

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6615612号
(P6615612)

(45) 発行日 令和1年12月4日(2019.12.4)

(24) 登録日 令和1年11月15日(2019.11.15)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08 Z N A
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 8 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-544487 (P2015-544487)	(73) 特許権者	513030983
(86) (22) 出願日	平成25年11月29日 (2013.11.29)		マックス・デルブリュック・セントラム
(65) 公表番号	特表2015-536665 (P2015-536665A)		フュア モレクラール・メディツイン (エムディーシー) ベルリン・ブッフ
(43) 公表日	平成27年12月24日 (2015.12.24)		ドイツ国 1 3 1 2 5 ベルリン, ロベルト・レッシェー・ストラッセ 1 0
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/075141	(74) 代理人	100088904
(87) 国際公開番号	W02014/083173		弁理士 庄司 隆
(87) 国際公開日	平成26年6月5日 (2014.6.5)	(74) 代理人	100124453
審査請求日	平成28年10月27日 (2016.10.27)		弁理士 資延 由利子
(31) 優先権主張番号	1221628.9	(74) 代理人	100135208
(32) 優先日	平成24年11月30日 (2012.11.30)		弁理士 大杉 卓也
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)	(74) 代理人	100152319
(31) 優先権主張番号	61/731,666		弁理士 曾我 亜紀
(32) 優先日	平成24年11月30日 (2012.11.30)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規腫瘍特異的 T細胞レセプター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト T細胞レセプター (TCR) の生産方法であって、該 TCR は腫瘍細胞に特異的なものであり、かつ、養子 T細胞療法における副作用を減少した TCR であって、

以下のステップ a ~ c 若しくはステップ a ~ d の工程；

ステップ a：ヒト白血球抗原 (HLA) -A201 の発現のための遺伝子導入を含み、及び再構成されていない (un-rearranged) ヒト TCR 座を発現する非ヒト哺乳動物を提供すること、

ステップ b：腫瘍特異抗原 (TSA) である RAC1 に特異的なエピトープを含む 9 ~ 16 のアミノ酸長をもつペプチドであって、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含むペプチドで該非ヒト哺乳動物を免疫すること、

ステップ c：ヒト変異 RAC1 に対して活性をもつ T細胞クローンを該非ヒト哺乳動物から単離すること、

ステップ d：該 T細胞クローンから TCR を単離すること、を含む方法。

【請求項 2】

該非ヒト哺乳動物は、さらに、不活性化された内成的な TCR 座を含む、又は TCR 及び鎖をコードする不活性化された内生的な TCR 座を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該非ヒト哺乳動物は ABabDII マウスである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

該変異RAC1が、RAC1P29Sである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一に記載の方法。

【請求項 5】

鎖及び鎖が、

a . 鎖が配列番号 4 2 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含み、および鎖が配列番号 4 3 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含む、

b . 鎖が配列番号 4 4 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含み、および鎖が配列番号 4 5 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含む、

c . 鎖が配列番号 4 6 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含み、および鎖が配列番号 4 8 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含む、

d . 鎖が配列番号 4 7 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含み、および鎖が配列番号 4 9 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含む、

e . 鎖が配列番号 5 0 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含み、および鎖が配列番号 5 1 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含む、

f . 鎖が配列番号 5 2 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含み、および鎖が配列番号 5 3 に示される可変領域に存在する全 3 つの C D R を含む、

である、鎖及び鎖を含む単離されたTCR。

【請求項 6】

鎖及び鎖が、

a . 鎖が配列番号 4 2 に示される可変領域を含み、および鎖が配列番号 4 3 に示される可変領域を含む、

b . 鎖が配列番号 4 4 に示される可変領域を含み、および鎖が配列番号 4 5 に示される可変領域を含む、

c . 鎖が配列番号 4 6 に示される可変領域を含み、および鎖が配列番号 4 8 に示される可変領域を含む、

d . 鎖が配列番号 4 7 に示される可変領域を含み、および鎖が配列番号 4 9 に示される可変領域を含む、

e . 鎖が配列番号 5 0 に示される可変領域を含み、および鎖が配列番号 5 1 に示される可変領域を含む、

f . 鎖が配列番号 5 2 に示される可変領域を含み、および鎖が配列番号 5 3 に示される可変領域を含む、

である、請求項 5 に記載の単離されたTCR。

【請求項 7】

請求項 5 または 6 に記載のTCRを含む、宿主細胞。

【請求項 8】

CD4がCD8が陽性のT細胞である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫療法において、特にアドプティブな(adoptive)T細胞移入(transfer)における有害事象リスクの減少された、新規T細胞レセプター(TCR)の生産方法に係る。本発明の方法によって生産されたTCRは、腫瘍細胞特異的で、健康な組織に反応しない。更に、本発明は、本発明のTCRをコードする核酸、本発明のTCRを含むベクター及び宿主細胞、同様に腫瘍疾患の治療でのこれらの物質の使用を提供する。

【背景技術】

【0002】

診断法の著しい技術的な進歩及び癌と診断された患者に利用可能な治療オプションの著しい技術的な進歩に関わらず、予後はまだしばしば悪いままであり、また、多くの患者が治癒されない。免疫療法は、正常組織を破損せずに、悪性腫瘍細胞を根絶する可能性を持ち、様々な腫瘍をもつと診断された患者への、有力で、標的化された治療提供の見込みがある。理論上、免疫系のT細胞は、腫瘍細胞特異的にタンパク質パターンを認識すること

10

20

30

40

50

ができ、多様なエフェクター・メカニズムによってそれらの破壊を仲介することができる。

アドプティブなT細胞治療は、健康な組織を破損せずに、患者自身のT細胞の腫瘍根絶能を利用するもので、増幅させ、それらが有効に残存腫瘍を除去するように患者にこれらのエフェクターをもどすというものである。このアドプティブなT細胞治療(ATT)というアプローチは、腫瘍免疫学の分野で、新規ではないが、いまだ、この臨床使用での多くの欠点があるが、癌治療でのこのアプローチの完全利用を損なっている。

【0003】

TCRは、信号伝達の仲介に關与するCD3複合体の定常タンパク質に關係しており、免疫グロブリンスーパーファミリーの異種ダイマー性の細胞表面タンパク質である。TCRは、
及び形式で存在し、それは構造上類似しているが、全く別個の解剖学的位置付け及び恐らく全く別個の機能を持っている。天然型の異種ダイマー性のTCRの細胞外部分は、2つのポリペプチドからなり、その各々は、膜近位性定常領域、及び1つの膜遠位性可変領域からなる。定常・可変領域の各々は、鎖内ジスルフィド結合を含んでいる。

