol Med. (2010) Feb;16(2):77-87
- Løset GA et al., Phage Display Engineered T Cell Receptors as Tools for the Study of Tumor Peptide-MHC Interactions. Front Oncol (2014); 4: 378. 50

- Hughes RA et al. Gene synthesis: methods and applications. *Methods Enzymol.* (2011);498: 277–309
- Labrou NE. Random mutagenesis methods for in vitro directed enzyme evolution. *Curr Protein Pept Sci.* (2010) Feb;11(1):91–100.
- Trehan A et al. REPLACR—mutagenesis, a one-step method for site-directed Scientific Reports (2016) 6, Article number:19121
- Maeder ML & Gersbach CA. Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy. *Molecular Therapy* (2016); 24 3,430~446.
- Verhoeven E et al. Lentiviral vector gene transfer into human T cells. *Methods Mol Biol.* 2009;506:97–114 10
- Huang X et al. Sleeping Beauty Transposon-mediated Engineering of Human Primary T Cells for Therapy of CD19+ Lymphoid Malignancies. *Molecular Therapy* (2008); 16 3,580~589.
- Kim TK & Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 2010 Aug; 397(8): 3173~3178.
- Chen, JL et al. (2005). Structural and kinetic basis for heightened immunogenicity of T cell vaccines. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(8), 1243~1255.
- Pettersen EF et al. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605~1612. 20
- Spasov VZ & Yan L (2013). pH-selective mutagenesis of protein-protein interfaces: in silico design of therapeutic antibodies with prolonged half-life. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(4), 704~714.
- Cohen CJ et al. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8878–86.
- Cohen CJ et al. Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res.* 2007 Apr 15;67(8):3898–903. 30
- Voss RH et al. Molecular design of the Calpha beta interface favors specific pairing of introduced TCR alpha beta in human T cells. *J Immunol.* 2008 Jan 1;180(1):391–401.
- Walter et al. (2003) *J Immunol.*, Nov 15;171(10):4974–8.
- Knies et al. An optimized single chain TCR scaffold relying on the assembly with the native CD3-complex prevents residual mispairing with endogenous TCRs in human T-cells. *Oncotarget.* 2016 Apr 19; 7(16):21199~21221.
- Thomas Hoffmann et al. Quantitative Analysis of the Association Angle between T-cell Receptor V α /V β Domains Reveals Important Features for Epitope Recognition. *PLOS*, July 17, 2015, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004244> 40

【図面】

【図 1 A】

TRBV: TRBV6-5ヒト						TRAV: TRAV8-6ヒト					
FR1-IMGT	1	1	aat	ASN	N	1	0	agc	ALA	A	
	2	2	gct	ALA	A	2	1	cag	GLN	Q	
	3	3	ggg	GLY	G	3	2	tct	SER	S	
	4	4	gtc	VAL	V	4	3	gtg	VAL	V	
	5	5	act	THR	T	5	4	acc	THR	T	
	6	6	cag	GLN	Q	6	5	cag	GLN	Q	
	7	7	thr	THR	T	7	6	ctt	LEU	L	
	8	8	cca	PRO	P	8	7	gac	ASP	D	
	9	9	aaa	LYS	K	9	8	agc	SER	S	
	10	10	ttc	PHE	F	10	9	caa	GLN	Q	
	11	11	cag	GLN	Q	11	10	gtc	VAL	V	
	12	12	gtc	VAL	V	12	11	cct	PRO	P	
	13	13	ctg	LEU	L	13	12	gtc	VAL	V	
	14	14	aag	LYS	K	14	13	ttt	PHE	F	
	15	15	aca	THR	T	15	14	gaa	GLU	E	
	16	16	gga	GLY	G	16	15	gaa	GLU	E	
	17	17	cag	GLN	Q	17	16	gcc	ALA	A	
	18	18	agc	SER	S	18	17	cct	PRO	P	
	19	19	atg	MET	M	19	18	gtg	VAL	V	
	20	20	aca	THR	T	20	19	gag	GLU	E	
	21	21	ctg	LEU	L	21	20	ctg	LEU	L	
	22	22	cag	GLN	Q	22	21	agg	ARG	R	
	23	23	tgt	CYS	C	23	22	tgc	CYS	C	
	24	24	gcc	ALA	A	24	23	aac	ASN	N	
	25	25	cag	GLN	Q	25	24	tac	TYR	Y	
	26	26	gat	ASP	D	26	25	tca	SER	S	
CDR1-IMGT	27	27	atg	MET	M	27	26	tct	SER	S	
	28	28	aac	ASN	N	28	27	tct	SER	S	
	29	29	cat	HIS	H	29	28	gtt	VAL	V	
	30	30	gaa	GLU	E	30	29	tca	SER	S	
	31	* 31	tac	TYR	Y	31	30	gtg	VAL	V	
	32	*	-	-	-	32	* 31	tat	TYR	Y	
	33	-	-	-	-	33	*	-	-	-	
	34	-	-	-	-	34	*	-	-	-	
	35	-	-	-	-	35	-	-	-	-	
	36	-	-	-	-	36	-	-	-	-	
	37	-	-	-	-	37	-	-	-	-	
	38	-	-	-	-	38	-	-	-	-	

