

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-535366
(P2023-535366A)

(43)公表日 令和5年8月17日(2023.8.17)

(51)国際特許分類

C 12 N	15/12 (2006.01)	F I	C 12 N	15/12
C 12 N	15/86 (2006.01)		C 12 N	15/86
C 12 N	5/10 (2006.01)		C 12 N	5/10
A 61 K	38/17 (2006.01)		A 61 K	38/17
A 61 P	35/00 (2006.01)		A 61 P	35/00

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全48頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-503124(P2023-503124)
(86)(22)出願日	令和3年7月15日(2021.7.15)
(85)翻訳文提出日	令和5年3月14日(2023.3.14)
(86)国際出願番号	PCT/US2021/041737
(87)国際公開番号	WO2022/015922
(87)国際公開日	令和4年1月20日(2022.1.20)
(31)優先権主張番号	63/052,502
(32)優先日	令和2年7月16日(2020.7.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く

(71)出願人	510002280 アメリカ合衆国 アメリカ合衆国、20892-7788 メリーランド州、ベセスダ、エムエス シー7788、ロックレッジ ドライヴ 6701、スイート700、ナショナル インスティテュート オブ ヘルス、オ フィス オブ テクノロジー トランسف ター
(74)代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宣
(74)代理人	100080791 弁理士 高島 一
(74)代理人	100125070 弁理士 土井 京子
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 G 12 V 変異を有する R A S に対する H L A クラス I I 拘束性 D R B T 細胞受容体

(57)【要約】

12位のグリシンがバリンで置換されている変異型ヒトR A Sアミノ酸配列に対して抗原特異性を有する、単離又は精製されたT細胞受容体(T C R)が開示される。T C Rは、H L A - D Rヘテロ二量体によって提示されたG 12 V R A Sを認識し得る。関連するポリペプチド及びタンパク質、並びに関連する核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、及び医薬組成物も提供される。また、哺乳類におけるがんの存在を検出する方法及び哺乳類におけるがんを治療又は予防する方法も開示される。

【選択図】図1A

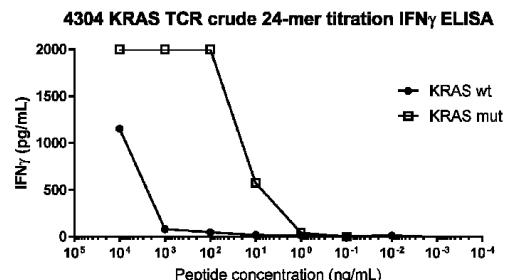


Fig. 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- (a) 配列番号1～3の全て、
- (b) 配列番号4～6の全て、又は
- (c) 配列番号1～6の全て

のアミノ酸配列を含む、単離又は精製されたT細胞受容体(TCR)であって、

前記TCRが、12位のグリシンがバリンで置換されている変異型ヒトRASアミノ酸配列に対して抗原特異性を有し、

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

12位が、それぞれ、野生型ヒトKRAS、野生型ヒトHRAS、又は野生型ヒトNRASのタンパク質を参照することによって定義されるTCR。

【請求項 2】

前記変異型ヒトRASアミノ酸配列が、MTEYKLVVVGAVGVGKSA_LTIQ_LI(配列番号34)である、請求項1に記載のTCR。

【請求項 3】

MTEYKLVVVGAGG₂VGKSA_LTIQ_LI(配列番号35)の野生型ヒトRASアミノ酸配列に対して抗原特異性を有しない、請求項1又は2に記載のTCR。

【請求項 4】

前記変異型ヒトRASアミノ酸配列が、ヒト白血球抗原(HLA)クラスII分子によって提示される、請求項1～3のいずれか一項に記載のTCR。

【請求項 5】

前記HLAクラスII分子が、HLA-DRヘテロ二量体である、請求項4に記載のTCR。

【請求項 6】

前記HLAクラスII分子が、HLA-DR鎖を、HLA-DRB1遺伝子によってコードされているHLA-DR鎖と組み合わせて含む、請求項4に記載のTCR。

【請求項 7】

前記HLAクラスII分子が、HLA-DRB1*01:HLA-DRA*01ヘテロ二量体である、請求項4に記載のTCR。

【請求項 8】

- (i) 配列番号7、
- (ii) 配列番号8、
- (iii) 配列番号9、
- (iv) 配列番号10、
- (v) 配列番号7及び8の両方、又は
- (vi) 配列番号9及び10の両方

のアミノ酸配列を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のTCR。

【請求項 9】

- (a)

(i) 配列番号19の48位のXが、Thr若しくはCysであり；

(ii) 配列番号19の112位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(iii) 配列番号19の114位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(iv) 配列番号19の115位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号19のアミノ酸配列を含む鎖定常領域；

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 20 の 57 位の X が、 S e r 若しくは C y s である、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む 鎮定常領域；又は

(c) (a) 及び (b) の両方

を更に含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 10】

(a)

(i) 配列番号 25 の 175 位の X が、 T h r 若しくは C y s であり；

(i i) 配列番号 25 の 239 位の X が、 S e r 、 A l a 、 V a l 、 L e u 、 I l e 、 P r o 、 P h e 、 M e t 、若しくは T r p であり；

(i i i) 配列番号 25 の 241 位の X が、 M e t 、 A l a 、 V a l 、 L e u 、 I l e 、 P r o 、 P h e 、若しくは T r p であり；かつ

(i v) 配列番号 25 の 242 位の X が、 G l y 、 A l a 、 V a l 、 L e u 、 I l e 、 P r o 、 P h e 、 M e t 、若しくは T r p である、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む鎖；

(b) 配列番号 26 の 186 位の X が、 S e r 若しくは C y s である、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む 鎮；

(c) (a) 及び (b) の両方；

(d)

(i) 配列番号 27 の 156 位の X が、 T h r 若しくは C y s であり；

(i i) 配列番号 27 の 220 位の X が、 S e r 、 A l a 、 V a l 、 L e u 、 I l e 、 P r o 、 P h e 、 M e t 、若しくは T r p であり；

(i i i) 配列番号 27 の 222 位の X が、 M e t 、 A l a 、 V a l 、 L e u 、 I l e 、 P r o 、 P h e 、若しくは T r p であり；かつ

(i v) 配列番号 27 の 223 位の X が、 G l y 、 A l a 、 V a l 、 L e u 、 I l e 、 P r o 、 P h e 、 M e t 、若しくは T r p である、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む鎖；

(e) 配列番号 28 の 171 位の X が、 S e r 若しくは C y s である、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む 鎮；

(f) (d) 及び (e) の両方；

(g) 配列番号 29 ；

30

(h) 配列番号 30 ；

(i) 配列番号 31 ；

(j) 配列番号 32 ；

(k) (g) 及び (h) の両方；又は

(l) (i) 及び (j) の両方；

を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の単離又は精製された T C R。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の T C R の機能的部分を含む、単離又は精製されたポリペプチドであって、前記機能的部分が、

(a) 配列番号 1 ~ 3 の全て、

40

(b) 配列番号 4 ~ 6 の全て、又は

(c) 配列番号 1 ~ 6 の全て

のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 12】

前記機能的部分が、

(i) 配列番号 7 、

(i i) 配列番号 8 、

(i i i) 配列番号 9 、

(i v) 配列番号 10 、

(v) 配列番号 7 及び 8 の両方、又は

50

(v i) 配列番号 9 及び 10 の両方

のアミノ酸配列（複数可）を含む、請求項 11 に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 13】

(a)

(i) 配列番号 19 の 48 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(ii) 配列番号 19 の 112 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(iii) 配列番号 19 の 114 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(iv) 配列番号 19 の 115 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である、配列番号 19 のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 20 の 57 位の X が、Ser 若しくは Cys である、配列番号 20 のアミノ酸配列；又は

(c) (a) 及び (b) の両方

を更に含む、請求項 11 又は 12 に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 14】

(a)

(i) 配列番号 25 の 175 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(ii) 配列番号 25 の 239 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(iii) 配列番号 25 の 241 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(iv) 配列番号 25 の 242 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む鎖；

(b) 配列番号 26 の 186 位の X が、Ser 若しくは Cys である、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む鎖；

(c) (a) 及び (b) の両方；

(d)

(i) 配列番号 27 の 156 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；

(ii) 配列番号 27 の 220 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；

(iii) 配列番号 27 の 222 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ

(iv) 配列番号 27 の 223 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む鎖；

(e) 配列番号 28 の 171 位の X が、Ser 若しくは Cys である、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む鎖；

(f) (d) 及び (e) の両方；

(g) 配列番号 29；

(h) 配列番号 30；

(i) 配列番号 31；

(j) 配列番号 32；

(k) (g) 及び (h) の両方；又は

(l) (i) 及び (j) の両方；

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

【請求項 15】

配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 4 ~ 6 のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含む第2のポリペプチド鎖を含む、単離又は精製されたタンパク質。

【請求項16】

(i) 第1のポリペプチド鎖が、配列番号7のアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチド鎖が、配列番号8のアミノ酸配列を含む；又は

(ii) 第1のポリペプチド鎖が、配列番号9のアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチド鎖が、配列番号10のアミノ酸配列を含む、請求項15に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項17】

(a) 第1のポリペプチド鎖が、

(i) 配列番号19の48位のXが、Thr若しくはCysであり；

(ii) 配列番号19の112位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(iii) 配列番号19の114位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(iv) 配列番号19の115位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号19のアミノ酸配列を更に含む；

(b) 第2のポリペプチド鎖が、配列番号20の57位のXがSer若しくはCysである、配列番号20のアミノ酸配列を更に含む；又は

(c) (a)及び(b)の両方である、請求項15又は16に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項18】

(a) 第1のポリペプチド鎖が、

(i) 配列番号25の175位のXが、Thr若しくはCysであり；

(ii) 配列番号25の239位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(iii) 配列番号25の241位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(iv) 配列番号25の242位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号25のアミノ酸配列を含む；

(b) 第2のポリペプチド鎖が、配列番号26の186位のXがSer若しくはCysである配列番号26のアミノ酸配列を含む；

(c) (a)及び(b)の両方である；

(d) 第1のポリペプチド鎖が、

(i) 配列番号27の156位のXが、Thr若しくはCysであり；

(ii) 配列番号27の220位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；

(iii) 配列番号27の222位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ

(iv) 配列番号27の223位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号27のアミノ酸配列を含む；

(e) 第2のポリペプチド鎖が、配列番号28の171位のXがSer若しくはCysである配列番号28のアミノ酸配列を含む；

(f) (d)及び(e)の両方である；

(g) 第1のポリペプチド鎖が、配列番号29のアミノ酸配列を含む；

(h) 第2のポリペプチド鎖が、配列番号30のアミノ酸配列を含む；

(i) 第1のポリペプチド鎖が、配列番号31のアミノ酸配列を含む；

(j) 第2のポリペプチド鎖が、配列番号32のアミノ酸配列を含む；

10

20

30

40

50

(k) (g) 及び (h) の両方である；又は

(l) (i) 及び (j) の両方である、請求項 15～17 のいずれか一項に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 19】

請求項 1～10 のいずれか一項に記載の TCR、請求項 11～14 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 15～18 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードしているヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸。

【請求項 20】

5'から3'に向かって、第1の核酸配列及び第2のヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸であって、前記第1及び第2のヌクレオチド配列が、それぞれ、配列番号 10
7 及び 8 ; 8 及び 7 ; 9 及び 10 ; 10 及び 9 ; 25 及び 26 ; 26 及び 25 ; 27 及び
28 ; 28 及び 27 ; 29 及び 30 ; 30 及び 29 ; 31 及び 32 ; 又は 32 及び 31 の
アミノ配列をコードしている核酸。

【請求項 21】

第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との間に介在する第3のヌクレオチド配列を更に含み、前記第3のヌクレオチド配列が、切断可能なリンカーペプチドをコードしている、請求項 20 に記載の単離又は精製された核酸。

【請求項 22】

前記切断可能なリンカーペプチドが、 RAKRSGSAGATNFSLLKQAGDVE
ENPGP (配列番号 33) のアミノ酸配列を含む、請求項 21 に記載の単離又は精製された核酸。 20

【請求項 23】

請求項 19～22 のいずれか一項に記載の核酸を含む、組み換え発現ベクター。

【請求項 24】

トランスポゾン又はレンチウイルスベクターである、請求項 23 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 25】

請求項 19～22 のいずれか一項に記載の核酸又は請求項 23 若しくは 24 に記載のベクターによってコードされている、単離又は精製された TCR、ポリペプチド、又はタンパク質。 30

【請求項 26】

請求項 19～22 のいずれか一項に記載の核酸又は請求項 23 若しくは 24 に記載のベクターが細胞内で発現した結果得られる、単離又は精製された TCR、ポリペプチド、又はタンパク質。

【請求項 27】

MTEYKLVVVGAVLGVGKSA~~L~~TIQLI (配列番号 34) のペプチドに対して抗原特異性を有する TCR を発現する宿主細胞を生成する方法であって、請求項 23 又は 24 に記載のベクターの細胞への導入を可能にする条件下で前記細胞を前記ベクターと接触させることを含む方法。

【請求項 28】

請求項 19～22 のいずれか一項に記載の核酸又は請求項 23 若しくは 24 に記載の組換え発現ベクターを含む、単離又は精製された宿主細胞。 40

【請求項 29】

前記細胞が、ヒトリンパ球である、請求項 28 記載の宿主細胞。

【請求項 30】

T 細胞、ナチュラルキラー T (NK T) 細胞、インバリアントナチュラルキラー T (i NK T) 細胞、及びナチュラルキラー (NK) 細胞からなる群から選択される、請求項 28 又は 29 に記載の宿主細胞。

【請求項 31】

請求項 28～30 のいずれか一項に記載の宿主細胞を含む、単離又は精製された細胞の 50

集団。

【請求項 3 2】

請求項 1 ~ 10、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 11 ~ 14、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 15 ~ 18、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のタンパク質を生成する方法であって、前記 T C R、ポリペプチド、又はタンパク質が生成されるように、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の宿主細胞又は請求項 31 に記載の宿主細胞の集団を培養することを含む方法。

【請求項 3 3】

(a) 請求項 1 ~ 10、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 11 ~ 14、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 15 ~ 18、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 19 ~ 22 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 23 若しくは 24 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の宿主細胞、又は請求項 31 に記載の細胞の集団と、(b) 薬学的に許容し得る担体と、を含む医薬組成物。 10

【請求項 3 4】

哺乳類におけるがんの存在を検出する方法であって、

(a) 前記がんの細胞を含むサンプルを、請求項 1 ~ 10、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 11 ~ 14、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 15 ~ 18、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 19 ~ 22 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 23 若しくは 24 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 31 に記載の細胞の集団、又は請求項 33 に記載の医薬組成物と接触させ、それによって、複合体を形成させることと； 20

