

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7020687号

(P7020687)

(45)発行日 令和4年2月16日(2022.2.16)

(24)登録日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 21 (全84頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-513633(P2018-513633)

(86)(22)出願日 平成28年9月15日(2016.9.15)

(65)公表番号 特表2018-528776(P2018-528776
A)

(43)公表日 平成30年10月4日(2018.10.4)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/051847

(87)国際公開番号 WO2017/048902

(87)国際公開日 平成29年3月23日(2017.3.23)

審査請求日 令和1年9月2日(2019.9.2)

(31)優先権主張番号 62/218,990

(32)優先日 平成27年9月15日(2015.9.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 500039463

ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ
ーシティ オブ テキサス システムBOARD OF REGENTS, TH
E UNIVERSITY OF TEX
AS SYSTEMアメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州
, オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
ート 2 1 02 1 0 West 7th Street
Austin, Texas 7 8 7 0 1
U . S . A .

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T細胞受容体(TCR)結合抗体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

T細胞受容体アルファ(TCR)のエピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体またはその抗原結合断片は、1組の相補性決定領域(CDR)HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み、

(a) HCDR1が、配列番号2；または配列番号15のアミノ酸配列を有し、；

(b) HCDR2が、配列番号3；または配列番号16のアミノ酸配列を有し、；

(c) HCDR3が、配列番号21；配列番号23；配列番号22；または配列番号17のアミノ酸配列を有し、；

(d) LCDR1が、配列番号4；配列番号9；または配列番号18のアミノ酸配列を有し、；

(e) LCDR2が、配列番号5のアミノ酸配列を有し、；かつ

(f) LCDR3が、配列番号6；または配列番号10のアミノ酸配列を有する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】

(a) HCDR1が配列番号2のアミノ酸配列を有する；

(b) HCDR2が配列番号3のアミノ酸配列を有する；

(c) HCDR3が配列番号21のアミノ酸配列を有する；

(d) LCDR1が配列番号4のアミノ酸配列を有する；

(e) L C D R 2 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有する；及び
(f) L C D R 3 が配列番号 6 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

(g) H C D R 1 が配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する；
(h) H C D R 2 が配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する；
(i) H C D R 3 が配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する；
(j) L C D R 1 が配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する；
(k) L C D R 2 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有する；及び
(l) L C D R 3 が配列番号 6 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 4】

(a) H C D R 1 が配列番号 2 のアミノ酸配列を有する；
(b) H C D R 2 が配列番号 3 のアミノ酸配列を有する；
(c) H C D R 3 が配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する；
(d) L C D R 1 が配列番号 9 のアミノ酸配列を有する；
(e) L C D R 2 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有する；及び
(f) L C D R 3 が配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

20

(a) H C D R 1 が配列番号 2 のアミノ酸配列を有する；
(b) H C D R 2 が配列番号 3 のアミノ酸配列を有する；
(c) H C D R 3 が配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する；
(d) L C D R 1 が配列番号 9 のアミノ酸配列を有する；
(e) L C D R 2 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有する；及び
(f) L C D R 3 が配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

(a) H C D R 1 が配列番号 2 のアミノ酸配列を有する；
(b) H C D R 2 が配列番号 3 のアミノ酸配列を有する；
(c) H C D R 3 が配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する；
(d) L C D R 1 が配列番号 4 のアミノ酸配列を有する；
(e) L C D R 2 が配列番号 5 のアミノ酸配列を有する；及び
(f) L C D R 3 が配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 7】

ヒトまたはヒト化である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記抗原結合断片が、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v またはジスルフィド結合 F v (s d F v) である、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項 9】

前記抗体が、I g G、I g M または I g A 抗体である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

膜貫通ドメインをさらに含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 11】

レポーターと結合される、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結

50

合断片。

【請求項 1 2】

配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V H)、及び配列番号 8 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V L) を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 3】

配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する V H、及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する V L を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 4】

配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する V H、及び配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する V L を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 1 5】

配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する V H、及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する V L を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 6】

配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する V H、及び配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する V L を含む、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核ポリヌクレオチド。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド分子を含む、宿主細胞。

20

【請求項 1 9】

T C R を含む細胞の選択方法における使用のための、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む組成物であって、前記方法は、

(a) 前記細胞を、前記組成物と接触させること；及び

(b) 前記 T C R 鎖を含む細胞を選択すること

を含む、組成物。

【請求項 2 0】

T 細胞の拡張及び / または活性化方法における使用のための、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む組成物であって、前記方法は、前記組成物の存在下で、前記 T 細胞を人工抗原提示細胞 (a A P C) と接触させることを含む、組成物。

30

【請求項 2 1】

自己免疫疾患または T 細胞白血病の処置における使用のための、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1】

本出願は、2015 年 9 月 15 日に提出された米国特許仮出願番号第 62 / 218, 990 号の利益を主張し、その出願は、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

配列表の組み込み

本出願は、配列表を含み、これは、A S C I I 形式で電子的に提出され、これによりその全体が参照により組み込まれる。2016 年 9 月 15 日に作成された前記 A S C I I コピーは、0100 - 0021WO1 __ S L . t x t と命名され、サイズは 15 k b である。

本発明は、一般的に、分子生物学及び免疫学の分野に関する。さらに具体的には、- T C R (T 細胞受容体) に結合するモノクローナル組換え抗体、ならびに身体の内側及び外側の - T C R + T 細胞の操作におけるそのような抗体の使用に関する。

【背景技術】

50

【 0 0 0 2 】

T細胞ベース療法は、広範囲の疾患を処置するために現在調査されている。しかしながら、あらゆるT細胞ベース療法における大きな障害の1つは、療法で使用するためのT細胞の効率的な選択（単離）及び数値拡張である。さらに、T細胞は、活性化及び免疫抑制のために身体の内側で変化させることができる。従って、T細胞をインビボ及びエクスピボで操作するために使用することができる新しい方法及び組成物が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 3 】

本発明は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を提供する。

10

【 0 0 0 4 】

実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、 10^{-2} M 、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 10^{-3} M 、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 10^{-4} M 、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 10^{-5} M 、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 10^{-6} M 、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 10^{-7} M 、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 10^{-8} M 、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 10^{-9} M 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 10^{-10} M 、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 10^{-11} M 、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 10^{-12} M 、 $8.4 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 10^{-12} M 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、 10^{-13} M 、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 10^{-14} M 、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、または 10^{-15} M を超えない解離定数（ K_D ）により特徴付けられた親和性をもつ配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。実施形態では、 K_D は、約 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ～約 $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ である。さらなる実施形態では、 K_D は、約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ～約 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ である。

20

【 0 0 0 5 】

さらなる実施形態では、本発明は、（a）配列番号2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1；（b）配列番号3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2；（c）CDYW（配列番号21）；CAYW（配列番号23）；またはCAYL（配列番号22）に同一であるHCDR3；（d）配列番号4または配列番号9に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1；（e）配列番号5に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2；及び（f）配列番号6または配列番号10に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3を含む、TCRポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片に関する。

30

【 0 0 0 6 】

本発明は、（a）79A-15（配列番号2）のVHCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1；（b）79A-15（配列番号3）のVHCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2；（c）79A-15（配列番号22）のVHCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR3；（d）79A-15（配列番号9）のVLCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1；（e）79A-15（配列番号5）のVLCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2；及び（f）79A-15（配列番号10）のVLCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3を含む、TCRポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片をさらに提供する。

40

【 0 0 0 7 】

さらなる態様では、本発明は、（a）79A-13 KASGYTF TDY YMNWV（配列番号2）のVHCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1；（b）79A-13 WIGEINPNN（配列番号3）のVHCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2；（c）79A

50

- 13 CAYL (配列番号22)のV_HCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR3; (d) 79A-13 NTYLEWY (配列番号4)のV_LCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1; (e) 79A-13 KLLIYKVS NRFS (配列番号5)のV_LCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2; 及び(f) 79A-13 MQGSHVPW (配列番号10)のV_LCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0008】

実施形態では、本発明はさらに、(a) 79A-11 KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2)のV_HCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1; (b) 79A-11 WIGEINPNN (配列番号3)のV_HCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2; (c) 79A-11 CAYW (配列番号23)のV_HCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR3; (d) 79A-11 NTYLEWF (配列番号9)のV_LCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1; (e) 79A-11 KLLIYKVS NRFS (配列番号5)のV_LCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2; 及び(f) 79A-11 MQGSHVPW (配列番号10)のV_LCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0009】

本発明はまた、(a) 79A KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2)のV_HCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1; (b) 79A WIGEINPNN (配列番号3)のV_HCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2; (c) 79A CDYW (配列番号21)のV_HCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR3; (d) 79A NTYLEWY (配列番号4)のV_LCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1; (e) 79A KLLIYKVS NRFS (配列番号5)のV_LCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2; 及び(f) 79A FQGSHVPW (配列番号6)のV_LCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0010】

実施形態では、本発明は、(a) KASGYTF TGYMNWV (配列番号15)に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1; (b) WIGGINPNN (配列番号16)に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2; (c) CRYW (配列番号17)に同一であるHCDR3; (d) QSI VHGGNTY (配列番号18)に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1; (e) KLLIYKVS NRFS (配列番号5)に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2; 及び(f) FQGSHVPW (配列番号6)に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【0011】

さらなる態様では、本発明は、T細胞受容体 鎖(TCR)に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含む単離ポリヌクレオチドをさらに提供し、前記抗体は、配列GSTLRG (配列番号1)を含むTCR ポリペプチドのエピトープに結合する。

【0012】

10

20

30

40

50

さらなる実施形態では、本発明は、T細胞受容体鎖(TCR)に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供し、前記抗体は、配列GSTLRG(配列番号1)を含むTCRポリペプチドのエピトープに結合する。

【0013】

さらに別の実施形態では、本発明は、(a)細胞中で、抗体のVL及びVH鎖をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子を発現すること；及び(b)T細胞受容体鎖(TCR)に特異的に結合する抗体を細胞から精製することを含む、抗体またはその抗原結合断片の製造方法を提供する。

【0014】

本発明は、(a)細胞を、TCR鎖に結合する抗体またはその抗原断片と接触させること、抗体または断片は、複数のT細胞エピトープ特異性を有するT細胞に結合し；及び(b)抗体または断片の結合に基づいて、TCR鎖を含む細胞を選択することを含む、T細胞受容体鎖(TCR)を含む細胞の選択方法をさらに提供する。

【0015】

さらなる実施形態では、本発明は、T細胞受容体(TCR)のエピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片の存在下で、T細胞を人工抗原提示細胞(aAPC)と接触させることを含み、前記エピトープは、配列GSTLRG(配列番号1)を含むポリペプチドである、T細胞の拡張及び/または活性化方法を提供する。

【0016】

ある特定の態様では、本発明は、配列GSTLRG(配列番号1)を含むTCRポリペプチドを標的にするキメラ抗原受容体を含む宿主細胞を、動物に投与することを含む、処置を必要とする前記動物における自己免疫疾患またはT細胞白血病の処置方法を提供する。

【0017】

さらなる実施形態では、本発明は、GSTLRG(配列番号1)を含むTCR鎖に結合する抗体またはその抗原結合断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子を含み、抗体またはその抗原結合断片は、複数のT細胞エピトープ特異性を有するT細胞に選択的に結合する、宿主細胞を提供する。

【0018】

さらなる実施形態は、複数のT細胞エピトープ特異性を有するT細胞に結合する本実施形態の抗体、または、T細胞受容体(TCR)に結合する抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子を含む宿主細胞、及び哺乳動物T細胞の増殖を増加させる少なくとも第1の薬剤を含むキットを提供する。ある特定の態様では、キットは、APCをさらに含む。
特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

配列GSTLRG(配列番号1)を含むT細胞受容体アルファ(TCR)ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目2)

(a) 配列番号2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1；

(b) 配列番号3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2；

(c) CDYW(配列番号21)；CAYW(配列番号23)；またはCAYL(配列番号22)に同一であるHCDR3；

(d) 配列番号4または配列番号9に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1；

(e) 配列番号5に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2；及び

(f) 配列番号6または配列番号10に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3

10

20

30

40

50

を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片。

(項目3)

(a) 配列番号2に同一であるHC DR 1;

(b) 配列番号3に同一であるHC DR 2;

(c) CDYW (配列番号21); CAYW (配列番号23); またはCAYL (配列番号22) に同一であるHC DR 3;

(d) 配列番号4; または配列番号9に同一であるLC DR 1;

(e) 配列番号5に同一であるLC DR 2; 及び

(f) 配列番号6; または配列番号10に同一であるLC DR 3

を含む、項目2に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

(項目4)

(a) 79A-15 (配列番号2) のV_HCDR 1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHC DR 1;

(b) 79A-15 (配列番号3) のV_HCDR 2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHC DR 2;

(c) 79A-15 (配列番号22) のV_HCDR 3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHC DR 3;

(d) 79A-15 (配列番号9) のV_LCDR 1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLC DR 1;

(e) 79A-15 (配列番号5) のV_LCDR 2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLC DR 2; 及び

20

(f) 79A-15 (配列番号10) のV_LCDR 3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLC DR 3

を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片。

(項目5)

79A-15 (配列番号11) のV_Hドメインに少なくとも約80%、85%、90%または95%同一であるV_Hドメイン、及び79A-15 (配列番号12) のV_Lドメインに少なくとも約80%、85%、90%または95%同一であるV_Lドメインを含む、項目1に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目6)

30

79A-15 (配列番号11) のV_Hドメインに90%~99%同一であるV_Hドメイン、及び79A-15 (配列番号12) のV_Lドメインに90%~99%同一であるV_Lドメインを含む、項目5に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目7)

79A-15 (配列番号11) のV_Hドメインに同一であるV_Hドメイン、及び79A-15 (配列番号12) のV_Lドメインに同一であるV_Lドメインを含む、項目5に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目8)

(a) 79A-13 KASGYTF TDY YMNWV (配列番号2) のV_HCDR 1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHC DR 1;

40

(b) 79A-13 WIGEINPNN (配列番号3) のV_HCDR 2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHC DR 2;

(c) 79A-13 CAYL (配列番号22) のV_HCDR 3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHC DR 3;

(d) 79A-13 NTYLEWY (配列番号4) のV_LCDR 1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLC DR 1;

(e) 79A-13 KLLIYKVS N RFS (配列番号5) のV_LCDR 2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLC DR 2; 及び

(f) 79A-13 MQGSHVPW (配列番号10) のV_LCDR 3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLC DR 3

50

を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片。
 (項目9)
 (a) KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2) に同一であるHCDR1 ;
 (b) WIGEINPNN (配列番号3) に同一であるHCDR2 ;
 (c) CAYL (配列番号22) に同一であるHCDR3 ;
 (d) NTYLEWY (配列番号4) に同一であるLCDR1 ;
 (e) KLLIYKVS NRFS (配列番号5) に同一であるLCDR2 ; 及び
 (f) MQGSHVPW (配列番号10) に同一であるLCDR3
 を含む、項目8に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目10)

10

79A-13 (配列番号11) のV_Hドメインに少なくとも約80%、85%、90%
 または95%同一であるV_Hドメイン、及び79A-13 (配列番号14) のV_Lドメイン
 に少なくとも約80%、85%、90%または95%同一であるV_Lドメインを含む、
 項目1に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目11)

79A-13 (配列番号11) のV_Hドメインに90%~99%同一であるV_Hドメイン、
 または79A-13 (配列番号14) のV_Lドメインに90%~99%同一であるV_L
 ドメインを含む、項目10に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目12)

79A13 (配列番号11) のV_Hドメインに同一であるV_Hドメイン、及び79A-
 13 (配列番号14) のV_Lドメインに同一であるV_Lドメインを含む、項目10に記載
 の単離抗体またはその抗原結合断片。

20

(項目13)

(a) 79A-11 KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2) のV_HCDR1に
 少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1 ;
 (b) 79A-11 WIGEINPNN (配列番号3) のV_HCDR2に少なくとも8
 0%、85%、90%または95%同一であるHCDR2 ;
 (c) 79A-11 CAYW (配列番号23) のV_HCDR3に少なくとも80%、8
 5%、90%または95%同一であるHCDR3 ;
 (d) 79A-11 NTYLEWF (配列番号9) のV_LCDR1に少なくとも80%
 、85%、90%または95%同一であるLCDR1 ;
 (e) 79A-11 KLLIYKVS NRFS (配列番号5) のV_LCDR2に少なく
 とも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2 ; 及び
 (f) 79A-11 MQGSHVPW (配列番号10) のV_LCDR3に少なくとも8
 0%、85%、90%または95%同一であるLCDR3

30

を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片。

(項目14)

(a) KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2) に同一であるHCDR1 ;
 (b) WIGEINPNN (配列番号3) に同一であるHCDR2 ;
 (c) CAYW (配列番号23) に同一であるHCDR3 ;
 (d) NTYLEWF (配列番号9) に同一であるLCDR1 ;
 (e) KLLIYKVS NRFS (配列番号5) に同一であるLCDR2 ; 及び
 (f) MQGSHVPW (配列番号10) に同一であるLCDR3

40

を含む、項目13に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目15)

79A-11 (配列番号13) のV_Hドメインに少なくとも約80%、85%、90%
 または95%同一であるV_Hドメイン、及び79A-11 (配列番号12) のV_Lドメイン
 に少なくとも約80%、85%、90%または95%同一であるV_Lドメインを含む、
 項目1に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目16)

50

79A-11 (配列番号13)のV_Hドメインに90%~99%同一であるV_Hドメイン、または79A-11 (配列番号12)のV_Lドメインに90%~99%同一であるV_Lドメインを含む、項目15に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目17)

79A11 (配列番号13)のV_Hドメインに同一であるV_Hドメイン、及び79A11 (配列番号12)のV_Lドメインに同一であるV_Lドメインを含む、項目15に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目18)

(a) 79A KASGYTF T D Y Y M N W V (配列番号2)のV_HCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1；

10

(b) 79A WIGEINPNN (配列番号3)のV_HCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2；

(c) 79A CDYW (配列番号21)のV_HCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR3；

(d) 79A NTYLEWY (配列番号4)のV_LCDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1；

(e) 79A KLLIYKVS NRFS (配列番号5)のV_LCDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2；及び

(f) 79A FQGSHVPW (配列番号6)のV_LCDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3

20

を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目19)

(a) KASGYTF T D Y Y M N W V (配列番号2)に同一であるHCDR1；

(b) WIGEINPNN (配列番号3)に同一であるHCDR2；

(c) CDYW (配列番号21)に同一であるHCDR3；

(d) NTYLEWY (配列番号4)に同一であるLCDR1；

(e) KLLIYKVS NRFS (配列番号5)に同一であるLCDR2；及び

(f) FQGSHVPW (配列番号6)に同一であるLCDR3

を含む、項目18に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目20)

30

79A (配列番号7)のV_Hドメインに少なくとも約80%、85%、90%または95%同一であるV_Hドメイン、及び79A (配列番号8)のV_Lドメインに少なくとも約80%、85%、90%または95%同一であるV_Lドメインを含む、項目1に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目21)

79A (配列番号7)のV_Hドメインに90%~99%同一であるV_Hドメイン、または79A (配列番号8)のV_Lドメインに90%~99%同一であるV_Lドメインを含む、項目20に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目22)

79A (配列番号7)のV_Hドメインに同一であるV_Hドメイン、及び79A (配列番号8)のV_Lドメインに同一であるV_Lドメインを含む、項目20に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

40

(項目23)

(a) KASGYTF T G Y Y M N W V (配列番号15)に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1；

(b) WIGGINPNN (配列番号16)に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2；

(c) CRYW (配列番号17)に同一であるHCDR3；

(d) QSVHGGGNTY (配列番号18)に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1；

50

(e) K L L I Y K V S N R F S (配列番号 5) に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 2 ; 及び

(f) F Q G S H V P W (配列番号 6) に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 3

を含む、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片。
(項目 2 4)

(a) K A S G Y T F T G Y Y M N W V (配列番号 1 5) に同一である H C D R 1 ;

(b) W I G G I N P N N (配列番号 1 6) に同一である H C D R 2 ;

(c) C R Y W (配列番号 1 7) に同一である H C D R 3 ;

(d) Q S I V H G G G N T Y (配列番号 1 8) に同一である L C D R 1 ;

(e) K L L I Y K V S N R F S (配列番号 5) に同一である L C D R 2 ; 及び

(f) F Q G S H V P W (配列番号 6) に同一である L C D R 3

を含む、項目 2 3 に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目 2 5)

7 9 A - 2 3 (配列番号 1 9) の V_H ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 2 3 (配列番号 2 0) の V_L ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_L ドメインを含む、項目 1 に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目 2 6)

7 9 A - 2 3 (配列番号 1 9) の V_H ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 2 3 (配列番号 2 0) の V_L ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_L ドメインを含む、項目 2 5 に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目 2 7)

7 9 A - 2 3 (配列番号 1 9) の V_H ドメインに同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 2 3 (配列番号 2 0) の V_L ドメインに同一である V_L ドメインを含む、項目 2 5 に記載の単離抗体またはその抗原結合断片。

(項目 2 8)

多重特異性である、項目 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 2 9)

二重特異性である、項目 2 8 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 0)

F a b 断片である、項目 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 1)

F (a b)₂ 断片である、項目 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 2)

F v 断片である、項目 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 3)

一本鎖抗体である、項目 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 4)

多価であり、かつ、少なくとも 2 つの重鎖及び少なくとも 2 つの軽鎖を含む、項目 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 5)

ヒトカップ定常領域及びヒトラムダ定常領域からなる群から選択される軽鎖定常領域を含む、項目 1 ~ 2 9、3 3 及び 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 6)

重鎖定常領域またはその断片を含む、項目 1 ~ 3 0、及び 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 7)

前記重鎖定常領域またはその断片が、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、

10

20

30

40

50

I g M、I g A 1、I g A 2、I g E、またはI g Dである、項目 3 6 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 8)

前記抗体またはその断片が、ヒト化、霊長類化またはキメラである、項目 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 3 9)

前記抗体またはその断片が、ヒト化である、項目 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 4 0)

リンカーにより分離されるV H及びV Lドメインを含む、項目 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

(項目 4 1)

膜貫通ドメインをさらに含む、項目 4 0 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 4 2)

前記V Hが、配列番号 1 1、配列番号 1 3 及び配列番号 1 9 からなる群から選択されるポリペプチドに少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記V Lが、配列番号 1 2、配列番号 1 4 及び配列番号 2 0 からなる群から選択されるポリペプチドに少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである、項目 4 0 または 4 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 4 3)

20

前記V Hが、配列番号 1 1 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記V Lが、配列番号 1 2 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである、項目 4 0 または 4 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 4 4)

前記V Hが、配列番号 1 3 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記V Lが、配列番号 1 2 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである、項目 4 0 または 4 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 4 5)

前記V Hが、配列番号 1 1 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記V Lが、配列番号 1 4 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである、項目 4 0 または 4 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

(項目 4 6)

前記V Hが、配列番号 1 9 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記V Lが、配列番号 2 0 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである、項目 4 0 または 4 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

(項目 4 7)

T細胞受容体 鎖 (T C R) に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、

前記抗体は、前記配列 G S T L R G (配列番号 1) を含むT C R ポリペプチドのエピトープに結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

40

(項目 4 8)

前記核酸が、配列番号 1 1、配列番号 1 3 または配列番号 1 9 に少なくとも 9 0 % 同一であるV Hポリペプチドをコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 4 9)

前記核酸が、配列番号 1 2、配列番号 1 4 または配列番号 2 0 に少なくとも 9 0 % 同一であるV Lポリペプチドをコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 5 0)

前記核酸が、配列番号 2 に同一であるH C D R 1 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 5 1)

50

前記核酸が、配列番号 1 5 に同一である H C D R 1 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 5 2)

前記核酸が、配列番号 3 に同一である H C D R 2 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 5 3)

前記核酸が、配列番号 1 6 に同一である H C D R 2 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 5 4)

前記核酸が、配列番号 2 1 に同一である H C D R 3 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

10

(項目 5 5)

前記核酸が、配列番号 2 2 に同一である H C D R 3 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 5 6)

前記核酸が、配列番号 2 3 に同一である H C D R 3 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 5 7)

前記核酸が、配列番号 1 7 に同一である H C D R 3 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

20

(項目 5 8)

前記核酸が、配列番号 4 に同一である L C D R 1 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 5 9)

前記核酸が、配列番号 9 に同一である L C D R 1 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 6 0)

前記核酸が、配列番号 1 8 に同一である L C D R 1 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 6 1)

30

前記核酸が、配列番号 5 に同一である L C D R 2 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 6 2)

前記核酸が、配列番号 6 に同一である L C D R 3 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 6 3)

前記核酸が、配列番号 1 0 に同一である L C D R 3 アミノ酸配列をコードする、項目 4 7 に記載の単離ポリヌクレオチド。

(項目 6 4)

V H ポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、

40

前記 V H ポリペプチドは、配列番号 2、3、及び 2 1 をそれぞれ含む H C D R 1、H C D R 2、及び H D C R 3 アミノ酸配列を含み、前記 V H ポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含む T 細胞受容体アルファ (T C R) ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

(項目 6 5)

V H ポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、

前記 V H ポリペプチドは、配列番号 2、3、及び 2 2 をそれぞれ含む H C D R 1、H C D R 2、及び H D C R 3 アミノ酸配列を含み、前記 V H ポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含む T 細胞受容体アルファ (T C R) ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

50

(項目 6 6)

V_Hポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、
前記V_Hポリペプチドは、配列番号2、3、及び23をそれぞれ含むHCDR1、HCDR2、及びHDCR3アミノ酸配列を含み、前記V_Hポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

(項目 6 7)

V_Hポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、
前記V_Hポリペプチドは、配列番号15、16、及び17をそれぞれ含むHCDR1、HCDR2、及びHDCR3アミノ酸配列を含み、前記V_Hポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

