

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7577149号
(P7577149)

(45)発行日 令和6年11月1日(2024.11.1)

(24)登録日 令和6年10月24日(2024.10.24)

(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
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
請求項の数 17 外国語出願 (全31頁)				
(21)出願番号	特願2023-32695(P2023-32695)	(73)特許権者	517122578	
(22)出願日	令和5年3月3日(2023.3.3)		アダプティミューン・リミテッド	
(62)分割の表示	特願2018-552872(P2018-552872)の分割		イギリス国、オックスフォードシャー オーエックス 1 4 ・ 4 アールエックス , アビンドン, ミルトン・パーク, ジュ ビリー・アヴェニュー 6 0	
原出願日	平成29年4月10日(2017.4.10)	(74)代理人	100099623	
(65)公開番号	特開2023-81949(P2023-81949A)		弁理士 奥山 尚一	
(43)公開日	令和5年6月13日(2023.6.13)	(74)代理人	100125380	
審査請求日	令和5年4月3日(2023.4.3)		弁理士 中村 綾子	
(31)優先権主張番号	1606177.2	(74)代理人	100142996	
(32)優先日	平成28年4月8日(2016.4.8)		弁理士 森本 聡二	
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(74)代理人	100166268	
			弁理士 田中 祐	
		(74)代理人	100180231	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T細胞受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

HLA-A*0201と複合体形成したGVYDGREHTV（配列番号1）に結合するT細胞受容体（TCR）であって、当該TCRがTCRアルファ鎖可変ドメインおよびTCRベータ鎖可変ドメインを含み、
アルファCDR1が、VSPFSNであり、
アルファCDR2が、LTIMTF、または、LTIVTF、または、LTILTFであり、かつ、
アルファCDR3が、CVVSGGTDSWGKLQFであり、並びに、
ベータCDR1が、KGHDRであり、
ベータCDR2が、SFDVKであり、かつ、
ベータCDR3が、CATSGQGAYEEQFFである、TCR。

【請求項2】

アルファ鎖TRAV10+TRAC定常ドメイン配列およびベータ鎖TRBV24-1+TRBC-2定常ドメイン配列を有する、アルファ-ベータヘテロ二量体である、請求項1に記載のTCR。

【請求項3】

型Vα-L-Vβ、Vβ-L-Vα、Vα-Cα-L-Vβ、またはVα-L-Vβ-Cβの単鎖形式である、請求項1に記載のTCRであって、VαおよびVβがそれぞれTCRα可変領域およびTCRβ可変領域であり、CαおよびCβがそれぞれTCRα定常領

域および T C R β 定常領域であり、かつ、L がリンカー配列である、T C R。

【請求項 4】

検出可能な標識、治療剤または P K 改変部分と結合された、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 5】

前記 T C R アルファ鎖可変ドメインが、配列番号 3 の T C R アルファ鎖可変ドメインのアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または、

前記 T C R ベータ鎖可変ドメインが、配列番号 4 の T C R ベータ鎖可変ドメインのアミノ酸配列に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 6】

前記 T C R が、

(i) そのアミノ酸残基 1 ～ 27 の配列が、配列番号 3 のアミノ酸残基 1 ～ 27 の配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列であり、

(i i) アミノ酸残基 28 ～ 33 の配列が、V S P F S N であり、

(i i i) そのアミノ酸残基 34 ～ 47 の配列が、配列番号 3 のアミノ酸残基 34 ～ 47 の配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列であり、

(i v) アミノ酸残基 48 ～ 53 の配列が、L T I M T F または L T I V T F または L T I L T F であり、

(v) そのアミノ酸残基 54 ～ 90 の配列が、配列番号 3 のアミノ酸残基 54 ～ 90 の配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列であり、かつ、

(v i) アミノ酸 91 ～ 105 の配列が、C V V S G G T D S W G K L Q F である、
前記 T C R アルファ鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 7】

前記 T C R が、配列番号 3、7、または 8 のアミノ酸配列である前記 T C R アルファ鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 8】

前記 T C R が、

(i) そのアミノ酸残基 1 ～ 45 の配列が、配列番号 4 の残基 1 ～ 45 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列であり、

(i i) アミノ酸残基 46 ～ 50 の配列が、K G H D R であり、

(i i i) そのアミノ酸残基 51 ～ 67 の配列が、配列番号 4 のアミノ酸残基 51 ～ 67 の配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列であり、

(i v) アミノ酸残基 68 ～ 72 の配列が、S F D V K であり、

(v) そのアミノ酸残基 73 ～ 109 の配列が、配列番号 4 のアミノ酸残基 73 ～ 109 の配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有する配列であり、かつ、

(v i) アミノ酸 110 ～ 123 の配列が、C A T S G Q G A Y E E Q F F である、
前記 T C R ベータ鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 9】

前記 T C R が、配列番号 9 のアミノ酸配列である前記 T C R ベータ鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 10】

前記 T C R が、配列番号 3、7、および 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列である前記 T C R アルファ鎖可変ドメインと、配列番号 9 のアミノ酸配列である前記 T C R ベータ鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 11】

前記 T C R が、配列番号 8 のアミノ酸配列である前記 T C R アルファ鎖可変ドメインと、配列番号 9 のアミノ酸配列である前記 T C R ベータ鎖可変ドメインとを含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の T C R。

10

20

30

40

50

【請求項 12】

核酸によりコードされる TCR を提示している細胞であって、前記核酸が、

(A) (i) そのアミノ酸残基 1～27 の配列が、配列番号 3 のアミノ酸残基 1～27 の配列に対して少なくとも 90% の同一性を有し、

(ii) アミノ酸残基 28～33 の配列が、VSPFSN であり、

(iii) そのアミノ酸残基 34～47 の配列が、配列番号 3 のアミノ酸残基 33～47 の配列に対して少なくとも 90% の同一性を有し、

(iv) アミノ酸残基 48～53 の配列が、LTIMTF または LTI VTF または L T I L T F であり、

(v) そのアミノ酸残基 54～90 の配列が、配列番号 3 のアミノ酸残基 54～90 の配列に対して少なくとも 90% の同一性を有する、かつ

(vi) アミノ酸 91～105 の配列が、CVVSGGTD SWGKLQF である、TCR アルファ鎖可変ドメインと、

(B) (i) アミノ酸残基 1～45 の配列が、配列番号 4 の残基 1～45 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90% の同一性を有し、

(ii) アミノ酸残基 46～50 の配列が、KGHDR であり、

(iii) そのアミノ酸残基 51～67 の配列が、配列番号 4 のアミノ酸残基 51～67 の配列に対して少なくとも 90% の同一性を有し、

(iv) アミノ酸残基 68～72 の配列が、SFDVK であり、

(v) そのアミノ酸残基 73～109 の配列が、配列番号 4 のアミノ酸残基 73～109 の配列に対して少なくとも 90% の同一性を有し、かつ、

(vi) アミノ酸 110～123 の配列が、CATSGQGAYEEQFF である、TCR ベータ鎖可変ドメインと

を含む TCR をコードする、細胞であり、

前記 TCR が、HLA-A*0201 と複合体形成した GVYDGREHTV (配列番号 1) に結合する、細胞。

【請求項 13】

前記 TCR をコードする核酸が、配列番号 3、7、および 8 のアミノ酸配列からなる群から選択される TCR アルファ鎖可変ドメインと、配列番号 9 のアミノ酸配列である TCR ベータ鎖可変ドメインとを含む TCR をコードする、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 14】

前記 TCR をコードする核酸が、配列番号 8 のアミノ酸配列である TCR アルファ鎖可変ドメインと、配列番号 9 のアミノ酸配列である TCR ベータ鎖可変ドメインとを含む TCR をコードする、請求項 12 または 13 に記載の細胞。

【請求項 15】

1 種または複数の薬学的に許容される担体または添加剤と一緒に、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の TCR、請求項 12 から 14 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む医薬組成物。

【請求項 16】

薬における使用のための、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の TCR、または請求項 12 から 14 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 17】

がんを治療する方法における使用のための、請求項 16 に記載の TCR、または細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、黒色腫関連抗原 (MAGE) A4 タンパク質 (アミノ酸 230～239) 由来の HLA-A*0201 拘束デカペプチド GVYDGREHTV を結合する T 細胞受容体 (TCR) に関する。本発明の TCR は、この MAGE エピトープに対する優れた特異性プロフィールを示す。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

がん・精巣抗原（CTA）は、約140遺伝子によってコードされる腫瘍関連抗原（TAA）のサブクラスである。これらの抗原の発現は、精巣、胎盤および胎児卵巣などの免疫特権部位に限定される；それらは、他の組織内では通常は発現されない。これらの遺伝子の発現は、悪性腫瘍において認められている。CTAの免疫原性は、多くの固形腫瘍においてこれらの抗原を標的にするがんワクチンの広範な開発を導いてきた。このTAAの大きなクラスの中で、黒色腫関連抗原（MAGE）は、がん免疫療法のための有望な候補として浮かび上がってきている。

【0003】

30を超えるがん・精巣（CT）遺伝子が、染色体X上の遺伝子クラスター内に編成されている多遺伝子ファミリーのメンバーとして報告されている（CT-X抗原）。CT遺伝子クラスターは、Xq24およびXq28の間に位置し、MAGEおよびNY-ESO-1などの遺伝子ファミリーを含む。I型MAGE遺伝子クラスターは、最も広範囲に特徴づけられており、MAGE-A、MAGE-BおよびMAGE-Cファミリーを含む。MAGE-Aタンパク質は、異なる12のMAGE-A遺伝子ファミリーメンバー（MAGE-A1からMAGE-A12）によってコードされ、MAGE相同ドメイン（MHD）と呼ばれる、保存された165～171アミノ酸塩基によって定義される。MHDは、すべてのMAGE-Aファミリーメンバーによって共有されたアミノ酸の領域のみに相当する。

【0004】

T細胞は、ヒト白血球抗原（「HLA」）、または主要組織適合複合体（「MHC」）と呼ばれる、細胞表面分子とペプチドとの複合体を認識してそれらと相互作用する。ペプチドは、より大きな分子に由来し、これは、細胞によってプロセッシングされ、HLA/MHC分子も示す。T細胞とHLA/ペプチド複合体との相互作用は限定され、HLA分子およびペプチドの特定の組合せに特異的なT細胞を必要とする。特異的なT細胞が存在しない場合には、そのパートナー複合体が存在するとしてもT細胞応答はない。同様に、特定の複合体がない場合には、応答はないが、T細胞は存在する。このメカニズムは、感染に対する免疫系の応答に、自己免疫疾患に、かつ腫瘍などの異常に対する応答に関与している。

【0005】

いくつかのMAGE遺伝子ファミリータンパク質は、生殖細胞およびがんにおいてのみ発現される（MAGE-AからMAGE-Cファミリー）。他は、正常組織において広範に発現される（MAGE-DからMAGE-H）。これらすべてのMAGEタンパク質ファミリーは、他のMAGEタンパク質の配列と近似した相同領域を有し、かつ免疫認識においてHLA/ペプチド複合体として提示されるペプチドを含む。したがって、所望のMAGEペプチド/HLA-A2抗原に特異性が高いTCR臨床候補を選択することは重要である。

