

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7340127号

(P7340127)

(45)発行日 令和5年9月7日(2023.9.7)

(24)登録日 令和5年8月30日(2023.8.30)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 14/725 (2006.01)

C 0 7 K 14/725

Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

請求項の数 16 (全80頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-548022(P2018-548022)

(73)特許権者 506258073

(86)(22)出願日 平成29年3月16日(2017.3.16)

イマティクス バイオテクノロジー ゼ

(65)公表番号 特表2019-511222(P2019-511222

ーエムペーハー

A)

ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン,

(43)公表日 平成31年4月25日(2019.4.25)

パウル - エンリヒ - シュトラッセ 1 5

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/056260

(74)代理人 100145403

(87)国際公開番号 WO2017/158103

弁理士 山尾 憲人

(87)国際公開日 平成29年9月21日(2017.9.21)

(74)代理人 100122301

審査請求日 令和2年3月5日(2020.3.5)

弁理士 富田 憲史

(31)優先権主張番号 1604492.7

(74)代理人 100157956

(32)優先日 平成28年3月16日(2016.3.16)

弁理士 稲井 史生

(33)優先権主張国・地域又は機関

(74)代理人 100170520

英国(GB)

弁理士 笹倉 真奈美

(31)優先権主張番号 62/308,975

(74)代理人 100221545

(32)優先日 平成28年3月16日(2016.3.16)

弁理士 白江 雄介

最終頁に続く

最終頁に続く

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

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト白血病抗原 (H L A) クラス I 分子と複合体を形成する、9 ~ 14 アミノ酸長のペプチドに含まれる配列番号 1 のアミノ酸配列に特異的に結合する、T 細胞受容体 (T C R) であって、

前記 T C R が T C R 可変領域および T C R 可変領域を含むものであって、

(i) T C R 可変領域が配列番号 5 8 に示される相補性決定領域 (C D R) 1、配列番号 5 9 に示される C D R 2 および配列番号 6 0 に示される C D R 3 を含み、および T C R 可変領域が配列番号 6 6 に示される C D R 1、配列番号 6 7 に示される C D R 2 および配列番号 6 8 に示される C D R 3 を含み、または、

(ii) T C R 可変領域が配列番号 4 2 に示される C D R 1、配列番号 4 3 に示される C D R 2 および配列番号 4 4 に示される C D R 3 を含み、および T C R 可変領域が配列番号 5 0 に示される C D R 1、配列番号 5 1 に示される C D R 2 および配列番号 5 2 に示される C D R 3 を含み、または、

(iii) T C R 可変領域が配列番号 7 4 に示される C D R 1、配列番号 7 5 に示される C D R 2 および配列番号 7 6 に示される C D R 3 を含み、および T C R 可変領域が配列番号 8 2 に示される C D R 1、配列番号 8 3 に示される C D R 2 および配列番号 8 4 に示される C D R 3 を含み、および、

前記 T C R が、1 個以下の保存的アミノ酸での置換を有する各 C D R のアミノ酸配列を含んでなる、T C R。

【請求項 2】

前記 T C R が、対象において免疫応答を誘導でき、前記免疫応答がインターフェロン (I F N) レベルの増加によって特徴付けられる、または、前記免疫応答がインターフェロン (I F N) レベルの増加によって特徴付けられない、請求項 1 に記載の T C R。

【請求項 3】

前記 T C R が、ヒト化、キメラ化および / またはマウス化されている、請求項 1 または 2 に記載の T C R。

【請求項 4】

前記 T C R が、T C R 鎖および T C R 鎖を含んでなり、

(i) 前記 T C R 鎖の配列が、配列番号 5 8 に示される C D R 1、配列番号 5 9 に示される C D R 2 および配列番号 6 0 に示される C D R 3 を含んでなり、および前記 T C R 鎖の配列が、配列番号 6 6 に示される C D R 1、配列番号 6 7 に示される C D R 2 および配列番号 6 8 に示される C D R 3 を含んでなる；または、

10

(ii) 前記 T C R 鎖の配列が、配列番号 4 2 に示される C D R 1、配列番号 4 3 に示される C D R 2 および配列番号 4 4 に示される C D R 3 を含んでなり、および前記 T C R 鎖の配列が、配列番号 5 0 に示される C D R 1、配列番号 5 1 に示される C D R 2 および配列番号 5 2 に示される C D R 3 を含んでなる；または、

(iii) 前記 T C R 鎖の配列が、配列番号 7 4 に示される C D R 1、配列番号 7 5 に示される C D R 2 および配列番号 7 6 に示される C D R 3 を含んでなり、および前記 T C R 鎖の配列が、配列番号 8 2 に示される C D R 1、配列番号 8 3 に示される C D R 2 および配列番号 8 4 に示される C D R 3 を含んでなる、

20

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 5】

前記 T C R が、少なくとも 1 つの T C R 鎖および 1 つの T C R 鎖配列を含んでなる T C R であり、

(i) 前記 T C R 鎖配列が、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を有する可変領域配列もしくは、配列番号 5 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域を含んでなり、前記配列番号 5 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域配列が、配列番号 5 8、配列番号 5 9、および配列番号 6 0 のアミノ酸配列を有する C D R s を含んでなり、および前記 T C R 鎖配列が、配列番号 6 5 のアミノ酸配列を有する可変領域配列もしくは、配列番号 6 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域を含んでなり、前記配列番号 6 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域配列が、配列番号 6 6、配列番号 6 7、および配列番号 6 8 のアミノ酸配列を有する C D R s を含んでなる、または、

30

(ii) 前記 T C R 鎖配列が、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有する可変領域配列もしくは、配列番号 4 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域を含んでなり、前記配列番号 4 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域配列が、配列番号 4 2、配列番号 4 3、および配列番号 4 4 の C D R 1 ~ C D R 3 配列を含んでなり、および前記 T C R 鎖配列が、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を有する可変領域配列もしくは、配列番号 4 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域を含んでなり、前記配列番号 4 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域配列が、配列番号 5 0、配列番号 5 1、および配列番号 5 2 のアミノ酸配列を有する C D R s を含んでなる、または、

40

(iii) 前記 T C R 鎖配列が、配列番号 7 3 のアミノ酸配列を有する可変領域配列もしくは、配列番号 7 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域を含んでなり、前記配列番号 7 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域配列が、配列番号 7 4、配列番号 7 5、および配列番号 7 6 のアミノ酸配列を有する C D R s を含んでなり、および前記 T C R 鎖配列が、配列番号 8 1 のアミノ酸配列を有する可変領域配列もしくは、配列番号 8 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域を含んでなり、前記配列番号 8 1 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の可変領域配列が、配列番号 8 2、配列番号 8 3、および配列番号 8 4 のアミノ酸配列を有する C D R s を含んでなる、

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の T C R。

50

【請求項 6】

前記 T C R が、

(i) 配列番号 6 2、7 0、4 6、5 4、7 8、および 8 6 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する T C R 定常領域をさらに含んでなる、T C R であり；または、前記 T C R が、少なくとも、1 つの T C R 鎖配列および 1 つの T C R 鎖配列から構成され、前記 T C R 鎖配列が、配列番号 6 2、4 6、および 7 8 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する定常領域を含んでなり；前記 T C R 鎖配列が、配列番号 7 0、5 4、および 8 6 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する定常領域を含んでなる、

10

(i i) 一本鎖 T C R (s c T C R) である、または、

(i i i) 組換え / ヘテロ二量体 T C R であって、導入されたジスルフィド結合が、それらの定常ドメインの残基間に存在する、
請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の T C R。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R をコードする核酸もしくは 2 つの分離した核酸。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸もしくは 2 つの分離した核酸を含んでなるベクター。

20

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R、または請求項 7 に記載の核酸もしくは 2 つの分離した核酸、または請求項 8 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R、または請求項 7 に記載の核酸もしくは 2 つの分離した核酸、または請求項 8 に記載のベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞、および薬学的に許容可能な担体、安定剤および / または賦形剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項 11】

医療で使用するための請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか一項に記載の T C R、または請求項 7 に記載の核酸もしくは 2 つの分離した核酸、または請求項 8 に記載のベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞、または請求項 10 に記載の医薬品組成物。

30

【請求項 12】

悪性または良性の腫瘍疾患を含んでなる増殖性疾患の診断、予防および / または治療における使用のための、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R、または請求項 7 に記載の核酸もしくは 2 つの分離した核酸、または請求項 8 に記載ベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞、または請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

薬剤の製造をするための請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R、または請求項 7 に記載の核酸もしくは 2 つの分離した核酸、または請求項 8 に記載のベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞、または請求項 10 に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項 14】

悪性または良性の腫瘍疾患を含んでなる増殖性疾患の診断、予防および / または治療用の薬剤の製造のための、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R、または請求項 7 に記載の核酸もしくは 2 つの分離した核酸、または請求項 8 に記載のベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞、または請求項 10 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 15】

a . 対象から得られた適切な宿主細胞を提供するステップと、
b . 請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R をコードするコード配列を含んでなる遺伝子コンストラクトを提供するステップと、
c . 前記適切な宿主細胞に前記遺伝子コンストラクトを導入するステップと、

50

d . 前記適切な宿主細胞によって前記遺伝子コンストラクトを発現させるステップとを含んでなる、細胞株を発現する T A A 特異的 T C R を製造するインビトロ方法。

【請求項 16】

前記 T C R が修飾 T C R であり、前記修飾が、標識を含んでなる機能ドメインの付加、または膜アンカードメインを含んでなる代替ドメインの付加を含んでなる、請求項 15 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

10

【0002】

細胞性免疫応答の特異的要素は、腫瘍細胞を特異的に認識して破壊できる。腫瘍浸潤性細胞集団からの、または末梢血からの T 細胞の単離は、がんに対する自然免疫防御において、このような細胞が重要な役割を果たすことを示唆する。特に、細胞質ゾル内に位置するタンパク質または欠陥リボソーム産物 (D R I P S) に由来する、通常は 8 ~ 10 アミノ酸残基の主要組織適合性複合体 (M H C) 保有ペプチドのクラス I 分子を認識する C D 8 陽性 T 細胞が、この応答において重要な役割を果たす。ヒトの M H C 分子はまた、ヒト白血球抗原 (H L A) とも称される。

20

【背景技術】

【0003】

M A G E A 4 は、M A G E A 遺伝子ファミリーのメンバーである。M A G E A 4 タンパク質および mRNA の発現は、様々ながんの発症および予後と結びつけられている。M A G - 003 ペプチド、すなわち、K V L E H V V R V (配列番号 1) は、M A G E A 4 (アミノ酸 286 ~ 294) の H L A - A * 0201 拘束性細胞毒性 T リンパ球 (C T L) エピトープである。その内容全体が本明細書に参照により援用される (J i a e t a l . 2010 ; W u e t a l . 2011) 。M A G - 003 は、生体外と H L A - A * 0201 / K b 遺伝子組換えマウスの双方において、H L A - A * 0201 - 陽性 P B M C からペプチド特異的 C T L を誘発する。M A G - 003 誘導性 C T L は H L A - A * 0201 拘束様式で標的細胞を溶解し、M A G - 003 が H L A - A * 0201 拘束性 C T L エピトープであることを実証する。

30

【0004】

M H C 分子には、M H C クラス I および M H C クラス I I の 2 つのクラスがある。ペプチドと M H C クラス I の複合体が、適切な T 細胞受容体 (T C R) を有する C D 8 陽性 T 細胞によって認識される一方で、ペプチドと M H C クラス I I 分子の複合体は、適切な T C R を有する C D 4 陽性ヘルパー T 細胞によって認識される。C D 8 および C D 4 依存性の双方のタイプの応答が、抗腫瘍効果と共同して相乗的に寄与するので、腫瘍関連抗原および対応する T 細胞受容体の同定と特性解析は、ワクチンおよび細胞療法などのがん免疫療法の開発において重要である。

40

【0005】

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

【0006】

本明細書に従って、特定の T C R (例えば、可溶性 T C R または細胞表面 T C R) およ

50

び抗体またはその他の結合分子（複合体）によって、ペプチド - M H C を標的化する場合、基礎となるペプチドの免疫原性は二次的である。これらの場合には、提示が決定要因である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

がん治療のための分子標的薬の開発が進歩しているものの、当該技術分野において、がん細胞に高度に特異的な分子を特異的に標的化する新たな抗がん剤を開発する必要性がなおある。本明細書は、新規 M A G - 0 0 3 T C R と、核酸と、ベクターと、M A G - 0 0 3 に特異的に結合する宿主細胞とを提供し、がんの治療におけるそのような分子の使用

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

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

【 0 0 0 9 】

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

20

【 0 0 1 0 】

本明細書は、M A G - 0 0 3 ペプチド - H L A 分子複合体に特異的に結合する T C R にさらに関し、M A G - 0 0 3 ペプチドは、K V L E H V V R V（配列番号 1）と、配列番号 2 ~ 配列番号 2 4 に示されるものなどのその変異型とから選択される。一実施形態では、H L A 分子は H L A - A * 0 2 である。

【 0 0 1 1 】

本明細書は、表 2 に示される T C R 可変ドメインと少なくとも 7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性、好ましくは 9 0 % の配列同一性を有する、T C R 可変ドメインと；表 2 に示される T C R 可変ドメインと少なくとも少なくとも（a t l e a s t a t l e a s t）7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性、好ましくは 9 0 % の配列同一性を有する T C R 可変ドメインとを含んでなる、T C R にさらに関する。

30

【 0 0 1 2 】

一実施形態では、T C R 可変ドメインは、表 2 に示される T C R ドメインに対して少なくとも1つの変異を有し；および/または T C R 可変ドメインは、表 2 に示される T C R ドメインに対して少なくとも1つの変異を有する。一実施形態では、T C R 可変ドメインおよび/または T C R 可変ドメインに少なくとも1つの変異を含んでなる T C R は、M A G - 0 0 3 ペプチド - H L A 分子複合体に対して、非変異 T C R ドメインおよび/または非変異 T C R 可変ドメインを含んでなる T C R の少なくとも倍の結合親和性および/または結合半減期を有する。

40

【 0 0 1 3 】

本明細書の T C R 鎖は、表 2 に示される T C R 定常ドメインと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する、T C R 定常ドメインをさらに含んでなってもよい。本明細書の T C R 鎖は、表 2 に示される T C R 定常ドメインと少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有する、T C R 定常ドメインをさらに含んでなってもよい。

【 0 0 1 4 】

50

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

【 0 0 1 5 】

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

【 0 0 1 6 】

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

【 0 0 1 7 】

本明細書は、本明細書の T C R をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離または組換え核酸にさらに関する。一実施形態では、本明細書の核酸は、表 2 に示されるように、T C R 鎖および / または T C R 鎖をコードする。

【 0 0 1 8 】

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

【 0 0 1 9 】

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

【 0 0 2 0 】

本明細書は、本明細書による組換え発現ベクター単離を含んでなるされた宿主細胞にさらに関し、好ましくはその細胞は、ヒト細胞、好ましくは末梢血リンパ球 (P B L)、より好ましくは C D 4 または C D 8 陽性 T リンパ球である。

【 0 0 2 1 】

本明細書は、本明細書の組換え発現ベクターを含んでなる単離された P B L にさらに関し、P B L は、C D 8 + T 細胞または C D 4 + T 細胞である。

【 0 0 2 2 】

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

【 0 0 2 3 】

本明細は、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がんなどの増殖性疾患を治療するための、本明細書の T C R および宿主細胞にさらに関する。

【 0 0 2 4 】

一態様では、宿主細胞は、本明細書による少なくとも 1 つの T C R をコードする核酸で形質移入された、C D 8 + T 細胞または C D 4 + T 細胞であり、T C R は、表 2 で開示される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含んでなる。別の態様では、このような宿主細胞は、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がん、好ましくは非小細胞肺がんの免疫療法で使用される。

【 0 0 2 5 】

本明細書は、がん細胞を本明細書に記載の T C R、核酸、ベクターまたは宿主細胞に接

10

20

30

40

50

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

【 0 0 2 6 】

別の態様では、本明細書は、例えば、以下の一般式 I、
X 1 X 2 L E H V V R X 3 (配列番号 2 5)

式 I

(式中、X 1 はアミノ酸 K および Y から選択され、X 2 はアミノ酸 V、L および A から選択され、X 3 は V、L、A、および I から選択され、前記ペプチドは、H L A クラス I またはクラス II 分子に結合し、および / または前記ペプチドと交差反応する T 細胞を誘導する) に記載のアミノ酸配列を含んでなる単離ペプチドなどの M A G - 0 0 3 ペプチド、またはその薬学的に許容可能な塩に関する。

一態様では、前記ペプチドは、その基礎となる全長ポリペプチドではない。

【 0 0 2 7 】

好ましいのは、配列番号 1 からなる群から選択される配列、または配列番号 1 と少なくとも 6 6 %、好ましくは少なくとも 7 7 %、より好ましくは少なくとも 8 8 % 相同的な (好ましくは少なくとも 7 7 % または少なくとも 8 8 % 同一の) それらの変異配列、またはその薬学的に許容可能な塩であり、前記変異型は、H L A クラス I またはクラス II 分子に結合し、および / または前記ペプチドと交差反応する T 細胞を誘導し、前記ペプチドは、基礎となる完全長ポリペプチドでない。

【 0 0 2 8 】

本明細書は、配列番号 1、または配列番号 1 と少なくとも 6 6 %、好ましくは少なくとも 7 7 %、より好ましくは少なくとも 8 8 % 相同的な (好ましくは少なくとも 7 7 % または少なくとも 8 8 % 同一の) その変異型からなる群から選択される配列を含んでなる、本明細書のペプチドにさらに関し、前記ペプチドまたはその変異型は、8 ? 1 0 0、好ましくは 8 ? 3 0、最も好ましくは 8 ? 1 4 アミノ酸の全長を有する。

【 0 0 2 9 】

以下の表は、本明細書による例示的ペプチド、およびそれらの各配列番号を示す。一態様では、表 1 のペプチドは H L A - A * 0 2 に結合してもよい。別の態様では、本明細書に記載の T C R は、表 1 の 1 つまたは複数のペプチドに結合でき、または特異的に結合できる。

【 0 0 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1：本明細書によるペプチド。

配列番号：	配列
1	KVLEHVVRV
2	KVLEHVRL
3	KVLEHVRA
4	KVLEHVRI
5	KLLEHVVRV
6	KLLEHVRL
7	KLLEHVRA
8	KLLEHVRI
9	KALEHVVRV
10	KALEHVRL
11	KALEHVRA
12	KALEHVRI
13	YLLEHVVRV
14	YLLEHVRL
15	YLLEHVRA
16	YLLEHVRI
17	YALEHVVRV
18	YALEHVRL
19	YALEHVRA
20	YALEHVRI
21	YVLEHVVRV
22	YVLEHVRL
23	YVLEHVRA
24	YVLEHVRI

10

20

【0031】

一態様では、本明細書は、本明細書に記載の1つまたは複数のペプチドを利用することによる、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がんなどの増殖性疾患の治療に関する。

30

【0032】

特に好ましいのは、配列番号1～配列番号24からなる群から選択される、本明細書による単独のまたは組み合わせられたペプチドである。より好ましいのは、配列番号1～配列番号24（表1を参照されたい）からなる群から選択される単独のまたは組み合わせのペプチドと、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、頭頸部がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、および食道がん、好ましくは非小細胞肺癌の免疫療法におけるそれらの使用である。

40

【0033】

一態様では、本明細書は、HLAクラスIまたは長さ変異型-HLAクラスIIなどのより長い形態の分子に結合する能力を有する、本明細書によるペプチドに関する。

【0034】

一態様では、本明細書は、本明細書によるペプチドに関し、前記ペプチドは（それぞれ）配列番号1～配列番号24に記載のアミノ酸配列を含んでなり、それからなり、またはそれから本質的になる。

【0035】

本明細書は、本明細書によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは、修飾され、およ

50

び / または非ペプチド結合を含む。

【 0 0 3 6 】

本明細書は、本明細書によるペプチドにさらに関し、前記ペプチドは、特に H L A - D R 抗原関連不変鎖 (I i) の N 末端アミノ酸、好ましくはその 8 0 個の N 末端アミノ酸に融合した、または例えば樹状細胞に対して特異的な抗体などの抗体 (またはその配列中) に融合した、融合タンパク質の一部である。

【 0 0 3 7 】

本明細書は、本明細書によるペプチドをエンコードする核酸にさらに関する。本明細書は、 D N A 、 c D N A 、 P N A 、 R N A またはそれらの組み合わせである、本明細書による核酸にさらに関する。

10

【 0 0 3 8 】

本明細書は、本明細書による核酸を発現でき、および / または発現する、発現ベクターにさらに関する。

【 0 0 3 9 】

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

【 0 0 4 0 】

本明細書は、本明細書によるペプチドに、または本明細書による前記ペプチドと M H C との複合体に、特異的に結合する抗体と、このような抗体を生産する方法とにさらに関する。

20

【 0 0 4 1 】

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

【 0 0 4 2 】

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

【 0 0 4 3 】

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

30

【 0 0 4 4 】

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

【 0 0 4 5 】

本明細書は、抗原提示細胞が、配列番号 1 ~ 配列番号 2 4 を含有する、好ましくは配列番号 1 ~ 配列番号 2 4 またはその変異アミノ酸配列を含有する、前記ペプチドを発現する能力がありおよび / または発現する、発現ベクターを含んでなる、本明細書による方法にさらに関する。

40

【 0 0 4 6 】

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

【 0 0 4 7 】

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

50

【 0 0 4 8 】

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

【 0 0 4 9 】

好ましくは、前記薬剤は、ＴＣＲ、可溶性ＴＣＲまたは抗体に基づく、細胞療法、ワクチンまたはタンパク質である。

【 0 0 5 0 】

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

【 0 0 5 1 】

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

【 0 0 5 2 】

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

【 0 0 5 3 】

本明細書はまた、がん治療の文脈におけるこれらの新規標的の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 4 】

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

【図２】がんおよび健常組織における、M A G - 0 0 3 発現を示す。

【図３】同上

【図４】同上

【図５】M A G - 0 0 3 ペプチド（配列番号１）を負荷した標的細胞または相同的なとの同時インキュベーション後における、それぞれ、ＴＣＲ R 7 P 1 D 5、R 2 0 P 1 H 7、およびR 1 0 P 2 G 1 2（表２）の および 鎖RNAで電気穿孔された、C D 8 + T 細胞からのI F N 放出を示すが、無関係のペプチドR A B G A P 1 L - 0 0 1（配列番号９１）、A X I N 1 - 0 0 1（配列番号９２）、A N O 5 - 0 0 1（配列番号９３）、T P X 2 - 0 0 1（配列番号９４）、S Y N E 3 - 0 0 1（配列番号９５）、M I A 3 - 0 0 1（配列番号９６）、H E R C 4 - 0 0 1（配列番号９７）、P S M E 2 - 0 0 1（配列番号９８）、H E A T R 5 A - 0 0 1（配列番号９９）またはC N O T 1 - 0 0 3（配列番号１００）または対照ペプチドN Y E S O 1 - 0 0 1（配列番号１０１）との同時インキュベーションでは、放出はなかった。I F N 放出データは、２人の異なるドナー（ドナー１は右のX軸、ドナー２は左のX軸）に由来するC D 8 + T 細胞で得られた。R N A 電気穿孔C D 8 + T 細胞単独、または未負荷標的細胞との同時インキュベーションが、対照の役割を果たした。

