

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6929867号
(P6929867)

(45) 発行日 令和3年9月1日 (2021.9.1)

(24) 登録日 令和3年8月13日 (2021.8.13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A

C O 7 K 14/725 (2006.01)

C O 7 K 14/725

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 Z

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 21 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-548050 (P2018-548050)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月16日 (2017.3.16)
 (65) 公表番号 特表2019-512242 (P2019-512242A)
 (43) 公表日 令和1年5月16日 (2019.5.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/056289
 (87) 国際公開番号 W02017/158116
 (87) 国際公開日 平成29年9月21日 (2017.9.21)
 審査請求日 令和1年5月15日 (2019.5.15)
 (31) 優先権主張番号 1604494.3
 (32) 優先日 平成28年3月16日 (2016.3.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 62/308,970
 (32) 優先日 平成28年3月16日 (2016.3.16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 506258073
 イマティクス バイオテクノロジーズ ゲ
 ーエムペーハー
 ドイツ, 72076 テュービンゲン, パ
 ウルーエンリヒェンシュトラッセ 15
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (72) 発明者 マウラー, ドミニク
 ドイツ, 72116 メッシンゲン, フレ
 イネルヴェーグ 7
 (72) 発明者 アルテン, レオニー
 ドイツ, 72076 テュービンゲン, ア
 ーピーピー, 161, ヴァイスドルンヴェ
 ーグ 14

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんに対する免疫療法で使用するための形質移入T細胞およびT細胞受容体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鎖および 鎖を含んでなる T C R であって、前記 鎖が相補鎖決定領域である配列番号 5 に示される C D R 1、配列番号 6 に示される C D R 2 および配列番号 7 に示される C D R 3 を含む T C R 可変ドメインを含んでなり；および、前記 鎖が相補鎖決定領域である配列番号 13 に示される C D R 1、配列番号 14 に示される C D R 2 および配列番号 15 に示される C D R 3 を含む T C R 可変ドメインを含んでなり；および、前記 T C R は I G F 2 B P 3 - 001 ペプチド - M H C 分子複合体に特異的に結合し、前記 I G F 2 B P 3 - 001 ペプチドは配列番号 1 のアミノ酸配列からなり、および、前記 T C R は前記 I G F 2 B P 3 - 001 ペプチドの 1 および 3 ~ 7 位置に結合する、T C R。

10

【請求項 2】

前記 鎖が、配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一である T C R 可変ドメイン、および、配列番号 5 に示される C D R 1、配列番号 6 に示される C D R 2 および配列番号 7 に示される C D R 3 を含む、および、前記 鎖が、配列番号 12 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一である T C R 可変ドメイン、および、配列番号 13 に示される C D R 1、配列番号 14 に示される C D R 2 および配列番号 15 に示される C D R 3 を含む、請求項 1 に記載の T C R。

【請求項 3】

T C R 定常ドメインおよび T C R 定常ドメインをさらに含むものであり、前記 T C R 定常ドメインが、配列番号 9 の T C R 定常ドメインと少なくとも 95 % 同一であり

20

、前記 T C R 定常ドメインが、配列番号 17 の T C R 定常ドメインと少なくとも 95 % 同一である、請求項 1 または 2 に記載の T C R。

【請求項 4】

配列番号 2 からなる 鎖と、配列番号 10 からなる 鎖とを含んでなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 5】

前記 鎖および 鎖が融合して一本鎖 T C R を形成する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 6】

前記 鎖および / または 鎖が検出可能な標識を含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の T C R。

10

【請求項 7】

前記 および / または 鎖が治療効果のある薬剤にコンジュゲートされている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 8】

鎖および 鎖を含んでなる T C R であって、前記 鎖が配列番号 2 のアミノ酸配列に含まれる C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含んでなり、および前記 T C R 鎖が配列番号 10 のアミノ酸配列に含まれる C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含んでなり；前記 T C R が I G F 2 B P 3 - 001 ペプチド - M H C 分子複合体に特異的に結合し、前記 I G F 2 B P 3 - 001 ペプチドは配列番号 1 のアミノ酸配列からなり、および、前記 T C R は前記 I G F 2 B P 3 - 001 ペプチドの 1 および 3 ~ 7 位置に結合する、T C R。

20

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の T C R の 鎖および / または 鎖、または請求項 8 に記載の T C R の 鎖および / または 鎖をコードする核酸。

【請求項 10】

少なくとも 1 つのプロモーター配列に作動可能に連結された、請求項 9 に記載の核酸を含んでなる発現ベクター。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

30

【請求項 12】

T 細胞または T 細胞前駆細胞である、請求項 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 9 に記載の核酸、請求項 10 に記載の発現ベクター、および / または請求項 11 ~ 12 のいずれか一項に記載の宿主細胞と；薬学的に許容可能な担体を含んでなる医薬組成物。

【請求項 14】

がん治療薬の製造のための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 9 に記載の核酸、請求項 10 に記載の発現ベクター、請求項 11 ~ 12 のいずれか一項に記載の宿主細胞、および / または請求項 13 に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 15】

前記 T C R の発現を促進するのに適した条件下で、請求項 11 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を培養するステップを含んでなる、M H C 分子によって提示されると、配列番号 1 のペプチドに特異的に結合する T C R を生成する方法。

【請求項 16】

がん治療方法に使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 9 に記載の核酸、請求項 10 に記載の発現ベクター、請求項 11 ~ 12 のいずれか一項に記載の宿主細胞、および / または請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記がんが、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん

50

、肝細胞がん、頭頸部がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、食道がん、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 6 に記載の T C R、核酸、発現ベクター、宿主細胞、および / または医薬組成物。

【請求項 1 8】

a) 生物学的サンプルを請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T C R に接触させるステップと、

b) 前記生物学的サンプルへの T C R の結合を検出するステップと

を含んでなる、生物学的サンプル中のがんを検出する方法に使用するための請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T C R。

10

【請求項 1 9】

前記がんが、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、頭頸部がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、食道がん、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 8 に記載の T C R。

【請求項 2 0】

前記 T 細胞が / T 細胞である、請求項 1 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 2 1】

可溶性 T C R である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T C R。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

T 細胞ベースの免疫療法は、主要組織適合性複合体 (M H C) の分子によって提示される、腫瘍関連または腫瘍特異的タンパク質由来ペプチドエピトープを標的化する。これらの腫瘍関連抗原 (T A A) は酵素、受容体、転写因子などの全てのタンパク質クラスに由来するペプチドであり得て、それらは各腫瘍細胞内で発現され、同一起源の非改変細胞内と比較して、通常、上方制御される。

【0 0 0 2】

細胞性免疫応答の特異的要素は、腫瘍細胞を特異的に認識して破壊できる。腫瘍浸潤性細胞集団からの、または末梢血からの T 細胞の単離は、がんに対する自然免疫防御において、このような細胞が重要な役割を果たすことを示唆する。特に、細胞質ゾル内に位置するタンパク質または欠陥リボソーム産物 (D R I P S) に由来する、通常は 8 ~ 1 0 アミノ酸残基の主要組織適合性複合体 (M H C) 保有ペプチドのクラス I 分子を認識する、C D 8 陽性 T 細胞が、この応答において重要な役割を果たす。ヒトの M H C 分子はまた、ヒト白血球抗原 (H L A) とも称される。

30

【背景技術】

【0 0 0 3】

I G F 2 B P 3 は、m R N A 局在化、交代、および翻訳調節に関与するとされる、インスリン様成長因子 I I m R N A 結合タンパク質ファミリーのメンバーである。対照組織と比較して、多数のがん組織における I G F 2 B P 3 の高い転写物レベルの存在は、I G F 2 B P 3 タンパク質が、増殖中の形質転換細胞内で機能的役割を果たしているかもしれないことを示唆する。I G F 2 B P 3 発現は、腎明細胞がん (R C C) ; 悪性黒色腫 ; 食道扁平上皮がん ; 膵臓がん ; および尿路上皮腫瘍などのいくつかのがん型において報告されている。したがって、I G F 2 B P 3 に由来するエピトープは、抗がん治療薬を I G F 2 B P 3 発現がんに標的化するのに有用であってもよい。

40

【0 0 0 4】

M H C 分子には、M H C クラス I および M H C クラス I I の 2 つのクラスがある。ペプチドと M H C クラス I の複合体が、適切な T 細胞受容体 (T C R) を有する C D 8 陽性 T 細胞によって認識される一方で、ペプチドと M H C クラス I I 分子の複合体は、適切な T

50

C Rを有するC D 4 陽性ヘルパーT細胞によって認識される。C D 8 およびC D 4 依存性の双方のタイプの応答が、抗腫瘍効果と共同して相乗的に寄与するので、腫瘍関連抗原および対応するT細胞受容体の同定と特性解析は、ワクチンおよび細胞療法などのがん免疫療法の開発において重要である。

【 0 0 0 5 】

M H CクラスI 依存免疫反応において、ペプチドは腫瘍細胞によって発現される特定のM H CクラスI 分子に結合できるだけでなく、それらはまた、引き続いて特異的T細胞受容体(T C R)を有するT細胞によって認識されなくてはならない。したがって、T A Aは、腫瘍ワクチンおよび細胞療法をはじめとするが、これに限定されるものではない、T細胞ベースの治療法開発の出発点である。

10

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

がん治療のための分子標的薬の開発が進歩しているものの、当該技術分野において、がん細胞に高度に特異的な分子を特異的に標的化する新たな抗がん剤を開発する必要性がなおある。本明細書は、ペプチドK I Q E I L T Q V (I G F 2 B P 3 - 0 0 1 ; 配列番号1) およびその変異型などのI G F 2 B P 3のエピトープに特異的に結合する新規T C R、核酸、ベクター、および宿主細胞と;このような分子をがんの治療において使用する方法とを提供することにより、必要性に対処する。

【 課題を解決するための手段 】

20

【 0 0 0 7 】

本明細書は、鎖および鎖(「 / T C R」)を含んでなるT細胞受容体(T C R)に関する。別の実施形態では、本明細書は、鎖および鎖を含んでなるT C R(「 / T C R」)に関する。

【 0 0 0 8 】

本明細書は、T C Rと、個々のT C Rサブユニット(単独または組み合わせ)およびそのサブドメインと、例えば、天然T C Rには存在しない定常ドメイン残基の間に少なくとも1つのジスルフィド鎖間結合を有する可溶性 / 二量体T C Rなどの可溶性T C R(s T C R)と、クローン化T C Rと、当該物質を生産する方法ならびに前記T C Rを保有するその他の細胞を生産する方法とにさらに関し、前記T C Rは、自己由来または同種異系T細胞またはT細胞前駆体細胞に組み込まれる。

30

【 0 0 0 9 】

本明細書は、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 ペプチド - H L A 分子複合体に特異的に結合するT C Rにさらに関し、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 ペプチドは、K I Q E I L T Q V (配列番号1) を含んでなり、または代案としてはそれからなる。一実施形態では、H L A 分子はH L A - A * 0 2 である。

【 0 0 1 0 】

本明細書は、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 ペプチド - H L A 分子複合体に特異的に結合するT C Rにさらに関し、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 ペプチドは、配列番号1 と少なくとも6 6 %、好ましくは少なくとも7 7 %、およびより好ましくは少なくとも8 8 % 相同的な(好ましくは少なくとも7 7 % または少なくとも8 8 % 同一の) I G F 2 B P 3 - 0 0 1 の変異型、またはその薬学的に許容可能な塩を含んでなり、または代案としてはそれからなり、前記変異型は、H L A クラスI またはクラスI I 分子に結合し、および / または前記ペプチドと交差反応するT細胞を誘導し、前記ペプチドは、基礎となる完全長ポリペプチドでない。

40

【 0 0 1 1 】

本明細書は、配列番号1、または配列番号1 と少なくとも6 6 %、好ましくは少なくとも7 7 %、より好ましくは少なくとも8 8 % 相同的な(好ましくは少なくとも7 7 % または少なくとも8 8 % 同一の) その変異型からなる群から選択される配列を含んでなる、本明細書のペプチドにさらに関し、前記ペプチドまたはその変異型は、8 ~ 1 0 0、好まし

50

くは 8 ~ 30、最も好ましくは 8 ~ 14 アミノ酸の全長を有する。

【0012】

本明細書は、表 1 に示される TCR 可変ドメインと少なくとも 75%、80%、90%、95%、98%、または 99% の配列同一性、好ましくは 90% の配列同一性を有する、TCR 可変ドメインと；表 1 に示される TCR 可変ドメインと少なくとも少なくとも (at least at least) 75%、80%、90%、95%、98%、または 99% の配列同一性、好ましくは 90% の配列同一性を有する TCR 可変ドメインとを含んでなる、TCR にさらに関する。

【0013】

一実施形態では、TCR 可変ドメインは、表 1 に示される TCR ドメインに対して少なくとも 1 つの変異を有し；および / または TCR 可変ドメインは、表 1 に示される TCR ドメインに対して少なくとも 1 つの変異を有する。一実施形態では、TCR 可変ドメインおよび / または TCR 可変ドメインに少なくとも 1 つの変異を含んでなる TCR は、IGF2BP3 - 001 ペプチド - HLA 分子複合体に対して、非変異 TCR ドメインおよび / または非変異 TCR 可変ドメインを含んでなる TCR の少なくとも 10 倍の結合親和性および / または結合半減期を有する。

【0014】

本明細書の TCR 鎖は、表 1 に示される TCR 定常ドメインと少なくとも 70%、75%、80%、90%、95%、98%、または 99% の配列同一性を有する、TCR 定常ドメインをさらに含んでなってもよい。本明細書の TCR 鎖は、表 1 に示される TCR 定常ドメインと少なくとも 70%、75%、80%、90%、95%、98%、または 99% の配列同一性を有する、TCR 定常ドメインをさらに含んでなってもよい。

【0015】

本明細書の TCR 鎖は、TCR 膜貫通ドメインおよび / または TCR 細胞内ドメインをさらに含んでなってもよい。本明細書の TCR 鎖は、TCR 膜貫通ドメインおよび / または TCR 細胞内ドメインをさらに含んでなってもよい。

【0016】

本明細書は、表 1 で開示される 1 つまたは複数の 鎖相補性決定領域 (CDR) を含んでなる TCR 鎖、および表 1 に示される CDR に対して 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つの置換を有するその変異型にさらに関する。表 1 に示される CDR 1、CDR 3、および CDR 3 から選択される少なくとも 1 つの CDR を含んでなる TCR 鎖が、さらに記載される。表 1 に示される 鎖 CDR 3 を含んでなる TCR 鎖が、さらに記載される。

【0017】

本明細書は、表 1 で開示される 1 つまたは複数の 鎖相補性決定領域 (CDR) を含んでなる TCR 鎖、および表 1 に示される CDR に対して 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つの置換を有するその変異型にさらに関する。表 1 に示される 鎖 CDR 1、CDR 3、および CDR 3 から選択される少なくとも 1 つの CDR を含んでなる TCR 鎖が、さらに記載される。表 1 に示される 鎖 CDR 3 を含んでなる TCR 鎖が、さらに記載される。

【0018】

本明細書は、本明細書の TCR をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離または組換え核酸にさらに関する。一実施形態では、本明細書の核酸は、表 1 に示されるように、TCR 鎖および / または TCR 鎖をコードする。