【0006】

MAGE A4は、MAGE A遺伝子ファミリーのCTAメンバーである。それは胚発生において役割を果たしうると考えられているが、その機能はまだ知られていない。腫瘍病因論では、それは、腫瘍形質転換または腫瘍進行の局面に関与するようである。MAGE A4は、精上皮腫、先天性角化不全症、黒色腫、肝細胞癌、腎細胞癌、膵臓がん、肺がん、大腸がんおよび乳がんを含む、多数の腫瘍に関与するとされている。ペプチドGVYDGREHTV（配列番号1）は、既知のMAGE-A4タンパク質のアミノ酸残基番号230～239に相当する。

【0007】

MAGE B2は、MAGE B遺伝子ファミリーのCTAである。MAGE B2は、精巣および胎盤、ならびに多様な組織学的な型の腫瘍の顕著な画分において発現される。ペプチドGVYDGEESHV（配列番号2）は、MAGE A4と交差反応性を示し

10

20

30

40

50

、それによって、ある種のTCRが、両方のペプチドを提示しているHLA分子に結合することができるようになる。

【発明の概要】

【0008】

本発明者らは、MAGE B2に優先して、MAGE A4ペプチドGVYDGREHTVを提示しているHLA分子に結合するTCRを開発した。第1の態様では、本発明は、可溶型のT細胞受容体(TCR)を使用して25℃、pH7.1から7.5の間で表面プラズモン共鳴で測定されるときに約0.05μMから約20.0μMまでの解離定数で、HLA-A*0201と複合体形成したGVYDGREHTV(配列番号1)に結合する特性を有するTCRであって、TCRは、TCRアルファ鎖可変ドメインおよびTCRベータ鎖可変ドメインを含み、TCR可変ドメインは、GVYDGREHTV(配列番号1)の少なくとも残基V2、Y3およびD4との接触を形成する、TCRを提供する。

10

【0009】

実施形態では、本発明によるTCRは、可溶型のTCRを使用して25℃、pH7.1から7.5の間で表面プラズモン共鳴で測定されるときに約20μMから約50μMまでの解離定数で、HLA-A*0201と複合体形成したGVYDGE EHSV(配列番号2)に結合する特性を有し、ここで、TCRは、TCRアルファ鎖可変ドメインおよびTCRベータ鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、解離定数は、50マイクロMを超え、例えば、100μM、200μM、500μMまたはそれ以上などである。

【0010】

20

したがって、本発明によるTCRは、GVYDGREHTVを提示しているHLAに効率良く結合する能力があるが、GVYDGE EHSVを提示しているHLAに効率良く結合する能力はない。

【0011】

一部の実施形態では、TCRのアルファ鎖可変ドメインは、配列番号3(アルファ鎖)のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／またはベータ鎖可変ドメインは、配列番号4(ベータ鎖)のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0012】

さらなる態様では、本発明は、HLA-A*0201と複合体形成したGVYDGREHTV(配列番号1)に結合する特性を有し、TCRアルファ鎖可変ドメインおよびTCRベータ鎖可変ドメインを含む、T細胞受容体(TCR)であって、

30

アルファ鎖可変ドメインは、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または

ベータ鎖可変ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、TCRを提供する。

【0013】

GVYDGREHTV HLA-A2複合体は、本発明のTCRが標的としうるがんマーカーを提供する。本発明は、がん細胞に細胞傷害剤または免疫エフェクター剤を送達する目的に有用な、かつ／または養子療法における使用に有用な、こうしたTCRを提供する。

40

【0014】

TCRは、国際免疫遺伝学(IMG T)TCR命名法、およびTCR配列のIMG T公的データベースへのリンクを使用して記載されている。天然のアルファベータヘテロ二量体TCRは、アルファ鎖およびベータ鎖を有する。概して、それぞれの鎖は、可変領域、連結領域および定常領域を含み、ベータ鎖は、通常、可変領域と連結領域との間に短い多様性領域も含むが、この多様性領域は、連結領域の部分とみなされることが多い。それぞれの可変領域は、フレームワーク配列内に埋め込まれた3つのCDR(相補性決定領域)を含み、1つは、CDR3と命名された超可変領域である。それらのフレームワーク、CDR1およびCDR2配列によって、ならびに部分的に定義されたCDR3配列によっ

50

て、区別されるいくつかの型のアルファ鎖可変 ($V\alpha$) 領域およびいくつかの型のベータ鎖可変 ($V\beta$) 領域がある。 $V\alpha$ 型は、IMGT 命名法において固有の TRAV 番号によって称される。したがって、「TRAV21」は、TCR から TCR までで保存されているが TCR から TCR までで異なるアミノ酸配列も含むアミノ酸配列によって部分的に定義される固有のフレームワークおよび CDR1 および CDR2 配列、ならびに CDR3 配列を有する TCR $V\alpha$ 領域を定義する。同様の方法で、「TRBV5-1」は、固有のフレームワークおよび CDR1 および CDR2 配列を有する TCR $V\beta$ 領域を定義するが、部分的にのみ定義された CDR3 配列を有する。

【0015】

TCR の連結領域は、固有の IMGT TRAJ および TRBJ 命名法によって、定常領域は、IMGT TRAC および TRBC 命名法によって、同様に定義される。

【0016】

ベータ鎖多様性領域は、IMGT 命名法において略語 TRBD によって称され、上記のように、連鎖状の TRBD/TRBJ 領域は、連結領域と一緒にみなされることが多い。

【0017】

$\alpha\beta$ TCR の α 鎖および β 鎖は、一般に、それぞれ2つの「ドメイン」、すなわち、可変ドメインおよび定常ドメインを有するとみなされる。可変ドメインは、可変領域および連結領域の連鎖からなる。本明細書および特許請求の範囲において、「TCR アルファ可変ドメイン」という用語は、したがって、TRAV および TRAJ 領域の連鎖を指し、TCR アルファ定常ドメインという用語は、細胞外 TRAC 領域、または C 末端トランケート型 TRAC 配列を指す。同様に、「TCR ベータ可変ドメイン」という用語は、TRBV および TRBD/TRBJ 領域の連鎖を指し、TCR ベータ定常ドメインという用語は、細胞外 TRBC 領域、または C 末端トランケート型 TRBC 配列を指す。

【0018】

IMGT 命名法によって定義される固有の配列は、TCR 分野における当業者に広く知られており、利用可能である。例えば、それらは、IMGT 公的データベースにおいて見出されうる。“T cell Receptor Factsbook”, (2001) LeFranc and LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8 も、IMGT 命名法によって定義される配列を開示しているが、その公開日および結果として生じる時間のずれのため、その中の情報は、時に、IMGT データベースの参照による確認を必要とする。

【0019】

本発明による1つの TCR は、配列番号2 (TRAV10+TRAC) に示されているようなアルファ鎖細胞外ドメインおよび配列番号3 (TRBV24-1+TRBC-2) に示されているようなベータ鎖細胞外ドメインを含む。「親 TCR」、「親 MAGE-A4 TCR」という用語は、本明細書において同義的に使用され、配列番号2および3それぞれの細胞外アルファ鎖およびベータ鎖を含むこの TCR を指す。ペプチド-HLA 複合体に対して親 TCR よりも高い親和性および／または遅い解離速度を有する、親 TCR に対して相対的に変異または修飾された TCR を提供することは望ましい。

【0020】

こうした変異または修飾された TCR の結合プロフィールが比較されうるものに対する参照 TCR を提供する目的で、配列番号3に示されている親 MAGE-A4 TCR アルファ鎖の細胞外配列および配列番号4に示されている親 MAGE-A4 TCR ベータ鎖の細胞外配列を有する本発明による可溶性 TCR を使用することは都合がいい。その TCR は、本明細書において、「参照 TCR」または「参照 MAGE-A4 TCR」と称される。配列番号5は、配列番号3の親アルファ鎖細胞外配列を含み、また T162 (すなわち、TRAC の T48) から C162 に置換されていることに留意されたい。同様に、配列番号6は、配列番号4の親ベータ鎖細胞外配列であり、また S169 (すなわち、TRBC2 の S57) から C169 に置換され、C187 から A187 に置換され、N201 から D201 に置換されている。親アルファ鎖および親ベータ鎖細胞外配列に対して相

10

20

30

40

50

対的なこれらのシステイン置換は、リフォールディングされた可溶性TCR、すなわち、細胞外アルファ鎖およびベータ鎖をリフォールディングすることによって形成されたTCRを安定化する鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。安定なジスルフィドで連結された可溶性TCRを参照TCRとして使用することにより、結合親和性および結合半減期のさらに好都合な評価が可能となる。本発明のTCRは、上記の変異を含んでいてもよい。

【0021】

本発明のTCRは、天然に存在しないものであってもよく、かつ／または精製および／もしくは改変されていてもよい。本発明のTCRは、親TCRに対して相対的なアルファ鎖可変ドメインおよび／またはベータ鎖可変ドメインに存在する2つ以上の変異を有していてもよい。「改変TCR」および「変異体TCR」は、本明細書において同義的に使用され、親TCRに対して相対的に、特に、そのアルファ鎖可変ドメインおよび／またはベータ鎖可変ドメイン内に、導入された1つまたは複数の変異を有するTCRを一般に意味する。これらの変異は、HLA-A*020101と複合体形成したGVYDGRHTV（配列番号1）に対する結合親和性を改良しうる。ある特定の実施形態では、アルファ鎖可変ドメイン内に1、2、3、4、5、6、7つまたは8つの変異、例えば、4つまたは8つの変異があり、かつ／またはベータ鎖可変ドメイン内に1、2、3、4つまたは5つの変異、例えば、5つの変異がある。一部の実施形態では、本発明のTCRのα鎖可変ドメインは、配列番号3のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、本発明のTCRのβ鎖可変ドメインは、配列番号4のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0022】

本発明のTCRのアルファ鎖可変ドメインは、配列番号3に示されている番号付けを参照して

【表1】

M4	VまたはL
----	-------

の変異を有していてもよく、かつ／または

ベータ鎖可変ドメインは、配列番号4に示されている番号付けを参照して

【表2】

N10	E
-----	---

の変異のうちの少なくとも1つを有していてもよい。

【0023】

本発明のTCRのアルファ鎖可変ドメインは、配列番号3もしくは5もしくは7～8のアミノ酸残基1～105のアミノ酸配列

またはそのアミノ酸残基1～27、34～47および54～90がそれぞれ配列番号3もしくは5もしくは7～8のアミノ酸残基1～27、34～47および54～90の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有し、アミノ酸残基28～33、48～53および91～105がそれぞれ配列番号3もしくは5もしくは7～8のアミノ酸残基28～33、48～53および91～105の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0024】

アルファ鎖可変ドメインにおいて

(i) そのアミノ酸残基1～26の配列は、(a) 配列番号3のアミノ酸残基1～26の配列に対して少なくとも90%の同一性を有していてもよく、または(b) (a)の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された1つ、2つまたは3つのアミノ酸残基を有していてもよく、

(ii) アミノ酸残基28～33の配列は、VSPFSNであり、

(iii) そのアミノ酸残基33～49の配列は、(a) 配列番号3のアミノ酸残基34～47の配列に対して少なくとも90%の同一性を有していてもよく、または(b) (a)の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された1つ、2つまたは3つのアミノ酸残基を有していてもよく、

(iv) アミノ酸残基48～53の配列は、LTIMTFまたはLTRMTFまたはLTI VTFまたはLTILTFであってもよく、

(v) そのアミノ酸残基55～89の配列は、配列番号3のアミノ酸残基54～90の配列に対して少なくとも90%の同一性を有していてもよく、またはそれに対して相対的に1つ、2つまたは3つの挿入、欠失もしくは置換を有していてもよく、