【図６】同上

【図７】同上

10

20

30

40

50

【図 8】それぞれ、TCR R7P1D5、R20P1H7、およびR10P2G12（表 2）の および 鎖RNAで電気穿孔された、CD8 + T細胞のMHC / MAG - 003 四量体またはMHC / NYESO1 - 001 四量体染色を示す。MHC / NYESO1 - 001 複合体に特異的に結合する1G4 TCRのRNAで電気穿孔されたCD8 + T細胞、および模擬電気穿孔されたCD8 + T細胞が、対照の役割を果たした。

【図 9】配列番号 1 の 1 ~ 9 位で、MAG - 003 ペプチド（配列番号 1）または様々な MAG - 003 アラニン置換変異型が負荷された標的細胞との同時インキュベーション後に、それぞれ、TCR R7P1D5、R20P1H7、およびR10P2G12（表 2）の および 鎖RNAで電気穿孔された、CD8 + T細胞からのIFN 放出を示す。RNA電気穿孔CD8 + T細胞単独、または対照ペプチドNYESO1 - 001 が負荷された標的細胞とのまたは未負荷標的細胞との同時インキュベーションが、対照の役割を果たした。IFN 放出データは、2 人の異なるドナー（ドナー 1 は右の X 軸、ドナー 2 は左の X 軸）に由来するCD8 + T細胞で得られた。

【図 10】同上

【図 11】同上

【図 12】それぞれ、A - 375 黒色腫細胞株、T98G 神経膠芽腫細胞株、およびSK - BR - 3 乳がん細胞株との同時インキュベーション後における、TCR (A) R7P1D5、(B) R20P1H7、および(C) R10P2G12 の および 鎖RNAで電気穿孔されたCD8 + T細胞からの放出。RNA電気穿孔されたCD8 + T細胞単独が、対照の役割を果たした。

【図 13】TCR R7P1D5、R10P2G12、R20P1H7、模擬または対照 TCR 1G4（配列番号 X）をコードするRNAで形質移入されたT細胞は、異なる初代ヒト健常組織細胞（略号については表 13 を参照されたい）、標的陰性腫瘍細胞株MCF - 7、およびMAGEA4 - およびNY - ESO1 - 陽性細胞株A - 375 およびNCI - H1755 と共に同時培養された。T細胞内のTCR R7P1D5、R10P2G12、R20P1H7、および1G4 発現は、RNAベクターを用いた電気穿孔によって達成された。ヒト健常組織細胞培養物は、TCR R7P1D5、R10P2G12 または R20P1H7 に対する有意なTCR 媒介認識およびT細胞活性化をもたらさなかった。E : T 比 1 : 1、各 20,000 個の細胞、反復から 20 時間後のIFN - 放出の平均が、ELISAによって測定されるように示される。誤差棒は標準偏差を示す。結果は、TCR 形質移入T細胞単独からのIFN - 放出、および標的細胞と目的のTCRを発現しないT細胞との同時培養に起因するIFN - 放出の減算によって正規化された。

【図 14】6 つの異なるレンチウイルスコンストラクト（R71 - R78）での形質導入後におけるR7P1D5 TCR 導入遺伝子発現についてスクリーニングされた、4 人のドナーからの累積データである。CD3 + / CD8 + T細胞は、形質導入の96 時間後における、MHC / MAG - 003 四量体結合細胞の比率に関するフローサイトメトリーによって分析された。MHC / NYESO1 - 001 四量体で染色された非形質導入T細胞（NT）、およびMHC / MAG - 003 四量体で染色された1G4（NY - ESO1）TCR 形質導入T細胞が、それぞれ陰性対照および陽性対照として使用された。細胞は、生存CD3 + CD8 + 集団上でゲートされた。

【図 15】MAGEA4 発現腫瘍細胞株A375 およびMAGEA4 陰性腫瘍細胞株MCF - 7 を同時培養した際のIFN 生成の手段によって測定される、R7P1D5 TCR 形質導入T細胞のエフェクター応答である。R7P1D5 TCR をコードするR73 レンチウイルスの濃縮上清で形質導入されたT細胞は、4 人の健常ドナーのPBMC に由来する非形質導入細胞（NT）と比較された。結果は、三連の平均 ± SEM として提示される。減少する濃度のMAG - 003 ペプチドでパルス処理されたT2 標的細胞との同時インキュベーション時における、2 人の健常ドナー（ドナー 6 および 7）のPBMC に由来する、R7P1D5 TCR 形質導入（R73 レンチウイルス）T細胞のIFN 応答である。結果は、形質導入の96 時間後に測定された、三連の平均 ± SEM として提示される。

10

20

30

40

50

【図16】(A、B) 4HCr51放出アッセイにおいて、異なるE:T比で、MAGEA4発現腫瘍細胞系A375に対して測定された、R7P1D5TCR(R73レンチウイルス)形質導入および非形質導入T細胞(NT)の細胞毒性応答である。結果は、三連から四連の平均±SEMとして提示される。(C) 40:1のE:T比(ratio)で、MAGEA4発現(A375)およびMAGEA4-陰性(MCF-7)腫瘍標的の抗原特異的死滅を示す5人のドナーから作製された、7つのR7P1D5TCR(R73レンチウイルス)形質導入T細胞産物からの合わせたデータである。

【発明を実施するための形態】

【0055】

本明細書は、鎖および/または鎖(「TCR」)を含んでなるT細胞受容体(TCR)に関する。MHC分子によって提示されるとTCRおよび抗体に結合できる、MAG-003ペプチドもまた提供される。本明細書はまた、本明細書のTCRおよびペプチドを発現するための核酸、ベクター、および宿主細胞;そしてそれを使用する方法にも関する。

【0056】

したがって、本発明の目的は、第1の態様において、配列番号44、52、60、68、76、および84から選択されるアミノ酸配列との少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または好ましくは100%の配列同一性を有する、少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)3を含んでなるコンストラクトを認識する抗原によって解決される。

【0057】

本発明によるコンストラクトを認識する抗原は、好ましくは抗体、またはその誘導体もしくは断片、またはT細胞受容体(TCR)、またはその誘導体もしくは断片から選択される。本発明の抗体またはTCRの誘導体または断片は、好ましくは、親分子の抗原結合/認識能力、特に上で説明したようなその特異性および/または選択性を保持しなければならない。そのような結合機能は、本明細書で定義されるCDR3領域の存在によって保持されてもよい。

【0058】

本発明の一実施形態では、本発明のTCRは、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスI依存性様式でTAA抗原を認識できる。「MHCクラスI依存性様式」は、本明細書の用法では、TCRが、MHCクラスI分子の文脈内で、TAA抗原への結合時に免疫応答を誘発することを意味する。MHCクラスI分子は、例えば、HLA-A分子などの当該技術分野で公知の任意のMHCクラスI分子であり得る。本発明の好ましい実施形態では、MHCクラスI分子は、HLA-A*02分子である。

【0059】

本発明は、コンストラクトを認識する一本鎖抗原とコンストラクトを認識する二重鎖との双方を提供する。

【0060】

一実施形態では、TCR可変ドメインは、表2に示されるTCRドメインに対して少なくとも1つの変異を有し;および/またはTCR可変ドメインは、表2に示されるTCRドメインに対して少なくとも1つの変異を有する。一実施形態では、TCR可変ドメインおよび/またはTCR可変ドメインに少なくとも1つの変異を含んでなるTCRは、TAAペプチド-HLA分子複合体に対して、非変異TCRドメインおよび/または非変異TCR可変ドメインを含んでなるTCRの少なくとも倍の結合親和性および/または結合半減期を有する。

【0061】

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

【0062】

10

20

30

40

50

本発明は、特に抗原認識コンストラクトとしてのTCRまたはその断片もしくは誘導体を提供する。TCRは、好ましくはヒトTCRであり、ヒトTCR遺伝子座から生じ、したがってヒトTCR配列を含んでなるものとして理解される。さらに、本発明のTCRは、それがヒト起源であり、表1で言及される本発明のTAA抗原を特異的に認識することを特徴としてもよい。

【0063】

本発明の別の実施形態は、それに加えてまたは代案として、免疫応答を誘導する、上述の抗原認識コンストラクトを提供し、好ましくは免疫応答は、インターフェロン(IFN)レベルの増加によって特徴付けられる。

【0064】

本発明のTCRは、一本鎖または、またはおよび、分子、または代案としては、および鎖、またはおよび鎖の双方から構成される、二重鎖コンストラクトとして提供されてもよい。

【0065】

最も好ましくは、いくつかの追加的な実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるTCR鎖の任意の1、2つまたは全てのCDR1~CDR3領域を含んでなる、抗原認識コンストラクトに言及し(表2を参照されたい)、3つ以下、2つ、好ましくは唯一の修飾アミノ酸残基がある本発明の各CDR配列を含んでなる、抗原認識コンストラクトが、好ましくあってもよい。修飾されたアミノ酸残基は、アミノ酸の挿入、欠失または置換から選択されてもよい。最も好ましくは、3つ、2つ、好ましくは唯一の修飾アミノ酸残基は、それぞれのCDR配列の最初または最後のアミノ酸残基である。修飾が置換である場合、いくつかの実施形態では、置換は保存的アミノ酸置換であることが好ましい。

【0066】

本発明のTCRは、例えば、ヒト、ラット、サル、ウサギ、ロバ、またはマウスなどの任意の哺乳類などの任意の適切な生物種に由来する、定常領域をさらに含んでなってもよい。本発明の一実施形態では、本発明のTCRは、ヒト定常領域をさらに含んでなる。いくつかの好ましい実施形態では、本発明のTCRの定常領域は、例えば、好ましくはマウス配列である、TCR発現および安定性を増加させてもよい異種配列の導入によって、わずかに修飾されてもよい。

【0067】

本発明の一実施形態では、キメラTCRが提供され、TCR鎖は複数の生物種からの配列を含んでなる。好ましくは、本発明のTCRは、鎖のヒト可変領域と、例えば、マウスTCR鎖のマウス定常領域とを含んでなる、鎖を含んでなってもよい。

【0068】

一実施形態では、本発明のTCRは、上記の実施形態に従ったヒト可変領域と、ヒト定常領域とを含んでなるヒトTCRである。

【0069】

いくつかの実施形態では、抗原認識コンストラクトは、マウス化またはヒト化される。異種これらの用語は、異種由来のアミノ酸配列が本発明のコンストラクトに導入される場合に使用される。

【0070】

本発明のTCRは、一本鎖TCR(scTCR)として提供されてもよい。本発明によるscTCRは、1つのポリペプチド鎖中に、好ましくはペプチドリナーを介して連結される、完全なまたは部分的鎖配列および完全なまたは部分的鎖配列を含まなければならない。scTCRは、第1のTCR鎖(例えば、鎖)の可変領域のポリペプチドと、全(完全長)第2のTCR鎖(例えば、鎖)のポリペプチドとを含んでなり得て、または逆もまた然りである。さらに、scTCRは、任意選択的に、2つ以上のポリペプチドと一緒に連結する、1つまたは複数のリンカーを含んでなり得る。リンカーは、例えば、本明細書に記載されるように、2つの一本鎖と一緒に結合するペプチドであり得る。また、IL-2、IL-7またはIL-15などのヒトサイトカインに融合された本発明の

10

20

30

40

50

s c T C R も提供される。

【 0 0 7 1 】

本発明による抗原認識コンストラクトはまた、少なくとも2つの s c T C R 分子を含んでなる多量体複合体の形態で提供され得て、前記 s c T C R 分子は、それぞれ、少なくとも1つのピオチン部分に、またはその他の相互接続分子 / リンカーに融合され、前記 s c T C R は、ピオチン - ストレプトアビジン相互作用によって相互連結され前記多量体複合体が形成できるようにする。多量体 T C R を生成するための当該技術分野で公知の同様のアプローチも可能であり、本開示に含まれる。本発明の s c T C R を2つを超えて含んでなる、より高次の多量体複合体もまた提供される。

【 0 0 7 2 】

本発明の目的で、T C R は、少なくとも1つの T C R または および / または T C R または 可変ドメインを有する部分である。一般に、それらは、T C R 可変ドメインおよび T C R 可変ドメインの双方を含んでなり、代案としては、T C R 可変ドメインおよび T C R 可変ドメインの双方を含んでなる。それらは、ヘテロ二量体であってもよく、または一本鎖形態であってもよい。養子療法における使用のために、またはヘテロ二量体 T C R は、例えば、細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインの双方を有する完全長鎖として形質移入されてもよい。所望ならば、導入されたジスルフィド結合が、それぞれの定常ドメインの残基間に存在してもよい。

【 0 0 7 3 】

好ましい実施形態では、抗原認識コンストラクトは、ヒト T C R 、その断片もしくは誘導体である。ヒト T C R またはその断片もしくは誘導体は、対応するヒト T C R 配列の50%超を含んでなる T C R である。好ましくは、T C R 配列のごく一部のみが人工起源であり、またはその他の生物種に由来する。しかし、例えばヒト起源に由来して定常ドメインにマウス配列を有するものなどのキメラ T C R が有利であることが知られている。したがって、それらの定常ドメインの細胞外部分にマウス配列を含有する、本発明による T C R が特に好ましい。

【 0 0 7 4 】

したがって、本発明の抗原認識コンストラクトが、ヒト白血球抗原 (H L A) 依存的様式、好ましくは H L A - A 0 2 依存的様式で、その抗原を認識することもまた好ましい。「H L A 依存的様式」という用語は、本発明の文脈では、抗原ペプチドが前記 H L A によって提示される場合にのみ、抗原認識コンストラクトが抗原に結合することを意味する。

【 0 0 7 5 】

本発明による抗原認識コンストラクトは、一実施形態では好ましくは免疫応答を誘導し、好ましくは免疫応答は、インターフェロン (I F N) レベルの増加によって特徴付けられる。

【 0 0 7 6 】

例えば、実施例セクションおよび表2に記載の T C R の任意の1つなどの、本明細書に記載の T C R (またはその機能性変異型) のいずれかの機能性部分を含んでなるポリペプチドもまた、本発明によって提供される。「ポリペプチド」という用語は、本明細書の用法では、オリゴペプチドを含み、1つまたは複数のペプチド結合によって連結されたアミノ酸の一本鎖を指す。本発明のポリペプチドに関して、機能性部分は、機能性部分が、好ましくは本明細書の表1で開示されるような T A A 抗原に特異的に結合するという条件で、それがその一部である T C R (またはその機能性変異型) の連続アミノ酸を含んでなる任意の部分であり得る。「機能性部分」という用語は、T C R (またはその機能性変異型) に関して使用される場合、本発明の T C R (またはその機能性変異型) の任意の部分または断片を指し、その部分または断片は、それがその一部である (親 T C R またはその親機能性変異型) 、T C R (またはその機能性変異型) の生物学的活性を保持する。機能性部分は、例えば、T C R (またはその機能性変異型) の部分を包含する親 T C R (またはその機能性変異型) と同様の程度に、同じ程度に、またはより高い程度に、T A A 抗原に (H L A 依存的様式で) 特異的に結合する能力を保持し、またはがんを検出し、治療し、

10

20

30

40

50

または予防する。親TCR（またはその機能性変異型）に関して、機能性部分は、例えば、約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%、またはそれ以上の親TCRの可変配列（またはその機能性変異型）を含んでなり得る。

【0077】

機能性部分は、部分のアミノまたはカルボキシ末端に、または双方の末端に、追加的なアミノ酸を含んでなり得て、追加的なアミノ酸は、親TCRまたはその機能性変異型のアミノ酸配列中に見いだされない。望ましくは、追加的なアミノ酸は、例えば、TAA抗原に特異的に結合する；および/またはがん検出し、がんを治療または予防するなどの能力を有する、機能性部分の生物学的機能に干渉しない。より望ましくは、追加的なアミノ酸は、親TCRまたはその機能性変異型の生物学的活性と比較して、生物学的活性を増強する。

10

【0078】

場合によっては、本発明のコンストラクトは、配列番号39～86のいずれかに記載の配列（CDR配列、定常領域および可変領域、および完全長配列）、またはその機能性断片を含んでなる、1つまたは2つのポリペプチド鎖を含んでなってもよく、例えば、免疫グロブリンまたはその一部をコードするアミノ酸配列などのその他のアミノ酸配列をさらに含んでなり、本発明のタンパク質は融合タンパク質であり得る。この点において、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、本明細書に記載される本発明のポリペプチドの少なくとも1つを含んでなる融合タンパク質も提供する。もう1つのポリペプチドは、融合タンパク質の別個のポリペプチドとして存在し得るか、または本明細書に記載される本発明のポリペプチドの1つと共にフレーム（タンデム）で発現されるポリペプチドとして存在し得る。もう1つポリペプチドとしては、免疫グロブリン、CD3、CD4、CD8、MHC分子、例えば、CD1a、CD1b、CD1c、CD1dなどのCD1分子をはじめとするが、これに限定されるものではない、任意のペプチド分子またはタンパク分子、またはその一部が挙げられる。

20

【0079】

融合タンパク質は、本発明のポリペプチドの1つまたは複数のコピーおよび/またはもう1つのポリペプチドの1つまたは複数のコピーを含んでなり得る。例えば、融合タンパク質は、本発明のポリペプチドおよび/またはもう1つのポリペプチドの1、2、3、4、5つ、またはそれ以上のコピーを含んでなり得る。融合タンパク質を作製する適切な方法は、当該分野で公知であり、例えば、組換え方法が挙げられる。本発明のいくつかの実施形態では、本発明のTCR（およびその機能性部分および機能性変異型）、ポリペプチド、およびタンパク質は、鎖および鎖を連結し、鎖および鎖を連結するリンカーペプチドを含んでなる、単一タンパク質として発現されてもよい。この点において、本発明のTCR（およびその機能性変異型および機能性部分）、ポリペプチド、およびタンパク質は、本発明のTCRの可変領域のアミノ酸配列を含んでなり、リンカーペプチドをさらに含んでなってもよい。リンカーペプチドは、宿主細胞内で、組換えTCR（その機能性部分および機能性変異型を含む）、ポリペプチド、および/またはタンパク質の発現を有利に促進してもよい。リンカーペプチドは、任意の適切なアミノ酸配列を含んでなってもよい。一本鎖TCRコンストラクトのためのリンカー配列は、当該技術分野で周知である。このような一本鎖コンストラクトは、1つまたは2つの定常ドメイン配列をさらに含んでなってもよい。リンカーペプチドを含むコンストラクトの宿主細胞による発現に際して、リンカーペプチドもまた切断されて、鎖と鎖が分離され、鎖と鎖が分離されてもよい。

30

40

【0080】

既に上述したように、本発明のTCRの結合機能性は、抗体のフレームワークにおいて提供されてもよい。例えば、おそらく3、2または1つの追加的なNおよび/またはC末端フレームワーク残基を含む、本発明のTCRのCDR配列は、抗体可変重鎖/軽鎖配列に直接グラフトされてもよい。その様々な文法的形態における「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子を指すために、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、す

50

なわち抗原結合部位またはパラトープを含有する分子を指すために、本明細書で使用される。このような分子は、免疫グロブリン分子の「抗原結合断片」とも称される。本発明は、本明細書に記載の抗原に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合部分をさらに提供する。抗体は、当該技術分野で公知の任意のタイプの免疫グロブリンであり得る。例えば、抗体は、例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgMなどの任意のアイソタイプであり得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。抗体は、例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、鶏、ハムスター、ヒトなどの哺乳類から単離されたおよび/または精製された抗体などの天然抗体であり得る。代案としては、抗体は、例えば、ヒト化抗体またはキメラ抗体などの遺伝子改変抗体であり得る。抗体は、単量体または多量体の形態であり得る。

10

【0081】

「抗体」という用語としては、細胞内抗体、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体（例えば、「CDR-グラフト」によって作製される）、抗体断片、およびヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二重特異性抗体、二特異性抗体、三特異性抗体、四特異性抗体など）などの遺伝子操作されまたは別の様式で修飾された形態の免疫グロブリンが挙げられるが、これに限定されるものではない。「抗体」という用語は、cys-二特異性抗体およびミニ抗体を含む。したがって、本明細書で提供されるありとあらゆる実施形態は、「抗体」または「抗体様コンストラクト」に関して、他に明確に示されていない限り、二重特異性抗体、二特異性抗体、scFv断片、キメラ抗体受容体（CAR）コンストラクト、二特異性抗体および/または小型抗体実施形態とも想定される。「抗体」という用語は、免疫グロブリンファミリーのポリペプチドを含み、または本明細書に開示されるように、好ましくは本発明のTAAである対応する抗原に、非共有結合的、可逆的、および特異的様式で結合できる免疫グロブリンの断片を含んでなるポリペプチドを含む。例示的な抗体構造単位は、四量体を構成する。いくつかの実施形態では、完全長抗体は、2つの同一対のポリペプチド鎖から構成され得て、各対は、1つの「軽」鎖および1つの「重」鎖（ジスルフィド結合を介して連結される）を有する。抗体の構造およびアイソタイプは、当業者に周知である（例えばJaneway's Immunobiology, 9th edition, 2016）。

20

【0082】

哺乳類の認識された免疫グロブリン遺伝子としては、 、 、 、 、およびμ定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。（免疫グロブリン遺伝子についてより詳しくは、国際Im-MunoGeNeTics information system（登録商標）、Lefranc M-Petal, Nucleic Acids Res. 2015 Jan; 43 (Database issue): D413-22; および<http://www.imgt.org/>を参照されたい）完全長鎖では、軽鎖は または のどちらかに分類される。完全長鎖では、重鎖は、 、μ、 、または に分類され、それは次に、それぞれ免疫グロブリンクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEを規定する。各鎖のN末端は、抗原認識に主に関与する約100?110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。可変軽鎖（VL）および可変重鎖（VH）という用語は、それぞれ軽鎖および重鎖のこれらの領域を指す。本発明における用法では、「抗体」は、抗体およびその断片の全ての変種を包含する。したがって、この概念の範囲内で、完全長抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体（scFv）、Fab、Fab'、およびこれらの断片の多量体バージョン（例えば、F(ab')₂）は、本質的に同一または類似結合特異性を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、本発明のペプチドTAAに特異的に結合する。本発明による好ましい抗原認識コンストラクトとしては、抗体重鎖、好ましくはその可変ドメイン、またはその抗原結合断片、および/または抗体軽鎖、好ましくはその可変ドメイン、またはその抗原結合断片が挙げられる。同様に、ジスルフィド安定化可変領域断片（dsFv）は、組換えDNA技術によって調製され得るが、本発明の抗体断片は、これらの例示的なタイプの抗体断片に限定されない。また、抗体、またはその抗原結合部分は、例えば、放射性同位体、フル