可変領域は、抗体の相補性決定領域(CDR)と類似した非常に多形態のループを含んでいる。TCR遺伝子治療の使用は、多くの現在の問題点を克服する。それは、活性の損失を回避して、短期間にT細胞の十分な数の生成と所望の特異性をもった患者自身のT細胞を調製することを可能にする。TCRは、中央(central)メモリT細胞あるいは幹細胞特性を備えたT細胞へ形質導入され、それは、移入に際し、よりよい持続性及び機能を保証する。TCR遺伝子操作T細胞は、効率的な移植を可能にはするが免疫抑制を阻害する化学療法または放射線照射によりリンパ球減少性をこうむった癌患者に投与される。ヒトMHC分子及び種々のヒトTCRレパトリーを発現する遺伝子組み換えマウスは、ペプチド抗原が免疫原性であるかどうか、それらがMHC分子によって効率的に処理され提示されるか、それらが効率的に免疫反応をもたらすT細胞反応を導くかを、素早く分析するためのツールとして役立つ(Liら、2010年Nat Med)。

【0004】

ヒトTCRトランスジェニックマウスを使う場合、マウスゲノムによってコードされていないヒトペプチド配列というものは、免疫化にふさわしく、最適な親和性を備えたTCRを産出する。最適な親和性とは、T細胞が、ヒト自己-MHC分子に拘束され、また異質のものとしてペプチド抗原を認識する、例えば、非寛容なレパトリーを表わす、ということの意味する。

ペプチド/MHCマルチマーの使用によって、遺伝子組み換えマウスの特異的T細胞は、単一の細胞PCRによって単離されたヒトTCRを選別でき、該TCRは、内生的なTCRとのミスマッチを回避して効率的な発現のために最適化され、ウイルスベクターで患者T細胞の形質導入につかわれる(Uckertら、2008年Cancer Immunol Immunother;Kammertoens Tら、2009年のEur J Immunol)。

【0005】

ATTの重要な問題は、腫瘍再発及び有害副作用を防ぐために正しい抗原をターゲットとすることである。これは単純に多くの推定上の腫瘍抗原を与えられると思える。しかしながら、大部分は腫瘍関連(自己)抗原(TAA)である。TAAはまた正常細胞によって発現される。まれであるが重要な細胞による発現は通常分析されていない。さらに、TAA発現は、与えられた個々の腫瘍/腫瘍転移の範囲内において異質であるかもしれない。したがって、TAAをターゲットとすることは、無効果で長期的な反応及び正常組織の破壊のリスクをもたらす。

【0006】

例えば、Melan-A/MART-1、gp100、HER-2及び癌胎児性抗原に向けられたTCR(あるいはキメラ抗体受容体:CAR)-遺伝子操作T細胞での臨床トライアルが、この仮説を支持した。モーガンRA及び同僚は、ERBB2を認識するキメラ抗原受容体で形質転換されたT細胞を投与することで処置されたERBB2過剰発現癌を担持する患者についてのケースレポートを提供した。注入15分後、患者は呼吸困難及び劇的な肺の浸潤を経験し、5日後に死亡した。

この劇的な結果は、アドプティブなT細胞治療の場合における有害副作用の問題を強調する。

【0007】

別のアプローチは、マウスの免疫がなされ、その後、腫瘍患者の自己由来末梢リンパ細胞を形質転換するために、細胞からT細胞及びT細胞レセプターの単離がなされた。形質導入されたリンパ細胞は増殖され、次に、再注入された。腫瘍退化は観察されたが、患者はなお正常細胞の破壊をおこした(ジョンソンLAら、2009Blood)。

【0008】

Parkhurstと同僚(2010 Mol Ther)は、標準の治療に抵抗性がある転移結腸直腸癌の患者の自己由来のTリンパ球を遺伝子操作した。Tリンパ球は癌胎児性抗原(CEA)を対象とするマウスT細胞レセプターを発現するように変更された。再び、その報告は、腫瘍の退行を示したにもかかわらずすべての患者に副作用としての重症な一時的な炎症性大腸炎を伴った。

【0009】

かくして、多数(大部分ではないにしても)においては、有効なアドプティブT細胞治療によって腫瘍関連抗原の実質的な毒性が予測された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

背景技術の上記の主な欠点の観点で、本発明の目的は、遺伝子操作されたT細胞レセプターが自己リンパ細胞へ導入され、そしてヒト患者に再注入されたとき、免疫療法において観察される重篤な副作用を克服できるアドプティブなT細胞治療のための新規なアプローチを提供することである。本発明のより特異的な目的は、腫瘍細胞を特異的に標的とし、健康細胞は標的としない、新規な抗原認識構成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の第一の態様において、上記の目的は、腫瘍細胞に特異的で、アドプティブなT細胞治療で副作用を減少した、ヒトT細胞レセプター(TCR)あるいはT細胞の生産の方法によって解決され、以下の工程を含む；

- a. 再調整がされていないヒトTCR遺伝子座を発現する宿主生物体を提供すること、
 - b. 該宿主生物体を腫瘍特異抗原(TSA)に特異的なエピトープ含むペプチドで免疫すること、
 - c. 該宿主生物体からヒト変異TSAに対する活性をもつT細胞クローンを単離すること、
 - d. 所望により、該T細胞クローンからTCRを単離すること、
- 以上において、該TSAは、体細胞変異抗原のクラスから選択される。

【0012】

本発明の驚くべき事実は、当該技術分野でのアプローチの現状とは逆に、変異癌-駆動発癌遺伝子、特に体細胞変異抗原のクラスからのTSAが、アドプティブT細胞治療(ATT)によって標的化されるならば、当業者で知られるTAAでの多くの問題が解決されるということである。癌ウィルスによってコードされた抗原を別にすれば、変異抗原というものが、唯一の排他的な腫瘍特異抗原である。

【0013】

無論、本発明のここに記述された方法に従って生産されたTCRは、アドプティブなT細胞治療におけるそれらの有利な結果を提供するだけでなく、また、その標的にTCRの特異的結合性が利用される他の治療的アプローチで有利な結果を提供する。

【0014】

本発明の方法に従って単離されたTCRは、アドプティブなT細胞治療で観察される副作用リスクの減少により、当業者レベルの抗原認識構成物の状態をこえて有利である。アドプティブなT細胞移入の場合での副作用は、主として、自己免疫反応あるいは非標的化反応による。本発明は、腫瘍細胞に高度に特異的で、患者の健康な組織に対する免疫反応を仲

10

20

30

40

50

介しないT細胞の提供により、前述の問題を解決することに成功した。本発明が減少させるヒトの自己由来あるいは同種異型のリンパ細胞の注入によってもたらされる有害事象は様々でありえる。

本発明の好ましい実施態様では、本発明によって得られたTCRは、アドプティブなT細胞治療で使用された時、健全な組織において、浮腫と壊死に帰着するかもしれない、損傷を引き起こすリスクをさげる。

【0015】

本発明の一つの好適な実施態様において、宿主生物体によるヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIあるいはII対立遺伝子の発現のための遺伝子導入をさらに含む。好適なMHCは、該変異TSAを提示できると知られ又は推定されるヒト白血球抗原(HLA)タイプである。さらに好適には、該宿主生物体で発現されるHLAタイプが、該変異TSAに由来したペプチドを提示することができるか或いは想定されるものということである。このペプチドは、同じタンパク質の相当する未変化(野生体)バージョンに反して、変異TSAに特異的に存在する変異を含むアミノ酸配列を含むことが必要である。

