

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7046016号

(P7046016)

(45)発行日 令和4年4月1日(2022.4.1)

(24)登録日 令和4年3月24日(2022.3.24)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

Z N A

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/17

Z

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 0 7 K 14/725(2006.01)

C 0 7 K 14/725

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

請求項の数 35 (全32頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-567933(P2018-567933)

(86)(22)出願日 平成29年6月30日(2017.6.30)

(65)公表番号 特表2019-522984(P2019-522984
A)

(43)公表日 令和1年8月22日(2019.8.22)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/040448

(87)国際公開番号 WO2018/006054

(87)国際公開日 平成30年1月4日(2018.1.4)

審査請求日 令和2年6月23日(2020.6.23)

(31)優先権主張番号 62/357,265

(32)優先日 平成28年6月30日(2016.6.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 508285606

ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリ
カ, アズ リプレゼンテッド バイ ザ
セクレタリー, デパートメント オブ
ヘルス アンド ヒューマン サービスーズ
アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 9
2 - 7 6 6 0, ベセスダ, エグゼキュ
ティブ プールバード 6 0 1 1, スイ
ート 3 2 5, エムエスシー 7 6 6 0,
ナショナル インスティテューツ オブ
ヘルス, オフィス オブ テクノロジー
トランスファー

(73)特許権者 502099441

ロヨラ ユニバーシティ オブ シカゴ
アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 1 5 3,
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H E R V - E 反応性 T 細胞受容体および使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 の核酸配列を含む T 細胞受容体 鎖をコードする核酸分子と、配列番号 3 の核酸配列を含む T 細胞受容体 鎖をコードする核酸分子とを含む、ベクター。

【請求項 2】

前記 T 細胞受容体 鎖をコードする前記核酸、前記 T 細胞受容体 鎖をコードする前記核酸、または両方が、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】

細胞内ドメインを欠く末端切断型 C D 3 4 タンパク質をコードする核酸分子をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載のベクター。

【請求項 4】

レトロウイルスベクターである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のベクター。

【請求項 5】

S A M E N レトロウイルスベクターである、請求項 4 に記載のベクター。

【請求項 6】

配列番号 6 の核酸配列を含む、請求項 5 に記載のベクター。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

【請求項 8】

ウイルスの g a g タンパク質、ウイルスの p o l タンパク質、ウイルスの e n v タンパク質、またはこれらの 2 つまたはそれより多くの組合せをコードする核酸をさらに含む、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

P G 1 3 細胞である、請求項 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

リンパ球である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

前記リンパ球が T 細胞である、請求項 10 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む T 細胞受容体 鎖をコードする異種核酸と、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む T 細胞受容体 鎖をコードする異種核酸分子とを含む、改変された T 細胞。

【請求項 13】

前記 T 細胞受容体 鎖をコードする前記異種核酸が、配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードし、前記 T 細胞受容体 鎖をコードする前記異種核酸が、配列番号 5 のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする、請求項 12 に記載の改変された T 細胞。

【請求項 14】

前記 T 細胞受容体 鎖をコードする前記異種核酸が、配列番号 2 の核酸配列を含むまたはそれからなり、前記 T 細胞受容体 鎖をコードする前記異種核酸が、配列番号 3 の核酸配列を含むまたはそれからなる、請求項 12 または請求項 13 に記載の改変された T 細胞。

【請求項 15】

細胞内ドメインを欠く末端切断型 C D 3 4 タンパク質をコードする異種核酸をさらに含む、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の改変された T 細胞。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のベクターで形質導入された改変された T 細胞。

【請求項 17】

腎細胞癌を有する被験体に対して自己であるゲノムを含む、請求項 12 ~ 16 のいずれか一項に記載の改変された T 細胞。

【請求項 18】

請求項 12 ~ 17 のいずれか一項に記載の改変された T 細胞および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 12 に記載の改変された T 細胞を含む、被験体における腎細胞癌 (R C C) を処置または阻害するための組成物。

【請求項 20】

前記改変された T 細胞の集団を、前記被験体に投与する前に増殖させる、請求項 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記 R C C が明細胞 R C C である、請求項 19 または 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記 R C C が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むヒト内在性レトロウイルス - E (H E R V - E) タンパク質を発現する、請求項 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 23】

腎細胞癌抗原特異的 T 細胞受容体を発現する改変された T 細胞を作製する方法であって、被験体から得られたリンパ球の集団を抗 C D 3 抗体およびインターロイキン - 2 と接触させて、活性化 T 細胞の集団を産生すること、
該活性化 T 細胞の集団を請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のベクターで形質導入して、形質導入された T 細胞の集団を産生すること、ならびに
該形質導入された T 細胞の集団を増殖させることによって、該改変された T 細胞を産生す

10

20

30

40

50

ること

を含む、方法。

【請求項 24】

前記形質導入された T 細胞の集団を増殖させることが、前記形質導入された T 細胞を抗 CD3、抗 CD28、IL-2、および IL-15 と接触させることを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記形質導入された T 細胞を抗 CD3、抗 CD28、IL-2、および IL-15 と接触させることが、該細胞を抗 CD3、抗 CD28、IL-2、および IL-15 と 9 ~ 11 日間接触させることを含む、請求項 24 に記載の方法。

10

【請求項 26】

前記形質導入された T 細胞を抗 CD34 抗体と接触させることによって、前記形質導入された T 細胞の集団を富化することをさらに含む、請求項 23 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記リンパ球の集団が、腎細胞癌 (RCC) を有する被験体から得られる、請求項 23 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記リンパ球の集団が、配列番号 1 を含むタンパク質を発現する腎細胞癌を有する被験体から得られ、該被験体が HLA-A11 陽性である、請求項 23 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 29】

配列番号 2 の核酸配列を含む T 細胞受容体 鎖をコードし、配列番号 3 の核酸配列を含む T 細胞受容体 鎖をコードする単離された核酸。

【請求項 30】

配列番号 2 の核酸配列からなる前記 T 細胞受容体 鎖をコードする、請求項 29 に記載の核酸。

【請求項 31】

配列番号 4 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードする前記 T 細胞受容体 鎖をコードする、請求項 29 または請求項 30 に記載の核酸。

30

【請求項 32】

配列番号 3 の核酸配列からなる前記 T 細胞受容体 鎖をコードする、請求項 29 ~ 31 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 33】

配列番号 5 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードする前記 T 細胞受容体 鎖をコードする、請求項 29 ~ 32 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 34】

配列番号 4 および配列番号 5 のアミノ酸配列を含む、単離された T 細胞受容体ポリペプチド。

【請求項 35】

配列番号 4 および配列番号 5 のアミノ酸配列からなる、請求項 34 に記載のポリペプチド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016年6月30日に出願された米国仮出願第 62 / 357 , 265 号の利益を請求し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

分野

本開示は、がん免疫療法に関し、特に、腎細胞癌反応性 T 細胞受容体を発現する T 細胞、

50

ならびにT細胞を作製および使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

腎細胞癌(RCC)は、米国単独で毎年約12,000人の死亡の原因である。ほとんどのがんと同様に、早期に検出された場合には外科的介入が非常に効果的である。標的化された阻害剤および免疫チェックポイントの阻害剤(抗CTLA-4および抗PD-1モノクローナル抗体など)でのRCCの処置が進歩しているにもかかわらず、転移性RCCは一般に致死性であり、平均生存期間は1年未満である。したがって、RCCに対してより効果的な療法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書では、RCC細胞上に発現される抗原を認識するT細胞受容体(TCR)が開示される。被験体においてRCCを処置または阻害するために、T細胞にTCR(例えば、TCR鎖および鎖)をコードする核酸を形質導入し、T細胞を、RCCを有する被験体に投与することができる。

【0005】

本明細書では、RCC細胞によって発現されるヒト内在性レトロウイルス-E(HERV-E)抗原(例えば、配列ATFLGSLTWKを有するペプチド;配列番号1)に結合することができるTCRが開示される。一部の例では、TCRは、明細胞腎細胞癌(ccRCC)細胞によって発現されるHLA-A11拘束性TCRである。一部の例では、TCRは、鎖(配列番号4に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する鎖など)および鎖(配列番号5に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する鎖など)を含む。一部の例では、TCR鎖は、配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸によってコードされ、TCR鎖は、配列番号3に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸によってコードされる。

【0006】

本明細書では、例えば、発現制御配列(プロモーターなど)に作動可能に連結された、本開示のTCR鎖および/または鎖をコードする核酸を含むベクター(ウイルスベクターなど)も開示される。一部の例では、ベクターは、細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを含むが細胞内ドメインを欠く、CD34タンパク質などの末端切断型CD34タンパク質をコードする核酸も含む。非限定的な一例では、ベクターは、TCR鎖(配列番号2など)、TCR鎖(配列番号3など)、および末端切断型CD34をコードする核酸を含むレトロウイルスベクター(SAMENベクターなど)である。

【0007】

さらに、TCR鎖(例えば、配列番号2)およびTCR鎖(例えば、配列番号3)をコードする核酸などの、RCC細胞(ccRCC細胞など)によって発現されるHERV-E抗原に結合することができるTCRを発現する改変されたT細胞も開示される。一部の例では、改変されたT細胞は、TCR鎖およびTCR鎖、および必要に応じて末端切断型CD34タンパク質をコードする核酸を含むベクターをT細胞(RCCを有する被験体またはドナーから得られたT細胞など)に形質導入することによって調製される。

【0008】

一部の実施形態では、方法は、被験体またはドナーからT細胞の集団を得ること、TCR鎖(配列番号2など)およびTCR鎖(配列番号3など)をコードする核酸を含むベクターをT細胞の集団に形質導入すること、改変されたT細胞の集団を生成すること、ならびに改変されたT細胞を含む組成物を被験体に投与することによって、RCC(例えば、ccRCCまたは転移性ccRCC)を有する被験体を処置することを含む。一部の例では、T細胞の集団は、核酸分子を形質導入する前に*in vitro*で活性化される。他の例では、改変されたT細胞の集団は、被験体に投与する前に増殖および/または富化される。

10

20

30

40

50

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

配列番号2の核酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を含むT細胞受容体鎖をコードする核酸分子、配列番号3の核酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を含むT細胞受容体鎖をコードする核酸分子、または両方を含む、ベクター。

(項目2)

前記T細胞受容体鎖をコードする前記核酸分子が配列番号2の核酸配列を含み、前記T細胞受容体鎖をコードする前記核酸分子が配列番号3の核酸配列を含み、または両方である、項目1に記載のベクター。

(項目3)

配列番号2の核酸配列および配列番号3の核酸配列を含む、項目2に記載のベクター。

(項目4)

前記T細胞受容体鎖をコードする前記核酸、前記T細胞受容体鎖をコードする前記核酸、または両方が、プロモーターに作動可能に連結されている、項目1~3のいずれか一項に記載のベクター。

(項目5)

細胞内ドメインを欠く末端切断型CD34タンパク質をコードする核酸分子をさらに含む、項目1~4のいずれか一項に記載のベクター。

(項目6)

レトロウイルスベクターである、項目1~5のいずれか一項に記載のベクター。

(項目7)

SAMENレトロウイルスベクターである、項目6に記載のベクター。

(項目8)

配列番号6の核酸配列を含む、項目7に記載のベクター。

(項目9)

項目1~8のいずれか一項に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

(項目10)

ウイルスのgagタンパク質、ウイルスのpolタンパク質、ウイルスのenvタンパク質、またはこれらの2つまたはそれより多くの組合せをコードする核酸をさらに含む、項目9に記載の宿主細胞。

(項目11)

PG13細胞である、項目10に記載の宿主細胞。

(項目12)

リンパ球である、項目9に記載の宿主細胞。

(項目13)

前記リンパ球がT細胞である、項目12に記載の宿主細胞。

(項目14)

配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を含むT細胞受容体鎖をコードする異種核酸および配列番号5のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を含むT細胞受容体鎖をコードする異種核酸分子を含む、改変されたT細胞。

(項目15)

前記T細胞受容体鎖をコードする前記異種核酸が、配列番号4のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードし、前記T細胞受容体鎖をコードする前記異種核酸が、配列番号5のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードする、項目14に記載の改変されたT細胞。

(項目16)

前記T細胞受容体鎖をコードする前記異種核酸が、配列番号2の核酸配列を含むまたはそれからなり、前記T細胞受容体鎖をコードする前記異種核酸が、配列番号3の核酸配列を含むまたはそれからなる、項目14または項目15に記載の改変されたT細胞。