【0019】

本明細書はさらに、本明細書に記載の TCR 鎖、鎖、またはその双方をコードする核酸を含んでなる、組換え発現ベクターに関する。

【0020】

本明細書は、本明細書に記載の TCR 鎖、鎖、またはその双方をコードする核酸を発現する組換え発現ベクターを含んでなる、単離された宿主細胞にさらに関する。

【0021】

10

20

30

40

50

本明細書は、本明細書による組換え発現ベクター単離を含んでなるされた宿主細胞にさらに
関し、好ましくはその細胞は、ヒト細胞、好ましくは末梢血リンパ球（PBL）、より
好ましくはCD4またはCD8陽性Tリンパ球である。

【0022】

本明細書は、本明細書の組換え発現ベクターを含んでなる単離されたPBLにさらに
関し、PBLは、CD8+T細胞またはCD4+T細胞である。

【0023】

本明細書は、本明細書に記載の少なくとも1つの宿主細胞を含んでなる細胞の集団に
さらに関する。

【0024】

本明細書は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん（例えば、神経膠芽腫、神
経芽腫）、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、頭頸部がん、膵臓がん、前立腺がん、白
血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および
胆管がん、および食道がんなどの増殖性疾患を治療するための、本明細書のTCRおよび
宿主細胞にさらに関する。

【0025】

一態様では、宿主細胞は、本明細書による少なくとも1つのTCRをコードする核酸で
形質移入された、CD8+T細胞またはCD4+T細胞であり、TCRは、表1で開示され
る少なくとも1つのアミノ酸配列を含んでなる。別の態様では、このような宿主細胞は
、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん（例えば、神経膠芽腫
、神経芽腫）、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳
がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん
、および食道がんの免疫療法で使用される。

【0026】

本明細書は、がん細胞を本明細書に記載のTCR、核酸、ベクターまたは宿主細胞に接
触させるステップを含んでなる、がん細胞を死滅させまたはその数を減少させる方法にさ
らに関する。本明細書に記載のTCR、核酸、ベクターまたは宿主細胞をそれを必要とす
る対象に投与するステップを含んでなる、がんを治療する方法もまた提供される。

【0027】

本明細書は、本明細書によるTCRをコードする核酸と、本明細書による核酸を発現で
きる発現ベクターとにさらに関する。

【0028】

本明細書は、疾患の治療および医療で、特にがんの治療で使用するための本明細書によ
るTCR、本明細書による核酸、または本明細書による発現ベクターにさらに関する。

【0029】

本明細書は、前述のような本明細書による核酸または発現ベクターを含んでなる、宿主
細胞にさらに関する。

【0030】

本明細書は、抗原提示細胞であり、好ましくは樹状細胞である、本明細書による宿主細
胞にさらに関する。

【0031】

本明細書は、本明細書による宿主細胞を培養するステップと、前記宿主細胞またはその
培養液からペプチドを単離するステップとを含んでなる、本明細書によるペプチドを生産
する方法にさらに関する。

【0032】

本明細書は、十分な量の抗原を抗原提示細胞に接触させることで、適切な抗原提示細胞
または人工抗原提示細胞の表面に発現されるクラスIまたはII MHC分子上に抗原が
負荷され、または抗原/クラスIまたはII MHC複合体モノマーを四量体化すること
で、クラスIまたはII MHC四量体上に抗原が負荷される、本明細書による方法にさ
らに関する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 3 】

本明細書は、抗原提示細胞が、配列番号 1 またはその変異型を含有する前記ペプチドを発現できまたは発現する発現ベクターを含んでなる、本明細書による方法にさらに関する。

【 0 0 3 4 】

本明細書は、本明細書による方法によって生産される活性化 T リンパ球にさらに関し、T 細胞は、本明細書によるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを発現する細胞を選択的に認識する。

【 0 0 3 5 】

本明細書は、患者においてがんを死滅させおよび / または細胞を抑制する方法にさらに関し、そのがん細胞は、本明細書による任意のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを異常に発現し、方法は、本明細書によって生産される有効数の T 細胞を患者に投与するステップを含んでなる。

10

【 0 0 3 6 】

本明細書は、本明細書による薬剤としてのまたは薬剤の製造における、本明細書に記載の任意のペプチド、本明細書に記載の核酸、本明細書に記載の発現ベクター、本明細書に記載の細胞、本明細書に記載の活性化 T リンパ球、T 細胞受容体、抗体、またはその他のペプチド - および / またはペプチド - M H C - 結合分子の使用にさらに関する。一態様では、薬剤はがんに対して有効である。

【 0 0 3 7 】

好ましくは、前記薬剤は、細胞療法、T C R、可溶性 T C R または抗体である。

20

【 0 0 3 8 】

本明細書はさらに、本明細書による使用に関し、がん細胞は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん（例えば、神経膠芽腫、神経芽腫）、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がん、好ましくは非小細胞肺癌である。

【 0 0 3 9 】

本明細書は、がん、好ましくは非小細胞肺癌の診断において使用され得る、本明細書で「標的」と称される、本明細書によるペプチドをベースとするバイオマーカーにさらに関する。マーカーは、ペプチドそれ自体の過剰提示、または対応遺伝子の過剰発現であり得る。マーカーはまた、好ましくは免疫療法、最も好ましくはバイオマーカーによって同定されるのと同じ標的を標的化する免疫療法である、治療の成功確率を予測するために使用されてもよい。例えば、抗体または可溶性 T C R を使用して腫瘍切片が染色され、M H C と複合体形成した目的ペプチドの存在が検出され得る。任意選択的に、抗体または可溶性 T C R は、免疫刺激ドメインまたは毒素などのさらなるエフェクター機能を保有する。

30

【 0 0 4 0 】

本明細書は、前記標的の少なくとも 1 つを認識する T C R を同定するための、好ましくは T 細胞を活性化する前記 T C R を同定するための、これらの新規標的の使用にさらに関する。

40

【 0 0 4 1 】

本明細書はまた、がん治療の文脈におけるこれらの新規標的の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 2 】

【図 1】健常組織およびがんにおける、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 ペプチド提示を示す。

【図 2】がんおよび健常組織における、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 発現を示す。

【図 3】同上

【図 4】同上

【図 5】T C R R 1 0 P 1 A 7 の および 鎖 R N A で電気穿孔された、C D 8 + T 細胞の M H C / I G F 2 B P 3 - 0 0 1 四量体または M H C / N Y E S O 1 - 0 0 1 四量体

50

染色を示す(表1)。MHC/NYESO1-001複合体に特異的に結合する1G4 TCRのRNAで形質転換されたCD8+T細胞、および模擬形質転換が、対照の役割を果たした。

【図6】IGF2BP3-001ペプチド(配列番号1)または同種であるが無関係のペプチドCLUA-001(配列番号26)、CHCHD6-001(配列番号27)、CDC42BPG-001(配列番号28)、PARP14-002(配列番号29)、SYNE2-001(配列番号30)、IFT7-001(配列番号31)、DHRS12-001(配列番号32)、STX12-001(配列番号33)、EEA-001(配列番号34)、SENP7-001(配列番号35)、または対照ペプチドNYESO1-001(配列番号36)が負荷された標的細胞との同時インキュベーション後における、TCR R10P1A7の および 鎖RNA(表1)で電気穿孔されたCD8+T細胞からのIFN 放出を示す。IFN 放出データは、2人の異なるドナー由来のCD8+T細胞を用いて得られた。RNA電気穿孔CD8+T細胞単独、または未負荷標的細胞との同時インキュベーションが、対照の役割を果たした。

10

【図7】IGF2BP3-001(配列番号1)、または配列番号1の1~9位における様々なIGF2BP3-001アラニン置換変異型が負荷された標的細胞との同時インキュベーション後における、TCR R10P1A7 および 鎖RNAで電気穿孔されたCD8+T細胞からのIFN 放出を示す。RNA電気穿孔CD8+T細胞単独、または対照ペプチドNYESO1-001が負荷された標的細胞とのまたは未負荷標的細胞との同時インキュベーションが、対照の役割を果たした。IFN 放出データは、2人の異なるドナー由来のCD8+T細胞を用いて得られた。

20

【図8】それぞれA-375黒色腫細胞株、T98G神経膠芽腫細胞株、およびSK-BR-3乳がん細胞株との同時インキュベーション後における、TCR R10P1A7(表1)の および 鎖RNAで電気穿孔されたCD8+T細胞からのIFN 放出である。RNA電気穿孔されたCD8+T細胞単独が、対照の役割を果たした。

【発明を実施するための形態】

【0043】

本明細書は、鎖および鎖(「 / TCR」)を含んでなるT細胞受容体(TCR)に関する。MHC分子によって提示されるとTCRおよび抗体に結合できる、IGF2BP3-001ペプチドもまた提供される。本明細書はまた、本明細書のTCRおよびペプチドを発現するための核酸、ベクター、および宿主細胞;そしてそれを使用する方法にも関する。

30

【0044】

定義

本明細書の用法では、別段の記載がない限り、全ての用語は下述のとおり定義される。

【0045】

「T細胞受容体」(TCRと略記される)という用語は、ポリペプチド鎖(鎖)およびポリペプチド鎖(鎖)を含んでなるヘテロ二量体分子を指し、ヘテロ二量体受容体は、HLA分子によって提示されるペプチド抗原と結合できる。

【0046】

40

「T細胞応答」という用語は、生体外または生体内でペプチドによって誘導される、エフェクター機能の特異的増殖および活性化を意味する。MHCクラスI拘束性細胞毒性T細胞に関して、エフェクター機能は、ペプチドパルスされた、ペプチド前駆体パルスされた、または天然にペプチドを提示する、標的細胞の溶解;ペプチドによって誘導される、好ましくはインターフェロン-、TNF-、またはIL-2であるサイトカインの分泌;ペプチドによって誘導される、好ましくはグランザイムまたはパーフォリンであるエフェクター分子の分泌;または脱顆粒であってもよい。

【0047】

「ペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の アミノ基とカルボニル基との間のペプチド結合によって互いに連結される、一連のアミノ酸残基を命名するために

50

、本明細書で使用される。ペプチドは、好ましくは9アミノ酸長であるが、8アミノ酸長程度に短くあり得て、10、11、または12以上に長くあり得て、MHCクラスIIペプチド（本明細書のペプチドのより長い変異型）の場合、それらは13、14、15、16、17、18、19または20アミノ酸長以上に長くあり得る。

【0048】

さらに「ペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の アミノ基とカルボニル基との間のペプチド結合によって互いに連結される、一連のアミノ酸残基の塩を含むものとする。好ましくは、塩は、例えば、塩化物塩または酢酸塩（トリフルオロ酢酸塩）などのペプチドの薬学的に許容可能な塩である。ペプチドは生体内で塩ではないので、本明細書によるペプチドの塩は、それらの生体内の状態がペプチドと実質的に異なることに留意すべきである。

10

【0049】

「ペプチド」という用語は、「オリゴペプチド」もまた含むものとする。「オリゴペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の アミノ基とカルボニル基との間のペプチド結合によって互いに連結される、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。オリゴペプチドの長さは、その中で正しいエピトープまたはエピトープ群が保持されれば、本明細書にとって重要でない。オリゴペプチドは、典型的に、約30アミノ酸残基長未満であり、約15アミノ酸長を超える。

【0050】

「ポリペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の アミノ基とカルボニル基との間のペプチド結合によって互いに連結される、一連のアミノ酸残基を指す。正しいエピトープが保持されれば、ポリペプチドの長さは本明細書にとって重要でない。ペプチドまたはオリゴペプチドという用語とは対照的に、ポリペプチドという用語は、約30を超えるアミノ酸残基を含有する分子を指すことが意図される。

20

【0051】

ペプチド、オリゴペプチド、タンパク質またはこのような分子をコードするポリヌクレオチドは、免疫応答を誘導できれば「免疫原性」である（したがって本明細書における「免疫原」である）。本明細書では、免疫原性は、より具体的には、T細胞応答を誘導する能力と定義される。したがって「免疫原」は、免疫応答を誘導できる分子であり、本明細書では、T細胞応答を誘導できる分子である。別の態様では、免疫原は、それに対する特異的抗体またはTCRを生じさせるのに使用される、ペプチド、ペプチドとMHCの複合体、オリゴペプチド、および/またはタンパク質であり得る。

30

【0052】

クラスI T細胞「エピトープ」は、クラスI MHC受容体に結合している短いペプチドを必要とし、三成分複合体（MHCクラスI 鎖、 β 2-microglobulin、およびペプチド）を形成し、それは、適切な親和性でMHC/ペプチド複合体に結合する適合T細胞受容体を保有するT細胞によって、認識され得る。MHCクラスI分子に結合するペプチドは、典型的に8~14アミノ酸長であり、最も典型的には9アミノ酸長である。

【0053】

特定のペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、天然起源であってもよく、またはそれらは合成的に構築されてもよい。一般に、本明細書のペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質をエンコードするDNAセグメントは、cDNA断片と短いオリゴヌクレオチドリンカーとから構築され、またはひと続きのオリゴヌクレオチドから構築されて、微生物またはウイルスオペロンに由来する調節因子を含んでなる、組換え転写単位で発現できる合成遺伝子が提供される。

40

【0054】

本明細書の用法では「ペプチドをコーディング（またはコード）するヌクレオチド」という用語は、配列が、例えば、TCRの生産に有用な樹状細胞または別の細胞株によって発現される生体系と適合性である、人工（人造）開始および停止コドンを含むペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を指す。

50

【 0 0 5 5 】

本明細書の用法では「TCRをコーディング（またはコード）するヌクレオチド」という用語は、配列が、例えば、TCRの生産に有用なT細胞または別の細胞株によって発現される生体系と適合性である、人工（人造）開始および停止コドンを含むTCRをコードする、1つまたは複数のヌクレオチド配列を指す。

【 0 0 5 6 】

本明細書の用法では、核酸配列への言及は、一本鎖および二本鎖の核酸の双方を含む。したがって、例えば、特異的配列は、文脈上明らかに別の意味が示唆されない限り、このような配列の一本鎖DNA、このような配列とその補体との二本鎖（二本鎖DNA）、およびこのような配列の補体を指す。

10

【 0 0 5 7 】

「コード領域」という用語は、その天然ゲノム環境内で、遺伝子の発現産物を天然にまたは正常にコードする遺伝子の部分、すなわち、遺伝子の天然発現産物を生体内でコードする領域を指す。

【 0 0 5 8 】

コード領域は、非変異（「正常」）、変異または改変遺伝子に由来し得て、またはDNA合成技術の当業者に周知の方法を使用して実験室で完全に合成された、DNA配列または遺伝子にさえ由来し得る。

【 0 0 5 9 】

「発現産物」という用語は、遺伝子の、そして遺伝コード縮重に起因する同等物をコードし、したがって同一アミノ酸をコードする任意の核酸配列の、天然翻訳産物である、ポリペプチドまたはタンパク質を意味する。

20

【 0 0 6 0 】

コード配列に言及する場合、「断片」という用語は、その発現産物が、完全コード領域の発現産物と本質的に同一の生物学的機能または活性を保つ、完全未満のコード領域を含んでなるDNAの部分の意味する。

【 0 0 6 1 】

「DNAセグメント」という用語は、別々の断片の形態の、またはより大型のDNAコンストラクトの構成要素としての、DNAポリマーを指し、それは、実質的に純粋な、すなわち、混入内因性物質を含まない形態で、例えばクローニングベクターを使用した標準生化学的方法によって、セグメントおよびその構成ヌクレオチド配列が、同定、操作、および回収できる量または濃度で、少なくとも1回単離されたDNAに由来する。このようなセグメントは、典型的に真核生物遺伝子内に存在する内部非翻訳配列またはイントロンによって中断されていない、読み取り枠の形態で提供される。非翻訳DNA配列は、それがコード領域の操作または発現を妨げない、読み取り枠下流に存在してもよい。