(b) 前記複合体を検出することと、
を含み、

前記複合体の検出が、前記哺乳類におけるがんの存在を示す方法。

【請求項 3 5】

哺乳類におけるがんに対する免疫応答の誘導において使用するための、請求項 1 ~ 10、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 11 ~ 14、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 15 ~ 18、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 19 ~ 22 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 23 若しくは 24 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 31 に記載の細胞の集団、又は請求項 33 に記載の医薬組成物。 30

【請求項 3 6】

哺乳類におけるがんの治療又は予防において使用するための、請求項 1 ~ 10、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 11 ~ 14、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 15 ~ 18、25、若しくは 26 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 19 ~ 22 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 23 若しくは 24 に記載の組み換え発現ベクター、請求項 28 ~ 30 のいずれか一項に記載の宿主細胞、請求項 31 に記載の細胞の集団、又は請求項 33 に記載の医薬組成物。 40

【請求項 3 7】

前記がんが、12位のグリシンがバリンで置換されている変異型ヒト R A S アミノ酸配列を発現し、

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

12位が、それぞれ、野生型ヒト K R A S、野生型ヒト H R A S、又は野生型ヒト N R A S のタンパク質を参照することによって定義される、請求項 34 に記載の方法、又は請

求項 3 5 若しくは 3 6 に記載の使用のための T C R 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、若しくは医薬組成物。

【請求項 3 8】

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト K i r s t e n ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (K R A S) アミノ酸配列である、請求項 3 7 に記載の方法、又は請求項 3 7 に従って使用するための T C R 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、若しくは医薬組成物。

【請求項 3 9】

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト神経芽細胞腫ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (N R A S) アミノ酸配列である、請求項 3 7 に記載の方法、又は請求項 3 7 に従って使用するための T C R 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、若しくは医薬組成物。

10

【請求項 4 0】

前記変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト H a r v e y ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (H R A S) アミノ酸配列である、請求項 3 7 に記載の方法、又は請求項 3 7 に従って使用するための T C R 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、若しくは医薬組成物。

20

【請求項 4 1】

前記がんが、脾臓、結腸直腸、肺、子宮内膜、卵巣、又は前立腺のがんである、請求項 3 4 及び 3 7 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法、又は請求項 3 5 ~ 4 0 のいずれか一項に従って使用するための T C R 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、若しくは医薬組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

この特許出願は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、2020年7月16日出願の米国仮特許出願第 6 3 / 0 5 2 , 5 0 2 号の利益を主張する。

30

【0 0 0 2】

連邦支援の研究又は開発に関する記述

本発明は、米国国立衛生研究所、国立がん研究所によって、プロジェクト番号 Z I A B C 0 1 0 9 8 4 の下、政府の支援を受けて成された。政府は、本発明において一定の権利を有する。

30

【0 0 0 3】

電子的に提出された文献の参照による援用

本明細書と同時に提出され、以下の通り特定されるコンピュータ可読ヌクレオチド／アミノ酸配列表は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる：2021年5月17日付の「 7 5 4 3 9 6 _ S T 2 5 . t x t 」という名称の 5 8 , 4 2 0 バイトの A S C I I (テキスト) ファイル。

40

【背景技術】

【0 0 0 4】

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

40

【発明の概要】

【0 0 0 5】

本発明の実施形態は、(a) 配列番号 1 ~ 3 の全て、(b) 配列番号 4 ~ 6 の全て、又は (c) 配列番号 1 ~ 6 の全てのアミノ酸配列を含む単離又は精製された T 細胞受容体 (

50

T C R) であって、該 T C R が、1 2 位のグリシンがバリンで置換されている変異型ヒト R A S アミノ酸配列に対して抗原特異性を有し、該変異型ヒト R A S アミノ酸配列が、変異型ヒト K i r s t e n ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (K R A S) 、変異型ヒト H a r v e y ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (H R A S) 、又は変異型ヒト神経芽細胞腫ラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ (N R A S) のアミノ酸配列であり、1 2 位が、それぞれ、野生型ヒト K R A S 、野生型ヒト H R A S 、又は野生型ヒト N R A S のタンパク質を参照することによって定義される T C R を提供する。

【 0 0 0 6 】

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

【 0 0 0 7 】

本発明の更に別の実施形態は、配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖及び配列番号 4 ~ 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含む、単離又は精製されたタンパク質を提供する。

【 0 0 0 8 】

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

【 0 0 0 9 】

本発明の実施形態は、5'から3'に向かって、第 1 の核酸配列及び第 2 のヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸であって、該第 1 及び第 2 のヌクレオチド配列が、それぞれ、配列番号 7 及び 8 ; 8 及び 7 ; 9 及び 1 0 ; 又は 1 0 及び 9 のアミノ酸配列をコードしている核酸を提供する。 20

【 0 0 1 0 】

哺乳類におけるがんの存在を検出する方法、哺乳類におけるがんを治療又は予防する方法、哺乳類においてがんに対する免疫応答を誘導する方法、 M T E Y K L V V V G A V G V G K S A L T I Q L I (配列番号 3 4) のペプチドに対して抗原特異性を有する T C R を発現する宿主細胞を生成する方法、並びに本発明の T C R 、ポリペプチド、及びタンパク質を生成する方法が、本発明の実施形態によって更に提供される。 30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 1 】

【 図 1 A - 1 B 】 図 1 A ~ 1 B は、標的細胞をエフェクター細胞と共に培養した後の、 I F N - 分泌量 (p g / m L) (図 1 A) 又は 4 - 1 B B 発現について陽性であった T C R マウス定常領域 (m T C R) 陽性 / C D 3 + 細胞の割合 (図 1 B) を示すグラフである。エフェクター細胞は、 4 3 0 4 T C R 1 で形質導入された T 細胞であった。標的細胞は、指定の濃度 (n g / m L) の G 1 2 V 2 4 - m e r ペプチド (四角) (K R A S m u t) 又は対応する W T 2 4 - m e r ペプチド (円形) (K R A S w t) をパルスした D C であった。

【 図 2 】 図 2 は、エフェクター細胞を標的細胞と共に培養した後の E L I S P O T アッセイによって測定した I F N - 分泌 (スポット / 3 e 4 細胞) を示すグラフである。エフェクター細胞は、 4 3 0 4 T C R 1 で形質導入された健常ドナー P B L であった。標的細胞は、図に示す H L A クラス I I ヘテロ二量体のうちの 1 つで独立してトランスフェクトされた C O S 7 細胞又は H E K 2 9 3 細胞であった。標的細胞に G 1 2 V 2 4 - m e r ペプチドを負荷し、予めトランスフェクトされたそれぞれの H L A クラス I I 分子をプロックする抗体の存在下又は非存在下で培養した。 D M S O と共に培養した標的細胞をネガティブコントロールとした。(i) G 1 2 V 2 4 - m e r ペプチドと共に培養した患者 4 3 0 4 由来の自己 D C をポジティブコントロールとし、(i i) D M S O と共に培養した患者 4 3 0 4 由来の自己 D C をネガティブコントロールとした。 40

【 発明を実施するための形態 】

10

20

30

40

50

【0012】

RASファミリーのタンパク質は、低分子GTPaseの大きなファミリーに属する。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、変異したとき、RASタンパク質は、多くのヒトのがんの発がん初期におけるシグナル伝達に関与する可能性があると考えられる。単一のアミノ酸置換によって、タンパク質が活性化され得る。変異型RASタンパク質産物は、構成的に活性化され得る。変異型RASタンパク質は、例えば、膵臓がん（例えば、膵がん）、結腸直腸がん、肺がん（例えば、肺腺がん）、子宮内膜がん、卵巣がん（例えば、上皮性卵巣がん）、及び前立腺がん等の様々なヒトのがんのいずれかで発現し得る。ヒトRASファミリーのタンパク質としては、KRAS、HRAS、及びNRASが挙げられる。

10

【0013】

KRASは、GTPase KRas、V-Ki-Ras2 Kirstenラット肉腫ウイルスがん遺伝子、又はKRAS2とも称される。KRASには、KRASバリアントA及びKRASバリアントBの2つの転写物バリアントが存在する。野生型(WT)KRASバリアントAは、配列番号11のアミノ酸配列を有する。WT KRASバリアントBは、配列番号12のアミノ酸配列を有する。以後、「KRAS」（変異型又は非変異型(WT)）に対する言及は、特に規定のない限り、バリアントA及びバリアントBの両方を指す。活性化されたとき、変異型KRASは、グアノシン-5'-三リン酸(GTP)に結合し、そして、GTPをグアノシン5'-二リン酸(GDP)に変換する。

20

【0014】

HRASは、RASタンパク質ファミリーの別のメンバーである。HRASは、Harveyラット肉腫ウイルスがんタンパク質、V-Ha-Ras Harveyラット肉腫ウイルスがん遺伝子ホモログ、又はRasファミリー低分子GTP結合タンパク質H-Rasとも称される。WT HRASは、配列番号13のアミノ酸配列を有する。

【0015】

NRASは、RASタンパク質ファミリーの更に別のメンバーである。NRASは、GTPase NRas、V-Ras神経芽細胞腫RASウイルスがん遺伝子ホモログ、又はNRAS1とも称される。WT NRASは、配列番号14のアミノ酸配列を有する。

【0016】

本発明の実施形態は、12位のグリシンがバリンで置換されている変異型ヒトRASのアミノ酸配列に対して抗原特異性を有する、単離又は精製されたTCRであって、該変異型ヒトRASのアミノ酸配列が、変異型ヒトKRAS、変異型ヒトHRAS、又は変異型ヒトNRASのアミノ酸配列であり、12位が、それぞれ、WTヒトKRAS、WTヒトHRAS、又はWTヒトNRASのタンパク質を参照することによって定義されるTCRを提供する。以後、「TCR」に対する言及は、特に規定のない限り、TCRの機能的部分及び機能的バリアントも指す。

30

【0017】

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

40

【0018】

本発明の実施形態では、変異型ヒトRASアミノ酸配列は、12位のグリシンがバリン

50

で置換されているヒトRASアミノ酸配列を含み、12位は、対応するWT RASタンパク質を参照して定義される。WT RASタンパク質は、WT KRASタンパク質(配列番号11又は12)、WT HRASタンパク質(配列番号13)、又はWT NRASタンパク質(配列番号14)のいずれか1つであってよいが、その理由は、上に説明した通り、WTヒトNRASタンパク質及びWTヒトKRASタンパク質のアミノ酸残基1～86が100%同一であり、WTヒトHRASタンパク質及びWTヒトKRASタンパク質のアミノ酸残基1～94も100%同一であるためである。従って、WT KRAS、WT HRAS、及びWT NRASのタンパク質のそれぞれの12位におけるアミノ酸残基は同じである、すなわち、グリシンである。

【0019】

10

変異型ヒトRASアミノ酸配列は、12位のグリシンのバリンによる置換を有する。これに関して、本発明の実施形態は、G12V変異を有する任意のヒトRASのタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドのアミノ酸配列に対して抗原特異性を有するTCRを提供する。

【0020】

20

RASの変異及び置換は、本明細書では、対応するWT RASタンパク質のアミノ酸配列を参照して定義される。従って、RASの変異及び置換は、本明細書では、WT RASタンパク質の特定の位置に存在するアミノ酸残基(すなわち、12位)、続いて、位置番号、続いて、検討中の特定の変異又は置換においてその残基に置き換わったアミノ酸残基を参照して記載される。RASアミノ酸配列(例えば、RASペプチド)は、完全長のWT RASタンパク質の全アミノ酸残基よりも少ないアミノ酸残基を含む場合がある。従って、RASアミノ酸配列の特定の例では対応する残基の実際の位置が異なる場合もあるという理解の下、本明細書では、12位は、WT完全長RASタンパク質(すなわち、配列番号11～14のいずれか1つ)を参照して定義される。位置が配列番号11～14のいずれか1つによって定義される通りである場合、用語「G12」とは、配列番号11～14のいずれか1つの12位には通常グリシンが存在することを指し、「G12V」は、配列番号11～14のいずれか1つの12位に通常存在するグリシンがバリンに置き換わっていることを示す。例えば、RASアミノ酸配列の特定の例が、例えばTEYKLVVVGAGGVGKSA~~T~~TIQLI(配列番号36)(配列番号11の連続アミノ酸残基2～24に対応する例示的なWT KRASペプチド)である場合、「G12V」とは、たとえ配列番号36における下線付きグリシンの実際の位置が11であったとしても、配列番号36における下線付きグリシンのバリンによる置換を指す。以下、G12V変異を有するヒトRASアミノ酸配列を「G12V RAS」又は「G12V」と称する。

30

【0021】

G12V変異を有する完全長RASタンパク質の例を、以下の表1に記載する。

【0022】

【表1】

変異型完全長RASタンパク質	配列番号
G12V KRASバリアントA	15
G12V KRASバリアントB	16
G12V HRAS	17
G12V NRAS	18

40

【0023】

本発明の実施形態では、TCRは、上記G12V変異を有するRASペプチドに対して抗原特異性を有し、該G12V RASペプチドは、任意の長さを有する。本発明の実施形態では、G12V RASペプチドは、本明細書に記載のHLAクラスII分子のいずれかに結合するのに好適な任意の長さを有する。例えば、TCRは、G12V変異を有するRASペプチドであって、約11～約30アミノ酸残基、約12～約24アミノ酸残基

50

、又は約18～約20アミノ酸残基の長さを有するRASペプチドに対して抗原特異性を有し得る。G12V RASペプチドは、G12V変異を含む変異型RASタンパク質の任意の連続アミノ酸残基を含み得る。本発明の実施形態では、TCRは、G12V変異を有するRASペプチドであって、約30アミノ酸残基、約29アミノ酸残基、約28アミノ酸残基、約27アミノ酸残基、約26アミノ酸残基、約25アミノ酸残基、約24アミノ酸残基、約23アミノ酸残基、約22アミノ酸残基、約21アミノ酸残基、約20アミノ酸残基、約19アミノ酸残基、約18アミノ酸残基、約17アミノ酸残基、約16アミノ酸残基、約15アミノ酸残基、約14アミノ酸残基、約13アミノ酸残基、約12アミノ酸残基、約11アミノ酸残基、又は上記値のうちのいずれか2つの範囲の長さを有する変異型RASペプチドに対して抗原特異性を有し得る。本発明のTCRによって認識され得る、G12V変異を有する特異的ペプチドの例は、MTEYKLVVVGAGVGKSA
10 LTIQLI(配列番号34)である。本発明の実施形態では、TCRは、配列番号34の変異型ヒトRASアミノ酸配列に対する抗原特異性を有する。本発明の実施形態では、TCRは、MTEYKLVVVGAGVGKSA
20 LTIQLI(配列番号35)の野生型ヒトRASアミノ酸配列に対して抗原特異性を有しない。