10

(項目 6 8)

VLポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、
前記VLポリペプチドは、配列番号4、5及び6をそれぞれ含むLCDR1、LCDR2、及びLCDR3アミノ酸配列を含み、前記VLポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

(項目 6 9)

VLポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、
前記VLポリペプチドは、配列番号9、5及び10をそれぞれ含むLCDR1、LCDR2、及びLCDR3アミノ酸配列を含み、前記VLポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

20

(項目 7 0)

VLポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、
前記VLポリペプチドは、配列番号4、5及び10をそれぞれ含むLCDR1、LCDR2、及びLCDR3アミノ酸配列を含み、前記VLポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

30

(項目 7 1)

VLポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドであって、
前記VLポリペプチドは、配列番号18、5及び6をそれぞれ含むLCDR1、LCDR2、及びLCDR3アミノ酸配列を含み、前記VLポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記単離ポリヌクレオチド。

(項目 7 2)

項目47～71のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

(項目 7 3)

前記ポリヌクレオチドは、プロモーターと機能的に結合している、項目72に記載のベクター。

40

(項目 7 4)

抗体またはその抗原結合断片の製造方法であって、

(a) 細胞中で、抗体のV_L及びV_H鎖をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子（複数可）を発現すること；ならびに

(b) T細胞受容体 鎖（TCR）に特異的に結合する前記抗体を前記細胞から精製すること

を含む、前記方法。

(項目 7 5)

前記抗体またはその抗原結合断片が、GSTLRG（配列番号1）を含むTCR のエ

50

ピトープに選択的に結合する、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 7 6)

T 細胞受容体 鎖 (T C R) を含む細胞の選択方法であって、

(a) 前記細胞を、T C R 鎖に結合する抗体またはその抗原断片と接触させること、前記抗体または断片は、複数の T 細胞エピトープ特異性を有する T 細胞に結合し；及び

(b) 前記抗体または断片の結合に基づいて、前記 T C R 鎖を含む細胞を選択することを含む、前記方法。

(項目 7 7)

前記 T C R 鎖が、前記配列 G S T L R G (配列番号 1) を含むエピトープを含む、項目 7 6 に記載の方法。

(項目 7 8)

前記抗体または断片が、レポーターを含み、前記方法が、蛍光活性化細胞選別 (F A C S) によって前記細胞を選択することをさらに含む、項目 7 6 または 7 7 に記載の方法。

(項目 7 9)

T 細胞の拡張及び / または活性化方法であって、

T 細胞受容体 (T C R) のエピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片の存在下で、前記 T 細胞を人工抗原提示細胞 (a A P C) と接触させることを含む、

前記エピトープは、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含むポリペプチドである、前記方法。

(項目 8 0)

前記 a A P C が、K 5 6 2 細胞である、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 1)

前記 K 5 6 2 細胞が、T 細胞共刺激リガンドを発現する、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 2)

前記 a A P C が、T C R の前記エピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片を発現する、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記 a A P C が、T C R の前記エピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片を発現するための発現構築物を含む、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 4)

T C R のエピトープに結合する前記抗体またはその抗原結合断片が、複数の T 細胞エピトープ特異性を含む T 細胞に結合する、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記抗体またはその抗原結合断片が、項目 1 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載によるものである、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2 に少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一である H C D R 1 ; 配列番号 3 に少なくとも 9 5 % 同一である H C D R 2 ; C A Y L (配列番号 2 2) に同一である H C D R 3 を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 9 に少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一である L C D R 1 ; 配列番号 5 に少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一である L C D R 2 ; 配列番号 1 0 に少なくとも 9 5 % 同一である L C D R 3 を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 2 に少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一である H C D R 1 ; 配列番号 3 に少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一である H C D R 2 ; C A Y W (配列番号 2 3) に同一である H C D R 3 を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 8 9)

10

20

30

40

50

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 9 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 1 ; 配列番号 5 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 2 ; 配列番号 10 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 3 を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 4 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 1 ; 配列番号 5 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 2 ; 配列番号 10 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 3 を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 1 5 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である H C D R 1 ; 配列番号 1 6 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である H C D R 2 ; C R Y W (配列番号 1 7) に同一である H C D R 3 を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 2)

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 1 8 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 1 ; 配列番号 5 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 2 ; 配列番号 6 に少なくとも 95 % または 100 % 同一である L C D R 3 を含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 3)

前記抗体または抗原結合断片が、リンカーにより分離される V H 及び V L ドメインを含む、項目 8 5 に記載の方法。

(項目 9 4)

前記抗体または抗原結合断片が、膜貫通ドメインをさらに含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記 V H が、配列番号 1 1、配列番号 1 3 及び配列番号 1 9 からなる群から選択されるポリペプチドに少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L が、配列番号 1 2、配列番号 1 4 及び配列番号 2 0 からなる群から選択されるポリペプチドに少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドである、項目 9 3 または 9 4 に記載の方法。

(項目 9 6)

前記 V H が、配列番号 1 1 に少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L が、配列番号 1 2 に少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドである、項目 9 1 または 9 2 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記 V H が、配列番号 1 3 に少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L が、配列番号 1 2 に少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドである、項目 9 3 または 9 4 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記 V H が、配列番号 1 1 に少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L が、配列番号 1 4 に少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドである、項目 9 3 または 9 4 に記載の方法。

(項目 9 9)

前記 V H が、配列番号 1 9 に少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L が、配列番号 2 0 に少なくとも 90 % 同一であるポリペプチドである、項目 9 3 または 9 4 に記載の方法。

(項目 1 0 0)

前記 T 細胞が、末梢血単核球細胞 (P B M C) である、項目 7 9 ~ 9 9 に記載の方法。

(項目 1 0 1)

処置を必要とする動物における自己免疫疾患または T 細胞白血病の処置方法であって、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含む T C R ポリペプチドを標的にするキメラ抗原

10

20

30

40

50

受容体を含む宿主細胞を、前記動物に投与すること
を含む、前記方法。

(項目 102)

前記宿主細胞が、NK またはガンマデルタ T 細胞である、項目 101 に記載の方法。

(項目 103)

G S T L R G (配列番号 1) を含む T C R 鎖に結合する抗体またはその抗原結合断片をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド分子を含み、

前記抗体またはその抗原結合断片は、複数の T 細胞エピトープ特異性を有する T 細胞に選択的に結合する、宿主細胞。

(項目 104)

前記細胞が、哺乳動物細胞、酵母細胞、細菌細胞、繊毛虫細胞、または昆虫細胞からなる群から選択される、項目 103 に記載の宿主細胞。

(項目 105)

V H をコードするポリヌクレオチド、及び V L をコードするポリヌクレオチドを含む、組換え宿主細胞であって、

前記 V H をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 及び 3 からそれぞれなる H C D R 1 及び H C D R 2 アミノ酸配列、ならびに H C D R 3 アミノ酸配列 C A Y L (配列番号 22) を含む V H ポリペプチドをコードし、前記 V L をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 9、5 及び 10 をそれぞれ含む L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 アミノ酸配列を含む V L ポリペプチドをコードし、ポリヌクレオチドをコードする前記 V H 及び V L によりコードされる抗体またはその抗原断片は、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含む T C R 鎖ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記組換え宿主細胞。

(項目 106)

V H をコードするポリヌクレオチド、及び V L をコードするポリヌクレオチドを含む、組換え宿主細胞であって、

前記 V H をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 及び 3 をそれぞれ含む H C D R 1 及び H C D R 2 アミノ酸配列、ならびに H C D R 3 アミノ酸配列 C A Y W (配列番号 23) を含む V H ポリペプチドをコードし、前記 V L をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 9、5 及び 10 をそれぞれ含む L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 アミノ酸配列を含む V L ポリペプチドをコードし、ポリヌクレオチドをコードする前記 V H 及び V L によりコードされる抗体またはその抗原断片は、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含む T C R 鎖ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記組換え宿主細胞。

(項目 107)

V H をコードするポリヌクレオチド、及び V L をコードするポリヌクレオチドを含む、組換え宿主細胞であって、

前記 V H をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 2 及び 3 からそれぞれなる H C D R 1 及び H C D R 2 アミノ酸配列、ならびに H C D R 3 アミノ酸配列 C A Y L (配列番号 22) を含む V H ポリペプチドをコードし、前記 V L をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 4、5 及び 10 をそれぞれ含む L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 アミノ酸配列を含む V L ポリペプチドをコードし、ポリヌクレオチドをコードする前記 V H 及び V L によりコードされる抗体またはその抗原断片は、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含む T C R 鎖ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記組換え宿主細胞。

(項目 108)

V H をコードするポリヌクレオチド、及び V L をコードするポリヌクレオチドを含む、組換え宿主細胞であって、

前記 V H をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 15 及び 16 からそれぞれなる H C D R 1 及び H C D R 2 アミノ酸配列、ならびに H C D R 3 アミノ酸配列 C R Y W (配列番号 17) を含む V H ポリペプチドをコードし、前記 V L をコードするポリヌクレオチドは、配列番号 18、5 及び 6 をそれぞれ含む L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 アミノ酸配列を含む V L ポリペプチドをコードし、ポリヌクレオチドをコードする前記 V H

10

20

30

40

50

及びV Lによりコードされる抗体またはその抗原断片は、配列G S T L R G（配列番号1）を含むT C R 鎖ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、前記組換え宿主細胞。
（項目109）

配列G S T L R G（配列番号1）を含むT C R ポリペプチドのエピトープに特異的に結合し、かつ、腫瘍関連抗原を標的にする抗体またはその抗原含有断片をさらに含む表面抗体またはその抗原含有断片を含む、組換え宿主細胞。

（項目110）

腫瘍関連抗原を標的にする前記抗体またはその抗原含有断片が、キメラ抗原受容体（C A R）である、項目107に記載の組換え宿主細胞。

（項目111）

配列G S T L R G（配列番号1）を含むT C R ポリペプチドを標的にするキメラ抗原受容体を含む、宿主細胞であって、

前記宿主細胞が、N KまたはガンマデルタT細胞である、前記宿主細胞。

【0019】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様を説明するために含まれている。本発明は、本明細書に示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて1つ以上の図面を参照することによってもっと理解することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A】A）モノクローナル抗体（クローン79A）の結合特異性。E L I S Aは、直鎖T C R 不変鎖特異的合成ペプチドで被覆された固相上で行った。抗体用量曲線は、1000ng/mL～7.5ng/mLの濃度範囲で実行した。対照には、アッセイにおける非特異的ペプチド、二次抗体対照、及び緩衝液対照が含まれる。V i c t o r（商標）プレートリーダーによって、アッセイプレートをOD450で読み取った。試料は、重複して実行した。B）A l a - スキャンライブラリーにより、固相E L I S A上に被覆された凍結乾燥ペプチド（M i m o t o p e（商標）A l a - スキャンペプチドライブラリー）上のm A b 79Aの直鎖エピトープ特異性が確認された。グラフは、選択されたA Aをアラニンで置換する際に、79A m A bの最も高い結合強度を示す。C）アラニンで置換された、図に示す特異的ペプチドへの79Aの中程度の結合。D）G S T L G R（配列番号1）は、T C R V a 24及びJ a 18のジャンクションを表し、アラニンによるこれらのA Aの置換の79A結合焦点は、結合を完全に抑制する。E（i）及びE（i i）79Aは、T C R - C D R 3不変鎖に対する立体構造上の適合度が欠如している。フローサイトメトリーアッセイは、79Aが、精製されたi N K T細胞（画像における）またはレギュラー + - T細胞（後に示す）のいずれかに結合しないことを示し、i N K T特異的m A bとして、6 B 1 1は、i N K T細胞上の立体配座エピトープを検出する。

【図1B】同上

【図1C】同上

【図1D】同上

【図1E - 1】同上

【図1E - 2】同上

【0021】

【図2】m A bクローン79AのV遺伝子増幅。アガロースゲル画像は、ハイブリドーマクローンA79のV H及びV L鎖の増幅を示す。V H鎖（400～bp）は、（高縮退及び低縮退の混合物を含有する）マウス重鎖F R 1領域プライマーと一緒にマウス重鎖定常領域プライム（M H - I g G 1）の混合物を用いた増幅後の画像で示し、V L鎖（370～bp）は、マウスカッパ鎖ユニバーサル縮退プライマー及びカッパ鎖定常プライマーの混合物を用いた増幅後である。全ての5'プライマーは、F R 1の第1のヌクレオチドで開始するV L及びV Hの両方について設計された。

【0022】

【図3A】A～B）抗体（79A）ホモロジーモデル。A B Rに基づいた79Aホモロジ

10

20

30

40

50

ーモデルの構築は、(Ref. Kunik, V., Peters, B. and Ofra n, Y. (2012) Structural consensus among anti bodies defines the antigen binding site. P LoS computational biology, 8, e1002388.) (Kun ik et al., 2012. Nucleic Acid Research. 40, W521-524)によって分析した。WAMサーバー(antibody.bath. ac.ukでのワールド・ワイド・ウェブ)を使用して、VL鎖を構築し、VH鎖CDR は短いため、SWISS-MODEL(swissmodel.expasy.orgでのワールド・ワイド・ウェブ)を使用して、VHドメインを構築した。パラメーターは、サーバー仕様のとおりである。C)TCR不変鎖特異的ペプチドをもつ79AのZ-ドッキングモデル。ドッキングモデルは、79Aが、2CDEに由来するTCR不変鎖特異的ペプチドとの立体配置特異的適合を誘発しないことを示している。D)ドッキングモデルは、ウェブサーバーZDOCKで構築された - TCR(PDBコード1KGC)と複 合した79A抗体を示し、BuildModel機能を介して出力を得た。FoldXによ ってドッキングモデルを分析した。Ala-スキャンを行って、抗体CDRにおける個 々のアミノ酸のエネルギー寄与を描出した。相互作用エネルギー(G)の総変化は、 変種の相互作用エネルギーから野生型の相互作用エネルギーを引くことによって算出した。

【図3B】同上

【図3C】同上

【図3D】同上

【0023】

【図4A】FoldXの複合体Ala-スキャン機能に基づいた相互作用エネルギー(G)の変化。 $G^* = G_{MU} - G_{WT} (-9.98)$ 抗体から得られた総相 互作用エネルギー(G)を、Ala-スキャン後にモデルドッキングした。

G^* は、変種の相互作用エネルギーから野生型のものを引くことによって算出した。赤色 丸印は、相互作用エネルギーの最低の変化と、突然変異に適切な残基を示す。A)L鎖の CDR1の41位のチロシン(Y)をフェニルアラニン(F)に変異させた。L鎖のCD R3の94位のフェニルアラニン(F)をメチオニン(M)に変えた。B)H鎖のCDR 3の99位のアスパラギン酸(D)をアラニン(A)に変異させた。H鎖のCDR3の1 01位のトリプトファン(W)をロイシン(L)に変異させた。C)散布折れ線グラフは 、抗体79A CDR(VH及びVL領域)に沿った、Kcal/molの分子相互作用エ ネルギー(G)の分布を表す。相互作用エネルギーが低いアミノ酸(< 0.5 Kcal/mol)は、突然変異の候補として考えられ、(赤色矢印で)マークされる。関連す る突然変異は、79A軽鎖CDR1における32位でセリンからグリシン(S32G)、 33位でアスパラギンからグリシン(N33G)、重鎖CDR1における31位でアスパ ラギン酸からグリシン(D31G)、重鎖CDR2における50位でアスパラギン酸から グリニン(D50G)、及び79A重鎖のCDR3における99位でアスパラギン酸から アルギニン(D99R)である。関連する突然変異を79A抗体可変領域に導入し、変異 型組換え抗体クローンS23を構築した。

【図4B】同上

【図4C】同上

【0024】

【図5A-1】A(i)変異型組換え抗体発現ベクターS15(一本鎖の親和性が最適化 された新規の変種15)のための分子構築物。概略図は、組換え抗体を生成するために、 切断型IgG1 Fcに融合した79A変異型scFvを示す。抗体遺伝子発現カセット は、可変重鎖(VH変異体15)及び可変軽鎖(VL変異体15)とフレーム結合したV H5シグナルペプチドからなる。発現は、SV40プロモーターの制御下であり、ポリA シグナルで停止した。発現は、SV40プロモーターの制御下であり、ポリAシグナルで 終了した。A(ii)ベクターマップは、組換え抗体(S15)を生成するために、切断 型IgG1 Fcに融合した79A変異型scFvを示す。抗体発現カセットは、可変重

10

20

30

40

50

鎖（VH変異体15）及び可変軽鎖（VL変異体15）とフレーム結合したVH5シグナルペプチドからなる。発現は、SV40プロモーターの制御下であり、ポリAシグナルで終了した。B）変異体23（S23）のVH及びVLを表す分子構築物。修飾（D31G、D50G及びD99R）を有するVH可変領域をヒトIgG1Fcガンマ定常鎖に融合し、修飾（S32G及びN33G）を有するVLをヒト定常軽鎖に融合する。全長抗体配列をPCR増幅した後、高発現ベクター（LakePharma）のMCSにクローンし、HEK293細胞をトランスフェクトして、一過性発現させた。培養上清を抗体精製に使用した。

【図5A-2】同上

【図5B】同上

【0025】

【図6-1】A）組換え抗体（S11、S13及びS15）のホモロジー及び純度。クマシーブルー染色されたSDS-PAGEゲルは、プロテインA精製後の組換え抗体調製物のホモロジー及び純度を示す。画像に示すものは、哺乳動物293T細胞で発現された3つの異なる変異型抗体である。B）79A変異体（一本鎖mAb）は、変性した全T細胞溶解物中のTCR-アルファ鎖を検出する。ドナーPBMCまたは精製T細胞から抽出された全細胞溶解物を、変性したPAGE（2Xプロモフェノールブルーと組み合わせたSDS+2ME）で実施した。等量（10ug）のタンパク質を正規化後に各レーンにロードした。親mAb 79A及び変異体mAb（変異体13及び変異体15）は、一次抗体として使用した後、検出のためのマッチした二次抗体にHRP結合させた。化学発光によってプロットを視覚化し、Bioradイメージャーによって画像を取得した。最大検出感度が、変異体m15について達成され、最も高いGが、親A79scFvと変異体mAb（S13及びS15）の間の「相互作用エネルギーの変化」と相関していた。C）T細胞の-TCRへの組換えmAb S15の立体配座特異的結合。フロープロットは、S15がそのネイティブ構成で-TCR+T細胞に結合できたことを示す。S15（変異体15）の結合改善は、79A鎖に導入した部位特異的突然変異に相関する。左パネルで、親mAb 79Aは、PBMC由来のT細胞に結合しない。しかしながら、S15は、-TCR+T細胞と共染色し、結合は、市販の抗-TCR（WT31）抗体に匹敵する。D）組換えタンパク質（S15及びS23）のSDS-PAGE分析は、TGX予め染色されたゲル（Miniprotean、Biorad）上で実施した。試料を2MEで還元し、ゲルをロードする前に2分間加熱（95）した。Bioradイメージングシステム（Chemidoc）によって画像を取得した。プロテインA親和性精製された試料の重鎖及び軽鎖の両方の位置を図に示す。E）ドットプロットは、培養物（n=3）から採取された活性化+T細胞への変異型組換え抗体S15の結合が改善されたことを示す。細胞を、マッチした蛍光結合二次抗体と一緒に一次抗体79AまたはS15で染色し、方法で記載されたフローサイトメーター上で実施した。BD FACSCalibur上の所定のフォーワード&サイドスキャッター設定に基づいて、生細胞をリンパ球にゲートした。50万個の細胞のデータを取得した。

【図6-2】同上

【図6-3】同上

【0026】

【図7A】A）K562活性化及び増殖細胞（AaPC）上にS15（変異体VHリンカー変異体VL）をテザーする分子構築物。プラスミドコードS15（変異体VHリンカー変異体VL）を導入するための分子構築物。画像に示すように、5'LTR（長い末端反復）を、選択マーカーとして、異種エンハンサーRSVラウス肉腫ウイルス、HIVパッケージングシグナル、RRE逆応答エレメント、cPPTセントラルポリプリントラクト、Igkリーダー鎖配列、S15-VH変異体抗体可変重鎖、S15-VL可変軽鎖、4グリシン-3セリンリンカー反復、HAタグを有するCD8TM膜貫通、及び切断型CD8膜貫通、HBVPREウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節因子、及び自己不活性化HIVLTR、AmpRアンピシリン耐性遺伝子に融合した。パッケージングベ

10

20

30

40

50

クター (p s P A X 2) 及びエンベロープ (p V S V - G) プラスミドを別々に加える。全てのプラスミドを 2 9 3 T 細胞にトランスフェクトし、レンチウイルス粒子を産生する。B) 操作された K 5 6 2 - A a P C (K 5 6 2 - S 1 5 及び K 5 6 2 - O K T 3) は、T 細胞活性化及び共刺激リガンドを発現する。ヒストグラムは、S 1 5 s c F v (抗 H A タグにより検出)、T 細胞共刺激リガンド C D 8 6、C D 1 3 7 L、及びサイトカインリガンド I L 1 5 - I L 1 5 R a を発現するように形質導入された K 5 6 2 細胞レンチウイルスの免疫表現型を示す。また、K 5 6 2 細胞を操作して、C D 6 4 を発現し、C D 3 m A b O K T 3、及び同様の共刺激リガンドをロードした。C) C F S E ベースの色素希釈アッセイは、C D 2 8 及び O K T 3 (C D 3 特異的 m A b) と比較して、プレート結合組換え抗体 S 1 5 及び S 2 3 を介した活性化後の T 細胞分裂を示す。細胞を生死について染色し、C D 3 + ゲート T 細胞上のフローサイトメトリーによって分析した。C F S E 強度は、フローサイトメトリーによって 4 8 8 n m 励起で捕捉した。各ピークは、2 日目の抗体刺激後に生成された C D 3 陽性 T 細胞の異なる集団を表す。D) C F S E ベースの色素希釈アッセイは、6 日目のプレート結合抗体の活性化後の T 細胞増殖を示す。C F S E をロードした未刺激 P B M C (暗灰色ヒストグラム) は、アッセイにおいて対照として使用する。E) K 5 6 2 - A a P C で拡張された T 細胞の成長速度。照射された K 5 6 2 - A a P C 上で 2 週間の共培養後の健常なドナー P B M C 由来の C D 3 + - T C R + T 細胞の拡張。生細胞は、トリパンブルー色素排除法によって計数し、絶対細胞数として表した。グラフは、T 細胞共刺激リガンドの存在下で S 1 5 及び O K T 3 を介して刺激した T 細胞を示す。F) 抗体 (S 1 5 のみ) と共にロードした K 5 6 2 細胞上の T 細胞の同様の成長速度。K 5 6 2 親細胞は、陰性対照として作用し、O K T 3 をロードした K 5 6 2 は、陽性対照として作用する。G) エクスビゴ培養された活性化 T 細胞の免疫表現型。活性化された生 T 細胞は、- T C R (W T 3 1)、C D 3、C D 4 及び C D 8 T 細胞マーカー (B D) の細胞表面発現についてフローサイトメトリーによって分析した。図に示すものは、K 5 6 2 (親)、共刺激による K 5 6 2 S 1 5、共刺激による K 5 6 2 O K T 3 を用いた共培養の 7 日目に採取された活性化 T 細胞におけるマーカーの免疫表現型発現を表す擬似カラープロットである。H) 組換え抗体によって活性化されたエクスビゴ繁殖された T 細胞を、a b - T C R 発現及び a b - T C R 発現について分析し、C D 3 と共に示した。I) 抗体による活性化の前後の C D 4 発現の T 細胞表現型。J) 抗体による活性化の前後の C D 8 発現の T 細胞表現型。K) 及び L) メモリーまたはエフェクターメモリー表現型の生成をもたらす活性化のレベルを評価するための C D 4 5 R A 及び C D 4 5 R O 発現に基づいた T 細胞分化マーカー。エクスビゴ繁殖された生 T 細胞 (固定可能生存性色素陰性) 及び健常なドナー P B M C 由来の T 細胞は、フローサイトメトリーによって分析した。細胞を C D 1 9 及び C D 1 4 で染色し、B 細胞及び単球を除外した。全ての生細胞を C D 3 + C D 5 6 陰性 T 細胞集団にゲートした。P B M C 由来の操作されていない T 細胞集団と比較して、O K T 3 刺激後に C D 4 + T 細胞パーセンテージが減少するようと思われる、S 2 3 は高い C D 4 組成物を維持しながら、逆に、C D 8 パーセンテージは、O K T 3 刺激群において最も高かった。細胞分化の場合、C D 4 5 R A 陰性集団は、O K T 3 群において最も高かった一方、C D 4 5 R A 陰性 C D 4 5 R O 陽性集団は、刺激に使用した抗体クローンに関わりなく細胞の各群内で安定したままである。(M) T 細胞の疲弊化のマーカー P D 1 は、S 1 5 または S 2 3 媒介活性化と比較して、O K T 3 刺激群において上方調節される。