(項目17)

10

20

30

40

50

細胞内ドメインを欠く末端切断型 C D 3 4 タンパク質をコードする異種核酸をさらに含む、項目 1 4 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の改変された T 細胞。

(項目 1 8)

項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のベクターで形質導入された改変された T 細胞。

(項目 1 9)

腎細胞癌を有する被験体に対して自己であるゲノムを含む、項目 1 4 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の改変された T 細胞。

(項目 2 0)

項目 1 4 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の改変された T 細胞および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

(項目 2 1)

腎細胞癌 (R C C) を処置または阻害する方法であって、

R C C を有する被験体から T 細胞の集団を得ること、

配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する核酸を含む T 細胞受容体鎖をコードする核酸および配列番号 3 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する核酸を含む T 細胞受容体鎖をコードする核酸を含むベクターで該 T 細胞の集団を形質導入することによって、改変された T 細胞の集団を産生すること、ならびに

該改変された T 細胞を含む組成物を該被験体に投与することによって、該 R C C を処置または阻害すること

を含む、方法。

(項目 2 2)

前記 T 細胞受容体鎖をコードする前記核酸が、配列番号 2 の核酸配列を含むまたはそれからなり、前記 T 細胞受容体鎖をコードする前記核酸が、配列番号 3 の核酸配列を含むまたはそれからなる、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記 T 細胞受容体鎖をコードする前記核酸が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードし、前記 T 細胞受容体鎖をコードする前記核酸が、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードする、項目 2 1 または項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記ベクターが、細胞内ドメインを欠く末端切断型 C D 3 4 タンパク質をコードする核酸をさらに含む、項目 2 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 5)

前記ベクターがレトロウイルスベクターである、項目 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 6)

前記改変された T 細胞の集団が、前記被験体に投与する前に、抗 C D 3 4 抗体を用いる選択によって富化される、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記 T 細胞の集団が、形質導入の前に活性化される、項目 2 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 8)

形質導入の前に、C D 4 を発現する T 細胞を前記 T 細胞の集団から枯渇させる、項目 2 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 9)

前記改変された T 細胞の集団を、前記被験体に投与する前に増殖させる、項目 2 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 0)

前記改変された T 細胞の集団を前記被験体に投与する前に、該被験体に免疫抑制療法が施される、項目 2 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 3 1)

前記 R C C が明細胞 R C C である、項目 2 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

前記 R C C が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むヒト内在性レトロウイルス - E (H E R V - E) タンパク質を発現する、項目 2 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記被験体が、ヒト白血球抗原 (H L A) 血清型 H L A - A 1 1 について陽性である、項目 2 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

R C C を有する被験体を選択することをさらに含み、該 R C C が、配列番号 1 を含む H E R V - E タンパク質を発現し、該被験体が H L A - A 1 1 について陽性である、項目 2 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 3 5)

腎細胞癌抗原特異的 T 細胞受容体を発現する改変された T 細胞を作製する方法であって、被験体からリンパ球の集団を得ること、

該リンパ球の集団を抗 C D 3 抗体およびインターロイキン - 2 と接触させて、活性化 T 細胞の集団を産生すること、

該活性化 T 細胞の集団を項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のベクターで形質導入して、形質導入された T 細胞の集団を産生すること、ならびに

該形質導入された T 細胞の集団を増殖させることによって、該改変された T 細胞を産生すること

20

を含む、方法。

(項目 3 6)

前記形質導入された T 細胞の集団を増殖させることが、前記形質導入された T 細胞を抗 C D 3、抗 C D 2 8、I L - 2、および I L - 1 5 と接触させることを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記形質導入された T 細胞を抗 C D 3、抗 C D 2 8、I L - 2、および I L - 1 5 と接触させることが、該細胞を抗 C D 3、抗 C D 2 8、I L - 2、および I L - 1 5 と 9 ~ 1 1 日間接触させることを含む、項目 3 6 に記載の方法。

30

(項目 3 8)

前記形質導入された T 細胞を抗 C D 3 4 抗体と接触させることによって、前記形質導入された T 細胞の集団を富化することをさらに含む、項目 3 5 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 9)

前記リンパ球の集団が、腎細胞癌 (R C C) を有する被験体から得られる、項目 3 5 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

前記リンパ球の集団が、配列番号 1 を含むタンパク質を発現する腎細胞癌を有する被験体から得られ、該被験体が H L A - A 1 1 陽性である、項目 3 5 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 4 1)

配列番号 2 の核酸配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を含む T 細胞受容体 鎖をコードする単離された核酸。

(項目 4 2)

配列番号 2 の核酸配列を含むまたはそれからなる、項目 4 1 に記載の核酸。

(項目 4 3)

配列番号 4 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードする、項目 4 1 または項目 4 2 に記載の核酸。

(項目 4 4)

50

配列番号 3 の核酸配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を含む T 細胞受容体 鎖をコードする単離された核酸。

(項目 4 5)

配列番号 3 の核酸配列を含むまたはそれからなる、項目 4 4 に記載の核酸。

(項目 4 6)

配列番号 5 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなるタンパク質をコードする、項目 4 4 または項目 4 5 に記載の核酸。

(項目 4 7)

配列番号 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を含む、単離された T 細胞受容体 鎖ポリペプチド。

(項目 4 8)

配列番号 4 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、項目 4 7 に記載のポリペプチド。

(項目 4 9)

配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を含む、単離された T 細胞受容体 鎖ポリペプチド。

(項目 5 0)

配列番号 5 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、項目 4 9 に記載のポリペプチド。

【 0 0 0 9 】

本開示の上記のおよび他の特徴は、添付の図面を参照して進める以下の詳細な記載からより明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】図 1 は、本明細書に記載する T C R 鎖および 鎖の発現用の例示的なレトロウイルスベクターの概略図である。C M V、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサー； 、パッケージングシグナル；S D、スプライスドナー；S A、スプライスアクセプター；T C R 、H E R V - E 抗原特異的 T C R 鎖（例えば、配列番号 2）；P 2 A、豚テシオウイルスに由来する自己切断性 2 A ペプチド；T C R 、H E R V - E 抗原特異的 T C R 鎖（例えば、配列番号 3）；T 2 A、T h o s e a a s i g n a ウイルスの自己切断性 2 A ペプチド；C D 3 4 t、タンパク質の細胞外および膜貫通領域を有する末端切断型 C D 3 4 ；L T R、3 ' L T R。

【 0 0 1 1 】

【図 2】図 2 は、R C C を有する被験体を処置するための改変された T 細胞を回収および作製するための例示的なプロトコルの概略図である。

【 0 0 1 2 】

【図 3 A】図 3 A および 3 B は、2 人のドナー（図 3 A）および 1 人のドナー（図 3 B）からの c c R C C 細胞に対する H L A - A 1 1 拘束性 T C R をコードするレトロウイルスベクターで形質導入された T 細胞の反応性を示すグラフである。

【図 3 B】図 3 A および 3 B は、2 人のドナー（図 3 A）および 1 人のドナー（図 3 B）からの c c R C C 細胞に対する H L A - A 1 1 拘束性 T C R をコードするレトロウイルスベクターで形質導入された T 細胞の反応性を示すグラフである。

【 0 0 1 3 】

【図 4】図 4 A ~ 4 C は、C D 3 4 選択ステップの前および後の形質導入された T 細胞における C D 3 4 発現（図 4 A）、ならびに C D 3 4 選択の形質導入された T 細胞における C D 3（図 4 B）および H E R V - E テトラマー（図 4 C）の発現を示す一連のプロットである。

【 0 0 1 4 】

【図 5】図 5 A および 5 B は、C D 3 4 + - H E R V - E テトラマー + 形質導入 T 細胞における C D 8 細胞（図 5 A）および C D 4 細胞（図 5 B）を示すプロットである。

【 0 0 1 5 】

【図 6】図 6 A および 6 B は、2 人のドナーからの c c R C C 細胞に対する H L A - A 1

10

20

30

40

50

1 拘束性 T C R をコードするレトロウイルスベクターで形質導入された T 細胞のクロム細胞傷害性を示すグラフである。ドナー 1 からの T 細胞集団は 39.9% の C D 8 + であり (図 6 A)、ドナー 2 からの T 細胞集団は 52.8% の C D 8 + であった (図 6 B)。

【 0 0 1 6 】

【 図 7 】 図 7 は、2 人の異なるドナーからの R C C 細胞または L C L 細胞に対する、および H L A - A 1 1 陰性ドナーからの T 細胞および活性化 T 細胞に対する H L A - A 1 1 拘束性 T C R をコードするレトロウイルスベクターで形質導入された T 細胞のクロム放出細胞傷害性を示すグラフである。

【 0 0 1 7 】

【 図 8 】 図 8 は、様々な細胞株と接触させた H L A - A 1 1 拘束性 T C R をコードするレトロウイルスベクターで形質導入された健常ドナーからの C D 8 + C D 3 4 + T 細胞を使用したインターフェロン - (I F N) 分泌を示すグラフである。各細胞株の H E R V - E / H L A - A 1 1 状態は以下の通りである： S A U J : H E R V - E + / H L A - A 1 1 + ; L Y O W T : H E R V - E + / H L A - A 1 1 陰性 ; S N Y A 1 1 + : H E R V - E 陰性 / H L A - A 1 1 形質導入 ; U R B A 1 1 + : H E R V - E 陰性 / H L A - A 1 1 形質導入 ; W H I A 1 1 + : H E R V - E 陰性 / H L A - A 1 1 形質導入 ; O R T A 1 1 + : H E R V - E 陰性 / H L A - A 1 1 形質導入 ; O R T W T : H E R V - E 陰性 / H L A - A 1 1 陰性 ; S E A W T : H E R V - E 陰性 / H L A - A 1 1 陰性。標準曲線を挿入図に示す。

【 0 0 1 8 】

【 図 9 】 図 9 は、進行性 c c R C C を有する H L A - A 1 1 陽性患者における H E R V - E T C R 形質導入自己 T 細胞の安全性および忍容性を決定するための例示的な第 I 相臨床試験を示す概略図である。

【 0 0 1 9 】

【 図 1 0 】 図 1 0 は、H E R V - E T C R 形質導入 T 細胞を用いて転移性 c c R C C を有する患者を処置するための例示的なプロトコールを示す概略図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 0 】

配列表

本明細書または添付の配列表に挙げる任意の核酸配列およびアミノ酸配列は、37 C . F . R . § 1 . 8 2 2 で定義されるヌクレオチド塩基およびアミノ酸の標準的な略語を使用して示している。少なくとも一部の場合に、各核酸配列の一方の鎖のみを示すが、示した鎖に対する任意の参照により、相補鎖も包含されるものと理解される。

【 0 0 2 1 】

配列番号 1 は、H L A - A 1 1 R C C 特異的 H E R V - E 抗原ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 2 2 】

配列番号 2 は、例示的な R C C H E R V 反応性 T C R アルファ鎖の核酸配列である。

【 0 0 2 3 】

配列番号 3 は、例示的な R C C H E R V 反応性 ベータ鎖の核酸配列である。

【 0 0 2 4 】

配列番号 4 は、例示的な R C C H E R V 反応性 T C R アルファ鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 5 】

配列番号 5 は、例示的な R C C H E R V 反応性 ベータ鎖のアミノ酸配列である。

【 0 0 2 6 】

配列番号 6 は、R C C H E R V 反応性 T C R および末端切断型 C D 3 4 の発現用の例示的な S A M E N ベクターの核酸配列である。

【 0 0 2 7 】

配列番号 7 は、例示的な末端切断型 C D 3 4 (C D 3 4 t) タンパク質のアミノ酸配列である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

詳細な説明

同種移植後に長期的な腫瘍退縮を示した R C C 患者から同種 T 細胞クローンが以前に単離された (Takahashiら、J. Clin. Invest. 118 巻: 1099 ~ 1109 頁、2008 年)。この H L A - A 1 1 拘束性の C D 8 + T 細胞クローンは、H L A - A 1 1 陽性の c c R C C 細胞株に対して高度に細胞傷害性であったが、非悪性細胞を殺滅しなかった (Takahashiら、2008 年)。c D N A 発現クローニングを使用して、内在性レトロウイルス E 型 (H E R V - E) によってコードされる、このクローンによって認識される抗原が同定された (Takahashiら、2008 年)。この抗原は c c R C C で発現されていたが、正常組織または他の腫瘍型では観察されず、約 80 % の c c R C C 腫瘍によって発現される。