30

【 0 0 6 2 】

「プライマー」という用語は、短い核酸配列を意味し、それはDNAの1本鎖と対合し得て、DNAポリメラーゼがそこでデオキシリボヌクレオチド鎖合成を開始する、遊離3'-OH末端を提供する。

【 0 0 6 3 】

「プロモーター」という用語は、転写を開始するためのRNAポリメラーゼ結合に関与する、DNAの領域を意味する。

40

【 0 0 6 4 】

「単離」という用語は、物質が、その元の環境（例えば、それが天然起源であれば天然環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生きている動物に存在する天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然システムで共存する物質の一部または全部から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。一態様では、このようなポリヌクレオチドはベクターの一部であり、および/またはこのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部であり、このようなベクターまたは組成物はその天然環境の一部ではないという点において、依然として単離

50

されている。

【 0 0 6 5 】

本明細書によって開示されるポリヌクレオチド、および組換えまたは免疫原性ポリペプチドは、「精製」形態であってもよい。「精製」という用語は、完全に純粋である必要はなく；むしろ、それは相対的定義であることが意図され、これらの用語が当業者によって理解されるように、高度に精製された調製物、または部分的にのみ精製された調製物を含み得る。例えば、cDNAライブラリーから単離された個々のクローンは、電気泳動的に均一に、従来法で精製されている。少なくとも1桁、好ましくは2または3桁、より好ましくは4または5桁までの、出発原料または天然物質の精製が明示的に検討される。さらに、重量基準で、好ましくは99.999%、または少なくとも99.99%または99.9%；さらに望ましくは99%以上の純度を有する、特許請求されるポリペプチドが明示的に包含される。

10

【 0 0 6 6 】

本明細書によって開示される核酸およびポリペプチド発現産物、ならびにこのような核酸および/またはこのようなポリペプチドを含有する発現ベクターは、「富化形態」であってもよい。本明細書の用法では、「富化」という用語は、物質濃度が、（例えば）その天然濃度の少なくとも約2、5、10、100、または1000倍であることを意味し、有利には重量基準で0.01%、好ましくは重量基準で少なくとも約0.1%である。重量基準で約0.5%、1%、5%、10%、および20%の富化調製物もまた、検討される。本明細書を構成する、配列、コンストラクト、ベクター、クローン、およびその他の物質は、有利には、富化または単離形態であり得る。「活性断片」という用語は、通常は、単独で、または任意選択的に適切なアジュバントと共に、またはベクター中で、例えば、ウサギまたはマウスなどのそしてまたヒトをはじめとする哺乳類などの動物に投与されると免疫応答を生じる（すなわち、免疫原性を有する）ペプチド、ポリペプチドまたは核酸配列の断片を意味し、このような免疫応答は、ヒトなどのレシピエント動物内でT細胞応答を刺激する形態を取る。代案としては、「活性断片」はまた、生体外T細胞応答を誘導するのに使用されてもよい。

20

【 0 0 6 7 】

本明細書の用法では、ポリペプチドとの関連で使用される場合、「部分」、「セグメント」、および「断片」という用語は、アミノ酸残基などの連続する残基の配列を指し、その配列はより大型の配列のサブセットを形成する。例えば、ポリペプチドが、トリプシンまたはキモトリプシンなどの一般的エンドペプチダーゼのいずれかによって処理されれば、このような処理から得られるオリゴペプチドは、出発ポリペプチドの部分、セグメントまたは断片に相当するであろう。ポリヌクレオチドに関して使用される場合、これらの用語は、いずれかのエンドヌクレアーゼによる前記ポリヌクレオチドの処理によって生じる生成物を指す。

30

【 0 0 6 8 】

本明細書によると、配列に言及する場合、「同一性百分率」または「パーセント同一」という用語は、比較される配列（「比較配列」）と、記載されまたは特許請求される配列（「参照配列」）とのアライメント後に、配列が、特許請求されまたは記載される配列と比較されることを意味する。次に同一性百分率は、次式に従って判定される：

40

同一性百分率 = $100 [1 - (C / R)]$

式中、Cは、参照配列と比較される配列との間のアライメント長にわたる、参照配列と比較配列の間の差異の数であり、

(i) 比較配列中に対応する整列塩基またはアミノ酸を有しない、参照配列中の各塩基またはアミノ酸、および

(ii) 参照配列中の各ギャップ、および

(iii) 比較配列中の整列塩基またはアミノ酸と異なる、参照配列中の各整列塩基またはアミノ酸が差異を構成して、

(iv) アライメントは、整合配列の1位から開始しなくてはならず；

50

R は、比較配列とのアライメント長にわたる参照配列中の塩基またはアミノ酸の数であり、参照配列中に生じる任意のギャップもまた、塩基またはアミノ酸として数えられる。

【0069】

比較配列と、それに対して同一性百分率が上のように計算される参照配列との間に、特定の最小同一性百分率とほぼ同じまたはそれを上回るアライメントが存在すれば、その中に、上記のように計算された同一性百分率が特定の同一性百分率未満であるアライメントが存在したとしても、比較配列は、参照配列との特定の最小同一性百分率を有する。

【0070】

本明細書では、「相同的」という用語は、2つのアミノ酸配列、すなわちペプチドまたはポリペプチド配列の配列間の同一性の程度を指す（上の同一性百分率を参照されたい）。前述の「相同性」は、比較される配列にわたり、最適条件下でアライメントされた2つの配列を比較することで判定される。このような配列相同性は、例えばClustalWアルゴリズムを使用してアライメントを作成することで、計算され得る。一般に利用できる配列解析ソフトウェア、より具体的には、Vector NTI、GENETYXまたはその他のツールが、公共データベースによって提供される。

【0071】

当業者は、特定のペプチドの変異型によって誘導されるT細胞が、ペプチドそれ自体と交差反応できるかどうかを評価できるであろう

【0072】

所与のアミノ酸配列の「変異型」によって、本発明者らは、ペプチドが、配列番号1のアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同様にHLA分子となおも結合できるように、（例えば、それらを別の天然アミノ酸残基の側鎖で、またはその他の側鎖で置換することにより）例えば、アミノ酸の1つまたは2つの残基の側鎖が変化することを意味する。例えば、ペプチドは、それがHLA-A*02または-DRなどの適切なMHC分子の結合溝と相互作用して結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持するように修飾されてもよく、このようにしてそれは、活性化Tリンパ球のTCRに結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持する。同様に、TCRは、HLA-A*02またはHLA-DRなどの適切なMHC分子/KIQEILTQV（配列番号1）複合体と相互作用して結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持するように修飾されてもよく、このようにしてそれは、T細胞を活性化する能力を改善せずとも、少なくとも維持する。

【0073】

これらのT細胞は、本明細書の態様で定義されているように、引き続いて細胞と交差反応して、KIQEILTQV（配列番号1）などの同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞を死滅させ得る学術文献およびデータベース（Ramensee et al., 1999）から演繹され得るように、HLA結合ペプチドの特定の位置は、典型的にアンカー残基であり、結合溝を構成するポリペプチド鎖の極性、電気物理的、疎水性、および空間特性によって画定されるHLA受容体の結合モチーフと適合する、コア配列を形成する。一態様では、当業者は、本明細書の教示を所与として、既知のアンカー残基を維持することによって、TCRのアミノ酸配列を修飾する能力を有し、このようなTCR変異型がMHCクラスIまたはII分子/KIQEILTQV（配列番号1）複合体に結合する能力を維持するかどうかを判定できるであろう。本明細書のTCR変異型は、MHCクラスIまたはII分子/KIQEILTQV（配列番号1）複合体に結合する能力を維持する。本明細書のTCR変異型を発現するT細胞は、引き続いて、KIQEILTQV（配列番号1）などの同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞を死滅させ得る。

【0074】

一態様では、本明細書で開示されるペプチドまたはTCRは、特に明記されない場合、ペプチド鎖内の異なる、おそらくは選択的な部位での1つまたは複数の残基の置換によって修飾され得る。好ましくはこれらの置換は、前記ペプチドのアミノ酸鎖の末端に位置する。TCRでは、好ましくは、これらの置換は、TCR鎖およびTCR鎖の可変領域

10

20

30

40

50

に位置する。このような置換は、保存的性質であってもよく、例えば、疎水性アミノ酸が別の疎水性アミノ酸によって置換されるなど、構造および特徴の類似したアミノ酸によってアミノ酸が置換される。さらにより保存的な置換は、ロイシンのイソロイシンによる置換などの、同一または類似サイズおよび化学的性質のアミノ酸の置換である。天然起源相同タンパク質ファミリーの配列多様性の研究では、特定のアミノ酸置換は、他よりも耐容されることが多く、これらは、元のアミノ酸とその置換物との間のサイズ、電荷、極性、および疎水性の類似性との相関を示すことが多く、これが「保存的置換」の定義の基礎である。

【0075】

保存的置換は、本明細書では、以下の5つのグループの1つの中の交換として定義される：グループ1 - 小型脂肪族、非極性またはわずかに極性の残基 (Ala、Ser、Thr、Pro、Gly)；グループ2 - 極性の負に帯電した残基とそれらのアミド (Asp、Asn、Glu、Gln)；グループ3 - 極性の正に帯電した残基 (His、Arg、Lys)；グループ4 - 大型脂肪族非極性残基 (Met、Leu、Ile、Val、Cys)；およびグループ5 - 大型芳香族残基 (Phe、Tyr、Trp)。

10

【0076】

より保存的でない置換は、アラニンのイソロイシン残基による置換などの、類似した特徴を有するが、サイズがいくらか異なる別のアミノ酸による置換を伴うかもしれない。高度に非保存的な置換は、極性アミノ酸の、または塩基性アミノ酸の酸性アミノ酸による置換を伴うかもしれない。しかし化学効果は完全に予測可能でなく、過激な置換は単純な化学的原理からは予測できない偶然の効果を生じさせる可能性があるので、このような「過激な」置換は、潜在的に無効であるとして却下され得ない。

20

【0077】

一態様では、このような置換は、一般的なL - アミノ酸以外の構造を含んでもよい。したがってD - アミノ酸が、本明細書の抗原性ペプチドに通常見いだされるL - アミノ酸を置換するかもしれず、依然として本明細書の開示に包含される。さらに、非標準アミノ酸（すなわち、一般的な天然タンパク質新生アミノ酸以外）もまた置換目的で使用されて、本明細書による免疫原および免疫原性ポリペプチドが生産されてもよい

【0078】

2つ以上の位置における置換が、以下に定義されるように実質的に同等のまたはそれを超える抗原活性のあるペプチドをもたらすことが判明した場合、これらの置換の組み合わせを試験して、置換の組み合わせが、ペプチドの抗原性に相加または相乗効果をもたらすかどうか判定される。最大でも、ペプチド内の4つを超える位置が、同時に置換されることはない。

30

【0079】

T細胞受容体 (TCR)

好ましい実施形態では、本明細書は、表1に示されるTCR鎖およびその変異型と、表1に示されるTCR鎖およびその変異型とを含んでなる、TCRに関する。一態様では、本明細書に記載のTCRは、ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス - I / K I Q E I L T Q V (配列番号1) / 複合体またはクラス II / K I Q E I L T Q V (配列番号1) / 複体の分子に結合するまたは特異的に結合する能力を有する。

40

【0080】

【表 1 - 1】

表1：本明細書による代表的なTCR

TCR ID	説明	配列
R10P1A7 α鎖	α鎖	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYL YWKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSA IYFCAESKETRLMFGDGTQLVVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAFAVSNKSDFAFANFNNSII PEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMT LRLWSS (SEQ ID NO:2)
	Lセグメント (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR (SEQ ID NO:3)
	V鎖 (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYL YWKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSA IYFCAES (SEQ ID NO:4)
	CDR1	DSSSTY (SEQ ID NO:5)
	CDR2	IFS (SEQ ID NO:6)
	CDR3	CAESKETRLMF (SEQ ID NO:7)
	Jセグメント (TRAJ31)	RLMFGDGTQLVVKP (SEQ ID NO:8)
	定常領域 (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKSDSVYITDKTVLDMR SMDFKSNSAFAVSNKSDFAFANFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET DTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:9)

10

20

【表 1 - 2】

R10P1A7 β鎖	β鎖	MLLLLLLPGGISLPGSLAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDF QATTMFWRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTV TSAHPEDSSFYICARAGGHEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE ISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNSR YCLSSRLRVSAFWQNPРНHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:10)
	Lセグメント (TRBV20-1)	MLLLLLLPGGISLPGSLAGSGL (SEQ ID NO:11)
	V鎖 (TRBV20-1)	MLLLLLLPGGISLPGSLAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDF QATTMFWRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTV TSAHPEDSSFYICAR (SEQ ID NO:12)
	CDR1	DFQATT (SEQ ID NO:13)
	CDR2	SNEGSKA (SEQ ID NO:14)
	CDR3	CSARAGGHEQFF (SEQ ID NO:15)
	J鎖 (TRBJ2-1)	EQFFGPGTRLTVL (SEQ ID NO:16)
	定常領域 (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVH SGVSTDPQPLKEQPALNSRYCLSSRLRVSAFWQNPРНHFRQVQFYGLSEN DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:17)

30

40

50

【0081】

/ TCRの および 鎖、そして / TCRの および 鎖は、一般にそれぞれ2つの「ドメイン」、すなわち可変および定常ドメインを有すると見なされる。可変ドメインは、可変領域(V)と接合領域(J)の連結からなる。可変ドメインはまた、リーダー領域(L)を含んでもよい。 および 鎖はまた、多様性領域(D)を含んでもよい。

および 定常ドメインはまた、 および 鎖を細胞膜に固着させるC末端膜貫通(TM)ドメインを含んでもよい。

【0082】

したがって本明細書では、「TCR 可変ドメイン」という用語は、リーダー領域(L)のないTCR V(TRAV)領域とTCR J(TRAJ)領域との連結を指し；「TCR 定常ドメイン」という用語は、細胞外TRAC領域、またはC末端切断型TRAC配列を指し、任意選択的に 膜貫通ドメイン(VIGFRILLK VAGFNLLMTL(配列番号18))を指す。

10

【0083】

同様に「TCR 可変ドメイン」という用語は、リーダー領域(L)のないTCR V(TRBV)領域とTCR D/J(TRBD/TRBJ)領域との連結を指し；「TCR 定常ドメイン」という用語は、細胞外TRBC領域、またはC末端切断型TRBC配列を指し、任意選択的に 膜貫通ドメイン(TILYEILLGKATLYAVLVSA LVL(配列番号19))を指す。

20

【0084】

/ TCRに関して、「TCR 可変ドメイン」という用語は、本明細書の用法ではリーダー領域(L)のないTCR V(TRGV)領域とTCR J(TRGJ)領域との連結を指し、TCR 定常ドメインという用語は、細胞外TRGC領域を指し、またはC末端切断型TRGC配列を指す同様に「TCR 可変ドメイン」という用語は、リーダー領域(L)のないTCR V(TRDV)領域とTCR D/J(TRDD/TRDJ)領域との連結を指し、「TCR 定常ドメイン」という用語は、細胞外TRDC領域を指し、またはC末端切断型TRDC配列を指す。