【図 7 B】同上

【図 7 C】同上

【図 7 D】同上

【図 7 E】同上

【図 7 F】同上

【図 7 G】同上

【図 7 H】同上

【図 7 I】同上

10

20

30

40

50

【図 7 J】同上

【図 7 K】同上

【図 7 L】同上

【図 7 M】同上

【0027】

【図 8 A - 1】A) S 1 5 または O K T 3 - C D 3 刺激によって a A P C 上に拡張された活性化 T 細胞と比較した健常なドナー P B M C 由来の T 細胞の T C R V レパートリーは、異種 T 細胞レパートリーによる T 細胞の集団の生成を示す。活性化されインビトロ拡張された T 細胞のレパートリーの予想外のゆがみは、全く気付かれない。B) S 1 5 刺激 (C S 1 S 1 5) または O K T 3 T 細胞のいずれかによって増殖された活性化 T 細胞の T C R V レパートリー。レパートリーは、クローン型の任意の特異的増殖のないポリクローナル T 細胞集団を表す。C) エクスビボ増殖後の T 細胞クローン頻度及び分布の次世代ディープシーケンス調査。クローン型の共通性は、O K T 3 刺激と比較して、S 1 5 媒介活性化後により良く P B M C と整列することが見られる。D) 表は、活性化後に生成された T 細胞のクローン頻度を表すピアソン係数値 (r^2) を示す。T 細胞クローン頻度は、(親 K 5 6 2 / A C T)、(K 5 6 2 - S 1 5 - 共刺激) 及び (K 5 6 2 - O K T 3 - 共刺激) で刺激された T 細胞間で比較する。P B M C と比較した試料重複は、S 1 5 T 細胞について r^2 値 0 . 0 4 3 及び $\sigma = 0 . 4 7 2$ 、及び O K T 3 - P B M C について $r^2 = 0 . 0 5 5$ 及び試料重複 $\sigma = 0 . 1 7 2$ を示す。クローンの重複は、S 1 5 活性化 T 細胞が優れている。

10

20

【図 8 A - 2】同上

【図 8 B】同上

【図 8 C】同上

【図 8 D】同上

【0028】

【図 9】V - J 対合遺伝子頻度。積み上げヒストグラムは、共刺激により K 5 6 2 - S 1 5 (クローン C S 1 S 1 5) 上で増殖された T 細胞、及び共刺激により K 5 6 2 - O K T 3 (クローン K 5 6 2 O K T 3) 上で増殖された T 細胞の任意の特定の遺伝子座における V - J 対合遺伝子頻度を示す。

【0029】

30

【図 10】ディープシーケエンシング後の N G S データから分析した際の操作されていない T 細胞対活性化 T 細胞のクローン階層。T 細胞活性化及び増殖で使用された健常なドナー P B M C 試料における各クローンによって表された、生産的なシーケエンシングリードのパーセンテージに基づいた最も高いランキング (1 ~ 10) のクローン (上パネル)。表は、対応する T C R C D R 3 のアミノ酸配列を、V 及び J ファミリー対立遺伝子と共に、ならびにそれぞれのパーセンテージを示す。K 5 6 2 - S 1 5 対 K 5 6 2 - O K T 3 によって活性化された T 細胞間のトップクローン頻度の比較をヒストグラムとして示す (下パネル)。Y 軸は、試料当たりの総カウントのパーセンテージを表す。

【0030】

【図 11】S 1 5 活性化 T 細胞及び O K T 3 活性化 T 細胞の両方の C D R 3 鎖長の釣鐘曲線分布。P B M C 由来 T 細胞と比較した場合の活性化 T 細胞の C D R 3 鎖長。C D R 3 鎖の全ての分布にわたる摂動は観察されない。

40

【発明を実施するための形態】

【0031】

定義

本明細書で使用する場合、特定の成分において「本質的に含まない」は、指定された成分のいずれも意図的に組成物に処方されていない及び/または汚染物質としてのみ、もしくは微量に存在していることを意味するために本明細書で使用される。従って、組成物の意図しない汚染から得られる指定された成分の合計量は、好ましくは 0 . 0 1 % を下回る。最も好ましいのは、指定された成分を標準的な分析方法で全く検出することができない組

50

成物である。

【 0 0 3 2 】

本明細書及び特許請求の範囲で使用する場合、「a」または「an」は、1つ以上を意味し得る。本明細書及び特許請求の範囲で使用する場合、用語「含む」と組み合わせて使用する場合、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つまたは2つ以上を意味し得る。本明細書及び特許請求の範囲で使用する場合、「別の」または「さらなる」は、少なくとも第2またはそれ以上を意味し得る。

【 0 0 3 3 】

本明細書及び特許請求の範囲で使用する場合、「約」という用語は、値に、装置の固有の変動、値を定量するために使用される方法の固有の変動、または研究対象に存在する変動が含まれることを示すために使用される。

10

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」という用語は、単数の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を含むことが意図され、アミド結合(ペプチド結合とも知られる)によって直線的に連結した単量体(アミノ酸)からなる分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の1つ以上の鎖を指し、特定の長さの産物を指さない。従って、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」または2つ以上のアミノ酸の任意の1つ以上の鎖を指すために用いられる任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義の範囲内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらのいずれかの用語の代わりに用いられてもよく、またはこれらの用語と同義に用いられてもよい。「ポリペプチド」という用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことも意図される。発現後修飾には、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、または非天然アミノ酸による修飾が含まれるが、それに限定されるわけではない。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来してもよく、組換え技術によって産生されてもよいが、必ずしも、指定された核酸配列から翻訳されるとは限らない。ポリペプチドは、化学合成を含む任意のやり方で作製することができる。

20

【 0 0 3 5 】

本発明のポリペプチドは、約3以上、5以上、10以上、20以上、25以上、50以上、75以上、100以上、200以上、500以上、1,000以上、または2,000以上アミノ酸のサイズでもよい。ポリペプチドは、規定された三次元構造を有してもよいが、必ずしも、このような構造を有するとは限らない。規定の三次元構造を有するポリペプチドは、折り畳まれていると呼ばれ、規定の三次元構造を有さないが多数の異なる立体構造をとることができるポリペプチドは、折り畳まれていないと呼ばれる。本明細書で使用する際、糖タンパク質という用語は、アミノ酸残基、例えば、セリン残基またはアスパラギン残基の酸素含有側鎖または窒素含有側鎖を介してタンパク質に取り付けられた少なくとも1つの炭水化物部分と結合しているタンパク質を指す。

30

【 0 0 3 6 】

「単離された」ポリペプチドまたはその断片、変種、もしくは誘導体とは、天然の環境にはないポリペプチドを意図している。特定のレベルの精製は必要とされない。例えば、単離されたポリペプチドは、その自然または天然の環境から取り出されていてもよい。宿主細胞内で発現された合成組換えポリペプチド及び/またはタンパク質は、本発明の目的で単離されているとみなされ、同様に、任意の適切な技法によって分離されている、分画されている、または部分的もしくは実質的に精製されている自然のポリペプチドまたは組換えポリペプチドも単離されているとみなされる。

40

【 0 0 3 7 】

本発明のポリペプチドとして、前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、または変種、及びその任意の組み合わせも含まれる。「断片」、「変種」、「誘導体」、及び「類似体」という用語は本発明の抗TCR抗体または抗体ポリペプチドを指す時には、本発明の対応する抗体または抗体ポリペプチドの抗原結合特性の少なくとも一部を保持している任

50

意のポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドの断片には、本明細書の他の場所で議論される特定の抗体断片に加えて、タンパク質分解断片、及び欠失断片が含まれる。本発明の抗TCR抗体及び抗体ポリペプチドの変種には、前記の断片が含まれ、アミノ酸置換、欠失、または挿入のためにアミノ酸配列が変化しているポリペプチドも含まれる。変種は、天然のものでもよく、非天然のものでもよい。非天然変種は、当該技術分野において公知の突然変異誘発技術を用いて生成されてもよい。変種ポリペプチドは、保存的もしくは非保存的なアミノ酸置換、欠失、または付加を含んでもよい。変種ポリペプチドはまた、本明細書において「ポリペプチド類似体」と呼ばれることもある。本明細書で使用する場合、抗TCR抗体または抗体ポリペプチドの「誘導体」は、官能基側鎖基の反応によって1つ以上の残基が化学的に誘導体化された目的のポリペプチドを指す。20種類の標準アミノ酸の中の1つ以上の天然アミノ酸誘導体を含むポリペプチドも「誘導体」として含まれる。例えば、プロリンの代わりに4-ヒドロキシプロリンが用いられてもよく、リジンの代わりに5-ヒドロキシリジンが用いられてもよく、ヒスチジンの代わりに3-メチルヒスチジンが用いられてもよく、セリンの代わりにホモセリンが用いられてもよく、リジンの代わりにオルニチンが用いられてもよい。本発明の抗TCR抗体及び抗体ポリペプチドの誘導体は、本発明の参照抗体または抗体ポリペプチドでは見られないさらなる特徴を示すように変えられているポリペプチドを含んでもよい。

【0038】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単数の核酸ならびに複数の核酸を包含することが意図され、単離された核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)またはプラスミドDNA(pDNA)を指す。ポリヌクレオチドは、従来のホスホジエステル結合または従来にはない結合(例えば、アミド結合、例えば、ペプチド核酸(PNA)において見られる結合)を含んでもよい。「核酸」という用語は、ポリヌクレオチドに存在する任意の1つ以上の核酸セグメント、例えば、DNA断片またはRNA断片を指す。「単離された」核酸またはポリヌクレオチドとは、自然環境から取り出されている核酸分子、DNAまたはRNAを意図している。例えば、ベクターの中に含まれる、抗TCR結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片をコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の目的では単離されているとみなされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞の中で維持されている組換えポリヌクレオチド、または溶解状態にある(部分的もしくは実質的に)精製されたポリヌクレオチドが含まれる。単離されたRNA分子には、本発明のポリヌクレオチドのインビボRNA転写物またはインビトロRNA転写物が含まれる。さらに、本発明の単離されたポリヌクレオチドまたは核酸には、合成により生成されたこのような分子が含まれる。さらに、ポリヌクレオチドまたは核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターなどの調節エレメントでもよく、これを含んでもよい。

【0039】

本明細書で使用する場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸部分である。「停止コドン」(TAG、TGA、またはTAA)はアミノ酸に翻訳されないが、コード領域の一部とみなされることがある。だが、隣接配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどは、どれもコード領域の一部でない。本発明の2つ以上のコード領域が1つのポリヌクレオチド構築物の中に存在してもよく、例えば、1つのベクターにあってよく、別々のポリヌクレオチド構築物に、例えば、別々の(異なる)ベクターにあってよい。さらに、どのベクターもコード領域を1つしか含んでいなくてもよく、2つ以上のコード領域を含んでもよい。例えば、免疫グロブリン重鎖可変領域をコードするベクター及び免疫グロブリン軽鎖可変領域をコードするベクターが別々にあってよい。さらに、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、抗TCR抗体またはその断片、変種、もしくは誘導体をコードする核酸と融合した状態で、または融合していない状態で異種コード領域をコードしてもよい。異種コード領域には、分泌シグナルペプチドまたは異種機能ドメインなどの特殊なエレメントまたはモチーフが含まれるが、それに限定されるわけではない。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸は、DNAである。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、1つ以上のコード領域と機能的に結合しているプロモーター及び/または他の転写調節エレメントもしくは翻訳調節エレメントを含んでもよい。機能的に結合しているとは、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドが調節配列（複数可）の影響または制御を受けて発現されるように、遺伝子産物のコード領域が1つ以上の調節配列と結合している時である。2つのDNA断片（例えば、ポリペプチドコード領域及びこれらと結合しているプロモーター）は、プロモーター機能の誘導によって望ましい遺伝子産物をコードするmRNAが転写されれば、及び2つのDNA断片間の結合の性質が、発現調節配列が遺伝子産物の発現を誘導する能力を妨げず、またはDNAテンプレートが転写される能力を妨げないのであれば「機能的に結合している」。従って、プロモーター領域は、このプロモーターが核酸の転写に影響を与えることができる場合、ポリペプチドコード核酸と機能的に結合しているだろう。プロモーターは、所定の細胞においてのみDNAを実質的に転写する細胞特異的プロモーターでもよい。細胞特異的転写を誘導するために、プロモーターのほかに他の転写調節エレメント、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、及び転写終結シグナルがポリヌクレオチドと機能的に結合していてもよい。適切なプロモーター及び他の転写制御領域が本明細書において開示される。

10

【 0 0 4 1 】

様々な転写制御領域が当業者に公知である。これらには、脊椎動物細胞において機能する転写制御領域が含まれるが、それに限定されるわけではない。脊椎動物細胞において機能する転写制御領域には、サイトメガロウイルスに由来するプロモーター及びエンハンサーセグメント（最初期プロモーターとイントロン-A）、シミアンウイルス40（初期プロモーター）、ならびにレトロウイルス（例えば、ラウス肉腫ウイルス）などがあるが、これに限定されない。他の転写制御領域には、脊椎動物遺伝子、例えば、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、及びウサギ - グロビンに由来する転写制御領域、ならびに真核細胞において遺伝子発現を制御することができる他の配列が含まれる。さらなる適切な転写制御領域には、組織特異的プロモーター及びエンハンサーならびにリンホカイン誘導性プロモーター（例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導されるプロモーター）が含まれる。

20

【 0 0 4 2 】

同様に、様々な翻訳調節エレメントが当業者に公知である。これらには、リボソーム結合部位、翻訳開始コドン及び翻訳終結コドン、ならびにピコルナウイルスに由来するエレメント（特に、配列内リボソーム進入部位すなわちIRES、CITE配列とも呼ばれる）が含まれるが、これに限定されない。

30

【 0 0 4 3 】

他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、RNA、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）の形をしたRNAである。

【 0 0 4 4 】

本発明のポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を誘導する分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードする、さらなるコード領域と結合してもよい。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されたタンパク質には、シグナルペプチド配列または分泌リーダー配列があり、粗面小胞体を通る成長タンパク質鎖の輸送が開始したらシグナルペプチド配列または分泌リーダー配列は成熟タンパク質から切断される。当業者であれば、脊椎動物細胞によって分泌されたポリペプチドは、一般的に、ポリペプチドのN末端にシグナルペプチドが融合しており、シグナルペプチドは、完全なまたは「完全長」のポリペプチドから切断されて、分泌形態または「成熟」形態のポリペプチドを産生することを知っている。ある特定の態様では、天然シグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖シグナルペプチドを使用するか、または機能的に結合しているポリペプチドの分泌を誘導する能力を

40

50

保持している、その配列の機能誘導体が用いられる。あるいは、異種哺乳動物シグナルペプチドまたはその機能誘導体が用いられてもよい。例えば、野生型リーダー配列を、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (TPA) またはマウス - グルクロニダーゼのリーダー配列と置換してもよい。

【0045】

本明細書で使用する場合、「TCR」という用語は、「T細胞受容体」を指す。T細胞受容体は、Tリンパ球(「T細胞」)の表面上の分子である。実施形態では、受容体は、T細胞受容体がアルファ()及びベータ()鎖を含むことを意味する、 - TCR受容体であり、典型的には、CD3鎖分子との複合体の一部として発現される。従って、「 - TCR + T細胞」は、 及び 鎖を含むその表面上にT細胞受容体を含有するTリンパ球である。 及び 鎖の両方は、非常に可変であるが、T細胞受容体 鎖は、定常(保存領域)、すなわち、Va24 - Ja18ジャンクション(アミノ酸配列GSTLGR(配列番号1))を含有する。

10

【0046】

本発明の「結合分子」または「抗原結合分子」は、その最も広い意味で、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。1つの実施形態では、結合分子は、TCR、例えば、T細胞受容体、例えば、T細胞受容体 鎖に特異的に結合する。実施形態では、結合分子は、T細胞受容体 鎖のVa24 - Ja18ジャンクション(アミノ酸配列GSTLGR(配列番号1))に特異的に結合する。別の実施形態では、本発明の結合分子は、親和性を増加させるために点突然変異を含む抗体またはその抗原結合断片である。別の実施形態では、本発明の結合分子は、抗体分子の少なくとも1つの重鎖CDRまたは軽鎖CDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも2つのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも3つのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも4つのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも5つのCDRを含む。別の実施形態では、本発明の結合分子は、1つ以上の抗体分子に由来する少なくとも6つのCDRを含む。

20

【0047】

本発明は、ある特定の抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体に関する。具体的に天然抗体などのフルサイズ抗体について言及している場合を除いて、「抗TCR抗体」という用語は、フルサイズ抗体ならびにこのような抗体、例えば、天然抗体もしくは免疫グロブリン分子の抗原結合断片、変種、類似体、もしくは誘導体、または抗体分子と同様に抗原に結合する操作された抗体分子もしくは断片を含む。

30

【0048】

本明細書で使用する場合、「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体、または下記のように、例えば、Kucherlapati etによる米国特許第5,939,598号に記載のように1つ以上のヒト免疫グロブリンの遺伝子が導入されているが、内因性免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体を含む。「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体はまた、少なくとも重鎖可変ドメインを含むか、または少なくとも重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、可変ドメイン(複数可)は、ヒト免疫グロブリン可変ドメイン(複数可)のアミノ酸配列を有する。

40

【0049】

「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体はまた、本明細書に記載の抗体分子(例えば、VH領域及び/またはVL領域)の変種(誘導体を含む)を含むか、これらから本質的になるか、またはこれらからなり、抗体またはその断片がTCRまたはその断片もしくは変種に免疫特異的に結合する、前記の「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体を含む。アミノ酸を置換する部位特異的変異誘発及びPCRを介した変異誘発を含むが、これに限定されない、当業者に公知の標準的な技法を用いて、ヒト抗TCR抗体をコードするヌクレオチド配列に変異を導入することができる。好ましくは、変種(誘導体を含む)は、参照のVH領

50

域、HCDR1、HCDR2、HCDR3、VL領域、LCDR1、LCDR2、またはLCDR3を基準として、50アミノ酸未満の置換、40アミノ酸未満の置換、30アミノ酸未満の置換、25未満のアミノ酸未満の置換、20アミノ酸未満の置換、15アミノ酸未満の置換、10アミノ酸未満の置換、5アミノ酸未満の置換、4アミノ酸未満の置換、3アミノ酸未満の置換、または2アミノ酸未満の置換をコードする。

【0050】

ある特定の実施形態では、アミノ酸置換は、以下でさらに議論される保存的アミノ酸置換である。あるいは、突然変異は、例えば、飽和突然変異誘発によって、コード配列の全てまたは一部に沿って無作為に導入されてもよく、活性を保持している変種を同定するために、結果として得られた変種は、生物学的活性（例えば、TCRポリペプチド、例えば、ヒトTCR、マウスTCR、またはヒトTCR及びマウスTCRの両方に結合する能力）についてスクリーニングされてもよい。「ヒト」抗体または「完全ヒト」抗体のこのような変種（またはその誘導体）はまた、「最適化された」または「抗原結合に最適化された」ヒト抗体または完全ヒト抗体と呼ばれることもあり、抗原に対する親和性が改善した抗体を含む。

10

【0051】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は、本明細書において同義に用いられる。抗体または免疫グロブリンは、少なくとも重鎖可変ドメインを含み、通常、少なくとも重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。脊椎動物系における免疫グロブリン基本構造は、かなりよく理解されている。例えば、Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press) を参照されたい。

20

【0052】

以下でさらに詳細に議論するように、「免疫グロブリン」という用語は、生化学的に区別することができる様々な広範囲のクラスのポリペプチドを含む。当業者であれば、重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンと分類され、これらの中にはいくつかのサブクラス（例えば、ガンマ1～ガンマ4）があると理解するだろう。抗体の「クラス」を、それぞれ、IgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEと決めるのは、この鎖がどういったものであるかということである。免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1などは、はっきり特徴付けられており、機能の専門化を付与することが知られている。本開示を考慮すれば、これらのクラス及びアイソタイプのそれぞれの改変バージョンは当業者であれば容易に認めることができ、従って、本発明の範囲内である。明らかに、全ての免疫グロブリンクラスが本発明の範囲内である。以下の考察は、概して、免疫グロブリン分子のIgGクラスに関するものであろう。IgGについて、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量が約23,000ダルトンの2本の同一の軽鎖ポリペプチド、及び分子量が53,000～70,000の2本の同一の重鎖ポリペプチドを含む。4本の鎖は、典型的には、「Y」立体配置をとってジスルフィド結合しており、軽鎖は、「Y」の口元から始まり可変領域まで延びて重鎖の添え木となる。

30

【0053】

軽鎖は、カッパまたはラムダ（ κ 、 λ ）のいずれかに分類される。各重鎖のクラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかと結合してもよい。一般的に、軽鎖及び重鎖は互いに共有結合しており、免疫グロブリンがハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子操作された宿主細胞によって産生された時には、2本の重鎖の「テール」部分は、ジスルフィド共有結合または非共有結合によって互いに結合している。重鎖のアミノ酸配列は、Y立体配置の二またに分かれた末端にあるN末端から、各鎖の底部にあるC末端まで延びている。

40

【0054】

軽鎖及び重鎖は両方とも構造及び機能に相同性のある領域に分けられる。機能上、「定常」及び「可変」という用語が用いられる。これに関して、軽鎖部分の可変ドメイン（VLまたはVK）及び重鎖部分の可変ドメイン（VH）が抗原認識及び特異性を決定すること

50

が理解されるだろう。逆に、軽鎖の定常ドメイン（C L）及び重鎖の定常ドメイン（C H 1、C H 2、またはC H 3）は、分泌、経胎盤移動性、F c 受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインのナンバリングは、抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から離れるにつれて大きくなる。N末端部分は可変領域であり、C末端部分には定常領域がある；C H 3ドメイン及びC Lドメインは、実際には、それぞれ、重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【0055】

前記のように、可変領域があると、抗体は抗原にあるエピトープを選択的に認識し、抗原にあるエピトープに特異的に結合することが可能になる。すなわち、抗体のV Lドメイン及びV Hドメインまたはこれらの可変ドメインの中にある相補性決定領域（C D R）のサブセットが一緒になって、三次元抗原結合部位を規定する可変領域を形成する。この四次抗体構造は、Yの各アームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。さらに具体的には、抗原結合部位は、V H鎖及びV L鎖のそれぞれにある3つのC D Rによって規定される。本明細書で使用する場合、H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3という用語は、それぞれ、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3を指す。同様に、本明細書で使用する場合、L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3という用語は、それぞれ、V L C D R 1、V L C D R 2、及びV L C D R 3を指す。場合によっては、例えば、ラクダ科の種に由来する、またはラクダ科の免疫グロブリンに基づいて操作された、ある特定の免疫グロブリン分子では、完全な免疫グロブリン分子は重鎖のみからなり、軽鎖が無いことがある。例えば、Hamers - Casterman et al., Nature 363: 446 - 448 (1993)を参照されたい。

【0056】

天然抗体において、それぞれの抗原結合ドメインに存在する6つの「相補性決定領域」すなわち「C D R」は、抗体が水環境内で三次元立体配置をとる時に抗原結合ドメインを形成するように特異的に配置される短く非連続のアミノ酸配列である。抗原結合ドメインにある残りのアミノ酸は「フレームワーク」領域と呼ばれ、分子内の変化がより少ない。フレームワーク領域は、主にシート立体構造をとり、C D Rは、シート構造をつなぐループを形成し、場合によっては、シート構造の一部を形成する。従って、フレームワーク領域は、非共有結合性の鎖間相互作用によってC D Rを正しい方向に配置する足場を形成するように働く。配置されたC D Rによって形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を規定する。この相補的な表面は、抗体とそのコグネイトエピトープとの非共有結合を促進する。C D R及びフレームワーク領域を含むアミノ酸は、それぞれ正確に定められているので（以下を参照されたい）、当業者であれば、所定の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインについてC D R及びフレームワーク領域を含むアミノ酸を容易に特定することができる。

【0057】

当該技術分野において用いられる、及び／または受け入れられている用語の2つ以上の定義がある場合、本明細書で使用する用語の定義は、はっきりと反対のことが述べられている場合を除いて、このような全ての意味を含むことが意図される。具体例は、「相補性決定領域」（「C D R」）という用語が、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域の中に見られる非連続の抗原結合部位について述べるために用いられることである。この特定の領域は、参照により本明細書に組み入れられる、Kabata et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」及びChothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)によって説明され、Kunik et al., Nucl. Acids Res. 40: W521 - W524 (2012)によって最近更新されており、ここでは、これらの定義は、互いに比較した時にアミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体またはその変種のC D Rを言うために一方の定義を用いても、本明細書において定義及び使用されたような用語の範囲の中にあると意図される。前

記で引用された各参考文献によって定義されたようなCDRを含む適切なアミノ酸残基を、比較として下記の表1に示す。ある特定のCDRを含む正確な残基番号は、CDRの配列及びサイズに応じて異なる。当業者であれば、抗体の可変領域アミノ酸配列があれば、どの残基が特定のCDRを構成するか日常的に確かめることができる。

【0058】

Kabat et al. は、どの抗体にも適用可能な可変ドメイン配列のナンバリングシステムを定めた。当業者であれば、配列そのものの他にどの実験データにも頼ることなく、この「Kabatナンバリング」システムを任意の可変ドメイン配列に明確に割り当てることができる。本明細書で使用する場合、「Kabatナンバリング」は、Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」に記載のナンバリングシステムを指す。

10

【0059】

Kunik et al., Nucl. Acids Res. 40:W521-W524 (2012) は、配列または構造に基づいて、抗体中の抗原結合領域を系統的に同定するためのオンラインツール、Paratomeを開示した。通常、Paratomeベース分析は、Kabatナンバリングと一致するが、従来のCDRに隣接する残基も含み得る。特別の定めがない限り、本発明の抗TCR抗体CDRまたはその抗原結合断片、変種、または誘導体における特定のアミノ酸残基位置のナンバリングに関する言及は、Paratome同定に基づいたナンバリングシステムに準じたものである。

20

【0060】

本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab' 及びF(ab')₂、Fd、Fv、一本鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、VLドメインまたはVHドメインを含む断片、Fab発現ライブラリーによって産生された断片、ならびに抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本明細書において開示された抗TCR抗体に対する抗Id抗体を含む)が含まれるが、これに限定されない。scFv分子は当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,892,019号に記載されている。本発明の免疫グロブリンまたは抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgD、IgA、及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2など)、またはサブクラスのものでよい。