10

【0016】

MHCクラスIに相当するHLAsは、タイプA、B及びCを含む。HLAクラスIは、提示細胞(もし存在するならウイルスペプチドのような異質なペプチドを含む)内で処理されるペプチドを提示する。一般に、そのようなHLAクラスIペプチドは、小さなポリマー、長さで約9つのアミノ酸である。MHCクラスIIに相応するHLAは、タイプDP、DM、DOA、DOB、DQ及びDRを含む。HLAクラスII複合体は、細胞の外部から由来する抗原を提示する。それらは12~18アミノ酸の間の長さでありうる。選択の抗原を提示する原因となるHLA対立遺伝子の特徴づけは、当該技術分野で一般的に知られた方法である。

20

【0017】

本発明に従って使用された宿主生物体において(その限りにおいて、それはヒトではない)、再調整されていない(un-rearranged)ヒトTCR遺伝子座は、好適には、該宿主生物体のゲノム中の1つ以上の導入遺伝子として存在する。好適には、これらの遺伝子座はTCR及び鎖をコードし、そして、好適には複数、理想的には全てのヒトTCR V、D、J及び/又はC遺伝子を含む。

【0018】

本発明に従う方法において、宿主生物体は、適応性のある免疫系を持っており、及び/又は、該ヒトTCR遺伝子座内のVDJC再配置(再調整)(rearrangement)を実施できるというのが、好適には必須条件である。更に、宿主生物体は、異種起源のTCRを発現することができるのが好適である。本発明のある好ましい実施態様で、該宿主生物体は、遺伝子組み換え動物、好適には哺乳動物、より好適には非ヒト哺乳動物、最も好ましくは、マウス、ラット、ロバ、ウサギ、野ウサギあるいは猿、あるいは当技術分野でT細胞の生成のための宿主として知られているあらゆる動物である。

30

【0019】

上述の方法に関係がある、そして非ヒト宿主生物体が使われた本発明の実施態様において、このような非ヒト宿主生物体は、好適には、さらに、不活性内生的TCR遺伝子座を含み、好適には、該内生的TCR遺伝子座は該非ヒト宿主生物体のTCR及び鎖をコードする。

40

【0020】

本発明の格別に特異的な実施態様において、宿主生物体は「ABabDII」マウスである。用語「ABabDII」マウスは、Liら(2010;16:1029-34NatureMedicine)に記述されるように生産された遺伝子組み換え動物を指す。もちろん、本発明のここに記述された実施例で使用される適切な宿主生物体としてLiらに記述されるのと同じ方法論で生産された他の遺伝子組み換え動物も包含されることは理解されうる。

【0021】

代替の実施態様は、ヒト、例えば、健康な個体或いは腫瘍疾患のヒト患者が、本発明で記述のペプチドで免疫される用途に関する。この実施態様において、T細胞は、ヒト被験

50

者の血液から、免疫プロセスの後に、分離することができる。この実施態様は、改善されたT細胞レセプターが、アドプティブなT細胞治療において再注入のために使用できる、ヒト、理想的には自己由来のT細胞で発現されるという有利性をもつ。

【0022】

本発明の方法の条件で宿主生物体の免疫に使用されたペプチドは、相応する野生型の細胞タンパク質のアミノ酸配列と比較して少なくとも一つのアミノ酸残基において変異したアミノ酸配列を含む。本発明は腫瘍特異抗原の使用に関し、したがって、腫瘍細胞の成長において変異した、及びしたがってこの特異的に変異された形態で、排他的に、癌細胞に存在するタンパク質の使用に関係する。しかしながら、正常で、健康な、細胞は、なおオリジナルの未変異の(野生型)タンパク質を発現するかもしれない。したがって、ここに記述された本発明にとって、免疫に使用されたペプチドは、その配列において、オリジナルの未変異細胞蛋白質から当該TSAを区別する変異を含むというのが特異的に好適である。本発明の方法で使用される好ましいペプチドは、SEQ ID 1番~27番に示される配列のうちのいくつかを含む。本発明の好ましい実施態様では、免疫用のペプチドは、SEQ ID 1番に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0023】

健康な組織ではなく腫瘍細胞で特に発現する抗原は4つのタイプに分類することができる：

(I)変異抗原が、腫瘍細胞内で点突然変異か転移によって腫瘍生成中に成長する。それらの抗原は、厳密に腫瘍特異的である。本発明の条件で、これらの抗原は腫瘍特異抗原(TSA)と呼ばれる。

20

(II)癌/生殖細胞系抗原が、通常、健康な体細胞組織ではなく、もっぱら成人生物体の生殖細胞内で発現される。しかしながら、癌細胞においては、後成的な調節の欠失により、生殖細胞特異的遺伝子は活性化されうる。

(III)異分化抗原が、腫瘍及びそれらの健康な先祖細胞で発現される。そのような抗原に対するCTL反応は、しばしば自己免疫反応に帰着する。

(IV) 過剰発現したTAAが、正常細胞(腫瘍では、それらの抗原は強く活性化される)のみで少量の発現を示す。

本発明においては、最初のタイプの抗原のみが使用されることが好適である。

【0024】

本発明は、何らかの変異で形成されたTSAが含まれる。単に図解的な理由で、次のタイプの変異が記述される:アミノ酸置換、欠失、付加、挿入あるいは化学的若しくは翻訳後修飾。更に、染色体転座を含み、及び新規スプライス部位になる、非特異的スプライシング変異によっておこる、癌細胞において排他的に発現するスプライス変異体を含む。

30

【0025】

免疫プロセスにおいて、該ペプチドは任意の長さをもつ。しかしながら、最小の必要条件は、上記の言及された変異配列を含んでいるエピートプの存在である。本発明の好ましいペプチドは、100のアミノ酸、好適には50のアミノ酸、さらに好適には30のアミノ酸、なお一層好適には8~16のアミノ酸の長さをもつ。正確なペプチドの長さは、TSAがMHCクラスIかMHCクラスIIの提示かどうかによって依存して、変化しうる。

40

【0026】

宿主生物体の免疫を増強するために、アジュバントがペプチドと一緒に使用されることが好適である。アジュバントは、例えば、それに制限されずに、CpG及び/又は不完全なフロイントのアジュバントである。ペプチドでの最初の免疫の後、宿主生物体は好適には、少なくとも1あるいは2、3あるいは4回以上、該ペプチド及び/又は選択されたアジュバントで処理される。フロイントアジュバントは、免疫用の抗原が乳化される油(ミネラル)溶液である。不完全なフロイントアジュバントは、この、本発明で好適に使用されたように、マイコバクテリウムのコンポーネントを何ら含まない。