10

【 0 0 2 9 】

本発明者らは、R C C 患者から単離された T 細胞クローンによって発現される T 細胞受容体を同定した。本明細書に記載するように、この T C R は、R C C 患者を処置するための遺伝子移入免疫療法のために使用することができる。T 細胞を T C R 鎖および 鎖をコードする遺伝子で形質導入し、T 細胞を、R C C を有する被験体に投与して被験体由来の正常 T 細胞の特異性を R C C 細胞に向け直す。

I . 略語

c c R C C	明細胞腎細胞癌
C D 3 4 t	末端切断型 C D 3 4
C T L	細胞傷害性 T リンパ球
H E R V	ヒト内在性レトロウイルス
H L A	ヒト白血球抗原
L T R :	長鎖末端反復
M M L V	モロニーマウス白血病ウイルス
P B M C	末梢血単核細胞
R C C	腎細胞癌
T C R	T 細胞受容体

20

【 0 0 3 0 】

I I . 用語

別段の記載がなければ、技術用語は従来の用法に従って使用される。分子生物学の一般的な用語の定義は、Lewin's Genes X、Krebsら編、Jones and Bartlett Publishers、2009 年 (I S B N 0 7 6 3 7 6 6 3 2 1) ; Kendrewら (編)、The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Publishers 刊、1994 年 (I S B N 0 6 3 2 0 2 1 8 2 9) ; Robert A. Meyers (編)、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、Wiley, John & Sons, Inc. 刊、1995 年 (I S B N 0 4 7 1 1 8 6 3 4 1) ; および George P. Redei、Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics、第 3 版、Springer、2008 年 (I S B N : 1 4 0 2 0 6 7 5 3 4) ; および他の類似の参考文献に見出すことができる。

30

40

【 0 0 3 1 】

別段の説明がなければ、本明細書で使用する全ての科学技術用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。「a」、「an」、および「the」という単数の用語は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の指示対象を包含する。同様に、「または」という語は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、「および」を包含することを意図する。したがって、「A または B を含む」は、A、または B、または A および B を含むことを意味する。核酸またはポリペプチドについて与えられた全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および全ての分子量または分子質量の値は、近似値であり、説明のために提供されていることがさらに理解されるべきである。

50

【 0 0 3 2 】

本開示の実施または試験において本明細書に記載するものに類似のまたは均等な方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及する全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。GenBank 受託番号に関連する配列は、別段の記載がなければ、2016年6月30日時点でGenBankに存在するものとして参照により本明細書に組み込まれる。不一致がある場合は、用語の説明を含めて本明細書が優先する。加えて、材料、方法、および実施例は例示的なものに過ぎず、限定することを意図しない。

【 0 0 3 3 】

本開示の様々な実施形態の再調査を促進するために、特定の用語について以下の説明を提供する。

10

【 0 0 3 4 】

抗原：被験体において抗体の産生またはT細胞応答を刺激できる化合物、組成物、または物質である。抗原は、異種免疫原によって誘導されるものなどの特定の液性または細胞性免疫の産物と反応する。「抗原」という用語は、全ての関連する抗原エピトープを包含する。「エピトープ」または「抗原決定基」は、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位を指す。一実施形態では、T細胞は、エピトープがMHC分子との組み合わせで提示されたときにエピトープに応答する。エピトープは、連続するアミノ酸またはタンパク質の三次フォールディングによって並置される連続しないアミノ酸の両方から形成され得る。連続するアミノ酸から形成されるエピトープは、変性溶媒に曝露された際に通常保持されるが、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、変性溶媒で処理した際に通常失われる。エピトープは、典型的に、少なくとも3つ、より一般的には、少なくとも5つ、約9つ、約7~11、または約8~10のアミノ酸を特有の空間コンホメーションにおいて含む。エピトープの空間コンホメーションを決定する方法としては、例えば、X線結晶構造解析法および二次元核磁気共鳴が挙げられる。

20

【 0 0 3 5 】

抗原は、組織特異的抗原または疾患特異的抗原であってよい。組織特異的抗原は疾患特異的抗原であってもよい。これらの用語は排他的なものではない。組織特異的抗原は、単一の組織などの限られた数の組織で発現される。疾患特異的抗原は、疾患プロセスと同時に発生的に発現される。疾患特異的抗原の特定の非限定的な例は、その発現が腫瘍形成、例えばRCCと相関するまたはそれを予測する抗原である。

30

【 0 0 3 6 】

自己：個体自身の組織から採られた組織、細胞、または核酸を指す。例えば、T細胞の自己移入または移植ではドナーとレシピエントとが同一の人である。自己（または「自家（autogeneic）」または「自原性（autogenous）」）は自身に関し、または生物体それ自体の内に起源がある。

【 0 0 3 7 】

CD34：細胞間接着分子として機能する細胞表面糖タンパク質である。CD34は、高度にグリコシル化された細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを有する1回膜貫通タンパク質である。CD34は造血細胞上に発現され、細胞遊走において役割を果たす。例示的なヒトCD34配列としては、GenBank 受託番号NM_001025109およびNM_001773（核酸配列）、ならびにNP_001020280およびNP_001764（アミノ酸配列）が挙げられ、これらの全ては、2016年6月30日の時点でGenBank中に存在するものとして参照により本明細書に組み込まれる。

40

【 0 0 3 8 】

HLA-A11：HLAのA型に含まれるヒト白血球抗原（HLA）の血清型である。HLA-A11は、HLA-A*11対立遺伝子群によってコードされる鎖および2-ミクロglobulinによってコードされる鎖を含むMHCクラスI分子である。HLA-A11などのMHCクラスI分子は、典型的に7~11アミノ酸長のペプチド（抗原）に

50

結合し、T C Rへの結合を介したT細胞への抗原の提示に関与する。

【0039】

ヒト内在性レトロウイルスE (H E R V - E) : H E R Vは、ヒトゲノムに組み込まれた古代の外因性レトロウイルスのレムナントである。H E R Vはヒトゲノムの5 ~ 8 %を構成すると推定される。ほとんどのH E R Vは変異を蓄積しておりまたは転写がサイレンシングされており、全長タンパク質を産生しない。しかしながら、一部のH E R Vは、腫瘍などの状況で転写が活性である。H E R V - Eはヒト第6 q染色体上に位置するH E R Vサブタイプである。H E R V - Eからの少なくとも3つの転写物(例えば、G e n B a n k 受託番号E U 1 3 7 8 4 6、E U 1 3 7 8 4 7、およびJ Q 7 3 3 9 0 5)が同定されており、R C C細胞で発現されるが、他の腫瘍または非腫瘍細胞では発現されない(Taka hashiら、J. Clin. Oncol. 1 1 8巻: 1 0 9 9 ~ 1 1 0 9頁、2 0 0 8年)。

10

【0040】

作動可能に連結された: 第1の核酸が第2の核酸と機能的な関係で配置されているときに、第1の核酸は第2の核酸と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターはコード配列に作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結された核酸は連続し、2つのタンパク質コーディング領域の連結が必要な場合、オープンリーディングフレームが揃えられる。

【0041】

組換え: 組換え核酸分子は、天然に存在しない配列を有するか、または2つの、他の方法で分離した配列のセグメントの人工的な組合せによって作られる配列を有する核酸分子である。この人工的な組合せは、化学合成によって、または遺伝子操作技術によるなどの核酸分子の単離されたセグメントの人工的な操作によって達成することができる。

20

【0042】

同様に、組換えウイルスは、天然に存在しない核酸配列(ウイルスに由来しない異種配列などを包含する)、または異なる起源の少なくとも2つの配列の人工的な組合せによって作られる核酸配列を有するウイルスである。「組換え」という用語はまた、天然の核酸分子、タンパク質、またはウイルスの一部分の付加、置換、または欠失のみによって変化した核酸、タンパク質、およびウイルスも包含する。

【0043】

腎細胞癌(R C C) : 腎臓の細胞を起源とする腫瘍である。R C Cは成人において最もよく見られる種類の腎臓がんである。R C Cには複数の組織学的サブタイプがあり、サブタイプとしては、R C Cの6 0 ~ 7 0 %を占め、近位尿細管の細胞を起源とする明細胞腎細胞癌(c c R C C)が挙げられる。c c R C C細胞は、腺房または類肉腫の増殖パターンを有する透明な細胞質を呈する。追加のサブタイプとしては、乳頭状R C C(これも近位尿細管の細胞を起源とする)、色素嫌性R C C(皮質集合管の細胞を起源とする)、腫瘍溶解性R C C(皮質集合管の細胞を起源とする良性新生物)、および集合管R C C(髄質集合管の細胞を起源とする)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0044】

T細胞: 免疫応答の重要なメディエーターである白血球(リンパ球)である。T細胞としては、C D 4 + T細胞およびC D 8 + T細胞が挙げられるが、これらに限定されない。C D 4 + Tリンパ球は、その表面に「表面抗原分類4 (cluster of differentiation 4)」(C D 4)として公知のマーカーを有する免疫細胞である。ヘルパーT細胞としても公知のこれらの細胞は、抗体応答およびキラーT細胞応答などの免疫応答を統合するのを助ける。C D 8 + T細胞は、「表面抗原分類8」(C D 8)マーカーを有する。一実施形態では、C D 8 + T細胞は細胞傷害性Tリンパ球(C T L)である。別の実施形態では、C D 8 + 細胞はサブレッサーT細胞である。

40

【0045】

活性化T細胞は、細胞増殖および/または1つもしくは複数のサイトカイン(I L - 2、I L - 4、I L - 6、I F N、もしくはT N F など)の発現もしくは分泌の増加によって検出することができる。C D 8 + T細胞の活性化は、抗原に応答した細胞溶解活性の

50

増加によっても検出することができる。

【 0 0 4 6 】

一部の例では、「改変された T 細胞」は、異種核酸（本明細書に開示する核酸もしくはベクターの 1 つもしくは複数など）で形質導入されたか、または 1 つもしくは複数の異種タンパク質を発現する T 細胞である。「改変された T 細胞」および「形質導入された T 細胞」という用語は、本明細書の一部の例では交換可能に使用される。

【 0 0 4 7 】

T 細胞受容体（TCR）：抗原（例えば抗原提示細胞上の、MHC 分子に結合した抗原など）に結合する T 細胞の表面上のヘテロダイマータンパク質である。TCR は、それぞれが膜貫通糖タンパク質である鎖および鎖を含む。各鎖は、免疫グロブリンの可変ドメインおよび定常ドメインに対して相同性を有する可変領域および定常領域、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、ならびに細胞質尾部を有する。免疫グロブリンに類似して、TCR 遺伝子セグメントは発生の間に再構成して、完全な可変ドメインを生成する。

【 0 0 4 8 】

T 細胞は、TCR への抗原の結合および共刺激シグナルによって活性化される。例えば、CD8⁺ T 細胞は、細胞上の特定の HLA 分子によって提示されたときに特定のエピトープを認識する T 細胞受容体を有する。抗原提示細胞によって刺激されて細胞傷害性 T リンパ球となる CTL 前駆体がそのような HLA - ペプチド複合体を有する細胞に接触したときに、CTL は細胞とコンジュゲートを形成し、それを破壊する。

【 0 0 4 9 】

形質導入する：宿主細胞への異種核酸の移入など、細胞に核酸を移入することである。本明細書で使用する場合、形質導入する（またはトランスフェクトするまたは形質転換する）という用語は、核酸を細胞に導入する全ての技術を包含し、該技術としては、プラスミドベクターでの形質転換、ウイルスベクターの感染、およびエレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リポフェクション、または粒子銃加速によるネイキッド DNA の導入が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 5 0 】

「異種」核酸またはタンパク質は、異なる遺伝的供給源を起源とする核酸またはタンパク質を指す。例えば、細胞に対して異種の核酸またはタンパク質は、それが発現される細胞以外の生物体または個体を起源とする。他の例では、異種核酸またはタンパク質は、それが発現される細胞以外の細胞型を起源とする。