30

40

50

オロフォア（例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン（F I T C）、フィコエリトリン（P E））、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、および元素粒子（例えば、金粒子）などの検出可能な標識を含んでなるように修飾され得る。場合によっては、T C R C D R 3 配列は、配列番号 4 4、5 2、6 0、6 8、7 6、および 8 4 に提供される C D R 3 配列と比較して、好ましくは 3 つ以下のアミノ酸残基で、好ましくは 2 つのみ、最も好ましくは 1 つのみのアミノ酸位置で、わずかに修飾されてもよい。好ましくは、抗体は、表 2 の本発明の T C R について示されるように、C D R 3、好ましくは全ての C D R 1 ? C D R 3 領域の組合せを含んでなり、いずれの場合にも独立して、これらの配列と比較して、任意選択的に、それぞれ 3 つまたは 2 つ以下、好ましくは 1 つのアミノ酸置換、挿入および / または欠失を有する。

10

【 0 0 8 3 】

抗体を作製する適切な方法は、当該技術分野で公知である。例えば、標準的なハイブリドーマ法は、例えば、Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol, 5, 511 - 519 (1976); Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988); および C. A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 8 Ed., Garland Publishing, New York, NY (2011) に記載される。代案としては、EBV - ハイブリドーマ法 (Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74 (2), 361 - 67 (1984)、および Roder et al, Methods Enzymol, 121, 140 - 67 (1986)) およびバクテリオファージベクター発現系（例えば、Huse et al., Science, 246, 1275 - 81 (1989)）を参照されたい）などのその他の方法が、当該技術分野で公知である。さらに、非ヒト動物において抗体を生産する方法は、例えば、米国特許第 5, 545, 806 号明細書、米国特許第 5, 569, 825 号明細書、および米国特許第 5, 714, 352 号明細書、および米国特許出願公開第 2002 / 0197266 号明細書に記載される。

20

【 0 0 8 4 】

本発明のいくつかの実施形態はまた、可溶性 T C R である、T C R またはその機能性断片およびポリペプチドにも関する。本明細書の用法では、「可溶性 T 細胞レセプター」という用語は、天然 T C R のヘテロ二量体切断変異型を指し、それは、例えばジスルフィド結合によって連結されているが、天然タンパク質の膜貫通および細胞質ゾルドメインを欠く、T C R 鎖および 鎖の細胞外部分を含んでなる。「可溶性 T 細胞受容体 鎖配列および可溶性 T 細胞受容体 鎖配列」という用語は、膜貫通および細胞質ドメインを欠く T C R 鎖および 鎖配列を指す。可溶性 T C R 鎖および 鎖の配列（アミノ酸または核酸）は、天然 T C R 中の対応する配列と同一であってもよく、または対応する天然 T C R 配列と比較して、変異型の可溶性 T C R 鎖および 鎖配列を含んでなってもよい。「可溶性 T 細胞受容体」という用語は、本明細書の用法では、変異型または非変異型の可溶性 T C R 鎖および 鎖配列を有する、可溶性 T C R を包含する。変異型は、可溶性 T C R 鎖および 鎖配列の可変領域または定常領域にあってもよく、アミノ酸欠失、挿入物、置換変異、ならびにアミノ酸配列を変化させない核酸配列変化が挙げられるが、これに限定されるものではない。いずれにしても、本発明の可溶性 T C R は、それらの親分子の結合機能を保持する。

30

40

【 0 0 8 5 】

定義

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

【 0 0 8 6 】

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

【 0 0 8 7 】

50

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

【００８８】

「ペプチド」という用語は、典型的に、隣接するアミノ酸の アミノ基とカルボニル基との間のペプチド結合によって互いに連結される、一連のアミノ酸残基を命名するために、本明細書で使用される。ペプチドは、好ましくは９アミノ酸長であるが、８アミノ酸長程度に短くあり得て、１０、１１、または１２以上に長くあり得て、ＭＨＣクラスⅠⅠペプチド（本明細書のペプチドのより長い変異型）の場合、それらは１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０アミノ酸長以上に長くあり得る。

【００８９】

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

【００９０】

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

【００９１】

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

【００９２】

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

【００９３】

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

【００９４】

特定のペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

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

【0095】

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

10

【0096】

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

【0097】

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

20

【0098】

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

【0099】

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

【0100】

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

30

【0101】

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

【0102】

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

40

【0103】

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

【0104】

50

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

【0105】

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

10

【0106】

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

20

【0107】

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

30

【0108】

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

40

【0109】

本明細書によると、配列に言及する場合、「同一性百分率」または「パーセント同一」という用語は、比較される配列（「比較配列」）と、記載されまたは特許請求される配列（「参照配列」）とのアライメント後に、配列が、特許請求されまたは記載される配列と

50

比較されることを意味する。次に同一性百分率は、次式に従って判定される：

同一性百分率 = $100 [1 - (C/R)]$

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

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

(ii) 参照配列中の各ギャップ、および

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

(iv) アライメントは、整合配列の1位から開始しなくてはならず；

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

【0110】

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

【0111】

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

【0112】

当業者は、特定のペプチドの変異型によって誘導されるT細胞が、ペプチドそれ自体と交差反応できるかどうかを評価できるであろう（Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zarembo et al., 1997）。

【0113】

所与のアミノ酸配列の「変異型」によって、本発明者らは、ペプチドが、配列番号1～配列番号24からなる群から選択される所与のアミノ酸配列を有するペプチドと実質的に同様にHLA分子となおも結合できるように、（例えば、それらを別の天然アミノ酸残基の側鎖で、またはその他の側鎖で置換することにより）例えば、アミノ酸の1つまたは2つの残基の側鎖が変化することを意味する。例えば、ペプチドは、それがHLA-A*02または-D Rなどの適切なMHC分子の結合溝と相互作用して結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持するように修飾されてもよく、このようにしてそれは、活性化Tリンパ球のTCRに結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持する。同様に、TCRは、HLA-A*02またはHLA-D Rなどの適切なMHC分子/KVLEHVVRV（配列番号1）複合体と相互作用して結合する能力を改善せずとも、少なくとも維持するように修飾されてもよく、このようにしてそれは、T細胞を活性化する能力を改善せずとも、少なくとも維持する。

【0114】

これらのT細胞は、本明細書の態様で定義されているように、引き続いて細胞と交差反応して、KVLEHVVRV（配列番号1）などの同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞を死滅させ得る学術文献およびデータベース（Ramensee et al., 1999; Godkin et al., 1997）から演繹され得るように、HLA結合ペプチドの特定の位置は、典型的にアンカー残基であり、結合溝を構成するポリペプチド鎖の極性、電気物理的、疎水性、および空間特性によって

10

20

30

40

50

画定されるHLA受容体の結合モチーフと適合する、コア配列を形成する。一態様では、当業者は、本明細書の教示を所与として、既知のアンカー残基を維持することによって、TCRのアミノ酸配列を修飾する能力を有し、このようなTCR変異型がMHCクラスIまたはII分子/KVLEHVVRV(配列番号1)複合体に結合する能力を維持するかどうかを判定できるであろう。本明細書のTCR変異型は、MHCクラスIまたはII分子/KVLEHVVRV(配列番号1)複合体に結合する能力を維持する。本明細書のTCR変異型を発現するT細胞は、引き続いて、KVLEHVVRV(配列番号1)などの同族ペプチドの天然アミノ酸配列を含有するポリペプチドを発現する細胞を死滅させ得る。

【0115】

一態様では、本明細書で開示されるペプチドまたはTCRは、特に明記されない場合、ペプチド鎖内の異なる、おそらくは選択的な部位での1つまたは複数の残基の置換によって修飾され得る。好ましくはこれらの置換は、前記ペプチドのアミノ酸鎖の末端に位置する。TCRでは、好ましくは、これらの置換は、TCR鎖およびTCR鎖の変領域に位置する。このような置換は、保存的性質であってもよく、例えば、疎水性アミノ酸が別の疎水性アミノ酸によって置換されるなど、構造および特徴の類似したアミノ酸によってアミノ酸が置換される。さらにより保存的な置換は、ロイシンのイソロイシンによる置換などの、同一または類似サイズおよび化学的性質のアミノ酸の置換である。天然起源相同タンパク質ファミリーの配列多様性の研究では、特定のアミノ酸置換は、他よりも耐容されることが多く、これらは、元のアミノ酸とその置換物との間のサイズ、電荷、極性、および疎水性の類似性との相関を示すことが多く、これが「保存的置換」の定義の基礎である。

【0116】

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

【0117】

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

【0118】

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

【0119】

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

【0120】

本明細書の用法では、「マウス」または「ヒト」という用語は、抗原認識コンストラクト、またはTCR、または本明細書に記載のTCRの任意の構成要素(例えば、相補性決

10

20

30

40

50

定 (d e t e r - m i n i n g) 領域 (C D R) 、可変領域、定常領域、鎖、および / または 鎖) に言及する場合、それぞれ、マウスまたはヒト非再構成型 T C R 遺伝子座に由来する T C R (またはその構成要素) を意味する。

【 0 1 2 1 】

T 細胞受容体 (T C R)

好ましい実施形態では、本明細書は、表 2 に示される T C R 鎖およびその変異型と、表 2 に示される T C R 鎖およびその変異型とを含んでなる、T C R に関する。一態様では、本明細書に記載の T C R は、ヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス - I / K V L E H V V R V (配列番号 1) / 複合体またはクラス I I / K V L E H V V R V (配列番号 1) / 複体の分子に結合するまたは特異的に結合する能力を有する。

10

【 0 1 2 2 】

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2：本明細書による代表的なTCR

TCR ID	説明	配列
R20P1H7 α 鎖	α 鎖	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESS SLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEKE RLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCVQGENSGYSTLTF GKGTMMLVSPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKSDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:39)
	Lセグメント (TRAV20)	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSG (SEQ ID NO:40)
	V鎖 (TRAV20)	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESS SLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEKE RLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCVQ (SEQ ID NO:41)
	CDR1	VSGLRG (SEQ ID NO:42)
	CDR2	LYS (SEQ ID NO:43)
	CDR3	CAVQGENSGYSTLTF (SEQ ID NO:44)
	連結部分 (TRAJ11)	NSGYSTLTFGKGTMMLLVSP (SEQ ID NO:45)
	定常領域 (TRAC)	DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSD VYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:46)
R20P1H7 β 鎖	β 鎖	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVT CSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVP EGYKVS RKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASSLGPGLAAYN EQFFGPGTRLTVLEDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDQPPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:47)
	Lセグメント (TRBV27)	MGPQLLGYVVLCLLGAGPL (SEQ ID NO:48)
	V鎖 (TRBV27)	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVT CSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVP EGYKVS RKEKRNFLILESPSPNQTSLYFCASSL (SEQ ID NO:49)
	CDR1	MNHEY (SEQ ID NO:50)
	CDR2	SMNVEV (SEQ ID NO:51)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

	CDR3	CASSLGPGLAAYNEQF (SEQ ID NO:52)
	J鎖 (TRBJ2-1)	YNEQFFGPGTRLTVL (SEQ ID NO:53)
	定常領域 (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVE LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTQIVS AEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVVKRDSRG (SEQ ID NO:54)
R7P1D5 α鎖	α鎖	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVI NCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQR LTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSG TRLSIRPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLQSVI GFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:55)
	Lセグメント (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSR (SEQ ID NO:56)
	V鎖 (TRAV5)	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVI NCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQR LTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAE (SEQ ID NO:57)
	CDR1	DSSSTY (SEQ ID NO:58)
	CDR2	IFS (SEQ ID NO:59)
	CDR3	CAEYSSASKIIF ((SEQ ID NO:60)
	連結部分 (TRAJ3)	YSSASKIIFGSGTRLSIRP (SEQ ID NO:61)
	定常領域 (TRAC)	NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSD VYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLQSVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:62)
R7P1D5 β鎖	β鎖	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNPIDDSGMP EDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASRANTGELFF GEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFYPDHVELSWWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDS RYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVQTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSAVLAMAMVVKRDSRG (SEQ ID NO:63)
	Lセグメント (TRBV12-4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHT (SEQ ID NO:64)

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

	V鎖 (TRBV12-4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTL RCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNPIDDSGMP EDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS (SEQ ID NO:65)
	CDR1	SGHDY (SEQ ID NO:66)
	CDR2	FNNNVP (SEQ ID NO:67)
	CDR3	CASRANTGELFF (SEQ ID NO:68)
	J鎖 (TRBJ2-1)	NTGELFFGEGSRLTVL (SEQ ID NO:69)
	定常領域 (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVE LSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVS AEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:70)
R10P2G12 α 鎖	α 鎖	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLD CVYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRNNSFDEQNEISGRY SWNFQKSTSSFNFTITASQVVDASVYFCALSEGNSGNTPLVF GKGTRLSVIANIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTNLFQNL LSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:71)
	Lセグメント (TRAV19)	MLTASLLRAVIASICVVSSM (SEQ ID NO:72)
	V鎖 (TRAV19)	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLD CVYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRNNSFDEQNEISGRY SWNFQKSTSSFNFTITASQVVDASVYFCALSE (SEQ ID NO:73)
	CDR1	TRDTTY (SEQ ID NO:74)
	CDR2	RNSF (SEQ ID NO:75)
	CDR3	CALSEGNSGNTPLVF (SEQ ID NO:76)
	連結部分 (TRAJ29)	NSGNTPLVFGKTRLSVIA (SEQ ID NO:77)
	定常領域 (TRAC)	NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSD VYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPESCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS (SEQ ID NO:78)

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

R10P2G12 β 鎖	β 鎖	MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLE CVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSLSSGSHQET QYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDQPPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVQTIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:79)
	Lセグメント (TRBV28)	MGIRLLCRVAFCFLAVGLV (SEQ ID NO:80)
	V鎖 (TRBV28)	MGIRLLCRVAFCFLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLE CVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP EGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSL (SEQ ID NO:81)
	CDR1	MDHEN (SEQ ID NO:82)
	CDR2	SYDVKM (SEQ ID NO:83)
	CDR3	CASSLSSGSHQETQYF (SEQ ID NO:84)
	J鎖 (TRBJ2-5)	QETQYFGPGTRLLVL (SEQ ID NO:85)
	定常領域 (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVE LSWVWNGKEVHSGVSTDQPPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVQTIVS AEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:86)

10

20

【0123】

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

30

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

【0124】

したがって本明細書では、「TCR 可変ドメイン」という用語は、リーダ領域 (L) のない TCR V (TRAV) 領域と TCR J (TRAJ) 領域との連結を指し；「TCR 定常ドメイン」という用語は、細胞外 TRAC 領域、または C 末端切断型 TRAC 配列を指し、任意選択的に 膜貫通ドメイン (VIGFRILLKVGFNLLMTL (配列番号 87)) を指す。

【0125】

同様に「TCR 可変ドメイン」という用語は、リーダ領域 (L) のない TCR V (TRBV) 領域と TCR D/J (TRBD/TRBJ) 領域との連結を指し；TCR 定常ドメインという用語は、細胞外 TRBC 領域、または C 末端切断型 TRBC 配列を指し、任意選択的に 膜貫通ドメイン (TILYEILLGKATLYAVLVSAVL (配列番号 88)) を指す。

40

【0126】

/ TCR に関して、「TCR 可変領域」という用語は、本明細書の用法では、リーダ領域 (L) のない TCR V (TRGV) 領域と TCR J (TRGJ) 領域との連結を指し、TCR 定常領域という用語は、細胞外 TRGC 領域、または C 末端トランケート型 TRGC 配列を指す。同様に、「TCR 可変領域」という用語は、リーダ領

50

域 (L) のない T C R V (T R D V) 領域と T C R D / J (T R D D / T R D J) 領域との連結を指し「 T C R 定常領域」という用語は、細胞外 T R D C 領域、または t C 末端トランケート型 T R D C 配列を指す。

【 0 1 2 7 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、表 2 に示される T C R 鎖と少なくとも 7 5 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の、好ましくは 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の T C R 鎖を含んでなり、またはそれからなる。表 2 に示される T C R 鎖は、表 2 で定義されるような、リーダー (L) セグメント ; V 鎖 ; 3 つの相補性決定領域 (C D R 1 、 C D R 2 、 および C D R 3) ; 接合領域 (J) 、 および定常領域を含有する。

10

【 0 1 2 8 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、表 2 に示される T C R 可変ドメインと少なくとも 7 5 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の、好ましくは 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の T C R 可変ドメインを含んでなり、またはそれからなる。

【 0 1 2 9 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、表 2 に示される T C R 定常ドメインと少なくとも 7 5 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の、好ましくは 7 5 % 同一の T C R 定常ドメインを含んでなり、またはそれからなる。

20

【 0 1 3 0 】

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

【 0 1 3 1 】

特に好ましい実施形態では、本明細書の T C R は、表 2 の T C R 可変ドメインと少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する T C R 可変ドメインを含んでなり、またはそれからなり、表 2 の同一 可変ドメインの C D R 1 、 C D R 2 、 および C D R 3 を含んでなる。

30

【 0 1 3 2 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、表 2 に示される T C R 鎖と少なくとも 7 5 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の、好ましくは 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の T C R 鎖を含んでなり、またはそれからなる。表 2 に示される T C R 鎖は、表 2 で定義されるような、リーダー (L) セグメント ; V 鎖 ; 3 つの相補性 (c o m p l i m e n t a r y) 決定領域 (C D R 1 、 C D R 2 、 および C D R 3) ; 接合領域 (J) 、 および定常領域を含有する。

【 0 1 3 3 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、表 2 に示される T C R 可変ドメインと少なくとも 7 5 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の、好ましくは 9 0 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の T C R 可変ドメインを含んでなり、またはそれからなる。

40

【 0 1 3 4 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、表 2 に示される T C R 定常ドメインと少なくとも 7 5 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、または 9 9 % 同一の、好ましくは 7 5 % 同一の T C R 定常ドメインを含んでなり、またはそれからなる。

【 0 1 3 5 】

50

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

【0136】

特に好ましい実施形態では、本明細書のTCRは、表2のTCR鎖可変ドメインと少なくとも90%または95%の配列同一性を有するTCR鎖可変ドメインを含んでなり、またはそれからなり、表2の同一鎖可変ドメインのCDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

10

【0137】

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

【0138】

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

20

【0139】

一実施形態では、表2の任意のTCR鎖は、表2の任意のTCR鎖と対になって、MAG-003ペプチド-HLA分子複合体に特異的に結合するTCRを生成する。

【0140】

TCR R20P1H7

一実施形態では、本明細書のTCRは、それぞれ配列番号39および47に対応する、TCR R20P1H7の鎖および/または鎖を含んでなり、またはそれからなる。

【0141】

TCR R20P1H7のTCR鎖可変ドメインは、配列番号39のアミノ酸22~133を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR R20P1H7のTCR定常ドメインは、配列番号39のアミノ酸134~275を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR R20P1H7のTCR鎖可変ドメインは、配列番号47のアミノ酸20~135を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR定常ドメインは、配列番号47のアミノ酸136~315を含んでなり、または代案としてはそれからなる。

30

【0142】

特定の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号39のTCR鎖と少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR鎖を含んでなる。

40

【0143】

別の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号39のTCR鎖可変ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR鎖可変ドメインを含んでなる。

【0144】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号39のTCR定常ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは75%同一のTCR定常ドメインを含ん

50

でなる。

【 0 1 4 5 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、配列番号 3 9 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの 鎖相補性決定領域 (C D R) を含んでなる、T C R 可変ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、T C R 可変ドメインは、配列番号 3 9 の 鎖 C D R 3 を含んでなる。別の好ましい実施形態では、T C R 可変ドメインは、配列番号 3 9 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含んでなる。

【 0 1 4 6 】

特に好ましい実施形態では、本明細書の T C R は、配列番号 3 9 の T C R 可変ドメインと少なくとも 9 0 % または 9 5 % の配列同一性を有する T C R 可変ドメインを含んでなり、配列番号 3 9 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含んでなる。

10

【 0 1 4 7 】

別の特定の実施形態では、本明細書の T C R は、配列番号 4 7 の T C R 鎖と少なくとも 7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一の、好ましくは 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一の T C R 鎖を含んでなる。

【 0 1 4 8 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、配列番号 4 7 の T C R 可変ドメインと少なくとも 7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一の、好ましくは 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一の T C R 可変ドメインを含んでなる。

20

【 0 1 4 9 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、配列番号 4 7 の T C R 定常ドメインと少なくとも 7 5 %、8 0 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一の、好ましくは 7 5 % 同一の T C R 定常ドメインを含んでなる。

【 0 1 5 0 】

一実施形態では、本明細書の T C R は、配列番号 4 7 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの 鎖相補性決定領域 (C D R) を含んでなる、T C R 可変ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、T C R 可変ドメインは、配列番号 4 7 の 鎖 C D R 3 を含んでなる。別の好ましい実施形態では、T C R 可変ドメインは、配列番号 4 7 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含んでなる。

30

【 0 1 5 1 】

特に好ましい実施形態では、本明細書の T C R は、配列番号 4 7 の T C R 可変ドメインと少なくとも 9 0 % または 9 5 % の配列同一性を有する T C R 可変ドメインを含んでなり、配列番号 4 7 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含んでなる。

【 0 1 5 2 】

鎖可変ドメインは、配列番号 3 9 の対応する C D R 配列に対して、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸置換を有する 1 つまたは複数の C D R ドメインを含んでなってもよい。同様に、鎖可変ドメインは、配列番号 4 7 の対応する C D R 配列に対して、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸置換を有する 1 つまたは複数の C D R ドメインを含んでなってもよい。

40

【 0 1 5 3 】

T C R R 7 P 1 D 5

一実施形態では、本明細書の T C R は、それぞれ配列番号 5 5 および 6 3 に対応する、T C R R 7 P 1 D 5 の 鎖および / または 鎖を含んでなり、またはそれからなる。

【 0 1 5 4 】

T C R R 7 P 1 D 5 の T C R 可変ドメインは、配列番号 5 5 のアミノ酸 2 2 ~ 1 3

50

1を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR R7P1D5のTCR 定常ドメインは、配列番号55のアミノ酸132～272を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR R7P1D5のTCR 可変ドメインは、配列番号63のアミノ酸20～131を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR 定常ドメインは、配列番号63のアミノ酸132～310を含んでなり、または代案としてはそれからなる。