【0085】

一実施形態では、本明細書のTCRは、表1に示されるTCR 鎖と少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 鎖を含んでなり、またはそれからなる。表1に示されるTCR 鎖は、表1で定義されるような、リーダー(L)セグメント；V鎖；3つの相補性(complementary)決定領域(CDR1、CDR2、およびCDR3)；接合領域(J)、および定常領域を含有する。

30

【0086】

一実施形態では、本明細書のTCRは、表1に示されるTCR 可変ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 可変ドメインを含んでなり、またはそれからなる。

40

【0087】

一実施形態では、本明細書のTCRは、表1に示されるTCR 定常ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは75%同一のTCR 定常ドメインを含んでなり、またはそれからなる。

【0088】

一実施形態では、本明細書のTCRは、表1に示される 鎖CDR1、CDR3、およびCDR3からなる群から選択される少なくとも1つの 鎖相補性決定領域(CDR)を含んでなる、TCR 可変ドメインを含んでなり、またはそれからなる。好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、表1に示される 鎖CDR3を含んでなる。別の好ま

50

しい実施形態では、TCR 可変ドメインは、表 1 に示される 鎖 CDR 1、CDR 2、および CDR 3 を含んでなる。

【0089】

特に好ましい実施形態では、本明細書の TCR は、表 1 の TCR 可変ドメインと少なくとも 90% の配列同一性を有する TCR 可変ドメインを含んでなり、またはそれからなり、表 1 の同一 可変ドメインの CDR 1、CDR 2、および CDR 3 を含んでなる。

【0090】

一実施形態では、本明細書の TCR は、表 1 に示される TCR 鎖と少なくとも 75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の、好ましくは 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の TCR 鎖を含んでなり、またはそれからなる。表 1 に示される TCR 鎖は、表 1 で定義されるような、リーダー (L) セグメント；V 鎖；3 つの相補性 (complementary) 決定領域 (CDR 1、CDR 2、および CDR 3)；接合領域 (J)、および定常領域を含有する。

【0091】

一実施形態では、本明細書の TCR は、表 1 に示される TCR 可変ドメインと少なくとも 75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の、好ましくは 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の TCR 可変ドメインを含んでなり、またはそれからなる。

【0092】

一実施形態では、本明細書の TCR は、表 1 に示される TCR 定常ドメインと少なくとも 75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の、好ましくは 75% 同一の TCR 定常ドメインを含んでなり、またはそれからなる。

【0093】

一実施形態では、本明細書の TCR は、表 1 に示される 鎖 CDR 1、CDR 3、および CDR 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの 鎖相補性決定領域 (CDR) を含んでなる、TCR 鎖可変ドメインを含んでなり、またはそれからなる。好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、表 1 に示される 鎖 CDR 3 を含んでなる。別の好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、表 1 に示される 鎖 CDR 1、CDR 2、および CDR 3 を含んでなる。

【0094】

特に好ましい実施形態では、本明細書の TCR は、表 1 の TCR 可変ドメインと少なくとも 90% または 95% の配列同一性を有する TCR 可変ドメインを含んでなり、またはそれからなり、表 1 の同一 可変ドメインの CDR 1、CDR 2、および CDR 3 を含んでなる。

【0095】

鎖可変ドメインは、表 1 に示される対応する CDR 配列に対して、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸置換を有する 1 つまたは複数の CDR ドメインを含んでなってもよい。同様に、鎖可変ドメインは、表 1 に示される対応する CDR 配列に対して、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸置換を有する 1 つまたは複数の CDR ドメインを含んでなってもよい。

【0096】

TCR 鎖および TCR 鎖は、融合して一本鎖 TCR を形成してもよい。代案としては、TCR 鎖および 鎖は、ヘテロ二量体に組み立てられ得る、別個のタンパク質として発現されてもよい。

【0097】

一実施形態では、表 1 の任意の TCR 鎖は、任意のその他の TCR 鎖と対になって、IGF2BP3 - 001 ペプチド - HLA 分子複合体に特異的に結合する TCR を生じる。別の実施形態では、表 1 の任意の TCR 鎖は、任意のその他の TCR 鎖と対にな

10

20

30

40

50

って、IGF2BP3-001ペプチド-HLA分子複合体に特異的に結合するTCRを生じる。

【0098】

TCR R10P1A7

一実施形態では、本明細書のTCRは、それぞれ配列番号2および配列番号10に対応する、TCR R10P1A7の鎖および/または鎖を含んでなり、またはそれからなる。

【0099】

TCR R10P1A7のTCR 可変ドメインは、配列番号2のアミノ酸22~130を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR R10P1A7のTCR 定常ドメインは、配列番号2のアミノ酸131~271を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR R10P1A7のTCR 可変ドメインは、配列番号10のアミノ酸26~139を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR 定常ドメインは、配列番号10のアミノ酸140~318を含んでなり、または代案としてはそれからなる。

10

【0100】

特定の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号2のTCR 鎖と少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 鎖を含んでなる。

20

【0101】

別の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号2のTCR 可変ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 可変ドメインを含んでなる。

【0102】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号2のTCR 定常ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは75%同一のTCR 定常ドメインを含んでなる。

30

【0103】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号2の鎖CDR1、CDR2、およびCDR3からなる群から選択される少なくとも1つの鎖相補性決定領域(CDR)を含んでなる、TCR 可変ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号2の鎖CDR3を含んでなる。別の好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号2の鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

【0104】

特に好ましい実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号2のTCR 可変ドメインと少なくとも90%の配列同一性を有するTCR 可変ドメインを含んでなり、配列番号2の鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

40

【0105】

別の特定の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号10のTCR 鎖と少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 鎖を含んでなる。

【0106】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号10のTCR 可変ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%

50

、または99%同一のTCR 可変ドメインを含んでなる。

【0107】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号10のTCR 定常ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは75%同一のTCR 定常ドメインを含んでなる。

【0108】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号10の 鎖CDR1、CDR2、およびCDR3からなる群から選択される少なくとも1つの 鎖相補性決定領域(CDR)を含んでなる、TCR 可変ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号10の 鎖CDR3を含んでなる。別の好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号10の 鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

10

【0109】

特に好ましい実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号10のTCR 可変ドメインと少なくとも90%の配列同一性を有するTCR 可変ドメインを含んでなり、配列番号10の 鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

【0110】

鎖可変ドメインは、配列番号2の対応するCDR配列に対して、1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸置換を有する1つまたは複数の CDRドメインを含んでなってもよい。同様に、 鎖可変ドメインは、配列番号10の対応する CDR配列に対して、1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸置換を有する1つまたは複数の CDRドメインを含んでなってもよい。

20

【0111】

さらに好ましい実施形態では、本明細書のTCRは、IGF2BP3ペプチド-HLA分子複合体に特異的に結合し、IGF2BP3ペプチドはKIQEILTQV(配列番号1)およびその変異型から選択される。一実施形態では、HLA分子は、HLA-A、HLA-B、およびHLA-C分子からなる群から選択される、クラスI MHC分子である。一実施形態では、HLA分子はHLA-A*02である。別の実施形態では、HLA分子は、HLA-DP、HLA-DQ、およびHLA-DRからなる群から選択される、クラスII MHC分子である。

30

【0112】

本明細書のTCRは、好ましくは、約2 μ M以下、約3 μ M以下、約25 μ M以下、または約10 μ M以下の結合親和性(KD)で、IGF2BP3ペプチド-HLA分子複合体に結合する。より好ましいのは、約1 μ M以下、約100 nM以下、約50 nM以下、約25 nM以下の結合親和性を有する、高親和性TCRである。本発明のTCRの好ましい結合親和性範囲の非限定的例としては、約1 nM~約10 nM; 約10 nM~約20 nM; 約20 nM~約30 nM; 約30 nM~約40 nM; 約40 nM~約50 nM; 約50 nM~約60 nM; 約60 nM~約70 nM; 約70 nM~約80 nM; 約80 nM~約90 nM; および約90 nM~約100 nMが挙げられる。

40

【0113】

本明細書の用法では、本明細書のTCRとの関連で、「特異的結合」およびそれらの文法的変種は、IGF2BP3ペプチド-HLA分子複合体に対して、2 μ M以下の結合親和性(KD)を有するTCRを意味するために使用される。

【0114】

本明細書の / ヘテロ二量体TCRは、それらの定常ドメインの間に導入された、ジスルフィド結合を有してもよい。このタイプの好ましいTCRとしては、TRAC定常ドメイン配列とTRBC1またはTRBC2定常ドメイン配列とを有するものが挙げられるが、ただし、TRACのThr48およびTRBC1またはTRBC2のSer57は、システイン残基によって置換されており、前記システインは、TCRのTRAC定常ドメ

50

イン配列と T R B C 1 または T R B C 2 定常ドメイン配列との間に、ジスルフィド結合を形成する。

【 0 1 1 5 】

上述の導入された鎖間結合の存在下または不在下で、本明細書の / ヘテロ二量体 T C R は、T R A C 定常ドメイン配列と T R B C 1 または T R B C 2 定常ドメイン配列とを有してもよく、T C R の T R A C 定常ドメイン配列と、T R B C 1 または T R B C 2 定常ドメイン配列とが、T R A C のエクソン 2 の C y s 4 と、T R B C 1 または T R B C 2 のエクソン 2 の C y s 2 との間の天然ジスルフィド結合によって連結されてもよい。

【 0 1 1 6 】

本明細書の T C R は、放射性核種、フルオロフォア、およびビオチンからなる群から選択される、検出可能な標識を含んでなってもよい。本明細書の T C R は、放射性核種、化学療法剤、または毒素などの治療的活性薬剤にコンジュゲートされてもよい。

10

【 0 1 1 7 】

一実施形態では、鎖に少なくとも 1 つの変異を有し、および / または鎖に少なくとも 1 つの変異を有する本明細書の T C R は、非変異 T C R と比較して修飾されたグリコシル化を有する。

【 0 1 1 8 】

一実施形態では、T C R 鎖および / または T C R 鎖に少なくとも 2 つの変異を含んでなる T C R は、I G F 2 B P 3 ペプチド - H L A 分子複合体に対して、非変異 T C R 鎖および / または非変異 T C R 鎖を含んでなる T C R の少なくとも 2 倍の結合親和性および / または結合半減期を有する。腫瘍特異的 T C R の親和性増強とその利用は、最適 T C R 親和性のウィンドウの存在に依存する。このようなウィンドウの存在は、H L A - A 2 拘束性病原体に対して特異的な T C R が、H L A - A 2 拘束性腫瘍関連自己抗原に対して特異的な T C R と比較して、一般に約 1 0 分の 1 の K D 値を有するという観察に基づく (A l e k s i c e t a l . 2 0 1 2 ; K u n e r t e t a l . 2 0 1 3) 。腫瘍抗原は免疫原性である可能性を有するが、腫瘍は個人自身の細胞から生じるので、改変された翻訳プロセッシングのある変異タンパク質またはタンパク質のみが、免疫系によって異質と見なされることが今や知られている。上方制御されまたは過剰発現される抗原 (いわゆる自己抗原) は、腫瘍に対する機能性免疫応答を必ずしも誘導しない。これらの抗原に対して高度に反応性である T C R を発現する T 細胞は、中枢性免疫寛容として知られているプロセスにおいて胸腺内で負に選択され (X i n g e t a l . 2 0 1 2 ; R u e l l a e t a l . 2 0 1 4 ; S h a r p e e t a l . 2 0 1 5) 、すなわち、自己抗原に対する低親和性 T C R を有する T 細胞のみが残留する。したがって、I G F 2 B P 3 に対する本明細書の T C R または変異型の親和性は、当技術分野で周知の方法によって高め得る。

20

30

【 0 1 1 9 】

「医薬組成物」は、医学的状況においてヒトへの投与に適する組成物である。好ましくは、医薬組成物は無菌であり、G M P ガイドラインに準拠して製造される。

【 0 1 2 0 】

本明細書の医薬組成物はまた、本明細書の T C R を発現する少なくとも 1 つの宿主細胞と、薬学的に許容で可能な担体とを含む。

40

【 0 1 2 1 】

本明細書の医薬組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤および / または安定剤もまた含んでもよい。

【 0 1 2 2 】

この組成物は、皮下、皮内、筋肉内などの非経口投与、または経口投与のために使用される。このためには、ペプチドおよび任意選択的にその他の分子が、薬学的に許容可能な、好ましくは水性担体に溶解され、または懸濁される。さらに組成物は、緩衝液、結合剤、プラスチック剤、希釈剤、香料、潤滑剤などの賦形剤を含有し得る。このような組成物中で使用され得る賦形剤の詳細な一覧は、例えば、A . K i b b e , H a n d b o o k

50

of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000) から採用され得る。組成物は、腺腫様またはがん性疾患の阻止、予防法および/または治療のために使用され得る。例示的調合物は、例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、欧州特許第 2 1 1 2 2 5 3 号明細書にある。

【0123】

本明細書のさらなる態様は、本明細書のペプチド、ペプチド変異型、TCR、および TCR 変異型をコードする核酸（例えばポリヌクレオチド）を提供する。ポリヌクレオチドは、それがペプチドをコードしさえすれば、例えば、一本鎖および/または二本鎖のいずれかの DNA、cDNA、PNA、RNA またはそれらの組み合わせであってもよく、または例えばホスホロチオエート主鎖を有するポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドの未変性または安定化形態であってもよく、それはイントロンを含有してもまたはしなくてもよい。もちろん、天然起源ペプチド結合によって連結する天然アミノ酸残基を含有するペプチドのみが、ポリヌクレオチドによってエンコードされ得る。本明細書のなおもさらなる態様は、本明細書によるポリペプチドを発現できる発現ベクターを提供する。

【0124】

例えば相補的付着端を通じて、ポリヌクレオチド、特に DNA をベクターに連結する、多様な方法が開発されている。例えば、ベクター DNA に挿入される DNA セグメントに、相補的ホモポリマー配列が付加され得る。次に、相補的ホモポリマー尾部間の水素結合によって、ベクターおよび DNA セグメントが連結されて、組換え DNA 分子が形成する。

【0125】

1 つまたは複数の制限部位を含有する合成リンカーは、DNA セグメントをベクターに連結する代替え方法を提供する。多様な制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する合成リンカーは、米国コネチカット州ニューヘイブンの International Biotechnologies Inc. をはじめとするいくつかの供給元から商業的に入手できる。

【0126】

本明細書のポリペプチドをコードする DNA を修飾する望ましい方法は、Saiki et al. (Saiki et al., 1988) で開示されるようなポリメラーゼ連鎖反応を用いる。この方法は、例えば、適切な制限部位を遺伝子操作することで、DNA を適切なベクターに導入するために使用されてもよく、またはそれは、当該技術分野で既知のその他の有用な様式で DNA を修飾するために使用されてもよい。ウイルスベクターを使用するのであれば、ボックスウイルスまたはアデノウイルスベクターが好ましい。

【0127】

一態様では、本明細書の TCR を発現する T 細胞を得るために、本明細書の TCR - および/または TCR - 鎖をコードする核酸が、レトロウイルスまたはレンチウイルスなどの発現ベクターにクローン化される。組換えウイルスが生成され、次に、抗原特異性および機能性結合活性などの機能について試験される。次に、最終生成物のアリコートを使用して、標的 T 細胞集団（一般に患者の PBMC から精製される）を形質導入し、それを患者への輸液前に増殖させる。