【 0 0 5 1 】

ベクター：ベクターが複製するおよび / または宿主細胞に組み込まれる能力を破壊することなく外来核酸の挿入を可能とする核酸分子である。ベクターは、複製起点などの、宿主細胞中でその複製を可能とする核酸配列を含み得る。ベクターは、1 つまたは複数の選択マーカー遺伝子および他の遺伝子エレメントも含み得る。発現ベクターは、1 つまたは複数の挿入された遺伝子の転写および翻訳を可能とする必要な調節配列を含有するベクターである。一部の非限定的な例では、ベクターは、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクターである。

【 0 0 5 2 】

III . T 細胞受容体、ベクター、および宿主細胞

RCC HERV - E 反応性 T 細胞株からクローニングされた T 細胞受容体（例えば、TCR 鎖および鎖）が本明細書に開示される。開示する TCR を含むベクター（発現ベクターなど）ならびに開示する TCR 鎖および / または鎖をコードする少なくとも 1 つの異種核酸を含む宿主細胞も開示される。

【 0 0 5 3 】

A . TCR

一部の実施形態では、TCR は、ATELGSLTWK（配列番号 1）などの RCC 細胞上に発現される HERV - E ペプチドを認識する。TCR は、鎖および鎖の核酸またはポリペプチドを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

一部の例では、T C R 鎖は、配列番号 2 の核酸配列を含むまたはそれからなる核酸によってコードされる。一部の例では、T C R 鎖は、配列番号 3 の核酸配列を含むまたはそれからなる核酸によってコードされる。一部の例では、T C R 鎖のポリペプチドは、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の例では、T C R 鎖のポリペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態では、本明細書に開示する T C R をコードする核酸は、配列番号 2 または配列番号 3 の核酸配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %、1 0 0 % など) 同一の配列を有する。他の実施形態では、本明細書に開示する T C R ポリペプチドは、配列番号 4 または配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % (少なくとも 9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % など) 同一のアミノ酸配列を有する。例示的な配列は、インターネット上で容易に利用可能なコンピュータプログラムならびに本明細書に記載する核酸配列およびアミノ酸配列を使用して得ることができる。一例では、ポリペプチドは、例えば T C R 鎖および 鎖の両方の状況で T 細胞によって発現されたときに、R C C 特異的抗原エピトープ (例えば、配列番号 1) への結合性など、開示する T C R ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保持する。

【 0 0 5 6 】

T C R 鎖および / または 鎖をコードする核酸配列または一次アミノ酸配列の軽微な改変は、本明細書に記載する未改変の対応するポリペプチドと比べて実質的に同等の活性を有するポリペプチドを生じることがある。そのような改変は、部位特異的変異導入によるもののように故意のものであってもよいし、または自発的なものであってもよい。これらの改変によって生成されたポリペプチドの全てが本明細書に包含される。したがって、T C R 鎖または 鎖のポリペプチドの特定の非限定的な例は、T C R 鎖または 鎖のポリペプチドの保存的バリエーションである (単一の保存的アミノ酸置換など、例えば、1 つまたは複数の保存的アミノ酸置換、例えば、1 ~ 1 0 の保存的置換、2 ~ 5 の保存的置換、4 ~ 9 の保存的置換、例えば、1、2、5、または 1 0 の保存的置換)。保存的置換の表を本明細書で提供する (表 1)。配列番号 4 および 5 に示すアミノ酸配列の置換は、この表に基づいて行うことができる。しかしながら、ポリペプチドの活性を著しく変化させることなく非保存的アミノ酸置換を行うこともできることが理解されるべきである。当業者は、配列アライメントおよび他の利用可能な配列解析ツールに基づいて、置換できるアミノ酸を選択することができる。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1.例示的な保存的アミノ酸置換

元々の残基	保存的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

10

20

【0057】

B. ベクター

【0058】

HERV-E 反応性 TCR をコードする核酸を含むベクターも本明細書に開示される。ベクターは、1つまたは複数の発現制御エレメントに作動可能に連結された開示する TCR の鎖および鎖の一方または両方をコードする核酸（配列番号 2 および / または配列番号 3 に対して少なくとも 90% 同一の核酸など）を含む。特定の実施形態では、ベクターは、TCR 鎖（例えば、配列番号 4 をコードする核酸、配列番号 2 など）および TCR 鎖（例えば、配列番号 5 をコードする核酸、配列番号 3 など）の両方をコードする核酸を含む。しかしながら、他の例では、TCR 鎖および TCR 鎖は、別々のベクターから発現されてもよい。発現制御エレメントは、プロモーター、エンハンサー、リーダー配列、転写ターミネーター、開始および / または終止コドン、内部リボソーム進入部位（IRES）、スプライシングシグナル、ならびにポリアデニル化シグナルなどの、核酸の転写および / または翻訳を制御または調節する配列である。ベクターは、複製起点および選択マーカーなどの、ベクターの移入およびその後の複製のための追加のエレメントも含有してもよい。

30

【0059】

一部の例では、ベクターは、開示する TCR 鎖および鎖の少なくとも 1 つをコードする核酸（配列番号 2 または配列番号 3 に対して少なくとも 90% の配列同一性を有する核酸など）を含むウイルスベクターである。特定の実施形態では、ベクターはレトロウイルスベクターである。T 細胞への遺伝子送達に好適な追加のウイルスベクターとしては、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、および鶏痘ウイルスベクターが挙げられる。他の例では、ベクターは、プラスミドまたはバキュロウイルスベクターである。当業者は、例えば本明細書に記載する TCR で T 細胞を安定的にまたは一過的に形質導入するために、適切なベクターを選択することができる。

40

【0060】

一部の実施形態では、ベクターは、本明細書に開示する TCR 鎖および鎖のポリペプ

50

チドの一方または両方をコードする核酸を含むレトロウイルスベクターである。特定の例では、ベクターは、ウイルスにコードされたタンパク質が（例えば、複製コンピテントウイルスの産生を防止するため、望まれない免疫原性を低下させるため、および／または目的の遺伝子（複数可）の挿入を受容するために）削除された改変レトロウイルスベクターである。例示的なレトロウイルス骨格は、L X S NおよびS A M E Nベクターなどのモロニー Maus 白血病ウイルス（M M L V）に基づくものが挙げられる（Clayら、Pathol. Oncol. Res. 5巻：3～15頁、1999年）。したがって、一例では、ベクターは、配列番号4に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するT C R鎖をコードする核酸（配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸など）を含むS A M E Nレトロウイルスベクターである。別の例では、ベクターは、配列番号5に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するT C R鎖をコードする核酸（配列番号3に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸など）を含むS A M E Nレトロウイルスベクターである。さらに別の例では、ベクターは、配列番号4に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するT C R鎖をコードする核酸（配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸など）および配列番号5に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するT C R鎖をコードする核酸（配列番号3に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸など）を含むS A M E Nレトロウイルスベクターである。非限定的な一例では、ベクターは、配列番号4のアミノ酸配列を有するT C R鎖をコードする核酸（配列番号2の核酸配列など）および配列番号5のアミノ酸配列を有するT C R鎖をコードする核酸（配列番号3の核酸配列など）を含むS A M E Nレトロウイルスベクターである。T C R鎖核酸およびT C R鎖核酸の両方が存在するベクターにおいて、鎖核酸と鎖核酸は、鎖核酸および鎖核酸の両方が転写および／または翻訳されるように、I R E Sまたはプロモーターによって分離されていてもよい。他の例では、鎖核酸と鎖核酸とは、ウイルス2 Aペプチド、例えば、豚テシオウイルス - 1 2 AまたはTh o s e a a s s i g n aウイルス自己切断性ペプチドなどのペプチド切断部位または「自己切断性」ペプチドをコードする核酸によって分離されている（例えば、Kimら、PLoS One 6巻：e 1 8 5 5 6、2 0 1 1年を参照）。

【0061】

追加の実施形態では、ベクターは、ベクターで形質導入された細胞の同定および／または富化を可能とする選択マーカーをコードする核酸をさらに含む。例示的な選択マーカーは、抗生物質耐性遺伝子（ネオマイシン耐性など）、チミジンキナーゼ、蛍光タンパク質（緑色蛍光タンパク質など）、または - ガラクトシダーゼを含む。他の例では、選択マーカーは、（例えば、フローサイトメトリーまたは免疫磁気分離を使用して）形質導入された細胞を同定するために使用できる細胞表面発現タンパク質を含む。非限定的な一例では、本明細書に開示するベクターは、細胞内シグナル伝達ドメインを欠いた末端切断型C D 3 4タンパク質（C D 3 4 t）をコードする核酸を含む。C D 3 4 tタンパク質は、C D 3 4の細胞外および膜貫通領域を含み、結果として、細胞表面上に発現されるが、末端切断型タンパク質を発現する細胞の活性に影響を及ぼさない（Norellら、Cancer Immunol. Immunother. 59巻：851～862頁、2010年）。C D 3 4 tを発現する細胞は、抗C D 3 4抗体を用いて同定することができ、また、フローサイトメトリーまたは免疫磁気的方法を使用して単離することができる。

【0062】

一例では、C D 3 4 tをコードする核酸は、配列番号6のヌクレオチド4028～4975の配列または配列番号6のヌクレオチド4028～4975と少なくとも95%の（例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、またはそれより高い）配列同一性を有する配列を含むまたはそれからなる。特定の例では、C D 3 4 tタンパク質は、配列番号7のアミノ酸配列と少なくとも95%（少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、または100%など）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

開示する T C R 鎖および 鎖を発現するための例示的なレトロウイルスベクター (S A M E N ベクターなど) を図 1 に示す。ベクターは、プロモーター / エンハンサー (M M L V 5 ' L T R に融合されたヒトサイトメガロウイルスプロモーター / エンハンサーなど) を含む 5 ' 長鎖末端反復 (L T R)、パッケージングシグナル ()、T C R 鎖をコードする核酸 (例えば、配列番号 2)、第 1 の自己切断性 2 A ペプチド (豚デシオウイルス自己切断性 2 A (P 2 A) ペプチドなど)、T C R 鎖をコードする核酸 (例えば、配列番号 3)、第 2 の自己切断性 2 A ペプチド (T h o s e a a s i g n a 自己切断性 2 A (T 2 A) ペプチドなど)、末端切断型 C D 3 4 タンパク質をコードする核酸、および 3 ' L T R を含む。

10

【 0 0 6 4 】

一部の例では、ベクターは、配列番号 6 の核酸配列を含むまたはそれからなる。他の例では、ベクターは、配列番号 6 の核酸配列と少なくとも 9 5 % (少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % など) の配列同一性を有する核酸配列を含むまたはそれからなる。本明細書で提供する例示的なベクターにおいて、T C R 鎖は配列番号 6 のヌクレオチド 2 1 6 5 ~ 2 9 7 1 によってコードされ、P 2 A ペプチドは配列番号 6 のヌクレオチド 2 9 7 2 ~ 3 0 3 7 によってコードされ、T C R 鎖は配列番号 6 のヌクレオチド 3 0 3 8 ~ 3 9 5 8 によってコードされ、T 2 A ペプチドは配列番号 6 のヌクレオチド 3 9 5 9 ~ 4 0 2 7 によってコードされ、C D 3 4 t 受容体は配列番号 6 のヌクレオチド 4 0 2 8 ~ 4 9 7 5 によってコードされる。

20

【 0 0 6 5 】

C . 宿主細胞

T C R 鎖、T C R 鎖、または両方をコードするベクターなどの、開示する T C R 鎖および / または開示する T C R 鎖をコードする核酸を含む宿主細胞も本明細書に開示される。一部の例では、宿主細胞は、ベクターを含む組換えウイルスを産生できる細胞 (例えば、プロデューサー細胞) である。他の例では、宿主細胞はリンパ球 (例えば、T 細胞) である。宿主細胞にベクターを導入する方法は当業者に公知であり、(例えばプラスミドベクターでの) 形質転換、(例えばウイルスベクターの) 感染、およびエレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リポフェクション、または粒子銃加速 (例えば、ネイキッド DNA) が挙げられる。