【0155】

特定の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号55のTCR 鎖と少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 鎖を含んでなる。

10

【0156】

別の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号55のTCR 可変ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 可変ドメインを含んでなる。

【0157】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号55のTCR 定常ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは75%同一のTCR 定常ドメインを含んでなる。

20

【0158】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号55の 鎖CDR1、CDR2、およびCDR3からなる群から選択される少なくとも1つの 鎖相補性決定領域(CDR)を含んでなる、TCR 可変ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号55の 鎖CDR3を含んでなる。別の好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号55の 鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

【0159】

特に好ましい実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号55のTCR 可変ドメインと少なくとも90%または95%の配列同一性を有するTCR 可変ドメインを含んでなり、配列番号55の 鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

30

【0160】

別の特定の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号63のTCR 鎖と少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%または95%同一のTCR 鎖を含んでなる。

【0161】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号63のTCR 可変ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 可変ドメインを含んでなる。

40

【0162】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号63のTCR 定常ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは75%同一のTCR 定常ドメインを含んでなる。

【0163】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号63の 鎖CDR1、CDR2、およびCDR3からなる群から選択される少なくとも1つの 鎖相補性決定領域(CDR)を

50

含んでなる、TCR 可変ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号 63 の鎖 CDR3 を含んでなる。別の好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号 63 の鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 を含んでなる。

【0164】

特に好ましい実施形態では、本明細書の TCR は、配列番号 63 の TCR 可変ドメインと少なくとも 90% または 95% の配列同一性を有する TCR 可変ドメインを含んでなり、配列番号 63 の鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 を含んでなる。

【0165】

鎖可変ドメインは、配列番号 55 の対応する CDR 配列に対して、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸置換を有する 1 つまたは複数の CDR ドメインを含んでなってもよい。同様に、鎖可変ドメインは、配列番号 63 の対応する CDR 配列に対して、1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つのアミノ酸置換を有する 1 つまたは複数の CDR ドメインを含んでなってもよい。

10

【0166】

TCR R10P2G12

一実施形態では、本明細書の TCR は、それぞれ配列番号 71 および 79 に対応する、TCR R10P2G12 の鎖および / または鎖を含んでなり、またはそれからなる。

【0167】

TCR R10P2G12 の TCR 可変ドメインは、配列番号 71 のアミノ酸 21 ~ 136 を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR R10P2G12 の TCR 定常ドメインは、配列番号 71 のアミノ酸 137 ~ 277 を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR R10P2G12 の TCR 可変ドメインは、配列番号 79 のアミノ酸 20 ~ 134 を含んでなり、または代案としてはそれからなり；TCR 定常ドメインは、配列番号 79 のアミノ酸 135 ~ 313 を含んでなり、または代案としてはそれからなる。

20

【0168】

特定の実施形態では、本明細書の TCR は、配列番号 71 の TCR 鎖と少なくとも 75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の、好ましくは 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の TCR 鎖を含んでなる。

30

【0169】

別の実施形態では、本明細書の TCR は、配列番号 71 の TCR 可変ドメインと少なくとも 75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の、好ましくは 90%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の TCR 可変ドメインを含んでなる。

【0170】

一実施形態では、本明細書の TCR は、配列番号 71 の TCR 定常ドメインと少なくとも 75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の、好ましくは 75% 同一の TCR 定常ドメインを含んでなる。

40

【0171】

一実施形態では、本明細書の TCR は、配列番号 71 の鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの鎖相補性決定領域 (CDR) を含んでなる、TCR 可変ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号 71 の鎖 CDR3 を含んでなる。別の好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号 71 の鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 を含んでなる。

【0172】

特に好ましい実施形態では、本明細書の TCR は、配列番号 71 の TCR 可変ドメイ

50

ンと少なくとも90%または95%の配列同一性を有するTCR 可変ドメインを含んでなり、配列番号71の鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

【0173】

別の特定の実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号79のTCR 鎖と少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 鎖を含んでなる。

【0174】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号79のTCR 可変ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のTCR 可変ドメインを含んでなる。

10

【0175】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号79のTCR 定常ドメインと少なくとも75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一の、好ましくは75%同一のTCR 定常ドメインを含んでなる。

【0176】

一実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号79の鎖CDR1、CDR2、およびCDR3からなる群から選択される少なくとも1つの鎖相補性決定領域(CDR)を含んでなる、TCR 可変ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号79の鎖CDR3を含んでなる。別の好ましい実施形態では、TCR 可変ドメインは、配列番号79の鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

20

【0177】

特に好ましい実施形態では、本明細書のTCRは、配列番号79のTCR 可変ドメインと少なくとも90%または95%の配列同一性を有するTCR 可変ドメインを含んでなり、配列番号79の鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。

【0178】

鎖可変ドメインは、配列番号71の対応するCDR配列に対して、1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸置換を有する1つまたは複数のCDRドメインを含んでなってもよい。同様に、鎖可変ドメインは、配列番号79の対応するCDR配列に対して、1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸置換を有する1つまたは複数のCDRドメインを含んでなってもよい。

30

【0179】

さらに好ましい実施形態では、本明細書のTCRは、MAG-003ペプチド-HLA分子複合体に特異的に結合し、MAG-003ペプチドは、配列番号2~配列番号24に示されるものなどの、KVL EHVVRV(配列番号1)およびその変異型から選択される。一実施形態では、HLA分子は、HLA-A、HLA-B、およびHLA-C分子からなる群から選択される、クラスI MHC分子である。一実施形態では、HLA分子はHLA-A*02である。別の実施形態では、HLA分子は、HLA-DP、HLA-DQ、およびHLA-DRからなる群から選択される、クラスII MHC分子である。

40

【0180】

本明細書のTCRは、好ましくは、約100μM以下、約50μM以下、約25μM以下、または約10μM以下の結合親和性(KD)で、MAG-003ペプチド-HLA分子複合体に結合する。より好ましいのは、約1μM以下、約100nM以下、約50nM以下、約25nM以下の結合親和性を有する、高親和性TCRである。本明細書のTCRの好ましい結合親和性範囲の非限定的例としては、約1nM~約10nM; 約10nM~約20nM; 約20nM~約30nM; 約30nM~約40nM; 約40nM~約50nM; 約50nM~約60nM; 約60nM~約70nM; 約70nM~約80nM; 約8

50

0 n M ~ 約 9 0 n M ; および約 9 0 n M ~ 約 1 0 0 n M が挙げられる。

【 0 1 8 1 】

本明細書の用法では、本明細書の T C R との関連で、「特異的結合」およびそれらの文法的変種は、M A G - 0 0 3 ペプチド - H L A 分子複合体に対して、1 0 0 μ M 以下の結合親和性 (K D) を有する T C R を意味するために使用される。

【 0 1 8 2 】

本明細書の / ヘテロ二量体 T C R は、それらの定常ドメインの間に導入された、ジスルフィド結合を有してもよい。このタイプの好ましい T C R としては、T R A C 定常ドメイン配列と T R B C 1 または T R B C 2 定常ドメイン配列とを有するものが挙げられるが、ただし、T R A C の T h r 4 8 および T R B C 1 または T R B C 2 の S e r 5 7 は、システイン残基によって置換されており、前記システインは、T C R の T R A C 定常ドメイン配列と T R B C 1 または T R B C 2 定常ドメイン配列との間に、ジスルフィド結合を形成する。

【 0 1 8 3 】

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

【 0 1 8 4 】

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

【 0 1 8 5 】

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

【 0 1 8 6 】

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

【 0 1 8 7 】

M A G - 0 0 3 ペプチド

本明細書は、配列番号 1 ~ 配列番号 2 4、または配列番号 1 ~ 配列番号 2 4 と 8 8 % 相同的であるその変異型、または T 細胞を本明細書に記載のペプチドと交差反応させるその

10

20

30

40

50

変異型からなる群から選択される配列を含んでなる、ペプチドを提供する。一態様では、本明細書のペプチドは、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅠ分子に、または本明細書に記載のペプチドのより長いバージョンは、クラスⅡに、結合する能力を有する。一態様では、本明細書に記載のTCRは、本明細書に記載のペプチドに結合できまたはそれに特異的に結合できる。

【0188】

ヒトにおいては、MHCクラスⅠ分子（ヒト白血球抗原（HLA）ともまた称されるヒトのMHC分子）をコードする、3つの異なる遺伝子座、HLA-A、HLA-B、およびHLA-Cがある。HLA-A*01、HLA-A*02、およびHLA-B*07は、これらの遺伝子座から発現され得る、異なるMHCクラスⅠ対立遺伝子の例である。

10

【0189】

表3：HLA-A*02およびHLA-A*24の発現頻度F、および最も高頻度のHLA-A-DR血清型。頻度は、ハーディ・ワインベルグの式 $F = 1 - (2 - Gf)?$ を用いて、Mori et al. (Mori et al., 1997) から適応された米国人集団内のハプロタイプ頻度Gfから推定された。連鎖不均衡のために、A*02またはA*24と特定のHLA-DR対立遺伝子との組み合わせは、それらの単一頻度から予測されるよりも、豊富でありまたは低頻度であるかもしれない。詳細については、Chanock et al. (Chanock et al., 2004) を参照されたい。

【0190】

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表3

対立遺伝子	集団	対立遺伝子出現頻度から計算された表現型
A*02	白人（北米）	49.1%
A*02	アフリカ系米国人（北米）	34.1%
A*02	アジア系米国人（北米）	43.2%
A*02	ラテン系米国人（北米）	48.3%
DR1	白人（北米）	19.4%
DR2	白人（北米）	28.2%
DR3	白人（北米）	20.6%
DR4	白人（北米）	30.7%
DR5	白人（北米）	23.3%
DR6	白人（北米）	26.7%
DR7	白人（北米）	24.8%
DR8	白人（北米）	5.7%
DR9	白人（北米）	2.1%
DR1	アフリカ系（北）米人	13.20%
DR2	アフリカ系（北）米人	29.80%
DR3	アフリカ系（北）米人	24.80%
DR4	アフリカ系（北）米人	11.10%
DR5	アフリカ系（北）米人	31.10%
DR6	アフリカ系（北）米人	33.70%
DR7	アフリカ系（北）米人	19.20%
DR8	アフリカ系（北）米人	12.10%
DR9	アフリカ系（北）米人	5.80%
DR1	アジア系（北）米人	6.80%
DR2	アジア系（北）米人	33.80%
DR3	アジア系（北）米人	9.20%
DR4	アジア系（北）米人	28.60%
DR5	アジア系（北）米人	30.00%
DR6	アジア系（北）米人	25.10%
DR7	アジア系（北）米人	13.40%
DR8	アジア系（北）米人	12.70%
DR9	アジア系（北）米人	18.60%
DR1	ラテン系（北）米人	15.30%
DR2	ラテン系（北）米人	21.20%
DR3	ラテン系（北）米人	15.20%
DR4	ラテン系（北）米人	36.80%
DR5	ラテン系（北）米人	20.00%
DR6	ラテン系（北）米人	31.10%
DR7	ラテン系（北）米人	20.20%

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

対立遺伝子	集団	対立遺伝子出現頻度から計算された表現型
DR8	ラテン系（北）米人	18.60%
DR9	ラテン系（北）米人	2.10%
A*24	フィリピン	65%
A*24	ロシアネネツ	61%
A*24	日本	59%
A*24	マレーシア	58%
A*24	フィリピン	54%
A*24	インド	47%
A*24	韓国	40%
A*24	スリランカ	37%
A*24	中国	32%
A*24	インド	29%
A*24	オーストラリア西部	22%
A*24	USA	22%
A*24	ロシアサマラ	20%
A*24	南米	20%
A*24	欧州	18%

10

20

【0191】

MAGEA4 遺伝子

この遺伝子は、MAGEA 遺伝子ファミリーのメンバーである。このファミリーのメンバーは、互いに 50?80% の配列同一性を有するタンパク質をコードする。MAGEA 遺伝子のプロモーターおよび第 1 のエクソンは、かなりの変動性を示し、この遺伝子ファミリーの存在が、異なる転写制御下で同じ機能を発現できるようにすることが示唆される。MAGEA 遺伝子は、染色体位置 Xq28 でクラスター化する。それらは、先天性角化異常症などのいくつかの遺伝性疾患に関与するとされている。同一タンパク質をコードする少なくとも 4 つの変異型が、この遺伝子について判明している。(RefSeq, Jul 2008 によって提供される)。

30

【0192】

MAGEA4 の局在化は、細胞質性として記載されている (Kim et al., 2015)。しかし、MAGEA4 染色はまた核内でも検出されており、高分化度がんと低分化型化がんとの対比では、核と細胞質の間で示差的分布が示された。(Sarcevic et al., 2003)。

【0193】

MAGEA4 は、雄生殖細胞マーカーとして使用される。これは、精原細胞では発現されないが、前精原細胞および成熟胚細胞で発現される (Mitchell et al., 2014)。

40

【0194】

【表 4】

表4：一般的ながん標的

抗原特性	評価
文献に報告される[目的のがん]における過剰発現	
文献に報告されるその他のがんにおける過剰発現	+
記載された起源タンパク質由来標的に対するT細胞応答	+
抗原特性	評価
がん胎児性発現パターン	+
がん幹細胞による発現	(-)
細胞周期進行および腫瘍細胞増殖における役割	(-)
腫瘍浸潤、移動、および転移における関与	
がん関連シグナル伝達経路との関連性 ¹	
抗アポトーシス効果	(-)
血管新生促進効果/新血管新生	
がんの予後不良と関連がある過剰発現	+
進行がんステージに関連する過剰発現	+
一般的ながん標的	
細胞内局在 ²	CY
文献中の起源タンパク質の特性決定 (-、+、++、+++)	+
細胞型関連性 ³	TU

¹TGF=形質転換成長因子；PI3K=ホスファチジルイノシチド3-キナーゼ；p53=細胞性腫瘍抗原 p53；EGFR=上皮成長因子受容体；FGF2=線維芽細胞増殖因子2；Wnt=Wnt/ β -カテニン経路（胚形性）；Ras=ラット肉腫原がん遺伝子；NF- κ B=核因子 κ B（真核生物転写因子）²CY=細胞質；³TU=腫瘍細胞

【0195】

標的としての p M H C

第Ⅰ相臨床試験では、食道がん患者において、HLA-A*24:02に結合したMAGEA4(143-151)に対して反応性のTCR操作自己CTLの養子免疫伝達が調査された。患者には、予備調節治療なしでTCR形質導入リンパ球が1回投与され、それに続いて2週間および4週間後に、MAGEA4ペプチドで皮下免疫化された。おそらくは、リンパ枯渇レジメンおよびIL2の投与の欠如のために、客観的な腫瘍退縮は観察されなかった(Kageyama et al., 2015)。マウスにおける前臨床試験は、移入されたT細胞が、マウスに接種されたMAGEA4発現腫瘍細胞株の増殖を阻害し、さらなるペプチドワクチン接種がこの抗腫瘍活性を増強することを実証した(Shirakura et al., 2012)。

【0196】

EBV陰性ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫の治療選択肢として、養子CTL移入を用いたMAGEA4の標的化が提案されている。EBV由来ペプチドを標的化する注入CTLは、EBV(+)リンパ腫患者において完全な寛解を誘導すると記載されている。したがって、MAGEA4をはじめとするリンパ腫によって発現されるその他の抗原を標的化することは、可能な治療選択肢として調査されている(Cruz et al., 2011; Gerdemann et al., 2011)。

【0197】

いくつかの研究は、重複ペプチド貯留でパルス処理された自己由来抗原提示細胞との培養後における、健常ドナーおよびがん患者からのMAGEA4特異的CD4(+)T細胞

の生成を実証している (Cesson et al., 2011; Gerdemann et al., 2011; Ohkuri et al., 2009)。

【0198】

MAG-003ペプチド、すなわち、K V L E H V V R V (配列番号1)は、MAGE A4 (アミノ酸286~294)のHLA-A*0201拘束性細胞毒性Tリンパ球 (CTL) エピトープである。その内容全体が本明細書に参照により援用される (Jia et al., 2010; Wu et al., 2011)。一態様では、MAG-003は、生体外とHLA-A*0201/Kb遺伝子組換えマウスの双方において、HLA-A*0201-陽性PBMCからペプチド特異的CTLを誘発する。別の態様では、誘導されたCTLは、HLA-A*0201拘束様式で標的細胞を溶解し、MAG-003が、HLA-A*0201拘束性CTLエピトープであり、治療の抗腫瘍ワクチン接種の標的の役割を果たすことが実証され、配列番号39の鎖CDR1、CDR2、およびCDR3を含んでなる。その内容全体が参照により本明細書に援用される (Jia et al., 2010)。

10

【0199】

図1は健常組織およびがんにおける、MAG-003ペプチド提示を示す。結果は、表5に要約される。具体的には、卵巣がん (OC) および非小細胞肺癌 (NSCLC) 由来の腫瘍組織において、それぞれ1細胞あたり約4000コピーおよび2,000コピーの細胞が推定される。

【0200】

【表5】

20

表5: 健常組織およびがんにおけるMAG-003提示。

A*02	サンプル	平均強度	jScore
健常	245中0	---	---
がん	397中14	1.1e+07	0.000
HCC	16中1	2.9e+06	0.000
MEL	3中0	0.0e+00	
OC	20中2	4.0e+07	0.000
pNSCLC	91中11	1.0e+07	0.000

【0201】

30

本明細書のペプチドをコードする遺伝子発現プロファイリング

健常細胞と比較した腫瘍細胞上のTAAの過剰提示または特異的提示は、免疫療法におけるその有用性にとって十分であり、いくつかのペプチドは、それらの起源タンパク質が健常組織にもまた存在するにもかかわらず、腫瘍特異的である。それでもなお、mRNA発現プロファイリングは、免疫療法のためのペプチド標的の選択において、安全性のレベルを高めることができる。特に、アフィニティ成熟TCRなどの安全性リスクが高い治療選択肢では、理想的な標的ペプチドは、腫瘍に特有で健常組織上には見いだされないタンパク質に由来する。

【0202】

RNA起源および調製

40

外科的に除去された組織標本は、告知に基づく同意書が各患者から入手された後に、上述の通り提供された。腫瘍組織標本が手術直後にスナップ凍結され、その後、液体窒素下で乳鉢と乳棒を用いて均質化された。TRI試薬 (独国ダルムシュタットのAmbion) を使用して、これらのサンプルから全RNAが調製され、RNeasy (独国ヒルデンのQIAGEN) による精製がそれに続き; どちらの方法も製造業者のプロトコルに従って実施された。

【0203】

RNAseq実験

腫瘍および健常組織RNAサンプルの遺伝子発現解析は、CeGAT (独国チュービンゲン) によって、次世代配列決定 (RNAseq) によって実施された。配列決定ライブ

50

ラリーは、RNA断片化、cDNA転換、および配列決定アダプターの付加を含む、Illumina HiSeq v4 試薬キットを使用して、販売業者（米国カリフォルニア州サンディエゴのIllumina Inc.）のプロトコルに従って作成される。複数のサンプルに由来するライブラリーは等モル混合され、Illumina HiSeq 2500 配列決定装置上で、製造会社の使用説明書に従って配列決定され、50bpのシングルエンドリードが生成される。処理された読み取りは、STARソフトウェアを使用して、ヒトゲノム（GRCh38）にマッピングされる。発現データは、ensembl 配列データベース（Ensembl77）の注釈に基づいて、RPKM（100万個のマッピングされた読み取り当たりキロベース当たり読み取り、ソフトウェアCufflinksによって作成される）として転写物レベルで、そしてエクソンレベルで（全読み取り、ソフトウェアBedtoolsによって作成される）提供される。エクソン読み取りは、エクソン長さおよびアライメントサイズについて正規化されて、RPKM値が得られる。

【0204】

図2～4に示されるように、MAG-003は、高リスクおよび中リスクの健常組織と比較して、がん組織と精巣などの低リスクの健常組織とにおいて、高度に発現される。

【0205】

表6～8は、様々ながんにおけるMAG-003発現のRNASeqデータ（発現スコア）を示す。

【0206】

【表6】

表6：RNASeqスコア1

腫瘍型	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
BRCA	1.57	1.23	1.23	1.51
CRC	1.65	1.00	1.00	1.76
HCC	12.10	11.98	11.97	6.15
OC	56.60	18.45	18.44	57.74
OSCAR	58.42	3.49	3.49	60.40
PC	12.10	10.78	10.77	4.74
pGB	0.88	0.95	0.95	0.74
pNSCLC	100.83	1.52	1.52	98.57
RCC	0.93	0.95	0.95	0.77
SCLC	56.41	28.32	28.30	152.27

【0207】

【表7】

表7：RNASeqスコア3

腫瘍型	tgScore	exonScore (27242)	exonScore (317034)	exonScore (593984)
BRCA	7.48	5.11	5.11	6.01
CRC	8.35	1.05	1.05	7.90
HCC	123.03	210.33	210.30	42.22
OC	612.59	333.74	333.69	447.29
OSCAR	632.95	47.41	47.40	468.45
PC	122.95	187.07	187.05	31.15
pGB	0.31	0.18	0.18	0.25
pNSCLC	1100.05	10.26	10.25	768.23
RCC	0.78	0.18	0.18	0.43
SCLC	611.00	524.23	524.17	1190.36

【 0 2 0 8 】

【表 8】

表8：腫瘍発現

腫瘍型	tgtumor40	Exontumor40 (27242)	Exontumor40 (317034)	Exontumor40 (593984)
BRCA	0.12	0.04	0.04	0.17
CRC	0.14	0.01	0.01	0.22
HCC	2.05	1.82	1.82	1.18
OC	11.19	3.16	3.16	13.72
OSCAR	10.89	0.42	0.42	13.11
PC	2.09	1.65	1.65	0.89
pGB	0.00	0.00	0.00	0.01
pNSCLC	19.25	0.09	0.09	22.58
RCC	0.01	0.00	0.00	0.01
SCLC	10.18	4.53	4.53	33.35

10

【 0 2 0 9 】

一態様では、本明細書で示されるようなアミノ酸配列から本質的になるペプチドは、非修飾ペプチドと比較して、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅠまたはⅡ分子に結合する能力が、実質的に変化したり悪影響を受けたりすることなく交換される、1つまたは2つの非アンカーアミノ酸を有し得る（アンカーモチーフについては下記を参照されたい）。別の実施形態では、本明細書で示されるようなアミノ酸配列から本質的になるペプチドにおいては、ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅠまたはⅡ分子に結合する能力が非修飾ペプチドと比較して実質的に変化したり悪影響を受けることなく、1つまたは2つのアミノ酸が、それらの保存的交換パートナー（以下を参照されたい）で交換され得る。