図1A

【図 1 B】

TRBV: TRBV6-5ヒト						TRAV: TRAV8-6ヒト					
FR2-IMGT	39	32	atg	MET	M	39	32	ctc	LEU	L	
	40	33	tcc	SER	S	40	33	ttc	PHE	F	
	41	34	tgg	TRP	W	41	34	tgg	TRP	W	
	42	35	tat	TYR	Y	42	35	tat	TYR	Y	
	43	36	cga	ARG	R	43	36	gtg	VAL	V	
	44	37	caa	GLN	Q	44	37	caa	GLN	Q	
	45	38	gac	ASP	D	45	38	tac	TYR	Y	
	46	39	cca	PRO	P	46	39	ccc	PRO	P	
	47	40	ggc	GLY	G	47	40	aac	ASN	N	
	48	41	atg	MET	M	48	41	caa	GLN	Q	
	49	42	ggg	GLY	G	49	42	gga	GLY	G	
	50	43	ctg	LEU	L	50	43	ctc	LEU	L	
	51	44	agg	ARG	R	51	44	cag	GLN	Q	
	52	45	ctg	LEU	L	52	45	ctt	LEU	L	
	53	46	att	ILE	I	53	46	ctc	LEU	L	
	54	47	cat	HIS	H	54	47	ctg	LEU	L	
	55	48	tac	TYR	Y	55	48	aag	LYS	K	
CDR2-IMGT	56	49	tca	SER	S	56	* 49	tat	TYR	Y	
	57	50	gtt	VAL	V	57	* 50	tta	LEU	L	
	58	51	ggg	GLY	G	58	* 51	tca	SER	S	
	59	52	gct	ALA	A	59	* 52	gga	GLY	G	
	60	53	ggg	GLY	G	60	-	-	-	-	
	61	54	atc	ILE	I	61	-	-	-	-	
	62	-	-	-	-	62	-	-	-	-	
	63	-	-	-	-	63	-	-	-	-	
	64	-	-	-	-	64	-	-	-	-	
	65	-	-	-	-	65	-	-	-	-	
FR3-IMGT	66	55	act	THR	T	66	* 53	tcc	SER	S	
	67	56	gac	ASP	D	67	* 54	acc	THR	T	
	68	57	caa	GLN	Q	68	* 55	ctg	LEU	L	
	69	58	gga	GLY	G	69	* 56	gtt	VAL	V	
	70	59	gaa	GLU	E	70	* 57	gaa	GLU	E	
	71	60	gtc	VAL	V	71	* 58	agc	SER	S	
	72	61	ccc	PRO	P	72	* 59	atc	ILE	I	
	73	* 62	-	-	-	73	*	-	-	-	
	74	* 63	aat	ASN	N	74	* 60	aac	ASN	N	
	75	* 64	ggc	GLY	G	75	61	ggg	GLY	G	
	76	65	tac	TYR	Y	76	62	ttt	PHE	F	
	77	66	aat	ASN	N	77	63	gag	GLU	E	