【0024】

本発明の実施形態では、本発明のTCRは、HLAクラスII分子によって提示されるG12V RASを認識することができる。これに関して、TCRは、HLAクラスII分子の枠内でG12V RASに結合した際に免疫応答を惹起し得る。本発明のTCRは、HLAクラスII分子によって提示されるG12V RASを認識することができ、G12V RASに加えてHLAクラスII分子にも結合することができる。
20

【0025】

本発明の実施形態では、HLAクラスII分子は、HLA-DRヘテロ二量体である。HLA-DRヘテロ二量体は、鎖及び鎖を含む細胞表面受容体である。HLA-DRの鎖は、HLA-DRA遺伝子によってコードされている。HLA-DRの鎖は、HLA-DRB1遺伝子、HLA-DRB3遺伝子、HLA-DRB4遺伝子、又はHLA-DRB5遺伝子によってコードされている。HLA-DRB1によってコードされている分子の例としては、HLA-DR1、HLA-DR2、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR5、HLA-DR6、HLA-DR7、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR10、HLA-DR11、HLA-DR12、HLA-DR13、HLA-DR14、HLA-DR15、HLA-DR16、及びHLA-DR17を挙げることができるが、これらに限定されない。HLA-DRB3遺伝子は、HLA-DR52をコードしている。HLA-DRB4遺伝子は、HLA-DR53をコードしている。HLA-DRB5遺伝子は、HLA-DR51をコードしている。本発明の実施形態では、HLAクラスII分子は、HLA-DR鎖を、HLA-DRB1遺伝子によってコードされているHLA-DR鎖と組み合わせて含む。特に好ましい実施形態では、HLAクラスII分子は、HLA-DRB1*01:HLA-DRA*01ヘテロ二量体である(すなわち、HLA-DRB1*01:HLA-DRA*01のアレルによって発現される)。実施形態では、HLA-DRの鎖は、HLA-DRB1*01:01のアレルによってコードされている。
30

【0026】

本発明のTCRは、養子細胞移入に使用される細胞によって発現された場合を含む、様々な利点のうちのいずれか1つ以上を提供し得る。G12V RASは、がん細胞で発現し、正常な非がん細胞では発現しない。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、本発明のTCRは、有利なことに、がん細胞の破壊を標的とするが、一方、例えば毒性を最小化又は排除することによって、正常な非がん細胞の破壊を最小化又は排除し、それによって、低減すると考えられる。更に、G12V変異は、腫瘍形成の初期段階で発生する可能性が高いため、G12V RAS変異は、患者のがん細胞の実質的に全てで発現している可能性がある。本発明のTCRは、有利なことに、例えば化学療法、外科手術、又は放射線照射等の他の種類の治療には応答しないG12V RAS陽性がんを成功裏に治療
40

又は予防することができる。更に、本発明の T C R は、操作されていない腫瘍細胞（例えば、インターフェロン（ I F N ） - で処理されていない、 G 1 2 V R A S 及び H L A - D R B 1 * 0 1 : H L A - D R A * 0 1 ヘテロ二量体の一方又は両方をコードしているベクターでトランスフェクトされていない、 G 1 2 V R A S ペプチドをパルスしていない、又はこれらの組み合わせの腫瘍細胞）を認識する能力を提供し得る、 G 1 2 V R A S の高い結合活性での（ h i g h l y a v i d ）認識を提供することができる。 K R A S の変異は、膵臓がんの約 7 0 % 、結腸直腸がんの 3 6 % 、及び肺がんの 2 0 % でみられる。最も一般的には、コドン 1 2 （グリシン、 G をコードしている）に変異が生じる。 G 1 2 V R A S 変異は、膵臓及び結腸直腸のがんの患者のそれぞれ約 2 7 % 及び約 8 % でみられる。更に、 H L A - D R B 1 * 0 1 アリルは、白人の民族性を有するヒトで一般的に発現している。例えば、このアリルは、米国における白人の民族性を有するヒトの約 2 0 % で発現している。このアリルが米国における白人の民族性を有するヒトの約 2 0 % で発現しており、変異型 R A S が全てのがん患者の約 3 0 % で発現しており、 R A S 変異のうちの約 2 5 % が G 1 2 V R A S である場合、該 T C R は、米国におけるがんを有する白人の民族性を有する全てのヒトの約 1 . 5 % (0 . 2 × 0 . 3 × 0 . 2 5 = 0 . 0 1 5) を治療する潜在力を有する。従って、本発明の T C R は、他の M H C 分子によって提示される R A S を認識する T C R を使用する免疫療法に適格ではない場合がある H L A - D R B 1 * 0 1 アリルを発現する患者が含まれるように、免疫療法適格がん患者の数を増加させることができる。更に、本発明の T C R 、ポリペプチド、及びタンパク質は、ヒトの C D R 及び可変領域のアミノ酸配列を含み、これによって、例えばマウスの C D R 及び可変領域のアミノ酸配列を含む T C R 、ポリペプチド、及びタンパク質と比べてヒト免疫系によって拒絶されるリスクを低減することができる。
10
20
20

【 0 0 2 7 】

語句「抗原特異性」とは、本明細書で使用するとき、 T C R が、高い結合活性で G 1 2 V R A S に特異的に結合し、免疫学的に認識できることを意味する。例えば、 T C R は、（ a ）低濃度の G 1 2 V R A S ペプチド（例えば、約 0 . 0 5 n g / m L ~ 約 1 0 n g / m L 、 1 n g / m L 、 2 n g / m L 、 5 n g / m L 、 8 n g / m L 、 1 0 n g / m L 、又は上記値のうちのいずれか 2 つによって規定される範囲）をパルスした抗原陰性 H L A クラス I I 分子陽性標的細胞又は（ b ）標的細胞が G 1 2 V R A S を発現するように G 1 2 V R A S をコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性 H L A クラス I I 分子陽性標的細胞と共に培養した際に、該 T C R を発現している約 1 × 1 0 ⁴ ~ 約 1 × 1 0 ⁵ 個の T 細胞が少なくとも約 2 0 0 p g / m L 以上（例えば、 2 0 0 p g / m L 以上、 3 0 0 p g / m L 以上、 4 0 0 p g / m L 以上、 5 0 0 p g / m L 以上、 6 0 0 p g / m L 以上、 7 0 0 p g / m L 以上、 1 0 0 0 p g / m L 以上、 5 , 0 0 0 p g / m L 以上、 7 , 0 0 0 p g / m L 以上、 1 0 , 0 0 0 p g / m L 以上、 2 0 , 0 0 0 p g / m L 以上、又は上記値のうちのいずれか 2 つによって規定される範囲）の I F N - ₋ を分泌した場合、 G 1 2 V R A S について「抗原特異性」を有するとみなしてよい。本発明の T C R を発現している細胞は、より高濃度の G 1 2 V R A S ペプチドをパルスした抗原陰性 H L A クラス I I 分子陽性標的細胞と共に培養した際にも I F N - ₋ を分泌することができる。 H L A クラス I I 分子は、本明細書に記載の H L A クラス I I 分子のいずれかであつてよい。
30
40

【 0 0 2 8 】

あるいは又は更に、 T C R は、ネガティブコントロールが発現する I F N - ₋ の量と比較して、（ a ）低濃度の G 1 2 V R A S ペプチドをパルスした抗原陰性 H L A クラス I I 分子陽性標的細胞又は（ b ）標的細胞が G 1 2 V R A S を発現するように G 1 2 V R A S をコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性 H L A クラス I I 分子陽性標的細胞と共に培養した際に、該 T C R を発現している T 細胞が少なくとも 2 倍（例えば、 5 倍）多い I F N - ₋ を分泌した場合、 G 1 2 V R A S について「抗原特異性」を有するとみなしてよい。ネガティブコントロールは、例えば、（ i ）（ a ）同濃度の無関係のペプチド（例えば、 G 1 2 V R A S ペプチドとは異なる配列を有する幾つかの他のペ
50

プチド)若しくは(b)標的細胞が無関係のペプチドを発現するように該無関係のペプチドをコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共に培養した、該TCRを発現しているT細胞、又は(i)(a)同濃度のG12VRASペプチドをパルスした抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞若しくは(b)標的細胞がG12VRASを発現するようにG12VRASをコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共に培養した、形質導入されていないTCR細胞(例えば、該TCRを発現しないPBM由来)であってよい。ネガティブコントロールの標的細胞が発現するHLAクラスII分子は、試験するT細胞と共に培養した標的細胞が発現するのと同じHLAクラスII分子である。HLAクラスII分子は、本明細書に記載のHLAクラスII分子のいずれかであってよい。
IFN- 分泌は、当技術分野において公知の方法、例えば、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)によって測定することができる。

10

【0029】

あるいは又は更に、TCRは、IFN- γ を分泌するネガティブコントロールT細胞の数と比較して、(a)低濃度のG12VRASペプチドをパルスした抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞又は(b)標的細胞がG12VRASを発現するようにG12VRASをコードしているヌクレオチド配列が導入された抗原陰性HLAクラスII分子陽性標的細胞と共に培養した際に、少なくとも2倍(例えば、5倍)多い数の該TCRを発現しているT細胞がIFN- γ を分泌した場合、G12VRASについて「抗原特異性」を有するとみなしてよい。HLAクラスII分子、ペプチドの濃度、及びネガティブコントロールは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載する通りであってよい。IFN- γ を分泌する細胞の数は、当技術分野において公知の方法、例えば、ELISPOTによって測定することができる。

20

【0030】

あるいは又は更に、TCRは、G12VRASを発現している標的細胞で刺激した後に例えばフローサイトメトリーによって測定したとき、該TCRを発現しているT細胞が1つ以上のT細胞活性化マーカーの発現をアップレギュレートした場合、G12VRASについて「抗原特異性」を有するとみなしてよい。T細胞活性化マーカーの例としては、4-1BB、OX40、CD107a、CD69、及び抗原刺激した際にアップレギュレートされるサイトカイン(例えば、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン(IL)-2等)が挙げられる。

30

【0031】

本発明の実施形態は、例えば、TCRのアルファ(α)鎖、TCRのベータ(β)鎖、TCRのガンマ(γ)鎖、TCRのデルタ(δ)鎖、又はこれらの組み合わせ等の2つのポリペプチド(すなわち、ポリペプチド鎖)を含むTCRを提供する。本発明のTCRのポリペプチドは、TCRがG12VRASに対して抗原特異性を有する限り、任意のアミノ酸配列を含んでいてよい。幾つかの実施形態では、TCRは、天然には存在しない。

【0032】

本発明の実施形態では、TCRは、TCRの相補性決定領域(CDR)1、CDR2、及びCDR3を含む可変領域をそれぞれ含む、2本のポリペプチド鎖を含む。本発明の実施形態では、TCRは、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1(4304 TCR1の鎖のCDR1)、配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR2(4304 TCR1の鎖のCDR2)、及び配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR3(4304 TCR1の鎖のCDR3)を含む第1のポリペプチド鎖と、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR1(4304 TCR1の鎖のCDR1)、配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR2(4304 TCR1の鎖のCDR2)、及び配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR3(4304 TCR1の鎖のCDR3)を含む第2のポリペプチド鎖と、を含む。これに関して、本発明のTCRは、配列番号1~6からなる群から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ以上を含み得る。本発明の実施形態では、TCRは、(a)配列番号1~3の全て、(b)配列番号4~6の全て、又は(c)配列番号1~6の全ての

40

50

アミノ酸配列を含む。特に好ましい実施形態では、T C Rは、配列番号1～6の全てのアミノ酸配列を含む。

【0033】

本発明の実施形態では、T C Rは、上記C D Rを含むT C Rの可変領域のアミノ酸配列を含む。これに関して、T C Rは、(i)配列番号7(N末端シグナルペプチドを有しない4304 T C R 1の鎖の可変領域の予測配列)；(i i)配列番号8(N末端シグナルペプチドを有しない4304 T C R 1の鎖の可変領域の予測配列)；(i i i)配列番号9(N末端シグナルペプチドを有する4304 T C R 1の鎖の可変領域)；(i v)配列番号10(N末端シグナルペプチドを有する4304 T C R 1の鎖の可変領域)；(v)配列番号7及び8の両方；又は(v i)配列番号9及び10の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、T C Rは、(i)配列番号7及び8の両方又は(i i)配列番号9及び10の両方のアミノ酸配列を含む。10

【0034】

本発明のT C Rは、鎖定常領域及び鎖定常領域を更に含み得る。定常領域は、例えればヒト又はマウス等の任意の好適な種に由来していてよい。本発明の実施形態では、T C Rは、マウスの及び鎖の定常領域又はヒトの及び鎖の定常領域を更に含む。本明細書で使用するとき、用語「マウス」又は「ヒト」は、本明細書に記載のT C R又はT C Rの任意の構成要素(例えば、C D R、可変領域、定常領域、鎖、及び/又は鎖)に言及するとき、それぞれマウス又はヒト由来のT C R(又はその構成要素)、すなわち、それぞれマウスT細胞又はヒトT細胞を起源とするか又は該細胞によってかつて発現されたT C R(又はその構成要素)を意味する。20

【0035】

本発明の実施形態は、ヒト可変領域及びマウス定常領域を含むキメラT C Rであって、12位のグリシンがバリンで置換されている変異型ヒトR A Sアミノ酸配列に対して抗原特異性を有するT C Rを提供する。マウス定常領域は、任意の1つ以上の利点を提供し得る。例えば、マウス定常領域は、本発明のT C Rが導入される宿主細胞の内因性T C Rと本発明のT C Rとの誤対合を減少させることができる。あるいは又は更に、マウス定常領域は、ヒト定常領域を有する同じT C Rと比較して、本発明のT C Rの発現を増加させることができる。キメラT C Rは、配列番号23(W Tマウス鎖定常領域)、配列番号24(W Tマウス鎖定常領域)、又は配列番号23及び24の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、本発明のT C Rは、配列番号23及び24の両方のアミノ酸配列を含む。キメラT C Rは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載するC D R領域のいずれかと組み合わせて、本明細書に記載のマウス定常領域のいずれかを含み得る。これに関して、T C Rは、(a)配列番号1～3及び23の全て、(b)配列番号4～6及び24の全て、又は(c)配列番号1～6及び23～24の全てのアミノ酸配列を含み得る。本発明の別の実施形態では、キメラT C Rは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載する可変領域のいずれかと組み合わせて、本明細書に記載のマウス定常領域のいずれかを含み得る。これに関して、T C Rは、(i)配列番号7及び23の両方、(i i)配列番号8及び24の両方、(i i i)配列番号9及び23の両方、(i v)配列番号10及び24の両方、(v)配列番号7～8及び23～24の全て、又は(v i)配列番号9～10及び23～24の全てのアミノ酸配列を含み得る。3040