30

【 0 0 6 6 】

T C R 鎖および / または 鎖がレトロウイルスベクター (開示する S A M E N ベクターなど) から発現される例では、組換えウイルスの産生は、ヘルパーウイルスまたはパッケージング細胞株から発現されるウイルスタンパク質を必要とする。したがって、一部の例では、本明細書に開示するウイルスベクターは、ウイルスタンパク質 (g a g、p o l、および / または e n v など) を発現するヘルパーウイルスを用いて宿主細胞 (2 9 3 細胞株など) に導入される。他の例では、本明細書に開示するウイルスベクターは、ウイルスの g a g、p o l、および e n v タンパク質を安定に発現するパッケージング細胞株に形質導入される。例示的なパッケージング細胞株としては、G P & E 8 6、P G 1 3、および P A 3 1 7 細胞株などの N I H - 3 T 3 細胞株 (Markowitz ら、J. Virol. 6 2 巻 : 1 1 2 0 ~ 1 1 2 4 頁、1 9 8 8 年 ; Miller ら、J. Virol. 6 5 巻 : 2 2 2 0 ~ 2 2 2 4 頁、1 9 9 1 年 ; Miller ら、Mol. Cell Biol. 6 巻 : 2 8 9 5 ~ 2 9 0 2 頁、1 9 8 6 年)、または 2 9 3 G P G 細胞、G P 2 - 2 9 3 細胞などの 2 9 3 細胞株が挙げられる。したがって、一実施形態では、宿主細胞は、本明細書に記載するウイルスベクターで形質導入されたパッケージング細胞株などのプロデューサー細胞である。非限定的な一例では、ウイルスベクターは、H E R V - E 特異的な T C R 鎖および 鎖ならびに末端切断型 C D 3 4 タンパク質をコードする S A M E N ベクター (配列番号 6 の核酸を有するベクターなど) である。一部の例では、プロデューサー細胞株は G M P 認証されたものである。一例では、プロデューサー細胞株は、H E R V - E 特異的な T C R 鎖および 鎖ならびに末端切断型 C D 3 4 タンパク質をコードする S A M E N ベクター (配列番号 6 の核酸

40

50

を有するベクターなど)を含むPG13パッケージング細胞株である。

【0067】

一部の例では、宿主細胞は、T細胞などのリンパ球である。一部の実施形態では、リンパ球は、開示するTCR鎖および鎖の少なくとも1つをコードする異種核酸を含むT細胞(富化または増殖されたT細胞の集団など)である。一部の例では、リンパ球は、配列番号4に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するTCR鎖をコードする異種核酸(配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸など)を含む。別の例では、リンパ球は、配列番号5に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するTCR鎖をコードする異種核酸(配列番号3に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸など)を含む。さらに別の例では、リンパ球は、配列番号4に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するTCR鎖をコードする異種核酸(配列番号2に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸など)および配列番号5に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するTCR鎖をコードする核酸(配列番号3に対して少なくとも90%の配列同一性を有する核酸など)を含む。非限定的な一例では、リンパ球は、配列番号4のアミノ酸配列を有するTCR鎖をコードする異種核酸(配列番号2の核酸配列など)および配列番号5のアミノ酸配列を有するTCR鎖をコードする核酸(配列番号3の核酸配列など)を含む。追加の例では、リンパ球は、末端切断型CD34タンパク質(例えば、細胞内ドメインまたはシグナル伝達ドメインを欠いたCD34タンパク質)をコードする異種核酸も含む。

10

20

【0068】

一部の実施形態では、本明細書に開示するベクターでリンパ球(リンパ球の集団など)が形質導入される。形質導入後、標識化抗体を使用するフローサイトメトリーまたは同種(cognate)ペプチド(配列番号1など)への反応性の検出などの当業者に公知の方法によって、TCR鎖および/または鎖の発現を決定することができる。一部の例では、TCR鎖および/または鎖がCD34tと共発現される場合、形質導入された細胞は、例えば、フローサイトメトリーまたは免疫磁気技術(例えば、CliniMACS(登録商標)CD34試薬システム、Miltenyi Biotec Inc.、San Diego、CAまたはIsoplex(登録商標)300磁気細胞選択システム、Nexcel Therapeutics Inc.、Irvine、CA)を利用し、抗CD34抗体を使用して検出および/または富化することもできる。

30

【0069】

一部の実施形態では、開示するTCR鎖および鎖を発現する改変(例えば、形質導入)されたT細胞は、例えばアフェレーシスによって、被験体からリンパ球の集団(PBMC集団など)を得ることによって作製される。リンパ球の集団中のナイーブまたは休止したT細胞は、例えば、リンパ球を1つまたは複数のサイトカイン(IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-12、IL-15、およびIL-23の1つまたは複数など)と接触させることによって形質導入前に活性化される。一部の例では、リンパ球を抗CD3抗体およびIL-2と1~4日間(1日、約2日、約3日、または約4日など)接触させて活性化T細胞を産生させる。一部の例では、リンパ球を30ng/mlの抗CD3抗体および300IU/mlのIL-2と2または3日間接触させる。

40

【0070】

例えば、感染によって(ウイルスベクターの場合)またはトランスフェクションもしくは形質転換によって(プラスミドもしくはネイキッドDNAベクターの場合)、本明細書に開示するベクターで活性化T細胞を形質導入する。一部の例では、形質導入されたT細胞を、富化および/または増殖させる。例えば、ベクターが、末端切断型CD34分子をコードする核酸を含む場合、形質導入されたT細胞は、例えば形質導入の約2~4日後に、形質導入されたT細胞の集団を抗CD34抗体と接触させ、(例えば、フローサイトメトリーまたは免疫磁気ビーズを使用して)CD34発現細胞を精製することによって選択または富化することができる。また、形質導入されたT細胞は、形質導入されたT細胞を抗

50

CD3（例えば、約30 ng/ml）、抗CD28（例えば、約30 ng/ml）、および/またはIL-2（例えば、約300 IU/ml）とある期間（約7～14日間または9～11日間など）培養することによって増殖させることができる。一部の例では、放射線照射PBMC細胞上での培養によって、形質導入されたT細胞を増殖させる。

【0071】

IV. 腎細胞癌を処置または阻害する方法

RCC細胞によって発現される抗原またはエピトープに結合するTCR（例えば、TCR鎖および鎖）を発現するT細胞（またはT細胞の集団）を被験体に投与することによって、被験体においてRCCを処置または阻害する方法が本明細書に開示される。一部の例では、方法は、本明細書に記載する改変されたT細胞をRCC（ccRCC、進行性ccRCC、または転移性ccRCCなど）を有する被験体に投与することを含む。特定の例では、被験体は、HLA-A11陽性であり、ccRCCを有する。

10

【0072】

本明細書に記載する改変されたリンパ球（例えば、改変または形質導入されたT細胞）は、医薬組成物に組み込むことができる。一部の例では、組成物は、約10⁴～10¹²個の改変されたT細胞（例えば、約10⁴～10⁷個の細胞、約10⁶～10⁹個の細胞、または約10⁸～10¹²個の細胞）を含む。例えば、約5×10⁶～5×10⁸個の改変されたT細胞/kgが被験体に投与されるように組成物を調製することができる。そのような組成物は、典型的に、改変されたT細胞の集団および薬学的に許容される担体を含む。「薬学的に許容される担体」は、医薬品の投与に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを包含する。そのような担体または希釈剤の例としては、水、食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リポソームおよび固定油などの非水性ビヒクルを使用することもできる。補助活性化化合物を組成物に組み込んでよい。投与可能な組成物を調製するための実際の方法は当業者に公知または明らかであり、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Lippincott, Williams, & Wilkins編、Philadelphia, PA、第21版（2005年）などの刊行物により詳細に記載されている。

20

【0073】

被験体のin vivo処置は、本明細書に開示する改変されたT細胞の投与によって開始される。投与は、典型的に、静脈内または腹腔内注入によって為されるが、固形腫瘍または他のそのような限局性病変への直接の注射を使用することもできる。処置の有効性は、一般に、（例えば、RECIST基準を使用して）病変の減少/クリアランスによって評価される。病変のサイズおよび数は、イメージング（MRI、PET、および/またはCTイメージングなど）によって評価することができる。一部の例では、病期診断は毎月、3ヶ月毎、または6ヶ月毎に行われる。一部の例では、被験体からの血液試料も注入後の1つまたは複数の時点で分析されて、（例えば、CD34⁺を発現する改変されたT細胞の場合、CD34を発現するCD3⁺細胞の絶対数および/またはパーセンテージを評価することによって）存在する改変されたT細胞の数が定量される。

30

40

【0074】

改変されたT細胞の集団の複数回用量を投与することができる。例えば、改変されたT細胞の集団は、毎日、1日おき、週に2回、毎週、2週毎、3週毎、毎月、またはより少ない頻度で投与することができる。特定の一例では、改変されたT細胞の単回注入が投与されるが、熟練した臨床医は、被験体、処置されている状態、以前の処置歴、および他の要因に基づいて、代替的なスケジュールを選択することができる。

【0075】

一部の実施形態では、被験体は、ccRCCなどのRCCを有する。RCCまたはccRCCを有する被験体を同定する方法は当業者に公知であり、RCCの放射線写真による証拠（例えば、超音波、MRI、CTスキャン、もしくはPETスキャンによるイメージン

50

グ) および/または R C C の存在を確認する生検 (細針吸引もしくは針コア生検など) が挙げられる。一部の例では、被験体は転移性 R C C を有する。さらなる例では、R C C を有する被験体はまた、H L A A 1 1 + であり、腫瘍は H E R V - E プロウイルスを発現する (例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質を発現する) 。一部の実施形態では、方法は、改変された T 細胞を用いる処置のために、H L A A 1 1 + であり、その腫瘍が配列番号 1 を含むタンパク質を発現する R C C (c c R C C など) を有する患者を選択することを含む。

【 0 0 7 6 】

特定の実施形態では、方法は、R C C を有する被験体 (H L A A 1 1 + であり、その腫瘍が配列番号 1 を含むタンパク質などの H E R V - E プロウイルスを発現する c c R C C を有する被験体など) からリンパ球を含む細胞の集団を得ることを含む。他の例では、リンパ球を含む細胞の集団は、処置される被験体 (H L A A 1 1 + であり、その腫瘍が配列番号 1 を含むタンパク質などの H E R V - E プロウイルスを発現する c c R C C を有する被験体など) に対して H L A が適合したドナーから得られる。

【 0 0 7 7 】

被験体から T 細胞を回収し、T 細胞を形質導入するための例示的なプロトコルを図に示す。リンパ球 (P B M C など) を含む細胞の集団は、アフェレーシスを含むがこれに限定されない任意の方法によって得ることができる。細胞の集団の全てもしくは一部分を直ちに利用してもよいし、または細胞の全てもしくは一部分を将来的な使用のために凍結保存してもよい。使用の準備ができたときに、細胞の集団の全てまたは一部分を解凍し (以前に凍結保存した場合) 、抗 C D 3 抗体 (O K T 3 など) とのインキュベーションによって T 細胞を活性化する。一部の例では、約 $10^7 \sim 10^9$ 個の P B M C を抗 C D 3 モノクローナル抗体 (例えば、約 30 ng/ml) ならびに必要に応じてさらに I L - 2 (例えば、約 300 IU/ml) および/または I L - 1 5 (約 $10 \sim 100 \text{ ng/ml}$) とインキュベートする。特定の一部では、約 6×10^8 個の P B M C を抗 C D 3 抗体 O K T 3 および I L - 2 と約 1 ~ 5 日間 (約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、または約 5 日など) インキュベートする。別の特定の例では、約 6×10^8 個の P B M C を抗 C D 3 抗体 O K T 3、I L - 2、および I L - 1 5 と約 1 ~ 5 日間 (約 1 日、約 2 日、約 3 日、約 4 日、または約 5 日など) インキュベートする。

【 0 0 7 8 】

一部の例では、T 細胞の活性化後に、必要に応じて細胞から C D 4 + 細胞を枯渇させる。一部の例では、C D 4 + 細胞は、例えばフローサイトメトリーまたは免疫磁気技術 (例えば、C l i n i M A C S (登録商標) C D 4 試薬システム、M i l t e n y i B i o t e c I n c . , S a n D i e g o , C A) を利用し、抗 C D 4 抗体を使用して、または抗 C D 4 抗体が結合した C D 4 + T 細胞の赤血球リセッティングを使用して除去されて、C D 4 枯渇細胞集団が作製される。他の例では、C D 4 の枯渇は、形質導入後または形質導入された T 細胞の増殖後に実行することができる。一部の例では、C D 4 枯渇細胞集団は、T 細胞の C D 8 + 集団 (例えば、C D 8 + T 細胞が少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、またはそれより多い T 細胞の集団などの、実質的に C D 8 + T 細胞である T 細胞の集団) である。