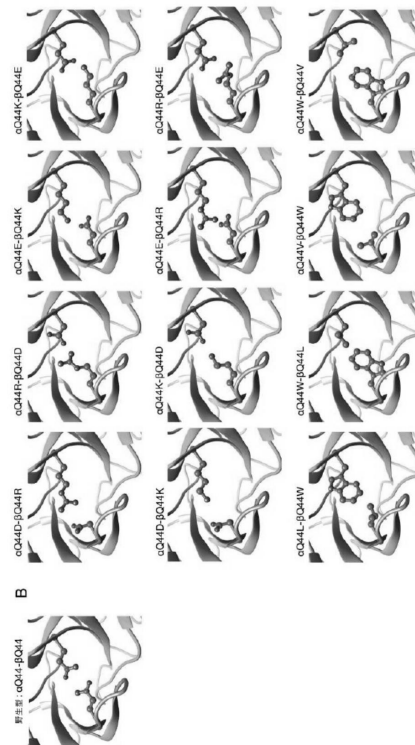
図1B

【図 1 C】

TRBV: TRBV6-5ヒト						TRAV: TRAV8-6ヒト					
	78	67	gtc	VAL	V	78	64	gct	ALA	A	
	79	68	tcc	SER	S	79	65	gaa	GLU	E	
	80	69	aga	ARG	R	80	66	ttt	PHE	F	
	81	70	tca	SER	S	81	67	aac	ASN	N	
	82	-	-	-	-	82	68	aag	LYS	K	
	83	71	acc	THR	T	83	69	agt	SER	S	
	84	72	aca	THR	T	84	70	caa	GLN	Q	
	85	73	gag	GLU	E	85	71	act	THR	T	
	86	74	gat	ASP	D	86	72	tcc	SER	S	
	87	75	ttc	PHE	F	87	73	ttc	PHE	F	
	88	76	ccg	PRO	P	88	74	cac	HIS	H	
	89	77	ctc	LEU	L	89	75	ttg	LEU	L	
	90	78	agg	ARG	R	90	76	agg	ARG	R	
	91	79	ctg	LEU	L	91	77	aaa	LYS	K	
	92	80	ctg	LEU	L	92	78	ccc	PRO	P	
	93	81	tct	SER	S	93	79	tca	SER	S	
	94	82	gct	ALA	A	94	80	gtc	VAL	V	
	95	83	gct	ALA	A	95	81	cat	HIS	H	
	96	84	ccc	PRO	P	96	82	ata	ILE	I	
	97	85	tcc	SER	S	97	83	agc	SER	S	
	98	86	cag	GLN	Q	98	84	gac	ASP	D	
	99	87	aca	THR	T	99	85	acg	THR	T	
	100	88	tct	SER	S	100	86	gct	ALA	A	
	101	89	gtg	VAL	V	101	87	gag	GLU	E	
	102	90	tac	TYR	Y	102	88	tac	TYR	Y	
	103	91	ttc	PHE	F	103	89	ttc	PHE	F	
	104	92	tgt	CYS	C	104	90	tgt	CYS	C	
CDR3-IMGT	105	93	gcc	ALA	A	105	91	gct	ALA	A	
	106	94	agc	SER	S	106	92	gtg	VAL	V	
	107	95	agt	SER	S	107	93	agt	SER	S	
	108	96	tat	TYR	Y						
	109	97	-	-	-						