20

【 0 2 1 0 】

T C Rとの相互作用に実質的に寄与しないアミノ酸残基は、その組み込みが、T細胞反応性に実質的に影響を及ぼさず、関連MHCとの結合を排除しない、その他のアミノ酸での置換によって修飾され得る。したがって与えられた但し書きを除いて、本発明のペプチドは、与えられたようなアミノ酸配列またはそれらの部分または変異型を含む、任意のペプチド（本発明者らは、その用語にオリゴペプチドまたはポリペプチドを含める）であってもよい。

30

【 0 2 1 1 】

40

50

【表 9】

表9：ペプチドの変異型およびモチーフ

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
配列番号1～24	K	V	L	E	H	V	V	R	V
変異型									L
									A
									I
		L							
		L							L
		L							A
		L							I
		A							
		A							L
		A							A
		A							I
	Y	L							
	Y	L							L
	Y	L							A
	Y	L							I
	Y	A							
	Y	A							L
	Y	A							A
	Y	A							I
	Y								
	Y								L
	Y								A
	Y								I

【0 2 1 2】

一態様では、より長いペプチドもまた、適切であってもよい。MHCクラスIエピトープは、通常は実際のエピトープであるが、プロセッシング中に実際のエピトープを曝露するのに必要なタンパク質分解性切断に実質的に影響を及ぼさない残基である可能性もある。

【0 2 1 3】

一態様では、記載のペプチドは、1、2、3、または4つまでのアミノ酸によって伸長され得て、すなわち、1、2、3、または4つのアミノ酸が、8?11個のアミノ酸の任意の組み合わせのペプチドのどちらかの末端に付加され得る。4：0?0：4の間の側面に位置する残基が好ましい。本明細書による伸長の組み合わせは、表10にある。

【0 2 1 4】

10

20

30

40

50

【表 10】

表10：本明細書のペプチドの伸長の組み合わせ

C末端	N末端
4	0
3	0または1
2	0または1または2
1	0または1または2または3
0	0または1または2または3または4
N末端	C末端
4	0
3	0または1
2	0または1または2
1	0または1または2または3
0	0または1または2または3または4

10

【0215】

伸長／延長のためのアミノ酸は、元のタンパク質配列のペプチドまたは任意のその他のアミノ酸であり得る。伸長を利用して、ペプチドの安定性または溶解度を高め得る。

【0216】

20

したがって本明細書のエピトープは、天然起源腫瘍関連または腫瘍特異的エピトープと同一であってもよく、またはそれらが実質的に同一の抗原活性を有しさえすれば、4つ以下の残基が参照ペプチドと異なるエピトープを含んでもよい。

【0217】

代案の実施形態では、ペプチドは、4つを超えるアミノ酸で、好ましくは最大30アミノ酸の全長まで、片側または両側で伸長される。一態様では、この伸長は、MHCクラスII結合ペプチドをもたらす。MHCクラスIIへの結合は、当該技術分野で公知の方法によって試験される得る。

【0218】

したがって、本明細書は、MHCクラスIIエピトープのペプチドおよび変異型を提供し、ペプチドまたは変異型は、8～100、好ましくは8～30、最も好ましくは8～14、すなわち8、9、10、11、12、13、14アミノ酸の全長を有し、より長いクラスII結合ペプチドの場合、長さはまた、15、16、17、18、19、20、21または22アミノ酸であり得る。

30

【0219】

一態様では、本明細書によるペプチドまたは変異型は、ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIまたはIIの分子に結合する能力を有する。ペプチドまたは変異型のMHC複合体への結合は、当該技術分野で既知の方法によって試験されてもよい。

【0220】

好ましくは、本明細書によるペプチドに特異的なT細胞を置換ペプチドについて試験する場合、置換ペプチドが背景に対して最大溶解増加の半分を達成するペプチド濃度は、約1mM以下、好ましくは約1μM以下、より好ましくは約1nM以下、さらにより好ましくは約100pM以下、最も好ましくは約10pM以下である。置換ペプチドが、2人以上、少なくとも2人、より好ましくは3人の個人からのT細胞によって認識されることもまた好ましい。

40

【0221】

本明細書の用法では、「複合体」という用語は、(例えば、抗原性)決定因子に特異的に結合する分子を指す。一実施形態では、複合体はまた、それが付着する実体(例えば、(第2の)抗原結合部分)を例えば、抗原決定基(例えば本出願書に記載のペプチドとMHCの複合体)を有する特異的腫瘍細胞または腫瘍間質などの型標的部位に誘導できる。

50

別の実施形態では、複合体は、例えば、T細胞受容体複合体抗原などのその標的抗原を通じて、シグナル伝達を活性化できる。複合体としては、抗体およびそれらの断片、抗体重鎖可変領域および抗体軽鎖可変領域を含んでなる抗体の抗原結合ドメイン、少なくとも1つのアンキリンリピートモチーフと単ドメイン抗原結合(SDAB)分子とを含んでなる結合タンパク質、アプタマー、(可溶性)TCR、および同種または自己由来T細胞などの(改変)細胞が挙げられるが、これに限定されるものではない。分子が標的に結合する複合体であるかどうかを評価するために、結合アッセイが実施され得る。

【0222】

「特異的」結合は、特異的標的を保有する細胞を死滅させることができる活性分子を装備した複合体(例えば、TCR)が、特異的標的は有しないがその他のペプチド-MHC複合体を提示する別の細胞を死滅させることができない程度に、複合体がその他の天然ペプチド-MHC-複合体よりもさらに良好に、目的ペプチド-MHC-複合体に結合することを意味する。交差反応性ペプチド-MHCのペプチドが天然に存在せず、すなわち、ヒトHLA-ペプチドームに由来しない場合、その他のペプチド-MHC複合体への結合は無関係である。標的細胞死滅を評価する試験は、当該技術分野で周知である。それらは、非改変ペプチド-MHC提示を有する標的細胞(初代細胞または細胞株)、または天然に存在するペプチド-MHCレベルに達するようにペプチドを負荷された細胞を使用して、実施されるべきである。

10

【0223】

各複合体は標識を含んでなり得て、それは、標識によって提供されるシグナルの存在または不在を判定することで、結合複合体が検出され得ることを提供する。例えば、複合体は、蛍光染料または任意のその他の適用可能な細胞マーカー分子で標識され得る。このようなマーカー分子は、当該技術分野で周知である。例えば、蛍光染料によって提供される蛍光標識は、蛍光またはレーザー走査顕微鏡またはフローサイトメトリーによる、結合アプタマーの視覚化を提供し得る。

20

【0224】

各複合体は、例えば、IL-21、抗-CD3、および抗-CD28などの第2の活性分子にコンジュゲートされ得る。

【0225】

ポリペプチド複合体に関するさらなる情報は、例えば、その内容全体が参照により援用される、国際公開第2014/071978A1号パンフレットの背景セクションに見いだされる。

30

【0226】

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

【0227】

本明細書の医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体中に、少なくとも1つのTCR、可溶性TCR、核酸、および/または本明細書のTCRを発現する宿主細胞もまた含む。

【0228】

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

40

【0229】

この組成物は、皮下、皮内、筋肉内などの非経口投与、または経口投与のために使用される。このためには、ペプチドおよび任意選択的にその他の分子が、薬学的に許容可能な、好ましくは水性担体に溶解され、または懸濁される。さらに組成物は、緩衝液、結合剤、プラスチック剤、希釈剤、香料、潤滑剤などの賦形剤を含有し得る。このような組成物中で使用され得る賦形剤の詳細な一覧は、例えば、A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients (Kibbe, 2000)から採用され得る。組成物は、腺腫様(adenomatous)またはがん性疾患の阻止、予防法および/または治療法のために使用され得る。例示的調合物は、例えば、その

50

内容全体が参照により本明細書に援用される、欧州特許第 2 1 1 2 2 5 3 号明細書にある。

【 0 2 3 0 】

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

10

【 0 2 3 1 】

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

【 0 2 3 2 】

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

20

【 0 2 3 3 】

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

30

【 0 2 3 4 】

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

【 0 2 3 5 】

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

40

【 0 2 3 6 】

末梢 T 細胞に導入された T C R 鎖は、T C R 表面発現に必要である CD 3 複合体との結合について、内因性 T C R 鎖と競合してもよい。高レベルの T C R 表面発現は、標的腫瘍抗原を発現する細胞による始動のための適切な感受性を付与するのに必須であることから (Cooper et al., 2000; Labrecque et al., 2001)、T C R - および T C R - 遺伝子発現レベルを増強する戦略は、T C R 遺伝子治療における重要な考慮事項である。

50

【0237】

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

10

【0238】

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

【0239】

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

20

【0240】

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

【0241】

30

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

【0242】

40

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

【0243】

誤対合を減少させるために、鎖間親和性を高める一方で、導入鎖が内因性TCRと対形成する能力が低下するように、本明細書の導入TCR鎖のC末端領域を修飾してもよい。これらの戦略は、ヒトTCR- およびTCR- のC末端領域をそれらのマウス対応物(マウス化C末端領域)で置換すること; 導入TCRのTCR- およびTCR-

50

- 鎖の双方に第2のシステイン残基を導入することによって、C末端領域に第2の鎖間ジスルフィド結合を生成すること(システイン修飾); TCR - およびTCR - 鎖のC末端領域内の相互作用残基を交換すること(「ノブ・イン・ホール」); TCR - およびTCR - 鎖の可変領域をCD3 に直接融合させること(CD3 融合)を含んでもよい。(Schmitt et al. 2009)。

【0244】

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

【0245】

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

【0246】

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

【0247】

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

【0248】

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

【0249】

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

【0250】

一実施形態では、宿主細胞は、本細書のTCRを発現するように遺伝子操作される。好ましい実施形態では、宿主細胞は、ヒトT細胞またはT細胞前駆体である。いくつかの実施形態では、T細胞またはT細胞前駆体は、がん患者から得られる。その他の実施形態で

10

20

30

40

50

は、T細胞またはT細胞前駆体は、健常ドナーから得られる。本明細書の宿主細胞は、治療される患者に関して、同種異系または自己由来であり得る。一実施形態では、宿主は、
/ TCRを発現するように形質転換された / T細胞である。

【0251】

構成的発現のための典型的な哺乳類細胞ベクタープラスミドは、適切なポリA尾部を有するCMVまたはSV40プロモーター、およびネオマイシンなどの耐性マーカーを含んでなる。一例は、米国ニュージャージー州ピスカタウェイのPharmaciaから入手できるpSVLである。誘導性哺乳類発現ベクターの一例であるpMSGもまた、Pharmaciaから入手できる。有用な酵母プラスミドベクターは、pRS403-406およびpRS413-416であり、通常、米国郵便番号92037カリフォルニア州ラホヤのStratagene Cloning Systemsから入手できる。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405、およびpRS406は、酵母組み込みプラスミド(Yips)であり、酵母の選択可能なマーカーHIS3、TRP1、LEU2、およびURA3が組み込まれている。プラスミドpRS413-416は、酵母セントロメアプラスミド(Ycps)である。CMVプロモーターベースのベクター(例えばSigma-Aldrich製)は、一過性または安定性発現、細胞質内発現または分泌、およびFRAG、3xFLAG、c-mycまたはMATの様々な組み合わせでのN末端またはC末端標識付けを提供する。これらの融合タンパク質は、組換えタンパク質を検出、精製、および分析できるようにする。二重標識融合物は、検出に融通性を与える。

【0252】

強力なヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター調節領域は、COS細胞内で、構成タンパク質発現レベルを1mg/L程度の高さに駆動する。効力がより低い細胞株では、タンパク質レベルは、典型的に約0.1mg/Lである。SV40複製起点の存在は、SV40複製許容COS細胞内で高レベルのDNA複製をもたらす。CMVベクターは、例えば、細菌細胞内のpMB1(pBR322の誘導体)複製起点、細菌におけるアンピシリン耐性選択のためのb-ラクタマーゼ遺伝子、hGHポリA、およびf1起点を含有し得る。ブレブトロリブシンリーダー(PPT)配列を含有するベクターは、抗FRAG抗体、樹脂、およびプレートを使用した精製のために、培養液中へのFRAG融合タンパク質分泌を誘導し得る。多様な宿主細胞と共に使用するためのその他のベクターおよび発現系が、当該技術分野で周知である。

【0253】

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

【0254】

本明細書はまた、本明細書のポリヌクレオチドベクターコンストラクトで形質転換された宿主細胞にも関する。宿主細胞は、原核または真核生物のどちらかであり得る。細菌細胞は、いくつかの状況では、好ましい原核宿主細胞であってもよく、典型的には、例えば、米国メリーランド州ベセスダのBethesda Research Laboratories Inc., から入手できる大腸菌(E. coli)DH5株、および米国メリーランド州ロックビルの米国微生物系統保存機関(ATCC)から入手できるRR1(ATCC番号31343)などの大腸菌(E. coli)株である。好ましい真核宿主細胞としては、酵母、昆虫、および哺乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サルまたはヒトの線維芽細胞株および結腸細胞株に由来するものなどの脊椎動物細胞が挙げられる。酵母宿主細胞としては、米国郵便番号92037カリフォルニア州ラホヤのStratagene Cloning Systemsから一般に入手できる、YPH499、YPH500、およびYPH501が挙げられる。好ましい哺乳類宿主細胞としては、ATCCから

CCL61として入手できるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ATCCからCRL1658として入手できるNIH Swissマウス胚細胞NIH/3T3、ATCCからCRL1650として入手できるサル腎臓由来COS-1細胞、およびヒト胎児由来腎細胞である293細胞が挙げられる。好ましい昆虫細胞は、バキュロウイルス発現ベクターで形質移入され得るSf9細胞である。発現のための適切な宿主細胞の選択に関する概説は、例えば、Paulina BalbasおよびArgelia Lorencの教科書、"Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9、および当業者に知られているその他の文献にある。

10

【0255】

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

20

【0256】

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

【0257】

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

30

【0258】

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

40

【0259】

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

【0260】

別の実施形態では、本明細書のTCR、核酸または発現ベクターは、医療において使用される。例えば、ペプチドまたはその変異型は、静脈内(i.v.)注射、皮下(s.c.)注射、皮内(i.d.)注射、腹腔内(i.p.)注射、筋肉内(i.m.)注射のために調合されてもよい。ペプチド注射の好ましい方法としては、s.c、i.d、i.p、i.m、およびi.v.が挙げられる。DNA注射の好ましい方法としては、i.d

50

、i . m、s . c、i . p、およびi . v . が挙げられる。例えば、50 μ g ~ 1 . 5 mg、好ましくは125 μ g ~ 500 μ gのペプチドまたはDNAの用量が投与されてもよく、それぞれのペプチドまたはDNAに左右される。この範囲の用量は、以前の治験で成功裏に使用された (Walter et al . , 2012)。

【0261】

活性ワクチン接種のために使用されるポリヌクレオチドは、実質的に純粋であってもよく、または適切なベクターまたは送達系に含有されてもよい。核酸は、DNA、cDNA、PNA、RNAまたはそれらの組み合わせであってもよい。このような核酸をデザインして導入する方法は、当該技術分野で周知である。概説は、例えば、Teufel et al . (Teufel et al . , 2005) によって提供される。ポリヌクレオチド 10
ワクチンは調製が容易であるが、免疫応答誘導におけるこれらのベクターの作用機序は、完全には分かっていない。適切なベクターおよび送達系としては、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、または2つ以上のウイルスの構成要素を含有するハイブリッドベースのシステムなどのウイルスDNAおよび/またはRNAが挙げられる。非ウイルス送達系としては、カチオン性脂質およびカチオン性ポリマーが挙げられ、DNA送達技術分野において周知である。「遺伝子銃」などを介した、物理的送達もまた使用されてもよい。核酸によってコードされるペプチド(単数)またはペプチド(複数)は、例えば、上述のように、それぞれの逆CDRのT細胞を刺激する、エピトープとの融合タンパク質であってもよい。

【0262】

本明細書は、アプタマーにさらに関する。アプタマー(例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される、国際公開第2014/191359号パンフレットおよびその中の引用文献を参照されたい)は、定義された三次元構造に折り畳まれて特異的標的構造を認識することができる、短い一本鎖核酸分子である。それらは、標的療法を開発するための適切な代案のようであった。アプタマーは、高い親和性および特異性で、多様な複合体標的と選択的に結合することが示されている。 20

【0263】

細胞表面に位置する分子を認識するアプタマーは、過去10年以内に同定されており、診断および治療的アプローチを開発する手段を提供する。アプタマーは、毒性および免疫原性がほぼ皆無であることが示されているので、それらは生物医学的用途のための有望な候補である。確かに、例えば、前立腺特異的膜抗原認識アプタマーなどのアプタマーは、標的療法のために成功裏に用いられており、異種移植片生体内モデルにおいて機能できることが示されている。さらに、特異的腫瘍細胞株を認識するアプタマーが同定されている。 30

【0264】

DNAアプタマーは、様々ながん細胞、特に固形腫瘍に由来するものに対して広域スペクトル認識特性を示す一方で、非腫瘍発生性および主要健常細胞を認識しないように選択され得る。同定されたアプタマーが、特異的腫瘍サブタイプを認識するだけでなく、むしろ一連の腫瘍と相互作用する場合、これは、アプタマーをいわゆる広域スペクトル診断薬および治療薬として応用可能にする。 40

【0265】

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

【0266】

アプタマーは、診断および治療目的で有用である。一態様では、少なくとも1つまたはそれ以上のアプタマーが腫瘍細胞に取り込まれ、したがってsiRNAなどの抗がん剤の腫瘍細胞への標的化送達のための分子ビヒクルとして機能し得る。

【0267】

アプタマーは、細胞SELEX(試験管内進化法)技術を使用して、細胞および組織などの複合体標的に対して、および本明細書による配列番号25~配列番号26のいずれかに記載の配列とMHC分子とを含んでなり、好ましくはそれからなるペプチド複合体また 50

は T C R などに対して、選択され得る。

【 0 2 6 8 】

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

【 0 2 6 9 】

本明細書は、本明細書による T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、H L A - A * 0 2 陰性健常ドナーに由来する P B M C を A 2 / M A G - 0 0 3 モノマーと共にインキュベートするステップと、P B M C を四量体フィコエリトリン (P E) と共にインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞分類 (F A C S) - C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

10

【 0 2 7 0 】

本明細書は、本明細書による T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、H L A - A * 0 2 陰性健常ドナーに由来する P B M C を A 2 / p 2 8 6 - 1 Y 2 L モノマーと共にインキュベートするステップと、P B M C を四量体フィコエリトリン (P E) と共にインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞分類 (F A C S) - C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

【 0 2 7 1 】

本明細書は、本明細書による T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、H L A - A * 0 2 陰性健常ドナーに由来する P B M C を A 2 / p 2 8 6 - 1 Y 2 L 9 L モノマーと共にインキュベートするステップと、P B M C を四量体フィコエリトリン (P E) と共にインキュベートするステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞分類 (F A C S) - C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

20

【 0 2 7 2 】

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

30

【 0 2 7 3 】

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

【 0 2 7 4 】

40

本明細書は、本明細書に従って T C R を同定し単離する方法にさらに関し、前記方法は、その T 細胞がマウス T C R 欠損を補う多様なヒト T C R レパートリーを発現する、全ヒト T C R 遺伝子遺伝子座 (1 . 1 および 0 . 7 M b) を有する、遺伝子組換えマウスを得るステップと、マウスを p 2 8 6 - 1 Y 2 L 9 L で免疫化するステップと、四量体フィコエリトリン (P E) を有する遺伝子組換えマウスから得られた P B M C を培養するステップと、高結合活性 T 細胞を蛍光活性化細胞選別 (F A C S) C a l i b u r 分析によって単離するステップとを含んでなる。

【 0 2 7 5 】

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

50

【 0 2 7 6 】

本明細書は、本明細書による有効数の T C R、可溶性 T C R および / または T 細胞を患者に投与するステップを含んでなる、その標的細胞が M A G - 0 0 3 を異常に発現する患者において、標的細胞を死滅させる方法にさらに関する。

【 0 2 7 7 】

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

【 0 2 7 8 】

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

【 0 2 7 9 】

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

【 0 2 8 0 】

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

【 0 2 8 1 】

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

【 0 2 8 2 】

本明細書の T C R、核酸、および宿主細胞、そしてその医薬組成物は、当該技術分野で公知であり、治療されるがん型次第で変動してもよい経路によって、それを必要とする対象に投与されてもよい。投与経路としては、例えば、局所投与（腫瘍内など）と、皮下、腹腔内、筋肉内、静脈内、門脈内および肝臓内などの非経口投与とが挙げられる。好ましい実施形態では、本明細書の T C R、核酸または宿主細胞、またはその医薬組成物は、例えば、点滴ポンプおよび / またはカテーテル装置を用いた、固形腫瘍などの治療される部位への局所注入によって、対象に投与される。一実施形態では、本明細書の組成物は、固

10

20

30

40

50

形腫瘍、固形腫瘍に供給する血管、および／または固形腫瘍を取り囲む領域に注入される。

【0283】

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

【0284】

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

10

【0285】

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

20

【0286】

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

【0287】

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

30

【0288】

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

【0289】

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

40

【0290】

本明細書は、小細胞肺がんの診断および／または予後診断において使用され得る、本明細書で「標的」と称される、本明細書によるペプチドベースの特定の標識タンパク質およびバイオマーカーにさらに関する。本明細書はまた、がん治療のためのこれらの新規標的の使用に関する。

【0291】

特異的ペプチド-MHC複合体を認識する可溶性T細胞受容体(sTCR)を生産する方法を提供することもまた、本明細書のさらなる態様である。このような可溶性T細胞受容体は、特異的T細胞クローンから生成され得て、それらの親和性は、相補性決定領域を

50

標的化する変異誘発によって増加され得る。T細胞受容体の選択目的で、ファージディスプレイが利用され得る（米国特許第2010/0113300号明細書、（Liddy et al., 2012））。ファージディスプレイ中に、そして薬剤として実用する際に、T細胞受容体を安定化させる目的で、例えば、非天然ジスルフィド結合、その他の共有結合（一本鎖T細胞受容体）、または二量体化ドメインによって、および鎖を連結させ得る（Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999）。T細胞受容体は、標的細胞上で特定機能を発揮させるために、毒素、薬剤、サイトカイン（例えば、米国特許第2013/0115191号明細書を参照されたい）、抗CD3ドメインのようなエフェクター細胞動員ドメインなどに、連結させ得る。別の態様では、それは養子免疫伝達のために使用されるT細胞内で発現される。例えば、その内容全体が参照により援用される、国際公開第2004/033685A1号パンフレット、国際公開第2004/074322A1号パンフレット、および国際公開第2013/057586A1号パンフレットを参照されたい。

【0292】

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

【0293】

抗体またはTCRはまた、生体内診断アッセイのために使用されてもよい。通常、抗体またはTCRは、腫瘍が位置確認され得るように、免疫シンチグラフィーを使用して、放射性ヌクレオチド（¹¹¹In、⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、³H、³²Pまたは³⁵Sなど）で標識される。一実施形態では、抗体またはそれらの断片は、上述のタンパク質からなる群から選択されるタンパク質の2つ以上の標的の細胞外ドメインに結合し、親和性（K_d）は1×10⁻⁶ M未満である。

【0294】

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

【0295】

本発明は、以下の項目にさらに関する。

【0296】

項目1。

鎖および鎖を含んでなるTCRであって、鎖が配列番号39、配列番号55、および配列番号71のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるTCR可変ドメインを含んでなり；鎖が配列番号47、配列番号63、および配列番号79のいずれかと少なくとも90%同一であるTCR可変ドメインを含んでなり；MAG-003ペプチド-MHC分子複合体に特異的に結合する、TCR。

【0297】

項目 2 .