【0027】

免疫プロセス中及び後、該宿主生物体は、本発明のTSAに対して特異的に再修正されたT

50

細胞レセプターを発現するT細胞をもたらす。そして、そのようなT細胞クローンは、好ましい実施態様において、該宿主生物体から分離される。例えば、該細胞は脾臓細胞、リンパ節細胞あるいは血液から分離することができる。T細胞クローンは、TSAエピトープがMHCクラスIあるいはIIかどうかによって依存して、例えば、CD4またはCD8の表面発現によって選択される。単一のT細胞クローン型の宿主生物体からの単離方法は、当業者には公知である。本発明はT細胞の分離のための特異的な方法には制限されない。しかしながら、本発明の1つの好ましい実施態様で、T細胞又は該T細胞クローンは、分離後、さらに、本発明の方法で使用されるTSAに結合するTCR (a TCR binding to the TSA)の発現のためにテストされる。これは、TSA特異的HLA四量体を使い、四量体結合(染色)によって好適になされる。選択的に、分離されたT細胞かT細胞クローンも、細胞タンパク質の未変異バージョンと比較して、TSAへの特異性に関してテストされた。この目的のために、変異体を含むペプチド及び野生型のバージョンを含むペプチドに対するT細胞反応性が比較された。好ましい実施態様では、そのようなT細胞あるいはT細胞クローンは、本発明の方法に従って分離され、それは、細胞タンパク質の未変異バージョンにではなくTSAに高度に選択的である。

10

【0028】

本発明の別の実施態様は、T細胞かT細胞クローンの単離の後、TCR配列がクローン化される。この実施態様で、上記のステップdの方法は、さらに次のようなステップを含む；(i)該T細胞クローンからcDNAを調製すること、及び(ii)該cDNAの増幅、そして(iii)ベクターにそれぞれTCR 及び 遺伝子をクローニングする。

20

好適には、ヒトの末梢血リンパ球の形質導入用のレトロウイルス・ベクターが、本発明のTCRの運搬体として使用される。このようなクローニング手法のための手段及び方法は、当業者には周知である。

【0029】

本発明の別の好ましい実施態様では、使用されたTSAが、腫瘍細胞または腫瘍疾患で発現される。

【0030】

ここに使用される、用語「腫瘍」あるいは、「腫瘍疾患」は、良性・悪性腫瘍の両方が、新生物体を意味し、黒色腫、リンパ腫、白血病、癌及び肉腫を含む。腫瘍組織の実例となる例は、悪性黒色腫と菌状息肉腫のような皮膚腫瘍；白血病のような血液の腫瘍、例えば急性リンパ芽球性、急性骨髄球性、あるいは慢性骨髄性白血病；ホジキン病または悪性リンパ腫のようなリンパ腫；卵巣・子宮の腫瘍のような婦人科領域の腫瘍；前立腺、膀胱あるいは精巣のような泌尿器領域の腫瘍；軟部組織肉腫、骨のあるいは非骨の肉腫、胸腫瘍；脳下垂体、甲状腺及び副腎皮質の腫瘍；食道、胃、腸及び結腸のような胃腸の腫瘍；膵臓及び肝臓腫瘍；喉頭、乳頭及び肺腫瘍、である。

30

本発明の条件において好ましい腫瘍は、黒色腫、肺腫瘍、子宮内膜の腫瘍、神経膠腫、リンパ腫、白血病あるいは前立腺腫瘍から選ばれる。

【0031】

ここに記述された本発明の方法に適用できる例示的なTSAは、Krauthammerらに記述され(2012 Nature Genetics)、本発明においてこれに制限されるものではない。HLAタイプA2によって提示されるTSAの好ましい選択は、RAC1、RAC2、RHOT1、MAP2K1、MAP2K2、Nos1、EGFR、SMCA4、STK11、ARID1A、RBM10、U2AF1、EP300、CHD4、FBXW7、H3F3A、KLHL6、SPOPあるいはMED12である。それぞれの変異エピトープ配列は、以下の実施例で提供される。

40

【0032】

本発明の目的は、本発明に従って得られた又は得られうるTCRをコードする核酸分子によって更に解決される。

更に本発明で提供されるのは、本発明のTCRのそれぞれ あるいは 鎖を、あるいは本発明のTCRの可変或いは定常領域を、或いは本発明のTCRの断片を(好適には、TCRのこのような断片はなおそのTSAへの結合活性/結合能を保持する)コードする核酸分子である

50

。それに加えて、核酸分子は、選択的に、該核酸配列の蛋白質発現のために、特異的には、哺乳動物/ヒトでの発現のために、さらに好適には、免疫細胞で、必要な更なる配列を担持する。使用された核酸は、細胞のTCRに相応する核酸配列の発現をさせるのにふさわしいベクター中に含まれることができる。

【0033】

また本発明によって提供されるのは、上述の核酸分子を含むベクター或いは細胞であり、特異的には、ベクターは医薬領域での使用向けである。さらに、本発明によってベクターを含む細胞が提供される。

【0034】

別の態様において、本発明は、T細胞レセプター(TCR)、あるいはその断片を提供し、それらは本発明の方法によって得られた若しくは別途入手可能である。本発明のTCRは、免疫療法において減少された副作用を示すTCRであることが特に好適である。好適には、本発明のTCRは、TCRの生成に使用されたTSAの未変異(野生型)バージョンを発現する正常細胞や組織を標的とはしない。好ましい具体的態様の本発明のTCRは、正常細胞または組織に対して、壊死を引き起こさず及び免疫反応を受けた時に応答を開始しない。本発明の好ましいTCRは、SEQ ID 1番に示されるエピトープに特異的なTCRである。

【0035】

本発明による好適なTCRは、以下に記述されるようなTCRでありうる。

【0036】

本発明の別の実施態様は、単一鎖TCR(scTCR、好適には -scTCR、それは本発明のTCRの配列に由来する)に関する。単一鎖のTCR(scTCRs)は単一のアミノ酸鎖から成る人工構築物である。scTCRは、第1のTCR鎖(例えばアルファ鎖)の可変領域のポリペプチド及び全(完全長の)第2のTCR鎖(例えばベータ鎖)のポリペプチド、或いはその逆の組み合わせ、を含むことができる。更に、scTCRは、2つ以上のポリペプチドをともに連結する1つ以上のリンカーを選択的に含むことができる。ここに記述されるように、リンカーは例えば2つの単一鎖をともに連結するペプチドでありえる。

【0037】

さらに、本発明は、IL-2、IL-7あるいはIL-15のようなヒトのサイトカインに融合された本発明のscTCRあるいは本発明の分子に由来する他のTCRを提供する。本発明のTCRは、多重結合の複合体としても提供することができ、それは、少なくとも2つのscTCRまたはTCR分子を含み、該scTCRまたはTCR分子は、導入されたビオチン-ストレプトタビジン機能によって例えば相互連結される。

【0038】

本発明の別の態様において、宿主細胞が提供され、それは上述の、ベクター、核酸あるいはTCR分子を含む。本発明の好ましい実施態様では、宿主細胞は、ヒト細胞、好適にはヒトTリンパ球であり、それはCD4またはCD8の発現に陽性である。本発明のそのような宿主細胞は、好適には、本発明に従って核酸がベクターの形質導入によって得られうる。T細胞へ核酸分子を導入する形質導入方法は、当該技術分野の当業者にとって、それに制限せず、公知であり、そしてそれに制限されることなくウイルスの形質導入運搬体を含んでいる。