図1C

【図 2】



A

図2

10

20

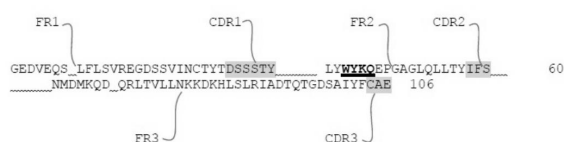
30

40

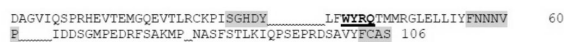
50

【圖 3】

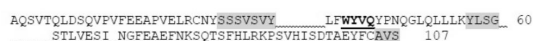
配列番号1: R7P1D5 (TRAV5) のTCR α 鎖可変ドメイン



配列番号2: R7P1D5 (TRBV12-4) のTCRβ鎖可変ドメイン



配列番号3: TRAV8-6のTCR α 鎖可変ドメイン



配列番号4: TRBV6-5のTCRβ鎖可変ドメイン

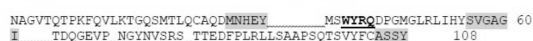


图3

【図 4 A】

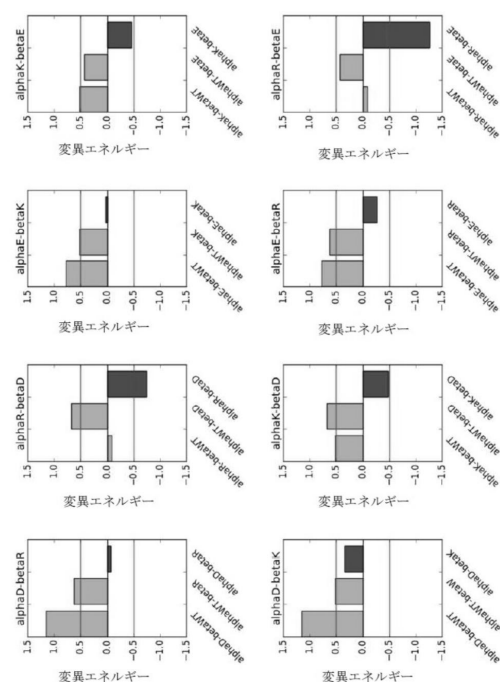


图4A

【図 4 B】

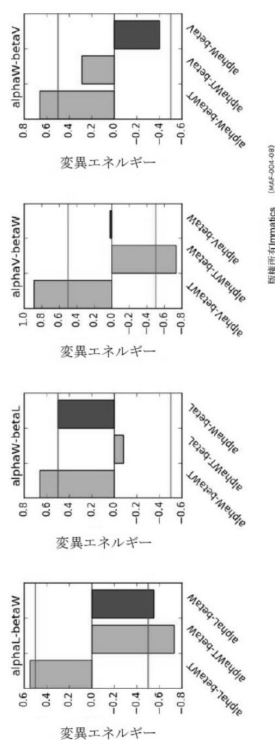


図4B

【図 5】

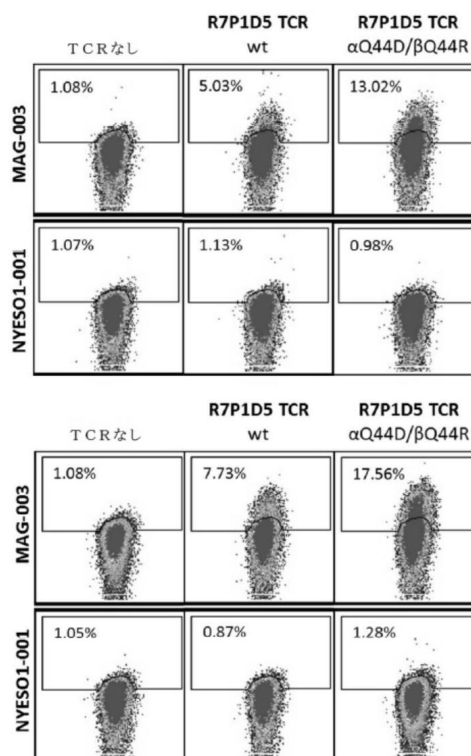


図5

【図 4 B】

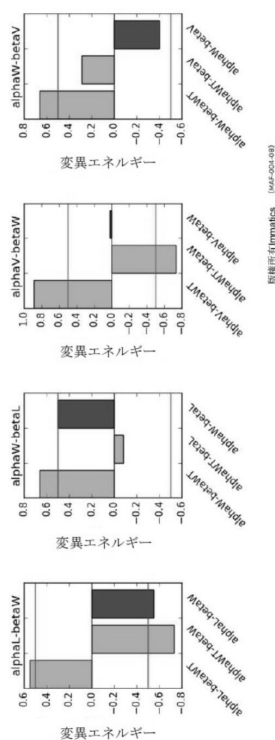


図4B

【図 5】

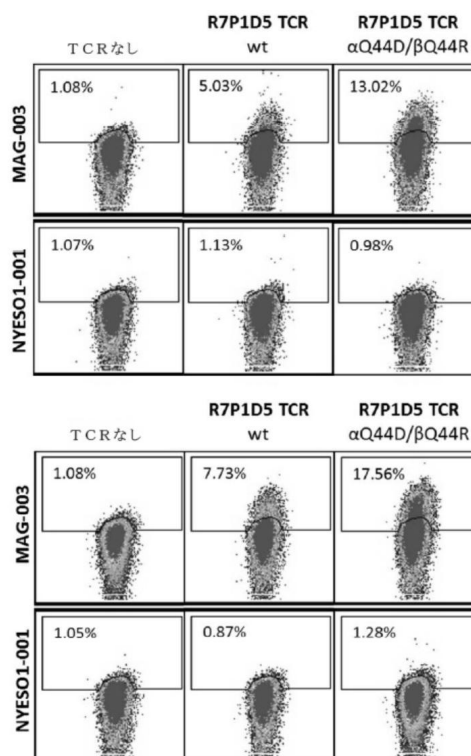
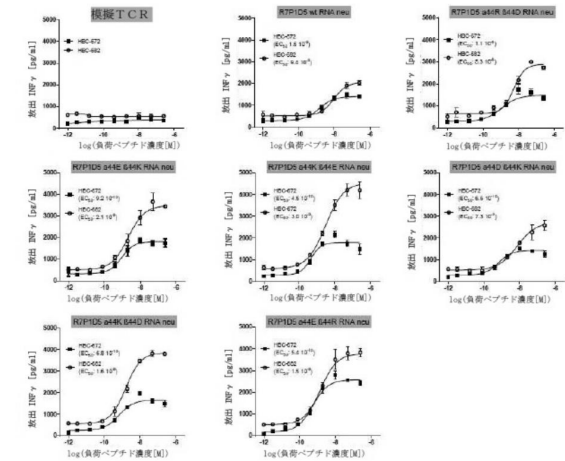
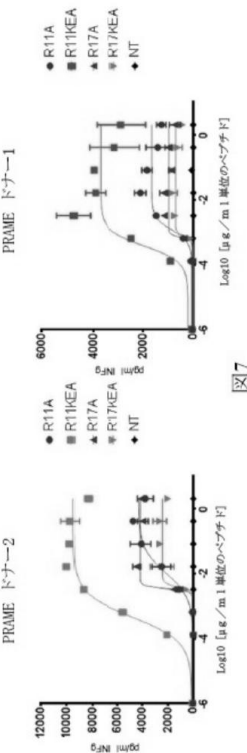


図5

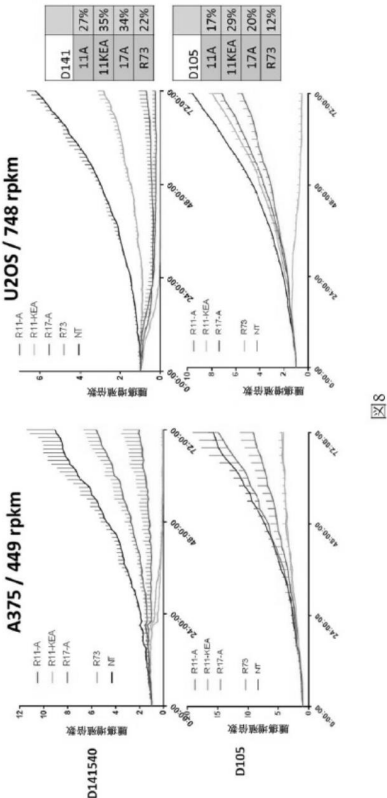
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023052688000001.xml

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年2月24日(2023.2.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本願明細書または図面に記載された発明。

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02

(72)発明者 バンク、ゼバスティアン

ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, ゲルトルートーボーイマーエステーエル. 1 9 / 1

(72)発明者 マウラー, ドミニク

ドイツ, 7 2 1 1 6 メッシンゲン, フレイネルヴェーグ 7

(72)発明者 フリッチェ, イェンス

ドイツ, 7 2 1 4 4 ドウスリンゲン, レルヒエンヴェーク 1 1

(72)発明者 ワーグナー, クラウディア

ドイツ, 7 2 0 7 4 テュービンゲン, ニュルティンガー シュトラーセ 3 2

(72)発明者 アルテン, レオニー

ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, アーピーピー. 1 6 1, ヴァイスドルンヴェーグ 1 4

(72)発明者 ホフガード, フランツィスカ

ドイツ, 7 2 0 7 2 テュービンゲン, シュベルツロッハー シュトラーセ 6 4

(72)発明者 フェルベール, マティアス

フランス, 7 5 1 0 1 0 パリ, 1 リュ デ パラディス