T C R 定常ドメインが配列番号 3 9、配列番号 5 5、および配列番号 7 1 のいずれかの T C R 定常ドメインと少なくとも 7 0 % 同一であり、定常ドメインが配列番号 4 7、配列番号 6 3、および配列番号 7 9 のいずれかの T C R 定常ドメインと少なくとも 7 0 % 同一である、T C R 定常ドメインおよび T C R 定常ドメインをさらに含んでなる、項目 1 に記載の T C R。

【 0 2 9 8 】

項目 3 .

定常ドメインが 膜貫通ドメイン V I G F R I L L L K V A G F N L L M T L (配列番号 9 7) を含んでなり、定常ドメインが 膜貫通ドメイン T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L (配列番号 8 8) を含んでなる、項目 1 または 2 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 2 9 9 】

項目 4 .

T C R 可変ドメインが配列番号 3 9 のアミノ酸配列からなり；T C R 可変ドメインが配列番号 4 7 のアミノ酸配列からなる、項目 1 ~ 3 のいずれかに記載の T C R。

【 0 3 0 0 】

項目 5 .

T C R 可変ドメインが配列番号 5 5 のアミノ酸配列からなり；T C R 可変ドメインが配列番号 6 3 のアミノ酸配列からなる、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 0 1 】

項目 6 .

T C R 可変ドメインが配列番号 7 1 のアミノ酸配列からなり；T C R 可変ドメインが配列番号 7 9 のアミノ酸配列からなる、項目 1 ~ 3 のいずれかに記載の T C R。

【 0 3 0 2 】

項目 7 .

T C R 定常ドメインが配列番号 3 9 の T C R 定常ドメインからなり、T C R 定常ドメインが配列番号 4 7 の T C R 定常ドメインからなる、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 0 3 】

項目 8 .

T C R 定常ドメインが配列番号 5 5 の T C R 定常ドメインからなり、T C R 定常ドメインが配列番号 6 3 の T C R 定常ドメインからなる、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 0 4 】

項目 9 .

T C R 定常ドメインが配列番号 7 1 の T C R 定常ドメインからなり、T C R 定常ドメインが配列番号 7 9 の T C R 定常ドメインからなる、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 0 5 】

項目 1 0 .

配列番号 3 9 からなる 鎖と、配列番号 4 7 からなる 鎖とを含んでなる、項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 0 6 】

項目 1 1 .

配列番号 5 5 からなる 鎖と、配列番号 6 3 からなる 鎖とを含んでなる、項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 0 7 】

項目 1 2 .

配列番号 7 1 からなる 鎖と、配列番号 7 9 からなる 鎖とを含んでなる、項目 1 ~ 9

10

20

30

40

50

のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 0 8 】

項目 1 3 .

T C R 鎖が配列番号 3 9、配列番号 5 5、および配列番号 7 1 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 からなる群から選択される、少なくとも 1 つの 鎖相補性決定領域 (C D R) を含んでなり ; および / または T C R 鎖が配列番号 4 7、配列番号 6 3、および配列番号 7 9 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 からなる群から選択される、少なくとも 1 つの 鎖相補性決定領域 (C D R) を含んでなる、項目 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 0 9 】

10

項目 1 4 .

T C R 鎖が、配列番号 3 9、配列番号 5 5 または配列番号 7 1 の全ての 3 つ C D R を含んでなる、項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 1 0 】

項目 1 5 .

T C R 鎖が、配列番号 4 7、配列番号 6 3 または配列番号 7 9 の全ての 3 つ C D R を含んでなる、項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 1 1 】

項目 1 6 .

鎖および 鎖が融合して一本鎖 T C R を形成する、項目 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の T C R。

20

【 0 3 1 2 】

項目 1 7 .

鎖および / または 鎖が検出可能な標識を含んでなる、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 1 3 】

項目 1 8 .

検出可能な標識が、放射性核種、フルオロフォア、およびビオチンからなる群から選択される、項目 1 7 に記載の T C R。

【 0 3 1 4 】

30

項目 1 9 .

および / または 鎖が治療効果のある薬剤にコンジュゲートされている、項目 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の T C R。

【 0 3 1 5 】

項目 2 0 .

治療効果のある薬剤が、放射性核種、化学療法剤、および毒素からなる群から選択される、項目 1 9 に記載の T C R。

【 0 3 1 6 】

項目 2 1 .

鎖および 鎖を含んでなる T C R であって、 鎖が配列番号 3 9、配列番号 5 5、および配列番号 7 1 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの相補性決定領域 (C D R) を含んでなり ; および / または T C R 鎖が配列番号 4 7、配列番号 6 3、および配列番号 7 9 の 鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの相補性決定領域 (C D R) を含んでなり ; M A G - 0 0 3 ペプチド - M H C 分子複合体に特異的に結合する、T C R。

40

【 0 3 1 7 】

項目 2 2 .

M A G - 0 0 3 ペプチド - M H C 分子複合体に特異的に結合し、M A G - 0 0 3 ペプチドが配列番号 1 ~ 2 4 からなる群から選択され、M H C 分子が H L A クラス I または H L A クラス I I 分子である、項目 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の T C R。

50

【 0 3 1 8 】

項目 2 3 .

項目 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の T C R の 鎖および / または 鎖、または項目 2 1 に記載の T C R の 鎖および / または 鎖をコードする核酸。

【 0 3 1 9 】

項目 2 4 .

少なくとも 1 つのプロモーター配列に作動可能に連結された、項目 2 3 に記載の核酸を含んでなる発現ベクター。

【 0 3 2 0 】

項目 2 5 .

項目 2 4 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【 0 3 2 1 】

項目 2 6 .

T 細胞または T 細胞前駆細胞である、項目 2 5 に記載の宿主細胞。

【 0 3 2 2 】

項目 2 7 .

T 細胞または T 細胞前駆体がん患者から得られる、項目 2 6 に記載の宿主細胞。

【 0 3 2 3 】

項目 2 8 .

T 細胞または T 細胞前駆体が健常ドナーから得られる、項目 2 6 に記載の宿主細胞。

【 0 3 2 4 】

項目 2 9 .

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R、項目 2 3 に記載の核酸、項目 2 4 に記載の発現ベクター、および / または項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞と ; 薬学的に許容可能な担体と ; 任意選択的に、薬学的に許容可能な賦形剤および / または安定剤とを含んでなる医薬組成物。

【 0 3 2 5 】

項目 3 0 .

T C R の発現を促進するのに適した条件下で、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養するステップを含んでなる、M H C 分子によって提示されると、配列番号 1 のペプチドに特異的に結合する T C R を生成する方法。

【 0 3 2 6 】

項目 3 1 .

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R、項目 2 3 に記載の核酸、項目 2 4 に記載の発現ベクター、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞および / または項目 2 9 に記載の医薬組成物をそれを必要とする対象に投与するステップを含んでなる、がんを治療する方法。

【 0 3 2 7 】

項目 3 2 .

T C R が宿主細胞の表面で発現される、項目 3 1 に記載の方法。

【 0 3 2 8 】

項目 3 3 .

宿主細胞が、T 細胞または T 細胞前駆体からなる群から選択される、項目 3 1 に記載の方法。

【 0 3 2 9 】

項目 3 4 .

T 細胞または T 細胞前駆体が自己由来である、項目 3 3 に記載の方法。

【 0 3 3 0 】

項目 3 5 .

T 細胞または T 細胞前駆体が同種異系である、項目 3 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 3 3 1 】

項目 3 6 .

T C R が治療効果のある薬剤にコンジュゲートされている、項目 3 1 に記載の方法。

【 0 3 3 2 】

項目 3 7 .

治療効果のある薬剤が、放射性核種、化学療法剤、および毒素からなる群から選択される、項目 3 6 に記載の方法。

【 0 3 3 3 】

項目 3 8 .

がんが、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、食道がん、またはそれらの組み合わせである、項目 3 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【 0 3 3 4 】

項目 3 9 .

少なくとも 1 つの化学療法剤を対象に投与することをさらに含んでなる、項目 3 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 3 5 】

項目 4 0 .

放射線療法を対象に施すステップをさらに含んでなる、項目 3 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【 0 3 3 6 】

項目 4 1 .

a) 細胞を前記対象から単離するステップと ;
 b) 項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R をコードするベクターで細胞を形質転換し、形質転換細胞を生成するステップと ;
 c) 形質転換細胞を増殖させて、複数の形質転換細胞を生成するステップと ;
 d) 複数の形質転換細胞を前記対象に投与するステップと
 を含んでなる、それを必要とする対象においてがんを治療する方法。

【 0 3 3 7 】

項目 4 2 .

細胞が、T 細胞または T 細胞前駆体から選択される、項目 4 1 に記載の方法。

30

【 0 3 3 8 】

項目 4 3 .

a) 細胞を健常ドナーから単離するステップと ;
 b) 項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R をコードするベクターで細胞を形質転換し、形質転換細胞を生成するステップと ;
 c) 形質転換細胞を増殖させて、複数の形質転換細胞を生成するステップと ;
 d) 複数の形質転換細胞を前記対象に投与するステップと
 を含んでなる、それを必要とする対象においてがんを治療する方法。

40

【 0 3 3 9 】

項目 4 4 .

細胞が、T 細胞または T 細胞前駆体から選択される、項目 4 3 に記載の方法。

【 0 3 4 0 】

項目 4 5 .

a) 生物学的サンプルを項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R に接触させるステップと、
 b) 生物学的サンプルへの T C R の結合を検出するステップと
 を含んでなる、生物学的サンプル中のがんを検出する方法。

【 0 3 4 1 】

50

項目 4 6 .

T C R が検出可能な標識を含んでなる、項目 4 5 に記載の方法。

【 0 3 4 2 】

項目 4 7 .

検出可能な標識が、放射性核種、フルオロフォア、およびビオチンからなる群から選択される、項目 4 6 に記載の方法。

【 0 3 4 3 】

項目 4 8 .

検出が、生体外、生体内または原位置で実施される、項目 4 5 ~ 4 7 のいずれかに記載の方法。

【 0 3 4 4 】

項目 4 9 .

前記がんが、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、腎細胞、脳がん、胃がん、結腸直腸がん、肝細胞がん、膵臓がん、前立腺がん、白血病、乳がん、メルケル細胞がん、黒色腫、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、胆嚢および胆管がん、食道がん、またはそれらの組み合わせである、項目 4 5 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 4 5 】

項目 5 0 .

T 細胞が / T 細胞である、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【 0 3 4 6 】

項目 5 1 .

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R を発現する有効数の T 細胞、項目 2 3 に記載の核酸、項目 2 4 に記載の発現ベクター、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞、および / または項目 2 9 に記載の医薬組成物を患者に投与するステップを含んでなる、その標的細胞が異常に M A G - 0 0 3 を発現する患者の標的細胞を死滅させる方法。

【 0 3 4 7 】

項目 5 2 .

可溶性 T C R である、項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R 。

【 0 3 4 8 】

項目 5 3 .

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R であって、鎖が配列番号 3 9、配列番号 5 5、および配列番号 7 1 のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一である T C R 可変ドメインを含んでなり；鎖が配列番号 4 7、配列番号 6 3、および配列番号 7 9 のいずれかと少なくとも 9 5 % 同一である T C R 可変ドメインを含んでなり；M A G - 0 0 3 ペプチド - M H C 分子複合体に特異的に結合する、T C R 。

【 0 3 4 9 】

項目 5 4 .

配列番号 3 9、配列番号 5 5 または配列番号 7 1 に対して鎖に少なくとも 1 つの変異を有し；および / または配列番号 4 7、配列番号 6 3、および配列番号 7 9 に対して鎖に少なくとも 1 つの変異を有し；同一ペプチドの非変異 T C R の少なくとも 2 倍である、M A G - 0 0 3 ペプチド - H L A 分子複合体に対する結合親和性および / または結合半減期を有する、項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R 。

【 0 3 5 0 】

項目 5 5 .

配列番号 3 9、配列番号 5 5 または配列番号 7 1 に対して鎖に少なくとも 1 つの変異を有し；および / または配列番号 4 7、配列番号 6 3、および配列番号 7 9 に対して鎖に少なくとも 1 つの変異を有し；非変異 T C R と比較して修飾されたグリコシル化を有する、項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R 。

【 0 3 5 1 】

項目 5 6 .

10

20

30

40

50

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R、項目 2 3 に記載の核酸、項目 2 4 に記載の発現ベクター、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞または項目 2 9 に記載の医薬組成物が、少なくとも 2 4 時間隔てられた少なくとも 2 回の投与で投与される、項目 3 1 ~ 4 4 または 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 5 2 】

項目 5 7 .

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R、項目 2 3 に記載の核酸、項目 2 4 に記載の発現ベクター、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞または項目 2 9 に記載の医薬組成物が、対象に、数日間、数週間または数ヶ月間にわたって投与される、項目 5 6 に記載の方法。

【 0 3 5 3 】

項目 5 8 .

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R、項目 2 3 に記載の核酸、項目 2 4 に記載の発現ベクター、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞または項目 2 9 に記載の医薬組成物が、局所注入によって投与される、項目 5 6 または 5 7 に記載の方法。

【 0 3 5 4 】

項目 5 9 .

局所注入が、注入ポンプおよび / またはカテーテル装置によって投与される、項目 5 8 に記載のいずれかの方法。

【 0 3 5 5 】

項目 6 0 .

前記局所注入が、固形腫瘍、固形腫瘍に供給する血管、および / または固形腫瘍を取り囲む領域への注入である、項目 5 8 または 5 9 に記載の方法。

【 0 3 5 6 】

項目 6 1 .

項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の T C R、項目 2 3 に記載の核酸、項目 2 4 に記載の発現ベクター、項目 2 5 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の宿主細胞または項目 2 9 に記載の医薬組成物が、1 用量当たり約 10^4 ~ 約 10^{10} 個の細胞の用量で投与される、項目 3 1 ~ 4 4、5 1 または 5 6 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 3 5 7 】

項目 6 2 .

配列番号 3 9、配列番号 5 5、および配列番号 7 1 の鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの鎖相補性決定領域 (C D R) ; および / または配列番号 4 7、配列番号 6 3、および配列番号 7 9 の鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つの鎖相補性決定領域 (C D R) を含んでなり ; M A G - 0 0 3 ペプチド - M H C 分子複合体に特異的に結合する、T C R。

【実施例】

【 0 3 5 8 】

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

【 0 3 5 9 】

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

告知に基づく同意を得た後、H L A - A * 0 2 陽性および H L A - A * 0 2 陰性の健常ド

10

20

30

40

50

ナーからのPBM Cを使用した。組換えビオチン化HL A - A 2クラスIモノマーと、MAG - 003を含有するA 2蛍光性四量体をMBL I (マサチューセッツ州ウーバン) から得た。リン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈した抗CD20SAと共に、PBM Cを室温で1時間培養し、洗浄して、ビオチン化A 2/MAG - 003モノマーと共に室温で30分間培養し、洗浄して、24ウェルプレート内の10%ヒトAB血清添加RPM Iに、 3×10^6 細胞/ウェルで播種した。インターロイキン7(IL - 7; R & D systems、ミネソタ州ミネアポリス)を1日目に10ng/mLで添加し、IL - 2(英国ヘアフィールドのChiron)を4日目に10U/mLで添加した。5週間にわたり、細胞を新鮮なPBM Cで毎週再刺激し、応答性細胞と1:1の比で混合して、24ウェルプレートに 3×10^6 /ウェルで播種した。

10

【0360】

高結合活性T細胞を得るために、およそ 10^6 のPBM CをHL A - A 2/MAG - 003四量体フィコエリトリン(PE)(MBL Iから得た)と共に、37°Cで30分間培養し、それに続いて抗CD8イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)/アロフィコシアニン(APC)と共に4°Cで20分間培養し、蛍光活性化細胞分類(FACS) - Calibur分析がそれに続いた。選別は、FACS - Vantage(英国オックスフォード市カウリーのBecton Dickinson)を用いて実施した。ウェル当たり、 2×10^5 の選別された細胞、フィーダーとしての 2×10^6 照射A 2陰性PBM C、 2×10^4 のCD3/CD28ビーズ/mL(ノルウェイ国オスロのDyna1)、およびIL - 2(1000U/mL)を使用して、選別された四量体陽性細胞を24ウェルプレート内で増殖させた。次に、このようにして得られた高結合活性T細胞を使用して、単細胞5'RACE(cDNA末端の迅速増幅)などの当該技術分野で公知の技術を用いてTCRを同定し単離した。次に、非重複TCR DNAをアミノ酸/DNA配列決定について分析し、当該技術分野で周知の方法を用いて発現ベクターにクローニングした。

20

【0361】

実施例2: ヒト - HCまたはヒトTCRについて遺伝子組換えであるマウスの免疫化

MAG - 003を使用して、そのT細胞がマウスTCR欠損を補う多様なヒトTCRレパートリーを発現する、全ヒトTCR 遺伝子座(1.1および0.7Mb)について遺伝子組換えであるマウスを免疫化する(Liet al. 2010)。高親和性T細胞を得るために、遺伝子組換えマウスから得られたPBM Cを四量体フィコエリトリン(PE)と共に培養し、上記のような細胞選別がそれに続く。次に、当該技術分野で記載された方法を使用して、アミノ酸/DNA配列決定および発現ベクターへのクローニングのために、このようにして得られた高結合活性T細胞を使用してTCRを同定し、単離する。

30

【0362】

一態様では、MAG - 003およびその変異型、すなわち、p286 - 1Y2L(2つのアミノ酸置換を有する、配列番号13)およびp286 - 1Y2L9L(3つのアミノ酸置換を有する、配列番号14)は、HL A - A*0201分子に対して強力な結合親和性および安定性を示す。特に、p286 - 1Y2L9Lは、一態様では健常ドナーとHL A - A2.1/Kb遺伝子組換えマウスの双方のPBM Cに由来する標的がん細胞を溶解する、特異的CTLを誘導する能力を示した。例えば、その内容全体が参照により本明細書に援用される(Wuet al. 2011)を参照されたい。

40

【0363】

MHCIまたはII/p286 - 1Y2Lまたはp286 - 1Y2L9L複合体に対する高結合活性を得るために、これらのペプチドは、実施例1および2に記載される方法で使用され得る。次に、当該技術分野で記載された方法を使用して、アミノ酸/DNA配列決定および発現ベクターへのクローニングのために、このようにして得られた高結合活性T細胞を使用してTCRを同定し、単離する。

【0364】

実施例3: TCRのクローニング

TCRのクローニング法は、例えば、前記方法に関してその内容全体が参照により本 明

50

細書に援用される、米国特許第 8,519,100 号明細書に記載されるように、当該技術分野で公知である。制限部位 Nde I をコードする 鎖可変領域配列特異的オリゴヌクレオチド A1 (g g a a t t c c a t a t g a g t c a a c a a g g a g a a g a a g a t c c 配列番号 26)、細菌における発現の効率的な開始のために導入されたメチオニン、および制限部位 Sal I をコードする 鎖定常領域配列特異的オリゴヌクレオチド A2 (t t g t c a g t c g a c t t a g a g t c t c t c a g c t g g t a c a c g 配列番号 27) を使用して、鎖可変領域を増幅した。鎖の場合、制限部位 Nde I をコードする 鎖可変領域配列特異的オリゴヌクレオチド B1 (t c t c t c a t a t g g a t g g t g g a a t t a c t c a a t c c c c a a 配列番号 28)、細菌における発現の効率的な開始のために導入されたメチオニン、および制限部位 Age I をコードする 鎖定常領域配列特異的オリゴヌクレオチド B2 (t a g a a a c c g g t g g c c a g g c a c a c c a g t g t g g c 配列番号 29) を使用して、鎖可変領域を増幅した。

【0365】

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

【0366】

それぞれ腫瘍特異的 TCR - および TCR - 鎖をコードする 3 つの TCR (R20P1H7、R7P1D5、および R10P2G12、表 2 を参照されたい) を健常ドナーの T 細胞から単離し増幅した。健常ドナー由来の細胞は、Walter et al., 2003 に記載の方法に従って、生体外刺激した。標的特異的細胞は、引き続く TCR 単離のために、標的特異的多量体を使用して単細胞ソートした。例えば、Molecular Cloning a laboratory manual fourth edition by Green and Sambrook に記載されるように、標準法によって 5' RACE を通じて TCR 配列を単離した。3 つの TCR は全て、HLA-A2 陽性ドナー由来であった。TCR R20P1H7、R7P1D5、および R10P2G12 の および 可変領域を配列決定した。

【0367】

R20P1H7 TCR 可変ドメインは、配列番号 39 の残基 22 ~ 133 に対応するアミノ酸配列を有することが見いだされた。R20P1H7 TCR 可変ドメインは、配列番号 47 の残基 20 ~ 135 に対応するアミノ酸配列を有することが見いだされた。

【0368】

R7P1D5 TCR 可変ドメインは、配列番号 55 の残基 22 ~ 131 に対応するアミノ酸配列を有する。R7P1D5 TCR 可変ドメインは、配列番号 63 の残基 20 ~ 131 に対応するアミノ酸配列を有する。

【0369】

R10P2G12 TCR 可変ドメインは、配列番号 71 の残基 21 ~ 136 に対応するアミノ酸配列を有する。R10P2G12 TCR 可変ドメインは、配列番号 79 の残基 20 ~ 134 に対応するアミノ酸配列を有する。

【0370】

ファージディスプレイを用いて TCR 変異型のライブラリーを作成し、高親和性変異体を同定し得た。表 2 に記載の TCR から選択された参照 TCR に、(Li et al., (

2005) Nature Biotech 23(3):349-354)に記載されるTCRファージディスプレイおよびスクリーニングを適用し得る。

【0371】

例えば、配列番号39、55、および71の鎖配列の全ての3つのCDR領域；配列番号47、55、および79の鎖配列の全ての3つのCDR領域を変異誘発によって標的化し得て、各CDRライブラリーは別々にパンニングおよびスリーニングする。