(vi) アミノ酸90～93の配列は、CVVSGGTD SWGKLQFであってもよい。

【0025】

本発明のTCRのベータ鎖可変ドメインは、配列番号4もしくは6もしくは9のアミノ酸配列

またはそのアミノ酸残基1～45、51～67、74～109がそれぞれ配列番号4もしくは9のアミノ酸残基1～45、51～67、74～109の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有し、アミノ酸残基46～50、68～73および109～123がそれぞれ配列番号4もしくは9のアミノ酸残基46～50、68～73および109～123の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有するアミノ酸配列

を含んでいてもよい。

【0026】

ベータ鎖可変ドメインにおいて

(i) そのアミノ酸残基1～45の配列は、(a) 配列番号4の残基1～45のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有していてもよく、または(b) (a)の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された1つ、2つまたは3つのアミノ酸残基を有していてもよく、

(ii) アミノ酸残基46～50の配列は、KGHDRであってもよく、

(iii) そのアミノ酸残基51～67の配列は、(a) 配列番号4のアミノ酸残基51～67の配列に対して少なくとも90%の同一性を有していてもよく、または(b) (a)の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された1つ、2つまたは3つのアミノ酸残基を有していてもよく、

(iv) アミノ酸残基68～73の配列は、SVFDKであってもよく、

(v) そのアミノ酸残基54～90の配列は、(a) 配列番号4のアミノ酸残基54～90の配列に対して少なくとも90%の同一性を有していてもよく、または(b) (a)の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された1つ、2つまたは3つのアミノ酸残基を有していてもよく、

(vi) アミノ酸109～123の配列は、CATSGQGAYNEQFFまたはCATSGQGAYREQFFである。

【0027】

本発明のTCRは、以下のアルファ鎖およびベータ鎖可変ドメインの組合せのうちの1つを有していてもよい：

10

20

30

40

50

【表 3】

アルファ鎖配列番号	ベータ鎖配列番号
3	4
3	6
3	9
5	4
5	6
5	9
7	4
7	6
7	9
8	4
8	6
8	9

10

20

【0028】

本明細書中に開示されている本発明のいずれのTCRの表現型的にサイレントなバリエーションも本発明の範囲内である。本明細書中で使用される場合、「表現型的にサイレントなバリエーション」という用語は、上記のものに加えて1つまたは複数のさらなるアミノ酸変更を組み込むTCRであって前記変更を含まない対応するTCRと類似した表現型を有するTCRを指すことが理解される。本出願の目的で、TCR表現型には、抗原結合特異性（ K_D および／または結合半減期）および抗原特異性が含まれる。表現型的にサイレントなバリエーションは、同一条件下で（例えば、25℃、同じSPRチップ上で）測定されたときに、前記変更を含まない対応するTCRの測定された K_D および／または結合半減期の10%以内の、GVYDGREHTV（配列番号1）HLA-A*0201複合体に対する K_D および／または結合半減期を有していてもよい。好適な条件は、実施例3においてさらに定義されている。抗原特異性は、以下でさらに定義されている。当業者に知られているように、GVYDGREHTV（配列番号1）HLA-A*0201複合体との相互作用のための親和性を変えることなく、上記に詳述されているものと比較して、その定常ドメインおよび／または可変ドメイン内に変更を組み込むTCRを作製することが可能でありうる。特に、こうしたサイレントな変異は、抗原結合に直接に関与しないことが知られている配列の部分内（例えば、CDRの外側）に組み込まれうる。こうした些細なバリエーションは、本発明の範囲内に含まれる。1つまたは複数の保存的置換がなされているTCRも、本発明の部分構成する。

30

40

【0029】

変異は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に基づいたもの、制限酵素に基づいたクロー

50

ニング、またはライゲーション非依存性クローニング（LIC）手順を含むが、これらに限定されない、任意の適切な方法を使用して行われうる。これらの方法は、多くの標準的な分子生物学教科書の中で詳述されている。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および制限酵素に基づいたクローニングに関するさらなる詳細については、Sambrook & Russell, (2001) Molecular Cloning – A Laboratory Manual (3rd Ed.) CSHL Pressを参照されたい。ライゲーション非依存性クローニング（LIC）手順についてのさらなる情報は、Rashchian, (1995) Curr Opin Biotechnol 6 (1): 30–6において見出されうる。

【0030】

本発明のTCRは、MAGE-A4ペプチド、GVYDGREHTV（配列番号1）HLA-A2複合体を結合する特性を有する。本発明のTCRは、他の、関連性のないエピトープに対して相対的に、そのMAGEエピトープに対する特異性が高いことが見出されており、したがって、そのエピトープを提示している細胞および組織に治療剤または検出可能な標識を送達するためのターゲティングベクターとして特に好適である。本発明のTCRの文脈における特異性は、ペプチドGVYDGREHTVについて陰性であるHLA-A*0201標的細胞、またはMAGE B2ペプチドGVYDGEESHVを提示するHLA細胞を認識するきわめて低い能力を有するのに対して、該ペプチドGVYDGREHTVについて陽性であるHLA-A*0201標的細胞を認識する本発明のTCRの能力に関する。特異性を試験するために、TCRは、可溶型であってもよく、かつ／またはT細胞の表面上で発現されてもよい。認識は、TCRおよび標的細胞の存在下におけるT細胞活性化のレベルを測定することによって決定されうる。この場合には、ペプチド陰性またはMAGE B2標的細胞の最低限の認識は、同じ条件下で測定されたときに、ペプチド陽性標的細胞の存在下で産生されるレベルの10%未満、好ましくは、5%未満、より好ましくは、1%未満のT細胞活性化のレベルとして定義される。本発明の可溶性TCRについて、特異性は、治療的に関連するTCR濃度で決定されうる。治療的に関連する濃度は、 10^{-9} M以下のTCR濃度として、かつ／または対応するEC₅₀値よりも最高100倍、好ましくは、最高1000倍高い濃度として定義されうる。ペプチド陽性細胞は、ペプチドをパルスすることによって得られてもよく、または、より好ましくは、それらは天然に存在する前記ペプチドであってもよい。好ましくは、ペプチド陽性細胞およびペプチド陰性細胞の両方がヒト細胞である。

【0031】

本発明のある特定のTCRは、養子療法における使用にきわめて好適であることが見出されている。こうしたTCRは、200 μM未満、例えば、約0.05 μMから約20 μMまたは約100 μMまでの、複合体に対するK_Dを有していてもよく、かつ／または約0.5秒から約12分までの範囲内の、複合体に対する結合半減期（T_{1/2}）を有していてもよい。一部の実施形態では、本発明のTCRは、約0.05 μMから約20 μM、約0.1 μMから約5 μMまたは約0.1 μMから約2 μMまでの、複合体に対するK_Dを有しうる。理論に拘束されることを望むものではないが、養子細胞療法における治療的使用を伴うTCRに対する親和性の最適枠があるようである。腫瘍抗原からエピトープを認識する天然に存在するTCRは、一般に、親和性が低すぎ（20マイクロMから50マイクロM）、（ナノモル範囲内またはそれより高い）きわめて高い親和性のTCRは、交差反応性の問題を持つ（Robbins et al (2008) J. Immunol. 180 6116–6131; Zhao et al (2007) J. Immunol. 179 5845–5854; Schmid et al (2010) J. Immunol 184 4936–4946）。

【0032】

本発明のTCRは、αβヘテロ二量体であってもよくまたは単鎖形式であってもよい。単鎖形式には、Vα-L-Vβ、Vβ-L-Vα、Vα-Cα-L-VβまたはVα-L-Vβ-Cβ型のαβTCRポリペプチドが含まれ、VαおよびVβはそれぞれTCRα

可変領域およびTCR β 可変領域であり、C α およびC β はそれぞれTCR α 定常領域およびTCR β 定常領域であり、Lはリンカー配列である。治療剤を抗原提示細胞に送達するためのターゲティング剤としての使用のために、TCRは、可溶型（すなわち、膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインを有していない）であってもよい。安定性のために、可溶性 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体TCRは、例えば、WO03/020763に、記載されているように、それぞれの定常ドメインの残基間に導入されたジスルフィド結合を有することが好ましい。本発明の $\alpha\beta$ ヘテロ二量体内に存在する定常ドメインのうちの1つまたは両方は、例えば、多くとも15個、または多くとも10個もしくは多くとも8個の、またはそれより少ないアミノ酸だけ、C末端でトランケートされていてもよい。養子療法における使用のために、 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体TCRは、例えば、細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインの両方を有する完全長の鎖としてトランスフェクトされてもよい。養子療法における使用のためのTCRは、自然界においてそれぞれのアルファ定常ドメインとベータ定常ドメインとの間に見出されるものと一致しているジスルフィド結合を含んでいてもよく、付加的にまたは代替的に、天然でないジスルフィド結合が存在していてもよい。

【0033】

当業者には明らかであろうように、TCRの結合特性に実質的に影響を及ぼすことなく、所与の配列をそのC末端および／またはN末端で、1、2、3、4、5つまたはそれ以上の残基だけ、トランケートすることも可能でありうる。すべてのこうした些細なバリエーションは、本発明によって包含される。

【0034】

本発明のアルファベータヘテロ二量体TCRは、通常、アルファ鎖TRAC定常ドメイン配列およびベータ鎖TRBC1またはTRBC2定常ドメイン配列を含む。アルファ鎖およびベータ鎖定常ドメイン配列は、TRACのエクソン2のCys4とTRBC1またはTRBC2のエクソン2のCys2との間の天然のジスルフィド結合を欠失させるためのトランケーションまたは置換によって修飾されていてもよい。アルファ鎖およびベータ鎖定常ドメイン配列は、TRACのThr48およびTRBC1またはTRBC2のSer57についてのシステイン残基の置換によっても修飾されていてもよく、前記システインは、TCRのアルファ定常ドメインとベータ定常ドメインとの間でジスルフィド結合を形成する。

【0035】

本発明のいくつかのTCRは、参照MAGE-A4 TCRのものよりも実質的に高いGVYDGREHTV-HLA-A2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。天然のTCRの結合親和性を高めると、そのペプチド-MHCリガンドに対するTCRの特異性が低下されることが多く、これは、Zhao Yangbing et al., The Journal of Immunology, The American Association of Immunologists, US, vol. 179, No. 9, 1 November 2007, 5845-5854において実証されている。しかし、親TCRに由来する本発明のTCRは、親TCRよりも実質的に高い結合親和性を有しているにもかかわらず、GVYDGREHTV-HLA-A2複合体に対する特異性を維持している。さらに、それらは、MAGE-B2を超えMAGE-A4について親TCRよりも顕著に（例えば、少なくとも10倍）選択的である。

【0036】

結合親和性（平衡定数 K_D に反比例する）および結合半減期（ $T_{1/2}$ と表される）は、本明細書中の実施例3の表面プラズモン共鳴（BIACore）法を使用して決定される。測定は、可溶型のTCRを使用して25℃、pH7.1から7.5の間で行われる。TCRの親和性が2倍になると、結果として K_D は半分になることは理解されよう。 $T_{1/2}$ は、解離速度（ k_{off} ）によって除算された $\ln 2$ として算出される。したがって、 $T_{1/2}$ が2倍になると、結果として k_{off} は半分になる。TCRについての K_D および k_{off} 値は、通常、可溶型、すなわち、トランケートされて疎水性膜貫通ドメイン残基が除去された形態のTCRについて測定される。したがって、所与のTCRは、