【 0 0 7 9 】

T 細胞の活性化 (および必要に応じた C D 4 + 細胞の枯渇) 後に、H E R V - E 反応性の T C R 鎖、T 細胞 鎖、または両方をコードする異種核酸を含むベクター (上記セクション I I I B に記載する 1 つまたは複数のベクターなど) で細胞を形質導入する。特定の例では、約 $10^7 \sim 10^9$ 個の細胞が形質導入される (例えば、約 1×10^7 個、 5×10^7 個、 1×10^8 個、 5×10^8 個、または 1×10^9 個の細胞) 。非限定的な一例では、約 2×10^8 個の細胞が形質導入される。一部の例では、ベクターは、末端切断型 C D 3 4 タンパク質をコードする異種核酸も含む。したがって、一部の例では、形質導入された T 細胞は、C D 3 4 特異的抗体 (フローサイトメトリーまたは免疫磁気精製など) を使用して濃縮される。

10

20

30

40

50

【0080】

形質導入されたT細胞（または必要に応じて、CD34富化の形質導入されたT細胞および/もしくはCD34富化、CD4枯渇の形質導入されたT細胞）を、*ex vivo*で増殖させ、増殖後に適切な投与量（例えば、約 $10^6 \sim 10^{12}$ 個の細胞）で凍結保存することができる。特定の一例では、 300 IU/ml のIL-2、 30 ng/ml の抗CD3、および 30 ng/ml の抗CD28を含有する培地中、放射線照射された同種PBMCフィーダー細胞（250,000個のT細胞あたり4000万個の細胞）上で形質導入されたT細胞を増殖させる。増殖は、所望の数のT細胞を得るのに十分な時間、例えば約4～14日（4～9日、7～10日、8～12日、9～14日、9～11日など）であってよい。一部の例では、T細胞に、5日目、8日目、および11日目に新鮮なIL-2を追加する。一部の非限定的な例では、増殖は、必要に応じて、1～5日間など増殖の少なくとも一部分の間、例えば増殖プロトコルの9～14日目に、WAVEバイオリアクター（GE Healthcare Life Sciences、Pittsburgh、PA）中で実行することができる。当業者は、*ex vivo*でT細胞を増殖させるための他の方法を特定することができ、それを本明細書に記載する形質導入されたT細胞で使用することもできる（例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,827,642号ならびにRiddellおよびGreenberg、J. Immunol. Meth. 128巻：189～201頁、1990年を参照）。

10

【0081】

形質導入（改変）されたT細胞を、被験体に投与する前に解凍する（以前に凍結された場合）。被験体は、改変されたT細胞を投与する前に免疫抑制レジメン（例えば、リンパ球枯渇）を受けてもよい。一例では、被験体は、改変されたT細胞を投与する前にシクロホスファミドおよび/またはフルダラビンに投与される。非限定的な一例では、被験体は、-5日目および-4日目にシクロホスファミド（例えば、 60 mg/kg ）、ならびに/または-5日目から-1日目にフルダラビン（例えば、 25 mg/m^2 ）を投与される（0日目が改変されたT細胞の投与である）。別の非限定的な例では、被験体は、-5日目にシクロホスファミド（ $1,000 \text{ mg/m}^2 \text{ IV}$ ）、および-5日目から-3日目にフルダラビン（ 30 mg/m^2 ）を投与される（0日目が改変されたT細胞の投与である）。改変されたT細胞は、例えば注入によって、被験体に投与される。一部の例では、T細胞は、約 $10^4 \sim 10^{12}$ 個の改変されたT細胞（例えば、約 $10^4 \sim 10^7$ 個の細胞、約 $10^6 \sim 10^9$ 個の細胞、または約 $10^8 \sim 10^{12}$ 個の細胞、または約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 個の改変されたT細胞/ kg （約 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、または 1×10^9 個の細胞/ kg など）の用量で投与される。例えば、改変されたT細胞の被験体中での増殖を促進するためおよび/または好中球の回復を支援するために、免疫系支持療法も被験体に施してもよい。非限定的な一例では、被験体は、10日間のIL-2（例えば、8時間毎の $72,000 \text{ iu/kg iv}$ ）および/または絶対好中球数が500より多くなるまで+1日目から毎日G-CSF（例えば、 $300 \sim 480 \mu\text{g sc}$ ）を投与される。別の例では、免疫系支持療法は、改変されたT細胞の投与後に12時間毎に7日間 $2 \times 10^6 \text{ i.u./m}^2$ を投与することを含む。

20

30

40

【0082】

処置有効性は、腫瘍サイズ、病変の数、腫瘍の病期、奏効率、または当業者に公知の他の基準などの標準的な方法によってモニターされる。一部の例では、（例えば、標準的なRECISTまたはirRECIST基準によって定義される）原発性腫瘍または転移のサイズの減少は、被験体におけるRCCの阻害を示す。例えば、両方が参照により本明細書に組み込まれる、Eisenhauerら、Eur. J. Cancer 45巻：228～247頁、2009年；Wolchockら、Clin. Cancer Res. 15巻：7412～7420頁、2009年を参照されたい。他の例では、無増悪生存および/または全生存期間（例えば、1ヶ月間、3ヶ月間、6ヶ月間、9ヶ月間、12ヶ月間、18ヶ月間、2年間、またはそれより長い、例えば、1～12ヶ月間、6～18ヶ月間、1～2年間、またはそれより長い）は、

50

被験体における R C C の阻害を示す。他の例では、循環 H E R V - E T C R 形質導入 C D 3 4 + または C D 8 + / C D 3 4 + T 細胞の持続性、免疫細胞サブセットの変化、および T 細胞の活性化状態のうちの 1 つまたは複数、ならびに他の免疫学的決定因子が、臨床アウトカムと共に、ベースライン、処置の間の異なる時点、および疾患進行の時点に評価される。

【 0 0 8 3 】

一部の例では、被験体は、形質導入された T 細胞での処置の前に、並行して、または後に、1 つもしくは複数の治療剤、外科的切除、および / または放射線療法などの 1 つまたは複数の追加の処置も施される。当業者は、本明細書に開示する改変された T 細胞と組み合わせて R C C を有する被験体に投与するための治療剤を選択することができる。そのような薬剤としては、抗 V E G F 剤（パゾパニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、アキシチニブ、カボザンチニブ、ソラフェニブ、レンパチニブ、および / もしくはベバシズマブなど）、m T O R 阻害剤（テムシロリムスおよび / もしくはエベロリムスなど）、免疫チェックポイント阻害剤（ニボルマブなど）、ならびに / またはサイトカイン療法（I F N および / もしくは I L - 2 など）が挙げられる。

【実施例】

【 0 0 8 4 】

以下の実施例は、ある特定の具体的な特徴および / または実施形態を説明するために提供するものである。これらの実施例は、記載する具体的な特徴または実施形態に本開示を限定するものと解してはならない。

【 0 0 8 5 】

（実施例 1）

H E R V - E C T - R C C 1 反応性 C D 8 + T 細胞からの T 細胞受容体のクローニング C D 8 + H L A - A 1 1 拘束性 R C C 反応性 T 細胞クローンは以前に同定された（Takahashi ら、J. Clin. Invest. 118 巻：1099～1109 頁、2008 年）。この R C C 反応性 C T L は、H E R V - E ペプチド A T E L G S L T W K（配列番号 1）（Takahashi ら、2008 年）を認識する。c c R C C 細胞の H L A - A 1 1 拘束性認識を有する T 細胞クローンからトータル R N A を抽出し、5' R A C E によって全長 T C R 鎖を同定した。T C R 鎖および 鎖をコードする核酸はそれぞれ配列番号 2 および 3 として本明細書に開示されている。T C R 鎖および 鎖のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号 4 および 5 として本明細書に開示されている。

【 0 0 8 6 】

鎖に連結された末端切断型 C D 3 4 分子を含むレトロウイルスコンストラクトに T C R 鎖および 鎖をコードする核酸（配列番号 2 および 3）をクローニングした（図 1）。末端切断型 C D 3 4 カセットは細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを含むが、細胞内シグナル伝達ドメインを欠くため、細胞中で機能しないが、その発現は C D 3 4 のそれらの表面発現に基づく形質導入された T 細胞の富化を可能とする。ベクターの配列を配列番号 6 として提供する。

【 0 0 8 7 】

（実施例 2）

c c R C C 細胞に対する H L A - A 1 1 拘束性 T C R で形質導入した T 細胞の反応性 2 人の健常ドナーからの P B M C を実施例 1 に記載のベクターで形質導入した。形質導入された T 細胞は、H L A - A 1 1 + および H E R V - E + c c R C C 細胞を特異的に殺滅した（図 3 A および 3 B）。C T - R C C - 1 ペプチド（配列番号 1）の追加は、予想した通り、H E R V - E 陰性細胞および H E R V - E 陽性細胞の両方に対する反応性を増加させた（図 3 A および 3 B）。

【 0 0 8 8 】

（実施例 3）

プロデュースークローンの開発

実施例 1 に記載のこの T C R を含有するレトロウイルスベクターを P G 1 3 パッケージ

10

20

30

40

50

グ細胞株に導入し、臨床用途のために高力価のレトロウイルスプロデューサークローンを単離した。P G 1 3 プロデューサー細胞株を限界希釈でクローニングして高力価のクローンを生成した。次いで、ヒト T 細胞に効率的に抗 H E R V - E 反応性を形質導入および移入する能力についてクローンをスクリーニングした。さらなる試験のために 2 つのクローンを選択した (7 G 1 および 2 7 A 7)。

【 0 0 8 9 】

この目的のために、各クローンからレトロウイルスを調製し、2 つの別々のフルスケールの検証手順を行った。2 人の健常ドナーからの T 細胞をクローン 7 G 1 または 2 7 A 7 からのレトロウイルスで形質導入した。それらは、それぞれ 6 3 . 2 % および 6 7 . 5 %

【 化 1 】

(\bar{x} =65.4%)

10

または 6 5 . 2 % および 6 1 . 6 %

【 化 2 】

(\bar{x} =63.4%)

の C D 3 4 + であり、両方のクローンが等しい効率で T 細胞を形質導入したことを示す。免疫磁気ビーズを使用した、形質導入された細胞の C D 3 4 精製後、培養物は、それぞれ 9 9 . 3 % および 9 8 . 4 %

20

【 化 3 】

(\bar{x} =98.9%)

または 9 9 . 4 % および 9 9 . 7 %

【 化 4 】

(\bar{x} =99.6%)

30

の C D 3 4 + であり、純粋な T C R 形質導入 T 細胞培養物であったことを示す。

【 0 0 9 0 】

バイアルあたり 5×10^6 個の細胞のマスターセルバンクを両方のクローンについて生成した (7 G 1 について 2 1 2 バイアルおよび 2 7 A 7 について 2 2 0 バイアル)。ウイルスの大きい 3 リットルのバッチを 7 G 1 クローンから調製し、7 G 1 クローンおよび 7 G 1 ウイルスの両方を G M P 認証のためにインディアナ大学の V e c t o r P r o d u c t i o n F a c i l i t y / N a t i o n a l G e n e V e c t o r B i o r e p o s i t o r y に送付した。

【 0 0 9 1 】

(実施例 4)

40

H E R V - E T C R 形質導入 T 細胞の評価

P G 1 3 レトロウイルスプロデューサークローン 7 G 1 からの上清を正常 P B L 由来 T 細胞を形質導入するために使用した。形質導入の 3 日後、細胞を、抗 C D 3 4 をコーティングした免疫磁性粒子とインキュベートし、C l i n i m a c s を使用して精製し、C D 3 4 発現について染色した。選択前に 6 3 . 2 % の細胞が C D 3 4 を発現し、これは選択後に 9 9 . 3 % に増加した (図 4 A)。C D 3 4 + 細胞は C D 3 を発現し (図 4 B)、H E R V - E テトラマーの染色が陽性であった (図 4 C)。C D 3 4 選択細胞は主に C D 8 + 細胞であり (図 5 A)、C D 4 + 細胞の割合はごくわずかであった (図 5 B)。

【 0 0 9 2 】

実施例 2 に記載の形質導入された T 細胞を評価した。クロム放出細胞傷害性による決定で

50

、形質導入されたT細胞は、HLA-A11+およびHERV-E+ccRCC細胞を特異的に殺滅した(図6Aおよび6B)。CT-RCC-1ペプチド(配列番号1)の追加は、HERV-E陰性細胞に対する反応性を増加させた(図6Aおよび6B)。ドナー1からのT細胞集団は39.9%のCD8+であり(図6A)、ドナー2からのT細胞集団は52.8%のCD8+であった(図6B)。