【0039】

本発明の代替的な態様において、T細胞は、ヒトT細胞レセプター(TCR)の生産のための方法によって得られ又は入手可能であり、それは腫瘍細胞に特異的で、上述されるようなアドプティブなT細胞治療における副作用を減少した。そのようなT細胞は、本発明の方法で使用される宿主生物体に依存し、それは例えばヒトかヒト以外のT細胞、好適にはヒトTCRを発現するヒト以外のT細胞である。

【0040】

本発明によって提供される化合物は、医薬としての使用の更なる態様をもち、例えば癌疾患の治療での使用の態様をもち、特に癌疾患は、変異TSA特異的発現によって特徴づけられる。最も好適には、本発明の化合物は、アドプティブなT細胞移入を含む癌治療で使

10

20

30

40

50

用される。

【0041】

本発明の別の態様は、ヒト被験者、特に腫瘍疾患患者を処置する方法に関連する。該処置の方法は、そのような処置を必要とする患者への上記化合物のうちのいずれかの投与を含む。本発明の化合物の投与は、例えば該患者への本発明のT細胞の注入を含む。好適には、そのようなT細胞は、本発明の核酸がTCRによって生体外で形質導入された、患者の自己由来のT細胞である。

【0042】

本発明は、また、本発明によるTCRまたはTCR断片、あるいは本発明による核酸、ベクター、宿主細胞あるいは単離されたT細胞を含む医薬組成物を提供する。好ましい実施態様では、医薬組成物は免疫療法用である。

10

【0043】

本発明において使用可能な薬学的に許容される担体あるいは希釈剤の例は、SPGAのような安定剤、炭水化物(例えばソルビトール、マンニトール、澱粉、蔗糖、グルコース、デキストラン)、アルブミンまたはカゼインのようなタンパク質、牛の血清或いはスキムミルクのようなタンパク質、及び緩衝剤(例えばリン酸緩衝液)を含む。

【0044】

本発明のTCRを得るために、本発明の方法において、好適に使用される腫瘍抗原は、以下の表にリストされる(変異は両カッコでくくられ表示されるエピトープ内のアミノ酸変異として示される):

20

【表1-1】

Table 1:

Gene	Protein	Epitope
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	27-35 (P29S)
TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein	715-723 (S722F)
Rac2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	28-38 (P29L)
		28-38 (P29Q)
Nos1	Nitric oxide synthase	770-779 (S771L)
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	1999-2007 (E2000V)
		1021-1031 (W1022L)
H3F3A	Histone H3.3	28-38 (G34V)
KLHL6	Kelch-like protein 6	48-58 (F49L)
ID3	Inhibitor of DNA binding 3	50-58 (L54V)
FLT3	Fms-related tyrosine kinase 3	835-843 (D835Y)
		835-843 (D835V)
FBXW7	F-box/WD repeat-containing protein 7	458-464 (F462S)
		458-464 (A463T)
Med12	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	724-732 (D727E)
CDK12	Cyclin-dependent kinase 12	898-906 (Y901C)
CDC42	Cell division cycle 42	7-14 (G12V)
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	1153-1161 (G1159W)
SMO	Smoothened, frizzled family receptor	412-420 (L412F)
SF3B1	Splicing factor 3b, subunit 1	693-701 (K700E)
CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	907-916 (L912V)
SPOP	Speckle-type POZ protein	83-91 (Y87N)
		83-91 (Y87C)
MAP2K2	Dual specificity mitogen-activated protein kinase2	154-162 (S154F)
Notch1	Notch1	1568-1576 (L1574P)
		1592-1600 (R1568P)

30

40

【表 1 - 2】

FOXA1	Forkhead Box A1	221-229 (D226N)
2 nd NT5C2	5'-Nucleotidase, Cytosolic II	a) 233-241 b) 236-244 (R238L)
2 nd Bcr-Abl	Bcr-Abl	247-255 (E255K)
RHOT1	Mitochondrial Rho GTPase 1	29-37 (P30L)
MAP2K1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase1	20-28 (E20K)
EGFR	Epidermal growth factor receptor	717-725 (G719A) 1125-1133 (H1129Y)
STK11	Serine/threonine-protein kinas	219-228 (P221L)
RBM10	RNA-binding protein 10	316-324 (I316F)
U2AF1	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit	28-36 (S34F)
EP300	Histone acetyltransferase p300	1623-1631 (R1627W)
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	23-32 (R24C) 23-32 (R24L)
PPP6C	Protein phosphatase 6, catalytic subunit	269-277 (S270L)
TACC1	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	792-801 (C794F)
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	5-14 (G12V)
TRAF7	TNF receptor-associated factor 7, E3 ubiquitin protein ligase	518-527 (N520S) 531-541 (G536S)
HIST1H3B	Histone cluster 1, H3b	26-35 (K27M)
ALK	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase	1272-1280 (R1275Q)
ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	251-260 (E255K) 247-255 (E255V)
CBL	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	398-406 (H398Y)
NPM1	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	283-291 (c.863_864insTCTG Insertion)
		283-291 (c.863_864insCATG Insertion)
		283-291 (c.863_864insCATG Insertion)
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2	637-645 (Y641F)
GNAS	GNAS complex locus	201-210 (R201C)
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	841-849 (D842V)
TSHR	Thyroid stimulating hormone receptor	451-459 (M453T)
KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	636-644 (K642E)
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	a) 654-662 b) 659-667 (D661Y)
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1	30-39 (S33C) 30-39 (S33F) 30-39 (S33Y)
STK11	Serine/threonine kinase 11	219-228 (P221L)
ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	773-782 (G776V)
SLIT2	Slit homolog 2	8-16 (M8I)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	113-121 (P114L)
XPO1	Exportin 1	568-576 (E571K)

10

20

30

【 0 0 4 5 】

本発明の上記のTCRは、以下のTCR分子に、好適な実施態様として、関係する：

【 0 0 4 6 】

本発明は、TCR 鎖に関係し、それはSEQ ID NO : 28、30、32、33、36、38あるいは40のうちの任意の1つで示される配列をもつCDR3領域を含む。好適なものは、SEQ ID NO : 42、44、46、47、50、52あるいは54のうちの任意の1つで示される配列をもつ可変領域を含むTCR 鎖である。

【 0 0 4 7 】

本発明は、TCR 鎖に関係し、それはSEQ ID NO : 29、31、34、35、37、39あるいは41のうちの任意の1つで示される配列をもつCDR3領域を含む。好適なものは、SEQ ID NO : 43、45、48、49、51、53あるいは55のうちの任意の1つで示される配列をもつ可変領域を含むTCR 鎖である。