10

20

30

40

50

そのTCRの可溶型がその必要条件を満たす場合には、それが、GVYDGREHTV-HLA-A2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という必要条件を満たすことが理解されるべきである。好ましくは、所与のTCRの結合親和性または結合半減期は、同じアッセイプロトコルを使用して、数回、例えば、3回以上測定され、結果の平均がとられる。参照MAGE-A4 TCRは、その方法によって測定された場合に約65 μ MのK_Dを有し、そのk_{off}は約0.73/秒である（すなわち、T_{1/2}は約0.95秒である）。

【0037】

さらなる態様では、本発明は、本発明のTCRをコードする核酸を提供する。一部の実施形態では、核酸は、cDNAである。一部の実施形態では、本発明は、本発明のTCRの α 鎖可変ドメインをコードする配列を含む核酸を提供する。一部の実施形態では、本発明は、本発明のTCRの β 鎖可変ドメインをコードする配列を含む核酸を提供する。核酸は、天然に存在しないものであってもよく、かつ／または精製および／もしくは改変されていてもよい。

【0038】

別の態様では、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。好ましくは、ベクターは、TCR発現ベクターである。

【0039】

本発明は、本発明のベクター、好ましくは、TCR発現ベクターを宿している細胞も提供する。ベクターは、単一のオープンリーディングフレーム、または2つの異なるオープンリーディングフレームにおいて、アルファ鎖およびベータ鎖をそれぞれコードする本発明の核酸を含んでいてもよい。別の態様は、本発明のTCRのアルファ鎖をコードする核酸を含む第1の発現ベクター、および本発明のTCRのベータ鎖をコードする核酸を含む第2の発現ベクターを宿している細胞を提供する。こうした細胞は、養子療法において特に有用である。本発明の細胞は、単離されていてもよく、かつ／または組換え体および／または天然に存在しないものであってもよく、かつ／または改変されていてもよい。

【0040】

本発明のTCRは、養子療法における有用性を有するので、本発明には、本発明のTCRを提示している、天然に存在しないかつ／または精製および／もしくは改変された細胞、特に、T細胞が含まれる。本発明は、本発明のTCRを提示しているT細胞の増殖した集団も提供する。本発明のTCRをコードする核酸（DNA、cDNAまたはRNAなど）でのT細胞のトランスフェクションに好適ないくつかの方法がある（例えば、Robbins et al., (2008) J Immunol. 180:6116-6131を参照されたい）。本発明のTCRを発現しているT細胞は、養子療法に基づいたがんの治療における使用に好適となる。当業者には知られているであろうように、養子療法が行われうるいくつかの好適な方法がある（例えば、Rosenberg et al., (2008) Nat Rev Cancer 8(4):299-308を参照されたい）。

【0041】

本発明の可溶性TCRは、抗原提示細胞および抗原提示細胞を含む組織に対する検出可能な標識または治療剤を送達するのに有用である。したがって、（GVYDGREHTV-HLA-A2複合体を提示している細胞の存在を検出するためにTCRが使用される、診断目的のための）検出可能な標識；治療剤；または（例えば、ペグ化による）PK修飾部分と（共有結合または他の方法で）結合されていてもよい。

【0042】

診断目的のための検出可能な標識としては、例えば、蛍光標識、放射標識、酵素、核酸プローブおよびコントラスト試薬が含まれる。

【0043】

本発明のTCRと結合されうる治療剤としては、免疫調節物質、放射性化合物、酵素（例えばパーフォリン）または化学療法剤（例えばシスプラチン）が含まれる。毒性作用が

10

20

30

40

50

望ましい部位において果たされることを確実にするために、毒素は、化合物がゆっくりと放出されるように、T C Rに連結されたリポソームの中にあってもよい。これは、体内での輸送中の損傷作用を防止することになり、関連する抗原提示細胞に対するT C Rの結合後に毒素が最も高い効果を有することを確実にする。

【0044】

他の好適な治療剤としては、

- ・ 小分子細胞傷害剤、すなわち、700ダルトン未満の分子量を有し、哺乳動物細胞を死滅させる能力を有する化合物。こうした化合物としては、細胞傷害作用を有する能力のある毒性金属も含まれる。さらに、これらの小分子細胞傷害剤としては、プロドラッグ、すなわち、生理学的な条件下で壊変してまたは変換されて細胞傷害剤を放出する化合物も含まれることが理解されるべきである。こうした作用剤の例には、シスプラチン、メイタンシン誘導体、ラシエルマイシン、カリケアマイシン、ドセタキセル、エトポシド、ゲムシタビン、イホスファミド、イリノテカン、メルファラン、ミトキサントロン、ソルフィマーソディウムフォトリニンII (s o r f i m e r s o d i u m p h o t o f r i n I I)、テモゾロミド、トポテカン、トリメトレートグルクロネート (t r i m e t r e a t e g l u c u r o n a t e)、オーリスタチンE、ビンクリスチンおよびドキソルビシンが含まれる；

- ・ ペプチド細胞毒素、すなわち、哺乳動物細胞を死滅させる能力を有するタンパク質またはその断片。例えば、リシン、ジフテリア毒素、シュードモナス細菌外毒素A、DNアーゼおよびRNアーゼ；

- ・ 放射性核種、すなわち、 α 粒子もしくは β 粒子、または γ 線のうちの1つまたは複数の同時発生的な放出を伴って壊変する元素の不安定同位体。例えば、ヨウ素131、レニウム186、インジウム111、イットリウム90、ビスマス210および213、アクチニウム225ならびにアスタチン213；高親和性T C R、またはその多量体に対するこれらの放射性核種の結合を促進するためにキレート化剤が使用されてもよい；

- ・ 免疫刺激剤、すなわち、免疫応答を刺激する免疫エフェクター分子。例えば、IL-2およびIFN- γ などのサイトカイン、

- ・ スーパー抗原およびその変異体；

- ・ T C R-H L A融合体；

- ・ ケモカイン、例えば、IL-8、血小板第4因子、黒色腫増殖刺激タンパク質など；

- ・ 抗T細胞または抗NK細胞決定因子抗体（例えば、抗CD3、抗CD28または抗CD16）を含む、抗体またはその断片；

- ・ 抗体様結合特性を有する代替のタンパク質足場

- ・ 補体活性化因子；

- ・ 異種のタンパク質ドメイン、同種異系のタンパク質ドメイン、ウイルス／細菌のタンパク質ドメイン、ウイルス／細菌のペプチドが含まれる。

【0045】

好ましい一実施形態は、抗CD3抗体、または前記抗CD3抗体の機能的な断片もしくはバリエーション（通常、アルファ鎖またはベータ鎖のN末端またはC末端への融合によって）結合された本発明のT C Rによって提供される。本明細書に記載の組成物および方法における使用に好適である抗体断片およびバリエーション／アナログとしては、ミニボディ、Fab断片、F(a b')₂断片、dsFvおよびscFv断片、Nanobodies（商標）(A b l y n x (B e l g i u m))によって市販されている、これらのコンストラクトは、ラクダ科動物（例えば、ラクダまたはラマ）抗体に由来する合成単一免疫グロブリン可変重鎖ドメインを含む）ならびにドメイン抗体(D o m a n t i s (B e l g i u m))、親和性が成熟した単一の免疫グロブリン可変重鎖ドメインまたは免疫グロブリン可変軽鎖ドメインを含む）または抗体様結合特性を示す代替のタンパク質足場、ほんの少し例を挙げれば、A f f i b o d i e s (A f f i b o d y (S w e d e n))、改変され

10

20

30

40

50

たプロテインA足場を含む)またはAnticalins (Pieris (German)、改変されたアンチカリンを含む)などが含まれる。

【0046】

いくつかの目的のために、本発明のTCRは、数種類のTCRを含む複合体に凝集されて多価TCR複合体を形成していてもよい。多価TCR複合体の生成において使用される、多量体化ドメインを含むいくつかのヒトタンパク質がある。例えば、p53の四量体化ドメイン、これは、単量体scFv断片と比較して、血清残留性の上昇および解離速度の顕著な低下を示す、scFv抗体断片の四量体を生成するために利用されてきた(Willuda et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392)。ヘモグロビンも、この種類の適用に潜在的に使用される四量体化ドメインを有する。本発明の多価TCR複合体は、多量体でない野生型または本発明のT細胞受容体ヘテロ二量体と比較して、GVYDGREHTV HLA-A2複合体に対する増強された結合能力を有する。したがって、本発明のTCRの多価複合体も本発明の範囲内に含まれる。本発明によるこうした多価TCR複合体は、in vitroまたはin vivoで特定の抗原を提示している細胞をトラッキングまたはターゲティングするのに特に有用であり、こうした使用を有するさらなる多価TCR複合体の生成のための中間体としても有用である。

【0047】

当技術分野においてよく知られているように、TCRには、翻訳後修飾が行われうる。グリコシル化は、1つのこうした修飾であり、これは、TCR鎖における定められたアミノ酸に対するオリゴ糖部分の共有結合的付加を含む。例えば、アスパラギン残基、またはセリン/スレオニン残基は、よく知られているオリゴ糖付加のための部位である。特定のタンパク質のグリコシル化状態は、タンパク質配列、タンパク質高次構造および特定の酵素の有用性を含む、いくつかの要因に依存する。さらに、グリコシル化状態(すなわち、オリゴ糖型、共有結合および付加の総数)は、タンパク質機能に影響する。したがって、組換えタンパク質を製造するとき、グリコシル化を制御するのが望ましいことが多い。制御されたグリコシル化は、抗体に基づいた療法を改良するために使用されてきた。(Jefferys R., Nat Rev Drug Discov. 2009 Mar; 8 (3): 226-34.)。本発明の可溶性TCRに対して、グリコシル化は、in vivoで、例えば、特定の細胞株を使用することによって、またはin vitroで、化学修飾によって、制御されてもよい。グリコシル化は、薬物動態を改良すること、免疫原性を低下させること、および天然のヒトタンパク質をより密接に模倣することができるので、こうした修飾は望ましい(Sinclair AM and Elliott S., Pharm Sci. 2005 Aug; 94 (8): 1626-35)。

【0048】

患者への投与のために、(通常、検出可能な標識または治療剤と結合された)本発明のTCR、核酸および/または細胞は、薬学的に許容される担体または添加剤と一緒に医薬組成物中で提供されてもよい。本発明による治療用またはイメージング用TCRは、通常、薬学的に許容される担体を通常は含むであろう無菌の医薬組成物の部分として供給されることになる。この医薬組成物は、(患者にそれを投与する望ましい方法に依存して)いかなる好適な形態であってもよい。それは、単位剤形で提供されてもよく、一般には密封された容器内で提供されることになり、キットの部分として提供されてもよい。こうしたキットには、通常は(必ずではないが)、使用のための説明書が含まれるはずである。それは、複数の前記単位剤形を含んでいてもよい。

【0049】

医薬組成物は、任意の適切な経路、好ましくは、非経口(皮下、筋肉内、または好ましくは静脈内を含む)経路による投与用に構成されていてもよい。こうした組成物は、製薬の分野において知られている任意の方法によって、例えば、無菌条件下で活性成分を担体または添加剤と混合することによって調製される。

【0050】

本発明の物質の用量は、治療される疾患または障害、治療される個体の年齢および状態などによって広い範囲の間で変化しえ、医師が、使用される適切な用量を最終的に決定することになる。