【0128】

別の態様では、本明細書の TCR を発現する T 細胞を得るために、例えば、生体外転写システムなどの当該技術分野で公知の技術によって、TCR RNA が合成される。次に生体外で合成された TCR RNA は、健常ドナーから得られた原発性 CD8 + T 細胞内に電気穿孔によって導入され、腫瘍特異的 TCR - および/または TCR - 鎖が再発現される。

【0129】

末梢 T 細胞に導入された TCR 鎖は、TCR 表面発現に必要である CD3 複合体との結合について、内因性 TCR 鎖と競合してもよい。高レベルの TCR 表面発現は、標的腫瘍

10

20

30

40

50

抗原を発現する細胞による始動のための適切な感受性を付与するのに必須であることから (Cooper et al., 2000; Labrecque et al., 2001)、TCR- および TCR- 遺伝子発現レベルを増強する戦略は、TCR 遺伝子治療における重要な考慮事項である。

【0130】

発現を増加させるために、本明細書のTCRをコードする核酸は、レトロウイルス長末端反復 (LTR)、サイトメガロウイルス (CMV)、マウス幹細胞ウイルス (MSCV) U3、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、 β -アクトリン、ユビキチン、およびシミアンウイルス40 (SV40) / CD43複合プロモーター (Cooper et al., 2004; Jones et al., 2009)、伸長因子 (EF) - 1a (Tsuji et al., 2005)、および脾臓フォーカス形成ウイルス (SFV) プロモーター (Joseph et al., 2008) などの強力なプロモーターと作動可能に連結されてもよい。好ましい実施形態では、プロモーターは、発現される核酸に対して異種である。

10

【0131】

強力なプロモーターに加えて、本明細書のTCR発現カセットは、レンチウイルスコンストラクトの核転座を促進する、中央ポリプリントラクト (cPPT) (Folienzi et al., 2000)、およびRNA安定性を増大させることで導入遺伝子発現のレベルを高める、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節因子 (wPRE) (Zufferey et al., 1999) をはじめとする導入遺伝子発現を高め得る追加的な要素を含有してもよい。

20

【0132】

本発明のTCRの および 鎖は、別々のベクターにある核酸によってコードされてもよく、または同一ベクターにあるポリヌクレオチドによってコードされてもよい。

【0133】

高レベルのTCR表面発現の達成には、導入されたTCRのTCR- およびTCR- 鎖の双方を高レベルで転写する必要がある。これを行うために、本明細書のTCR- およびTCR- 鎖は、この障害を克服できることが示されている、単一ベクター内のバイシストロニックコンストラクトにクローン化されてもよい。TCR- およびTCR- 鎖は、翻訳中に2つのタンパク質に分かれて等モル比のTCR- およびTCR- 鎖の生成を確実にする単一転写物から生じるので、TCR- 鎖とTCR- 鎖との間のウイルス配列内リボソーム進入部位の使用は、双方の鎖の協調発現をもたらす (Schmitt et al., 2009)。

30

【0134】

本明細書のTCRをコードする核酸はコドン最適化されて、宿主細胞からの発現が増加されてもよい。遺伝コードの重複は、いくつかのアミノ酸が2つ以上のコドンによってコードされるようにするが、特定のコードンは、適合tRNAの相対可用性ならびにその他の要因のために、他のものよりも「最適」でない (Gustafsson et al., 2004)。各アミノ酸が、哺乳類遺伝子発現のための最適コドンによってコードされるように、TCR- およびTCR- 遺伝子配列を修飾すること、ならびにmRNA不安定モチーフまたは潜在的なスプライス部位を除去することは、TCR- およびTCR- 遺伝子発現を有意に高めることが示されている (Scholten et al., 2006)。

40

【0135】

さらに、導入TCR鎖と内因性TCR鎖との間の誤対合は、重大な自己免疫リスクをもたらす特異性の獲得を引き起こすこともある。例えば、混合TCR二量体の形成は、適切に対合するTCR複合体を形成するために利用できるCD3分子の数を減少させてもよく、ひいては導入TCRを発現する細胞の機能性結合活性を有意に低下させ得る (Kuball et al., 2007)。

【0136】

50

誤対合を減少させるために、鎖間親和性を高める一方で、導入鎖が内因性TCRと対形成する能力が低下するように、本明細書の導入TCR鎖のC末端領域を修飾してもよい。これらの戦略は、ヒトTCR - およびTCR - のC末端領域をそれらのマウス対応物（マウス化C末端領域）で置換すること；導入TCRのTCR - およびTCR - 鎖の双方に第2のシステイン残基を導入することによって、C末端領域に第2の鎖間ジスルフィド結合を生成すること（システイン修飾）；TCR - およびTCR - 鎖のC末端領域内の相互作用残基を交換すること（「ノブ・イン・ホール」）；TCR - およびTCR - 鎖の可変領域をCD3 に直接融合させること（CD3 融合）を含んでもよい。（Schmitt et al. 2009）。

【0137】

次に、DNA（またはレトロウイルスベクターの場合はRNA）が適切な宿主において発現され、本明細書のペプチドまたは変異型を含んでなるポリペプチドが生産されてもよい。このようにして、本明細書に含まれる教示を考慮して適切に修正された既知の技術に従って、本明細書のペプチドまたは変異型をコードするDNAを使用して、発現ベクターが構築されてもよく、次にそれを使用して、本明細書のポリペプチドの発現および生産のために、適切な宿主細胞が形質転換される。このような技術としては、例えば、参照により本明細書に援用される、米国特許第4,440,859号明細書、米国特許第4,530,901号明細書、米国特許第4,582,800号明細書、米国特許第4,677,063号明細書、米国特許第4,678,751号明細書、米国特許第4,704,362号明細書、米国特許第4,710,463号明細書、米国特許第4,757,006号明細書、米国特許第4,766,075号明細書、および米国特許第4,810,648号明細書で開示されるものが挙げられる。

【0138】

本発明明細書の化合物を構成するポリペプチドをエンコードするDNA（またはレトロウイルスベクターの場合はRNA）は、適切な宿主への導入のために、多種多様なその他のDNA配列に連結されてもよい。コンパニオンDNAは、宿主の性質、DNAの宿主への導入様式、およびエピソームの維持または組み込みが所望されるかどうかに左右される。

【0139】

一般に、DNAは、発現のための適切な方向および正しい読み枠で、プラスミドなどの発現ベクターに挿入される。必要ならば、DNAは、所望の宿主によって認識される適切な転写および翻訳調節制御ヌクレオチド配列に連結されてもよいが、このような制御は、一般に発現ベクター中で利用できる。次に、標準的な技術を通じて、ベクターが宿主に導入される。一般に、全ての宿主がベクターによって形質転換されるわけではない。したがって、形質転換された宿主細胞を選択することが必要になる。一選択技術は、抗生物質耐性などの形質転換細胞内で選択可能な形質をコードする、任意の必要な制御因子を有するDNA配列を発現ベクター内に組み込むことを伴う。

【0140】

代案としては、このような選択可能な形質の遺伝子は、所望の宿主細胞を同時形質転換するのに使用される、別のベクター上にあり得る。

【0141】

次に、本明細書で開示される教示を考慮して、当業者に知られている適切な条件下で十分な時間にわたり、本発明の組換えDNAによって形質転換された宿主細胞が培養されてポリペプチドが発現され、次にそれが回収され得る。

【0142】

細菌（例えば大腸菌（*E. coli*）およびバチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）、酵母（例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、糸状菌（例えばアスペルギルス属（*Aspergillus*））、植物細胞、動物細胞、および昆虫細胞をはじめとする多数の発現系が知られている。好ましくは、発現系は、ATCC Cell Biology Collec

10

20

30

40

50

t i o nから入手できるC H O細胞などの哺乳類細胞であり得る。

【 0 1 4 3 】

一実施形態では、宿主細胞は、本細書のT C Rを発現するように遺伝子操作される。好ましい実施形態では、宿主細胞は、ヒトT細胞またはT細胞前駆体である。いくつかの実施形態では、T細胞またはT細胞前駆体は、がん患者から得られる。その他の実施形態では、T細胞またはT細胞前駆体は、健常ドナーから得られる。本明細書の宿主細胞は、治療される患者に関して、同種異系または自己由来であり得る。一実施形態では、宿主は、
/ T C Rを発現するように形質転換された / T細胞である。

【 0 1 4 4 】

構成的発現のための典型的な哺乳類細胞ベクタープラスミドは、適切なポリA尾部を有するC M VまたはS V 4 0プロモーター、およびネオマイシンなどの耐性マーカールを含んでなる。一例は、米国ニュージャージー州ピスカタウェイのP h a r m a c i aから入手できるp S V Lである。誘導性哺乳類発現ベクターの一例であるp M S Gもまた、P h a r m a c i aから入手できる。有用な酵母プラスミドベクターは、p R S 4 0 3 - 4 0 6 およびp R S 4 1 3 - 4 1 6であり、通常、米国郵便番号9 2 0 3 7カリフォルニア州ラホヤのS t r a t a g e n e C l o n i n g S y s t e m sから入手できる。プラスミドp R S 4 0 3、p R S 4 0 4、p R S 4 0 5、およびp R S 4 0 6は、酵母組み込みプラスミド(Y I p s)であり、酵母の選択可能なマーカールH I S 3、T R P 1、L E U 2、およびU R A 3が組み込まれている。プラスミドp R S 4 1 3 - 4 1 6は、酵母セントロメアプラスミド(Y c p s)である。C M Vプロモーターベースのベクター(例えば
S i g m a - A l d r i c h製)は、一過性または安定性発現、細胞質内発現または分泌、およびF R A G、3 x F L A G、c - m y cまたはM A Tの様々な組み合わせでのN末端またはC末端標識付けを提供する。これらの融合タンパク質は、組換えタンパク質を検出、精製、および分析できるようにする。二重標識融合物は、検出に融通性を与える。

【 0 1 4 5 】

強力なヒトサイトメガロウイルス(C M V)プロモーター調節領域は、C O S細胞内で、構成タンパク質発現レベルを1 m g / L程度の高さに駆動する。効力がより低い細胞株では、タンパク質レベルは、典型的に約0 . 1 m g / Lである。S V 4 0複製起点の存在は、S V 4 0複製許容C O S細胞内で高レベルのD N A複製をもたらす。C M Vベクターは、例えば、細菌細胞内のp M B 1 (p B R 3 2 2の誘導体)複製起点、細菌におけるアンピシリン耐性選択のためのb - ラクタマーゼ遺伝子、h G HポリA、およびf 1起点を含有し得る。プレプロトリプシンリーダー(P P T)配列を含有するベクターは、抗F R A G抗体、樹脂、およびプレートを使用した精製のために、培養液中へのF R A G融合タンパク質分泌を誘導し得る。多様な宿主細胞と共に使用するためのその他のベクターおよび発現系が、当該技術分野で周知である。

【 0 1 4 6 】

別の実施形態では、本明細書の2つ以上のペプチドまたはペプチド変異型がコードされ、したがって順次発現される(「数珠玉構造」コンストラクトと同様)。その際に、ペプチドまたはペプチド変異型は、例えばL L L L L Lなどの一続きのリンカーアミノ酸によって、共に連結または融合されてもよく、またはそれらの間のいかなる追加的なペプチドもなしに連結されてもよい。これらのコンストラクトはまた、がん療法のために使用され得て、M H C IとM H C I Iの双方が関与する免疫応答を誘導してもよい。

【 0 1 4 7 】

本明細書はまた、本明細書のポリヌクレオチドベクターコンストラクトで形質転換された宿主細胞にも関する。宿主細胞は、原核または真核生物のどちらかであり得る。細菌細胞は、いくつかの状況では、好ましい原核宿主細胞であってもよく、典型的には、例えば、米国メリーランド州ベセスダのB e t h e s d a R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s I n c . , から入手できる大腸菌(E . c o l i) D H 5 株、および米国メリーランド州ロックビルの米国微生物系統保存機関(A T C C)から入手できるR R 1 (A T C C 番号3 1 3 4 3) などの大腸菌(E . c o l i) 株である。好ましい真核宿主細胞

10

20

30

40

50

胞としては、酵母、昆虫、および哺乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒトの線維芽細胞株および結腸細胞株に由来するものなどの脊椎動物細胞が挙げられる。酵母宿主細胞としては、米国郵便番号92037カリフォルニア州ラホヤのStratagene Cloning Systemsから一般に入手できる、YPH499、YPH500、およびYPH501が挙げられる。好ましい哺乳類宿主細胞としては、ATCCからCCL61として入手できるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ATCCからCRL1658として入手できるNIH Swissマウス胚細胞NIH/3T3、ATCCからCRL1650として入手できるサル腎臓由来COS-1細胞、およびヒト胎児由来腎細胞である293細胞が挙げられる。好ましい昆虫細胞は、バキュロウイルス発現ベクターで形質移入され得るSf9細胞である。発現のための適切な宿主細胞の選択に関する概説は、例えば、Paulina BalbasおよびArgelia Larenceの教科書、"Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9、および当業者に知られているその他の文献にある。

【0148】

本明細書のDNAコンストラクトによる適切な細胞宿主の形質転換は、典型的に使用されるベクターのタイプに依存する周知の方法によって達成される。原核宿主細胞の形質転換に関しては、例えば、Cohen et al. (Cohen et al., 1972) および (Green and Sambrook, 2012) を参照されたい。酵母細胞の形質転換は、Sherman et al. (Sherman et al., 1986) に記載される。Beggs (Beggs, 1978) の方法もまた有用である。脊椎動物細胞に関しては、このような細胞を形質移入するのに有用な、例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストランまたはリボソーム製剤などの試薬が、米国郵便番号20877メリーランド州ゲイザースバーグのLife Technologies Inc., から入手できる。電気穿孔もまた、細胞を形質転換および/または形質移入するのに有用であり、酵母細胞、細菌細胞、昆虫細胞、および脊椎動物細胞を形質転換する技術分野で周知である。

【0149】

成功裏に形質転換細胞、すなわち本明細書のDNAコンストラクトを含有する細胞は、PCRなどの周知の技術によって同定され得る。代案としては、抗体を使用して、上清中のタンパク質の存在が検出され得る。

【0150】

例えば、細菌、酵母、および昆虫細胞などの本発明の特定の宿主細胞が、本発明のペプチドの調製において有用であることが理解されるであろう。しかしその他の宿主細胞が、特定の治療法において有用であってもよい。例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞は、それらが適切なMHC分子中に負荷されてもよいように、本明細書のペプチドを発現するために有用に使用されてもよい。したがって、本明細書は、本明細書による核酸または発現ベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。

【0151】

好ましい実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞、特に樹状細胞または抗原提示細胞である。前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)を含有する組換え融合タンパク質が負荷されたAPCは、無症候性または微小症候性転移性HRPCを治療するために、米国食品医薬品局(FDA)によって2010年4月20日に認可された(シプロイセルT)(Rini et al., 2006; Small et al., 2006)。

【0152】

本明細書のさらなる態様は、宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞またはその培養液からペプチドを単離するステップとを含んでなる、ペプチドまたはその変異型を生産する方法を提供する。

【0153】

別の実施形態では、本明細書のTCR、核酸または発現ベクターは、医療において使用される。例えば、ペプチドまたはその変異型は、静脈内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹腔内(i.p.)注射、筋肉内(i.m.)注射のために調合されてもよい。ペプチド注射の好ましい方法としては、s.c、i.d、i.p、i.m、およびi.v.が挙げられる。DNA注射の好ましい方法としては、i.d、i.m、s.c、i.p、およびi.v.が挙げられる。例えば、50 µg ~ 1.5 mg、好ましくは125 µg ~ 500 µgのペプチドまたはDNAの用量が投与されてもよく、それぞれのペプチドまたはDNAに左右される。この範囲の用量は、以前の治験で成功裏に使用された(Walter et al., 2012)。