【 0 0 4 8 】

本発明の好適な実施態様は、単離されたあるいはここに記述されるような方法のうちの任意の1つによって生産した(得られた)特異的TCRに関係する。本発明のそのようなTCRは、好適には表 1 及び 2 から選ばれた、変異抗原をターゲットとすることに特異的なTCRである。Rac-1がTRRAPの変異抗原が好適である。より特異的に、このようなTCRは、変異Rac-1エピトープFSGEYIPTV或いは変異TRAPPエピトープKLVFGSVFLに特異的な結合能をもつも

40

50

のが好適である。

【 0 0 4 9 】

本発明の好適なTCRは、SEQ ID NO : 28 ~ 41で示されるアミノ酸配列のうちの任意の1つを含むCDR3領域の存在によって更に特徴づけられる。鎖が鎖をもつ、本発明によるRac-1 TCRは、好適には、SEQ ID NO : 28 ~ 39のうちの任意の1つで示される配列をもつCDR3を含む。本発明による好ましいTRRAP TCRは、SEQ ID NO : 40または41で示される配列から選ばれたCDR3アミノ酸配列の存在によって特徴づけられる。

【 0 0 5 0 】

より好ましいものは、

SEQ ID NO : 28で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 29で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR ; 10
 SEQ ID NO : 30で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 31で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR ;
 SEQ ID NO : 32で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 34;で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR ;
 SEQ ID NO : 32で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 35で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR ;
 SEQ ID NO : 33で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 34で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR ;
 SEQ ID NO : 33で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 35で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR ; 20
 SEQ ID NO : 36で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 37で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR ;
 SEQ ID NO : 38で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 39で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR ;
 SEQ ID NO : 40で示されるCDR3配列を含む鎖及びSEQ ID NO : 41で示されるCDR3配列を含む鎖をもつアルファ/ベータTCR。

【 0 0 5 1 】

本発明のTCRにおいて含まれたTCR鎖は、更に、TCR 1 ~ 7のうちの任意の1つの可変領域のうちの1つに存在する、少なくとも1つ、好ましくは2つ、さらに好ましくは3つ全ての、CDR領域を含むことができる。3つのCDR領域のすべてを含んでいる該可変領域の配列は、SEQ ID NO : 42 ~ 55に示される。 30

【 0 0 5 2 】

本発明の別の好ましい実施態様において、本発明のTCRは、表3に例示される本発明のTCR T1 ~ T7の任意の1つのか鎖の可変領域から選ばれた及び/又は鎖の少なくとも1つの可変領域を含む。

【 0 0 5 3 】

本発明の条件において分離されるようなTCRは、次の可変領域(CDR3領域が下線によって強調される)を含む :

Rac-1 TCR: 40

表A

TRAV20*02-CAVQTSQGGSEKLVF-TRAJ57*01

MEKMLECAFIV LWLQLGWLSG EDQVTQSPEA LRLQEGESS LNCSTVSG L RGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAG
 EEKEKE RLKATLTKKE SFLHITAPKP EDSATYLCAV QTSQGGSEKL VFGKGTKLTVNPHYIQNPEPA

(SEQ ID NO : 42)

TRBV4-1*01-CASSQDASGIYYEQYF-TRBD2*02-TRBJ2-7*01

MGCRLCCAV LCELLGAVPID TEVTQTPKHL VMGMTNKKSL KCEQHMGHRA MYWYKQKAKKPPPELMFVYSYEKLSI
 NESVP SRFSPCPNS SLLNLHLHAL QPEDSALYLC ASSQDASGIY YEQYFGPGRRLTVT

(SEQ ID NO : 43)

TRAV13-1*01-CAASRGAQKLVF-TRAJ54*01 50

MTSIRAVFIF LWLQLDLVNG ENVEQHPSTL SVQEGDSAVI KCTYSDSASN YFPWYKQELGKGPQLIIDIRSNVGE
KKDQR IAVTLNKTAK HFSLHITETQ PEDSAVYFCA ASRGAQKLV FGQTRLTINPN

(SEQ ID NO : 44)

TRBV3-1*01-CASSQLAGGPLYNEQFF-TRBD2*02-TRBJ2-1*01

MGCRLCCVV FCLLQAGPLD TAVSQTPKYL VTQMGNDKSI KCEQNLGHDT MYWYKQDSKKFLKIMFSYNNKELII
NETVP NRFSPKSPDK AHLNLHINSL ELGDSAVYFC ASSQLAGGPL YNEQFFGPGTRTLTVL

(SEQ ID NO : 45)

TRAV5*01-CAESKRFSGQKLLF-TRAJ16*01

MR QVARVIVFLT LSMSRGEDVE QSLFSLVREG

DSSVINCTYT DSSSTYLYWY KQEPGAGLQL LTYIFSNMDM KQDQRLTVLL NKKDKHLSLR IADTQTGDSAIFYC
AESKRFSGQKLLFAR GTMLKVDLN

10

(SEQ ID NO : 46)

TRAV12-2*02-CAAQSARQLTF-TRAJ22*01

M MKSLRVLLVI LWLQLSWVWS QQKEVEQNSG PLSVPEGAIA SLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYS
NGDKED GRFTAQLNKA SQYVLLIRD SQPSDSATYL CAAQSARQLT FGSGTQLTVLPD

(SEQ ID NO : 47)

TRBV20-1*01(/02)-CSARDLITDTQYF-TRBJ2-3*01

MLLLLL LLGPGSGLGA VVSQHPSWVI CKSGTSVKIE CRSLDFQATT MFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQG
V EKDKFLINHA SLTLSTLTVT SAHPEDSSFY ICSARDLITD TQYFGPGTRTLTVL

20

(SEQ ID NO : 48)

TRBV3-1*01-CASSPWQETQYF-TRBJ2-5*01

MGCRL CCVVFCLLQA GPLDTAVSQT PKYLVQMGN DSIKCEQNL GHDTMYWYKQDSKKFLKIMFSYNNKELII
N ETVPNRFSPK SPDKAHLNLH INSLELGDSA VYFCASSPWQ ETQYFGPGTRLLVL

(SEQ ID NO : 49)

TRAV13-1*01 CAASLGSGNTPLVF TRAJ29*01

M TSIRAVFIFL WLQLDLVNGE NVEQHPSTLS VQEGDSAVIK CTYSDSASN YFPWYKQELGKGPQLIIDIRSNVGE
EKKDQRI AVTLNKTAKH FSLHITETQP EDSAVYFCAA SLGSGNTPLV FGKTRLSVIAN

(SEQ ID NO : 50)

TRBV28*01 CASSLHSGRDTQYF TRBJ2-3*01TRBD2*02

MGIRLLCR VAFCLAVGL VDVKVTQSSR YLVKRTGEKV FLECVQMDH ENMFWRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKE
KGD IPEGYSVSRE KKERFSLILE SASTNQTSMY LCASSLHSGR DTQYFGPGTRTLTVL

30

(SEQ ID NO : 51)