30

【0061】

本明細書で使用する場合、「重鎖部分」という用語は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。重鎖部分を含むポリペプチドは、CH1ドメイン、ヒンジ(例えば、上部、中部、及び/または下部のヒンジ領域)ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはその変種もしくは断片の少なくとも1つを含む。例えば、本発明において使用するための結合ポリペプチドは、CH1ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、及びCH2ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン及びCH3ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、及びCH3ドメインを含むポリペプチド鎖、またはCH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含んでもよい。別の実施形態では、本発明のポリペプチドは、CH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本発明において使用するための結合ポリペプチドは、CH2ドメインの少なくとも一部(例えば、CH2ドメインの全てまたは一部)を欠いてもよい。前記で示したように、これらのドメイン(例えば、重鎖部分)は、アミノ酸配列の点で天然免疫グロブリン分子と異なるように改変されてもよいことが当業者に理解されるだろう。

40

【0062】

50

本明細書において開示された、ある特定の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体において、多量体の 1 本のポリペプチド鎖の重鎖部分は、多量体の第 2 のポリペプチド鎖にある重鎖部分と同一である。あるいは、本発明の重鎖部分を含有する単量体は、同一ではない。例えば、本発明の重鎖部分含有単量体は同一でない。例えば、それぞれの単量体は、異なる標的結合部位、例えば、二重特異性抗体を形成する異なる標的結合部位を含んでもよい。

【 0 0 6 3 】

本明細書において開示された診断方法及び処置方法において使用するための結合分子の重鎖部分は、異なる免疫グロブリン分子に由来してもよい。例えば、ポリペプチドの重鎖部分は、I g G 1 分子に由来する C . s u b . H 1 ドメイン及び I g G 3 分子に由来するヒンジ領域を含んでもよい。別の例では、重鎖部分は、一部が I g G 1 分子に由来し、一部が I g G 3 分子に由来するヒンジ領域を含んでもよい。別の例では、重鎖部分は、一部が I g G 1 分子に由来し、一部が I g G 4 分子に由来するキメラヒンジを含んでもよい。

10

【 0 0 6 4 】

本明細書で使用する場合、「軽鎖部分」という用語は、免疫グロブリン軽鎖、例えば、カッパ軽鎖またはラムダ軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。好ましくは、軽鎖部分は、V L ドメインまたは C L ドメインの少なくとも 1 つを含む。

【 0 0 6 5 】

本明細書において開示された抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、これらが認識または特異的に結合する、抗原、例えば、本明細書において開示された標的ポリペプチド（例えば、T C R）のエピトープ（複数可）または部分（複数可）の観点から説明または特定されてもよい。抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的ポリペプチド部分が、「エピトープ」または「抗原決定基」である。標的ポリペプチドは、1 個のエピトープを含んでもよく、典型的には少なくとも 2 個のエピトープを含み、抗原のサイズ、立体構造、及びタイプに応じて任意の数のエピトープを含むことができる。さらに、標的ポリペプチドにある「エピトープ」は、非ポリペプチドエレメントでもよく、またはそれを含んでもよく、例えば、エピトープは、炭水化物側鎖を含んでもよいことに留意すべきである。

20

【 0 0 6 6 】

抗体に対するペプチドまたはポリペプチドエピトープの最小サイズは、約 4 ~ 5 個のアミノ酸と考えられている。ペプチドまたはポリペプチドエピトープは、好ましくは少なくとも 7 個、より好ましくは少なくとも 9 個、最も好ましくは少なくとも約 1 5 ~ 約 3 0 個のアミノ酸を含有する。C D R は、三次構造の形で抗原性のペプチドまたはポリペプチドを認識することができるので、エピトープを含むアミノ酸は、連続している必要はなく、場合によっては、同じペプチド鎖にさえなくてもよい。本発明の抗 T C R 抗体によって認識されるペプチドまたはポリペプチドエピトープは、T C R の少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、より好ましくは少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 1 0 個、少なくとも 1 5 個、少なくとも 2 0 個、少なくとも 2 5、または約 1 5 ~ 約 3 0 個の連続したまたは非連続のアミノ酸の配列を含有してもよい。

30

【 0 0 6 7 】

「特異的に結合する」とは、一般的に、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合することを意味し、結合が、抗原結合ドメインとエピトープとのある程度の相補性を必要とすることを意味する。この定義によれば、抗体は、ランダムな関連しないエピトープに結合するより容易に抗体の抗原結合ドメインを介してエピトープに結合する時に、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。「特異性」という用語は、ある特定の抗体がある特定のエピトープに結合する相対親和性を評価するために本明細書において用いられる。例えば、抗体「A」は、ある特定のエピトープに対して抗体「B」より高い特異性を有すると考えられてもよく、抗体「A」は、関連エピトープ「D」より高い親和性でエピトープ「C」に結合すると言われてもよい。

40

【 0 0 6 8 】

50

「優先的に結合する」とは、関連した、類似の、相同の、または似ているエピトープにより容易に、抗体がエピトープに特異的に結合することを意味する。従って、所定のエピトープに「優先的に結合する」抗体は、関連エピトープと交差反応することがあっても、このエピトープに結合する可能性が関連エピトープより高いだろう。

【0069】

非限定的な例として、抗体は、第2のエピトープに対する抗体の解離定数 (K_D) より低い K_D で第1のエピトープに結合すれば、第1のエピトープに優先的に結合するとみなすことができる。別の非限定的な例では、抗体は、第2のエピトープに対する抗体の K_D より少なくとも1桁低い親和性で第1のエピトープに結合すれば、第1のエピトープに優先的に結合するとみなすことができる。別の非限定的な例では、抗体は、第2のエピトープに対する抗体の K_D より少なくとも2桁低い親和性で第1のエピトープに結合すれば、第1のエピトープに優先的に結合するとみなすことができる。

10

【0070】

別の非限定的な例では、抗体は、第2のエピトープに対する抗体のオフレート (k_{off}) より低いオフレート (k_{off}) で第1のエピトープに結合すれば、第1のエピトープに優先的に結合するとみなすことができる。別の非限定的な例では、抗体は、第2のエピトープに対する抗体の k_{off} より少なくとも1桁低い親和性で第1のエピトープに結合すれば、第1のエピトープに優先的に結合するとみなすことができる。別の非限定的な例では、抗体は、第2のエピトープに対する抗体の k_{off} より少なくとも2桁低い親和性で第1のエピトープに結合すれば、第1のエピトープに優先的に結合するとみなすことができる。本明細書において開示された抗体、または抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、 5×10^{-2} 秒 $^{-1}$ 、 10^{-2} 秒 $^{-1}$ 、 5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 、もしくは 10^{-3} 秒 $^{-1}$ より低いオフレート (k_{off}) またはこれに等しいオフレート (k_{off}) で、本明細書において開示された標的ポリペプチド (例えば、TCR、例えば、ヒトTCR、マウスTCR、もしくはヒトTCR及びマウスTCRの両方) またはその断片もしくは変種に結合すると言うことができる。より好ましくは、本発明の抗体は、 5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ 、 10^{-4} 秒 $^{-1}$ 、 5×10^{-5} 秒 $^{-1}$ 、または 10^{-5} 秒 $^{-1}$ 、 5×10^{-6} 秒 $^{-1}$ 、 10^{-6} 秒 $^{-1}$ 、 5×10^{-7} 秒 $^{-1}$ 、または 10^{-7} 秒 $^{-1}$ より低いオフレート (k_{off}) またはこれに等しいオフレート (k_{off}) で、本明細書において開示された標的ポリペプチド (例えば、TCR、例えば、ヒトTCR、マウスTCR、もしくはヒトTCR及びマウスTCRの両方) またはその断片もしくは変種に結合すると言うことができる。

20

30

【0071】

本発明の抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、「多重特異性」、例えば、二重特異性、三重特異性でもよく、さらに大きな多重特異性でもよい。これは、1つ以上の異なる抗原 (例えば、タンパク質) に存在する2つ以上の異なるエピトープを同時に認識する、またはこれらに結合することを意味する。従って、抗TCR抗体が「単一特異性」か「多重特異性」、例えば、「二重特異性」かどうかは、結合ポリペプチドが反応する異なるエピトープの数を指している。多重特異性抗体は、本明細書に記載の標的ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異性があってもよく、標的ポリペプチドならびに異種エピトープ、例えば、異種ポリペプチドまたは固体支持体材料に対して特異性があってもよい。

40

【0072】

本明細書で使用する場合、「結合価 (valency)」という用語は、結合ポリペプチドまたはTCR結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片に存在する潜在的な結合ドメイン、例えば、抗原結合ドメインの数を指す。それぞれの結合ドメインは1つのエピトープに特異的に結合する。結合ポリペプチドまたはTCR結合分子が複数の結合ドメインを含む時には、それぞれの結合ドメインは同じエピトープに特異的に結合してもよく、2つの結合ドメインがある抗体については「二価単一特異性」と呼ばれ、異なるエピトープに特異的に結合してもよく、2つのドメインを有する抗体については「二価二重特異性

50

」と呼ばれる。抗体またはその抗原結合断片はまた二重特異性であり、かつそれぞれの特異性について二価でもよい（「二重特異性四価抗体」と呼ばれる）。別の実施形態では、四価ミニボディまたはドメイン欠失抗体を作製することができる。

【0073】

二重特異性二価抗体及びこれを作る方法は、例えば、米国特許第5,731,168号；同第5,807,706号；同第5,821,333号；ならびに米国特許出願公開第2003/020734号及び同第2002/015537号に記載されている。これらの全ての開示が参照により本明細書に組み入れられる。二重特異性四価抗体及びこれを作る方法は、例えば、WO02/096948及びWO00/14788に記載されている。これらの両方の開示が参照により本明細書に組み入れられる。概略については、PCT公報であるWO93/17715；WO92/08802；WO91/00360；WO92/05793；Tutt et al., J. Immunol. 147: 60-69 (1991)；米国特許第4,471,893号；同第4,714,681号；同第4,925,618号；同第5,573,920号；同第5,601,819号；Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992)を参照されたい。

10

【0074】

前記で示したように、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造及び三次元立体配置が周知である。本明細書で使用する場合、「VHドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、「CH1ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖の最初の（最もアミノ末端側にある）定常領域ドメインを含む。CH1ドメインは、VHドメインに隣接しており、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域のアミノ末端側にある。

20

【0075】

本明細書で使用する場合、「CH2ドメイン」という用語は、例えば、従来の番号付けの手法を用いて抗体の約残基244～残基360（残基244～360、Kabatsナンバリングシステム；及び残基231～340、EUNナンバリングシステム；Kabats et al.を参照されたい）に及ぶ重鎖分子部分を含む。CH2ドメインは、別のドメインと接近して対になっていない点で独特である。もっと正確に言うと、インタクトな自然IgG分子の2つのCH2ドメインの間に2本のN結合型の分枝した炭水化物鎖が配置されている。CH3ドメインは、CH2ドメインからIgG分子のC末端に及んでおり、約108個の残基を含むことも詳細に記録が残されている。

30

【0076】

本明細書で使用する場合、「ヒンジ領域」という用語は、CH1ドメインとCH2ドメインをつなぐ重鎖分子部分を含む。このヒンジ領域は約25個の残基を含み、可動性がある。従って、2つのN末端抗原結合領域は独立して動くことができる。ヒンジ領域は、3つの特異なドメイン：上部ヒンジ領域、中央ヒンジ領域、及び下部ヒンジ領域にさらに分けることができる（Roux et al., J. Immunol. 161: 4083 (1998)）。

【0077】

本明細書で使用する場合、「ジスルフィド結合」という用語は、2個の硫黄原子間で形成された共有結合を含む。アミノ酸システインは、ジスルフィド結合を形成するか、もう1つのチオール基と架橋することができるチオール基を構成する。ほとんどの天然IgG分子において、CH1領域及びCL領域は、ジスルフィド結合によって連結され、2本の重鎖は、Kabatsナンバリングシステムを用いた場合、239及び242に対応する位置（位置226または229、EUNナンバリングシステム）にある2個のジスルフィド結合によって連結されている。

40

【0078】

本明細書で使用する場合、「キメラ抗体」という用語は、免疫反応性領域または免疫反応性部位が第1の種から得られているか、または由来し、定常領域が第2の種から得られて

50

いる（インタクトでもよく、部分的なものでもよく、本発明に従って改変されてもよい）任意の抗体を意味すると考えられる。実施形態では、標的結合領域または標的結合部位は、非ヒト供給源に由来し（例えば、マウスまたは霊長類）、定常領域は、ヒトである。

【0079】

本明細書で使用する場合、「操作された抗体」という用語は、重鎖もしくは軽鎖またはその両方における可変ドメインが、既知の特異性の抗体に由来する1つ以上のCDRの少なくとも部分的置換によって変えられ、必要に応じて、部分的なフレームワーク領域置換及び配列変化によって変えられている抗体を指す。CDRは、フレームワーク領域が得られた抗体と同じクラスさらにはサブクラスの抗体に由来してもよいが、CDRは、異なるクラスの抗体から、好ましくは、異なる種に由来する抗体から得られると想定される。既知の特異性の非ヒト抗体に由来する1つ以上の「ドナー」CDRがヒト重鎖フレームワーク領域または軽鎖フレームワーク領域に移植されている操作された抗体は、本明細書において「ヒト化抗体」と呼ばれる。ある可変ドメインの抗原結合能力を別の可変ドメインに移すために、CDRの全てを、ドナー可変ドメインに由来する完全なCDRと交換することは必要でない場合がある。逆に、標的結合部位の活性を維持するのに必要な残基を移すことだけ必要な場合がある。

10

【0080】

さらに、ヒト化抗体の重鎖もしくは軽鎖またはその両方における可変ドメインの中にあるフレームワーク領域がヒト由来残基しか含まない場合があることが認められており、この場合、ヒト化抗体のこれらのフレームワーク領域は「完全ヒトフレームワーク領域」と呼ばれる。あるいは、必要に応じて、正しい結合を維持するために、またはTCR抗原との結合を増強するために、ヒト化抗体の重鎖もしくは軽鎖またはその両方における可変ドメインのヒトフレームワーク領域（複数可）の対応する位置の中にある、ドナー可変ドメインのフレームワーク領域（複数可）の1つ以上の残基が操作されてもよい。従って、このように操作されているヒトフレームワーク領域は、ヒトフレームワーク残基及びドナーフレームワーク残基の混合物を含み、本明細書において「部分的ヒトフレームワーク領域」と呼ばれる。

20

【0081】

例えば、抗TCR抗体のヒト化は、本質的に、Winter及び共同研究者（Jones et al., Nature 321: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 - 327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534 - 1536 (1988))の方法に従って、ヒト抗TCR抗体の対応する配列を、げっ歯類または変異体げっ歯類CDRまたはCDR配列で置換することによって行うことができる。参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,225,539号；同第5,585,089号；同第5,693,761号；同第5,693,762号；同第5,859,205号も参照されたい。結果として生じたヒト化抗TCR抗体は、ヒト化抗体の重鎖及び／または軽鎖の可変ドメインの完全ヒトフレームワーク領域の中に少なくとも1つのげっ歯類CDRまたは変異体げっ歯類CDRを含むだろう。場合によっては、ヒト化抗TCR抗体の1つ以上の可変ドメインのフレームワーク領域の中にある残基は、対応する非ヒト（例えば、げっ歯類）残基によって交換される（例えば、米国特許第5,585,089号；同第5,693,761号；同第5,693,762号；及び同第6,180,370号を参照されたい）。この場合、結果として生じたヒト化抗TCR抗体は、重鎖及び／または軽鎖の可変ドメインの中に部分的ヒトフレームワーク領域を含むだろう。

30

40

【0082】

さらに、ヒト化抗体は、レシビエント抗体またはドナー抗体に見られない残基を含んでもよい。これらの改変は、抗体の性能をさらに改良するために（例えば、望ましい親和性を得るために）加えられる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、及び典型的に2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ここで、CDRの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのCDRに対応し、フレームワーク領域の全てまたは実質的に全てが

50

ヒト免疫グロブリン配列のフレームワーク領域である。ヒト化抗体はまた、任意で、免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域 (Fc) の少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、参照により本明細書に組み入れられる、Jones et al., Nature 331: 522 - 525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323 - 329 (1988); 及び Presta, Curr. Op. Strict. Biol. 2: 593 - 596 (1992) を参照されたい。従って、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に小さい配列が非ヒト種に由来する対応配列によって置換されている抗体を含んでもよい。実際には、ヒト化抗体は、典型的に、一部のCDR残基、場合によっては一部のフレームワーク残基が、げっ歯類抗体の類似部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。例えば、米国特許第5,225,539号; 第5,585,089号; 第5,693,761号; 第5,693,762号; 第5,859,205号を参照されたい。ヒト化抗体及び所定の抗原に対する親和性が改善したヒト化抗体を産生するための技法が開示されている、米国特許第6,180,370号及び国際公開公報第01/27160号も参照されたい。

【0083】

本明細書で使用する場合、「連結した」、「融合した」、または「融合」という用語は、同義に用いられる。これらの用語は、化学的結合または組換え手段を含むどんな手段でも、2つ以上の要素または成分と一緒に結び付けることを指す。「インフレーム融合」は、2つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム (ORF) を結び付けて、元のORFの正しい翻訳読み枠を維持するように、連続したさらに長いORFを形成することを指す。従って、組換え融合タンパク質は、元のORFによってコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のセグメントを含有する1つのタンパク質である (これらのセグメントは、通常、天然では、このようにつながっていない)。従って、リーディングフレームは、融合セグメント全体を通して連続しているが、セグメントは、例えば、インフレームリンカー配列によって物理的または空間的に分離されてもよい。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドは、インフレームで融合しているが、「融合した」CDRが連続したポリペプチドの一部として同時翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域またはさらなるCDR領域をコードするポリヌクレオチドによって分離されてもよい。

【0084】

ポリペプチドの文脈において、「直線配列」または「配列」は、配列内で互いに隣接する残基がポリペプチドの一次構造において連続している、アミノ末端からカルボキシル末端方向へのポリペプチド内のアミノ酸の順序である。

【0085】

本明細書で使用する場合、「発現」という用語は、遺伝子が、生化学的因子、例えば、ポリペプチドを産生するプロセスを指す。このプロセスは、遺伝子ノックダウンならびに一過的発現及び安定発現を含むが、それに限定されるわけではない、細胞内での遺伝子の機能的存在の現れを含む。発現は、遺伝子からメッセンジャーRNA (mRNA) への転写、及びこのようなmRNAからポリペプチド (複数可) への翻訳を含むが、それに限定されるわけではない。望ましい最終産物が生化学的因子であれば、発現は、この生化学的因子及び任意の前駆体の生成を含む。遺伝子発現によって「遺伝子産物」が産生される。本明細書で使用する、遺伝子産物は、核酸、例えば、遺伝子の転写によって生成されるメッセンジャーRNAでもよく、転写物から翻訳されたポリペプチドでもよい。さらに、本明細書に記載の遺伝子産物は、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化が加えられた核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの結合、タンパク質切断などが加えられたポリペプチドを含む。

【0086】

本明細書で使用する場合、「処置する」または「処置」という用語は、治療的処置及び予防的処置または防止的処置の両方を指す。予防的処置もしくは防止的処置では、望ましく

10

20

30

40

50

ない生理学的変化または生理学的障害、例えば、多発性硬化症、関節炎、または癌の進行を阻止及び／または遅らせる（弱める）ことを目的とする。有益なまたは望ましい臨床結果には、検出可能でも検出不可能でも、症状の軽減、疾患の程度の低下、疾患の安定した（すなわち、悪化していない）状態、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の回復または寛解、及び軽快（部分的または全面的）が含まれるが、これに限定されない。「処置」はまた、処置を受けていない場合の期待生存率と比較して生存期間を延ばすことも意味する。処置を必要とする人には、状態または障害に既に罹患している人、ならびに状態もしくは障害に罹患しやすい人、または状態もしくは障害を予防しようとする人が含まれる。

【 0 0 8 7 】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」とは、診断、予後、または療法が所望される任意の対象、特に、哺乳動物対象を意味する。哺乳動物対象には、ヒト、家畜動物、農場動物、動物園動物、競技動物、またはペットの動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、乳牛などが含まれる。

10

【 0 0 8 8 】

本明細書で使用する場合、「抗 T C R 抗体の投与から利益を得る対象」及び「処置を必要とする動物」及び「処置を必要とする対象」という句は、例えば、抗 T C R ポリペプチドの検出（例えば、診断手順のため）のために、例えば、T細胞の特定の集団を数値拡張のためにインビボで刺激することに、使用される抗 T C R 抗体の投与から、及び／または抗 T C R 抗体を用いた疾患の処置、すなわち寛解もしくは予防のために使用された抗 T C R 抗体の投与から利益を得る対象、例えば、哺乳動物対象を含む。本明細書においてさらに詳述するように、抗 T C R 抗体は、非結合体の形で用いられてもよく、例えば、薬物、プロドラッグ、または同位体と結合されてもよい。

20

【 0 0 8 9 】

本発明の他の目的、特徴及び利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の特定の実施形態を示す一方で、詳細な説明及び特定の実施例は、本発明の趣旨及び範囲内の様々な変更及び修正はこの詳細な説明から当業者に明らかとなるため、説明するためだけに示されていることを理解されたい。

【 0 0 9 0 】

II . 導入

30

特定の抗原（例えば、腫瘍関連抗原）を標的にするT細胞を採用する治療薬は、癌から感染症までの様々な疾患を処置するために現在調査中である。しかしながら、これらの剤の複雑さは、T細胞の精製、増殖及び／または活性化のための専用ツールを必要とする。本出願の実施形態は、中程度の親和性によるT C R への結合を特に介して、T細胞に特異的に結合し、これを用いて、T細胞により認識されるエピトープとは独立して、T細胞を選択的に精製、繁殖、及び／または活性化することができる、抗体またはその抗原結合断片、例えば、s c F vを提供する。例えば、一態様では、T C R 鎖に特異的に結合し、複数のT細胞エピトープを認識するT細胞に關与する抗体を提供する。改変された79A - 15（「S15」）、79A - 11（「S11」）、79A - 13（「S13」）、79A - 23（「S23」）モノクローナル抗体は、例えば、 - T C R に關与するように特定の立体配置内で、T C R 鎖に特異的に結合する。この立体配座の特異的結合を使用して、T細胞を分析、単離、または繁殖、及び／または活性化する。実施形態の細胞表面抗T C R 抗体を含むK562細胞などのa A P Cを使用して、一次T細胞集団を活性化し、そのため繁殖することができる。（例えば、図7を参照）。本発明のいくつかの態様では、K562細胞は、H L A C 陽性であり、他の態様では、K562細胞は、H L A C 陰性である。さらに、抗T C R 抗体を発現するそのようなa A P Cにより拡張されたT細胞集団は、ポリクローナルT細胞レパートリーを包含する多種多様なクローン型を示している（図8～10）。さらに、T C R 特異的s c F vを介したT細胞の最適刺激は、現在流行中のT細胞刺激の類似の他の方法よりも良くドナーT細胞レパートリーを保存した。従って、本明細書に詳述される方法は、一般的なT細胞増殖のための新しい方法を提供する。

40

50

【 0 0 9 1 】

I I I . 標的ポリペプチド

実施形態では、本発明の結合分子は、及び鎖を含有するT細胞受容体（-TCR）に特異的に結合する。実施形態では、本発明の結合分子は、T細胞受容体鎖のV_a24-J18ジャンクション領域（GSTLGR（配列番号1））に位置する、TCR鎖の不変異領域に特異的に結合する。実施形態では、T細胞は、-TCR+T細胞中のTCRアルファ鎖特異的結合分子を介した-TCR架橋によって、拡張及び/または活性化することができる。従って、実施形態では、本発明の結合分子は、T細胞のクローン型にかかわらず、不変種GSTLGR（配列番号1）を含有するTCRに特異的に結合する。

10

【 0 0 9 2 】

I V . 抗TCR抗体

ある特定の実施形態では、TCRポリペプチドに結合し、T細胞成長をエキスビボで刺激する抗体またはその断片である。ある特定の態様では、本明細書で提供される抗体は、TCRにより認識されるエピトープから本質的に独立してTCRに結合し、これを使用して、様々なクローン型を有するT細胞の増殖を刺激することができる。抗体は、キメラ抗体、親和性成熟抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、もしくは抗原結合抗体断片または天然もしくは合成リガンドからなる群から選択することができる。好ましくは、抗TCR抗体は、モノクローナル抗体またはヒト化抗体である。

【 0 0 9 3 】

本実施形態に好適な抗体断片の例としては、限定されないが、(i) V_L、V_H、C_L、及びC_H1ドメインからなるFab断片；(ii) V_H及びC_H1ドメインからなる「Fd」断片；(iii) 単一抗体のV_L及びV_Hドメインからなる「Fv」断片；(iv) V_Hドメインからなる「dAb」断片；(v) 単離CDR領域；(vi) 2つの結合Fab断片を含む二価断片のF(ab')₂断片；(vii) V_Hドメイン及びV_Lドメインが、2つのドメインを会合させて結合ドメインを形成するペプチドリッカーにより結合している一本鎖Fv分子（「scFv」）；(viii) 二重特異性一本鎖Fv二量体（米国特許第5,091,513号を参照）；ならびに(ix) 遺伝子融合により構築される多価または多重特異性断片のダイアボディ（米国特許出願公開第20050214860号）が挙げられる。Fv、scFv、またはダイアボディ分子は、V_H及びV_Lドメインを結合させるジスルフィド架橋の取り込みにより安定化させることができる。C_H3ドメインに結合しているscFvを含むミニボディを作製することもできる（Hu et al., 1996）。

20

30

【 0 0 9 4 】

抗体様結合ペプチド模倣体も、実施形態では企図される。Liu et al. (2003) は、削減抗体として作用し、より長い血清半減期及びより煩雑でない合成法のある利点を有するペプチドである「抗体様結合ペプチド模倣体」(ABiP)を記載している。