【0051】

本発明のTCR、医薬組成物、ベクター、核酸および細胞は、実質的に純粋な形態で、例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%純粋で、提供されてもよい。

【0052】

本発明によってさらに提供されるのは、以下である：

- ・ 医学における使用のための、好ましくは、がん、例えば、固形腫瘍（例えば、肺、肝臓および胃の転移巣）および／または扁平上皮癌などを治療する方法における使用のための、本発明のTCR、核酸または細胞。

- ・ がんを治療するための医薬品の製造における本発明のTCR、核酸または細胞の使用。

- ・ 患者に本発明のTCR、核酸または細胞を投与することを含む、患者においてがんを治療する方法。

【0053】

本発明のそれぞれの態様の好ましい特徴は、必要な変更を加えて他の態様のそれぞれについてのものと同様である。本明細書において言及されている従来技術文献は、法律によって許可される最大限の範囲まで組み込まれている。

【0054】

本発明は、以下の非限定的な実施例においてさらに記載される。

【0055】

添付の配列が参照され、そこでは、
配列番号1は、MAGE A4ペプチドであり
配列番号2は、MAGE B2ペプチドである

【0056】

配列番号3は、親MAGE-A4特異的TCRのアルファ鎖の細胞外部分のアミノ酸配列であり、かつ配列番号4は、親MAGE-A4特異的TCRベータ鎖アミノ酸配列のベータ鎖の細胞外部分のアミノ酸配列を示す。

【0057】

配列番号5は、（本明細書において「参照TCR」と称される）天然のLenti TCRのアルファ鎖のアミノ酸配列を示す。配列は、T162（すなわち、TRAC定常領域のT48）にシステインが置換されることを除いて親TCRのものと同一である。配列番号6は、（本明細書において「参照TCR」と称される）天然のLenti TCRのベータ鎖である。配列は、システインがS169（すなわち、TRBC2定常領域のS57）に置換され、A187がC187に置換され、D201がN201に置換されることを除いて親TCRのものと同一である。

【0058】

配列番号7および8は、本発明のTCR内に存在しうるアルファ鎖の配列を示す。CDR領域を形成している部分配列、またはCDR領域の実質的な部分は、下線付きである。

【0059】

配列番号9は、本発明のTCR内に存在しうるベータ鎖の配列を示す。CDR領域を形成している部分配列、またはCDR領域の実質的な部分は下線付きである。

【0060】

配列番号10から15は、TCR A、BおよびCの可溶性のアルファ鎖およびベータ鎖の配列を示す。これらのTCRのいずれも、本発明による機能的TCRに発展させることはできなかった。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0061】

[実施例1]

pGMT7に基づく発現プラスミド内への参照MAGE-A4 TCRアルファ鎖およびベータ鎖可変領域配列のクローニング

それぞれ配列番号3および4の親MAGE-A4 TCR可変アルファドメインおよびTCR可変ベータドメインは、C α またはC β のいずれかを含むpGMT7に基づく発現プラスミド内に、(SambrookおよびRussellによるMolecular Cloning a Laboratory Manual Third edition)に記載されている標準的な方法によってクローニングされた。プラスミドは、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzerを使用してシーケンスされた。それぞれ配列番号4および5の参照MAGE-A4 TCR可変アルファドメインおよびTCR可変ベータドメインは、同様の方法でクローニングされた。

【0062】

TCRアルファ鎖可変領域をコードするDNA配列は、制限酵素で切断された、pEX956内にライゲーションされた。TCRベータ鎖可変領域をコードするDNA配列は、同じく制限酵素で切断された、pEXb21内にライゲーションされた。

【0063】

ライゲーションされたプラスミドは、コンピテントな大腸菌(E. coli)株XL1-blue細胞内に形質転換され、100 μ g/mLのアンピシリンを含むLB/寒天プレート上に播種された。37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーション後、単一コロニーが採取され、100 μ g/mLのアンピシリンを含む5mLのLB中で37 $^{\circ}$ Cで振盪しながら一晩培養された。クローニングされたプラスミドは、Miniprepキット(Qiagen)を使用して精製され、プラスミドは、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzerを使用してシーケンスされた。

【0064】

[実施例2]

可溶性参照MAGE-A4 TCRの発現、リフォールディングおよび精製

実施例1において調製されるような、参照TCR α 鎖および β 鎖をそれぞれ含む発現プラスミドが大腸菌株BL21pLysS内に別々に形質転換され、単一のアンピシリン耐性コロニーがTYP(アンピシリン100 μ g/mL)培地中で37 $^{\circ}$ Cで約0.6~0.8のOD₆₀₀まで培養された後に、0.5mMのIPTGでタンパク質発現が誘発された。細胞は、導入3時間後に、Beckman J-6B内で4000rpmで30分間の遠心分離によって回収された。細胞ペレットは、MgCl₂およびDNアーゼIの存在下で25mLのBug Buster(NovaGen)で溶解された。封入体ペレットは、Beckman J2-21遠心分離機内で13000rpmで30分間の遠心分離によって回収された。次いで、3回の界面活性剤での洗浄が行われて細胞デブリおよび膜成分が除去された。封入体ペレットは、毎回、Tritonバッファー(50mM Tris-HCl pH8.0、0.5% Triton-X100、200mM NaCl、10mM NaEDTA)中でホモジナイズされた後に、Beckman J2-21内で13000rpmで15分間の遠心分離によってペレット化された。次いで、以下のバッファー: 50mM Tris-HCl pH8.0、1mM NaEDTA中での同様の洗浄によって界面活性剤および塩が除去された。最終的に、封入体は、30mgの一定分量に小分けされて-70 $^{\circ}$ Cで凍結された。封入体タンパク質の収量は、6Mのグアニジン-HClで可溶化することによって定量化され、OD測定は、日立U-2001分光光度計上で行われた。次いで、吸光係数を使用してタンパク質濃度が算出された。

【0065】

約15mgのTCR α 鎖および15mgのTCR β 鎖の可溶化封入体が凍結ストックから解凍され、確実に完全に鎖変性するように、10mLのグアニジン溶液(6M 塩酸グアニジン、50mM Tris HCl pH8.1、100mM NaCl、10mM

10

20

30

40

50

EDTA、10mM DTT) 中に希釈された。完全に還元および変性されたTCR鎖を含むグアニジン溶液は、次いで、0.5リットルの以下のリフォールディングバッファ：100mM Tris pH8.1、400mM L-アルギニン、2mM EDTA、5M 尿素中に注入された。酸化還元対（塩酸システアミンおよび二塩酸シタミン）がそれぞれ6.6mMおよび3.7mMの最終濃度まで添加され、約5分後に、変性されたTCR鎖が添加された。溶液は、約30分間放置された。リフォールディングされたTCRは、Spectrapor1メンブレン（Spectrum；製品番号132670）において10LのH₂Oに対して18～20時間透析された。この時間の後に、透析バッファは、新しい10mM Tris pH8.1（10L）に2回交換され、透析は、5℃±3℃でさらに約8時間継続された。

10

【0066】

可溶性TCRは、透析されたリフォールディング物をPOROS 50HQ陰イオン交換カラム上にロードすることによっておよび結合したタンパク質をAkta精製装置（GE Healthcare）を使用して50カラム容量を超える10mMのTris pH8.1中の0～500mMのNaClの勾配で溶出することによって分解産物および夾雑物から分離された。ピーク画分がプールされ、プロテアーゼ阻害剤のカクテル（Calbiochem）が添加された。プールされた画分は、次いで、4℃で保存され、クマシーで染色されたSDS-PAGEによって解析された後にプールおよび濃縮された。最終的に、可溶性TCRは、PBSバッファ（Sigma）中で予め平衡化されたGE Healthcare Superdex 75HRゲル濾過カラムを使用して精製および特性評価された。約50kDaの相対分子量で溶出していたピークがプールされ、BIAcore表面プラズモン共鳴解析による特性評価の前に濃縮された。

20

【0067】

【実施例3】

結合特性評価

BIAcore解析

表面プラズモン共鳴バイオセンサー（BIAcore 3000（商標））は、可溶性TCRの、そのペプチド-MHCリガンドに対する結合を解析するために使用される。これは、ストレプトアビジンでコーティングされた結合表面（センサーチップ）に固定される可溶性ビオチン化ペプチド-HLA（「pHLA」）複合体を作製することによって容易になる。センサーチップは、異なる4種のpHLA複合体に対するT細胞受容体の結合を同時に測定することを可能にする4つの個別のフローセルを含む。pHLA複合体の手動注入により、固定されたクラスI分子の正確なレベルを容易に操作することが可能となる。

30

【0068】

ビオチン化されたクラスIのHLA-A*0201分子は、構成サブユニットタンパク質および合成ペプチドを含む、細菌で発現された封入体からin vitroでリフォールディングされ、その後、精製されて、in vitroで酵素によりビオチン化された（O'Callaghan et al. (1999) Anal. Biochem. 266:9-15）。HLA-A*0201重鎖は、適切なコンストラクトにおいてタンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを置き換えるC末端ビオチン化タグ付きで発現された。1リットルの細菌培養液あたり約75mgの封入体発現レベルが得られた。MHC軽鎖またはβ2-ミクログロブリンも、適切なコンストラクトから大腸菌における封入体として、1リットルの細菌培養液あたり約500mgのレベルで発現された。

40

【0069】

大腸菌細胞は溶解され、封入体は約80%の純度まで精製された。封入体からのタンパク質は、6M グアニジン-HCl、50mM Tris pH8.1、100mM NaCl、10mM DTT、10mM EDTA中で変性され、0.4M L-アルギニン、100mM Tris pH8.1、3.7mM 二塩酸シタミン、6.6mM 塩酸システアミン、HLA-A*02分子によるロードが必要とされる4mg/LのMA

50

GE-A4 G V Y D G R E H T V または M A G E - B 2 G V Y D G E E H S V ペプチド中に 30 mg / リットル 重鎖、30 mg / リットル β 2 m の濃度で、変性タンパク質の単一パルスをも 5 °C のリフォールディングバッファー中に添加することによってリフォールディングされた。リフォールディングは、4 °C で少なくとも 1 時間で完了に到達することが可能にされた。

【0070】

バッファーは、10 容量の 10 mM の T r i s pH 8.1 中での透析によって交換された。バッファーの 2 回の交換は、溶液のイオン強度を十分に低下させるために必要とされた。次いで、タンパク質溶液は、1.5 μ m のセルロースアセテートフィルターを通して濾過され、P O R O S 50 H Q 陰イオン交換カラム (8 ml のベッド容量) 上にロードされた。タンパク質は、A k t a 精製装置 (G E H e a l t h c a r e) を使用して 10 mM の T r i s pH 8.1 中の直線的な 0 ~ 500 mM の N a C l 勾配で溶出された。H L A - A * 0 2 0 1 - ペプチド複合体は、約 250 mM の N a C l で溶出され、ピーク画分が収集されて、プロテアーゼ阻害剤のカクテル (C a l b i o c h e m) が添加され、それらの画分が氷上で冷却された。