【0036】

本発明の実施形態では、T C Rは、置換定常領域を含む。これに関して、T C Rは、鎖及び鎖の一方又は両方の定常領域に1つ、2つ、3つ、又は4つのアミノ酸置換(複数可)を有する、本明細書に記載のT C Rのいずれかのアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、T C Rは、鎖及び鎖の一方又は両方のマウス定常領域に1つ、2つ、3つ、又は4つのアミノ酸置換(複数可)を有するマウス定常領域を含む。特に好ましい実施形態では、T C Rは、鎖のマウス定常領域に1つ、2つ、3つ、又は4つのアミノ酸置換(複数可)を有し、鎖のマウス定常領域に1つのアミノ酸置換を有するマウス定常領域を含む。幾つかの実施形態では、置換定常領域を含むT C Rは、有利なことに、非置換(野50

生型) 定常領域を含む親 T C R と比較して、G 1 2 V R A S⁺ 標的の認識の増大、宿主細胞による発現の増加、内因性 T C R との誤対合の減少、及び抗腫瘍活性の増大のうちの 1 つ以上を提供する。一般に、T C R の 鎖及び鎖のマウス定常領域の置換アミノ酸配列、それぞれ配列番号 1 9 及び 2 0 は、非置換マウス定常領域アミノ酸配列、それぞれ配列番号 2 3 及び 2 4 の全部又は一部に対応し、配列番号 1 9 は、配列番号 2 3 と比較して 1 つ、2 つ、3 つ、又は 4 つのアミノ酸置換(複数可)を有し、配列番号 2 0 は、配列番号 2 4 と比較して 1 つのアミノ酸置換を有する。これに関して、本発明の実施形態は、(a) (i) 4 8 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；(ii) 1 1 2 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；(iii) 1 1 4 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ(iv) 1 1 5 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp である配列番号 1 9 (鎖の定常領域)；(b) 5 7 位の X が Ser 若しくは Cys である配列番号 2 0 (鎖の定常領域)；又は(c) 配列番号 1 9 及び 2 0 の両方のアミノ酸配列を含む T C R を提供する。本発明の実施形態では、配列番号 1 9 を含む T C R は、配列番号 2 3 (鎖の非置換マウス定常領域)を含まない。本発明の実施形態では、配列番号 2 0 を含む T C R は、配列番号 2 4 (鎖の非置換マウス定常領域)を含まない。

【0037】

本発明の実施形態では、T C R は、可変領域及び定常領域を含む鎖と、可変領域及び定常領域を含む鎖とを含む。これに関して、T C R は、(a) (i) 配列番号 2 5 の 1 7 5 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；(ii) 配列番号 2 5 の 2 3 9 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；(iii) 配列番号 2 5 の 2 4 1 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp であり；かつ(iv) 配列番号 2 5 の 2 4 2 位の X が、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp である、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む鎖(N末端シグナルペプチドを有する 4 3 0 4 T C R 1 の鎖)；(b) 配列番号 2 6 の 1 8 6 位の X が、Ser 若しくは Cys である、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む鎖(N末端シグナルペプチドを有する 4 3 0 4 T C R 1 の鎖)；(c) 配列番号 2 5 及び 5 6 の両方；(d) (i) 配列番号 2 7 の 1 5 6 位の X が、Thr 若しくは Cys であり；(ii) 配列番号 2 7 の 2 2 0 位の X が、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくは Trp であり；(iii) 配列番号 2 7 の 2 2 2 位の X が、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくは Trp である、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む鎖(N末端シグナルペプチドを有しない 4 3 0 4 T C R 1 の鎖の予測配列)；(e) 配列番号 2 8 の 1 7 1 位の X が、Ser 若しくは Cys である、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む鎖(N末端シグナルペプチドを有しない 4 3 0 4 T C R 1 の鎖の予測配列)；(f) 配列番号 2 7 及び 2 8 の両方；(g) 配列番号 2 9 (N末端シグナル配列を有するシステイン置換 L V L 修飾 4 3 0 4 T C R 1 の鎖)；(h) 配列番号 3 0 (N末端シグナル配列を有するシステイン置換 L V L 修飾 4 3 0 4 T C R 1 の鎖)；(i) 配列番号 3 1 (N末端シグナル配列を有しないシステイン置換 L V L 修飾 4 3 0 4 T C R 1 の鎖の予測配列)；又は(j) 配列番号 3 2 (N末端シグナル配列を有しないシステイン置換 L V L 修飾 4 3 0 4 T C R 1 の鎖の予測配列)を含み得る。

【0038】

本発明の実施形態では、置換定常領域は、システイン置換 T C R を提供するために、鎖及び鎖の一方又は両方の定常領域にシステイン置換を含む。鎖及び鎖における対向するシステインは、置換された T C R の鎖及び鎖の定常領域を互いに連結させ、かつ非置換マウス定常領域を含む T C R には存在しないジスルフィド結合を提供する。これに関して、T C R は、配列番号 2 3 の 4 8 位のネイティブな Thr (Thr 4 8) 及び配

10

20

30

40

50

列番号24の57位のネイティブなSer(Ser57)の一方又は両方がCysで置換されていてよいシステイン置換TCRであり得る。好ましくは、配列番号23のネイティブなThr48及び配列番号24のネイティブなSer57の両方がCysで置換される。システイン置換TCRの定常領域配列の例を表2に記載する。本発明の実施形態では、システイン置換TCRは、(i)配列番号19、(ii)配列番号20、又は(iii)配列番号19及び20の両方を含み、配列番号19及び20はいずれも表2に定義される通りである。本発明のシステイン置換TCRは、本明細書に記載のCDR又は可変領域のいずれかに加えて、置換定常領域を含み得る。

【0039】

本発明の実施形態では、システイン置換キメラTCRは、完全長鎖及び完全長鎖を含む。システイン置換キメラTCRの鎖及び鎖の配列の例を表2に記載する。本発明の実施形態では、TCRは、(i)配列番号25、(ii)配列番号26、(iii)配列番号27、(iv)配列番号28、(v)配列番号25及び26の両方、又は(vi)配列番号27及び28の両方を含み、配列番号25～28は全て表2に定義される通りである。

【0040】

【表2】

配列番号	「X」の定義
配列番号19 (定常領域のα鎖)	48位のXが、Cysであり、 112位のXが、Serであり、 114位のXが、Metであり、かつ 115位のXが、Glyである。
配列番号20 (定常領域のβ鎖)	57位のXが、Cysである。
配列番号25 (N末端シグナルペプチドを有する4304 TCR 1のα鎖)	175位のXが、Cysであり、 239位のXが、Serであり、 241位のXが、Metであり、かつ 242位のXが、Glyである。
配列番号26 (N末端シグナルペプチドを有する4304 TCR 1のβ鎖)	186位のXが、Cysである。
配列番号27 (N末端シグナルペプチドを有しない4304 TCR1のα鎖の予測配列)	156位のXが、Cysであり、 220位のXが、Serであり、 222位のXが、Metであり、かつ 223位のXが、Glyである。
配列番号28 (N末端シグナルペプチドを有しない4304 TCR1のβ鎖の予測配列)	171位のXが、Cysである。

【0041】

本発明の実施形態では、置換アミノ酸配列は、疎水性アミノ酸で置換されたTCR(本明細書では「LV L修飾TCR」とも称される)を提供するために、鎖の定常領域の膜貫通(TM)ドメインにおける1つ、2つ、又は3つのアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換を含む。TCRのTMドメインにおける疎水性アミノ酸置換(複数可)は、TMドメインに疎水性アミノ酸置換(複数可)を有しないTCRと比較して、TCRのTMドメインの疎水性を増大させることができる。これに関して、TCRは、配列番号23のネイティブなSer112、Met114、及びGly115のうちの1つ、2つ、又は3つが、独立して、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrp；好ましくはLeu、Ile、又はValで置換されていてよい、LV L修飾TCRである

10

20

30

40

50

。好ましくは、配列番号 2 3 のネイティブな S e r 1 1 2 、 M e t 1 1 4 、及び G l y 1 1 5 の 3 つ全てが、独立して、 A l a 、 V a l 、 L e u 、 I l e 、 P r o 、 P h e 、 M e t 、又は T r p ; 好ましくは L e u 、 I l e 、又は V a l で置換されていてよい。本発明の実施形態では、 L V L 修飾 T C R は、(i) 配列番号 1 9 、(i i) 配列番号 2 0 、又は(i i i) 配列番号 1 9 及び 2 0 の両方を含み、配列番号 1 9 及び 2 0 はいずれも表 3 に定義される通りである。本発明の L V L 修飾 T C R は、本明細書に記載の C D R 又は可変領域のいずれかに加えて、置換定常領域を含み得る。

【 0 0 4 2 】

本発明の実施形態では、 L V L 修飾 T C R は、完全長 鎖及び完全長 鎖を含む。 L V L 修飾 T C R の 鎖及び 鎖の配列の例を表 3 に記載する。本発明の実施形態では、 T C R は、(i) 配列番号 2 5 、(i i) 配列番号 2 6 、(i i i) 配列番号 2 7 、(i v) 配列番号 2 8 、(v) 配列番号 2 5 及び 2 6 の両方、又は(v i) 配列番号 2 7 及び 2 8 の両方を含み、配列番号 2 5 ~ 2 8 は全て表 3 で定義される通りである。

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

【表3】

配列番号	「X」の定義
配列番号19(定常領域の α鎖)	48位のXが、Thrであり； 112位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又 はTrpであり； 好ましくは、112位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、112位のXが、Leuであり； 114位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrp であり； 好ましくは、114位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、114位のXが、Ileであり；かつ 115位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又 はTrpであり； 好ましくは、115位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、115位のXが、Valであり； 配列番号19は、配列番号23(非置換α鎖定常領域)を含まない 。
配列番号20(定常領域の β鎖)	57位のXが、Serである。
配列番号25(4304 TCR1 のα鎖)(N末端シグナル ペプチドを有する)	175位のXが、Thrであり； 239位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又 はTrpであり； 好ましくは、239位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、239位のXが、Leuであり； 241位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrp であり； 好ましくは、241位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、241位のXが、Ileであり；かつ 242位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又 はTrpであり； 好ましくは、242位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、242位のXが、Valであり； 配列番号25は、配列番号23(非置換α鎖定常領域)を含まない 。
配列番号26(4304 TCR1 のβ鎖)(N末端シグナル ペプチドを有する)	186位のXが、Serである。
配列番号27(4304 TCR1 のα鎖)(N末端シグナル ペプチドを有しない予 測配列)	156位のXが、Thrであり； 220位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又 はTrpであり； 好ましくは、220位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、220位のXが、Leuであり； 222位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrp であり； 好ましくは、222位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、222位のXが、Ileであり；かつ 223位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又 はTrpであり； 好ましくは、223位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、223位のXが、Valであり； 配列番号27は、配列番号23(非置換α鎖定常領域)を含まない 。
配列番号28(4304 TCR1 のβ鎖)(N末端シグナル ペプチドを有しない予 測配列)	175位のXが、Serである。

10

20

30

40

【0044】

本発明の実施形態では、置換アミノ酸配列は、鎖の定常領域の膜貫通(TM)ドメインにおける1つ、2つ、又は3つのアミノ酸の疎水性アミノ酸による置換(複数可)と組み合わせて、鎖及び鎖の一方又は両方の定常領域にシステイン置換を含む(本明細書では、「システイン置換LVL修飾TCR」とも称される)。これに関して、TCRは、配列番号23のネイティブなThr48がCysで置換されており；配列番号23のネイティブなSer112、Met114、及びGly115のうちの1つ、2つ、又は3つが、独立して、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrp；好ましくはLeu、Ile、又はValで置換されており；配列番号24のネイティブ

50

な S e r 5 7 が C y s で置換されている、システイン置換 L V L 修飾キメラ T C R である。好ましくは、配列番号 2 3 のネイティブな S e r 1 1 2 、 M e t 1 1 4 、 及び G l y 1 1 5 の 3 つ全てが、独立して、 A l a 、 V a l 、 L e u 、 I l e 、 P r o 、 P h e 、 M e t 、 又は T r p ; 好ましくは L e u 、 I l e 、 又は V a l で置換されていてよい。本発明の実施形態では、システイン置換 L V L 修飾 T C R は、(i) 配列番号 1 9 、(i i) 配列番号 2 0 、又は(i i i) 配列番号 1 9 及び 2 0 の両方を含み、配列番号 1 9 及び 2 0 はいずれも表 4 に定義される通りである。本発明のシステイン置換 L V L 修飾 T C R は、本明細書に記載の C D R 又は可変領域のいずれかに加えて、置換定常領域を含み得る。

【 0 0 4 5 】

実施形態では、システイン置換 L V L 修飾 T C R は、完全長 鎖及び完全長 鎖を含む。システイン置換 L V L 修飾 T C R の 鎖及び 鎖の配列の例を表 4 及び 8 に記載する。本発明の実施形態では、T C R は、(i) 配列番号 2 5 、(i i) 配列番号 2 6 、(i i i) 配列番号 2 7 、(i v) 配列番号 2 8 、(v) 配列番号 2 9 、(v i) 配列番号 3 0 、(v i i) 配列番号 3 1 、(v i i i) 配列番号 3 2 、(i x) 配列番号 2 5 及び 2 6 の両方、又は(x) 配列番号 2 7 及び 2 8 の両方、(x i) 配列番号 2 9 及び 3 0 の両方、又は(x i i) 配列番号 3 1 及び 3 2 の両方を含み、配列番号 2 5 ~ 2 8 は全て表 4 に定義される通りである。

【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

50

【表4-1】

配列番号	「X」の定義
配列番号19 (定常領域の α 鎖)	<p>48位のXが、Cysであり； 112位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、112位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、112位のXが、Leuであり； 114位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり； 好ましくは、114位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、114位のXが、Ileであり；かつ 115位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、115位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、115位のXが、Valであり； 配列番号19は、112位のSer、114位のMet、及び115位のGlyの全てを同時には含まない。</p>
配列番号20 (定常領域の β 鎖)	57位のXが、Cysである。
配列番号25(4304 TCR 1の α 鎖)(N末端シグナルペプチドを有する)	<p>175位のXが、Cysであり； 239位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、239位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、239位のXが、Leuであり； 241位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり； 好ましくは、241位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、241位のXが、Ileであり；かつ 242位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、242位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、242位のXが、Valであり； 配列番号25は、239位のSer、241位のMet、及び242位のGlyの全てを同時には含まない。</p>