【 0 0 9 5 】

1つの実施形態では、抗体は、キメラ抗体、例えば、異種非ヒト、ヒト、またはヒト化配列（例えば、フレームワーク及び/または定常ドメイン配列）にグラフトされた非ヒトドナーからの抗原結合配列を含む抗体である。モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖定常ドメインをヒト起源の類似のドメインにより置き換え、無傷な外来抗体の可変領域を残す方法が開発されている。あるいは、「完全ヒト」モノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックなマウス中で産生される。げっ歯類、例えば、マウス、及びヒトアミノ酸配列の両方を有する抗体可変ドメインを組換え構築することによりモノクローナル抗体の可変ドメインをよりヒト形態に変換する方法も開発されている。「ヒト化」モノクローナル抗体では、超可変CDRのみがマウスモノクローナル抗体に由来し、フレームワーク及び定常領域は、ヒトアミノ酸配列に由来する（米国特許第5,091,513号及び同第6,881,557号を参照）。げっ歯類に特徴的な抗体中のアミノ酸配列をヒト抗体の対応する位置中に見出されるアミノ酸配列により置き換えることは、

40

50

治療的使用中の有害免疫反応の見込みを低減させることが考えられる。ハイブリドーマまたは抗体を産生する他の細胞は、遺伝子突然変異または他の変化に供することもでき、それはハイブリドーマにより産生される抗体の結合特異性を変更してもしなくてもよい。

【 0 0 9 6 】

置換型変種は、典型的には、タンパク質内の 1 つ以上の部位における 1 つのアミノ酸の別のアミノ酸への交換を含有し、ポリペプチドの 1 つ以上の特性を、他の機能または特性の損失の有無にかかわらずモジュレートするように設計することができる。置換は、保存的であり得、すなわち、1 つのアミノ酸が類似形状または電荷の 1 つにより置き換えられる。保存的置換は、当該技術分野において周知であり、それとしては、例えば、アラニンのセリンへの変化；アルギニンのリジンへの変化；アスパラギンのグルタミンまたはヒスチジンへの変化；アスパラギン酸のグルタミンへの変化；システインのセリンへの変化；グルタミンのアスパラギンへの変化；グルタミン酸のアスパラギン酸への変化；グリシンのプロリンへの変化；ヒスチジンのアスパラギンまたはグルタミンへの変化；イソロイシンのロイシンまたはバリンへの変化；ロイシンのバリンまたはイソロイシンへの変化；リジンのアルギニンへの変化；メチオニンのロイシンまたはイソロイシンへの変化；フェニルアラニンのチロシンへの変化；ロイシンのメチオニンへの変化；セリンのトレオニンへの変化；トレオニンのセリンへの変化；トリプトファンのチロシンへの変化；チロシンのトリプトファンまたはフェニルアラニンへの変化；及びバリンのイソロイシンまたはロイシンへの変化が挙げられる。あるいは、置換は、ポリペプチドの機能または活性が影響を受けるように非保存的であり得る。非保存的变化は、典型的には、残基を化学的に異なるものにより置換すること、例えば、極性または荷電アミノ酸を非極性または非荷電アミノ酸により置換することを含み、逆もまた同様である。

【 0 0 9 7 】

タンパク質は、組換え体であり得、またはインビトロで合成することができる。あるいは、非組換えまたは組換えタンパク質は、細菌から単離することができる。このような変種を含有する細菌を組成物及び方法において実現することができることも企図される。結果的に、タンパク質は、単離される必要がない。

【 0 0 9 8 】

抗体または好ましくは抗体の免疫学的部分は、他のタンパク質に化学的に結合させ、または融合タンパク質として発現させることができる。本明細書及び添付の特許請求の範囲の目的のため、全てのこのような融合タンパク質は、抗体または抗体の免疫学的部分の定義に含まれる。

【 0 0 9 9 】

実施形態では、本発明は、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含む T 細胞受容体アルファ (T C R) ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【 0 1 0 0 】

実施形態では、T C R ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、(a) 配列番号 2 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 1 ; (b) 配列番号 3 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 2 ; (c) C D Y W (配列番号 2 1) ; C A Y W (配列番号 2 3) ; または C A Y L (配列番号 2 2) に同一である H C D R 3 ; (d) 配列番号 4 または配列番号 9 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 1 ; (e) 配列番号 5 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 2 ; 及び (f) 配列番号 6 または配列番号 1 0 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 3 を含む。実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、(a) 配列番号 2 に同一である H C D R 1 ; (b) 配列番号 3 に同一である H C D R 2 ; (c) C D Y W (配列番号 2 1) ; C A Y W (配列番号 2 3) ; または C A Y L (配列番号 2 2) に同一である H C D R 3 ; (d) 配列番号 4 ; または配列番号 9 に同一である L C D R 1 ; (e) 配列番号 5 に同一である L C D R 2 ; 及び (f) 配列番号 6 ; または配列番号 1 0 に同一であ

10

20

30

40

50

る L C D R 3 を含む。

【 0 1 0 1 】

本発明は、(a) 7 9 A - 1 5 (配列番号 2) の V_H C D R 1 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 1 ; (b) 7 9 A - 1 5 (配列番号 3) の V_H C D R 2 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 2 ; (c) 7 9 A - 1 5 C A Y L (配列番号 2 2) の V_H C D R 3 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 3 ; (d) 7 9 A - 1 5 (配列番号 9) の V_L C D R 1 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 1 ; (e) 7 9 A - 1 5 (配列番号 5) の V_L C D R 2 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 2 ; 及び (f) 7 9 A - 1 5 (配列番号 1 0) の V_L C D R 3 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 3 を含む、T C R ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片をさらに提供する。

10

【 0 1 0 2 】

本発明はさらに、7 9 A - 1 5 (配列番号 1 1) の V_H ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 1 5 (配列番号 1 2) の V_L ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_L ドメインを含む T C R ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体または抗原結合断片を提供する。実施形態では、単離抗体または抗原結合断片は、7 9 A - 1 5 (配列番号 1 1) の V_H ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 1 5 (配列番号 1 2) の V_L ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_L ドメインを含む。さらなる実施形態では、単離抗体またはその抗原結合断片は、7 9 A - 1 5 (配列番号 1 1) の V_H ドメインに同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 1 5 (配列番号 1 2) の V_L ドメインに同一である V_L ドメインを含む。

20

【 0 1 0 3 】

本発明は、(a) 7 9 A - 1 3 K A S G Y T F T D Y Y M N W V (配列番号 2) の V_H C D R 1 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 1 ; (b) 7 9 A - 1 3 W I G E I N P N N (配列番号 3) の V_H C D R 2 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 2 ; (c) 7 9 A - 1 3 C A Y L (配列番号 2 2) の V_H C D R 3 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 3 ; (d) 7 9 A - 1 3 N T Y L E W Y (配列番号 4) の V_L C D R 1 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 1 ; (e) 7 9 A - 1 3 K L L I Y K V S N R F S (配列番号 5) の V_L C D R 2 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 2 ; 及び (f) 7 9 A - 1 3 M Q G S H V P W (配列番号 1 0) の V_L C D R 3 に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 3 を含む、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片をさらに提供する。さらなる実施形態では、本発明は、(a) K A S G Y T F T D Y Y M N W V (配列番号 2) に同一である H C D R 1 ; (b) W I G E I N P N N (配列番号 3) に同一である H C D R 2 ; (c) C A Y L (配列番号 2 2) に同一である H C D R 3 ; (d) N T Y L E W Y (配列番号 4) に同一である L C D R 1 ; (e) K L L I Y K V S N R F S (配列番号 5) に同一である L C D R 2 ; 及び (f) M Q G S H V P W (配列番号 1 0) に同一である L C D R 3 を含む、単離抗体またはその抗原結合断片を提供する。

30

40

【 0 1 0 4 】

さらなる実施形態では、本発明は、7 9 A - 1 3 (配列番号 1 1) の V_H ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 1 3 (配列番号 1 4) の V_L ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_L ドメインを含む T C R ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を提供する。実施形態では、単離抗体または抗原結合断片は、7 9 A - 1 3 (配列番号 1 1) の V_H ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_H ドメイン、及び

50

79A-13 (配列番号14) のV_Lドメインに90%~99%同一であるV_Lドメインを含む。さらなる実施形態では、単離抗体または抗原結合断片は、79A-13 (配列番号11) のV_Hドメインに同一であるV_Hドメイン、及び79A-13 (配列番号14) のV_Lドメインに同一であるV_Lドメインを含む。

【0105】

本発明は、(a) 79A-11 KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2) のV_H CDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1；(b) 79A-11 WIGEINPNN (配列番号3) のV_H CDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2；(c) 79A-11 CAYW (配列番号23) のV_H CDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR3；(d) 79A-11 NTYLEWF (配列番号9) のV_L CDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1；(e) 79A-11 KLLIYKVS NRFS (配列番号5) のV_L CDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2；及び(f) 79A-11 MQGSHVPW (配列番号10) のV_L CDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片をさらに提供する。実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、(a) KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2) に同一であるHCDR1；(b) WIGEINPNN (配列番号3) に同一であるHCDR2；(c) CAYW (配列番号23) に同一であるHCDR3；(d) NTYLEWF (配列番号9) に同一であるLCDR1；(e) KLLIYKVS NRFS (配列番号5) に同一であるLCDR2；及び(f) MQGSHVPW (配列番号10) に同一であるLCDR3を含む。

【0106】

実施形態では、本発明は、79A-11 (配列番号13) のV_Hドメインに少なくとも約80%、85%、90%または95%同一であるV_Hドメイン、及び79A-11 (配列番号12) のV_Lドメインに少なくとも約80%、85%、90%または95%同一であるV_Lドメインを含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片を提供する。実施形態では、単離抗体またはその抗原結合断片は、79A-11 (配列番号13) のV_Hドメインに90%~99%同一であるV_Hドメイン、または79A-11 (配列番号12) のV_Lドメインに90%~99%同一であるV_Lドメインを含む。さらなる実施形態では、請求項16に記載の単離抗体またはその抗原結合断片は、79A-11 (配列番号13) のV_Hドメインに同一であるV_Hドメイン、及び79A-11 (配列番号12) のV_Lドメインに同一であるV_Lドメインを含む。

【0107】

本発明は、(a) 79A KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2) のV_H CDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR1；(b) 79A WIGEINPNN (配列番号3) のV_H CDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR2；(c) 79A CDYW (配列番号21) のV_H CDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるHCDR3；(d) 79A NTYLEWY (配列番号4) のV_L CDR1に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR1；(e) 79A KLLIYKVS NRFS (配列番号5) のV_L CDR2に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR2；及び(f) 79A FQGSHVPW (配列番号6) のV_L CDR3に少なくとも80%、85%、90%または95%同一であるLCDR3を含む、TCR ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片をさらに提供する。実施形態では、単離抗体または抗原結合断片は、(a) KASGYTF TDYYMNWV (配列番号2) に同一であるHCDR1；(b) WIGEINPNN (配列番号3) に同一であるHCDR2；(c) CDYW (配列番号21) に同一であるHCDR3；(d) NTYLEWY (配列番号4) に同一であるLCDR1；(e) KLLIYKVS NRFS (配列番号5) に同一であるLCDR2；及び(f) FQGSHVPW (配列番号6)

に同一である L C D R 3 を含む。

【 0 1 0 8 】

本発明は、7 9 A (配列番号 7) の V_H ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A (配列番号 8) の V_L ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_L ドメインを含む、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片をさらに提供する。実施形態では、単離抗体または抗原結合断片は、7 9 A (配列番号 7) の V_H ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_H ドメイン、または 7 9 A (配列番号 8) の V_L ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_L ドメインを含む。実施形態では、単離抗体または抗原結合断片は、7 9 A (配列番号 7) の V_H ドメインに同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A (配列番号 8) の V_L ドメインに同一である V_L ドメインを含む。

10

【 0 1 0 9 】

実施形態では、本発明は、(a) K A S G Y T F T G Y Y M N W V (配列番号 1 5) に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 1 ; (b) W I G G I N P N N (配列番号 1 6) に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である H C D R 2 ; (c) C R Y W (配列番号 1 7) に同一である H C D R 3 ; (d) Q S I V H G G G N T Y (配列番号 1 8) に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 1 ; (e) K L L I Y K V S N R F S (配列番号 5) に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 2 ; 及び (f) F Q G S H V P W (配列番号 6) に少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である L C D R 3 を含む、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、単離抗体またはその抗原結合断片を提供する。実施形態では、単離抗体またはその抗原結合断片は、(a) K A S G Y T F T G Y Y M N W V (配列番号 1 5) に同一である H C D R 1 ; (b) W I G G I N P N N (配列番号 1 6) に同一である H C D R 2 ; (c) C R Y W (配列番号 1 7) に同一である H C D R 3 ; (d) Q S I V H G G G N T Y (配列番号 1 8) に同一である L C D R 1 ; (e) K L L I Y K V S N R F S (配列番号 5) に同一である L C D R 2 ; 及び (f) F Q G S H V P W (配列番号 6) に同一である L C D R 3 を含む。

20

【 0 1 1 0 】

本発明は、7 9 A - 2 3 (配列番号 1 9) の V_H ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 2 3 (配列番号 2 0) の V_L ドメインに少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 % または 9 5 % 同一である V_L ドメインを含む。実施形態では、単離抗体またはその抗原結合断片は、7 9 A - 2 3 (配列番号 1 9) の V_H ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 2 3 (配列番号 2 0) の V_L ドメインに 9 0 % ~ 9 9 % 同一である V_L ドメインを含む抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片をさらに提供する。さらなる実施形態では、単離抗体またはその抗原結合断片は、7 9 A - 2 3 (配列番号 1 9) の V_H ドメインに同一である V_H ドメイン、及び 7 9 A - 2 3 (配列番号 2 0) の V_L ドメインに同一である V_L ドメインを含む。

30

【 0 1 1 1 】

実施形態では、本明細書で提供される抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片は、多重特異性、例えば、二重特異性である。実施形態では、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、本明細書で提供される抗体及び抗原結合断片は、F a b 断片、F v 断片、及び / または一本鎖である。実施形態では、本明細書で提供される抗 T C R 抗体及び抗原結合断片は、多価であり、かつ、少なくとも 2 つの重鎖及び少なくとも 2 つの軽鎖を含む。実施形態では、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、本明細書で提供される抗体及び抗原結合断片は、ヒトカップ定常領域及びヒトラムダ定常領域からなる群から選択される軽鎖定常領域を含む。

40

【 0 1 1 2 】

実施形態では、本明細書で提供される抗 T C R 抗体及び抗原結合断片は、重鎖定常領域またはその断片を含む。実施形態では、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、本明細書で提供される抗体及び抗原結合断片は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4

50

、I g M、I g A 1、I g A 2、I g E、またはI g Dである重鎖定常領域またはその断片を含む。

【0113】

実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、 10^{-2} M 、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 10^{-3} M 、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 10^{-4} M 、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 10^{-5} M 、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 10^{-6} M 、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 10^{-7} M 、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 10^{-8} M 、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 10^{-9} M 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 10^{-10} M 、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 10^{-11} M 、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 10^{-12} M 、 $8.4 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 10^{-12} M 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、 10^{-13} M 、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 10^{-14} M 、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、または 10^{-15} M を超えない解離定数 (K_D) により特徴付けられた親和性をもつ配列 G S T L R G (配列番号1) を含むT細胞受容体アルファ (T C R) ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。実施形態では、 K_D は、約 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ である。さらなる実施形態では、 K_D は、約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ ~ 約 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ である。

10

【0114】

実施形態では、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、本明細書で提供される抗体及び抗原結合断片は、ヒト化、霊長類化またはキメラである。実施形態では、T C R ポリペプチドに特異的に結合する、本明細書で提供される抗体及び抗原結合断片は、ヒト化である。

【0115】

実施形態では、本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片は、リンカーにより分離される V H 及び V L ドメインを含む。実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合断片は、膜貫通ドメインをさらに含む。実施形態では、リンカーにより分離される V H 及び V L ドメインを含む抗体またはその抗原結合断片は、配列番号11、配列番号13及び配列番号19からなる群から選択されるポリペプチドに少なくとも90%同一である V H ポリペプチドを含み、V L は、配列番号12、配列番号14及び配列番号20からなる群から選択されるポリペプチドに少なくとも90%同一であるポリペプチドである。

20

【0116】

実施形態では、本明細書において開示された抗 T C R 抗体または断片は、配列番号11に少なくとも90%同一である V H ポリペプチド、及び配列番号12に少なくとも90%同一である V L ポリペプチドを含有し、V H 及び V L は、リンカーにより分離される。

30

【0117】

実施形態では、本明細書において開示された抗 T C R 抗体または断片は、配列番号13に少なくとも90%同一である V H ポリペプチド、及び配列番号12に少なくとも90%同一である V L ポリペプチドを含有し、V H 及び V L は、リンカーにより分離される。

【0118】

本発明は、配列番号11に少なくとも90%同一である V H ポリペプチド、及び配列番号14に少なくとも90%同一である V L ポリペプチドを含有する抗 T C R 抗体または断片をさらに提供し、V H 及び V L は、リンカーにより分離される。

【0119】

実施形態では、本明細書において開示された抗 T C R 抗体または断片は、配列番号19に少なくとも90%同一である V H ポリペプチド、及び配列番号20に少なくとも90%同一である V L ポリペプチドを含有し、V H 及び V L は、リンカーにより分離される。

40

【0120】

従って、実施形態では、本明細書において開示された抗 T C R 抗体または抗原結合断片は、一本鎖 F v 断片 (s c F v)、例えば、単一ポリペプチドを形成する、リンカーにより接続される V H 及び V L ドメインを含有するヘテロ二量体である。

【0121】

実施形態では、リンカーは、10~30個の長さのアミノ酸、15~25個の長さのアミノ酸、15及び20個の長さのアミノ酸のポリペプチドである。実施形態では、リンカー

50

は、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または25個の長さのアミノ酸である。scFvに好適なリンカーは、当業者に知られている。例えば、GGGGS(G4SまたはGly4Ser)の多量体は、好適なリンカーである。例示のG4S多量体としては、15マー(G4S)₃、及び20マー(G4S)₄が挙げられる。さらなる例示のリンカーは、18マー-GGSSRSSSSSGGGGS GGGGである。エピトープタグ、またはCre-Lox組換え部位を含有するコード配列、またはscFv特性を改善させる配列などの、機能性を加えた例示の配列もまた、リンカー配列と考えられる。

【0122】

V. 抗TCR抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明は、本明細書の他箇所に記載の本発明のポリヌクレオチドの断片も含む。さらに、上記の融合ポリヌクレオチド、Fab断片、及び他の誘導体をコードするポリヌクレオチドも本発明で考えられる。

【0123】

ポリヌクレオチドは、当該技術分野において公知の任意の方法により産生または製造される。例えば、抗体のヌクレオチド配列が既知である場合、抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学合成オリゴヌクレオチドから組み立てることができ(例えば、Kutmeier et al., BioTechniques 17:242(1994)に記載される通り)、手短に述べると、抗体をコードする配列の部分を含む重複オリゴヌクレオチドを合成し、それらのオリゴヌクレオチドをアニール及びライゲートし、次いでライゲートされたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を含む。

【0124】

あるいは、本発明の抗TCR抗体、またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、好適な資源からの核酸から生成することができる。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手可能でないが、抗体分子の配列が既知の場合、抗体をコードする核酸は、化学合成することができ、または好適な資源(例えば、抗体cDNAライブラリー、または抗体もしくは他の抗TCR抗体を発現する任意の組織もしくは細胞、例えば、抗体を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞から生成されたcDNAライブラリー、またはそれから単離された核酸、好ましくは、ポリA+RNA)から、配列の3'及び5'末端にハイブリダイズする合成プライマーを使用するPCR増幅により、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングにより、例えば、抗体または他の抗TCR抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定することにより得ることができる。次いで、PCRにより生成された増幅核酸を、当該技術分野において周知の任意の方法を使用して複製可能なクローニングベクター中にクローニングすることができる。

【0125】

抗TCR抗体、またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体のヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列を決定したら、そのヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作の分野において周知の方法、例えば、組換えDNA技術、部位特異的突然変異導入、PCRなどを使用して操作して(例えば、Sambrook et al.(1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.)及びAusubel et al., eds.(1998) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY)に記載の技術を参照されたい、これらは両方とも参照により全体として本明細書に組み込まれる)、例えば、アミノ酸置換、欠失、及び/または挿入を作出するために異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成することができる。

【0126】

抗TCR結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、未改変RNAもしくはDNAまたは改変RNAもしくはDNAであり得る任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構

10

20

30

40

50

成することができる。例えば、抗 T C R 抗体、またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、1 本鎖及び 2 本鎖 D N A、1 本鎖及び 2 本鎖領域の混合物である D N A、1 本鎖及び 2 本鎖 R N A、ならびに 1 本鎖及び 2 本鎖領域の混合物である R N A、1 本鎖またはより典型的には 2 本鎖または 1 本鎖及び 2 本鎖領域の混合物であり得る D N A 及び R N A を含むハイブリッド分子から構成することができる。加えて、抗 T C R 結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、R N A もしくは D N A または R N A 及び D N A の両方を含む 3 本鎖領域から構成することができる。抗 T C R 結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドは、1 つ以上の修飾塩基または安定性もしくは他の理由のために修飾された D N A もしくは R N A 骨格も含有し得る。「修飾」塩基には、例えば、トリチル化塩基及び特殊塩基、例えば、イノシンが含まれる。様々な修飾を D N A 及び R N A に作製することができ；従って、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的修飾形態を包含する。

10

【0127】

免疫グロブリン（例えば、免疫グロブリン重鎖部分または軽鎖部分）に由来するポリペプチドの非天然変種をコードする単離ポリヌクレオチドは、1 つ以上のアミノ酸置換、付加または欠失がコードされるタンパク質中に導入されるように、1 つ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を免疫グロブリンのヌクレオチド配列中に導入することにより作出することができる。突然変異は、標準的な技術、例えば、部位特異的突然変異導入及び P C R 媒介突然変異導入により導入することができる。好ましくは、保存アミノ酸置換は、1 つ以上の非必須アミノ酸残基において作製される。

20

【0128】

実施形態では、本発明は、T C R 鎖に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を含む単離ポリヌクレオチドを提供し、前記抗体は、配列 G S T L R G（配列番号 1）を含む T C R ポリペプチドのエピトープに結合する。

【0129】

実施形態では、本発明は、配列番号 1 1、配列番号 1 3 または配列番号 1 9 に少なくとも 9 0 % 同一である V H ポリペプチドをコードする核酸を提供する。実施形態では、本発明は、配列番号 1 2、配列番号 1 4 または配列番号 2 0 に少なくとも 9 0 % 同一である V L ポリペプチドをコードする核酸をコードする核酸を提供する。

30

【0130】

本発明は、配列番号 2 または配列番号 1 5 に同一である H C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 3 または配列番号 1 6 に同一である H C D R 2 アミノ酸配列；及び / または配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、または配列番号 1 7 に同一である H C D R 3 アミノ酸配列をコードする核酸をさらに提供する。

【0131】

本発明は、配列番号 4、9 または 1 8 に同一である L C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 5 に同一である L C D R 2 アミノ酸配列をコードする核酸、及び / または配列番号 6、または 1 0 に同一である L C D R 3 アミノ酸配列をコードする核酸をさらに提供する。

【0132】

本発明は、V H ポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドをさらに提供し、前記 V H ポリペプチドは、配列番号 2、3、及び 2 1 をそれぞれ含む H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 アミノ酸配列を含み、前記 V H ポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列 G S T L R G（配列番号 1）を含む T 細胞受容体アルファ（T C R）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。

40

【0133】

本発明はまた、V H ポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドを提供し、前記 V H ポリペプチドは、配列番号 2、3、及び 2 2 をそれぞれ含む H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 アミノ酸配列を含み、前記 V H ポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列 G S T L R G（配列番号 1）を含む T 細胞受容体アルファ（T C R）

50

ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。

【0134】

実施形態では、本発明は、VHポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドに関し、前記VHポリペプチドは、配列番号2、3、及び23をそれぞれ含むHCDR1、HCDR2、及びHCDR3アミノ酸配列を含み、前記VHポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。

【0135】

さらなる実施形態では、本発明は、VHポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドを提供し、前記VHポリペプチドは、配列番号15、16、及び17をそれぞれ含むHCDR1、HCDR2、及びHCDR3アミノ酸配列を含み、前記VHポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。

10

【0136】

本発明はさらに、実施形態では、VLポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドに関し、前記VLポリペプチドは、配列番号4、5及び6をそれぞれ含むLCDR1、LCDR2、及びLCDR3アミノ酸配列を含み、前記VLポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。

【0137】

実施形態では、本発明は、VLポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドを提供し、前記VLポリペプチドは、配列番号9、5及び10をそれぞれ含むLCDR1、LCDR2、及びLCDR3アミノ酸配列を含み、前記VLポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。

20

【0138】

本発明は、VLポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドをさらに提供し、前記VLポリペプチドは、配列番号4、5及び10をそれぞれ含むLCDR1、LCDR2、及びLCDR3アミノ酸配列を含み、前記VLポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。

30

【0139】

実施形態では、本発明は、VLポリペプチドをコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチドを提供し、前記VLポリペプチドは、配列番号18、5及び6をそれぞれ含むLCDR1、LCDR2、及びLCDR3アミノ酸配列を含み、前記VLポリペプチドを含む抗体または抗原断片は、配列GSTLRG（配列番号1）を含むT細胞受容体アルファ（TCR）ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する。