【0154】

活性ワクチン接種のために使用されるポリヌクレオチドは、実質的に純粋であってもよく、または適切なベクターまたは送達系に含有されてもよい。核酸は、DNA、cDNA、PNA、RNAまたはそれらの組み合わせであってもよい。このような核酸をデザインして導入する方法は、当該技術分野で周知である。概説は、例えば、Teufel et al. (Teufel et al., 2005)によって提供される。ポリヌクレオチドワクチンは調製が容易であるが、免疫応答誘導におけるこれらのベクターの作用機構は、完全には分かっていない。適切なベクターおよび送達系としては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、または2つ以上のウイルスの構成要素を含有するハイブリッドベースのシステムなどのウイルスDNAおよび/またはRNAが挙げられる。非ウイルス送達系としては、カチオン性脂質およびカチオン性ポリマーが挙げられ、DNA送達技術分野において周知である。「遺伝子銃」などを介した、物理的送達もまた使用されてもよい。核酸によってコードされるペプチド(単数)またはペプチド(複数)は、例えば、上述のように、それぞれの逆CDRのT細胞を刺激する、エピトープとの融合タンパク質であってもよい。

【0155】

本明細書は、アプタマーにさらに関する。アプタマー(例えば、国際公開第2014/191359号パンフレット、およびその中で引用される文献を参照されたい)は、短い一本鎖核酸分子であり、それは、所定の三次元構造に折り畳まれて、特異的標的構造体を認識し得る。それらは、標的療法を開発するための適切な代案のようであった。アプタマーは、高い親和性および特異性で、多様な複合体標的と選択的に結合することが示されている。

【0156】

細胞表面に位置する分子を認識するアプタマーは、過去10年以内に同定されており、診断および治療的アプローチを開発する手段を提供する。アプタマーは、毒性および免疫原性がほぼ皆無であることが示されているので、それらは生物医学的用途のための有望な候補である。確かに、例えば、前立腺特異的膜抗原認識アプタマーなどのアプタマーは、標的療法のために成功裏に用いられており、異種移植片生体内モデルにおいて機能できることが示されている。さらに、特異的腫瘍細胞株を認識するアプタマーが同定されている。

【0157】

DNAアプタマーは、様々ながん細胞、特に固形腫瘍に由来するものに対して広域スペクトル認識特性を示す一方で、非腫瘍発生性および主要健常細胞を認識しないように選択され得る。同定されたアプタマーが、特異的腫瘍サブタイプを認識するだけでなく、むしろ一連の腫瘍と相互作用する場合、これは、アプタマーをいわゆる広域スペクトル診断薬および治療薬として応用可能にする。

【0158】

さらに、フローサイトメトリーによる細胞結合挙動の調査は、アプタマーがナノモル濃度範囲内の非常に良好な見かけの親和性を見せたことを示した。

【0159】

アプタマーは、診断および治療目的で有用である。一態様では、少なくとも1つまたはそれ以上のアプタマーが腫瘍細胞に取り込まれ、したがってsiRNAなどの抗がん剤の

10

20

30

40

50

腫瘍細胞への標的化送達のための分子ビヒクルとして機能し得る。

【0160】

アプタマーは、細胞 S E L E X (試験管内進化法) 技術を使用して、細胞および組織などの複合体標的に対して、および本明細書による配列番号 14 ~ 配列番号 15 のいずれかに記載の配列と M H C 分子とを含んでなり、好ましくはそれからなるペプチド複合体または T C R などに対して、選択され得る。

【0161】

一実施形態では、本明細書は、本明細書に記載されるような T C R を製造する方法を提供し、方法は、T C R の発現を促進するのに適した条件下で T C R を発現できる、宿主細胞を培養するステップを含んでなる。

10

【0162】

本明細書は、本明細書による T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、H L A - A * 02 陰性健常ドナーに由来する P B M C を A 2 / I G F 2 B P 3 モノマーと共にインキュベートするステップと、P B M C を四量体フィコエリトリン (P E) と共にインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞分類 (F A C S) - C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

【0163】

本明細書は、本明細書による T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、H L A - A * 02 陰性健常ドナーに由来する P B M C を A 2 / p 2 8 6 - 1 Y 2 L モノマーと共にインキュベートするステップと、P B M C を四量体フィコエリトリン (P E) と共にインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞分類 (F A C S) - C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

20

【0164】

本明細書は、本明細書による T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、H L A - A * 02 陰性健常ドナーに由来する P B M C を A 2 / p 2 8 6 - 1 Y 2 L 9 L モノマーと共にインキュベートするステップと、P B M C を四量体フィコエリトリン (P E) と共にインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞分類 (F A C S) - C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

【0165】

本明細書は、本明細書に従って T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、その T 細胞がマウス T C R 欠損を補償する多様なヒト T C R レパートリーを発現する、全ヒト T C R 遺伝子遺伝子座 (1 . 1 および 0 . 7 M b) を有する遺伝子組換えマウスを得るステップと、マウスを I G F 2 B P 3 - 0 0 1 で免疫化するステップと、四量体フィコエリトリン (P E) を有する遺伝子組換えマウスから得られた P B M C をインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞選別 (F A C S) C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

30

【0166】

本明細書は、本明細書に従って T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、その T 細胞がマウス T C R 欠損を補償する多様なヒト T C R レパートリーを発現する、全ヒト T C R 遺伝子遺伝子座 (1 . 1 および 0 . 7 M b) を有する遺伝子組換えマウスを得るステップと、マウスを p 2 8 6 - 1 Y 2 L で免疫化するステップと、四量体フィコエリトリン (P E) を有する遺伝子組換えマウスから得られた P B M C をインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞選別 (F A C S) C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

40

【0167】

本明細書は、本明細書に従って T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、その T 細胞がマウス T C R 欠損を補償する多様なヒト T C R レパートリーを発現する、全ヒト T C R 遺伝子遺伝子座 (1 . 1 および 0 . 7 M b) を有する遺伝子組換えマウスを得るステップと、マウスを p 2 8 6 - 1 Y 2 L 9 L で免疫化するステップと、四量体フィコエリトリン (P E) を有する遺伝子組換えマウスから得られた P B M C をインキュ

50

ベートするステップと、高結合活性T細胞を蛍光活性化細胞選別(FACS)Calibur分析によって単離するステップとを含んでなる。

【0168】

本明細書は、T細胞が、本明細書によるATCRを発現できる発現ベクターを含んでなる、本明細書による方法にさらに関する。

【0169】

本明細書は、本明細書による有効数のTCR、可溶性TCRおよび/またはT細胞を患者に投与するステップを含んでなる、その標的細胞がIGF2BP3を異常に発現する患者において、標的細胞を死滅させる方法にさらに関する。

【0170】

本明細書は、記載される任意のTCR、本明細書による核酸、本明細書による発現ベクター、本明細書による細胞、または本明細書による活性化細胞傷害性Tリンパ球の、薬剤としての、または薬剤の製造における、使用にさらに関する。本明細書は、薬剤ががんに対して有効である、本明細書による使用にさらに関する。

【0171】

本明細書はさらに、本明細書による使用に関し、前記がん細胞は、非小細胞肺癌細胞であり、または非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がんなどのその他の固形または血液学的腫瘍細胞である。

【0172】

本発明は、がん細胞を本明細書の宿主細胞と接触させるステップを含んでなる、がん細胞を死滅させる方法にさらに関する。一実施形態では、宿主細胞は、本明細書のTCRを発現する。一実施形態では、宿主細胞は、T細胞またはT細胞前駆体である。一実施形態では、好ましい実施形態では、がん細胞は、非小細胞肺癌細胞；または非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がんなどのその他の固形または血液学的腫瘍細胞から選択される。いくつかの実施形態では、TCRは、治療効果のある薬剤にコンジュゲートされる。特定の実施形態では、治療効果のある薬剤は、放射性核種、化学療法剤、および毒素からなる群から選択される。

【0173】

本発明は、本発明の宿主細胞をそれを必要とする対象に投与するステップを含んでなる、がんを治療する方法にさらに関する。一実施形態では、宿主細胞は、本明細書のTCRを発現する。一実施形態では、宿主細胞は、T細胞またはT細胞前駆体である。1つの実施形態では、宿主細胞は、治療される対象にとって自己由来である。別の実施形態では、宿主細胞は、処置される対象に対して同種異系である。好ましい実施形態では、がん細胞は、非小細胞肺癌細胞；または非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がんなどのその他の固形または血液学的腫瘍細胞から選択される。

【0174】

いくつかの実施形態では、TCRは、治療効果のある薬剤にコンジュゲートされる。本明細書の用法では、「治療効果のある薬剤」という用語は、疾患または望ましくない医学的状态を治療または予防するために使用される化合物を意味する。一実施形態では、治療効果のある薬剤を使用して、がんが治療または予防される。特定の実施形態では、治療効果のある薬剤は、放射性核種、化学療法剤、および毒素からなる群から選択される。

【0175】

本明細書のTCR、核酸、および宿主細胞、そしてその医薬組成物は、当該技術分野で公知であり、治療されるがん型次第で変動してもよい経路によって、それを必要とする対

10

20

30

40

50

象に投与されてもよい。投与経路としては、例えば、局所投与（腫瘍内など）と、皮下、腹腔内、筋肉内、静脈内、門脈内および肝臓内などの非経口投与とが挙げられる。好ましい実施形態では、本明細書のTCR、核酸または宿主細胞、またはその医薬組成物は、例えば、点滴ポンプおよび/またはカテーテル装置を用いた、固形腫瘍などの治療される部位への局所注入によって、対象に投与される。一実施形態では、本明細書の組成物は、固形腫瘍、固形腫瘍に供給する血管、および/または固形腫瘍を取り囲む領域に注入される。

【0176】

好ましい実施形態では、本明細書の組成物は、少なくとも24時間隔てられた少なくとも2回の投与の投与レジメンを用いて対象に投与される。本明細書の組成物を投与するのに適した投与レジメンとしては、例えば、1日1回、2日に1回、3日に1回などが挙げられる。より好ましい投与レジメンとしては、週1回、週2回、隔週1回、月1回、および月2回が挙げられる。特定の実施形態では、用量漸増レジメンが使用され、一連の増加用量が、数日間、数週間または数ヶ月間に対象に投与される。

10

【0177】

本発明のTCRを発現する宿主細胞の有効用量としては、例えば、1用量当たり少なくとも約 10^4 、少なくとも約 10^5 、少なくとも約 10^6 、少なくとも約 10^7 、少なくとも約 10^8 、少なくとも約 10^9 、および少なくとも 10^{10} 個の宿主細胞が挙げられる。一実施形態では、本明細書の宿主細胞は、1用量当たり約 10^4 ～約 10^{10} 個の細胞の用量、好ましくは1用量当たり 10^5 ～約 10^9 個の細胞の用量で投与される。好ましい実施形態では、用量は、少なくとも2回またはそれ以上の投与サイクルにわたって、投与レジメンで投与される。

20

【0178】

本発明はまた、少なくとも1つの化学療法剤および/または放射線療法と組み合わせて、本明細書のTCR、核酸、または宿主細胞を投与するステップを含んでなる、がんを治療する方法にも関する。

【0179】

a) 細胞を前記対象から単離するステップと；
b) 本明細書のTCRをコードする少なくとも1つのベクターで細胞を形質転換して、形質転換細胞を生成するステップと；
c) 形質転換細胞を増殖させて、複数の形質転換細胞を生成するステップと；
d) 複数の形質転換細胞を前記対象に投与するステップと
を含んでなる、それを必要とする対象においてがんを治療する方法もまた提供される。

30

【0180】

a) 細胞を健常ドナーから単離するステップと；
b) 本明細書のTCRをコードするベクターで細胞を形質転換して、形質転換細胞を生成するステップと；
c) 形質転換細胞を増殖させて、複数の形質転換細胞を生成するステップと；
d) 複数の形質転換細胞を前記対象に投与するステップと
を含んでなる、それを必要とする対象においてがんを治療する方法もまた提供される。

40

【0181】

a) 生物学的サンプルを本明細書のTCRに接触させるステップと；
b) 生物学的サンプルへのTCRの結合を検出するステップと
を含んでなる、生物学的サンプルにおいてがんを検出する方法もまた提供される。

【0182】

いくつかの実施形態では、がんを検出する方法は、生体外、生体内または原位置で実施される。

【0183】

本明細書は、小細胞肺がんの診断および/または予後診断において使用され得る、本明

50

細書で「標的」と称される、本明細書によるペプチドベースの特定の標識タンパク質およびバイオマーカーにさらに関する。本明細書はまた、がん治療のためのこれらの新規標的の使用に関する。

【0184】

特異的ペプチド-MHC複合体を認識する可溶性T細胞受容体(sTCR)を生産する方法を提供することまた、本明細書のさらなる態様である。このような可溶性T細胞受容体は、特異的T細胞クローンから生成され得て、それらの親和性は、相補性決定領域を標的化する変異誘発によって増加され得る。T細胞受容体の選択目的で、ファージディスプレイが利用され得る(米国特許第2010/0113300号明細書、(Liddy et al., 2012))。ファージディスプレイ中に、そして薬剤として実用する際に、T細胞受容体を安定化させる目的で、例えば、非天然ジスルフィド結合、その他の共有結合(一本鎖T細胞受容体)、または二量体化ドメインによって、および鎖を連結させ得る(Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999)。T細胞受容体は、標的細胞上で特定機能を発揮させるために、毒素、薬剤、サイトカイン(例えば、米国特許第2013/0115191号明細書を参照されたい)、または抗CD3ドメインのようなエフェクター細胞動員ドメインなどに、連結させ得る。別の態様では、それは養子免疫伝達のために使用されるT細胞内で発現される。例えば、その内容全体が参照により援用される、国際公開第2004/033685A1号パンフレット、国際公開第2004/074322A1号パンフレット、および国際公開第2013/057586A1号パンフレットを参照されたい。

10

20

【0185】

さらに本明細書のペプチドおよび/またはTCRまたは抗体またはその他の結合分子を使用して、病理学者の生検サンプルに基づくがん診断を確認し得る。

【0186】

抗体またはTCRはまた、生体内診断アッセイのために使用されてもよい。通常、抗体またはTCRは、腫瘍が位置確認され得るように、免疫シンチグラフィ(immunoscintigraphy)を使用して、放射性ヌクレオチド(^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{32}P または ^{35}S など)で標識される。一実施形態では、抗体またはそれらの断片は、上述のタンパク質からなる群から選択されるタンパク質の2つ以上の標的の細胞外ドメインに結合し、親和性(K_d)は $1 \times 10 \mu\text{M}$ 未満である。