【0047】

10

20

30

40

50

【表4-2】

配列番号	「X」の定義
配列番号26(4304 TCR 1のβ鎖) (N末端シグナルペプチドを有する)	186位のXが、Cysである。
配列番号27(4304 TCR 1のα鎖) (N末端シグナルペプチドを有しない予測配列)	156位のXが、Cysであり； 220位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、220位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、220位のXが、Leuであり； 222位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、又はTrpであり； 好ましくは、222位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、222位のXが、Ileであり；かつ 223位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、又はTrpであり； 好ましくは、223位のXが、Leu、Ile、又はValであり； 特に好ましくは、223位のXが、Valであり； 配列番号27は、220位のSer、222位のMet、及び223位のGlyの全てを同時には含まない。
配列番号28(4304 TCR 1のβ鎖) (N末端シグナルペプチドを有しない予測配列)	171位のXが、Cysである。

【0048】

本発明の実施形態では、システイン置換LV L修飾TCRは、(a)配列番号21(システイン置換LV L修飾TCRの鎖定常領域)；(b)配列番号22(システイン置換LV L修飾TCRの鎖定常領域)；又は(c)(a)及び(b)の両方を含む。
30

【0049】

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

【0050】

本発明のポリペプチドに関して、機能的部分は、G12V RASに特異的に結合する限り、該機能的部分がその一部であるTCRの連続アミノ酸を含む任意の部分であってよい。用語「機能的部分」は、TCRに関して使用されるとき、本発明のTCRの任意の部分又は断片であって、該部分又は断片がその一部であるTCR(親TCR)の生物活性を保持している部分又は断片を指す。機能的部分は、例えば、親TCRと同様の程度、同一程度、又はより高程度、(例えば、本明細書に記載のHLAクラスII分子のいずれかの枠内で)G12V RASに特異的に結合するか又はがんを検出、治療、若しくは予防する能力を保持しているTCRの部分を包含する。親TCRに関して、機能的部分は、例えば、親TCRの約10%、約25%、約30%、約50%、約70%、約80%、約90%、約95%、又はそれ以上を構成し得る。
40

【0051】

機能的部分は、該部分のアミノ若しくはカルボキシ末端又は両末端に、親TCRのアミノ酸配列にはみられない追加のアミノ酸を含んでいてもよい。望ましくは、追加のアミノ酸は、例えば、G12V RASに特異的に結合する及び/又はがんを検出する、がんを

10

20

30

40

50

治療若しくは予防する能力を有する等の機能的部分の生物学的機能に干渉しない。より望ましくは、追加のアミノ酸は、親 T C R の生物活性と比較して、生物活性を増強する。

【 0 0 5 2 】

ポリペプチドは、本発明の T C R の 鎖及び鎖のいずれか又は両方の機能的部分、例えば、本発明の T C R の 鎖及び/又は鎖の可変領域（複数可）の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 のうちの 1 つ以上を含む機能的部分を含み得る。本発明の実施形態において、ポリペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列（4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の C D R 1）、配列番号 2 のアミノ酸配列（4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の C D R 2）、配列番号 3 のアミノ酸配列（4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の C D R 3）、配列番号 4 のアミノ酸配列（4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の C D R 1）、配列番号 5 のアミノ酸配列（4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の C D R 2）、配列番号 6 のアミノ酸配列（4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の C D R 3）、又はそれらの組み合わせを含み得る。これに関して、本発明のポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つ以上を含み得る。本発明の実施形態では、ポリペプチドは、(a) 配列番号 1 ~ 3 の全て、(b) 配列番号 4 ~ 6 の全て、又は(c) 配列番号 1 ~ 6 の全てのアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 1 ~ 6 の全てのアミノ酸配列を含む。10

【 0 0 5 3 】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えば、上記 C D R 領域の組み合わせを含む本発明の T C R の可変領域を含み得る。これに関して、ポリペプチドは、(i) 配列番号 7 (N 末端シグナルペプチドを有しない 4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の可変領域の予測配列)；(i i) 配列番号 8 (N 末端シグナルペプチドを有しない 4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の可変領域の予測配列)；(i i i) 配列番号 9 (N 末端シグナルペプチドを有する 4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の可変領域)；(i v) 配列番号 1 0 (N 末端シグナルペプチドを有する 4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の可変領域)；(v) 配列番号 7 及び 8 の両方；又は(v i) 配列番号 9 及び 1 0 の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、ポリペプチドは、(i) 配列番号 7 及び 8 の両方又は(i i) 配列番号 9 及び 1 0 の両方のアミノ酸配列を含む。20

【 0 0 5 4 】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、上記本発明の T C R の定常領域を更に含み得る。これに関して、ポリペプチドは、配列番号 2 3 (鎖の W T マウス定常領域)、配列番号 2 4 (鎖の W T マウス定常領域)、配列番号 1 9 (鎖の置換マウス定常領域)、配列番号 2 0 (鎖の置換マウス定常領域)、配列番号 2 1 (システイン置換 L V L 修飾 T C R の 鎖定常領域)、配列番号 2 2 (システイン置換 L V L 修飾 T C R の 鎖定常領域)、配列番号 1 9 及び 2 0 の両方、配列番号 2 1 及び 2 2 の両方、又は配列番号 2 3 及び 2 4 の両方のアミノ酸配列を更に含み得る。好ましくは、ポリペプチドは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載する C D R 領域又は可変領域のいずれかと組み合せて、配列番号 1 9 及び 2 0 の両方、配列番号 2 1 及び 2 2 の両方、又は配列番号 2 3 及び 2 4 の両方のアミノ酸配列を更に含む。本発明の実施形態では、ポリペプチドの配列番号 1 9 及び 2 0 の一方又は両方は、表 2 ~ 4 のいずれか 1 つに定義される通りである。30

【 0 0 5 5 】

本発明の実施形態では、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載の T C R の 鎖又は鎖の全長を含み得る。これに関して、本発明のポリペプチドは、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、又は配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含み得る。あるいは、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載の T C R の両鎖を含んでいてもよい。例えば、ポリペプチドは、配列番号 2 5 ~ 2 6 の両方、配列番号 2 7 ~ 2 8 の両方、配列番号 2 9 ~ 3 0、又は配列番号 3 1 ~ 3 2 の両方を含み得る。40

【 0 0 5 6 】

例えば、本発明のポリペプチドは、(a) (i) 配列番号 2 5 の 1 7 5 位の X が、T h r 若しくは C y s であり；(i i) 配列番号 2 5 の 2 3 9 位の X が、S e r、A l a、V

a1、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；(i i i)配列番号25の241位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ(iv)配列番号25の242位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号25のアミノ酸配列を含む鎖；(b)配列番号26の186位のXが、Ser若しくはCysである、配列番号26のアミノ酸配列を含む鎖；(c)配列番号25及び56の両方；(d)(i)配列番号27の156位のXが、Thr若しくはCysであり；(i i)配列番号27の220位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；(i i i)配列番号27の222位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ(iv)配列番号27の223位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号27のアミノ酸配列を含む鎖；(e)配列番号28の171位のXが、Ser若しくはCysである、配列番号28のアミノ酸配列を含む鎖；(f)配列番号27及び28の両方；(g)配列番号29；(h)配列番号30；(i)配列番号31；(j)配列番号32；(k)配列番号29及び30の両方；又は(l)配列番号31及び32の両方のアミノ酸配列を含み得る。本発明の実施形態では、ポリペプチドの配列番号25～28のうちのいずれか1つ以上は、表2～4のいずれか1つに定義される通りである。

10

20

30

40

【0057】

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

【0058】

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

【0059】

本発明の別の実施形態では、(i)第1のポリペプチド鎖は、配列番号7のアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチド鎖は、配列番号8のアミノ酸配列を含む；又は(ii)第1のポリペプチド鎖は、配列番号9のアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチド鎖は、配列番号10のアミノ酸配列を含む。

【0060】

本発明のタンパク質は、本発明の他の態様について本明細書に記載する定常領域のいずれかを更に含み得る。これに関して、本発明の実施形態では、(i)第1のポリペプチド鎖は、配列番号19のアミノ酸配列を更に含み得、第2のポリペプチド鎖は、配列番号20のアミノ酸配列を更に含み得る；(ii)第1のポリペプチド鎖は、配列番号21のアミノ酸配列を更に含み得、第2のポリペプチド鎖は、配列番号22のアミノ酸配列を更に含み得る；又は(iii)第1のポリペプチド鎖は、配列番号23のアミノ酸配列を更に含み得、第2のポリペプチド鎖は、配列番号24のアミノ酸配列を更に含み得る。本発明の実施形態では、タンパク質の配列番号19及び20の一方又は両方は、表2～4のいずれか1つに定義される通りである。

【0061】

あるいは又は更に、(a)第1のポリペプチド鎖は、(i)配列番号25の175位のXが、Thr若しくはCysであり；(ii)配列番号25の239位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；(iii)配列番号25の241位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ(iv)配列番号25の242位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号25のアミノ酸配列を含む；(b)第2のポリペプチド鎖は、配列番号26の186位のXが、Ser若しくはCysである、配列番号26のアミノ酸配列を含む；(c)(a)及び(b)の両方である；(d)第1のポリペプチド鎖は、(i)配列番号

50

27の156位のXが、Thr若しくはCysであり；(ii)配列番号27の220位のXが、Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpであり；(iii)配列番号27の222位のXが、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、若しくはTrpであり；かつ(iv)配列番号27の223位のXが、Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、若しくはTrpである、配列番号27のアミノ酸配列を含む；(e)第2のポリペプチド鎖は、配列番号28の171位のXが、Ser若しくはCysである、配列番号28のアミノ酸配列を含む；(f)(d)及び(e)の両方である；(g)第1のポリペプチド鎖は、配列番号29のアミノ酸配列を含む；(h)第2のポリペプチド鎖は、配列番号30のアミノ酸配列を含む；(i)第1のポリペプチド鎖は、配列番号31のアミノ酸配列を含む；(j)第2のポリペプチド鎖は、配列番号32のアミノ酸配列を含む；(k)(g)及び(h)の両方；又は(i)(i)及び(j)の両方である。本発明の実施形態では、配列番号25～28のうちの1つ以上は、表2～4のいずれか1つに定義される通りである。

10

20

30

40

【0062】

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

20

【0063】

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

30

40

【0064】

本発明の幾つかの実施形態では、本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質は、鎖及び鎖を連結するリンカーペプチドを含む单一のタンパク質として発現し得る。これに関して、本発明のTCR、ポリペプチド、及びタンパク質は、リンカーペプチドを更に含み得る。リンカーペプチドは、有利なことに、宿主細胞における組み換え体のTCR、ポリペプチド、及び／又はタンパク質の発現を促進し得る。リンカーペプチドは、任意の好適なアミノ酸配列を含み得る。リンカーペプチドは、切断可能なリンカーペプチドであってもよい。例えば、リンカーペプチドは、RAKRS GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP（配列番号33）のアミノ酸配列を含むフリン-SGS G-P2Aリンカーペプチドであってよい。リンカーペプチドを含むコンストラクトが宿主細胞によって発現されたら、リンカーペプチドを切断してもよく、その結果、分離された鎖及び鎖が得られる。本発明の実施形態では、TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、完全長鎖、完全長鎖、及び鎖と鎖との間に位置するリンカーペプチドを含むアミノ酸配列を含み得る。

【0065】

50

本発明のタンパク質は、本明細書に記載の本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1

つを含む、組み換え抗体又はその抗原結合部分であってよい。本明細書で使用するとき、「組み換え抗体」とは、本発明のポリペプチドのうちの少なくとも1つ、及び抗体のポリペプチド鎖又はその抗原結合部分を含む組み換え（例えば、遺伝的に操作された）タンパク質を指す。抗体のポリペプチド又はその抗原結合部分は、抗体の重鎖、軽鎖、重鎖若しくは軽鎖の可変領域若しくは定常領域、単鎖可変領域（scFv）、又はFc、Fab、若しくはFc(ab)2'の断片等であってよい。抗体のポリペプチド鎖又はその抗原結合部分は、組み換え抗体の別々のポリペプチドとして存在してよい。あるいは、抗体のポリペプチド鎖又はその抗原結合部分は、本発明のポリペプチドとインフレームで（タンデムに）発現するポリペプチドとして存在してもよい。抗体のポリペプチド又はその抗原結合部分は、本明細書に記載の抗体及び抗体断片のいずれかを含む、任意の抗体又は任意の抗体断片のポリペプチドであってよい。

10

【0066】

本明細書に記載の本発明のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質の機能的バリアントは、本発明の範囲に含まれる。用語「機能的バリアント」とは、本明細書で使用するとき、親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質に対して実質的な又は著しい配列の同一性又は類似性を有するTCR、ポリペプチド、又はタンパク質を指し、該機能的バリアントは、該機能的バリアントがそのバリアントであるTCR、ポリペプチド、又はタンパク質の生物活性を保持している。機能的バリアントは、例えば、親のTCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質と同様の程度、同一程度、又はより高程度、親TCRが抗原特異性を有するか又は親のポリペプチド若しくはタンパク質が特異的に結合するG12V RASに特異的に結合する能力を保持している、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質（親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質）のバリアントを包含する。親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質に関して、機能的バリアントは、例えば、それぞれ親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質に対してアミノ酸配列が少なくとも約30%、約50%、約75%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又はそれ以上同一であってよい。

20

【0067】

機能的バリアントは、例えば、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のアミノ酸配列を含み得る。保存的アミノ酸置換は、当技術分野において公知であり、特定の物理的及び/又は化学的特性を有するあるアミノ酸が、同じ化学的又は物理的特性を有する別のアミノ酸に交換されるアミノ酸置換を含む。例えば、保存的アミノ酸置換は、酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸（例えば、Asp又はGlu）による置換、非極性側鎖を有するアミノ酸の、非極性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val等）による置換、塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸（Lys、Arg等）による置換、極性側鎖を有するアミノ酸の、極性側鎖を有する別のアミノ酸（Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr等）による置換等であってよい。

30

【0068】

あるいは又は更に、機能的バリアントは、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を有する親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質のアミノ酸配列を含み得る。この場合、非保存的アミノ酸置換が機能的バリアントの生物活性に干渉もせず、阻害もしないことが好ましい。好ましくは、非保存的アミノ酸置換は機能的バリアントの生物活性を増強し、その結果、機能的バリアントの生物活性は、親のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質と比べて増大する。

40

【0069】

TCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、本明細書に記載の指定のアミノ酸配列（複数可）から本質的になっていてよく、その結果、該TCR、ポリペプチド、又はタンパク質の他の構成要素、例えば他のアミノ酸が、該TCR、ポリペプチド、又はタンパク質の生物活性を実質的に変化させることがない。この点に関して、本発明のTCR、ポリペプチド、又はタンパク質は、例えば、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番