【0093】

実施例1に記載のベクターで形質導入された健常ドナーからのPBMCもRCC細胞およびT細胞の特異的殺滅について試験した。HLA-A11+およびHERV-E発現SAUJ-RCC細胞は特異的に殺滅されたが、HLA-A11-HERV-E陰性細胞(SAUJ-LCL)はそうでなかった(図7)。HERV-Eを発現しても(LYO-RCC)しなくても(LYO-LCL)、HLA-A11-細胞も殺滅されなかった。最後に、HLA-A11+ドナーからのT細胞は殺滅されなかった(図7)。

10

【0094】

標的として一連のccRCC細胞株を使用する酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によりインターフェロン- γ (INF-)分泌を測定することによってHERV-E TCR形質導入T細胞の抗原特異性を評価した。図8は、HLA-A11陽性でCT-RCC HERV-Eを発現するccRCC細胞と共培養したときのみ、形質導入されたT細胞はINF-を産生することを示す(バックグラウンドの2倍より多く、1ng/mlより多い)。

【0095】

20

(実施例5)

HERV-E TCR形質導入T細胞の安全性および忍容性の決定

本実施例は、HERV-E TCR形質導入T細胞でのccRCCの処置の安全性および忍容性を決定するために使用できる方法を記載する。しかしながら、これらの特定の方法から逸脱する方法を使用してHERV-E TCR形質導入T細胞の安全性および忍容性を成功裡に決定することも当業者であれば理解する。

【0096】

図9は、(例えば臨床的实施の前に)HERV-E TCR形質導入T細胞の安全性および忍容性を決定するための例示的なプロトコルを示す概略図である。

【0097】

30

完全な外科的切除に適さず、臨床的にまたは放射線写真により二次元的に評価可能な進行性であり、HLA-A11陽性である転移性のHERV-E陽性ccRCCを有する被験体をこの試験のために選択する。被験体は15~20リットルの白血球アフェレーシスを受け、 1×10^{10} 個のPBMCを回収する(必要に応じて凍結保存する)。その後、PBMC($6 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$ 個の細胞)を解凍し、抗CD3(例えば、50ng/mlのOKT3)およびIL-2(例えば、300IU/ml)(および必要に応じてIL-15、例えば100ng/ml)を含有する培地中で2~3日間活性化させた後、免疫磁気的方法を使用してCD4発現細胞を枯渇させる。HLA-A11拘束性HERV-E TCRおよびCD34t(例えば、実施例1に記載したもの)をコードするレトロウイルスで約 200×10^6 個のT細胞の形質導入を行う。形質導入後、CD34+免疫磁気ビーズ選択を使用して $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個の形質導入されたT細胞/kgを富化した後、(3人の健常ドナーからプールした)放射線照射した同種PBMCフィーダー細胞を使用してIL-2/IL-15含有培地(例えば、300IU/mlのIL-2および100ng/mlのIL-15)中で9~11日間ex vivoで増殖させる。

40

【0098】

プロトコルの一部の実施形態では、陽性選択されたCD34+T細胞をREPに入れて、注入に必要とされる細胞数を迅速に生成させる。REPに入れる形質導入された細胞の数は、患者の体重および注入コホートによって決定される。REPを開始するために、30ng/mlの可溶性抗hCD3抗体(OKT3)を有する150mlの完全サイトカイン培地(rhIL2/rhIL15)を含有する直立のT175cm²フラスコ中で1×

50

10⁶個のHERV-E TCR形質導入細胞を200×10⁶個のフィーダー細胞と合わせる。フィーダー細胞は、最低3人の別々の正常ドナーからのPBMCと一緒にし、5000RADの放射線を照射したPBMCからなる。加湿5%CO₂インキュベーター中に5～6日間、フラスコを直立にして置く。フラスコをインキュベーターから取り出し、細胞を回収し、計数し、300IU/mL-IL2および100ng/mLのIL15を含有する新鮮な培地中に再懸濁する。さらなる増殖のために細胞懸濁液をWaveバイオリアクターバッグ（複数可）に移す。Waveバイオリアクター灌流システムを利用することによって、サイトカインを含有する新鮮な培地を培養培地に毎日補充する。

【0099】

形質導入および増殖されたT細胞を、免疫抑制化学療法での処置後の個々の被験体へのその後の注入のために適切な用量レベル（下記を参照）で凍結保存する。

10

【0100】

4つの異なるT細胞用量段階増加コホート（5×10⁶個のT細胞/kg、5×10⁶個のT細胞/kg、1×10⁷個のT細胞/kg、または5×10⁷個のT細胞/kg）のそれぞれに3人の被験体を順次登録する。被験体は、IVでの1,000mg/m²のシクロホスファミド（-5日目）および毎日30分の3日間のi.v.での30mg/m²のフルダリン（-5日目から-3日目）による非骨髓破壊的な免疫抑制コンディショニングレジメンを受けた後、0日目にHERV-E TCR形質導入T細胞の注入により標的とするT細胞用量を送達される。注入前に、T細胞に対して最終の細胞計数を行い、生存能力および無菌性の評価を行う。T細胞注入後、注入関連毒性の徴候について被験体を最大4時間モニターする。T細胞注入前の準備投薬は、アセトアミノフェンおよびi.v.のベンダリルである。T細胞注入後、被験体に、7日間（0日目から+6日目）の2,000,000IU/m²の用量の12時間のi.v.によるIL-2および好中球回復（ANC>500）が起こるまで1日目から毎日の300μgのG-CSFを与える。被験体は好中球回復後に診療センターを退院し、6～8週間毎週通院し、身体検査および体重などの標準的な評価、ならびにルーチンの臨床検査（血液学および電解質）を受ける。RECIST基準を使用してPETおよびCTイメージングを使用した再病期診断をT細胞注入の30日後、次いで、最初の年は3ヶ月毎、次いでそれ以後は腫瘍進行のエビデンスが生じるまで6ヶ月毎に行う。

20

【0101】

試験における段階的増加、段階的縮小、または用量の段階的増加の保留の決定は、表2に概説する規則に従う。

30

【0102】

40

50

【表 2】

表 2.

アウトカム:所定の用量レベルでの患者数のうちの DLT の数	決定ルール
患者 3 人のうち 0 人が DLT	3 人までの患者を次の用量レベルに入れる
患者 2～3 人のうち 2 人が DLT	用量段階的増加の停止:3 人の患者のみがその用量で処置された場合、3 人までの追加の患者を以前の用量レベルに入れる
患者 3 人のうち 1 人が DLT	さらに 3 人までの患者を同じ用量レベルに入れる
患者 6 人のうち 1 人が DLT	3 人までの患者を次の用量レベルに入れる
患者 4～6 人のうち 2 人が DLT	用量段階的増加の停止:3 人の患者のみがその用量で処置された場合、3 人までの追加の患者を以前の用量レベルに入れる

10

【0103】

養子 T 細胞移入に関連する有害事象は一般に T 細胞注入後 21 日以内に起こるので、コホートの次の被験体または次のコホートの最初の被験体を処置する前に、各被験体を T 細胞注入後 21 日間観察する。したがって、登録された次の患者がコンディショニング化学療法を開始する前に、各患者に対する HERV-E TCR 形質導入 T 細胞の注入の間に最低 21 日間がある。用量制限毒性 (DLT) は、T 細胞注入の中止に繋がるあらゆる有害事象として、ならびに / または下記を除いて、HERV-E TCR 形質導入 CD8+ / CD34+ T 細胞の注入に恐らくまたは確実に関連すると判断される全てのグレード 3 および 4 の毒性として定義される：

20

【0104】

- ・リンパ球減少、好中球減少、および血小板減少として定義される骨髄抑制
- ・IL-2 の予測毒性 (セクション 14.3 に記載されている)
- ・フルダラビンおよびシクロホスファミドの予測毒性
- ・標準的な支持治療による細胞投与の 24 時間以内にグレード 2 またはそれ未満のグレードに戻ることができる、細胞注入の 2 時間以内に起こる (細胞注入に関する) 即時型過敏反応 (症候性気管支痙攣およびグレード 4 の低血圧を除く)
- ・グレード 3 の発熱
- ・10 日以内にグレード 2 未満またはグレード 2 の自己免疫毒性まで解消するグレード 3 の自己免疫
- ・7 日以内にグレード 2 まで解消する顕著な臨床的後遺症を伴わないグレード 3 の代謝検査異常

30

【0105】

T 細胞注入後の複数の時点において血液試料を採取し、循環 HERV-E TCR 形質導入 T 細胞を評価し、その細胞は、CD34 を発現する CD3+ 細胞のパーセンテージおよび絶対数を定量することによって分析される。容易に生検に適する腫瘍を有する患者は、上記と同じ方法論を使用して HERV-E TCR 形質導入 T 細胞を評価するために、転移性腫瘍病変の随意的細針吸引も受けてもよい。被験体を最大 5 年間追跡し、疾患進行が記録されたときに試験から外す。

40

【0106】

(実施例 6)

HERV-E TCR 形質導入 T 細胞を用いる腎細胞癌の処置

本実施例は、HERV-E TCR 形質導入 T 細胞を用いる、RCC を有する被験体に対

50

して使用できる方法を記載する。しかしながら、これらの特定の方法から逸脱する方法を使用して、HERV-E TCR形質導入T細胞によりRCCを有する被験体を成功裡に処置できることを当業者は理解する。

【0107】

図10は、RCCを有する被験体を処置するための例示的なプロトコールを示す概略図である。

【0108】

HLA-A11陽性でありHERV-E陽性であるRCC（転移性ccRCCなど）を有する被験体に対してアフエーシスを行い、Tリンパ球を回収する。30ng/mlの抗CD3抗体および300IU/mlのIL-2を用いてT細胞を*in vitro*で2日間活性化させる。本明細書に記載するHERV-E特異的TCRを含むレトロウイルスベクター（例えば、配列番号6）をT細胞に形質導入する。30mg/mlの抗CD3および30ng/mlの抗CD28を用いてリンパ球を7～14日間増殖させる。被験体に対して、（例えば、実施例3に記載するように）化学療法誘発性のリンパ球枯渇を行い、形質導入されたT細胞をIL-2支持と共に（例えば、実施例5に記載するように決定される）MTDで注入する。

【0109】

本開示の原理が適用され得る多くの可能な実施形態を考慮すれば、説明した実施形態は例に過ぎず、本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきではないことが認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって定義される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲および精神に含まれる全てを本発明者らの発明として主張する。

10

20

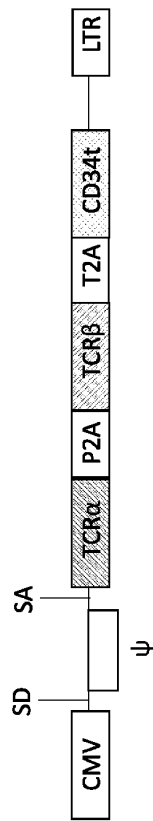
30

40

50

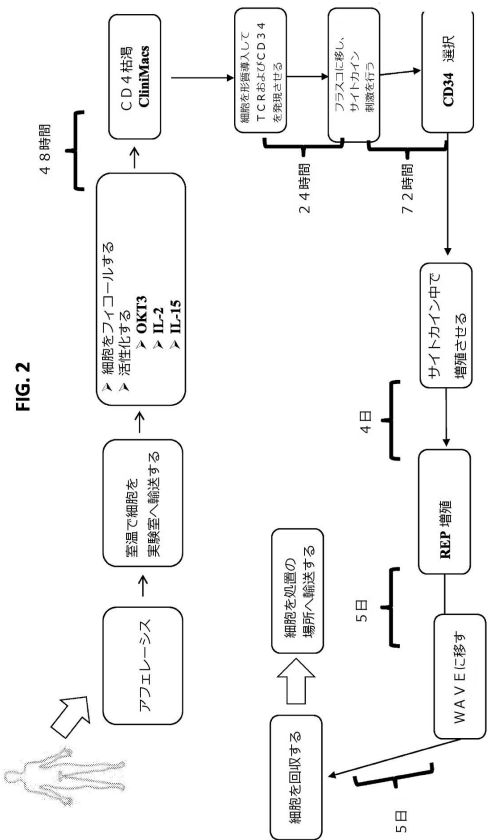
【図面】
【図 1】

FIG. 1



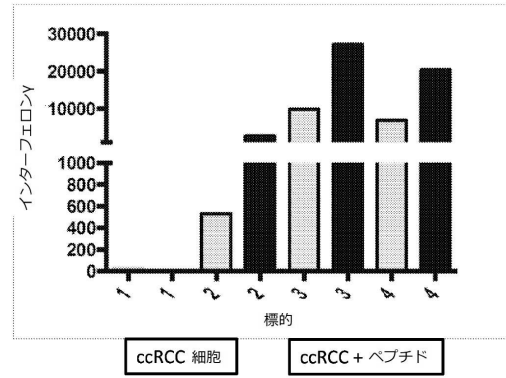
【図 2】

FIG. 2



【図 3 A】

FIG. 3A



ドナー 1 - 灰色カラム
ドナー 2 - 黒色カラム

標的 :