【0140】

VI．融合タンパク質及び抗体複合体

本明細書の他の場所においてさらに詳細に議論するように、抗TCR結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、さらに、N末端またはC末端において異種ポリペプチドと組換えにより融合されてもよく、ポリペプチドまたは他の組成物と化学的に結合されてもよい（共有結合及び非共有結合による結合を含む）。例えば、抗TCR抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子及びエフェクター分子、例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種、または毒素と組換えにより融合されてもよく、結合されてもよい。例えば、PCT国際公開公報第92/08495号；同第91/14438号；同第89/12624号；米国特許第5,314,995号；及びEP396,387を参照されたい。

40

【0141】

本発明の抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、改変された誘

50

導体、すなわち、共有結合によって抗体と標的 T C R との結合が妨げられないように、任意のタイプの分子を抗体に共有結合することによって改変された誘導体を含んでもよい。例えば、限定されるわけではないが、抗体誘導体は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基 / ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質との連結などによって改変されている抗体を含む。特異的な化学切断、アセチル化、ホルミル化などを含むが、これに限定されない公知の技法によって、非常に多くの化学修飾のうちどれでも行うことができる。さらに、誘導体は、1 つ以上の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

【 0 1 4 2 】

抗 T C R 結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、ペプチド結合または改変されたペプチド結合、すなわち、ペプチドアイソスターによって互いにつながったアミノ酸からなってもよく、遺伝子によってコードされる 20 種類のアミノ酸以外のアミノ酸を含有してもよい。例えば、抗 T C R 抗体は、翻訳後プロセシングなどの天然プロセスによって改変されてもよく、当該技術分野において周知の化学修飾技術によって改変されてもよい。このような改変は、基本的な教科書及びさらに詳しい研究書ならびに膨大な研究論文において詳細に説明されている。ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、及びアミノ末端もしくはカルボキシル末端を含む抗 T C R 結合分子のどの場所にも、または炭水化物などの部分に改変を加えることができる。所定の抗 T C R 結合分子の中のいくつかの部位において同程度または様々な程度で、同じタイプの改変が存在してもよいことが理解されるだろう。または、所定の抗 T C R 結合分子は、多くのタイプの改変を含有してもよい。抗 T C R 結合分子は、分枝していてもよく、例えば、ユビキチン結合の結果として分枝していてもよく、分枝して、または分枝することなく環状になっていてもよい。環状、分枝、及び分枝環状の抗 T C R 結合分子は、翻訳後天然プロセスから得られてもよく、合成法によって作製されてもよい。改変には、アセチル化、アシル化、A D P - リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、 α -カルボキシル化、グリコシル化、G P I アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストール化、酸化、ペグ化、タンパク質分解プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのトランスファー RNA を介したアミノ酸付加、例えば、アルギニル化、及びユビキチン結合が含まれる。(例えば、*Protein s - - Structure and Molecular Properties*, T . E . Creighton , W . H . Freeman and Company , NY ; 2nd ed . (1993) ; *Johnson , ed . (1983) Posttranslational Covalent Modification of Proteins* (Academic Press , NY) , pgs . 1 - 12 ; *Seifter et al . , Meth . Enzymol . 182 : 626 - 646 (1990)* ; *Rattan et al . , Ann . NY Acad . Sci . 663 : 48 - 62 (1992)* を参照されたい)。

【 0 1 4 3 】

本発明はまた、抗 T C R 抗体、またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体、及び異種ポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。抗体が融合する異種ポリペプチドは、抗 T C R ポリペプチド発現細胞を機能させるのに有用であり、または抗 T C R ポリペプチド発現細胞を標的にするのに有用である。例えば、T C R の結合及び / または架橋により、サイトカイン産生、増殖、及び殺傷などの T 細胞エフェクター機能をもたらす。別の実施形態では、抗体または変異体を含むその誘導体を使用して、トランスフェクト細胞 (複数可) 上で融合構築物を所望の表面発現し、及び / またはエフェクター機能の改善を引き起こすキメラによって認識された所望の標的認識を可能にするヒト免疫細胞表面受容体の膜貫通ドメインに融合させてもよい。

10

20

30

40

50

【0144】

1つの実施形態では、本発明の融合タンパク質は、本発明の抗体のVHドメインのいずれか1つ以上のアミノ酸配列または本発明の抗体のVLドメインのいずれか1つ以上のアミノ酸配列、またはその断片もしくは変種、及び異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含むか、これから本質的になるか、またはこれからなる。

【0145】

別の実施形態では、本明細書において開示された診断方法及び処置方法において使用するための融合タンパク質は、抗TCR抗体、またはその断片、変種、もしくは誘導体のVHドメインのCDRのいずれか1つ、2つ、または3つのアミノ酸配列、または抗TCR抗体、またはその断片、変種、もしくは誘導体のVLドメインのCDRのいずれか1つ、2つ、または3つのアミノ酸配列、及び異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含むか、これから本質的になるか、またはこれからなる。1つの実施形態では、融合タンパク質は、本発明の抗TCR抗体の少なくとも1つのVHドメインのアミノ酸配列、及び本発明の抗TCR抗体またはその断片、誘導体、もしくは変種の少なくとも1つのVLドメインのアミノ酸配列、ならびに異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含む。好ましくは、融合タンパク質のVHドメイン及びVLドメインは、TCRの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する単一供給源の抗体（またはscFvもしくはFab断片）に対応する。さらに別の実施形態では、本明細書において開示された診断方法及び処置方法において使用するための融合タンパク質は、抗TCR抗体のVHドメインのCDRのいずれか1つ、2つ、3つ以上のアミノ酸配列、及び抗TCR抗体またはその断片もしくは変種のVLドメインのCDRのいずれか1つ、2つ、3つ以上のアミノ酸配列、ならびに異種ポリペプチド配列を有するポリペプチドを含む。好ましくは、VHドメインまたはVLドメインの2つ、3つ、4つ、5つ、6つ以上のCDRは、本発明の単一供給源の抗体（またはscFvもしくはFab断片）に対応する。これらの融合タンパク質をコードする核酸分子も本発明に含まれる。

【0146】

文献において報告された例示的な融合タンパク質には、T細胞受容体（Gaseigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 (1987)）；CD4（Capon et al., Nature 337:525-531 (1989)）；Traunecker et al., Nature 339:68-70 (1989)；Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9:347-353 (1990)；及びByrn et al., Nature 344:667-670 (1990)）；L-セレクトリン（ホーミング受容体）（Watson et al., J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990)）；及びWatson et al., Nature 349:164-167 (1991)）；CD44（Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990)）；CD28及び137（Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)）；CTLA-4（Lisley et al., J. Exp. Med. 174:561-569 (1991)）；CD22（Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991)）；TNF受容体（Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991)）；Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991)）；及びPepellet et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991)）；ならびにIgE受容体a（Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, Abstract No. 1448 (1991)）の融合が含まれる。

【0147】

本明細書の他の場所において議論するように、ポリペプチドのインビボ半減期を延ばすために、または当該技術分野において公知の方法を用いてイムノアッセイにおいて使用する

10

20

30

40

50

ために、抗TCR結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、異種ポリペプチドと融合されてもよい。例えば、1つの実施形態では、本発明の抗TCR抗体のインビボ半減期を延ばすために、PEGを本発明の抗TCR抗体と結合することができる。Leong et al., Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); またはWeir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002) を参照されたい。

【0148】

さらに、抗TCR結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、精製または検出を容易にするために、ペプチドなどのマーカー配列と融合することができる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、ヘキサヒスチジンペプチド、例えば、特に、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)の中に入れて提供されているタグである。マーカーアミノ酸配列の多くは市販されている。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)に記載のように、例えば、ヘキサヒスチジンをを用いると融合タンパク質が便利に精製される。精製に有用な他のペプチドタグには、インフルエンザ血球凝集素タンパク質に由来するエプトープに対応する「HA」タグ(Wilson et al., Cell 37:767 (1984))及び「flag」タグが含まれるが、これに限定されない。

【0149】

融合タンパク質は、当該技術分野において周知の方法を用いて調製することができる(例えば、米国特許第5,116,964号及び同第5,225,538号を参照されたい)。融合がなされる正確な部位は、融合タンパク質の分泌または結合特性を最適化するように経験的に選択することができる。次いで、発現のために、融合タンパク質をコードするDNAを宿主細胞に導入する。

【0150】

抗TCR結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、非結合型で用いられてもよく、様々な分子、例えば、分子の治療特性を改善する分子、標的検出を容易にする分子、または患者のイメージングもしくは療法のための分子の少なくとも1つと結合されてもよい。精製前もしくは精製後、または精製が行われている時に、抗TCR結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を標識または結合することができる。

【0151】

特に、本発明の抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物学的応答調節剤、薬剤、またはPEGと結合されてもよい。

【0152】

当業者であれば、結合しようとする選択された剤に応じて様々な技法を用いて複合体を組み立てることができるとう理解するだろう。例えば、ビオチンとの複合体は、例えば、結合ポリペプチドと、ビオチンN-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどのビオチン活性化エステルとの反応によって調製される。同様に、蛍光マーカーとの複合体は、カップリング剤、例えば、本明細書において列挙したカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアネート、好ましくは、フルオレセイン-イソチオシアネートとの反応によって調製することができる。本発明の抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体の複合体も同様に調製される。

【0153】

さらに、本発明は、診断剤または治療剤と結合した、抗TCR結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を包含する。抗TCR抗体は、その抗原結合断片、変種、及び誘導体を含めて、臨床試験法の一部として、例えば、所定の処置法及び/または予防法の効力を確かめる臨床試験法の一部として、例えば、疾患の発

症または進行をモニタリングするために診断に使用することができる。例えば、検出は、抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体と検出可能な物質とをカップリングすることによって容易にすることができる。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子団、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、様々な陽電子放射型断層撮影法を用いる陽電子放射金属、及び非放射性的の常磁性金属イオンが含まれる。本発明による診断剤として使用するために抗体と結合することができる金属イオンについては、例えば、米国特許第4,741,900号を参照されたい。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子団複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが含まれる。適切な蛍光材料の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが含まれる。発光材料の一例にはルミノールが含まれる。生物発光材料の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが含まれる。適切な放射性材料の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、または ^{99}Tc が含まれる。

【0154】

抗TCR結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、細胞毒、治療剤、または放射性金属イオンなどの治療部分と結合されてもよい。細胞毒または細胞傷害剤には、細胞に有害な任意の剤が含まれる。

【0155】

抗TCR結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体はまた、化学発光または蛍光化合物などのレポーターとカップリングすることによって検出可能に標識することもできる。次に、標識された抗TCR結合分子の存在は、化学反応中に生じた発光の存在を検出することによって決定される。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、テロマティックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、及びシュウ酸エステルである。

【0156】

抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を検出可能に標識することができる手法の1つは、これらと酵素を連結し、酵素イムノアッセイ(EIA)において連結産物を使用することによる手法である(Volley, A., 「The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)」 Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Diagnostic Horizons 2: 1-7 (1978); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31: 507-520 (1978); Butler, Meth. Enzymol. 73: 482-523 (1981); Maggio, ed. (1980) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla.; Ishikawa et al., eds. (1981) Enzyme Immunoassay (Kagaku Shoin, Tokyo)。酵素は、抗TCR抗体に結合しており、例えば、分光光度法、蛍光測定法、または視覚的手段によって検出可能な化学部分を生じるように、適切な基質、好ましくは、発色基質と反応する。抗体を検出可能に標識するのに使用することができる酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 α -5-ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これに限定されない。さらに、検出は、酵素の発色基質を用いる比色法によって達成することができる。検出はまた、同じように調製された標準と比較して基質の酵素反応の程度を視覚的に比較することによって達成することもできる。

10

20

30

40

50

【0157】

検出はまた、様々な他のイムノアッセイのいずれを用いても達成することができる。例えば、抗TCR結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を放射性標識することによって、ラジオイムノアッセイ(RIA)を用いて結合分子を検出することができる(例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Weintraub (March, 1986) Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques (The Endocrine Society)を参照されたい)。放射性同位体は、ガンマカウンター、シンチレーションカウンター、またはオートラジオグラフィーを含むが、これに限定されない手段によって検出することができる。

10

【0158】

抗TCR結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体はまた、¹⁵²Euなどの蛍光放出金属またはランタニド系列の他の蛍光放出金属を用いて検出可能に標識することもできる。これらの金属は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)などの金属キレート基を用いて結合分子に取り付けることができる。

【0159】

様々な部分と、抗体(例えば、抗TCR抗体)またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を結合するための技法は周知である。例えば、Amon et al. (1985) 「Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy」, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243 - 56; Hellstrom et al. (1987) 「Antibodies for Drug Delivery」, in Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2nd ed.; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623 - 53; Thorpe (1985) 「Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review」, in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al., pp. 475 - 506; 「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」, in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al., Academic Press, pp. 303 - 16 (1985); 及び Thorpe et al. (1982) 「The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjug」, Immunol. Rev. 62: 119 - 58を参照されたい。

20

30

40

【0160】

VII. 抗TCR抗体ポリペプチドの発現

抗体の軽鎖及び重鎖をコードするDNA配列は、周知の方法に従って逆転写酵素及びDNAポリメラーゼを用いて同時にまたは別々に作製することができる。PCRは、コンセンサス定常領域プライマーによって開始されてもよく、公開された重鎖及び軽鎖のDNA配列及びアミノ酸配列に基づく、さらに特異性のあるプライマーによって開始されてもよい。前記で議論したように、抗体軽鎖及び重鎖をコードするDNAクローンを単離するために、PCRも使用することができる。この場合、コンセンサスプライマーまたはさらに大きな相同プローブ、例えば、マウス定常領域プローブによってライブラリーをスクリーニングすることができる。

50

【 0 1 6 1 】

DNA、典型的には、プラスミドDNAを、当該技術分野において公知の技法を用いて細胞から単離し、例えば、組換えDNA技術に関する前述の参考文献に詳述された標準的な周知の技法に従って制限地図を作製し、配列決定することができる。もちろん、DNAは、単離プロセスまたは後の分析の間のどの時点であっても本発明に従って合成DNAでもよい。

【 0 1 6 2 】

本発明の抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を得るために、単離された遺伝物質を操作した後に、抗TCR抗体をコードするポリヌクレオチドは、典型的には、望ましい量の抗TCR抗体を産生するのに使用することができる宿主細胞に導入するために発現ベクターに挿入される。

10

【 0 1 6 3 】

本明細書に記載の標的分子、例えば、TCRに結合する、抗体またはその断片、誘導体、もしくは類似体、例えば、抗体の重鎖または軽鎖の組換え発現は、抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖またはその一部（好ましくは、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインを含有する部分）をコードするポリヌクレオチドが得られたら、当該技術分野において周知の技法を用いた組換えDNA技術によって、抗体分子を産生するためのベクターを作製することができる。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現させることによってタンパク質を調製する方法が本明細書に記載されている。当業者に周知の方法を用いて、抗体コード配列ならびに適切な転写制御シグナル及び翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインビボ遺伝子組換えが含まれる。従って、本発明は、プロモーターと機能的に連結された、本発明の抗体分子またはその重鎖もしくは軽鎖または重鎖可変ドメインもしくは軽鎖可変ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでもよく（例えば、PCT国際公開公報第86/05807号；PCT国際公開公報第89/01036号；及び米国特許第5,122,464号を参照されたい）、重鎖全体または軽鎖全体を発現させるために、抗体の可変ドメインをこのようなベクターにクローニングすることができる。

20

30

【 0 1 6 4 】

「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、望ましい遺伝子を宿主細胞に導入し、宿主細胞において発現させるためのビヒクルとして本発明に従って用いられるベクターを意味するために本明細書において用いられる。当業者に公知のように、このようなベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス、及びレトロウイルスからなる群から容易に選択することができる。一般的に、本発明と適合するベクターは、選択マーカー、望ましい遺伝子のクローニングを容易にする適切な制限部位、ならびに真核細胞または原核細胞において進入及び/または複製する能力を含む。

【 0 1 6 5 】

特定の態様では、本発明は、本明細書において開示された抗TCR抗体及び抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。実施形態では、ベクターは、ウイルス性、非ウイルス性、エピソーム、または組み込みである。実施形態では、ベクターは、トランスポゾン、例えば、スリーピングビューティートランスポゾンである。実施形態では、ベクターは、レンチウイルスバックボーン成分を含むベクターである。例示的なバックボーン成分としては、pFUGW、及びpSMPUWが含まれるが、これに限定されない。

40

【 0 1 6 6 】

本発明の目的では、非常に多くの発現ベクター系を使用することができる。例えば、あるクラスのベクターでは、ウシバピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、パキユロウイルス、レトロウイルス（RSV、MMTV、もしくは

50

はMOMLV)、またはSV40ウイルスなどの動物ウイルスに由来するDNAエレメントが用いられる。他のベクターでは、ポリシストロニック系と内部リボソーム結合部位が用いられる。さらに、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカーを導入することによって、DNAを細胞染色体に組み込んでいる細胞を選択することができる。マーカーは、栄養要求性宿主に対する原栄養性、殺生物剤耐性(例えば、抗生物質)、または銅などの重金属耐性を提供してもよい。選択マーカー遺伝子は、発現させようとするDNA配列と直接連結されてもよく、同時形質転換によって同じ細胞に導入されてもよい。最適なmRNA合成のために、さらなるエレメントも必要とされることがある。これらのエレメントは、シグナル配列、スプライスシグナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、及び終結シグナルを含んでもよい。

10

【0167】

特に好ましい実施形態では、クローニングされた可変領域遺伝子は、前記のように合成された重鎖定常領域遺伝子及び軽鎖定常領域遺伝子(好ましくは、ヒト)と共に発現ベクターに導入される。もちろん、真核細胞において発現を誘発することができる任意の発現ベクターを本発明において使用することができる。適切なベクターの例には、プラスミドpcDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、及びpZeoSV2(Invitrogen, San Diego, Calif. から入手可能)、ならびにプラスミドpCI(Promega, Madison, Wis. から入手可能)が含まれるが、これに限定されない。一般的に、多数の形質転換細胞から、適切に高いレベルの免疫グロブリン重鎖及び軽鎖を発現する形質転換細胞をスクリーニングすることは、例えば、ロボットシステムによって行うことができる日常的な実験法である。

20

【0168】

さらに一般的には、抗TCR抗体の単量体サブユニットをコードするベクターまたはDNA配列が調製されたら、発現ベクターを適切な宿主細胞に導入することができる。宿主細胞へのプラスミドの導入は当業者に周知の様々な技法によって達成することができる。これらには、トランスフェクション(電気泳動及びエレクトロポレーションを含む)、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エンベロープのあるDNAとの細胞融合、マイクロインジェクション、ならびにインタクトなウイルスの感染が含まれるが、これに限定されない。Ridgway(1988)「Mammalian Expression Vectors」 in Vectors, ed. Rodriguez and Denhardt (Butterworths, Boston, Mass.), Chapter 24.2, pp. 470-472を参照されたい。典型的に、宿主へのプラスミドの導入はエレクトロポレーションによるものである。発現構築物を有する宿主細胞を軽鎖及び重鎖の産生に適切な条件下で増殖させ、重鎖タンパク質及び/または軽鎖タンパク質の合成についてアッセイする。例示的なアッセイ技術には、酵素結合免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、または蛍光活性化セルソーター分析(FACS)、免疫組織化学などが含まれる。

30

【0169】

発現ベクターを従来技術によって宿主細胞に導入し、次いで、トランスフェクトされた細胞を従来技術によって培養して、本明細書に記載の方法において使用するための抗体を産生する。従って、本発明は、異種プロモーターと機能的に連結された、本発明の抗体またはその重鎖もしくは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。二本鎖抗体の発現に好ましい態様では、下記で詳述するように、免疫グロブリン分子全体を発現させるために、重鎖及び軽鎖を両方ともコードするベクターを宿主細胞において同時発現させることができる。

40

【0170】

本明細書で使用する「宿主細胞」とは、組換えDNA技術を用いて構築され、少なくとも1つの異種遺伝子をコードするベクターを有する細胞を指す。組換え宿主から抗体を単離

50

するためのプロセスの説明において、「細胞」、及び「細胞培養物」という用語は、特に断りのない限り、抗体の供給源を指すために同義に用いられる。言い換えると、「細胞」からのポリペプチドの回収は、遠心沈殿した全細胞からの回収を意味してもよく、培地及び懸濁細胞の両方を含有する細胞培養物からの回収を意味してもよい。

【0171】

本明細書に記載の方法において使用するための抗体分子を発現させるために、様々な宿主発現ベクター系を利用することができる。このような宿主発現系は、関心対象のコード配列が産生され、その後に精製されるビヒクルであるが、適切なヌクレオチドコード配列によって形質転換またはトランスフェクトされた時に本発明の抗体分子をインサイチューで発現することができる細胞でもある。これらには、微生物、例えば、抗体コード配列を含有する、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターによって形質転換された細菌（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*）；抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターによって形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；抗体コード配列を含有する、組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、*CaMV*；タバコモザイクウイルス、*TMV*）に感染した、もしくは組換えプラスミド発現ベクター（例えば、*Ti*プラスミド）によって形質転換された植物細胞系；または哺乳動物細胞ゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）もしくは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（例えば、*COS*、*CHO*、*BLK*、293、3T3細胞）が含まれるが、これに限定されない。特に、組換え抗体分子全体を発現させるために、好ましくは、細菌細胞、例えば、*Escherichia coli*、より好ましくは、真核細胞は、組換え抗体分子の発現のために用いられる。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（*CHO*）などの哺乳動物細胞と、ヒトサイトメガロウイルスに由来する主要中間初期（major intermediate early）遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターが有効な抗体発現系である（Foecking et al., *Gene* 45:101 (1986)；Cockett et al., *Bio/Technology* 8:2 (1990)）。

【0172】

タンパク質発現に用いられる宿主細胞株は、哺乳動物に由来することが多い。当業者であれば、発現しようとする望ましい遺伝子産物に最も適した特定の宿主細胞株を優先的に決定する能力があると信じられている。例示的な宿主細胞株には、*CHO*（チャイニーズハムスター卵巣）、*DG44*及び*DUXB11*（チャイニーズハムスター卵巣株、*DHFR*マイナス）、*HELA*（ヒト子宮頸癌）、*CV1*（サル腎臓株）、*COS*（*SV40T*抗原を含む*CV1*誘導体）、*VERY*、*BHK*（ベビーハムスター腎臓）、*MDCK*、293、*WI38*、*R1610*（チャイニーズハムスター線維芽細胞）、*BALBC/3T3*（マウス線維芽細胞）、*HAK*（ハムスター腎臓株）、*SP2/O*（マウス骨髄腫）、*P3.times.63-Ag3.653*（マウス骨髄腫）、*BFA-1c1BPT*（ウシ内皮細胞）、*RAJI*（ヒトリンパ球）、及び293（ヒト腎臓）が含まれるが、これに限定されない。宿主細胞株は、典型的には、商業サービス、*American Tissue Culture Collection*、または公表された文献から入手することができる。

【0173】

さらに、挿入された配列の発現を調節する、またはある決まったやり方で遺伝子産物を修飾及びプロセシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のこのような修飾（例えば、グリコシル化）及びプロセシング（例えば、切断）は、タンパク質の機能に重要な場合がある。異なる宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセシング及び修飾のための特徴的かつ特異的な機構を有する。発現された外来タンパク質の正

10

20

30

40

50

しい修飾及びプロセッシングを確実にするように、適切な細胞株または宿主系を選択することができる。このために、一次転写物の正しいプロセッシング、グリコシル化、及び遺伝子産物のリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用することができる。

【0174】

組換えタンパク質を長期間、高収率で産生するために、安定発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定発現する細胞株を操作してもよい。ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）及び選択マーカーによって制御されたDNAによって、宿主細胞を形質転換することができる。外来DNAを導入した後、操作された細胞を強化培地中で1～2日間、増殖させてもよく、次いで、選択培地に移す。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択耐性を付与し、細胞がプラスミドを細胞染色体に安定に組み込み、増殖してフォーカス（foci）を形成し、次に、フォーカスがクローン化し、細胞株まで発達するのを可能にする。この方法は、抗体分子を安定発現する細胞株を操作するのに有利に使用することができる。

【0175】

単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子（Wigler et al., Cell 11: 223 (1977)）、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（Szybalska and Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202 (1992)）、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（Lowy et al., Cell 22: 817 (1980)）を含むが、これに限定されない多数の選択系を使用することができる。遺伝子は、それぞれ、tk-細胞、hgprt-細胞、またはaprt-細胞において使用することができる。また、代謝拮抗剤耐性を、以下の遺伝子：メトトレキセート耐性を付与する、dhfr（Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77: 357 (1980)；O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527 (1981)）；ミコフェノール酸耐性を付与する、gpt（Mulligan and Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072 (1981)）；アミノグリコシド G-418 耐性を付与する、neo（Clinical Pharmacy 12: 488-505；Wu and Wu, Biotherapy 3: 87-95 (1991)；Tolstoshey, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596 (1993)；Mulligan, Science 260: 926-932 (1993) 及び Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217 (1993)；TIB TECH 11(5): 155-215 (May, 1993)）；ならびにハイグロマイシン耐性を付与する、hygro（Santerre et al., Gene 30: 147 (1984)）の選択の基礎として使用することができる。使用することができる、当該技術分野において一般に知られている組換えDNA技術の方法は、Ausbell et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY)；Kriegler (1990)「Gene Transfer and Expression」in A Laboratory Manual (Stockton Press, NY)；Dracopoli et al. (eds) (1994) Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons, NY) Chapters 12 and 13；Colberre-Garapin et al. (1981) J. Mol. Biol. 150: 1に記載されている。これらはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0176】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって高めることができる（総説については、Bebbington and Hentschel (1987)「The Use of Vectors Based on Gene Amplification for th

10

20

30

40

50

e Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning」(Academic Press, NY) Vol. 3を参照されたい)。抗体を発現するベクター系の中にあるマーカが増幅可能な場合、宿主細胞の培養物に存在する阻害剤のレベルが上昇することによってマーカ遺伝子のコピー数が増加するであろう。増幅領域は抗体遺伝子と関連しているので、抗体の産生も増加するだろう(Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3: 257 (1983))。