TRAV13-2*01 CAENRGANSKLT F TRAJ56*01

MMAGIRALF MYLWLQLDWV SRGESVGLHL PTLVQEGDN SIINCAYSNS ASDYFIWYKQESGKGPQFIIDIRSNM
DKRQ GQRVTVLLNK TVKHLSQLIA ATQPGDSAVY FCAENRGANS KLTFGKITLSVRPD

(SEQ ID NO : 52)

TRBV12-3*01 CASSFTGGFYGYTF TRBJ1-2*01TRBD1*01

MDSWTFCCVS LCILVAKHTD AGVIQSPRHE VTEMGQEVTL RCKPISGHNS LFWYRQTMRRGLELLIYFNNNVPID
DSGMP EDRFSAKMPN ASFSTLKIQP SEPRDSAVYF CASSFTGGFY GYTFGSGTRTLTVV

40

(SEQ ID NO : 53)

TRRAP TCR:

TRAV17*01-CATDWYTGANSKLT F-TRAJ56*01

METLLGVSLV ILWLQLARVN SQQGEEDPQA LSIQEGENAT MNCSYKTSIN NLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNERE
KHSGR LRVTLDTSKK SSSLLITASR AADTASYFCA TDWYTGANSK LTFGKITLSVRPD

(SEQ ID NO : 54)

TRBV6-2*01-CASSYSGYEQYF-TRBD1*01-TRBJ2-7*01

MSLGLLCCAA FSLLWAGPVN AGVTQTPKFR VLKTGQSMTL LCAQDMNHEY MYWYRQDPGMGLRLIHYSVGEGETTA
KGEVP DGYNVSRLLK QNFLLGLESA APSQTSVYFC ASSYSGYEQY FPGTRTLTVT

(SEQ ID NO : 55)

50

【0054】

本発明の一つのさらに好適な実施態様は、TCR 及び/又は 鎖、若しくはそれらの断片を提供し、それは、SEQ ID NO: 42~55のグループから選ばれた配列を含む。好適には、本発明のTCRは、異種ダイマー性のTCRであって、それらは

SEQ ID NO 42による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 43による配列を含む 鎖、又は
 SEQ ID NO 44による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 45による配列を含む 鎖、又は
 SEQ ID NO 46による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 48による配列を含む 鎖、又は
 SEQ ID NO 46による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 49による配列を含む 鎖、又は
 SEQ ID NO 47による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 48による配列を含む 鎖、又は
 SEQ ID NO 47による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 49による配列を含む 鎖、又は
 SEQ ID NO 50による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 51による配列を含む 鎖、又は
 SEQ ID NO 52による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 53による配列を含む 鎖、又は
 SEQ ID NO 54による配列を含む 鎖及びSEQ IDNO 55による配列を含む 鎖、である。

10

【0055】

本発明のより好適な態様において、本発明のTCRは、以下の表3に示されるTCR T1~T7のうち任意の1つのTCR鎖から選ばれた少なくとも1つのTCR あるいは 鎖を含むTCRである。最も好適な本発明のTCRは、表3に示されるT1~T7のうち任意の1つから選ばれた / TCRである。

【0056】

本発明の上述のTCRは、いくつかの実施態様において、変更されたアミノ酸配列を含むことができる。本発明の好適なTCR鎖は以下を含む；少なくとも70、80、90、95、96、97、98あるいは99%の同一性ある、TCR配列、TCR もしくは 鎖配列、SEQ IDNO42~45のうちの任意の1つによるTCR可変領域、あるいはここに開示されるCDR3配列。最も好ましくは、本発明のTCRは、表3に例示されるTCR T1~T7のうち任意の1つの / 鎖と少なくとも90%あるいは95%あるいは99%の同一性ある 及び/又は 鎖を含む。

20

【0057】

上記TCRは、好適には、表1又は2に開示のRac-1又はTRRAPの変異抗原に特異的であり、特に腫瘍細胞若しくは抗原提示細胞のような細胞に提示されたとき、特異的である。本発明によってさらに含まれるのは、本発明のTCR若しくはTCR鎖の機能的な断片である。用語「TCR若しくはTCR鎖の機能的な断片」は、全長受容体分子の断片を指し、断片はその分子から由来し及び変異TAAへの同じ結合性を維持するという特徴をもつ。

30

【0058】

さらなる態様において、既に上述のように、本発明は、本発明のTCR分子をコードする核酸に関係し、同様に、さらにこれらの核酸を含む細胞、あるいは本発明の該TCRを発現している細胞に関係する。本発明は、更に、上述する様々な方法又は用途において、TCRタンパク質若しくは核酸、又は細胞の使用に関係する。

【0059】

本発明の好ましい態様は、本発明の方法及び様々な材料で腫瘍疾患の治療に関係がある。好適な疾患は、癌であり、それは本発明によって特定された変異TAAのうちの任意の1つの発現によって特徴づけられる癌である。好適な疾患は、Rac-1あるいはTRRAPの変異エピトープの発現によって特徴づけられる疾患である。Rac-1変異抗原あるいはTRRAP変異抗原に特異的である本発明のTCRで処理される好適な疾患は、癌性増殖性疾患、例えば肺癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、胃癌、腎臓癌、白血病、肝臓癌、リンパ腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、直腸癌、肉腫、皮膚癌、睾丸癌、また子宮癌から選ばれる。Rac1特異的TCRの格別好適な疾患は、黒色腫と非小細胞性肺癌である。

40

【0060】

本発明は、図面及び配列を伴い以下の実施例でさらに説明されるが、本発明はそれに制限されるものではない。本発明において、ここに引用される参考文献のすべては、それらの全体が本発明に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 6 1 】

【図 1】図 1 は、ABabDII マウスにおける、HLA-A201拘束変異RAC1P29Sエピトープに対する特異的CD8+T細胞反応を示す。SEQ ID NO 1~27は、表 1 に示すように、HLA型A2拘束TSAの変異エピトープ配列を示す。SEQ ID NO 28~41は、本発明のTCRのCDR3領域配列を示す。SEQIDNO 42~55は、本発明のTCR 1~7の可変領域を示す。

【実施例】

【 0 0 6 2 】

本発明の条件で使用可能である、好適な腫瘍特異抗原エピトープが、表 2 に表示される。

【表 2】

Gene	Protein	HLA A2.01.Epitope*
MELANOMA		
RAC1:	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	FP:SGEYIPTV
RAC2:	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	FP:LGEYIPTV
RHOT1:	Mitochondrial Rho GTPase 1	FP:LEEVPPRA
MAP2K1:	Dual specificity mitogen-activated protein kinase1	E:KIKLCDFGV
MAP2K2:	Dual specificity mitogen-activated protein kinase2	E:KIKLCDFGV
		S:FLDQVLKEA
Nos1:	Nitric oxide synthase	KS:LQAYAKTL
LUNG TUMOR		
EGFR:	Epidermal growth factor receptor	VLG:ASGAFGT
SMCA4:	Transcription activator BRG1	LLSTRAG:WGL
STK11:	Serine/threonine-protein kinas	FQP:LPEIANGL
ARID1A:	AT-rich interactive domain-containing protein 1A	MW:LVDRYLAFT
		FEV:MSKHPL
RBM10:	RNA-binding protein 10	I:FLGALAPYA
U2AF1:	Splicing factor U2AF 26 kDa subunit	RHGDRCS:FRL
ENDOMETRIAL TUMORS		
EP300:	Histone acetyltransferase p300	LMDGR:WDAFL
		LMDGR:QDAFL
CHD4:	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	NLEEL:VFHLL
FBXW7:	F-box:WD repeat-containing protein 7	TLYGHTF:SAV
		TLYGHTFA:TV
GLIOMA		
H3F3A:	Histone H3.3	QLATKAARK:M
		KSAPSTG:VGV
CLL		
KLHL6:	Kelch-like protein 6	KF:LDDAGLSL
PROSTATE TUMOR		
SPOP:	Speckle-type POZ protein	YLSLY:NLLLV
		YLSLY:CLLLV
		FVQKDWGFV
		FVQKDWGFL
MED12:	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12	VLYD:EQPRHV