1 - ccRCC HERV-E 陰性 / HLA-A11+

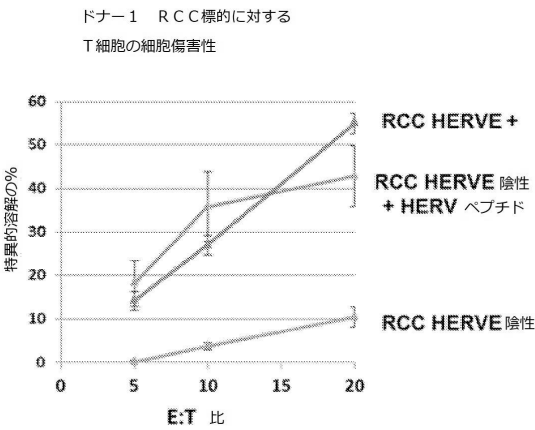
2 - ccRCC HERV-E + / HLA-A11+

3 - ccRCC HERV-E 陰性 / HLA-A11+
+ CT-RCC-1 ペプチド

4 - ccRCC HERV-E + / HLA-A11+
+ CT-RCC-1 ペプチド

【図 3 B】

FIG. 3B



10

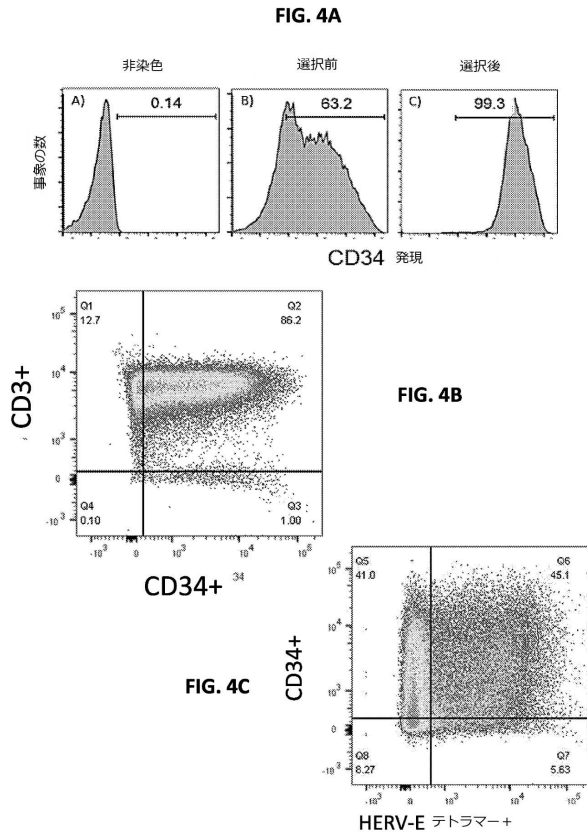
20

30

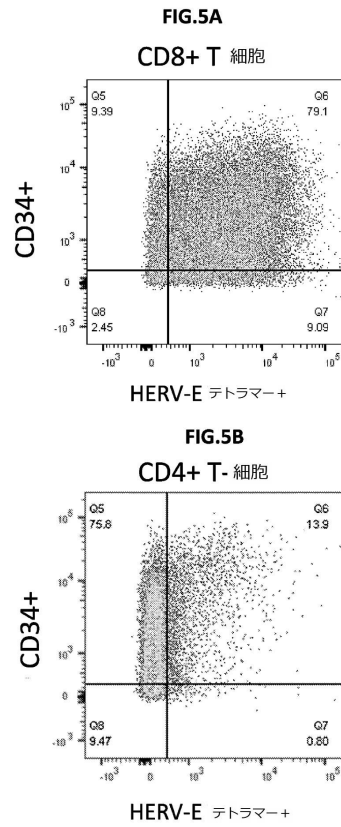
40

50

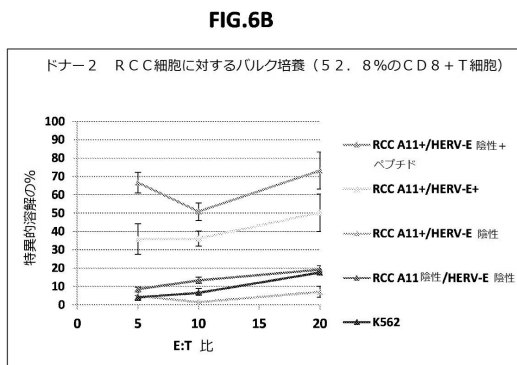
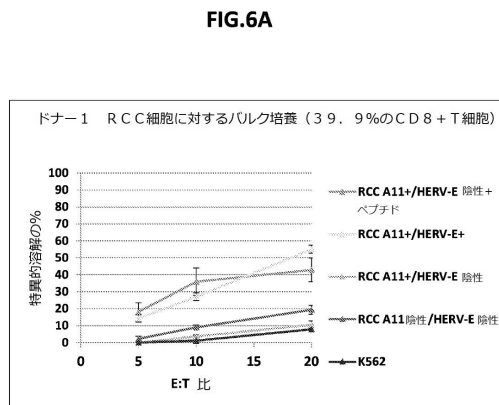
【図 4】



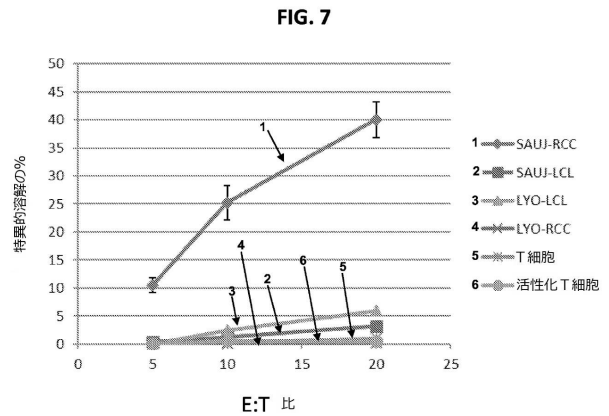
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

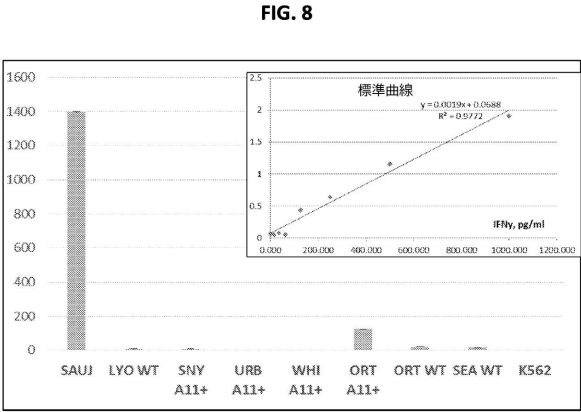
20

30

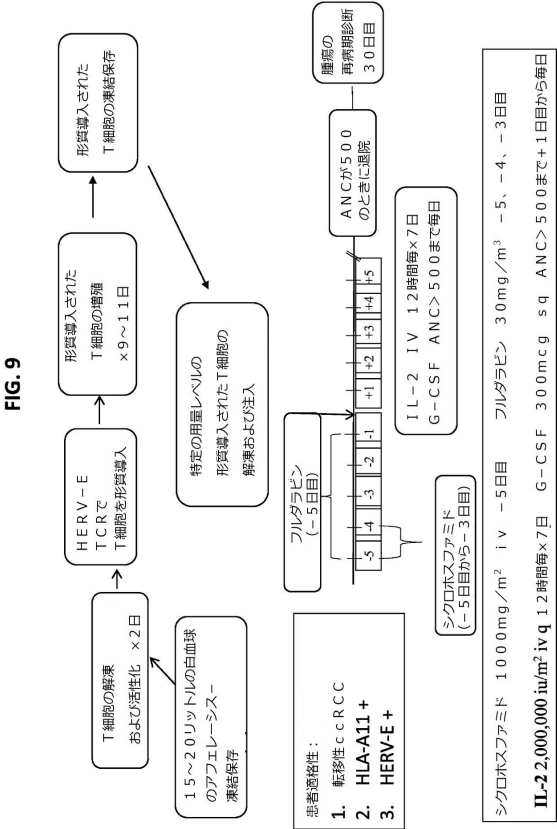
40

50

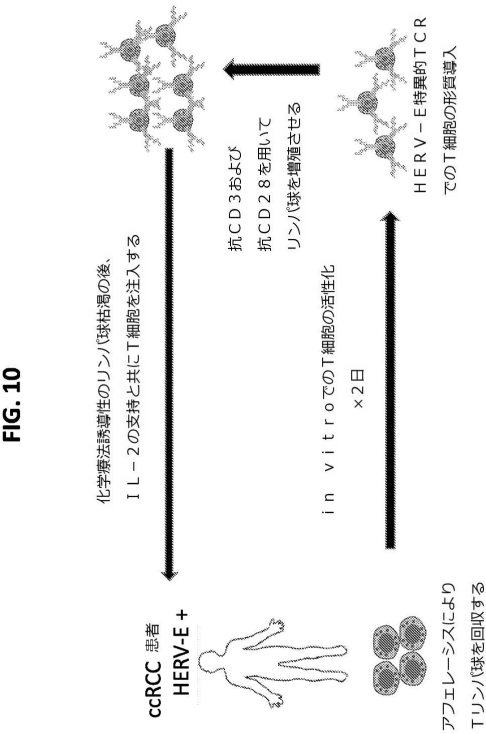
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



10

20

30

40

50

【配列表】

0007046016000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/48 (2006.01)

C 1 2 N 15/48

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/867

Z

メイウッド, サウス ファースト アベニュー 2 1 6 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 チャイルズ, リチャード ダブリュー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 9 2, ベセスダ, センター ドライブ 1 0, ルーム 3
イー - 3 5 3 2, エヌエイチエルピーアイ/エヌアイエイチ

(72)発明者 ニシムラ, マイケル アイ.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 1 5 3, メイウッド, サウス ファースト アベニュー 2 1 6 0
, ロヨラ ユニバーシティ シカゴ, シービーシーシー ルーム 3 0 1

(72)発明者 チェルカソフ, エレナ エー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 9 2, ベセスダ, センター ドライブ 1 0, ルーム 5
イー - 5 2 6 4, エヌエイチエルピーアイ/エヌアイエイチ

審査官 中山 基志

(56)参考文献 特開 2 0 1 3 - 1 7 6 3 7 3 (J P , A)

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

YOSHIYUKI TAKAHASHI, REGRESSION OF HUMAN KIDNEY CANCER FOLLOWING ALLOG
ENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION IS ASSOCIATED WITH RECOGNITION OF AN HERV
-E ANTIGEN BY T CELLS, JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 米国, 2008年03月03
日, VOL:118,NR:3, PAGE(S):1099-1109, <https://www.jci.org/articles/view/34409/pdf>
DEBETS RENO, TCR-ENGINEERED T CELLS TO TREAT TUMORS: SEEING BUT NOT TOUCH
ING?, SEMINARS IN IMMUNOLOGY, 2016年03月17日, VOL:28, NR:1, PAGE(S):10 - 21
, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.002>KIRSCH ILAN, T-CELL RECEPTOR PROFILING IN CANCER, MOLECULAR ONCOLOGY, 20
15年09月15日, VOL:9, NR:10, PAGE(S):2063 - 2070, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc
/articles/PMC5528728/pdf/MOL2-9-2063.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5528728/pdf/MOL2-9-2063.pdf)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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

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