【0177】

インビトロで産生されたら、スケールアップによって多量の望ましいポリペプチドを得ることができる。組織培養条件下で哺乳動物細胞を培養するための技法は、当該技術分野において公知であり、均一な懸濁培養、例えば、エアリフト型リアクターもしくは連続スターラーリアクターにおける懸濁培養、または固定化細胞培養もしくは捕捉細胞培養(entrapped cell culture)、例えば、中空系の中、マイクロカプセルの中、アガロースマイクロビーズ上、もしくはセラミックカートリッジ上での固定化細胞培養もしくは捕捉細胞培養を含む。必要に応じて及び/または所望に応じて、例えば、合成ヒンジ領域ポリペプチドを優先的に生合成した後に、または本明細書に記載のHICクロマトグラフィー段階の前もしくは後に、従来通りのクロマトグラフィー法、例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロース上でのクロマトグラフィー、または(イムノ)アフィニティクロマトグラフィーによってポリペプチド溶液を精製することができる。

【0178】

本発明の抗TCR抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体をコードする遺伝子はまた、昆虫細胞、細菌細胞もしくは酵母細胞、または植物細胞などの非哺乳動物細胞において発現させることもできる。核酸を容易に取り込む細菌には、enterobacteriaceaeのメンバー、例えば、Escherichia coliまたはSalmonellaの株; Bacillaceae、例えば、Bacillus subtilis; Pneumococcus; Streptococcus、Haemophilus influenzaeが含まれる。さらに、細菌において発現させた時に、異種ポリペプチドは典型的に封入体の一部になることが理解されるだろう。異種ポリペプチドを単離し、精製し、次いで、機能分子に組み立てなければならない。四価型抗体が望ましいのであれば、サブユニットは四価抗体に自己集合する(WO 02/096948 A2)。

【0179】

細菌系では、発現させる抗体分子に意図された用途に応じて、多くの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、抗体分子の薬学的組成物を作製するために、多量のこのようなタンパク質を産生しようとする時に、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を誘導するベクターが望ましい場合がある。このようなベクターには、以下が含まれるが、これに限定されない: 融合タンパク質が産生されるように、抗体コード配列が個々にベクターに入れられてlacZコード領域とインフレームに連結することができる、E. coli発現ベクターpUR278(Rutherford et al., EMBO J. 2: 1791 (1983)); ONベクター(Inouye and Inouye, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109 (1985); Van Heeke and Schuster, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509 (1989))など。グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するために、pGEXベクターも使用することもできる。一般的に、このような融合タンパク質は可溶性であり、マトリクスグルタチオン-アガロースビーズに吸着及び結合させた後に、遊離グルタチオンの存在下で溶出することによって溶解細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物をGST部分から放出できるようにトロンピンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計されている。

【0180】

原核生物に加えて、真核生物微生物も使用することができる。Saccharomyces cerevisiaeすなわち一般的なパン酵母が真核生物微生物の中で最も一般的に用いられるが、多くの他の株、例えば、Pichia pastorisが一般的に用いられる。

【0181】

Saccharomycesにおける発現のために、例えば、プラスミドYRp7 (Stinchcomb et al., Nature 282:39 (1979); Kingman et al., Gene 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene 10:157 (1980)) が一般的に用いられる。このプラスミドは、トリプトファン中での増殖能が無い変異酵母株、例えば、ATCC No. 44076またはPEP4-1 (Jones, Genetics 85:12 (1977)) に選択マーカーを提供するTRP1遺伝子を既に含有している。次いで、酵母宿主細胞ゲノムの特徴としてtrp1損傷が存在すれば、トリプトファンの非存在下での増殖によって形質転換を検出するのに有効な環境となる。

10

【0182】

昆虫系では、典型的に、オートグラフィア核多角体ウイルス (AcNPV) が外来遺伝子を発現するベクターとして用いられる。このウイルスは、ヨトウガ (Spodoptera frugiperda) 細胞において増殖する。抗体コード配列を個々にウイルスの非必須領域 (例えば、ポリヘドリン遺伝子) に入れてクローニングし、AcNPVプロモーター (例えば、ポリヘドリンプロモーター) の制御下に置くことができる。

20

【0183】

本発明の抗体分子が組換えにより発現されたら、当該技術分野において公知の任意の免疫グロブリン分子精製法によって、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、特に、プロテインA後の特異的抗原に対するアフィニティクロマトグラフィー、及びサイジング (sizing) カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差 (differential solubility)、またはタンパク質精製のための他の任意の標準的な技法によって精製することができる。あるいは、本発明の抗体の親和性を高める好ましい方法が米国特許出願公開第20020123057A1号に開示される。

【0184】

従って、本発明は、(a) 細胞中で、抗体のVL及びVH鎖をコードする1つ以上のポリヌクレオチド分子 (複数可) を発現すること; 及び (b) 抗体を細胞から精製することを含み、抗体は、TCR 鎖に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片の製造方法を提供する。実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、GSTLRG (配列番号1) を含むTCR 鎖のエピトープに選択的に結合する。

30

【0185】

VIII. TCRを含有する細胞の選択方法

さらなる実施形態では、(a) 細胞を、TCRに結合する抗体と接触させること、抗体は、複数のT細胞エピトープ特異性を有するT細胞に結合する; 及び (b) 抗体の結合に基づいて、TCRを含む細胞を選択することを含む、T細胞受容体 (TCR) を含む細胞を選択する方法を提供する。ある特定の態様では、抗体は、(i) TCRの結合について、79A、79A-23、79A-15、79A-11または79A-13モノクローナル抗体と競合し; (ii) T細胞エピトープ特異性から本質的に独立してT細胞に結合し; (iii) T細胞のTCR活性をアゴナイズし; または (iv) T細胞増殖を刺激する。

40

【0186】

TCRを含有する細胞を選択する方法のいくつかの態様では、抗体は、TCR ポリペプチドに結合する。他の態様では、抗体は、配列GSTLRG (配列番号1) を含むTCR ポリペプチドのエピトープに結合する。いくつかの態様では、細胞は、インビボである。いくつかの態様では、抗体は、レポーターを含み、方法は、蛍光活性化細胞選別 (FACS) によって、TCRを含む細胞を選択することを含む。いくつかの態様では、細胞を

50

選択することは、常磁性ビーズを用いて選択することを含む。ある特定の態様では、抗体は、支持体に結合している。例えば、支持体は、ビーズ、表面、カラム、または宿主細胞である。ある特定の態様では、方法は、T細胞を精製または濃縮する方法としてさらに定義される。さらなる態様では、細胞を抗体と接触させることは、TCRを含む細胞において活性化または成長を誘発することを含む。いくつかの態様では、TCRを含む細胞を精製または濃縮することは、細胞の増殖を刺激することを含む。

【0187】

IX. 人工抗原提示細胞 (aAPC)

場合によっては、人工抗原提示細胞 (「aAPC」) は、T細胞またはT細胞前駆体の拡張、増殖、及び/または活性化、ならびにT細胞ベースの治療用組成物及び細胞治療製品の調製に有用な細胞 (aAPC) を活性化し、増殖させることも指す。T細胞治療用組成物は、キメラ抗原受容体 (CAR)、T細胞受容体 (TCR)、または任意のキメラ受容体を含むように遺伝的に改変されるT細胞を含むことができる。

10

【0188】

実施形態に従って使用されるaAPCとしては、樹状細胞、マクロファージ、不死化細胞、及び人工抗原提示細胞が含まれるが、これらに限定されない。1つの態様では、aAPCは、トランスジェニックK562細胞であってもよい。本発明のいくつかの態様では、aAPCは、HLA陰性であり、本発明のいくつかの態様では、aAPCは、HLA陽性である。ある特定の態様では、aAPCは、実施形態の抗TCR結合抗体に結合する。さらなる態様では、aAPCは、抗TCR結合抗体 (例えば、膜結合型抗体) を表面発現するための発現構築物を含む。抗原提示系の調製及び使用に関する一般的指針については、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,225,042号、同第6,355,479号、同第6,362,001号、及び同第6,790,662号、米国特許公開第2009/0017000号、及び同第2009/0004142号、ならびに国際公開第2007/103009号を参照されたい。

20

【0189】

aAPCは、いくつかの場合では、T細胞を活性化または共刺激する追加の分子を含んでもよい。追加の分子は、いくつかの場合では、膜結合型C サイトカインを含んでもよい。なおもまださらなる態様では、AaPCは、不活性化もしくは照射される、または感染性物質に関して検査され、これを含まないと確認されている。さらに別の態様では、aAPCの存在下で細胞を培養することは、IL-15、IL-21、及び/またはIL-2などの可溶性サイトカインを含む培地中で細胞を培養することを含む。細胞は、約10:1~約1:10; 約3:1~約1:5; 約1:1~約1:3 (免疫エフェクター細胞対AaPC); またはその間で誘導可能な任意の範囲の比率で培養されてもよい。例えば、T細胞とaAPCの共培養は、約1:1、約1:2、または約1:3の比率であることができる。いくつかの態様では、遺伝的に改変されたT細胞またはT細胞をエクスピボ培養することは、14日間以下、7日間以下、または3日間以下にわたる。他の態様では、遺伝的に改変されたT細胞またはT細胞は、21日未満、例えば、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1日未満にわたって、エクスピボ培養される。

30

40

【0190】

例えば、エクスピボ培養 (例えば、AaPCまたはaAPCの存在下で培養) は、T細胞を倍增させる1つの集団未満で行うことができる。さらに別の態様では、T細胞は、AaPCまたはaAPCの存在下でエクスピボ培養されない。

【0191】

1つの態様では、aAPCは、CD137Lを発現し得る。他の態様では、aAPCは、CD19、CD64、CD86、または膜結合型IL-15をさらに発現し得る。いくつかの態様では、膜結合型IL-15 (mIL-15) は、IL-15~IL-15Raの融合タンパク質を含む。さらなる態様では、mIL-15構築物は、セリン-グリシンリンカーで全長IL-15Ra (NM002189.3) に融合したIL-15 cDNA

50

配列 (N M 0 0 0 5 8 5 . 4) を含む。I g E シグナルペプチド (g b | A A B 5 9 4 2 4 . 1) を、m I L 1 5 融合構築物に使用することができる。m I L - 1 5 の一例は、参照により本明細書に組み込まれる W O / 2 0 1 4 / 1 8 6 4 6 9 に記載されている。

【 0 1 9 2 】

実施形態では、切断型 C D 8 膜貫通タンパク質 (t C D 8 - T M) または切断型ヒト F c - t C D 8 - T M ドメイン (H A タグ有無) または同様の細胞外足場分子を抗 T C R 抗体またはその断片に融合して、共刺激リガンド C 8 6、C D 1 3 7 L、もしくは I L 1 5 (膜結合型製剤として含む)、またはその任意の組み合わせと一緒に、例えば、K 5 6 2 に由来する細胞上に発現される。本発明の態様では、配列番号 2 4 は、ヒト切断型 C D 8 ドメインの一例であり、配列番号 2 5 は、ヒト C D 8 a 膜貫通ドメインの一例であり、配列番号 2 6 は、h C D 8 a 細胞外ドメインの一例である。

10

【 0 1 9 3 】

a A P C を使用して、一般的にまたは T C R エピトープ特異的な方法で、T 細胞を拡張及び/または活性化してもよい。腫瘍抗原との遭遇の間、抗原提示細胞によって T 細胞に送られたシグナルは、T 細胞プログラミング及び以降の細胞の治療有効性に影響し得る。これに刺激を受け、T 細胞に与えられるシグナルに対する至適なコントロールを可能にする、人工抗原提示細胞の開発への取組みがなされた (T u r t l e e t a l . , 2 0 1 0)。T C R 結合抗体などの抗体に加えて、A P C 系はまた、少なくとも 1 つの外因性補助分子も含んでもよい。任意の好適な数及び組み合わせの補助分子を利用してもよい。補助分子は、共刺激分子及び接着分子などの補助分子から選択されてもよい。例示的な共刺激分子としては、C 8 6、C D 1 3 7 L 及び m I L 1 5 または O X 4 0 L (C D 1 3 4 L) が挙げられ、C D 7 0 及び B 7 . 1 (B 7 または C D 8 0 と呼ばれる) と共に、T 細胞の表面上の C D 2 8、4 - 1 B B または O X 4 0 分子に結合することができ、これにより、例えば、T 細胞拡張、T h 1 分化、T 細胞短期間生存、及びインターロイキン (I L) - 2 などのサイトカイン分泌に影響を及ぼす。接着分子として、セレクチンなどの炭水化物結合糖タンパク質、インテグリンなどの膜貫通型結合糖タンパク質、カドヘリンなどのカルシウム依存性タンパク質、及び細胞間接着分子 (I C A M) などの単回膜貫通型免疫グロブリン (I g) スーパーファミリータンパク質などを挙げることができ、これらは、例えば、細胞対細胞、または細胞対マトリックスの接触を促進する。例示的な接着分子としては、L F A - 3 及び I C A M - 1 などの I C A M が挙げられる。共刺激分子及び接着分子を含む例示的な補助分子の選択、クローニング、調製、及び発現に有用な技術、方法、及び試薬は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6 , 2 2 5 , 0 4 2 号、同第 6 , 3 5 5 , 4 7 9 号、及び同第 6 , 3 6 2 , 0 0 1 号に例示されている。

20

30

【 0 1 9 4 】

場合によっては、a A P C になるように選択された細胞は、細胞内抗原プロセッシング、細胞内ペプチド輸送、及び/または細胞内 M H C クラス I もしくはクラス I I 分子 - ペプチド負荷が欠失しているか、または変温性 (すなわち、温度攻撃に対して哺乳動物細胞株よりも感受性が低い) であるか、またはこれら欠失と変温性特性の両方を保有している。いくつかの態様では、a A P C になるように選択された細胞はまた、外因性 M H C クラス I またはクラス I I 分子、及び細胞内に導入される補助分子成分に対して、少なくとも 1 つの内因性対応物 (例えば、内因性 M H C クラス I もしくはクラス I I 分子、及び/または上記内因性補助分子) を発現する能力をも欠失している。さらに、a A P C は、a A P C を生成するためのそれらの修飾以前に細胞が保有していた欠失及び変温性特性を保持することができる。例示的な a A P C は、昆虫細胞株などの抗原プロセッシング関連トランスポーター (T A P) - 欠失細胞株を構成するか、もしくはその細胞株由来である。例示的な変温性昆虫細胞株は、S c h n e i d e r 2 細胞株などのショウジョウバエ細胞株である (例えば、S c h n e i d e r , J . m 1 9 7 2)。S c h n e i d e r 2 細胞の調製、増殖、培養に関する実例となる方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6 , 2 2 5 , 0 4 2 号、同第 6 , 3 5 5 , 4 7 9 号、及び同第 6 , 3 6 2 , 0 0 1 号に記載されている。

40

50

【0195】

a A P C は、凍結解凍サイクルにも曝される。例えば、a A P C を収容する好適な容器を、適量の液体窒素、固体二酸化炭素（ドライアイス）、または急速に凍結を起こすような同様の低温材料と接触させることにより、a A P C を凍結してもよい。続いて、低温材料を a A P C から除去して、周囲室温条件に曝すことにより、または、微温湯浴もしくは温かい手を用いて解凍時間の短縮を促進する促進化凍解プロセスのいずれかにより、凍結した a A P C を解凍する。さらに、a A P C を凍結し、解凍まで長期間保存してもよい。また、凍結した a A P C を解凍し、続いてさらに用いるまで凍結乾燥してもよい。ジメチルスルホキシド（DMSO）、ポリエチレングリコール（PEG）、及び他の防腐剤などの凍結解凍手順に悪影響を及ぼし得る防腐剤は、本質的にそのような防腐剤を欠く培地に a A P C を移すことなどにより、凍結解凍サイクルを受ける a A P C を含む培地には有利に含まれず、または本質的に除去される。

10

【0196】

他の実施形態では、不活化後に、細胞増殖、核酸の複製または発現が本質的に起こらないように、異種核酸及び a A P C に内因性の核酸を架橋により不活化してもよい。例えば、外因性 M H C 及び補助分子の発現、このような分子の a A P C 表面上への提示、ならびに選択された単一のペプチドまたは複数のペプチドによる提示された M H C 分子の負荷に続く点で、a A P C が不活化されてもよい。従って、このような不活化されて選択したペプチド負荷 a A P C は、本質的に増殖不能または複製不能にされているものの、選択したペプチド提示機能を保持し得る。架橋によっても、a A P C の抗原提示細胞機能を実質的に低下させることなく、細菌及びウイルスなどの微生物汚染が本質的にない A P C がもたらされる。従って、架橋は、a A P C の重要な A P C 機能を維持する一方で、a A P C を用いて開発された細胞療法産物の安全性に関する懸念を軽減するのに役立つ。架橋及び a A P C に関する方法については、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第 2 0 0 9 0 0 1 7 0 0 0 号を参照されたい。

20

【0197】

X . T 細胞を拡張及び / または活性化する方法

本発明は、T 細胞を生成するための、T 細胞を活性化し、エキスピボ及びインピボで増殖する方法を提供する。エキスピボ活性化及び増殖に関する実施形態では、T 細胞は、臨床グレードである。実施形態では、方法は、本発明の抗体または抗原結合断片を用いた - T C R 架橋によって T 細胞を活性化する。実施形態では、T 細胞は、末梢血単核球細胞（P B M C）である。さらなる実施形態では、T 細胞は、例えば、キメラ抗原受容体（C A R）、T 細胞受容体（T C R）または任意のキメラ受容体を含むように遺伝的に改変される T 細胞を含むことができる。いくつかの態様では、T 細胞はまた、T 細胞の増殖及び / または生存を刺激するサイトカインで改変されてもよい。例えば、T 細胞は、膜結合型バージョンの I L - 7、I L - 1 5、または I L - 2 1 を含む得る。いくつかの態様では、サイトカインは、サイトカインの受容体とサイトカインコード配列の融合によって膜に繋ぎ止められる。例えば、細胞は、I L - 1 5 - I L - 1 5 R a 融合タンパク質を発現するためのベクターを含むことができる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 1 4 1 8 6 4 6 9 を参照されたい。

30

40

【0198】

さらなる態様では、T 細胞は、トランスフェクト細胞のゲノム中に C A R または T C R コード配列の組み込みを促進するトランスポゼースでさらに改変される。いくつかの態様では、トランスポゼースは、D N A 発現ベクターとして提供される。しかしながら、好ましい態様では、トランスポゼースは、トランスポゼースの長期発現がトランスジェニック細胞で起きないように、発現可能な R N A またはタンパク質として提供される。例えば、いくつかの態様では、トランスポゼースは、m R N A（例えば、キャップ及びポリ A 尾部を含む m R N A）として提供される。任意のトランスポゼース系を実施形態に従って使用してもよい。しかしながら、いくつかの態様では、トランスポゼースは、サケ科型 T e 1 様トランスポゼース（S B）である。例えば、トランスポゼースは、いわゆる「スリーピン

50

グビューティ」トランスポゼースであり得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 6, 489, 458 号を参照されたい。ある特定の態様では、トランスポゼースは、酵素活性が増した遺伝子操作酵素である。トランスポゼースのいくつかの具体例としては、SB10、SB11、SB100x トランスポゼース（例えば、参照により本明細書に組み込まれる Mates et al、2009 を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、方法には、SB10、SB11、SB100x、または SB110x トランスポゼースをコードする mRNA を持つ細胞のエレクトロポレーションを伴い得る。

【0199】

T 細胞を活性化すること、または T 細胞活性化は、T 細胞の数値拡張（すなわち、T 細胞の数を増加させる）（T 細胞拡張とも呼ばれる）、ならびにサイトカインを産生し、特定の細胞（例えば、腫瘍抗原提示細胞）を殺傷するために T 細胞を刺激することが含まれる。

【0200】

本発明の T 細胞を拡張及び／または活性化する方法を臨床の場で使用して、罹患した対象、すなわち、これらを必要とする対象の T 細胞集団を拡張及び／または活性化し、またはドナーの T 細胞集団、すなわち、罹患した対象以外の供給源に由来する T 細胞を拡張及び／または活性化することができる。

【0201】

本発明はさらに、T 細胞受容体（TCR）のエピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片の存在下で、T 細胞を人工抗原提示細胞（aAPC）と接触させることを含み、前記エピトープが、配列 GSTLRG（配列番号 1）を含むポリペプチドである、T 細胞を拡張及び／または活性化する方法を提供する。実施形態では、aAPC は、TCR エピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片に結合する。実施形態では、aAPC は、TCR の前記エピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片を発現するための発現構築物を含む。実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、立体配置特異的な方法で - TCR と関与し、複数の T 細胞エピトープ特異性を介した認識を通じて、ポリクローナル T 細胞応答を誘発する。

【0202】

本明細書において開示された T 細胞を拡張及び／または活性化する方法では、実施形態では、抗体または抗原結合断片は、本明細書において開示された抗 TCR 抗体である。例えば、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 に少なくとも 95% または 100% 同一である HCDR1；配列番号 3 に少なくとも 95% 同一である HCDR2；CAYL（配列番号 22）に同一である HCDR3 を含む。さらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 9 に少なくとも 95% または 100% 同一である LCDR1；配列番号 5 に少なくとも 95% または 100% 同一である LCDR2；配列番号 10 に少なくとも 95% 同一である LCDR3 を含む。さらに、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 に少なくとも 95% または 100% 同一である HCDR1；配列番号 3 に少なくとも 95% または 100% 同一である HCDR2；CAYW（配列番号 23）に同一である HCDR3 を含む。

【0203】

本明細書において開示された T 細胞を拡張及び／または活性化する方法では、実施形態では、抗体または抗原結合断片は、本明細書において開示された抗 TCR 抗体である。例えば、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 9 に少なくとも 95% または 100% 同一である LCDR1；配列番号 5 に少なくとも 95% または 100% 同一である LCDR2；配列番号 10 に少なくとも 95% または 100% 同一である LCDR3 を含む。実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 に少なくとも 95% または 100% 同一である LCDR1；配列番号 5 に少なくとも 95% または 100% 同一である LCDR2；配列番号 10 に少なくとも 95% または 100% 同一である LCDR3 を含む。さらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 15 に少なくとも 95% または 100% 同一である HCDR1；配列番号 16 に少なくとも 95% または 100%

10

20

30

40

50

同一である H C D R 2 ; C R Y W (配列番号 1 7) に同一である H C D R 3 を含む。さらなる実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 1 8 に少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一である L C D R 1 ; 配列番号 5 に少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一である L C D R 2 ; 配列番号 6 に少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一である L C D R 3 を含む。

【 0 2 0 4 】

本明細書において開示された T 細胞を拡張及び / または活性化する方法では、実施形態では、抗体または抗原結合断片は、本明細書において開示された抗 T C R 抗体である。例えば、抗体または抗原結合断片は、リンカーにより分離される V H 及び V L ドメインを含む。実施形態では、抗体または抗原結合断片は、膜貫通ドメイン (例えば、h C D a l p h a (配列番号 2 5)) をさらに含む。本明細書において開示された T 細胞を拡張及び / または活性化する方法では、実施形態では、抗体または抗原結合断片は、本明細書において開示された抗 T C R 抗体である。例えば、V H は、配列番号 1 1、配列番号 1 3 及び配列番号 1 9 からなる群から選択されるポリペプチドに少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、V L は、配列番号 1 2、配列番号 1 4 及び配列番号 2 0 からなる群から選択されるポリペプチドに少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである。実施形態では、V H は、配列番号 1 1 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L は、配列番号 1 2 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである。さらなる実施形態では、V H は、配列番号 1 3 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L は、配列番号 1 2 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである。さらなる実施形態では、V H は、配列番号 1 1 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L は、配列番号 1 4 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである。さらなる実施形態では、V H は、配列番号 1 9 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドであり、前記 V L は、配列番号 2 0 に少なくとも 9 0 % 同一であるポリペプチドである。

【 0 2 0 5 】

本発明のある特定の態様では、一次 T 細胞の刺激は、本発明の抗 T C R 可溶性抗体または抗原結合断片を培養中で使用することで達成される。他の態様では、持続的な活性化は、I L - 2、I L - 7、I L - 1 5、または I L - 2 1 などの T 細胞成長促進サイトカインの存在下で、本発明の可溶性抗 T C R 抗体または抗原結合断片を介して T 細胞の T C R を関与させることで行われる。他の態様では、T 細胞は、支持体 (例えば、磁気ビーズ / ポリスチレン表面) を通じて、または照射された K 5 6 2 フィーダー細胞などの細胞を通じて、T C R リガンドの一定の関与によって数値的に拡張される。培養条件及びリガンド提示モードを変化させて、活性化及び刺激に影響を与え、T 細胞の数値拡張をもたらす。

【 0 2 0 6 】

X I . 治療用抗 T C R 抗体を用いた処置方法

本発明はまた、処置を必要とする動物において、自己免疫疾患もしくは T 細胞白血病もしくは T 細胞リンパ腫を処置し、または同種異系移植片 (骨髄または固形臓器) の拒絶を防止 / 制御する方法を提供する。本方法は、本発明の抗 T C R 抗体及び / または抗原結合断片を可溶性タンパク質、抗体の一部として、または、配列 G S T L R G (配列番号 1) を含む T C R ポリペプチドを標的にするキメラ抗原受容体 (C A R) を含む宿主細胞標的として動物に投与することを含む。実施形態では、宿主細胞は、内因性アルファベータ T C R の発現を防止するように操作されている N K またはガンマデルタ T 細胞または T 細胞である。