50

号 2 8 、配列番号 2 9 、配列番号 3 0 、配列番号 3 1 、配列番号 3 2 、配列番号 2 5 及び 2 6 の両方、配列番号 2 7 及び 2 8 の両方、配列番号 2 9 及び 3 0 の両方、又は配列番号 3 1 及び 3 2 の両方のアミノ酸配列から本質的になっていてよい。また、例えば、本発明の T C R 、ポリペプチド、又はタンパク質は、(i) 配列番号 7 、(i i) 配列番号 8 、(i i i) 配列番号 9 、(i v) 配列番号 1 0 、(v) 配列番号 7 及び 8 の両方、又は(v i) 配列番号 9 及び 1 0 の両方のアミノ酸配列(複数可)から本質的になっていてよい。更に、発明の T C R 、ポリペプチド、又はタンパク質は、(a) 配列番号 1 ~ 3 の全て、(b) 配列番号 4 ~ 6 の全て、又は(c) 配列番号 1 ~ 6 の全てのアミノ酸配列から本質的になっていてよい。

【 0 0 7 0 】

10

本発明の T C R 、ポリペプチド、及びタンパク質は、任意の長さであってよい、すなわち、該 T C R 、ポリペプチド、又はタンパク質が、その生物活性、例えば、G 1 2 V R A S に特異的に結合する；哺乳類におけるがんを検出する；又は哺乳類におけるがんを治療若しくは予防する能力等を保持している限り、任意の数のアミノ酸を含んでいてよい。例えば、ポリペプチドは、約 5 0 ~ 約 5 0 0 0 アミノ酸長の範囲、例えば、約 5 0 、約 7 0 、約 7 5 、約 1 0 0 、約 1 2 5 、約 1 5 0 、約 1 7 5 、約 2 0 0 、約 3 0 0 、約 4 0 0 、約 5 0 0 、約 6 0 0 、約 7 0 0 、約 8 0 0 、約 9 0 0 、約 1 0 0 0 、又はそれ以上のアミノ酸長であってよい。これに関して、本発明のポリペプチドは、オリゴペプチドも含む。

【 0 0 7 1 】

20

本発明の T C R 、ポリペプチド、及びタンパク質は、1つ以上の天然に存在するアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含んでいてよい。このような合成アミノ酸は、当技術分野において公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 - アミノ n - デカン酸、ホモセリン、S - アセチルアミノメチル - システイン、トランス - 3 - 及びトランス - 4 - ヒドロキシプロリン、4 - アミノフェニルアラニン、4 - ニトロフェニルアラニン、4 - クロロフェニルアラニン、4 - カルボキシフェニルアラニン、 - フェニルセリン - ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 - ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン - 2 - カルボン酸、1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N ' - ベンジル - N ' - メチル - リジン、N ' , N ' - ジベンジル - 30 リジン、6 - ヒドロキシリジン、オルニチン、 - アミノシクロペンタンカルボン酸、 - アミノシクロヘキサンカルボン酸、 - アミノシクロヘプタンカルボン酸、 - (2 - アミノ - 2 - ノルボルナン) - カルボン酸、 , , - ジアミノ酪酸、 , , - ジアミノブロピオン酸、ホモフェニルアラニン、及び - t e r t - ブチルグリシンが挙げられる。

【 0 0 7 2 】

本発明の T C R 、ポリペプチド、及びタンパク質を、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、N - アシル化、例えばジスルフィド架橋を介して環化、又は酸付加塩に変換、及び / 又は任意で二量体化若しくは多量体化、又はコンジュゲートしてもよい。

【 0 0 7 3 】

40

本発明の T C R 、ポリペプチド、及び / 又はタンパク質は、当技術分野において公知の方法、例えば、デノボ合成によって得ることができる。また、ポリペプチド及びタンパク質は、標準的な組み換え法を使用し、本明細書に記載の核酸を使用して組み換え的に生成することができる。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) を参照。あるいは、本明細書に記載の T C R 、ポリペプチド、及び / 又はタンパク質は、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) GenScript (Piscataway, NJ) 、及び Ray Biotech Life (Peachtree Corners, GA) 等の企

50

業によって商業的に合成され得る。これに関して、本発明の T C R 、ポリペプチド、及びタンパク質は、合成であってもよく、組み換え体であってもよく、単離されていてもよく、及び／又は精製されていてもよい。本発明の実施形態は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載する核酸又はベクターのいずれかによってコードされている単離又は精製された T C R 、ポリペプチド、又はタンパク質を提供する。本発明の別の実施形態は、本発明の他の態様に関して本明細書に記載する核酸又はベクターのいずれかが細胞内で発現した結果得られる、単離又は精製された T C R 、ポリペプチド、又はタンパク質を提供する。本発明の更に別の実施形態は、本明細書に記載の T C R 、ポリペプチド、又はタンパク質のいずれかを生成する方法であって、該 T C R 、ポリペプチド、又はタンパク質が生成されるように、本明細書に記載の宿主細胞又は宿主細胞の集団のいずれかを培養することを含む方法を提供する。

10

【 0 0 7 4 】

本発明の T C R 、ポリペプチド、又はタンパク質（これらの機能的部分又はバリアントのいずれかを含む）、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、宿主細胞の集団、又は抗体若しくはその抗原結合部分のいずれかを含むコンジュゲート、例えばバイオコンジュゲートも本発明の範囲に含まれる。コンジュゲート、及び一般にコンジュゲートを合成する方法は、当技術分野において公知である。

20

【 0 0 7 5 】

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

30

【 0 0 7 6 】

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

【 0 0 7 7 】

本発明の実施形態では、核酸は、配列番号 3 8 (切断可能なリンカーペプチドによって分離された 4 3 0 4 T C R 1 の 鎖及び鎖の両方をコードしている) 、配列番号 3 9 (4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の可変領域をコードしている) 、配列番号 4 0 (4 3 0 4 T C R 1 の 鎖の可変領域をコードしている) 、又は配列番号 3 9 及び 4 0 の両方のヌクレオチド配列を含む。

40

【 0 0 7 8 】

核酸は、当技術分野において公知の手順を使用して、化学合成及び／又は酵素ライゲーション反応に基づいて構築され得る。例えば、 G r e e n 及び S a m b r o o k ら、上掲を参照。例えば、核酸は、天然に存在するヌクレオチド、又は分子の生物学的安定性を増大させるか若しくはハイブリダイゼーションの際に形成される二本鎖の物理的安定性を増大させるために設計された様々に改変されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチド）を使用して、化学的に合成することができる。核酸を作製するために使用することができる改変ヌクレオチドの例としては、 5 - フルオ

50

ロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、- D - ガラクトシリルキュエオシン、イノシン、N⁶ - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - デミチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N⁶ - 置換アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、- D - マンノシリルキュエオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N⁶ - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、ブソイドウラシル、キュエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、及び 2 , 6 - ジアミノプリンが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、本発明の核酸のうちの 1 つ以上は、様々な商業実体のいずれかから購入することもできる。

10

【 0 0 7 9 】

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

20

【 0 0 8 0 】

また、本発明は、本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列、又は本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

30

【 0 0 8 1 】

ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列は、好ましくは、高ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする。「高ストリンジエントな条件」とは、ヌクレオチド配列が、非特異的ハイブリダイゼーションよりも検出可能に多い量で標的配列(本明細書に記載の核酸のいずれかのヌクレオチド配列)に特異的にハイブリダイズすることを意味する。高ストリンジエントな条件は、正確な相補的配列を有するポリヌクレオチド又は幾つかの散在している不一致しか含有していないものを、該ヌクレオチド配列に一致している幾つかの小さな領域(例えば、3 ~ 10 塩基)を偶然有するランダム配列と識別する条件を含む。このような相補的な小さな領域は、14 ~ 17 塩基又はそれ以上の完全長相補体よりも容易に融解するので、高ストリンジエントなハイブリダイゼーションによって容易に識別可能になる。比較的高ストリンジエントな条件は、例えば、約 0 . 02 ~ 0 . 1 M N a C l 又は等価物、約 50 ~ 70 の温度によって提供されるもの等の低塩及び / 又は高温条件を含む。このような高ストリンジエントな条件は、ヌクレオチド配列とテンプレート又は標的鎖との間の(もし存在するとしても)わずかな不一致しか許容せず、本発明の T C R のいずれかの発現を検出するのに特に好適である。一般的に、漸增量のホルムアミドを添加することによって、条件をよりストリンジエントにすることができると理解される。

40

【 0 0 8 2 】

本発明の実施形態はまた、本明細書に記載の核酸のいずれかと少なくとも約 70 % 以上、例えば、約 80 % 、約 90 % 、約 91 % 、約 92 % 、約 93 % 、約 94 % 、約 95 % 、

50

約 9 6 %、約 9 7 %、約 9 8 %、又は約 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。これに関して、核酸は、本明細書に記載のヌクレオチド配列のいずれかから本質的になっていてよい。

【 0 0 8 3 】

本発明の実施形態は、5'から3'に向かって、第1の核酸配列及び第2のヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸であって、該第1及び第2のヌクレオチド配列が、それぞれ、配列番号7及び8；8及び7；9及び10；10及び9；25及び26；26及び25；27及び28；28及び27；29及び30；30及び29；31及び32；又は32及び31のアミノ酸配列をコードしている核酸を提供する。

【 0 0 8 4 】

本発明の実施形態では、単離又は精製された核酸は、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との間に介在する第3のヌクレオチド配列を更に含み、該第3のヌクレオチド配列は、切断可能なリンカーペプチドをコードしている。本発明の実施形態では、切断可能なリンカーペプチドは、RAKRS GSGATNFSL LKQAGDVEENPGP（配列番号33）のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 8 5 】

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

【 0 0 8 6 】

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

【 0 0 8 7 】

本発明の組み換え発現ベクターは、任意の好適な組み換え発現ベクターであってよく、任意の好適な宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために使用することができる。好適なベクターとしては、プラスミド及びウイルス等、伝播及び増殖用、若しくは発現用、又は両方のために設計されたものが挙げられる。ベクターは、pUCシリーズ（Fermentas Life Sciences）、pBlue scriptシリーズ（Stratagene, La Jolla, CA）、pETシリーズ（Novagen, Madison, WI）、pGEXシリーズ（Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）、及びpEXシリーズ（Clontech, Palo Alto, CA）からなる群から選択され得る。GT10、GT11、ZapII（Stratagene）、EMBL4、及びNM1149等のバクテリオファージベクターを使用してもよい。植物発現ベクターの例としては、pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121、及びpBIN19（Clontech）が挙げられる。動物発現ベクターの例としては、pEUK-C1、pMAM、及びpMAMneo（Clontech）が挙げられる。好ましくは、組み換え発現ベクターは、ウイルスベクタ

10

20

30

40

50

一、例えば、レトロウイルスベクターである。特に好ましい実施形態では、組み換え発現ベクターは、MSGV1ベクターである。本発明の実施形態では、組換え発現ベクターは、トランスポゾン又はレンチウイルスベクターである。

【0088】

本発明の組み換え発現ベクターは、例えば、Green及びSambrookら、上掲に記載されている標準的な組み換えDNA技術を使用して調製することができる。環状又は線状である発現ベクターのコンストラクトは、原核又は真核の宿主細胞において機能する複製系を含有するように調製することができる。複製系は、例えば、C01E1、2μプラスミド、SV40、ウシパピローマウイルス等に由来していてよい。

【0089】

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

【0090】

組み換え発現ベクターは、形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞の選別を可能にする1つ以上のマーカー遺伝子を含んでいてよい。マーカー遺伝子は、殺生物剤耐性、例えば抗生物質、重金属等に対する耐性、原栄養性を与えるための栄養要求性宿主における補完等を含む。本発明の発現ベクターに好適なマーカー遺伝子は、例えば、ネオマイシン/G418耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、及びアンピシリン耐性遺伝子を含む。

【0091】

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

【0092】

本発明の組み換え発現ベクターは、一過的発現用、安定的発現用、又は両方のために設計することができる。また、組み換え発現ベクターは、構成的発現用又は誘導性発現用に作製することができる。

【0093】

更に、組み換え発現ベクターは、自殺遺伝子を含むように作製してもよい。本明細書で使用するとき、用語「自殺遺伝子」とは、自殺遺伝子を発現している細胞を死に至らしめる遺伝子を指す。自殺遺伝子は、該遺伝子が発現する細胞に対して剤、例えば薬物に対する感受性を付与し、そして、該細胞が該剤と接触したとき又は該剤に曝露されたときに該細胞を死に至らしめる遺伝子であってよい。自殺遺伝子は、当技術分野において公知であり、例えば、単純ヘルペスウイルス(HSV)チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ニトロレダクターゼ、及び誘導性カスパーゼ9遺伝子系を含む。

【0094】

本発明の別の実施形態は、更に、本明細書に記載の核酸又は組み換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。本明細書で使用するとき、用語「宿主細胞」とは、本発明の組み換え発現ベクターを含有し得る任意の種類の細胞を指す。宿主細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、真菌、又は藻類であってもよく、原核細胞、例えば、細菌又は

10

20

30

40

50

原生動物であってもよい。宿主細胞は、培養細胞であってもよく、初代細胞、すなわち、生物、例えばヒトから直接単離された細胞であってもよい。宿主細胞は、接着細胞であってもよく、懸濁細胞、すなわち、懸濁液中で成長する細胞であってもよい。好適な宿主細胞は、当技術分野において公知であり、例えば、DH5 大腸菌細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、サル VERO 細胞、COS 細胞、HEK293 細胞等が挙げられる。組み換え発現ベクターを増幅又は複製する目的のために、宿主細胞は、好ましくは、原核細胞、例えば DH5 細胞である。組み換え体の TCR、ポリペプチド、又はタンパク質を生成する目的のために、宿主細胞は、好ましくは、哺乳類細胞である。最も好ましくは、宿主細胞は、ヒト細胞である。宿主細胞は、任意の細胞型であってよく、任意の種類の組織を起源としていてよく、任意の発生段階であってよいが、宿主細胞は、好ましくは、末梢血リンパ球 (PBL) 又は末梢血单核細胞 (PBMC) である。より好ましくは、宿主細胞は、T 細胞である。本発明の実施形態では、宿主細胞は、ヒトリンパ球である。本発明の別の実施形態では、宿主細胞は、T 細胞、ナチュラルキラー-T (NKT) 細胞、インバリアントナチュラルキラー-T (iNKT) 細胞、及びナチュラルキラー (NK) 細胞からなる群から選択される。本発明の更に別の実施形態は、MTEYKLVVVGAVGVGKSAWTIQLI (配列番号 34) のペプチドに対して抗原特異性を有する TCR を発現する宿主細胞を生成する方法であって、本明細書に記載のベクターのいずれかの該細胞への導入を可能にする条件下で、該細胞を該ベクターと接触させることを含む方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0095】