【0372】

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

【0373】

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

【0374】

高親和性の可溶性ジスルフィド結合TCRと、TCR変異型、および天然ペプチドKVLHVVRV（配列番号1）HLA-A*02複合体との間の相互作用は、BIAcore法を用いて分析し得る。

【0375】

高親和性TCR変異型はまた、酵母、またはT細胞ディスプレイによって、CDR変異体のライブラリーから選択され得る（Holler et al. 2003; Chervin et al. 2008）。したがって、候補TCR変異型は、TCRのCDRの変異をデザインして、高結合活性のTCR変異型を得るための指針を提供する（Robbins et al. 2008; Zoete et al. 2007）。

【0376】

実施例4：自己T細胞の遺伝子操作

T細胞は、高結合活性TCR（いわゆるTCR療法）、またはMHCI/MAG-003複合体またはMHCI/MAG-003複合体に対する抗原特異性が増強されたタンパク質融合由来キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように、遺伝子操作し得る。一態様では、このアプローチは、中枢および末梢寛容に関連するいくつかの制限を克服し、患者における新生T細胞活性化の必要なしに、腫瘍の標的化においてより効率的なT細胞を生じる。

【0377】

一態様では、本明細書のTCRを発現するT細胞を得るために、実施例1～3に記載されるように同定され単離された腫瘍特異的TCR - および/またはTCR - 鎖をコードする核酸を、レトロウイルスまたはレンチウイルスなどの発現ベクターにクローン化する。組換えウイルスが生成され、次に、抗原特異性および機能性結合活性などの機能について試験される。次に、最終生成物のアリコートを使用して、標的T細胞集団（一般に患者のPBMCから精製される）を形質導入し、それを患者への輸液前に増殖させる。

【0378】

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

【0379】

TCRの特異性および親和性を判定するために、形質転換されたCD8+T細胞を、MAG-003が負荷された標的細胞と、または同種であるが無関係なペプチドRABGA P1L-001（配列番号91）、AXIN1-001（配列番号92）、ANO5-0

10

20

30

40

50

01 (配列番号93)、TPX2-001 (配列番号94)、SYNE3-001 (配列番号95)、MIA3-001 (配列番号96)、HERC4-001 (配列番号97)、PSME2-001 (配列番号98)、HEATR5A-001 (配列番号99)またはCNOT1-003 (配列番号100)または対照ペプチドNYESO1-001 (配列番号101)が負荷された標的細胞と同時インキュベートし、IFN- 放出アッセイがそれに続いた。未負荷標的細胞およびCD8+T細胞単独が、対照の役割を果たした。CD8+T細胞からのIFN- 分泌は、細胞毒性活性を有するT細胞活性化の指標となる。

【0380】

【表11】

表11

TCR番号	TCRコード	ドナー/HLA-A2 (+または-)	IFN γ (pg/ml)	EC50	%MAG-003 TET 陽性原発性 CD8+T細胞	%NYESO1-001 TET陽性原発性 CD8+T細胞
1	R7P1D5	HBC-583/(+)	400~ 1050	約3nM	7.99	0.87
2	R20P1H7	HBC-689/(+)	200~900	約10nM	5.73	0.87
3	R10P2G12	HBC-673/(+)	200~ 1500	約10nM	5.38	0.87

【0381】

図5~7に示されるように、本開示のTCRで形質転換された全ての初代CD8+T細胞は、MAG-003負荷標的細胞との同時インキュベーション後に、無関係のペプチドが負荷された標的細胞で刺激されたもの、および対照よりも、はるかに高レベルのIFN- を放出した。標的ペプチド滴定分析は、約3nM~約10nMの範囲のEC50を示した(表11)。これらの結果は、本発明のTCRが、MHC/MAG-003複合体との特異的相互作用を通じて、例えばIFN- 放出などの細胞毒性T細胞活性を活性化し得ることを示唆する。

【0382】

MHC/MAG-003結合活性化細胞毒性T細胞を検出するための四量体染色技術を用いて、T細胞活性化をさらに確認した。図8および表11に示されるように、MHC/NYESO1-001対照四量体または模擬対照よりも、蛍光標識MHC/MAG-003四量体で、より高い百分率のTCR発現CD8+T細胞が陽性に染色された。対照として、MHC/NYESO1-001複合体に特異的に結合することが知られている1G4TCRなどのTCRで形質転換された初代CD8+T細胞は、NYESO1-001を負荷した標的細胞によって容易に活性化された。TCR1G4の鎖および鎖は、それぞれ配列番号89および90で示される。

1G4鎖(配列番号89): METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTTQIPAALSVPEGENLV
LNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQ
PGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS LIVHPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF
DSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF
PSP ESSCDVKLV EKSFETDTNLN FQNLSVIGFRILL LKVAGFNLLMTLRLWSS

1G4鎖(配列番号90): MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSM
TLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLR
LLSAAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ
KATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA
TFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGV
LSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

MAG-003/MHC複合体に対するTCRの結合モチーフを判定するために、MAG-003ペプチドの9個のアミノ酸のそれぞれでポジショナルアラニンスキャニング分析を実施した。アラニン置換MAG-003ペプチドは、表12に示される。

【 0 3 8 3 】

【表 1 2 】

表12

位置:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MAG-003 (SEQ ID NO:1)	K	V	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A1 (SEQ ID NO:30)	A	V	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A2 (SEQ ID NO:31)	K	A	L	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A3 (SEQ ID NO:32)	K	V	A	E	H	V	V	R	V
MAG-003 A4 (SEQ ID NO:33)	K	V	L	A	H	V	V	R	V
MAG-003 A5 (SEQ ID NO:34)	K	V	L	E	A	V	V	R	V
MAG-003 A6 (SEQ ID NO:35)	K	V	L	E	H	A	V	R	V
MAG-003 A7 (SEQ ID NO:36)	K	V	L	E	H	V	A	R	V
MAG-003 A8 (SEQ ID NO:37)	K	V	L	E	H	V	V	A	V
MAG-003 A9 (SEQ ID NO:38)	K	V	L	E	H	V	V	R	A

10

【 0 3 8 4 】

目的の T C R をコードする R N A で電気穿孔された C D 8 + T 細胞を、M A G - 0 0 3、M A G - 0 0 3 - A 1 ~ M A G - 0 0 3 - A 9、または無関係の N Y E S O 1 - 0 0 1 ペプチドが負荷された標的細胞と共に同時インキュベートし、上記のような I F N 放出アッセイがそれに続いた。

20

【 0 3 8 5 】

ポジショナルアラニンスキャニング分析の結果は、図 9 ~ 1 1 に示され、表 1 3 に要約される。

【 0 3 8 6 】

【表 1 3 】

表13

TCR	TCR結合を可能にするMAG-003位置
R7P1D5	1、3、5、7、8
R20P1H7	1、3、4、5、7、8
R10P2G12	1、2、3、4、5、8

30

【 0 3 8 7 】

同一モチーフを有する A * 0 2 結合ペプチドのゲノムワイドスクリーニングは、それぞれ T C R R 2 0 P 1 H 7、R 7 P 1 D 5、および R 1 0 P 2 G 1 2 に対して、潜在的に交差反応性のペプチドがないことを明らかにした。これらの結果は、本明細書に記載される T C R が、オフターゲット効果のリスクが低下した、非常に特異的な認識パターンを示すことを示唆する。

【 0 3 8 8 】

本明細書に記載の T C R を発現する T 細胞の有効性を判定するために、T C R R 7 P 1 D 5、R 2 0 P 1 H 7、および R 1 0 P 2 G 1 2 の R N A で電気穿孔された初代 C D 8 + T 細胞を、例えば A - 3 7 5 (H L A - A 2 および M A G - 0 0 3 発現に対して陽性である黒色腫細胞株)、T 9 8 G (H L A - A 2 陽性および M A G - 0 0 3 陰性であるヒト神経膠芽腫)、および S K - B R - 3 (H L A - A 2 陰性および M A G - 0 0 3 陰性であるヒト乳がん細胞株)などの異なるヒトがん細胞株と共に同時インキュベートし、I F N 放出アッセイがそれに続いた。

40

【 0 3 8 9 】

図 1 2 A ~ C に示されるように、I F N 放出は、H L A - A 2 陽性および M A G - 0 0 3 陽性の A - 3 7 5 細胞で観察されたが、エフェクター細胞単独対照と同等の I F N 放出の基礎レベルを有する T 9 8 G および S K - B R - 3 細胞では観察されなかった。さらに、T C R R 7 P 1 D 5 で形質転換された C D 8 + T 細胞もまた、ヒト非小細胞がん

50

細胞株 H 1 7 5 5 と同時インキュベートすると I F N 放出が増加したが、対照では増加しなかった（データ未掲載）。これらの結果は、T C R R 7 P 1 D 5、R 2 0 P 1 H 7、および R 1 0 P 2 G 1 2 を発現する T 細胞が、H L A - A 2 / M A G - 0 0 3 特異的様式でがん細胞を標的化する細胞毒性活性を特異的に誘導し得ることを示す。

【 0 3 9 0 】

本発明は、がん / 腫瘍、好ましくは M A G - 0 0 3 を過剰にまたは排他的に提示する、黒色腫および非小細胞肺がんの治療に有用な T C R を提供する。

【 0 3 9 1 】

実施例 5：同種異系 T 細胞の遺伝子操作

病原体に対する防御の第一線に関与する非従来の T リンパ球エフェクターであるガンマデルタ（ $\gamma\delta$ ）細胞は、受容体、特に、T C R - および T C R - 鎖を活性化することで、M H C 非依存的様式で腫瘍細胞と相互作用して、腫瘍細胞を根絶し得る。これらの T 細胞は、活性化に際して、迅速なサイトカイン産生（I F N - 、T N F - ）および強力な細胞毒性応答細胞傷害性応を可能にする前活性化表現型を示す。これらの T 細胞は多くのがんに対して抗腫瘍活性を有し、T 細胞媒介免疫療法が実行可能であり、客観的な腫瘍応答を誘導し得ることが示唆される。（B r a z a e t a l . 2 0 1 3 ）。

【 0 3 9 2 】

固定化抗原、作動性モノクローナル抗体（m A b）、腫瘍由来人工抗原提示細胞（a A P C）、または活性化 m A b と a A P C の組み合わせを用いる近年の進歩は、オリゴクローナルまたはポリクローナル T C R レパートリーありまたはなしで、T 細胞を増殖させるのに成功している。例えば、固定化主要組織適合性複合体クラス I 鎖関連 A は、T C R 1 アイソタイプを発現する T 細胞に対する刺激であり、プレート結合活性化抗体は、生体外で V 1 および V 2 細胞を増殖させた。臨床的に十分な量の T C R 1、T C R 2、および T C R 1 n e g T C R 2 n e g は、a A P C 上での同時培養に続いて生成し、これらのサブセットは、記憶表現型および生体外および生体内での腫瘍に対する反応性の差異を示した。（D e n i g e r e t a l . 2 0 1 4 ）。

【 0 3 9 3 】

さらに、T 細胞は、T C R - 鎖および T C R - 鎖の導入によって証明されるように、遺伝子修飾に適している。（H i a s a e t a l . 2 0 0 9 ）。本明細書の別の態様は、M A G - 0 0 3 に結合する T C R - および T C R - を発現する T 細胞の生成に関する。これを行うために、T 細胞を D e n i g e r e t a l . 2 0 1 4 にによって記載される方法によって増殖させ、（実施例 3 に記載されるような）M A G - 0 0 3 に結合する T C R を発現する組換えウイルスを、増殖させた T 細胞に形質導入することがそれに続いた。次に、ウイルス形質導入 T 細胞を患者に輸液する。

【 0 3 9 4 】

実施例 6：M A G - 0 0 3 特異的 T C R の安全性

それぞれ腫瘍特異的 T C R - および T C R - 鎖をコードする 3 つの M A G - 0 0 3 特異的 T C R（R 7 P 1 D 5、R 1 0 P 2 G 1 2、R 2 0 P 1 H 7、表 2 を参照されたい）を健常ドナーの T 細胞から単離し増幅した。健常ドナーからの細胞を、以前記載された方法（W a l t e r e t a l . , 2 0 0 3 J I m m u n o l . , N o v 1 5 ; 1 7 1 (1 0) : 4 9 7 4 - 8 ）に従って生体外刺激し、H L A - A * 0 2 多量体を用いて標的特異的細胞を単細胞ソートし、次に引き続く T C R 単離のために使用した。例えば、M o l e c u l a r C l o n i n g a l a b o r a t o r y m a n u a l f o u r t h e d i t i o n b y G r e e n a n d S a m b r o o k に記載されるように、標準法によって 5 ' R A C E を通じて T C R 配列を単離した。T C R R 7 P 1 D 5、R 1 0 P 2 G 1 2、および R 2 0 P 1 H 7 の および 可変領域を配列決定し、さらなる機能特性解析のためにクローン化した。T C R R 7 P 1 D 5、R 1 0 P 2 G 1 2 および R 2 0 P 1 H 7 は、H L A - A * 0 2 陽性ドナーに由来する。

【 0 3 9 5 】

【表 1 4】

標的細胞型

細胞型	略号	起源
正常ヒト皮膚線維芽細胞	NHDF	初代細胞
ヒト冠動脈平滑筋細胞	HCASMC	初代細胞
ヒト気管支平滑筋細胞	HBSMC	初代細胞
ヒト腎臓上皮細胞	HREpC	初代細胞
ヒト心筋細胞	HCM	初代細胞
ヒト心臓微小血管内皮細胞	HCMEC	初代細胞
ヒト肝実質細胞	HH	初代細胞
ヒト星状細胞	HA	初代細胞
ヒト神経周囲細胞	HPC	初代細胞
ヒト髄膜細胞	HMC	初代細胞
ヒトニューロン	HN	iPSC由来細胞

10

20

【0396】

目的のTCRを、RNA電気穿孔を通じてヒトT細胞内で発現させ、異なるペプチドを負荷したT2細胞、ならびに腫瘍細胞株および健常組織由来の初代細胞などの異なる標的細胞との同時培養の後に、T細胞をIFN-放出について評価した。T細胞活性化データは、以下に示すように絶対IFN-レベルでまたは正規化様式で示される。

【0397】

TCR R7P1D5、R10P2G12およびR20P1H7を発現するCD8+T細胞の有効性は、標的細胞として異なる腫瘍細胞株を用いるT細胞活性化試験(IFN-放出)によって判定した。目的のTCRの安全性プロファイルの特徴づけは、健常組織由来の単離された原発性細胞型およびA*02陽性ドナー由来のHLA-I由来の多能性幹細胞(iPSC)誘導性細胞型との同時培養における、TCR発現T細胞の潜在的活性化を試験することによってアプローチした。(表13)。細胞型は、例えば脳、心臓、および肝臓などの重要な器官の大部分と、上皮、内皮または平滑筋などの様々な細胞型とをカバーするように選択された。腫瘍細胞株を陽性および陰性対照と並べて分析した。

30

【0398】

IFN-放出を正規化する方法:

$Meannorm(TCROI; co) = [平均(TCROI; co) - 平均(TCROI; エフェクター単独)] - [平均(模擬; co) - 平均(模擬; エフェクター単独)]$
それぞれのCVnormを計算した:

40

$CVnorm(TCROI; co) = [CV(TCROI; co)^2 + CV(TCROI; エフェクター単独)^2 + CV(模擬; co)^2 + CV(模擬; エフェクター単独)^2]^{1/2}$

TCROI = 目的のTCRを発現するエフェクター細胞

模擬 = 外因性TCR発現のないエフェクター細胞

Co = 標的細胞と共培養されたエフェクター細胞

エフェクター単独 = 共培養されないエフェクター細胞

平均(norm) = 平均IFN-放出(正規化された)

CV(norm) = 変動係数(正規化された)

50

結果：

T C R R 7 P 1 D 5、R 1 0 P 2 G 1 2またはR 2 0 P 1 H 7を発現するC D 8 + T細胞では、健常組織由来のH L A - A * 0 2 陽性細胞型との共培養で時に活性化は観察されなかった（図 1 3を参照されたい）一方で、M A G - 0 0 3 ペプチドの供給源遺伝子としてH L A - A * 0 2 およびM A G E A 4を発現する腫瘍細胞株A - 3 7 5 およびN C I - H 1 7 5 5 に対する活性があった。同様の反応性パターンがN Y E S O 1 特異的T C R 1 G 4を発現するC D 8 + T細胞で観察され、これはN Y E S O 1 発現H L A - A * 0 2 陽性腫瘍細胞株に対して反応性であるが、健常組織細胞の示されたパネルには反応しないことが判明した。

【 0 3 9 9 】

H L A - A * 0 2 およびM A G E A 4を発現する細胞株との同時培養時におけるT細胞活性化は、T C R R 7 P 1 D 5、R 1 0 P 2 G 1 2、およびR 2 0 P 1 H 7による内因性に発現されプロセスされた標的p H L Aの認識を反映する。

【 0 4 0 0 】

安全性分析は、健常組織初代細胞に対するT C R R 7 P 1 D 5、R 1 0 P 2 G 1 2 およびR 2 0 P 1 H 7の予期されない交差反応性または潜在的なアロ反応性の欠如を示唆する。これは、試験された初代細胞型が、H L A - A * 0 2 の文脈で数千の正常なH L A リガンドに相当し、正常細胞型毎に変動する追加的な同種異系H L A 対立遺伝子に相当する可能性が高いため、注目に値する。

【 0 4 0 1 】

実施例 7：本発明のT C Rのレンチウイルス発現
T細胞産物は、小規模なA C T e n g i n e 製造プロセスに続いて、健常ドナーから単離されたバルク全末梢血単核細胞（P B M C）から出発して生成された。A C T e n g i n e T細胞を製造するための本発明のR 7 P 1 D 5 T C Rを発現するレンチウイルスベクター骨格は、以前の研究および複数の臨床試験に基づいてデザインされた（P o r t e r e t a l . , 2 0 1 1 ; K a l o s e t a l . , 2 0 1 1 ; その他）。簡潔に述べると、解凍し休ませたP B M CをC D 3 / C D 2 8 抗体で活性化し、鎖および鎖の異なる配向を有するR 7 P 1 D 5 T C R 導入遺伝子と、プロモーターおよびエンハンサー配列の様々な組み合わせとを保有する種々のレンチウイルスベクターを用いて生成された濃縮ウイルス上清で、形質導入した（コンストラクトはR 7 1 - R 7 8 と表記される）。8つのコンストラクト（R 7 4、R 7 5）のうち2つは、低い力価および/または低い生産性のために排除された。残りの6つのウイルス上清で形質導入された細胞を増殖させ、フローサイトメトリーによって導入遺伝子発現について評価した。

【 0 4 0 2 】

配向は以下のとおりであった： - : R 7 1、R 7 2、7 5、7 6 ; - : R 7 3、R 7 4、R 7 7、7 8、I G 4。

【 0 4 0 3 】

全てのT細胞産物は、同等の生存度、リンパ球ならびにC D 3 + T細胞のパーセンテージを示した。C D 4 + およびC D 8 + T細胞の百分率は、ドナー間で異なった。6つのウイルス上清の全てにおいて、毒性に関して差は認められなかった。R 7 P 1 D 5 T C R レンチウイルスコンストラクトR 7 3は、四量体結合によって表面で検出される、より高いT C R 発現を一貫して誘導した。導入遺伝子発現に基づいて、レンチウイルスコンストラクトは、次の順序に従う：R 7 3 > R 7 8 > R 7 7 > R 7 1 > R 7 6 > R 7 2（図 1 4）。

【 0 4 0 4 】

R 7 P 1 D 5 T C R R 7 3 ウイルスの形質導入性を確認するために、2人の新規ドナーを用いた追加的な実験を行った。全ての実験からの形質導入細胞を、サイトカイン放出および死滅アッセイにおける機能評価について試験した。試験された全てのドナーにおいて、4人のドナーの全P B M Cに由来するR 7 3 形質導入T細胞は、非形質導入T細胞と比較して、M A G E - A 4 抗原を発現するA 3 7 5 細胞と共培養すると有意に高いI F N

10

20

30

40

50

産生を示した(図15A)。IFN 応答は、MAGE-A4発現を欠くMCF-7細胞の存在下における誘導がバックグラウンドレベル未満であったため、厳密に抗原特異的であった。さらに、MAG-003ペプチドの濃度の減少に応答して検出されたIFN量を表すT2滴定曲線に由来するEC50値は、双方のドナーにおいて10.0nMであった(図15B)。

【0405】

サイトカイン放出に加えて、R7P1D5 TCR(R73ウイルス)形質導入T細胞産物を4時間Cr51放出死滅アッセイで試験した。内因的にプロセスされたMAG-003ペプチドを提示する、MAGE-A4A375腫瘍細胞の認識および溶解を評価した。R73形質導入T細胞は、全てのE:T比で、非形質導入細胞よりも増加した殺傷率を示した(図16A、B)。MAGE-A4標的で観察された溶解百分率は、MAGEA-A4陰性標的細胞で観察されたパーセンテージよりも有意に高かったので(図16C)、R73形質導入細胞で見られた細胞毒性効果は、抗原特異的様式で媒介された。

【0406】

参考文献一覧

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

Alves PM, Levy N, Bouzourene H, Viatte S, Bricard G, Ayyoub M, Vuilleumier H, Givel JC, Halkic N, Speiser DE, Romero P, Levy F (2007). Molecular and immunological evaluation of the expression of cancer/testis gene products in human colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 839-847.

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

Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De ME, Spagnoli GC, Chomez P, De BO, Jegou B, Samson M (2001). MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92, 2778-2785.

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

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

Bergeron A, Picard V, LaRue H, Harel F, Hovington H, Lacombe L, Fradet Y (2009). High frequency of MAGE-A4 and MAGE-A9 expression in high-risk bladder cancer. *Int. J Cancer* 125, 1365-1371.

Bhan S, Chuang A, Negi SS, Glazer CA, Califano JA (2012). MAGEA4 induces growth in normal oral keratinocytes by inhibiting growth arrest and apoptosis. *Oncol Rep.* 28, 1498-1502.

Bode PK, Thielken A, Brandt S, Barghorn A, Lohe B, Knuth A, Moch H (2014). Cancer testis antigen expression in testicular germ cell tumorigenesis. *Mod. Pathol.* 27, 899-905.

Cabazon T, Gromova I, Gromov P, Serizawa R, Timmermans W, V, Kroman N, Celis JE, Moreira JM (2013). Proteomic profiling of triple-negative breast carcinomas in combination with a three-tier orthogonal technology approach identifies MAGE-A4 as potential therapeutic target in estrogen receptor negative breast

10

20

30

40

50

ast cancer. *Mol. Cell Proteomics*. 12, 381-394.