30

【0187】

診断用の抗体またはTCRは、様々なイメージング法による検出に適するプローブで標識されてもよい。プローブの検出方法としては、蛍光、光学、共焦点および電子顕微鏡検査; 磁気共鳴画像法および分光法; 蛍光透視法、コンピュータ断層撮影および陽電子放射型断層撮影法が挙げられるが、これに限定されるものではない。適切なプローブとしては、フルオレセイン、ローダミン、エオジンおよびその他のフルオロフォア、放射性同位体、金、ガドリニウムおよびその他のランタニド、常磁性鉄、フッ素 ^{18}F およびその他の陽電子放出放射性核種が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに、プローブは二官能価または多官能価であってもよく、列挙される方法の2つ以上によって検出可能であってもよい。これらの抗体および/またはTCRは、前記プローブで、直接または間接的に標識されてもよい。特に十分に技術分野で承認されている、プローブの抗体および/またはTCRへの付着としては、プローブの共有結合、プローブの抗体またはTCRへの組み込み、およびプローブ結合のためのキレート化合物の共有結合が挙げられる。免疫組織化学的検査では、疾患組織サンプルは、新鮮または冷凍であってもよく、またはパラフィン包埋されてホルマリンなどの保存料で固定されてもよい。サンプルを含有する固定または包埋切片は、標識一次抗体および二次抗体と接触されて、抗体を使用して原位置タンパク質発現が検出される。

40

【実施例】

【0188】

50

アロ反応性設定を使用して自己免疫寛容を回避し、自己由来設定、すなわち、患者に由来するT細胞と比較してより高い結合活性を有する、T細胞もをたらし得る。このような設定の例としては、アロHLA反応性ペプチド特異的T細胞の生体外生成 (S a d o v n i k o v a e t a l . 1 9 9 8 ; S a v a g e e t a l . 2 0 0 4 ; W i l d e e t a l . 2 0 1 2)、およびヒトMHCまたはヒトTCRについて遺伝子組換えであるマウスの免疫化 (S t a n i s l a w s k i e t a l . 2 0 0 1 ; L i e t a l . 2 0 1 0) が挙げられる。

【0189】

実施例1：アロHLA反応性ペプチド特異的T細胞の生体外生成 (S a v a g e e t a l . 2 0 0 4)

告知に基づく同意を得た後、HLA-A*02陽性およびHLA-A*02陰性の健康ドナーからのPBMCを使用した。組換えビオチン化HLA-A2クラスIIモノマーと、IGF2BP3-001を含有するA2蛍光性四量体をMBLI (マサチューセッツ州ウーバン) から得た。リン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈した抗CD20SAと共に、PBMCを室温で1時間培養し、洗浄して、ビオチン化A2/IGF2BP3-001モノマーと共に室温で30分間培養し、洗浄して、24ウェルプレート内の001%ヒトAB血清添加RPMIに、 3×10^6 細胞/ウェルで播種した。インターロイキン7 (IL-7; R&D systems、ミネソタ州ミネアポリス) を1日目に10ng/mLで添加し、IL-2 (英国ヘアフィールドのChiron) を4日目に10U/mLで添加した。5週間にわたり、細胞を新鮮なPBMCで毎週再刺激し、応答性細胞と1:1の比で混合して、24ウェルプレートに 3×10^6 /ウェルで播種した。

【0190】

高結合活性T細胞を得るために、およそ 10^6 のPBMCをHLA-A2/IGF2BP3-001四量体フィコエリトリン (PE) (MBLIから得た) と共に、37°Cで001分間培養し、それに続いて抗CD8イソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) /アロフィコシアニン (APC) と共に4°Cで20分間培養し、蛍光活性化細胞分類 (FACS) - Calibur分析がそれに続いた。選別は、FACS-Vantage (英国オックスフォード市カウリーのBecton Dickinson) を用いて実施した。ウェル当たり、 2×10^5 の選別された細胞、フィーダーとしての 2×10^6 照射A2陰性PBMC、 2×10^4 のCD3/CD28ビーズ/mL (ノルウェイ国オスロのDyna1)、およびIL-2 (1000U/mL) を使用して、選別された四量体陽性細胞を24ウェルプレート内で増殖させた。次に、このようにして得られた高結合活性T細胞を使用して、単細胞5'RACE (cDNA末端の迅速増幅) などの当該技術分野で公知の技術を用いてTCRを同定し単離した。次に、非重複TCR DNAをアミノ酸/DNA配列決定について分析し、当該技術分野で周知の方法を用いて発現ベクターにクローニングした。

【0191】

実施例2：TCRのクローニング

TCRのクローニング法は、例えば、前記方法に関してその内容全体が参照により本明細書に援用される、米国特許第8,519,100号明細書に記載されるように、当該技術分野で公知である。制限部位NdeIをコードする 鎖可変領域配列特異的オリゴヌクレオチドA1 (g g a a t t c c a t a t g a g t c a a c a a g g a g a a g a a g a t c c 配列番号22)、細菌における発現の効率的な開始のために導入されたメチオニン、および制限部位SalIをコードする 鎖定常領域配列特異的オリゴヌクレオチドA2 (t t g t c a g t c g a c t t a g a g t c t c t c a g c t g g t a c a c g 配列番号23) を使用して、鎖可変領域を増幅した。鎖の場合、制限部位NdeIをコードする 鎖可変領域配列特異的オリゴヌクレオチドB1 (t c t c t c a t a t g g a t g g t g g a a t t a c t c a a t c c c c a a 配列番号24)、細菌における発現の効率的な開始のために導入されたメチオニン、および制限部位AgeIをコードする 鎖定常領域配列特異的オリゴヌクレオチドB2 (t a g a a a c c g g t g g c c a g g c a c

a c c a g t g t g g c 配列番号 25) を使用して、鎖可変領域を増幅した。

【0192】

TCR 鎖をコードする DNA 配列を Nde I および Sal I で切断し、pGMT7 + C ベクターにライゲートし、それを Nde I および Xho I で切断した。TCR 鎖をコードする DNA 配列を Nde I および Age I で切断し、別個の pGMT7 + C ベクターにライゲートし、それもまた Nde I および Age I で切断した。ライゲートされたプラスミドをコンピテント大腸菌 (*Escherichia coli*) 株 XL1-blue 細胞に形質転換し、100 µg/ml のアンピシリンを含有する LB/寒天プレート上に播種する。37 °C で一晩インキュベートした後、単一コロニーを選択し、100 µg/ml のアンピシリンを含有する 10 ml の LB 中で一晩 37 °C で振盪しながら増殖させる。クローン化プラスミドを Miniprep キット (Qiagen) を用いて精製し、挿入断片を自動 DNA 配列決定装置 (Lark Technologies) を用いて配列決定する。

10

【0193】

腫瘍特異的 TCR- および TCR- 鎖をコードする TCR R10P1A7 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は、Walter et al., 2003 に記載の方法に従って、生体外刺激した。標的特異的細胞は、引き続き TCR 単離のために、標的特異的多量体を使用して単細胞ソートした。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 R10P1A7 は、HLA-A2 陰性ドナーから単離した。TCR R20P1H7、R7P1D5、および R10P2G12 の および 可変領域を配列決定した。

20

【0194】

R10P1A7 TCR 可変ドメインは、配列番号 2 の残基 22 ~ 130 に対応するアミノ酸配列を有することが見いだされた。R10P1A7 TCR 可変ドメインは、配列番号 10 の残基 26 ~ 139 に対応するアミノ酸配列を有することが見いだされた。

【0195】

ファージディスプレイを用いて TCR 変異型のライブラリーを作成し、高親和性変異体を同定し得た。表 1 に記載の TCR から選択された参照 TCR に、(Li et al., (2005) Nature Biotech 23(3): 349-354) に記載される TCR ファージディスプレイおよびスクリーニングを適用し得る。

30

【0196】

例えば、配列番号 2 の 鎖配列の全ての 3 つの CDR 領域；配列番号 10 の 鎖配列の全ての 3 つの CDR 領域を変異誘発によって標的化し得て、各 CDR ライブラリーは別々にパンニングおよびスリーニングする。

【0197】

したがって、参照 TCR の少なくとも 2 倍の (したがって、天然 TCR の少なくとも 2 倍であることが暗示される) 親和性および / または結合半減期を有する TCR が同定され得る。

40

【0198】

定常領域に導入されたシステインをはじめとする方法を用いて、TCR ヘテロ二量体を再折りたたみし、人工鎖間ジスルフィド結合を提供する。このようにして、(a) 変異鎖と共に参照 TCR 鎖；(b) 変異鎖と共に参照 TCR 鎖；および (c) 変異可変ドメインを含む鎖および鎖の様々な組み合わせからなる TCR を調製する。

【0199】

高親和性の可溶性ジスルフィド結合 TCR と、TCR 変異型、および天然ペプチド KIQEILTQV (配列番号 1) HLA-A 複合体との間の相互作用は、BIAcore 法を用いて分析し得る。

【0200】

50

高親和性 T C R 変異型はまた、酵母、または T 細胞ディスプレイによって、C D R 変異体のライブラリーから選択され得る (H o l l e r e t a l . 2 0 0 3 ; C h e r v i n e t a l . 2 0 0 8) 。したがって、候補 T C R 変異型は、T C R の C D R の変異をデザインして、高結合活性の T C R 変異型を得るための指針を提供する (R o b b i n s e t a l . 2 0 0 8 ; Z o e t e e t a l . 2 0 0 7) 。

【 0 2 0 1 】

実施例 3 : 自己 T 細胞の遺伝子操作

T 細胞は、高結合活性 T C R (いわゆる T C R 療法) 、または M H C I / I G F 2 B P 3 - 0 0 1 複合体または M H C I I / I G F 2 B P 3 - 0 0 1 複合体に対する抗原特異性が増強されたタンパク質融合由来キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように、遺伝子操作し得る。一態様では、このアプローチは、中枢および末梢寛容に関連するいくつかの制限を克服し、患者における新生 T 細胞活性化の必要なしに、腫瘍の標的化においてより効率的な T 細胞を生じる。

【 0 2 0 2 】

一態様では、本明細書の T C R を発現する T 細胞を得るために、実施例 1 ~ 2 に記載されるように同定され単離された腫瘍特異的 T C R - および / または T C R - 鎖をコードする核酸を、レトロウイルスまたはレンチウイルスなどの発現ベクターにクローン化する。組換えウイルスが生成され、次に、抗原特異性および機能性結合活性などの機能について試験される。次に、最終生成物のアリコートを使用して、標的 T 細胞集団 (一般に患者の P B M C から精製される) を形質導入し、それを患者への輸液前に増殖させる。

【 0 2 0 3 】

別の態様では、本明細書の T C R を発現する T 細胞を得るために、例えば、生体外転写システムなどの当該技術分野で公知の技術によって、T C R R N A が合成された。次に生体外で合成された T C R R N A は、健常ドナーから得られた原発性 C D 8 + T 細胞内に電気穿孔によって導入され、腫瘍特異的 T C R - および / または T C R - 鎖が再発現された。

【 0 2 0 4 】

外因性 T C R が形質転換 T 細胞の細胞表面で機能的に発現しているかどうかを試験するために、四量体染色技術を用いて M H C / I G F 2 B P 3 - 0 0 1 結合 T 細胞を検出した。図 5 および表 2 に示されるように、M H C / 無関係のペプチド (例えば N Y E S O 1 - 0 0 1) 四量体 (例えば 1 . 5 3 %) によるよりも、または模擬対照 (例えば 1 . 7 3 %) によるよりも、蛍光標識 M H C / I G F 2 B P 3 - 0 0 1 四量体染色によって、C D 3 陽性特異的 T 細胞集団のより高い百分率、すなわち 6 . 7 8 % が、T C R 発現 C D 8 + T 細胞内で観察された。対照として、M H C / N Y E S O 1 - 0 0 1 複合体と特異的に結合することが知られている対照 T C R である 1 G 4 T C R で形質転換された初代 C D 8 + T 細胞は、M H C / N Y E S O 1 - 0 0 1 四量体によって容易に検出され、すなわち、1 7 . 6 9 % であった。これらの結果は、T C R R 1 0 P 1 A 7 が T 細胞表面で発現され、M H C / I G F 2 B P 3 - 0 0 1 複合体と特異的に結合し得ることを示唆する。T C R 1 G 4 の 鎖および 鎖は、それぞれ配列番号 2 0 および 2 1 で示される。

1 G 4 鎖 (配列番号 2 0) : M E T L L G L L I L W L Q L Q W S S K Q E V T Q I P A A L S V P E G E N L V L N C S F T D S A I Y N L Q W F R Q D P G K G L T S L L L I Q S S Q R E Q T S G R L N A S L D K S S G R S T L Y I A A S Q P G D S A T Y L C A V R P T S G G S Y I P T F G R G T S L I V H P Y I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T V L D M R S M D F K S N S A V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S S C D V K L V E K S F E T D T N L N F Q N L S V I G F R I L L L K V A G F N L L M T L R L W S S

1 G 4 鎖 (配列番号 2 1) : M S I G L L C C A A L S L L W A G P V N A G V T Q T P K F Q V L K T Q Q S M T L Q C A Q D M N H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S Y V G N T G E L F F G E G S R L T V L E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S E S Y Q Q G V L S A T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S R G

T C R の特異性および親和性を判定するために、形質転換された C D 8 + T 細胞を、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 が負荷された標的細胞と、または同種であるが無関係のペプチド C L

U A - 0 0 1 (配列番号 2 6)、C H C H D 6 - 0 0 1 (配列番号 2 7)、C D C 4 2 B P G - 0 0 1 (配列番号 2 8)、P A R P 1 4 - 0 0 2 (配列番号 2 9)、S Y N E 2 - 0 0 1 (配列番号 3 0)、I F T 7 - 0 0 1 (配列番号 3 1)、D H R S 1 2 - 0 0 1 (配列番号 3 2)、S T X 1 2 - 0 0 1 (配列番号 3 3)、E E A - 0 0 1 (配列番号 3 4)、S E N P 7 - 0 0 1 (配列番号 3 5)、または対照ペプチド N Y E S O 1 - 0 0 1 (配列番号 3 6) が負荷された標的細胞と同時にインキュベートし、I F N - 放出アッセイがそれに続いた。未負荷標的細胞および C D 8 + T 細胞単独が、対照の役割を果たした。C D 8 + T 細胞からの I F N - 分泌は、細胞毒性活性を有する T 細胞活性化の指標となる。

【 0 2 0 5 】

10

【表 2】

TCRコード	ドナー /HLA-A2 (+または-)	IFN γ (pg/ml)	EC50	%IGF2BP3-001 TET 陽性原発性CD8+T 細胞	%YES01-001 TET陽性原発性 CD8+T細胞
R10P1A7	HBC-688/(+)	175	約1nM	6.78	1.53

【 0 2 0 6 】

図 6 に示されるように、本開示の T C R R 1 0 P 1 A 7 をコードする R N A で電気穿孔された初代 C D 8 + T 細胞は、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 が負荷された標的細胞との同時インキュベーション後に、対照ペプチドが負荷された標的細胞によって刺激されたもの、および対照よりも、はるかに高レベルの I F N - を放出した。標的ペプチド滴定分析は、約 1 n M の E C 5 0 を示した (表 2)。これらの結果は、本発明の T C R R 1 0 P 1 A 7 が、M H C / I G F 2 B P 3 - 0 0 1 複合体との特異的相互作用を通じて、例えば I F N - 放出などの細胞毒性 T 細胞活性を活性化し得ることを示唆する。

20

【 0 2 0 7 】

M H C / I G F 2 B P 3 - 0 0 1 複合体に対する T C R R 1 0 P 1 A 7 の結合モチーフを判定するために、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 ペプチドの 9 個のアミノ酸のそれぞれでポジショナルアラニンスキャニング分析を実施した。アラニン置換 I G F 2 B P 3 - 0 0 1 ペプチドは、表 3 に示される。