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

【0096】

また、本明細書に記載の少なくとも 1 つの宿主細胞を含む細胞の集団が本発明によって提供される。細胞の集団は、組み換え発現ベクターのいずれも含まない少なくとも 1 つの他の細胞、例えば宿主細胞 (例えば、T 細胞)、又は T 細胞以外の細胞、例えば B 細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋肉細胞、脳細胞等に加えて、記載される組み換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を含む不均質な集団であってよい。あるいは、細胞の集団は、組み換え発現ベクターを含む (例えば、から本質的になる) 宿主細胞を主に含む、実質的に均質な集団であってもよい。また、集団は、該集団の全ての細胞が、組み換え発現ベクターを含む 1 つの宿主細胞のクローンであり、その結果、該集団の全ての細胞が組み換え発現ベクターを含む、細胞のクローン集団であってもよい。本発明の一実施形態では、細胞の集団は、本明細書に記載の組み換え発現ベクターを含む宿主細胞を含むクローン集団である。

【0097】

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

イーダー P B M C (例えは、放射線照射された同種 P B M C) と共に培養することによって実行される。

【 0 0 9 8 】

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

10

【 0 0 9 9 】

本発明の T C R 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、及び宿主細胞(その集団を含む)(以後、これらを全てまとめて「本発明の T C R 材料」と称する)は、医薬組成物等の組成物に製剤化してもよい。これに関して、本発明は、本明細書に記載の T C R 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、発現ベクター、及び宿主細胞(その集団を含む)のいずれかと、薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物を提供する。本発明の T C R 材料のいずれかを含有する本発明の医薬組成物は、1つを超える本発明の T C R 材料、例えば、ポリペプチド及び核酸又は2つ以上の異なる T C R を含んでいてもよい。あるいは、医薬組成物は、別の薬学的活性剤(複数可)又は薬物(複数可)、例えば、化学療法剤、例えば、アスピラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチニン、シスプラチニン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ピンプラスチン、ピンクリスチン等と組み合わせて、本発明の T C R 材料を含み得る。

20

【 0 1 0 0 】

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

30

【 0 1 0 1 】

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

【 0 1 0 2 】

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

40

【 0 1 0 3 】

本発明の目的のために、投与される本発明の T C R 材料の量又は用量(例えは、本発明

50

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

【 0104 】

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

【 0105 】

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

【 0106 】

当業者であれば、本発明の T C R 材料を任意の数の方法で修飾してよく、その結果、該修飾を通して本発明の T C R 材料の治療又は予防の有効性が増大することを容易に理解するであろう。例えば、本発明の T C R 材料を、直接又は架橋を介して間接的に化学療法剤にコンジュゲートしてもよい。化合物の化学療法剤へのコンジュゲートの実施は、当技術分野において公知である。当業者は、架橋及び / 又は化学療法剤が本発明の T C R 材料に結合しても本発明の T C R 材料の機能、すなわち、G 12 V R A S に結合する能力にもがんを検出、治療、若しくは予防する能力にも干渉しない限り、本発明の T C R 材料の機能に必須ではない本発明の T C R 材料の部位が、架橋及び / 又は化学療法剤を結合させるのに好適な部位であることを認識する。

【 0107 】

本発明の医薬組成物、 T C R 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、及び細胞の集団は、がんを治療又は予防する方法において使用できることが企図される。特定の理論に縛られるものではないが、本発明の T C R は、 G 12 V R A S に特異的に結合し、その結果、 T C R (又は関連する本発明のポリペプチド若しくはタンパク質) は、細胞によって発現されたとき、 G 12 V R A S を発現している標的細胞に対する免疫応答を媒介することができると考えられる。これに関して、本発明の実施形態は、哺乳類におけるがんを治療又は予防する方法であって、本明細書に記載の医薬組成物、 T C R 、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれか、本明細書に記載の T C R 、ポリペプチド、タンパク質のいずれかをコードしているスクレオチド配列を含む任意の核酸若しくは組み換え発現ベクター、又は本明細書に記載の T C R 、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれかをコードしている組み換えベクターを含む任意の宿主細胞若しくは細胞の集団を、哺乳類におけるがんを治療又は予防するのに有効な量、該哺乳類に投与することを含む方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 8 】

本発明の実施形態は、哺乳類においてがんに対する免疫応答を誘導する方法であって、本明細書に記載の医薬組成物、T C R、ポリペプチド、若しくはタンパク質、本明細書に記載のT C R、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれかをコードしているヌクレオチド配列を含む任意の核酸若しくは組み換え発現ベクター、又は本明細書に記載のT C R、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれかをコードしている組み換えベクターを含む任意の宿主細胞若しくは細胞の集団のいずれかを、哺乳類においてがんに対する免疫応答を誘導するのに有効な量、該哺乳類に投与することを含む方法を提供する。

【 0 1 0 9 】

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

10

【 0 1 1 0 】

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

20

【 0 1 1 1 】

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

30

【 0 1 1 2 】

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

40

【 0 1 1 3 】

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

【 0 1 1 4 】

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

【 0 1 1 5 】

また、複合体の検出は、当技術分野において公知の任意の数の方法を通して行うことができる。例えば、本明細書に記載の本発明のT C R、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組み換え発現ベクター、宿主細胞、又は細胞の集団を、検出可能な標識、例えば、放射性

50

同位体、フルオロフォア（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、フイコエリトリン（P E））、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ）、及び元素粒子（例えば、金粒子）等で標識してよい。

【0116】

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

【0117】

本発明の方法に関して、がんは、急性リンパ球性がん、急性骨髓性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門、肛門管、又は肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢、又は胸膜のがん、鼻、鼻腔、又は中耳のがん、口腔のがん、膣のがん、外陰部のがん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髓性がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髓腫、上咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、中咽頭のがん、卵巣がん、陰茎のがん、脾臓がん、腹膜、網、及び腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮のがん、尿管がん、及び膀胱がんのいずれかを含む任意のがんであってよい。好ましいがんは、脾臓、結腸直腸、肺、子宮内膜、卵巣、又は前立腺のがんである。好ましくは、肺がんは肺腺がんであり、卵巣がんは上皮性卵巣がんであり、脾臓がんは脾臓腺がんである。本発明の実施形態では、がんは、12位のグリシンがバリンで置換されている変異型ヒトR A Sアミノ酸配列を発現し、該変異型ヒトR A Sアミノ酸配列は、変異型ヒトK R A S、変異型ヒトH R A S、又は変異型ヒトN R A Sのアミノ酸配列であり、12位は、それぞれW TヒトK R A S、W TヒトH R A S、又はW TヒトN R A Sタンパク質を参照することによって定義される。がんが発現する変異型ヒトK R A S、変異型ヒトH R A S、及び変異型ヒトN R A Sは、本発明の他の態様に関して本明細書に記載する通りであってよい。

【0118】

本発明の方法において言及される哺乳類は、任意の哺乳類であってよい。本明細書で使用するとき、用語「哺乳類」とは、げっ歯目の哺乳類、例えばマウス及びハムスター、並びにウサギ目の哺乳類、例えばウサギを含むがこれらに限定されない任意の哺乳類を指す。哺乳類は、ネコ及びイヌを含む食肉目の哺乳類であることが好ましい。哺乳類は、ウシ及びブタを含む偶蹄目、又はウマを含む奇蹄目の哺乳類であることがより好ましい。哺乳類は、靈長目、サル目（C e b o i d s又はS i m o i d s）（サル）、又は真猿亜目（ヒト及び類人猿）の哺乳類であることが最も好ましい。特に好ましい哺乳類は、ヒトである。

【実施例】

【0119】

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

【0120】

実施例1

この実施例は、結腸直腸がん患者4304のT I Lからの抗G12V R A S T C Rの単離を示す。

【0121】

結腸直腸がん患者4304由来のT I Lを、独立して、患者が発現する複数の異なるネオ抗原に対する反応性についてスクリーニングした。下記の通り、G12Vに対する反応性が観察された。患者4304からの腫瘍断片（F2、F4、F5、F23、及びF24と付番）由来のT I Lを樹状細胞（D C）と共に培養した。D Cに、（i）独立して、24-m e rペプチドの8つの異なるプール（ペプチドプール番号1～8（P P 1～P P 8）

10

20

30

40

50

) のうちの 1 つをパルスした又は (i i) 独立して、 5 つの異なるタンデムミニ遺伝子 (T M G) コンストラクトのうちの 1 つを形質導入した。プールの各ペプチドは、患者が発現する異なるネオ抗原を含んでいた。 1 つの T M G コンストラクトは、タンデムに複数の異なる無関係のペプチドをコードしていた。他の 4 つの T M G コンストラクトはそれぞれ、タンデムに患者が発現するネオ抗原を含む複数の異なる 2 4 - m e r ペプチドをコードしていた。ネガティブコントロールとして、 T I L をジメチルスルホキシド (D M S O) で処理した D C と共に培養した。ポジティブコントロールとして、 T I L を酢酸ミリスチン酸ホルボール (P M A) で処理した。

【 0 1 2 2 】

酵素結合免疫スポット (E L I S p o t) アッセイを用いて、 I F N 分泌によって反応性を試験した。腫瘍断片 F 4 についての結果を表 5 に提示する。 P P 3 をパルスした D C と共に培養した T I L で反応性細胞が観察された。 P P 3 のどのペプチドが反応性を付与したのかを決定するために、 T I L を、独立して、 P P 3 からの各ペプチドを別々にパルスした D C と共に培養した。結果を表 6 に提示する。 G 1 2 V 2 4 m e r ペプチドをパルスした D C と T I L を共培養することによって、反応性細胞が観察された。

10

20

30

40

【 0 1 2 3 】

【 表 5 】

ペプチドプール (PP) 番号	ELISpotによって測定された陽性スポット数	タンデムミニ遺伝子(TMG) 番号	ELISpotによって測定された陽性スポット数
PP 1	17	TMG 1	19
PP 2	~26	TMG 2	2
PP 3	~158	TMG 3	3
PP 4	~80	TMG 4	3
PP 5	18	無関係のTMG (コントロール)	3
PP 6	~18	DMSO (コントロール)	~15
PP 7	~17	培地 (コントロール)	1
PP 8	~30	PMA/イオノマイシン (コントロール)	~118

【 0 1 2 4 】

【 表 6 】

ペプチドの名称	ELISpotによって測定された陽性スポット数	ペプチドの名称	ELISpotによって測定された陽性スポット数
LRP5	~186	ACTC1	~317
KSR2	~86	ADAMTS7	~241
PXMP2	~145	SCNN1G	~185
KRAS	909	DMSO (コントロール)	54
ARID2	~373	培地 (コントロール)	7
IL25	~349	ブランクプレート (コントロール)	24
FLRT2	~257	ブランクプレート (コントロール)	16
FAM189A1	~178	PMA/イオノマイシン (コントロール)	~697

50

【0125】

陽性細胞を再刺激し、単一細胞 T 細胞受容体 (TCR) シーケンシングのために 4 - 1 B B のアップレギュレーションによってソートして 96 ウェルプレートに入れた。 TCR 、すなわち、 4304 TCR1 (TRBV29-1 * 01 / TRBJ1-2 * 01 / TRBD2 * 01 / TRAV16 * 01) がみられた。

【0126】

TCR のアルファ鎖及びベータ鎖の可変領域の配列を、単一細胞 TCR シーケンシングによって同定した。アルファ鎖及びベータ鎖の可変領域のアミノ酸配列を表 7 に示す。 CDR には下線を引いてある。 N 末端シグナルペプチドは太字フォントである。

【0127】

【表 7 】

TCRの名称	TCR鎖	アミノ酸配列
4304 TCR1	可変 α (N 末端シグナルペプチドを有しない予測配列)	AQRVTQPEKLLSVFKGAPVELKCNY <u>SYS</u> GSP E <u>LFWYVQYSRQL</u> QLLL <u>RHISRESIKGFTADLNKGETSFHLKKPFAQEEDSAMYYCALLQGAQKLVF</u> GQQGTRLTINP (配列番号7)
	可変 β (N 末端シグナルペプチドを有しない予測配列)	SAVISQKPSRDICQRGTSLT <u>IQCQVD</u> SQVTMMF WYRQQPGQSLT <u>IATA</u> <u>NQGSEAT</u> YESGFVIDKFPISRPNLT <u>FSTLTVSNM</u> SPEDSS <u>IYLCSVE</u> SG QDYGYTFGSGTRLTVV (配列番号8)
	可変 α (N 末端シグナルペプチドを有する)	M KPTLISVLVIIFILRGTRAQRVTQPEKLLSVFKGAPVELKCNY <u>SYS</u> GSP E <u>LFWYVQYSRQL</u> QLLL <u>RHISRESIKGFTADLNKGETSFHLKKPFAQE</u> EDSAMYY <u>CALLQGAQKLVFGQQGTRLTINP</u> (配列番号9)
	可変 β (N 末端シグナルペプチドを有する)	M ASLLLLLGLGSV <u>FAVISQKPSRDICQRGTSLT</u> IQCQVD <u>SQVTMMF</u> YRQQPGQSLT <u>LIATANQGSEAT</u> YESGFVIDKFPISRPNLT <u>FSTLTVSNM</u> SPEDSS <u>IYLCSVE</u> SGQDYGYTFGSGTRLTVV (配列番号10)

10

20

30

【0128】

実施例 2

この実施例は、実施例 1 の TCR をコードしているレトロウイルスベクターの構築を示す。

【0129】

表 7 の 4304 TCR1 の 鎖及び 鎖の可変領域をコードしているヌクレオチド配列を取得し、コドンを最適化した。 TCR の VDJ 領域をマウス TCR 定常鎖に融合させた。 TCR の VJ 領域をマウス TCR 定常鎖に融合させた。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、ヒトの TCR 鎖及び TCR 鎖の定常領域を対応するマウス定常領域で置換すると、 TCR の発現及び機能性が改善すると考えられる (Cohen et al . , Cancer Res . , 66 (17) : 8878 - 86 (2006)) 。

【0130】

更に、マウスの TCR 及び TCR の定常鎖をシスティンで修飾した。マウス TCR 定常鎖に膜貫通型疎水性変異を導入した。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、これら修飾は、導入された TCR 鎖を優先的に対合させ、 TCR の表面発現及び機能性を高めると考えられる (Cohen et al . , Cancer Res . , 67 (8) : 3898 - 903 (2007) ; Haga - Friedman et al . , J . Immu . , 188 : 5538 - 5546 (2012)) 。定常領域へのこれら修飾を含む 4 つの TCR のそれぞれの完全長の 鎖及び 鎖を表 8 に示す。表 8 中、 CDR には下線を引き、定常領域の修飾アミノ酸残基には下線を引き、かつ太字で示す。