【0071】

ビオチンタグ付き p H L A 分子は、10 mM T r i s pH 8.1、5 mM N a C l 中で平衡化された G E H e a l t h c a r e の高速脱塩カラムを使用して、同バッファー中にバッファー交換された。溶出されるとすぐに、タンパク質含有分画は氷上で冷却され、プロテアーゼ阻害剤カクテル (C a l b i o c h e m) が添加された。次いで、ビオチン化試薬: 1 mM ビオチン、5 mM A T P (p H 8 に緩衝された)、7.5 mM M g C l ₂、および 5 μ g / ml B i r A 酵素 (O ' C a l l a g h a n e t a l . (1999) A n a l . B i o c h e m . 266: 9-15 に従って精製された) が添加された。次いで、この混合物は、室温で一晩インキュベート可能にされた。

【0072】

ビオチン化された p H L A - A * 0 2 0 1 分子は、ゲル濾過クロマトグラフィーを使用して精製された。G E H e a l t h c a r e S u p e r d e x 75 H R 10 / 30 カラムは、濾過された P B S で予め平衡化されて 1 ml のビオチン化反応混合物がロードされ、そのカラムは、A k t a 精製装置 (G E H e a l t h c a r e) を使用して P B S を用いて 0.5 ml / 分で展開された。ビオチン化された p H L A - A * 0 2 0 1 分子は、約 15 ml で単一のピークとして溶出された。タンパク質を含む画分は、プールされて、氷上で冷却され、プロテアーゼ阻害剤カクテルが添加された。タンパク質濃度は、クマシー結合アッセイ (P e r B i o) を使用して決定され、ビオチン化された p H L A - A * 0 1 分子の一定分量は、-20 °C で凍結保存された。

【0073】

こうした固定された複合体は、T 細胞受容体および補助受容体 C D 8 $\alpha \alpha$ の両方を結合することができ、その両方が可溶相に注入されうる。可溶性 T C R の p H L A 結合特性は、T C R が可溶相または固定相のいずれかにおいて使用される場合、質的にも量的にも類似していることが認められる。これは、可溶種の部分活性についての重要な対照であり、ビオチン化 p H L A 複合体が生物学的に非ビオチン化複合体と同じくらい活性であることも示唆する。

【0074】

B I A c o r e 3000 (商標) 表面プラズモン共鳴 (S P R) バイオセンサーは、小さなフローセル内のセンサー表面付近のレスポンスユニット (R U) で表される屈折率における変化を測定し、受容体リガンド相互作用を検出するためおよびそれらの親和性および動態パラメーターを解析するために使用されうる原理である。B I A c o r e 実験は、25 °C の温度で、ランニングバッファーとして P B S バッファー (S i g m a、p H 7.1 ~ 7.5) を使用し、タンパク質試料の希釈物を調製して行われた。ストレプトアビジン、標準的なアミンカップリング法によってフローセルに固定された。p H L A 複合体は、ビオチンタグを介して固定された。次いで、異なるフローセルの表面上を一定流速

10

20

30

40

50

で通過する可溶性TCRによってアッセイが行われ、その際のSPRレスポンスが測定された。

【0075】

平衡結合定数

平衡結合定数を決定するために、上記のBIAcore解析法が使用された。ジスルフィドで連結された可溶性ヘテロ二量体形態の参照MAGE-A4 TCRの段階希釈物が調製され、1つめは約1000RUの特異的なGVYDGREHTV HLA-A*0201複合体でコーティングされ、2つめは約1000RUの非特異的な複合体でコーティングされた、2つの異なるフローセル上に毎分5 μ lの一定流速で注入された。レスポンスは、対照細胞からの測定値を使用して各濃度について標準化された。標準化されたデータレスポンスは、TCR試料の濃度に対してプロットされ、平衡結合定数 K_D を算出するために非線形曲線適合モデルに適合された。(Price & Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2nd Edition) 1979, Clarendon Press, Oxford)。ジスルフィドで連結された可溶性の参照MAGE-A4 TCR (実施例2) は、約2.00 μ Mの K_D を示した。同じBIAcoreデータより、 $T_{1/2}$ は約0.95秒であった。

【0076】

動態パラメーター

上記のBIAcore解析法は、平衡結合定数および解離速度を決定するためにも使用された。

【0077】

高親和性TCR (下記の実施例4を参照されたい) のために、 K_D は、解離速度定数、 k_{off} 、および結合速度定数、 k_{on} を実験的に測定することによって決定された。平衡定数 K_D は、 k_{off}/k_{on} として算出された。

【0078】

1つめは約1000RUの特異的なGVYDGREHTV HLA-A*0201複合体でコーティングされ、2つめは約1000RUの非特異的な複合体でコーティングされた2つの異なるセルにTCRが注入された。流速は、50 μ l/分に設定された。典型的には、約1 μ Mの濃度の250 μ lのTCRが注入された。次いで、レスポンスがベースラインに戻るまでまたは>2時間が経過するまでバッファーが流された。動態パラメーターは、BIAevaluationソフトウェアを使用して算出された。解離相は、半減期の算出を可能にする単一指数関数的減衰方程式に適合された。

【0079】

[実施例4]

本発明の高親和性TCRの調製

TCR α 鎖および β 鎖をそれぞれ含む発現プラスミドは、実施例1におけるように調製された：

【表4】

TCR ID	アルファ鎖配列番号	ベータ鎖配列番号
TCR1 (親)	3	4
TCR2	3	9
TCR3	7	9
TCR4	8	9

【0080】

プラスミドが大腸菌株 B L 2 1 p L y s S 内に別々に形質転換され、単一のアンピシリン耐性コロニーが T Y P (アンピシリン 1 0 0 μ g / m l) 培地中で 3 7 ° C で約 0 . 6 ~ 0 . 8 の O D ₆₀₀ まで培養された後に、0 . 5 m M の I P T G でタンパク質発現が誘発された。細胞は、導入 3 時間後に、B e c k m a n J - 6 B 内で 4 0 0 0 r p m で 3 0 分間の遠心分離によって回収された。細胞ペレットは、M g C l ₂ および D N アーゼ I の存在下で 2 5 m l の B u g B u s t e r (N o v a g e n) で溶解された。封入体ペレットは、B e c k m a n J 2 - 2 1 遠心分離機内で 1 3 0 0 0 r p m で 3 0 分間の遠心分離によって回収された。次いで、3 回の界面活性剤での洗浄が行われて細胞デブリおよび膜成分が除去された。封入体ペレットは、毎回、T r i t o n バッファー (5 0 m M T r i s - H C l p H 8 . 0 、 0 . 5 % T r i t o n - X 1 0 0 、 2 0 0 m M N a C l 、 1 0 m M N a E D T A) 中でホモジナイズされた後に、B e c k m a n J 2 - 2 1 内で 1 3 0 0 0 r p m で 1 5 分間の遠心分離によってペレット化された。次いで、以下のバッファー : 5 0 m M T r i s - H C l p H 8 . 0 、 1 m M N a E D T A 中で同様の洗浄によって界面活性剤および塩が除去された。最終的に、封入体は、3 0 m g の一定分量に小分けされて - 7 0 ° C で凍結された。封入体タンパク質の収量は、6 M のグアニジン - H C l で可溶化することによって定量化され、O D 測定は、日立 U - 2 0 0 1 分光光度計上で行われた。次いで、吸光係数を使用してタンパク質濃度が算出された。

10

【0081】

確実に完全に鎖変性するように、本発明の各 T C R のための約 1 0 m g の T C R α 鎖および 1 0 m g の T C R β 鎖の可溶化封入体は、1 0 m l のグアニジン溶液 (6 M 塩酸グアニジン、5 0 m M T r i s H C l p H 8 . 1 、 1 0 0 m M N a C l 、 1 0 m M E D T A 、 1 0 m M D T T) 中に希釈された。完全に還元および変性された T C R 鎖を含むグアニジン溶液は、次いで、0 . 5 リットルの以下のリフォールディングバッファー : 1 0 0 m M T r i s p H 8 . 1 、 4 0 0 m M L - アルギニン、2 m M E D T A 、 5 M 尿素中に注入された。酸化還元対 (塩酸システアミンおよび二塩酸シタミン) がそれぞれ 6 . 6 m M および 3 . 7 m M の最終濃度まで添加され、約 5 分後に、変性された T C R 鎖が添加された。溶液は、約 3 0 分間放置された。リフォールディングされた T C R は、S p e c t r a p o r 1 メンブレン (S p e c t r u m ; 製品番号 1 3 2 6 7 0) において 1 0 L の H ₂ O に対して 1 8 ~ 2 0 時間透析された。この時間の後に、透析バッファーは、新しい 1 0 m M T r i s p H 8 . 1 (1 0 L) に 2 回交換され、透析は、5 ° C $\pm$ 3 ° C でさらに約 8 時間継続された。

20

30

【0082】

可溶性 T C R は、透析されたリフォールディング物を P O R O S 5 0 H Q 陰イオン交換カラム上にロードすることによっておよび結合したタンパク質を A k t a 精製装置 (G E H e a l t h c a r e) を使用して 1 5 カラム容量を超える 1 0 m M の T r i s p H 8 . 1 中の 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l の勾配で溶出することによって分解産物および夾雑物から分離された。プールされた画分は、次いで、4 ° C で保存され、クマシーで染色された S D S - P A G E によって解析された後にプールおよび濃縮された。最終的に、可溶性 T C R は、P B S バッファー (S i g m a) 中で予め平衡化された G E H e a l t h c a r e S u p e r d e x 7 5 H R ゲル濾過カラムを使用して精製および特性評価された。約 5 0 k D a の相対分子量で溶出していたピークがプールされ、B I A c o r e 表面プラズモン共鳴解析による特性評価の前に濃縮された。

40

【0083】

M A G E - A 4 エピトープまたは M A G E - B 2 に対するこうして調製された T C R の親和性プロファイルは、実施例 3 の方法を使用して評価され、参照 T C R と比較された。結果は、以下の表に記載されている：

50

【表 5】

	MAGE A4 K _D (μM)	MAGE-B2 K _D (μM)
参照(TCR1)	65.1	17
TCR2	17.2	197.5
TCR3	2.6	27.6
TCR4	5.1	52.6

10

【0084】

配列番号10／11、12／13、14／15の組合せに基づいた高親和性TCRを調製するために試行も行われた。

【0085】

配列番号10のアルファ鎖と配列番号11のベータ鎖とを合わせ持つ、TCR Aの場合には、MAGE-A1、MAGE-A10およびPRAMEの間で交差反応性が認められた。変異および選択によってこの交差反応性をなくすことは不可能であった。

20

【0086】

TCR Bは、配列番号12のアルファ鎖と配列番号13のベータ鎖とを合わせ持つ。TCR Bは、可溶性TCRを形成するようにフォールディングさせることができなかったため、結合特性評価は不可能であった。

【0087】

TCR Cは、配列番号14のアルファ鎖と配列番号15のベータ鎖とを合わせ持つ。このTCRは、発現されたときに可溶性であってかつ抗原に結合することができた。しかし、T細胞において発現されたときには、TCR Cは、活性を示さなかった。

【0088】

【実施例5】

30

親MAGE-A4 TCRおよびバリエーションMAGE-A10 TCRでのT細胞のトランスフェクション

(a) Express-Inを介した293T細胞の一過的トランスフェクションによるレンチウイルスベクター調製

望ましいTCRをコードする遺伝子を含むレンチウイルスベクターをパッケージングするために、第3世代レンチウイルスパッケージングシステムが使用された。Express-Inを介したトランスフェクション(Open Biosystems)を使用して、293T細胞は、4種のプラスミド(実施例5c(以下)に記載のTCRアルファ鎖-P2A-TCRベータ鎖単一ORF遺伝子を含む1種のレンチウイルスベクター、および感染性であるが複製不可能なレンチウイルス粒子を構築するために必要な他の構成要素を含む3種のプラスミド)でトランスフェクトされた。