*wildtype/mutated amino acid

*表中 “ / ” は 野生体 / 変異アミノ酸 を意味する。

【 0 0 6 3 】

実施例 1 FSGEYIPTVエピトープに対するRAC1特異的TCR

RAC1 TSA特異的TCRを担持するT細胞の生成のため、その内在性TCR座を欠損し、ヒトTCRレポトリーを発現するマウスが使用された。遺伝子組み換えマウス(ABabDIIマウス)の生産及びセットアップの詳細は、(Li LP, Lampert JC, Chen X, LeitaoC, Popovic J, Mueller W, et al: 種々のヒトT細胞抗原受容体レポトリーをもつ遺伝子組み換えマウス。NatMed.2010;16:1029-34)に記述される。

【 0 0 6 4 】

ABabDIIマウスは、変異RAC1 P29Sエピトープで2度免疫された(上記参照)。最後の免疫の7日後に、集められた脾臓及びリンパ節細胞が、RAC1突然変異体或いは野生型ペプチドで生体外で刺激され、CD3、CD8及び細胞内IFNの発現を分析した。図1は、CD3+ 細胞集団内のCD8+及びIFN + 細胞を示す(数によって示された%)。括弧は、CD8+ T細胞集団内のC

10

20

30

40

50

D8+及びIFN + T細胞の%が与えられる。

【 0 0 6 5 】

実施例 2： 本発明のRAC1及びTRRAP特異的TCR

表 3： 次のTCRを分離することができる。

【表 3】

TCR	Antigen	peptide/ purification	TCR sequence	CDR3*
T1	Rac-1	FSGEYIPTV	TRAV20*02-CAVQTSQGGSEKLVF-TRAJ57*01	28
		<i>IFNg-CAPTURE</i>	TRBV4-1*01-CASSQDASGIYYEQYF-TRBD2*02-TRBJ2-7*01	29
T2	Rac-1	FSGEYIPTV	TRAV13-1*01-CAASRGGGAQKLVF-TRAJ54*01	30
		<i>IFNg-CAPTURE</i>	TRBV3-1*01-CASSQLAGGPLYNEQFF-TRBD2*02-TRBJ2-1*01	31
T3/T4	Rac-1	FSGEYIPTV	TRAV5*01-CAESKRFSQKLLF-TRAJ16*01	32
		<i>A2-TETRAMER</i>	TRAV12-2*02-CAAQSARQLTF-TRAJ22*01	33
			TRBV20-1*01(/02)-CSARDLITDTQYF-TRBJ2-3*01	34
			TRBV3-1*01-CASSPWQETQYF-TRBJ2-5*01	35
T5	Rac-1	FSGEYIPTV	TRAV13-1*01 CAASLGSGNTPLVF-TRAJ29*01	36
		<i>A2-TETRAMER</i>	TRBV28*01 CASSLHSGRDTQYF-TRBJ2-3*01 TRBD2*02	37
T6	Rac-1	FSGEYIPTV	TRAV13-2*01 CAENRGANSKLTFF-TRAJ56*01	38
		<i>A2-TETRAMER</i>	TRBV12-3*01 CASSFTGGFYGYTF-TRBJ1-2*01 TRBD1*01	39
T7	TRRAP	KLVFGSVFL	TRAV17*01-CATDWTGANSKLTFF-TRAJ56*01	40
		<i>IFNg-CAPTURE</i>	TRBV6-2*01-CASSYSGYEQYF-TRBD1*01-TRBJ2-7*01	41

* 配列識別子

【 0 0 6 6 】

表 3 は、本発明の単離されたTCR(T1 ~ T7)の 及び 鎖配列を開示する。配列は、既知のTCR対立遺伝子配列、及び、本発明のTCRの特異的CDR3アミノ酸配列を示す。TCR対立遺伝子命名法はTCR対立遺伝子データベースIMGTに由来する。

(<http://www.imgt.org/vquest/refseqh.html#VQUEST>)Lefranc, M.-P. and Lefranc,G.The T cell receptor FactsBook Academic Press,London, UK (398 pages), (2001)

【 0 0 6 7 】

TCR 1~7のTCR鎖の可変領域は、SEQ ID NO 42~55で示される。

T3/T4については、本発明者は、チェーン・コンビネーションTRAV5/TRBV20-1(SEQ IDNO:32と34)が、Rac1四量体に特によい結合性を示すことを見出した。

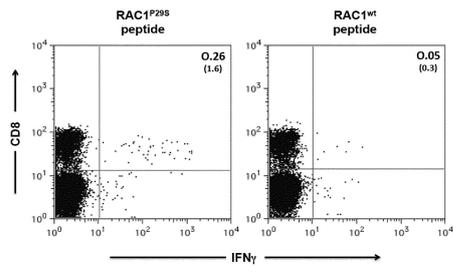
10

20

30

40

【 図 1 】



【 配列表 】

0006615612000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/09 (2010.01)	C 1 2 N	5/09
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17 Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
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	35/17 A
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
		A 6 1 K	38/00

- (72)発明者 ブランケンシュタイン, トーマス
ドイツ, 1 2 2 0 9 ベルリン, キースシュトラーセ 4 6
- (72)発明者 ヴィリムスキー, ゲラルト
ドイツ, 1 0 4 0 5 ベルリン, リケシュトラーセ 4 4

審査官 山本 匡子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 1 / 1 4 3 6 5 6 (WO, A 1)
Jelena Popovic, Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (online), 2 0 1 1 年, pp.1-98, [retrieved on 2017-09-11] Retrieved from the Internet: <URL: http://www.diss.fu-berlin.de/diss/servlets/MCRFileNodeServlet/FUDISS_derivate_000000012114/Jelena_Popovic_Dissertation_fin.pdf>
Nicholas P. Restifo, Nature Reviews Immunology, 2 0 1 2 年 4 月, Vol.12, pp.269-281

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0
C 1 2 N 1 / 0 0 - 5 / 2 8
C 0 7 K
C 1 2 P
C 1 2 Q
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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)