40

50

【0131】

【表8】

配列番号	配列
配列番号29 (N末端シグナルペプチドを有するCys置換LVL修飾4304 TCR1の α 鎖)	MKPTLISVLVIIIFILRGTRAQRVTQPEKLLSVFKGAPVELKCNY <u>SYS</u> <u>GSP</u> ELFWYVQYSRQLQLLRH <u>I</u> <u>S</u> <u>R</u> E <u>I</u> KGFTADLNKGETSFHLKPFAQEEDSAMYY <u>C</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>G</u> A <u>Q</u> KL <u>V</u> <u>F</u> GQGTRLTINPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLC LT DFDSQINVPKTMESGTFITDK <u>C</u> <u>V</u> LDMKAMDSKNSGAIAWSNQT <u>S</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>Q</u> DIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLL <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>K</u> VAGFNLLMTLRLWSS
配列番号30 (N末端シグナルペプチドを有するCys置換LVL修飾4304 TCR1の β 鎖)	MASLLLLLGLGSVFSAVISQKPSRDICQRGTSLT <u>I</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>PP</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>S</u>
配列番号31 (N末端シグナルペプチドを有しないCys置換LVL修飾4304 TCR1の α 鎖予測配列)	AQRVTQPEKLLSVFKGAPVELKCNY <u>SYS</u> <u>GSP</u> ELFWYVQYSRQLQLLRH <u>I</u> <u>S</u> <u>R</u> E <u>I</u> <u>K</u> GFTADLNKGETSFHLKKPFAQEEDSAMYY <u>C</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>G</u> A <u>Q</u> KL <u>V</u> <u>F</u> GQGTRLTINPNIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLC LT DFDSQINVPKTMESGTFITDK <u>C</u> <u>V</u> LDMKAMDSKNSGAIAWSNQT <u>S</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>Q</u> DIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLL <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>K</u> VAGFNL <u>M</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>S</u>
配列番号32 (N末端シグナルペプチドを有しないCys置換LVL修飾4304 TCR1の β 鎖予測配列)	SAVISQKPSRDICQRGTSLT <u>I</u> <u>Q</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>PP</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>H</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>S</u>

10

20

30

40

【0132】

表8の4304 TCR1の鎖及び鎖の可変領域をコードしているヌクレオチド配列を、以下の発現カセット構成を有するMSGV1ベースのレトロウイルスベクターにクローニングした：5' NcoI - VDJ - mC - フリン / Ser G1y / P2A - VJ - mC - EcoRI 3'。MSGV1ベクターの5' NcoIサイトへのTCR発現カセットのクローニングを促進するために、TCRV鎖のN末端シグナルペプチドにおける2番目のアミノ酸をロイシン(L)からアラニン(A)に変更した。TCR鎖をコードしているヌクレオチド配列は、配列番号39を含んでいた。TCR鎖をコードしているヌクレオチド配列は、配列番号40を含んでいた。

【0133】

TCR鎖及びTCR鎖は、フリンSer / G1y / P2Aリンカーペプチド(配列番号33)によって分離されていた。特定の理論又は機序に縛られるものではないが、リンカーペプチドは、2本の鎖の発現効率を同等にすると考えられる(Szymczak et al., Nat. Biotechnol., 22(5):589-94(2004))。

【0134】

レトロウイルスベクターのTCR発現カセットは、5'から3'に向かって、リンカーペプチドによって分離されたTCR鎖及びTCR鎖をコードしていた。TCR発現カセットは、配列番号38のヌクレオチド配列を含んでいた。TCR発現カセットがコードしているアミノ酸配列を表9に示す。表9中、CDRには下線を引き、定常領域はイタリック体で表記し、リンカーペプチドは太字で示す。

【0135】

50

【表9】

TCRの名称	TCR発現カセットにコードされているアミノ酸配列
4304 TCR1	MASLLLLLGLGSVFSAVISQKPSRDI CQRGTSLT I Q C Q V D S Q V T M M F W Y R Q Q P G Q S L T L I A T A N Q G S E A T Y E S G F V I D K F P I S R P N L T F S T L T V S N M S P E D S S I Y L C S V E S G Q D Y G Y T F G S G T R L T V V E D L R N V T P P K V S L F E P S K A E I A N K Q K A T L V C L A R G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V C T D P Q A Y K E S N Y S Y C L S S R L R V S A T F W H N P R N H F R C Q V Q F H G L S E E D K W P E G S P K P V T Q N I S A E A W G R A D C G I T S A 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 T L V V M A M V K R K N S R A K R S G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P M K P T L I S V L V I I F I L R G T R A Q R V T Q P E K L L S V F K G A P V E L K C N Y S Y S G S P E L F W Y V Q Y S R Q R L Q L L L R H I S R E S I K G F T A D L N K G E T S F H L K K P F A Q E E D S A M Y Y C A L L Q G A Q K L V F G Q G T R L T I N P N I Q N P E P A V Y Q L K D P R S Q D S T L C L F T D F D S Q I N V P K T M E S G T F I T D K C V L D M K A M D S K S N G A I A W S N Q T S F T C Q D I F K E T N A T Y P S S D V P C D A T L T E K S F E T D M N L N F Q N L L V I V L R I L L K V A G F N L L M T L R L W S S (配列番号37)

10

【0136】

実施例3

この実施例は、実施例2のレトロウイルスベクターによって発現されるTCRの結合活性を示す。

【0137】

健常ドナーPBLに、実施例2のレトロウイルスベクターを形質導入した。自己DCに、図1A～1Bに示す種々の濃度のG12V 24-merペプチドMTEYKLVVVGAVGVGKSAALTIQLI(配列番号34)又は対応するWT 24-merペプチドMTEYKLVVVGAGGGVGVGKSAALTIQLI(配列番号35)を2時間パルスした。この細胞を2回洗浄し、形質導入されたT細胞と1:1の比で一晩共培養した。IFN- 分泌をELISAによって測定した(図1A)。蛍光活性化細胞選別(FACS)によって、4-1BBのアップレギュレーションを評価した(図1B)。図1A～1Bに示すように、TCR形質導入細胞は、G12V 24merペプチドをパルスしたDCの特異的かつ高結合活性の認識を示した。

20

【0138】

実施例4

この実施例は、実施例2のレトロウイルスベクターによって発現されたTCRが、HLA-DRB1*01/HLA-DRA*01ヘテロ二量体によって提示されるG12VRASを認識することを示す。

30

【0139】

エクソーム及びmRNAシーケンシングを用いて、患者4304が発現したMHCクラスII分子を決定した。発現したMHCクラスII分子を図2に示す。

【0140】

エフェクター細胞は、4304 TCR1をコードしている実施例2のレトロウイルスベクターを形質導入した健常ドナーPBLであった。標的細胞は、独立して図2に示すHLAクラスIIヘテロ二量体のうちの1つをトランスフェクトしたCOS7又はHEK293細胞であった。標的細胞に、G12V 24merペプチドを負荷し、予めトランスフェクトされていたそれぞれのHLAクラスII分子をブロックした抗体の存在下又は非存在下で培養した。DMSOと共に培養した標的細胞をネガティブコントロールとした。(i) HLAブロッキング抗体の非存在下においてG12V 24-merペプチドで処理した患者4304由来の自己DCをポジティブコントロールとし、(ii) DMSOで処理した患者4304由来の自己DCをネガティブコントロールとした。

40

【0141】

ELISpotアッセイを用いて、IFN 分泌によって反応性を試験した。結果を図2に示す。図2に示すように、DRA*01:01/DRB1*01:01ヘテロ二量体をコードしているヌクレオチド配列を形質導入したG12V 24merを負荷した標的細胞と4304 TCR1形質導入細胞を共培養した際、反応性が観察された。この反応

50

性は、D R A * 0 1 : 0 1 / D R B 1 * 0 1 : 0 1 ヘテロ二量体を認識する抗体によってブロックされた。

【 0 1 4 2 】

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

【 0 1 4 3 】

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

【 0 1 4 4 】

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

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

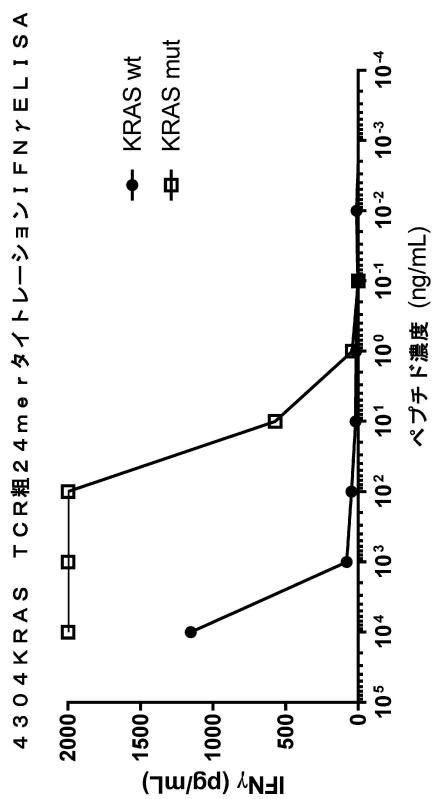


図 1 A

【図 1 B】

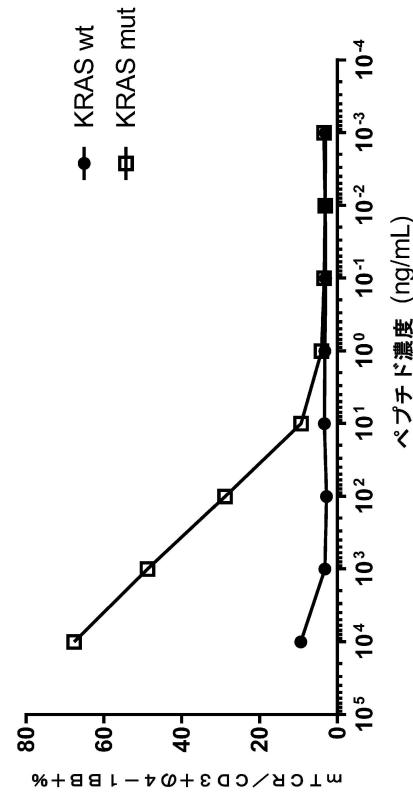


図 1 B

【図 2】

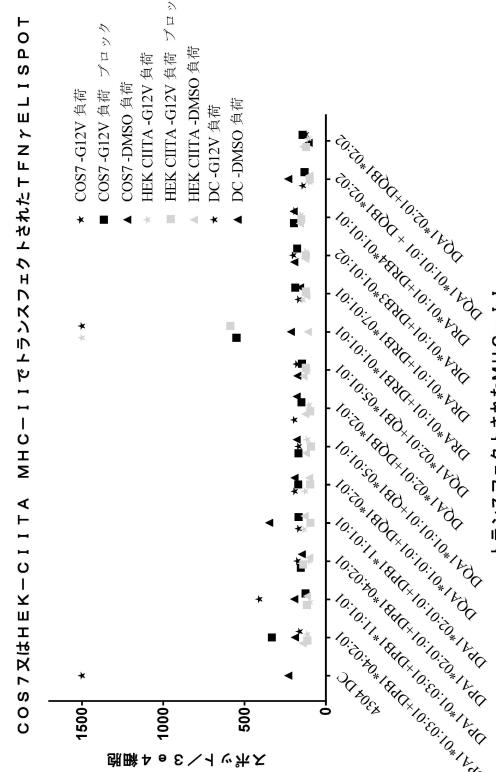


図 2

【配列表】

2023535366000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/041737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 C07K14/725 C07K16/32 C12N9/16 G01N33/574
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P G01N A61K C07K C12N

10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2019/085046 A1 (YOSEPH RAMI [US] ET AL) 21 March 2019 (2019-03-21)	1-8,11, 12,15, 16,19, 20,23-41
Y	examples 1-3,7-9 ----- -/-	9,10,13, 14,17, 18,21,22

20

30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

40

Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report

19 October 2021

28/10/2021

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, Olivier

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/041737

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	COHEN CYRILLE J 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 RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 66, no. 17, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 8878-8886, XP002466475, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1450 cited in the application abstract ----- Y COHEN CYRILLE J ET AL: "Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 67, no. 8, 15 April 2007 (2007-04-15), pages 3898-3903, XP002581931, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3986 cited in the application figure 1 ----- Y A. HAGA-FRIEDMAN ET AL: "Incorporation of Transmembrane Hydrophobic Mutations in the TCR Enhance Its Surface Expression and T Cell Functional Avidity", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 188, no. 11, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 5538-5546, XP055201584, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1103020 cited in the application figure 1 ----- Y DATABASE GeneSeq [Online] 16 May 2019 (2019-05-16), Malekzadeh P ET AL: "T cell receptor (TCR) alpha chain, SEQ ID 375.", XP055852859, Database accession no. BGE46898 the whole document -----	9,10,13, 14,17, 18,21,22 9,10,13, 14,17, 18,21,22 9,10,13, 14,17, 18,21,22 9,10,13, 14,17, 18,21,22 9,10,13, 14,17, 18,21,22
		10 20 30 40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/041737

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

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

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2021/041737

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2019085046	A1	21-03-2019	AR 112902 A1 AU 2018335274 A1 BR 112020005469 A2 CA 3076339 A1 CN 111201237 A EA 202090652 A1 EP 3684799 A1 JP 2020534828 A KR 20200051804 A MA 50180 A SG 11202002425P A TW 201920251 A US 2019085046 A1 WO 2019060349 A1	26-12-2019 09-04-2020 29-09-2020 28-03-2019 26-05-2020 21-08-2020 29-07-2020 03-12-2020 13-05-2020 26-05-2021 29-04-2020 01-06-2019 21-03-2019 28-03-2019

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I テーマコード(参考)

A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21

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

(74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉

(74)代理人 100152308
弁理士 中 正道

(74)代理人 100201558
弁理士 亀井 恵二郎

(72)発明者 レヴィン、ノーム

アメリカ合衆国、メリーランド州 20852、ロックヴィル、コングレッショナル レーン 357

(72)発明者 ロウリー、ザ サード、フランク ジェイ .

アメリカ合衆国、メリーランド州 20871、クラークスバーグ、マーツ ストリート 13052

(72)発明者 パークハースト、マリア アール .

アメリカ合衆国、メリーランド州 21043、エリコット シティ、グレース コート 4938

(72)発明者 ローゼンバーグ、スティーヴン エー .

アメリカ合衆国、メリーランド州 20854、ポトマック、アイアン ゲート ロード 10104

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 BA01 BA02 BA08 BA22 CA18 CA53 CA56 NA14
ZB071 ZB072 ZB261 ZB262
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 DA50 EA20 FA74