40

【0089】

トランスフェクションのために、指数関数的な増殖期にある293T細胞の1つのT150フラスコが回収され、細胞は、プレート上に均一に分散され、わずかに50%を超えるコンフルエントであった。Express-Inの一定分量は、室温にされた。3mLの無血清培地(RPMI1640+10mM HEPES)が無菌の15mLのコニカルチューブ内に入れられた。174μLのExpress-In試薬が無血清培地中に直接に添加された(これは、3.6:1の試薬対DNAの重量比を実現する)。これは、3~4回チューブを逆さにすることによって完全に混合されて、室温で5~20分間インキュベートされた。

50

【0090】

別の1.5mLのマイクロチューブ内で、予め混合されたパッケージング混合物一定分量（18μgのpRSV.REV（REV発現プラスミド）、18μgのpMDLg/p.RRE（Gag/Pol発現プラスミド）、7μgのpVSV-G（VSV糖タンパク質発現プラスミド）を含む、通常約22μL）に15μgのプラスミドDNAが添加され、DNA混合物を確実に均一にさせるために上および下にピペティングされた。このDNA混合物に約1mLのExpress-In/無血清培地が滴下で添加され、次いで、上および下に穏やかにピペティングされた後に、残りのExpress-In/無血清培地に移し戻された。チューブは、3～4回逆さにされて、室温で15～30分間インキュベートされた。細胞のフラスコから古い培地が除去された。293T細胞の直立型フラスコの底にExpress-In/培地/DNA（3mL）複合体が直接に添加された。ゆっくりと、フラスコは、細胞を覆うように平らに置かれ、確実に分散するようにきわめて穏やかに揺動された。1分後、22mLの新しい培地（R10+HEPES：RPMI 1640、熱失活された10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン/Ｌーグルタミン、10mM HEPES）が添加され、フラスコは、インキュベーターに注意深く戻された。これは、37℃/5%CO₂で一晩インキュベートされた。24時間後、パッケージングされたレンチウイルスベクターを含む培地が回収された。

10

【0091】

パッケージングされたレンチウイルスベクターを回収するために、細胞培養液上清は、0.45ミクロンのナイロンシリンジフィルターを通して濾過され、培養液は、10,000gで18時間（または112,000gで2時間）遠心分離され、（ペレットを乱さないように注意しながら）上清の大部分が除去され、残りの数mL（チューブあたり31mLの開始容量から、通常、約2mL）の上清中にペレットが再懸濁された。これは、1mLずつの一定分量でドライアイス上でスナップ凍結され、-80℃で保存された。

20

【0092】

（b）目的の遺伝子を含むパッケージングされたレンチウイルスベクターでのT細胞の形質導入

パッケージングされたレンチウイルスベクターでの形質導入前に、健常な志願者の血液からヒトT細胞（CD8もしくはCD4または必要条件によっては両方）が単離された。これらの細胞は、計数され、48ウェルプレート内で、50U/mLのIL-2を含むR10中、1mLあたり1×10⁶細胞（0.5mL/ウェル）で、1細胞あたり3個のビーズの比率で、予め洗浄された抗CD3/CD28抗体コーティング付きマイクロビーズ（Dynabeads（登録商標）T cell expander、Invitrogen）と共に一晩インキュベートされた。

30

【0093】

一晩の刺激後、0.5mLの無希釈のパッケージングされたレンチウイルスベクターが、望ましい細胞に添加された。これは、37℃/5%CO₂で3日間インキュベートされた。形質導入3日後、細胞は、計数され、0.5×10⁶細胞/mLまで希釈された。IL-2を含む新しい培地が必要に応じて添加された。ビーズは、形質導入5～7日後に除去された。2日間隔で、細胞が計数され、IL-2を含む新しい培地が交換または添加された。細胞は、0.5×10⁶細胞/mLおよび1×10⁶細胞/mLの間で維持された。細胞は、3日目からフローサイトメトリーによって解析され、5日目から機能アッセイ（例えば、IFNγ放出についてのELISPOT、実施例6を参照されたい）に使用された。10日目から、または細胞が分裂を遅延させ、大きさが減少したときに、細胞は、保存のために（90%FBS/10%DMSO中に1×10⁷細胞/mLで）少なくとも4×10⁶細胞/バイアルの一定分量で凍結される。

40

【0094】

【実施例6】

MAGE A4 TCR改変T細胞の活性化

腫瘍細胞株に応答した、TCR形質導入した細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の活性化

50

を実証するために、以下のアッセイを行った。ELISPOTアッセイを使用して測定されるような、IFN- γ 産生を、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）活性化についての読み出しとして使用した。

【0095】

ELISPOT

試薬

アッセイ培地： 10% FCS（Gibco、カタログ番号2011-09）、88% RPMI 1640（Gibco、カタログ番号42401）、1% グルタミン（Gibco カタログ番号25030）および1% ペニシリン／ストレプトマイシン（Gibco カタログ番号15070-063）。

洗浄バッファー：0.01M PBS／0.05% Tween 20
PBS（Gibcoカタログ番号10010）

関連したAEC基質セット（BD Bioscience、カタログ番号551951）と共に、捕捉抗体および検出抗体ならびにヒトIFN- γ PVDF ELISPOT 96ウェルプレートを含むヒトIFN γ ELISPOTキット（BD Bioscience；カタログ番号551849）

【0096】

方法

標的細胞の調製

この方法において使用される標的細胞は、天然のエピトープ提示細胞：両方HLA-A2⁺ MAGE A10⁺であるA375ヒト黒色腫細胞であった。HLA-A2⁺ MAGE A10⁻である、HCT116ヒト結腸がんは、陰性対照として使用された。十分な標的細胞（50,000細胞／ウェル）は、Megafuge（登録商標）1.0（Heraeus）内で1200rpmで10分の遠心分離3回によって洗浄された。細胞は、次いで、アッセイ培地中に10⁶細胞／mlで再懸濁された。

【0097】

エフェクター細胞調製

この方法において使用されるエフェクター細胞（T細胞）は、CD14およびCD25マイクロビーズキット（それぞれMiltenyi Biotechカタログ番号130-050-201および130-092-983）を使用して、健常な志願者の静脈血から新たに単離された末梢血単核細胞（PBMC）から負の選択によって得られた、末梢血リンパ球（PBL）であった。細胞は、抗CD3／CD28コーティング付きビーズ（Dynabeads（登録商標）T cell expander, Invitrogen）で刺激され、（実施例5に記載のコンストラクトに基づいた）目的の全 $\alpha\beta$ TCRをコードする遺伝子を運ぶレンチウイルスで形質導入され、50U／mLのIL-2を含むアッセイ培地中で形質導入10日後および13日後の間まで増殖した。これらの細胞は、次いで、アッセイ培地中に入れられた後に、Megafuge（登録商標）1.0（Heraeus）内で1200rpmで10分の遠心分離によって洗浄された。細胞は、次いで、4×最終的に必要とされる濃度でアッセイ培地中に再懸濁された。

【0098】

プレートは、以下のように調製された：100 μ Lの抗IFN- γ 捕捉抗体は、1プレートあたり10mLの無菌PBS中に希釈された。次いで、各ウェル内に100 μ Lの希釈された捕捉抗体が分注された。プレートは、次いで、4℃で一晩インキュベートされた。インキュベーション後、プレートは、洗浄（プログラム1、プレート型2、Ultrawash Plus 96ウェルプレート洗浄機；Dynex）されて捕捉抗体が除去された。プレートは、次いで、各ウェルに200 μ Lのアッセイ培地を添加することによってブロッキングされ、室温で2時間インキュベートされた。アッセイ培地は、次いで、プレートから洗浄され（プログラム1、プレート型2、Ultrawash Plus 96ウェルプレート洗浄機、Dynex）、残りのすべての培地は、ELISPOTプレートをペーパータオル上で軽く振り払うことおよび軽く叩くことによって除去された。

10

20

30

40

50

【0099】

次いで、以下の順序でアッセイの成分がELISPOTプレートに添加された：

50 μ L の標的細胞 10^6 細胞/mL（合計50,000個の標的細胞/ウェルにする）

50 μ L 培地（アッセイ培地）

50 μ L エフェクター細胞（20,000個のTCR形質導入PBL細胞/ウェル）

【0100】

プレートは、次いで、一晚インキュベートされた（37℃/5%CO₂）。翌日、プレートは、洗浄バッファーで3回洗浄され（プログラム1、プレート型2、Ultrawash Plus 96ウェルプレート洗浄機、Dynex）、ペーパータオル上で軽く叩かれて乾燥されて余分な洗浄バッファーが除去された。100 μ L の一次検出抗体は、次いで、各ウェルに添加された。一次検出抗体は、製造業者の説明書に明記された希釈を使用して、10mLの希釈バッファー（単一のプレートに必要とされる容量）中に希釈された。プレートは、次いで、室温で少なくとも2時間インキュベートされた後に洗浄バッファーで3回洗浄された（プログラム1、プレート型2、Ultrawash Plus 96ウェルプレート洗浄機、Dynex）；余分な洗浄バッファーは、プレートをペーパータオル上で軽く叩くことによって除去された。

【0101】

二次検出は、各ウェルに100 μ L の希釈されたストレプトアビジン-HRPを添加してプレートを室温で1時間インキュベートすることによって行われた。ストレプトアビジン-HRPは、製造業者の説明書に明記された希釈を使用して、10mLの希釈バッファー（単一のプレートに必要とされる容量）中に希釈された。プレートは、次いで、洗浄バッファーで3回洗浄され（プログラム1、プレート型2、Ultrawash Plus 96ウェルプレート洗浄機、Dynex）、ペーパータオル上で軽く叩かれて余分な洗浄バッファーが除去された。プレートは、次いで、PBSで各ウェルに200 μ L を添加することによって2回洗浄され、バッファーが軽く振り出され、ペーパータオル上で軽く叩かれて余分なバッファーが除去された。使用前15分以内に、1滴（20 μ L）のAEC色素原が各1mLのAEC基質に添加されて混合された。各プレートについて10mLのこの溶液が調製された；1ウェルあたり100 μ L が添加された。プレートは、次いで、ホイルを使用して光から保護され、通常、5～20分以内に生じる、スポット発色が定期的にモニターされる。プレートは、発色反応を終了させるために水道水中で洗浄され、それらが3つの成分に分解される前に振盪乾燥された。プレートは、次いで、室温で少なくとも2時間乾燥可能にされた後に、Immunospot（登録商標）プレートリーダー（CTL；Cellular Technology Limited）を使用してスポットが計数された。

【0102】

【実施例7】

すべての代替アミノ酸での置換による結合モチーフの同定

それぞれの位置のアミノ酸残基が19種すべての代替の天然に存在するアミノ酸で順次置き換えられた天然のMAGE-A4ペプチドのバリエーションが得られ、それによって、全部で171種のペプチドが調製された。天然のペプチドおよびアミノ酸置換されたペプチドが、抗原提示細胞上にパルスされ、ELISPOTアッセイを使用して測定されるような、インターフェロン γ （IFN γ ）産生が、TCR4で形質導入されたT細胞の活性化についての読み出しとして使用された。不可欠な位置は、天然のペプチドに対して相対的に50%を超えるT細胞活性における低下によって定義された。