Cesson V, Rivals JP, Escher A, Piotet E, Thielemans K, Posevitz V, Dojcinovic D, Monnier P, Speiser D, Bron L, Romero P (2011). MAGE-A3 and MAGE-A4 specific CD4(+) T-cells in head and neck cancer patients: detection of naturally acquired responses and identification of new epitopes. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 23-35.

Chambost H, Van BN, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000). Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95, 3530-3533.

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

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

Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM (2011). Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting up-regulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res* 17, 7058-7066.

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

Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnajatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K (2014). Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS ONE*. 9, e104099.

Duffour MT, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P (1999). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29, 3329-3337.

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

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

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

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

Hartmann S, Meyer TJ, Brands RC, Haubitz IR, Linz C, Seher A, Kubler AC, Muller-Richter UD (2015). MAGE-A expression clusters and antineoplastic treatment in head and neck cancer. *Int. J. Mol. Med.* 35, 1675-1682.

10

20

30

40

50

- Hussein YM, Morad FE, Gameel MA, Emam WA, El Sawy WH, El Tarhouny SA, Bayomy ES, Raafat N (2012). MAGE-4 gene m-RNA and TGF in blood as potential biochemical markers for HCC in HCV-infected patients. *Med. Oncol* 29, 3055-3062.
- Jacobs JF, Grauer OM, Brasseur F, Hoogerbrugge PM, Wesseling P, Gidding CE, van de Rakt MW, Figdor CG, Coulie PG, de Vries IJ, Adema GJ (2008). Selective cancer-germline gene expression in pediatric brain tumors. *J Neurooncol.* 88, 273-280.
- Jia ZC, Ni B, Huang ZM, Tian Y, Tang J, Wang JX, Fu XL, Wu YZ (2010). Identification of two novel HLA-A*0201-restricted CTL epitopes derived from MAGE-A4. *Clin Dev. Immunol.* 2010, 567594. 10
- Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kikokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.*
- Kang J, Lee HJ, Kim J, Lee JJ, Maeng LS (2015). Dysregulation of X chromosome inactivation in high grade ovarian serous adenocarcinoma. *PLoS. ONE.* 10, e0118927.
- Kawagoe H, Yamada A, Matsumoto H, Ito M, Ushijima K, Nishida T, Yakushiji M, Itoh K (2000). Serum MAGE-4 protein in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol* 76, 336-339. 20
- Kim K, Cho YM, Park BH, Lee JL, Ro JY, Go H, Shim JW (2015). Histological and immunohistochemical markers for progression prediction in transurethrally resected high-grade non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 743-750.
- Kobayashi T, Lonchay C, Colau D, Demotte N, Boon T, van der Bruggen P (2003). New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* 62, 426-432.
- Kocher T, Zheng M, Bolli M, Simon R, Forster T, Schultz-Thater E, Remmel E, Noppen C, Schmid U, Ackermann D, Mihatsch MJ, Gasser T, Heberer M, Sauter G, Spagnoli GC (2002). Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder: a tissue microarray study. *Int. J Cancer* 100, 702-705. 30
- Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M (2004). Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int. J Cancer* 109, 568-575.
- Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T (1997). Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res* 17, 3559-3563. 40
- Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J (2005). Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin Cancer Res* 11, 1809-1814.
- Lifantseva N, Koltsova A, Krylova T, Yakovleva T, Poljanskaya G, Gordeeva O (2011). Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. *Stem Cells Int.* 2011, 795239.
- Luftl M, Schuler G, Jungbluth AA (2004). Melanoma or not? Cancer testis anti 50

gens may help. *Br. J Dermatol.* 151, 1213-1218.

Melo DH, Mamede RC, Neder L, Saggioro FP, Figueiredo DL, da Silva WAJ, Jungbluth AA, Zago MA (2011). Expression of MAGE-A4 and MAGE-C1 tumor-associated antigen in benign and malignant thyroid diseases. *Head Neck* 33, 1426-1432.

Mischo A, Kubuschok B, Ertan K, Preuss KD, Romeike B, Regitz E, Schormann C, de BD, Wadler A, Neumann F, Schmidt W, Renner C, Pfreundschuh M (2006). Prospective study on the expression of cancer testis genes and antibody responses in 100 consecutive patients with primary breast cancer. *Int. J Cancer* 118, 696-703.

Mitchell RT, Camacho-Moll E, MacDonald J, Anderson RA, Kelnar CJ, O'Donnell M, Sharpe RM, Smith LB, Grigor KM, Wallace WH, Stoop H, Wolffenbuttel KP, Donat R, Saunders PT, Looijenga LH (2014). Intratubular germ cell neoplasia of the human testis: heterogeneous protein expression and relation to invasive potential. *Mod. Pathol.* 27, 1255-1266.

Miyahara Y, Naota H, Wang L, Hiasa A, Goto M, Watanabe M, Kitano S, Okumura S, Takemitsu T, Yuta A, Majima Y, Lemonnier FA, Boon T, Shiku H (2005). Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11, 5581-5589.

Montoro JR, Mamede RC, Neder SL, Saggioro FP, Figueiredo DL, Silva WA, Jr., Jungbluth AA, Spagnoli GC, Zago MA (2012). Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 34, 1123-1128.

Nagao T, Higashitsuji H, Nonoguchi K, Sakurai T, Dawson S, Mayer RJ, Itoh K, Fujita J (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* 278, 10668-10674.

Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, Hiasa A, Kitano S, Takahashi T, Yuta A, Majima Y, Shiku H (2006). Generation of peptide-specific CD8⁺ T-cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4⁺ T-cells. *J Immunol. Methods* 314, 54-66.

Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S (2012). Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 119, 3097-3104.

Oba-Shinjo SM, Caballero OL, Jungbluth AA, Rosenberg S, Old LJ, Simpson AJ, Marie SK (2008). Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma. *Cancer Immun.* 8, 7.

Ohkuri T, Wakita D, Chamoto K, Togashi Y, Kitamura H, Nishimura T (2009). Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J Cancer* 100, 1135-1143.

Ottaviani S, Colau D, van der Bruggen P, van der Bruggen P (2006). A new MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A24 carcinoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 867-872.

Otte M, Zafrakas M, Riethdorf L, Pichlmeier U, Loning T, Janicke F, Pantel K (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 61, 6682-6687.

Peikert T, Specks U, Farver C, Erzurum SC, Comhair SA (2006). Melanoma antigen A4 is expressed in non-small cell lung cancers and promotes apoptosis. *Cancer Res* 66, 4693-4700.

Peng JR, Chen HS, Mou DC, Cao J, Cong X, Qin LL, Wei L, Leng XS, Wang Y, Ch

10

20

30

40

50

en WF (2005). Expression of cancer/testis (CT) antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Lett.* 219, 223-232.

Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D (2008). Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int. J. Cancer* 123, 1551-1555.

Prasad ML, Jungbluth AA, Patel SG, Iversen K, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head Neck* 26, 1053-1057.

Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F (1997). Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* 17, 387-391.

Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.

Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S (1997). *MHC Ligands and Peptide Motifs*. (Heidelberg, Germany: Springer-Verlag).

Resnick MB, Sabo E, Kondratiev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J. Cancer* 101, 190-195.

Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J (2005). Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to -A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int. J. Oncol.* 26, 817-824.

Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y (2014). High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine* 32, 5901-5907.

Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, Nagao T, Nonoguchi K, Chiba T, Fujita J (2004). A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells. *J. Biol. Chem.* 279, 15505-15514.

Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A (2003). Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncology* 64, 443-449.

Schirmer U, Fiegl H, Pfeifer M, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Bode PK, Tischler V, Altevogt P (2013). Epigenetic regulation of L1CAM in endometrial carcinoma: comparison to cancer-testis (CT-X) antigens. *BMC. Cancer* 13, 156.

Shafer JA, Cruz CR, Leen AM, Ku S, Lu A, Rousseau A, Heslop HE, Rooney CM, Bollard CM, Foster AE (2010). Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can target chemoresistant side-population tumor cells in Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 51, 870-880.

Sharma P, Shen Y, Wen S, Bajorin DF, Reuter VE, Old LJ, Jungbluth AA (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 5442-5447.

Shichijo S, Hoshino T, Koufuji K, Hayashi A, Kawamoto M, Kikuchi M, Higuchi T, Ichiki M, Oizumi K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in sera of lung cancer patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 88, 414-419.

Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Mizukami M, So T, Ichi

10

20

30

40

50

ki Y, Yasuda M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K (2010). Clinical significance of cancer/testis antigens expression in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 68, 105-110.

Shirakura Y, Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H (2012). T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gamma null mice. *Cancer Sci.* 103, 17-25.

Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y (2013). Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol. Clin Oncol* 1, 326-330.

Su C, Xu Y, Li X, Ren S, Zhao C, Hou L, Ye Z, Zhou C (2015). Predictive and prognostic effect of CD133 and cancer-testis antigens in stage Ib-III A non-small cell lung cancer. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 5509-5518.

Takahashi N, Ohkuri T, Homma S, Ohtake J, Wakita D, Togashi Y, Kitamura H, Todo S, Nishimura T (2012). First clinical trial of cancer vaccine therapy with artificially synthesized helper/killer-hybrid epitope long peptide of MAGE-A4 cancer antigen. *Cancer Sci.* 103, 150-153.

Tanaka F, Mori M, Li J, Fujie T, Mimori K, Haraguchi M, Tanaka Y, Mafune K, Akiyoshi T (1997). High frequency of the expression of the MAGE gene family in human esophageal carcinoma. *Int. J Oncol* 10, 1113-1117.

Tsuzurahara S, Sata M, Iwamoto O, Shichijo S, Kojiro M, Tanikawa K, Itoh K (1997). Detection of MAGE-4 protein in the sera of patients with hepatitis-C virus-associated hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Jpn. J Cancer Res* 88, 915-918.

Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G, Wernet D, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S. (2003). Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol.* 171(10), 4974-8

Wang M, Li J, Wang L, Chen X, Zhang Z, Yue D, Ping Y, Shi X, Huang L, Zhang T, Yang L, Zhao Y, Ma X, Li D, Fan Z, Zhao L, Tang Z, Zhai W, Zhang B, Zhang Y (2015). Combined cancer testis antigens enhanced prediction accuracy for prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J Clin Exp. Pathol.* 8, 3513-3528.

Wu ZY, Gao YF, Wu YH, Liu W, Sun M, Zhai MX, Qi YM, Ye Y (2011). Identification of a novel CD8+ T-cell epitope derived from cancer-testis antigen MAGE-4 in esophageal carcinoma. *Scand. J Immunol.* 74, 561-567.

Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* 9, 6453-6460.

Yamada R, Takahashi A, Torigoe T, Morita R, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Kubo T, Watarai K, Kondo T, Hirohashi Y, Sato N (2013). Preferential expression of cancer/testis genes in cancer stem-like cells: proposal of a novel subcategory, cancer/testis/stem gene. *Tissue Antigens* 81, 428-434.

Yoshida N, Abe H, Ohkuri T, Wakita D, Sato M, Noguchi D, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Ikeda H, Nishimura T (2006). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens and T-cell infiltration in non-small cell lung carcinoma and their prognostic significance. *Int. J Oncol* 28, 1089-1098.

Zhang Y, Stroobant V, Russo V, Boon T, van der Bruggen P (2002). A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371.

10

20

30

40

50

Zimmermann AK, Imig J, Klar A, Renner C, Korold D, Fink D, Stadlmann S, Singer G, Knuth A, Moch H, Caduff R (2013). Expression of MAGE-C1/CT7 and selected cancer/testis antigens in ovarian borderlinetumours and primary and recurrent ovarian carcinomas. Virchows Arch. 462, 565-574.

【図面】

【図 1】

【図 2】

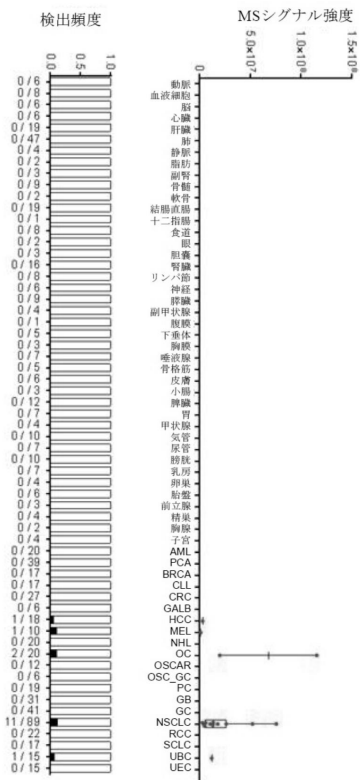


図 1

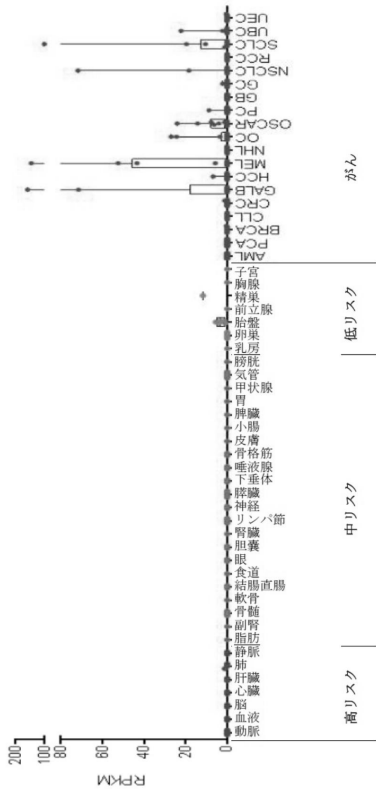


図 2

10

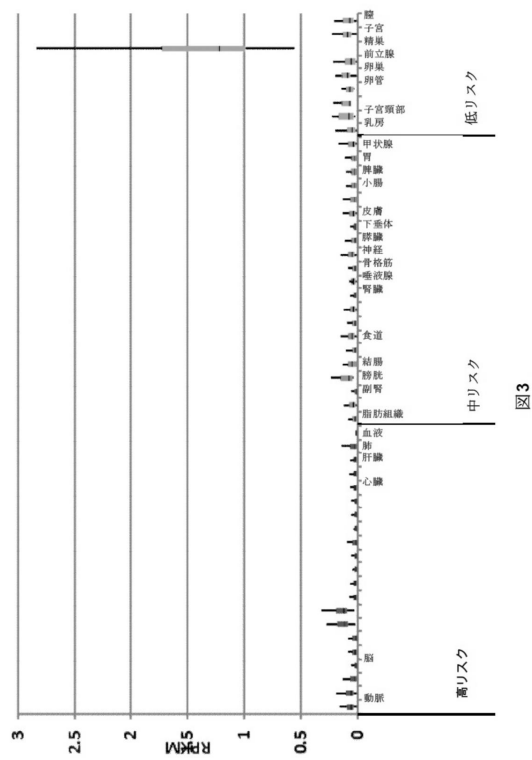
20

30

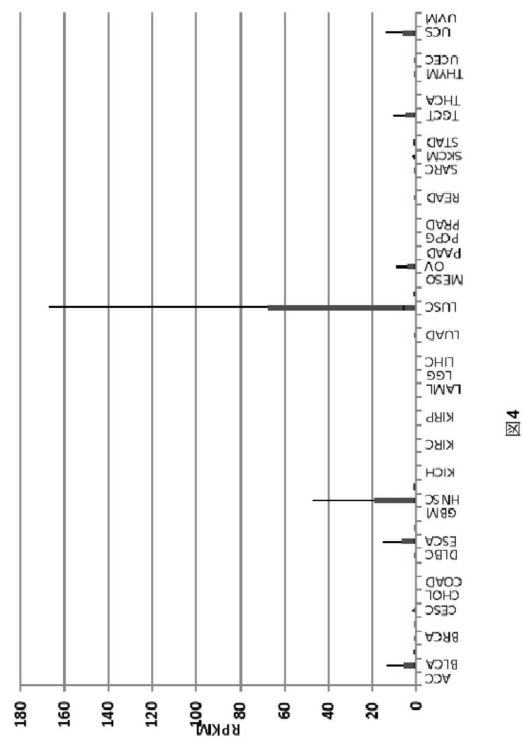
40

50

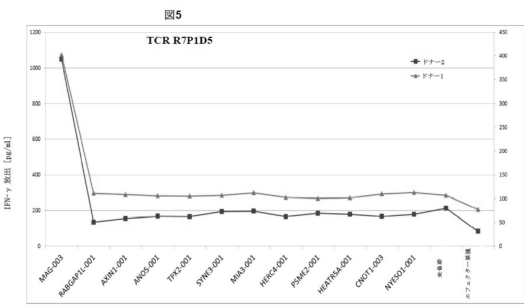
【図 3】



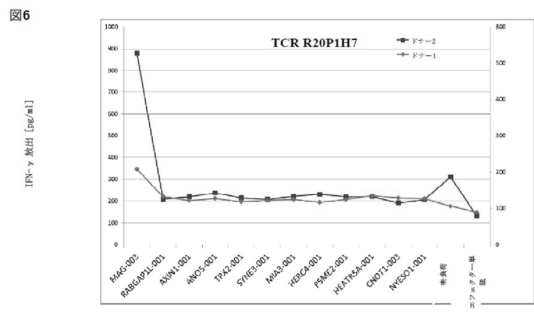
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

20

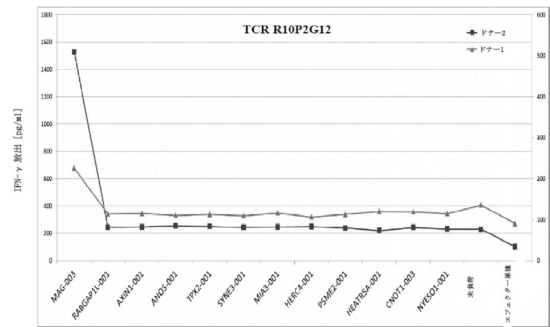
30

40

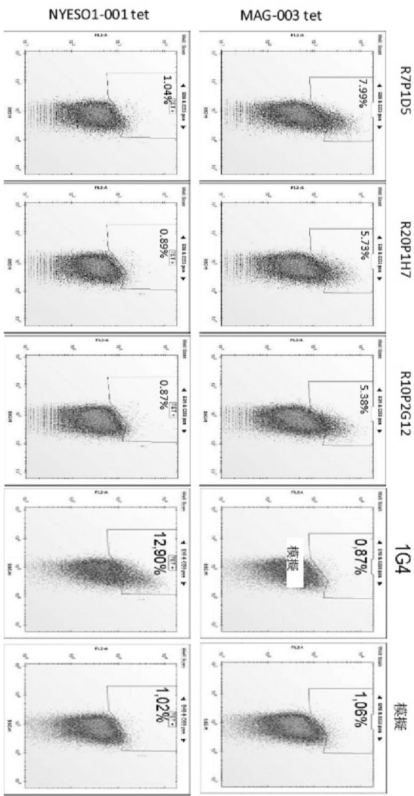
50

【 図 7 】

図7



【 図 8 】



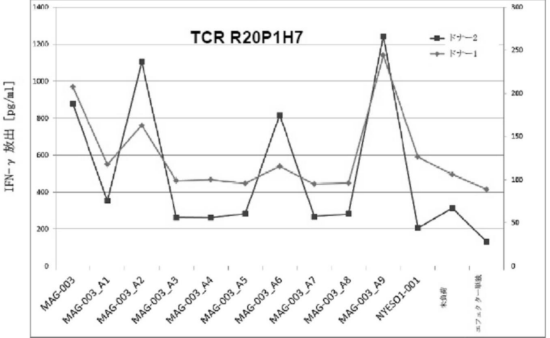
【 図 9 】

図9



【 図 10 】

図10



10

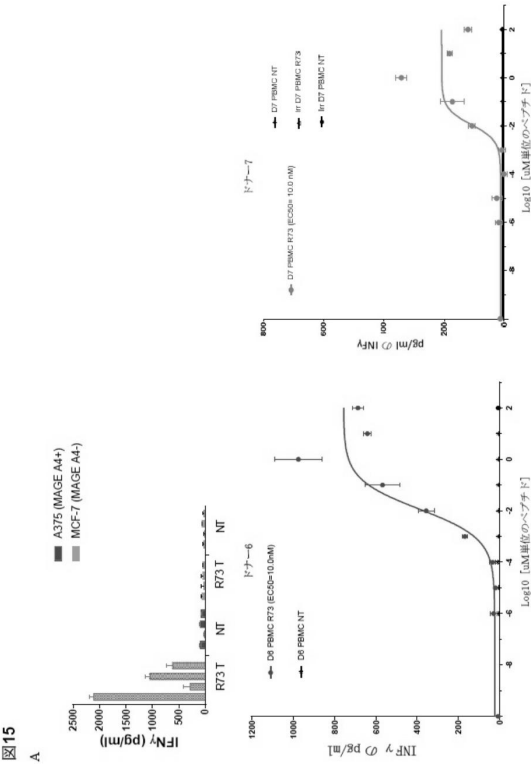
20

30

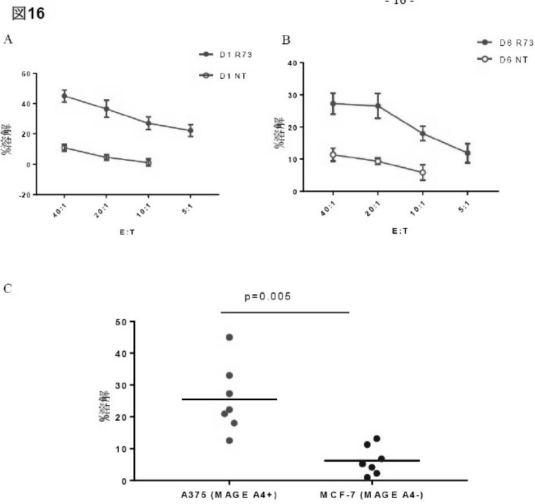
40

50

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 配列表 】

0007340127000001.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

A 6 1 K	31/7088(2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100124453

弁理士 資延 由利子

(74)代理人 100135208

弁理士 大杉 卓也

(74)代理人 100163544

弁理士 平田 緑

(72)発明者 アルテン, レオニー

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

(72)発明者 マウラー, ドミニク

ドイツ, 7 2 1 1 6 メッシンゲン, フレイネルヴェーグ 7

(72)発明者 バンク, ゼバスティアン

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

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 3 2 2 5 5 (W O , A 1)

特開 2 0 1 3 - 1 2 6 4 1 5 (J P , A)

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

British journal of cancer, 2009年, Vol.100, p.1135-1143

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 1 3

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 0 7 K 1 6 / 3 2

C 1 2 N 5 / 1 0

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 7 6

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

A 6 1 P 3 7 / 0 4

A 6 1 K 3 5 / 1 2

A 6 1 K 3 1 / 7 0 8 8

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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

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

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