【 0 2 0 8 】

【表 3】

位置:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IGF2BP3-001 (SEQ ID NO:1)	K	I	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A1 (SEQ ID NO:37)	A	I	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A2 (SEQ ID NO:38)	K	A	Q	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A3 (SEQ ID NO:39)	K	I	A	E	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A4 (SEQ ID NO:40)	K	I	Q	A	I	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A5 (SEQ ID NO:41)	K	I	Q	E	A	L	T	Q	V
IGF2BP3-001 A6 (SEQ ID NO:42)	K	I	Q	E	I	A	T	Q	V
IGF2BP3-001 A7 (SEQ ID NO:43)	K	I	Q	E	I	L	A	Q	V
IGF2BP3-001 A8 (SEQ ID NO:44)	K	I	Q	E	I	L	T	A	V
IGF2BP3-001 A9 (SEQ ID NO:45)	K	I	Q	E	I	L	T	Q	A

30

【 0 2 0 9 】

簡潔に述べると、T C R R 1 0 P 1 A 7 で形質転換された C D 8 + T 細胞を、I G F 2 B P 3 - 0 0 1、I G F 2 B P 3 - 0 0 1 - A 1 ~ I G F 2 B P 3 - 0 0 1 - A 9、または対照ペプチド N Y E S O 1 - 0 0 1 ペプチドが負荷された標的細胞と同時にインキュベートし、上記のような I F N 放出アッセイがそれに続いた。

40

【 0 2 1 0 】

T C R R 1 0 P 1 A 7 のポジショナルアラニンスキャニング分析の結果は図 7 に示され、表 4 に要約される。

【 0 2 1 1 】

【表 4】

TCR	TCR結合を可能にするIGF2BP3-001位置
R10P1A7	1、3～7

【0212】

同一モチーフを有するTCR R10P1A7に対するA*02結合ペプチドのゲノムワイドスクリーニングは、潜在的に交差反応性のペプチドがないことを明らかにした。これらの結果は、本明細書に記載されるTCRが、オフターゲット効果のリスクが低下した、非常に特異的な認識パターンを示すことを示唆する。

【0213】

本明細書に記載のTCRを発現するT細胞の有効性を判定するために、TCR R10P1A7のRNAで電気穿孔された初代CD8+T細胞を、例えば、HLA-A2陽性およびIGF2BP3-001(標的)陽性のA-375(ヒト黒色腫細胞)およびT98G(ヒト神経膠芽腫細胞株)などの異なるヒトがん細胞株、そしてHLA-A2陰性およびIGF2BP3-001陰性のSK-BR-3(ヒト乳がん細胞株)と同時インキュベートし、IFN 放出アッセイがそれに続いた。

【0214】

図8に示されるように、IFN 放出は、HLA-A2陽性およびIGF2BP3-001陽性のA-375およびT98G細胞の双方で観察されたが、エフェクター細胞単対照と同等の基礎レベルのIFN 放出を有するSK-BR-3細胞では観察されなかった。これらの結果は、TCR R10P1A7を発現するT細胞が、HLA-A2/IGF2BP3-001特異的様式で、がん細胞を標的化する細胞毒性活性を特異的に誘導し得ることを示唆する。

【0215】

本明細書は、IGF2BP3-001を過剰にまたは排他的に提示する、がん/腫瘍、好ましくは黒色腫および神経膠芽腫を治療するのに有用なTCRを提供する。

【0216】

実施例5：同種異系T細胞の遺伝子操作

病原体に対する防御の第一線に関与する非従来のTリンパ球エフェクターであるガンマデルタ()細胞は、受容体、特に、TCR- およびTCR- 鎖を活性化することで、MHC非依存的様式で腫瘍細胞と相互作用して、腫瘍細胞を根絶し得る。これらのT細胞は、活性化に際して、迅速なサイトカイン産生(IFN- 、TNF-)および強力な細胞毒性応答細胞傷害性応を可能にする前活性化表現型を示す。これらのT細胞は多くのがんに対して抗腫瘍活性を有し、T細胞媒介免疫療法が実行可能であり、客観的な腫瘍応答を誘導し得ることが示唆される。(Braz et al. 2013)。

【0217】

固定化抗原、作動性モノクローナル抗体(mAb)、腫瘍由来人工抗原提示細胞(aAPC)、または活性化mAbとaAPCの組み合わせを用いる近年の進歩は、オリゴクローナルまたはポリクローナルTCRレパートリーありまたはなしで、T細胞を増殖させるのに成功している。例えば、固定化主要組織適合性複合体クラスI鎖関連Aは、TCR 1アイソタイプを発現するT細胞に対する刺激であり、プレート結合活性化抗体は、生体外でV 1およびV 2細胞を増殖させた。臨床的に十分な量のTCR 1、TCR 2、およびTCR 1negTCR 2negは、aAPC上での同時培養に続いて生成し、これらのサブセットは、記憶表現型および生体外および生体内での腫瘍に対する反応性の差異を示した。(Deniger et al. 2014)。

【0218】

さらに、T細胞は、TCR- 鎖およびTCR- 鎖の導入によって証明されるように、遺伝子修飾に適している。(Hiasa et al. 2009)。本明細書の別の態様は、IGF2BP3-001に結合するTCR- およびTCR- を発現する

10

20

30

40

50

T細胞の生成に関する。これを行うために、T細胞をDeniger et al. 2014によって記載される方法によって増殖させ、（実施例3に記載されるような）IGF2BP3-001に結合するTCRを発現する組換えウイルスを、増殖させたT細胞に形質導入することがそれに続いた。次に、ウイルス形質導入T細胞を患者に輸液する。

【0219】

実施例6：レンチウイルスコンストラクトおよび発現分析

簡潔に述べると、2つの試験コンストラクト（「R10」）を作製した。次に、これらのコンストラクトを用いて、良好な力価および生産性を有するレンチウイルス上清を生成した。次にレンチウイルス上清を使用して、初代T細胞（2人のドナー）を形質導入し、フローサイトメトリーによる四量体結合に基づくTCRの表面発現が後続した。

【0220】

【表5A-1】

表5A：レンチウイルスコンストラクトおよび対照-試験された各ドナー（表の行はコンストラクトに対応する）

		名称	ロット番号	p24 (ng/ml) 1) PN	qPCR HEK (TU/ml)	qPCR SUPT1 (TU/ml) 1)	MOI 50 (μl) を達成するための量
1863R	IGF2BP3	MSCV-R10P1A7A-2A-R10P1A7B-WPRE	0139-0516-230	35590	7.2E+09	1.3E+10	3.9
1864R		MSCV-R10P1A7B-2A-R10P1A7A-WPRE	0139-0516-231	55724	9.7E+09	1.6E+10	3.2
VSVG-GFP	対照	EF1a-GFP	0139-0616-250	62176	1.3E+09	8.21E+08	60.9

【表5A-2】

		ドナー1				
フロー時の総細胞数	生存度	CD3+の%	CD3+ Tet+の%	CD4+の%	CD8+の%	CD8+ Tet+の%
126234	99.36%	98.05	2.3	40.75	57.3	3.93
98272	99.08%	97.78	15.15	39.88	57.9	21.99
92038	95.70%	98.81	0.21			0.04

		ドナー2				
フロー時の総細胞数	生存度	CD3+の%	CD3+ Tet+の%	CD4+の%	CD8+の%	CD8+ Tet+の%
132888	98.47	97.98	0.99	26.8	69.35	1.79
135418	98.74	98.01	8.12	29.47	71.2	11.72
104276	99.13	98.17	0	27.82	3.59	0.06

【0221】

参考文献一覧

AdairSJ, Hogan KT (2009). Treatment of ovarian cancer cell lines with 5-aza-2'-deoxycytidine upregulates the expression of cancer-testis antigens and class I major histocompatibility complex-encoded molecules. Cancer Immunol. Immunother. 58, 589-601.

AlvesPM, Levy N, Bouzourene H, ViatteS, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Giv

I JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.

Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun.* 8, 2.

Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin Cancer Res* 12, 764-771.

Bellati F, Napoletano C, Tarquini E, Palaia I, Landi R, Mancini N, Spagnoli G, Ruggetti A, Panici PB, Nuti M (2007). Cancer testis antigen expression in primary and recurrent vulvar cancer: association with prognostic factors. *Eur. J Cancer* 43, 2621-2627.

Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.

Chitale DA, Jungbluth AA, Marshall DS, Leitao MM, Hedvat CV, Kolb D, Spagnoli GC, Iversen K, Soslow RA (2005). Expression of cancer-testis antigens in endometrial carcinomas using a tissue microarray. *Mod. Pathol.* 18, 119-126.

Coral S, Parisi G, Nicolay HJ, Colizzi F, Danielli R, Fratta E, Covre A, Taverna P, Sigalotti L, Maio M (2013). Immunomodulatory activity of SGI-110, a 5-aza-2'-deoxycytidine-containing demethylating dinucleotide. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 605-614.

Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, Salvi S, Seelentag W, Speiser DE, Lienard D, Monnier P, Romero P, Bron L, Rimoldi D (2011). Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J Cancer* 128, 2625-2634.

Forghanifard MM, Gholamin M, Farshchian M, Moaven O, Memar B, Forghani MN, Dadkhah E, Naseh H, Moghbeli M, Raeisossadati R, Abbaszadegan MR (2011). Cancer-testis gene expression profiling in esophageal squamous cell carcinoma: identification of specific tumor marker and potential targets for immunotherapy. *Cancer Biol Ther.* 12, 191-197.

Gerdemann U, Katari U, Christin AS, Cruz CR, Tripic T, Rousseau A, Gottschalk SM, Savoldo B, Vera JF, Heslop HE, Brenner MK, Bollard CM, Rooney CM, Leen AM (2011). Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol. Ther.* 19, 2258-2268.

Gunda V, Cogdill AP, Bernasconi MJ, Wargo JA, Parangi S (2013). Potential role of 5-aza-2'-deoxycytidine induced MAGE-A4 expression in immunotherapy for anaplastic thyroid cancer. *Surgery* 154, 1456-1462.

Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjaric S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ, Altorki NK (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11, 8055-8062.

Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM, Parker AS, Leibovich BC, Jiang Z, Kwon ED (2008). External validation of IMP3 expression as an independent prognostic marker for metastatic progression and death for patients with clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 112, 1471-1479.

Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de

10

20

30

40

50

- Rakt MW, FigdorCG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germ line gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.
- KangJ, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* 10, e0118927.
- KimK, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 743-750.
- Kubuschok B, XieX, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575. 10
- Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.
- Lifantseva N, KoltsovaA, Krylova T, Yakovleva T, PoljanskayaG, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.
- Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis antigens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218. 20
- Mischo A, KubuschokB, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadle A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.
- Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolfenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.
- Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H (2008). Detection of novel cancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes, and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 30
- Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatovic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.
- Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosenberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immunol.* 8, 7. 40
- Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.
- Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Chen WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.
- Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien P A, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J Cancer* 123, 1551-1555. 50

- Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.
- Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H (2008). IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* 21, 431-437.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs.* (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).
- Resnick MB, Sabo E, Kondratiev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J. Cancer* 101, 190-195. 10
- Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.
- Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.
- Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880. 20
- Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res* 12, 5442-5447.
- Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichiki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.
- Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gamma null mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25. 30
- Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.
- Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-IIIa non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.
- Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Bhiring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 171(10), 4974-8. 40
- Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.
- Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel sub-category, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434. 50

Yantiss RK, Cosar E, Fischer AH (2008). Use of IMP3 in identification of carcinoma in fine needle aspiration biopsies of pancreas. Acta Cytol. 52,133-138.

【図 1】

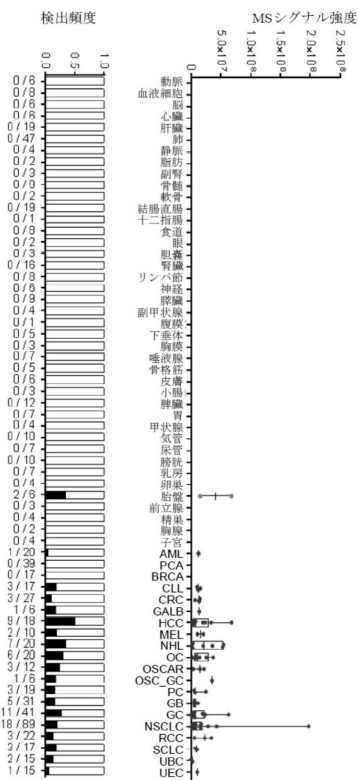


図 1

【図 2】

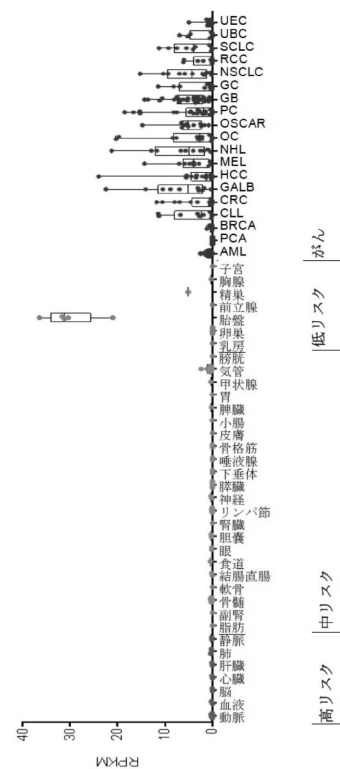
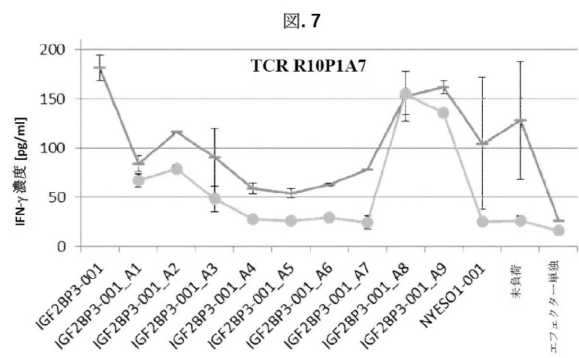


図 2

【 図 7 】



【 図 8 】

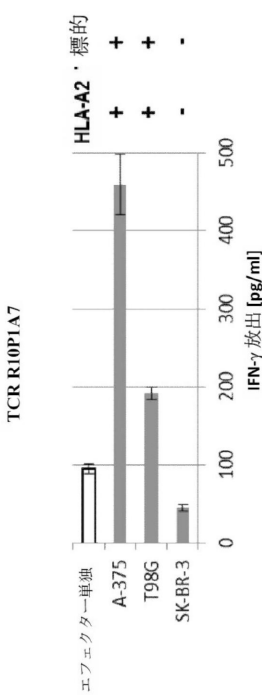


図. 8

【 配 列 表 】

0006929867000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17 A
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574 A

前置審査

(72)発明者 バンク, ゼバスティアン
ドイツ, 7 2 0 7 4 テューピングエン, ゲルトルート - ボイマーエステーエル, 1 9 / 1

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 1 1 9 5 8 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 5 / 0 6 3 3 0 2 (W O , A 1)
Cancer Science, 2011, Vol.102, No.1, p.71-78

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 1 2
A 6 1 K 3 5 / 1 7
A 6 1 K 3 8 / 1 6
A 6 1 P 3 5 / 0 0
A 6 1 P 3 5 / 0 2
C 0 7 K 1 4 / 7 2 5
C 0 7 K 1 9 / 0 0
C 1 2 N 5 / 0 7 8 3
C 1 2 N 5 / 1 0
C 1 2 N 1 5 / 6 3
C 1 2 P 2 1 / 0 2
C 1 2 Q 1 / 0 4
G 0 1 N 3 3 / 5 7 4
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q