【0103】

ELISPOTアッセイは、実施例6に記載のように行われた。

【0104】

ペプチドの各位置における許容される残基は、以下に示される。下線付きのアミノ酸は、ペプチド内の該当位置における天然の残基を表す。

【 0 1 0 5 】

【表 6】

位置	許容される残基
1	<u>G</u> H
2	<u>V</u> IL
3	<u>Y</u> VF
4	<u>D</u> N
5	<u>G</u> N
6	KAR <u>G</u> SCHTQMFVNLYI
7	<u>S</u> HQMEILWPYFATCNDGRKV
8	DSHQME <u>I</u> LWPYFATCNGRKV
9	<u>S</u> HQMEILWPYFATCNDGRKV
10	<u>V</u> FMAILT

10

20

【 0 1 0 6 】

したがって、抗原提示細胞の表面上でHLA-A*0201と複合体形成しているときに、MAGE A4 TCR4が、ペプチド（配列番号1）の少なくともV2 Y3およびD4と接触することは明らかである。

30

出願時の特許請求の範囲は以下の通り。

〔請求項1〕

可溶型のT細胞受容体（TCR）を使用して25℃、pH7.1から7.5の間で表面プラズモン共鳴で測定されるときに約0.05μMから約20.0μMまでの解離定数で、HLA-A*0201と複合体形成したGVYDGREHTV（配列番号1）に結合する特性を有し、かつHLA-A*0201と複合体形成したGVYDGAYVSV（配列番号2）に対する結合を超えHLA-A*0201と複合体形成した配列番号1に対する結合について少なくとも10倍の選択性を有するTCRであって、前記TCRが、TCRアルファ鎖可変ドメインおよびTCRベータ鎖可変ドメインを含み、前記TCR可変ドメインが、GVDGKSDSV（配列番号1）の少なくとも残基V2、Y3およびD4との接触を形成する、前記TCR。

40

〔請求項2〕

アルファ鎖TRAV10+TRAC定常ドメイン配列およびベータ鎖TRBV24-1+TRBC-2定常ドメイン配列を有する、アルファ-ベータヘテロ二量体である、請求項1に記載のTCR。

〔請求項3〕

VαおよびVβがそれぞれTCRα可変領域およびTCRβ可変領域であり、CαおよびCβがそれぞれTCRα定常領域およびTCRβ定常領域であり、Lがリンカー配列である、型Vα-L-Vβ、Vβ-L-Vα、Vα-Cα-L-Vβ、またはVα-L-V

50

β -C β の単鎖形式である、請求項1に記載のTCR。

〔請求項4〕

検出可能な標識、治療剤またはPK改変部分と結合された、請求項1から3のいずれか1項に記載のTCR。

〔請求項5〕

前記アルファ鎖可変ドメインが、配列番号3のアミノ酸残基1～105の配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号3に示されている番号付けを参照して

【表7】

M4	VまたはL
----	-------

10

の変異を有し、かつ／または前記ベータ鎖可変ドメインが、配列番号4のアミノ酸残基1～105の配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号4に示されている番号付けを参照して

【表8】

N10	E
-----	---

の変異のうちの少なくとも1つを有する、請求項1から4のいずれか1項に記載のTCR。

20

〔請求項6〕

前記アルファ鎖可変ドメインが、配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7～8のアミノ酸残基1～105のアミノ酸配列または

そのアミノ酸残基1～27、34～47および54～90がそれぞれ配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7～8のアミノ酸残基1～27、34～47および54～90の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有し、アミノ酸残基28～34、48～53および91～105がそれぞれ配列番号3もしくは配列番号5もしくは配列番号7～8のアミノ酸残基28～33、48～53および91～105の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1から5のいずれか1項に記載のTCR。

30

〔請求項7〕

前記アルファ鎖可変ドメインが、配列番号7もしくは配列番号8のアミノ酸残基1～105のアミノ酸配列または

そのアミノ酸残基1～27、34～47および55～89がそれぞれ配列番号7もしくは配列番号8のアミノ酸残基1～27、34～47および55～89の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有し、アミノ酸残基28～33、48～53および91～105がそれぞれ配列番号7もしくは配列番号8のアミノ酸残基28～33、48～53および91～105の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有するアミノ酸配列

を含む、請求項1から7のいずれか1項に記載のTCR。

40

〔請求項8〕

前記アルファ鎖可変ドメインにおいて

(i) そのアミノ酸残基1～27の配列が、(a) 配列番号3のアミノ酸残基1～26の配列に対して少なくとも90%の同一性を有し、または(b) (a)の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された1つ、2つまたは3つのアミノ酸残基を有し、

(ii) アミノ酸残基28～33の配列が、VSPFSNであり、

(iii) そのアミノ酸残基34～47の配列が、(a) 配列番号3のアミノ酸残基33～47の配列に対して少なくとも90%の同一性を有し、または(b) (a)の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された1つ、2つまたは3つのアミノ酸残基を有し、

(iv) アミノ酸残基48～53の配列が、LTIMTFまたはLTRMTFまたはL

50

T I V T F または L T I L T F であり、

(v) そのアミノ酸残基 54～90 の配列が、配列番号 3 のアミノ酸残基 55～89 の配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有し、またはそれに対して相対的に 1 つ、2 つまたは 3 つの挿入、欠失もしくは置換を有し、

(v i) アミノ酸 91～105 の配列が、C V V S G G T D S W G K L Q F である、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の T C R。

[請求項 9]

前記ベータ鎖可変ドメインが、配列番号 4 もしくは配列番号 6 もしくは配列番号 9 のアミノ酸配列、またはそのアミノ酸残基 1～45、51～67 および 74～109 がそれぞれ配列番号 4 もしくは配列番号 6 もしくは配列番号 9 のアミノ酸残基 1～45、51～67 および 74～109 の配列に対して少なくとも 90 % もしくは 95 % の同一性を有し、アミノ酸残基 46～50、68～73 および 109～123 がそれぞれ配列番号 4 もしくは配列番号 6 もしくは配列番号 9 のアミノ酸残基 46～50、68～73 および 109～123 の配列に対して少なくとも 90 % もしくは 95 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の T C R。

[請求項 10]

前記ベータ鎖可変ドメインにおいて

(i) そのアミノ酸残基 1～45 の配列が、(a) 配列番号 4 の残基 1～26 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有し、または (b) (a) の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された 1 つ、2 つまたは 3 つのアミノ酸残基を有し、

(i i) アミノ酸残基 46～50 の配列が、K G H D R であり、

(i i i) そのアミノ酸残基 51～67 の配列が、(a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 51～67 の配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有し、または (b) (a) の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された 1 つ、2 つまたは 3 つのアミノ酸残基を有し、

(i v) アミノ酸残基 68～73 の配列が、S F D V K であり、

(v) そのアミノ酸残基 54～90 の配列が、(a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 54～90 の配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有し、または (b) (a) の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された 1 つ、2 つまたは 3 つのアミノ酸残基を有し、

(v i) アミノ酸 109～123 の配列が、C A T S G Q G A Y N E Q F F または C A T S G Q G A Y R E Q F F である、

請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の T C R。

[請求項 11]

請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の T C R をコードする核酸。

[請求項 12]

請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の T C R を提示している、単離されたまたは天然に存在しない細胞、特に、T 細胞。

[請求項 13]

(a) 単一のオープンリーディングフレーム内に、もしくは前記アルファ鎖および前記ベータ鎖をそれぞれコードする 2 つの異なるオープンリーディングフレーム内に、請求項 13 に記載の核酸を含む T C R 発現ベクター、または

(b) 請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の T C R のアルファ鎖をコードする核酸を含む第 1 の発現ベクター、および請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の T C R のベータ鎖をコードする核酸を含む第 2 の発現ベクターを宿している細胞。

[請求項 14]

1 種または複数の薬学的に許容される担体または添加剤と一緒に、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の T C R、請求項 11 の核酸、または請求項 12 もしくは請求項 13 に記載の細胞を含む医薬組成物。

[請求項 15]

薬における使用のための、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の T C R、請求項 1

3の核酸、または請求項14もしくは請求項15の細胞。

【請求項16】

がんを治療する方法における使用のための、請求項15に記載の使用のためのTCR、核酸または細胞。

【0107】

配列番号1 MAGE A4エピトープ

【化1】

GVVDGREHTV

10

配列番号2 MAGE B2エピトープ

【化2】

GVYDGEEHSV

配列番号3 アルファ可変鎖

【化3】

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSN
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

20

配列番号4 ベータ可変鎖

【化4】

MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
LGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQTALYFCATSGQGAYNE
QFF

配列番号5 アルファ鎖 可溶型

【化5】

MKKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQD
TGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSW
GKLQFGAGTQVVVTPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYIT
DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

30

配列番号6 ベータ鎖 可溶型

【化6】

MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
LGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQTALYFCATSGQGAYNE
QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVN
GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN
DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD

40

配列番号7 変異型アルファ可変鎖

50

【化 7】

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIVTFSENTKSN
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

配列番号 8 変異型アルファ可変鎖

【化 8】

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSN
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

10

配列番号 9 変異型ベータ可変鎖

【化 9】

MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
LGLRLIYYSFVDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQATALYFCATSGQGAYEE
QFE

配列番号 10 アルファ鎖 可溶型

【化 10】

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQIPAAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPG
KGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVGGYSTLTFGK
GTVLLVSPDNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKTVLD
MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLN
FQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

20

配列番号 11 ベータ鎖 可溶型

【化 11】

MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCAQDMNHNMYWYRQDPG
MGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASSYSRWSP
LHFGNGTRLTVTEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVN
GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSEN
DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALV
LMAMVKRKDF

30

配列番号 12 アルファ鎖 可溶型

40

50

【化 1 2】

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKED
GRFTAQLNKASQYVSLLRDSQPSDSATYLCVVKMANQAGTALIFGKGTTLSVSSNIQNP
PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAW
SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

配列番号 1 3 ベータ鎖 可溶型

【化 1 3】

MQDGGITQSPKFQVLRTGQSMTELLCAQDMNHEMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRNLKREFSLRLESAAPSQTSVYFCASLGGLADEQFFGPGTRLTVLEDLK
NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPL
KEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV
SAEAWGRAD

10

配列番号 1 4 アルファ鎖 可溶型

【化 1 4】

MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTLYWYKQE
PGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAERN
SGAGSYQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD
KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET
DTNLNFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

20

配列番号 1 5 ベータ鎖 可溶型

【化 1 5】

MGTSLLCWMALCLLGADHDTGVSQNPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLG
QGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGFSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLFSGV
NTEAFFGQGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSW
WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGL
SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV
SALVLMAMVKRKDF

30

40

【配列表】

0007577149000001.xml

50

フロントページの続き

弁理士 水島 亜希子

(72)発明者 トリブル, ニコラス
イギリス国, オックスフォードシャー オーエックス14・4アールワイ, アビンドン, ミルトン・パーク, パーク・ドライブ 101, アダプティミューン・リミテッド内

(72)発明者 ローレンス, ウィリアム
イギリス国, オックスフォードシャー オーエックス14・4アールワイ, アビンドン, ミルトン・パーク, パーク・ドライブ 101, アダプティミューン・リミテッド内

(72)発明者 バッグ, エリノア
イギリス国, オックスフォードシャー オーエックス14・4アールワイ, アビンドン, ミルトン・パーク, パーク・ドライブ 101, アダプティミューン・リミテッド内

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 特開2013-126415 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07K 1/00-19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
PubMed