【 0 2 0 7 】

C A R は、典型的には、抗原認識のための細胞外抗体由来一本鎖可変ドメイン (s c F v) からなり、膜貫通ドメイン及び、T 細胞活性化のための C D 3 を含む細胞内シグナル伝達ドメイン (複数可) に連結したフレキシブルリンカーによってつながっている。通常、T 細胞がインビボで活性化される場合、T 細胞は、サイトカイン (すなわち、I L - 2 及び I L - 2 1) の産生を誘発する C D 2 8 から二次共刺激シグナル伝達による T C R シ

グナルを誘発させた一次抗原を受けて、自己分泌／傍分泌様式でシグナル伝達ループにフィードバックされる。これを考慮して、CARは、CD28細胞質シグナル伝達ドメイン、または4-1BBシグナル伝達ドメインなどの他の共刺激分子シグナル伝達ドメインを含むことができる。キメラCD28共刺激は、抗アポトーシス分子の上方調節及びIL-2の産生、ならびに末梢血単核球細胞(PBMC)に由来するT細胞の拡張によって、T細胞持続性を改善させる。

【0208】

1つの実施形態では、CARは、膜貫通ドメインとCD3ゼータエンドドメインに融合したモノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片(scFv)の融合体である。そのような分子は、その標的のscFvによる認識に応答して、ゼータシグナルの伝達をもたらす。

10

【0209】

実施形態では、CARは、エクストドメイン(細胞外)、膜貫通ドメイン、及びエンドドメイン(細胞内)を有してもよい。CARエクストドメインの1つの実施形態では、シグナルペプチドは、新生タンパク質を小胞体に向かわせる。これは、例えば、受容体がグリコシル化されかつ細胞膜に固定されるべきである場合には必須である。任意の真核生物シグナルペプチド配列は、機能的であると考えられる。一般的に、大部分のアミノ末端成分に天然に付着したシグナルペプチドが用いられる(例えば、軽鎖-リンカー-重鎖という配向を有するscFvでは、軽鎖の天然シグナルが用いられる)。使用することができる例示的なシグナルペプチドとしては、免疫グロブリン由来のシグナルペプチド、CD3、CD3、CD8アルファ(CD8a)、及びCD28が挙げられる。

20

【0210】

抗原認識ドメインは、scFvであってもよい。しかしながら、代替物が存在し得る。天然T細胞受容体(TCR)アルファ及びベータ一本鎖由来の抗原認識ドメインは、単純なエクストドメイン(例えば、HIV感染細胞を認識するCD4エクストドメイン)、及び(サイトカイン受容体を所持する細胞の認識につながる)、ならびに連結された、例えば、サイトカインなどの他の認識成分を有するものとして記載されている。所与の標的に高親和性で結合するほぼ何もかもを、抗原認識領域として用いることができる。さらなる態様では、scFvは、配列番号7、11、13、19、20、8、12、14、19、及び/または20に由来することができる。さらなる態様では、scFvは、各々の場合に、リンカーにより必要に応じて分離される、配列番号7及び8；配列番号11及び12；配列番号13及び14；または配列番号19及び20を含む。さらに別の態様では、scFvは、配列番号2、3、21、4、5、及び/または6；配列番号2、3、22、9、5及び/または10；配列番号2、3、23、9、5及び/または10；配列番号2、3、22、4、5及び/または10；または配列番号15、16、17、18、5及び/または6を含む。

30

【0211】

一般的に、CARは、二量体化形態で存在し、細胞外scFv(VLに連結したVH)領域、ストークドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達モチーフを連結する融合タンパク質として発現される。第一世代CARのエンドドメインは、CD3-シグナル伝達を介してT細胞活性化のみを誘発する。第二世代CARは、CD3-及びCD28、または4-1BBもしくはOX40などの他のエンドドメインを介して活性化シグナル伝達を提供する。第三世代CARは、CD28、4-1BB、またはOX40などの3つのシグナル伝達モチーフの、CD3-を含有する組み合わせを介してT細胞を活性化する。

40

【0212】

実施形態では、CARのエクストドメインと膜貫通ドメインの間に、ストークドメインが組み込まれる。本明細書で使用する場合、「ストークドメイン」という用語は、一般的に、膜貫通ドメインを、ポリペプチド鎖中のscFvまたは細胞質ドメインのいずれかに連結するように機能する任意のオリゴヌクレオチドまたはポリペプチドを意味する。ストークドメインは、Fcヒンジなどのフレキシブルヒンジ、及び必要に応じて、Fcの1つまた

50

は2つの定常ドメインを含むことができる。

【0213】

本発明の態様では、抗TCR抗体またはその抗原結合断片の配列を使用して、免疫細胞の特異性または結合を向け直す。例えば、抗TCR本発明の抗体または抗原結合断片の抗原結合配列を使用して、免疫細胞上で発現する場合に、前記免疫細胞の特異性または結合を向け直すように使用することができる膜結合型タンパク質を生成する。

【0214】

さらなる実施形態では、本発明は、(a)配列GSTLRG(配列番号1)を含むTCRポリペプチドを標的にする抗体またはその抗原結合断片、及び(b)腫瘍関連抗原を標的にする少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片を含む多重特異性T細胞エンゲージャーを動物に投与することを含む、処置を必要とする動物における癌または病原体による感染などの疾患を処置する方法を提供する。配列GSTLRG(配列番号1)を含むTCRポリペプチドを標的にする例示的な抗体またはその抗原結合断片は、scFvである。腫瘍関連抗原を標的にする例示的な抗体またはその抗原結合断片は、scFvである。例示的な多重特異的T細胞エンゲージャーは、TCRポリペプチドを標的にするscFv、ならびに腫瘍関連抗原を標的にするscFvを含む二重特異性T細胞エンゲージャーである。三重特異性T細胞エンゲージャーは、例えば、TCRポリペプチドを標的にするscFv、及び腫瘍関連抗原を標的にする第1及び第2のscFvを含む。さらなる態様では、この実施形態におけるTCRポリペプチドを標的にするscFvは、配列番号7、8、11、12、13、14、19、及び/または20を含む。さらなる態様では、scFvは、配列番号7及び8；配列番号11及び12；配列番号13及び14；または配列番号19及び20を含み、各々の場合に、配列は、リンカーにより必要に応じて分離される。さらに別の態様では、scFvは、配列番号2、3、21、4、5、及び/または6；配列番号2、3、22、9、5及び/または10；配列番号2、3、23、9、5及び/または10；配列番号2、3、22、4、5及び/または10；または配列番号15、16、17、18、5及び/または6を含む。

【0215】

他の実施形態では、配列GSTLRG(配列番号1)を含むTCRポリペプチドを標的にする例示的な抗体またはその抗原結合断片は、腫瘍抗原に結合して、可溶性の組換え「バインダー」を生成する他のscFvまたはタンパク質と組み合わせてもよい。腫瘍に關与する際、バインダーは、TCRの架橋によってT細胞を活性化し、増殖、サイトカイン産生、及び殺傷などのT細胞のエフェクター機能を活性化することができる。

【0216】

本発明の処置方法において、ある特定の態様では、処置を必要とする動物は、ヒトである。

【0217】

ある特定の実施形態では、多重特異的T細胞エンゲージャーは、腫瘍関連抗原または病原体特異的抗原結合ドメインを標的にする抗体またはその抗原結合断片を含み、デクチン-1などのパターン認識受容体によって認識される炭水化物抗原を含む。腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞の細胞表面上に発現される限り、いかなる種類の抗原であってもよい。腫瘍関連抗原の例示的な実施形態として、CD19、CD20、癌胎児性抗原、アルファフェトプロテイン、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮腫瘍抗原、メラノーマ関連抗原、変異p53、変異rasなどが挙げられる。

【0218】

ある特定の実施形態では、HA-1、サバイピン、WT1、及びp53などの細胞内腫瘍関連抗原を標的化してもよい。これは、HLAとの関連で細胞内腫瘍関連抗原から記述された処理されたペプチドを認識するユニバーサルT細胞上で発現されたscFvによって達成することができる。さらに、ユニバーサルT細胞は、HLAとの関連で細胞内処理された腫瘍関連抗原を認識するT細胞受容体ペアを発現するように遺伝的に改変されてもよい。ある特定の実施形態では、少量の腫瘍関連抗原がある場合に、T細胞は、膜結合型サ

10

20

30

40

50

イトカインと共発現し、持続性を改善することができる。例えば、C A Rは、膜結合型 I L - 1 5 と共発現することができる。

【 0 2 1 9 】

実施形態では、本発明の抗 T C R 抗体及び抗原結合断片は、例えば、T細胞を過剰に活性化させることで、これらを必要とする対象における免疫系をインビボで抑制し、T細胞及び免疫抑制の損失につながる。例えば、臓器、骨髄、及び幹細胞移植は、生活の質を改善し、生存を延ばすことができる。しかしながら、移植された組織の拒絶には、様々な手段による免疫系の抑制を必要とする。従って、本発明は、抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片を、それを必要とする患者に投与することを含む、免疫系を抑制する方法を提供する。実施形態では、本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片を、静脈 (I V) 注射を介して、1日1回、1日2回または1日3回で2 ~ 2 1 日間、1 ~ 2 0 m g / 日の用量で、それを必要とする患者に投与する。実施形態では、本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片を、I V 注射を介して、1日1回で5 ~ 1 5 日間、5 ~ 1 0 m g / 日の用量で、それを必要とする患者に投与する。実施形態では、本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片を、I V 注射を介して、1日1回で1 0 ~ 1 4 日間、5 m g / 日の用量で、それを必要とする患者に投与する。

10

【 0 2 2 0 】

さらなる実施形態では、T細胞をインビボで活性化し、及び/または抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 及び補体依存性細胞傷害 (C D C) などのエフェクター機能をインビボで活性化する治療方法において、本発明の抗 T C R 抗体及び抗原結合断片を、これらを必要とする対象に投与する。実施形態では、本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片を、静脈 (I V) 注射を介して、1日1回、1日2回または1日3回で2 ~ 2 1 日間、1 ~ 2 0 m g / 日の用量で、それを必要とする患者に投与する。実施形態では、本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片を、I V 注射を介して、1日1回で5 ~ 1 5 日間、5 ~ 1 0 m g / 日の用量で、それを必要とする患者に投与する。実施形態では、本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片を、I V 注射を介して、1日1回で1 0 ~ 1 4 日間、5 m g / 日の用量で、それを必要とする患者に投与する。

20

【 0 2 2 1 】

X I I . 薬学的組成物及び投与方法

抗 T C R 結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を調製する方法、及びこれらを必要とする対象に投与する方法は当業者に周知であるか、当業者によって容易に決定される。抗 T C R 結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体の投与経路は、例えば、経口経路、吸入による非経口経路、または局所経路でもよい。本明細書で使用する非経口という用語は、例えば、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、または腔投与を含む。これらの全ての形の投与がはっきりと本発明の範囲内と意図されるが、投与の形の一例は、注射用溶液、特に、静脈内または動脈内の注射用または点滴用の溶液であろう。通常、注射に適切な薬学的組成物は、緩衝液 (例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、またはクエン酸緩衝液)、界面活性剤 (例えば、ポリソルベート)、任意で、安定剤 (例えば、ヒトアルブミン) などを含んでもよい。しかしながら、本明細書における開示と適合した他の方法では、抗 T C R 結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を有害細胞集団の部位に直接送達し、それによって、治療剤への罹患組織の曝露を高めることができる。

30

40

【 0 2 2 2 】

本明細書において議論したように、T C R 発現細胞を介した疾患、例えば、ある特定のタイプの癌、自己免疫疾患、中枢神経系 (C N S) 炎症疾患及び末梢神経系 (P N S) 炎症疾患を含む炎症疾患、ならびに浸潤性血管形成をインビボで処置するために、抗 T C R 結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は薬学的に有効な量で投与することができる。これに関して、開示された本発明の結合分子は、投与を容易にし、活性物質の安定性を促進するように処方されることが理解されるだろう。

50

好ましくは、本発明による薬学的組成物は、薬学的に許容される、無毒で、無菌の担体、例えば、生理食塩水、無毒の緩衝液、防腐剤などを含む。本発明の用途のために、結合された、または結合されていない、抗 T C R 結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体の薬学的に有効な量とは、標的と効果的に結合し、利益を得るのに十分な量、例えば、疾患もしくは障害の症状を寛解するのに十分な量、または物質もしくは細胞を検出するのに十分な量を意味するとみなされるものとする。

【0223】

本発明において用いられる薬学的組成物は、例えば、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えば、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ろう、ポリエチレン - ポリオキシプロピレン - ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、及び羊毛脂を含む、薬学的に許容される担体を含む。

【0224】

非経口投与用の調製物には、無菌の水溶液または非水溶液、懸濁液、及びエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えば、オリーブ油、及び注射用有機エステル、例えば、オレイン酸エチルである。水性担体には、例えば、食塩水及び緩衝化培地を含む、水、アルコール溶液 / 水溶液、エマルジョン、または懸濁液が含まれる。本発明において、薬学的に許容される担体には、0.01 ~ 0.1 M、好ましくは 0.05 M のリン酸緩衝液または 0.8 % 食塩水が含まれるが、これに限定されない。他の一般的な非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンガー液デキストロース (Ringer's dextrose)、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液、または不揮発性油が含まれる。静脈内ビヒクルには、体液補充薬及び栄養分補充薬、電解質補充薬、例えば、リンガー液デキストロースをベースとするものなどが含まれる。防腐剤及び他の添加剤、例えば、殺菌剤、抗酸化物質、キレート剤、及び希ガスなども存在してもよい。

【0225】

さらに具体的には、注射使用に適した薬学的組成物には、滅菌した水溶液 (水溶性の場合) または分散液、及び滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌散剤が含まれる。このような場合、組成物は滅菌されていなければならず、容易な注射可能性が存在する程度まで液状であるべきである。これは製造及び保存の条件下で安定でなければならず、好ましくは、細菌及び菌類などの微生物の汚染作用を防ぐように保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、ならびにその適切な混合物を含有する溶媒または分散媒でもよい。例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合では必要とされる粒径を維持することによって、及び界面活性剤を使用することによって適切な流動性を維持することができる。本明細書において開示された治療方法において使用するのに適した製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980) に記載されている。

【0226】

微生物の活動は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって阻止することができる。多くの場合、等張性の剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。注射用組成物の長期吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に含めることによって可能になる。

【 0 2 2 7 】

どのような場合でも、必要とされる量の活性化化合物（例えば、抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体それ自体、または他の活性物質との組み合わせ）を単独で、または必要に応じて本明細書において列挙された成分の 1 つまたは組み合わせと適切な溶媒に溶解して組み込み、その後ろに濾過滅菌することによって、滅菌注射液を調製することができる。一般的に、分散液は、活性化化合物を、基本分散媒及び前記で列挙された成分に由来する必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌散剤の場合、好ましい調製方法は真空乾燥及び凍結乾燥である。真空乾燥及び凍結乾燥によって、活性成分と任意のさらなる望ましい成分の予め濾過滅菌された溶液から、活性成分と任意のさらなる望ましい成分の散剤が得られる。注射用の調製物は加工され、アンプル、バック、瓶、注射器、またはバイアルなどの容器に入れられ、当該技術分野において公知の方法に従って無菌条件下で密封される。さらに、調製物は、キット、例えば、米国特許公開第 2 0 0 2 / 0 1 0 2 2 0 8 号に記載のキットの形で包装及び販売されてもよい。このような製造品には、好ましくは、関連した組成物が、疾患もしくは障害に罹患している、または疾患もしくは障害の素因のある対象の処置に有用なことを示すラベルまたは添付文書があるだろう。

10

【 0 2 2 8 】

非経口製剤は単一ボーラス量でもよく、注入でもよく、または負荷ボーラス量の後に維持量が続いてもよい。これらの組成物は、特定の決まった間隔で、または変化する間隔で、例えば、1 日に 1 回、または「必要に応じて」投与されてもよい。

20

【 0 2 2 9 】

本発明において用いられるある特定の薬学的組成物は、例えば、カプセル、錠剤、水性懸濁液、または溶液を含む許容可能な剤形にして経口投与することができる。ある特定の薬学的組成物はまた、鼻用エアゾール剤または吸入によって投与することもできる。このような組成物は、ベンジルアルコールもしくは他の適切な防腐剤、バイオアベイラビリティを高める吸収促進剤、及び/または他の従来の可溶化剤もしくは分散剤を用いて食塩水に溶解した溶液として調製されてもよい。

【 0 2 3 0 】

担体材料と組み合わせる 1 つの剤形を生成することができる、抗 T C R 結合分子、例えば、抗体またはその断片、変種、または誘導体の量は、処置される宿主及び特定の投与方法に応じて異なるだろう。組成物は、単回投与、複数回の投与として、または注入中に所定の期間にわたって投与することができる。望ましい最適の応答（例えば、治療応答または予防応答）が得られるように、投与計画も調整することができる。

30

【 0 2 3 1 】

本開示の範囲に合わせて、上述の処置方法に従って、治療効果を生じるのに十分な量の本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体をヒトまたは他の動物に投与することができる。本発明の抗 T C R 抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体は、公知の技法に従って、本発明の抗体と従来の薬学的に許容される担体または希釈剤とを組み合わせることによって調製された従来の剤形にして、このようなヒトまたは他の動物に投与することができる。薬学的に許容される担体または希釈剤の形及び特徴は、組み合わせられる活性成分の量、投与経路、及び他の周知の変数によって決まることが当業者に認識されるだろう。さらに、当業者であれば、抗 T C R 結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体の 1 つ以上の種を含むカクテルが特に有効であると判明することがあることを理解するだろう。

40

【 0 2 3 2 】

「治療に有効な用量または量」または「有効量」とは、投与された時に、処置しようとする疾患を有する患者の処置に関して正の治療応答をもたらす、抗 T C R 結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片の量を意味する。

【 0 2 3 3 】

T C R 発現細胞を介した疾患、例えば、ある特定のタイプの癌、例えば、頭頸部癌、前立

50

腺癌、結腸癌、乳癌、及び肺癌；自己免疫疾患、例えば、関節炎、多発性硬化症、中枢神経系（ＣＮＳ）炎症疾患及び末梢神経系（ＰＮＳ）炎症疾患を含む炎症疾患；ならびに浸潤性血管形成を処置するための、本発明の組成物の治療に有効な用量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか動物であるか、投与される他の薬物療法、及び処置が予防であるか治療であるかを含めて多くの異なる要因に左右される。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含む非ヒト哺乳動物も処置することができる。安全性及び効力を最適化するために、当業者に公知の日常的な方法を用いて処置投与量を滴定することができる。

【 0 2 3 4 】

投与しようとする少なくとも１つの抗ＴＣＲ結合分子、例えば、抗体またはその結合断片の量は、本発明の開示があれば過度の実験なく当業者によって容易に求められる。投与モード、及び少なくとも１つの抗ＴＣＲ結合分子、例えば、抗体、その抗原結合断片、変種、または誘導体のそれぞれの量に影響を及ぼす要因には、疾患の重篤度、病歴、ならびに療法を受けている個体の年齢、身長、体重、健康状態、及び身体状態が含まれるが、これに限定されない。同様に、投与しようとする抗ＴＣＲ結合分子、例えば、抗体またはその断片、変種、もしくは誘導体の量は、投与モード、及び対象がこの剤の単回投与または複数回投与を受けるかどうかによって左右されるだろう。

【 0 2 3 5 】

本発明はまた、例えば、関節炎、多発性硬化症、ＣＮＳ炎症疾患及びＰＮＳ炎症疾患、または癌を含む、自己免疫疾患及び／または炎症疾患を処置するための医薬の製造における、抗ＴＣＲ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体の使用も提供する。

【 0 2 3 6 】

本発明はまた、自己免疫疾患及び／または炎症疾患を処置するために対象を処置するための、または癌を処置するための医薬の製造における、抗ＴＣＲ結合分子、例えば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体の使用も提供する。ここで、医薬は、少なくとも１つの他の療法によって前処置されている対象において用いられる。「前処置された」または「前処置」とは、対象が、抗ＴＣＲ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を含む医薬を受ける前に、１つ以上の他の療法を受けている（例えば、少なくとも１つの他の癌療法によって処置されている）ことを意図する。「前処置された」または「前処置」とは、対象が、抗ＴＣＲ結合分子、例えば、本明細書において開示されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を含む医薬を用いた処置が開始する前、２年以内に、１８ヶ月以内に、１年以内に、６ヶ月以内に、２ヶ月以内に、６週間以内に、１ヶ月以内に、４週間以内に、３週間以内に、２週間以内に、１週間以内に、６日以内に、５日以内に、４日以内に、３日以内に、２日以内に、さらには１日以内に、少なくとも１つの他の療法によって処置されていることを含む。対象が、以前の療法を用いた前処置に対するレスポンドであったことは必要でない。従って、抗ＴＣＲ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を含む医薬が与えられる対象は、以前の療法を用いた前処置、または前処置が複数の種類の療法を含んでいた場合、以前の療法の１つ以上に応答していてもよく、または応答していなくてもよい（例えば、癌は難治性であった）。抗ＴＣＲ結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体を含む医薬を受ける前に、対象が前処置を受けていてもよい他の癌療法の例には、外科手術；放射線療法；化学療法、任意で、自己由来骨髄移植と組み合わせた化学療法、この場合、適切な化学療法剤には、本明細書において前記で列挙された化学療法剤が含まれるが、これに限定されない；他の抗癌モノクローナル抗体療法；本明細書において前記で列挙された低分子を含むが、これに限定されない、低分子に基づく癌療法；ワクチン／免疫療法に基づく癌療法；ステロイド療法；他の癌療法；またはその任意の組み合わせが含まれるが、これに限定されない。本発明の実施は、特段の記載がない限り、当業者の技術の範囲内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子組換え生物学、微生物学、組換えＤＮＡ、及び免疫学の従来の

10

20

30

40

50

技術を利用することになる。このような技術は、文献に十分に説明されている。例えば、Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D.N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. 米国特許第4,683,195号; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 及び in Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) を参照されたい。

【0237】

抗体工学の一般的な原理は、Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press) に示されている。タンパク質工学の一般的な原理は、Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) に示されている。抗体及び抗体 - ハプテン結合の一般的な原理は、Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 及び Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.) に示されている。さらに、一般的に、*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 及び Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (WIT. Freeman and Co., NY) のように、当該技術分野において公知であり、具体的に述べられていない免疫学における標準的な方法に従う。

【0238】

免疫学の一般的な原理を示している標準的な参考文献には、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunology (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press) が含まれる。

10

20

【0239】

前記で引用された全ての参考文献ならびに本明細書において引用された全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【実施例】

30

【0240】

III. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様を説明するために含められる。後に続く実施例に開示された技術は、発明者が発明の実施に十分に機能すると見出した技術を示し、その実施に好ましいモードを構成するものと考えられ得ることを当業者により認識されるべきである。しかしながら、当業者は、本開示を踏まえて、開示された具体的実施態様において多くの変更がなし得ること、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく同様なまたは類似の結果が得られることを認識するべきである。

【0241】

実施例1 - T細胞のエキスピボ生成及び分析

40

ハイブリドーマ - CD1Dノックアウトマウスを、mCD8aに融合したTCR不変鎖 (ICVVS DRGSTLGRL) をコードする融合タンパク質を発現するマウスL - 線維芽細胞で免疫化した。ハイブリドーマクローンは、PEG - 1500を用いた標準的な細胞融合法を介して生成された。不変鎖エピトープに特異的な抗体クローンは、免疫原を発現するL細胞上のスクリーニング後に選択された。正極バインダーは、100 ngの遊離ペプチドで被覆された間接ELISAによって、免疫原を表す合成ペプチドで確認された (図1A)。最も高いOD450をもつ最良のバインダー79Aをさらなる分析用に選択した。

【0242】

抗体生成及び特徴付け - TCR Va24 - Ja18ジャンクション (アミノ酸配列: GS

50

T L G R (配列番号 1)) に向かって狭い直鎖エピトープ特異性をもち、T C R - C D R 3 鎖に向かって明らかな立体配置特異性をもたないモノクローナル抗体 (クローン 7 9 A) を、抗体モデリング及び親和性改善のために選択した。抗体クローン 7 9 A の特異性は、直鎖ペプチドの E L I S A によってチェックし、a l a - ペプチドライブラリー、またフローサイトメトリー分析によっても確認された (図 1 B ~ 1 D) 。

【 0 2 4 3 】

結合アッセイ - 結合アッセイは、V a 2 4 - J a 1 8 領域にわたって直鎖ペプチド配列で被覆された固相 E L I S A 上で行った (図 1 B) 。フローサイトメトリーは、一次抗体として 7 9 A または変異体抗体、及び検出用のマッチした蛍光共役二次抗体 (抗マウス F a b P E または抗ヒトガンマ F c P E や G F a b ポリクローナルのいずれか) を用いて、P B M C 由来の生 C D 3 + T 細胞で実施した (図 1 E) 。ウエスタンブロットは、S D S - P A G E 上で分解した全細胞溶解 (P B M C 、 T 細胞のいずれか) から単離された変性タンパク質で行った。

【 0 2 4 4 】

V 遺伝子増幅及び s c F v 生成 - 直鎖エピトープ G S T L G R (配列番号 1) に特異的なクローン 7 9 A を s c F v 生成のために選択した。抗体 V 遺伝子は、5 ' プライマー用のマウス V H F R 1 と 3 ' プライマー用の I g 定常領域の縮退プライマーの標準混合を伴う P C R によって、7 9 A c D N A から増幅した (図 2) (W a n g , Z . , R a i f u , M . , H o w a r d , M . , S m i t h , L . , H a n s e n , D . , G o l d s b y , R . a n d R a t n e r , D . (2 0 0 0) U n i v e r s a l P C R a m p l i f i c a t i o n o f m o u s e i m m u n o g l o b u l i n g e n e v a r i a b l e r e g i o n s : t h e d e s i g n o f d e g e n e r a t e p r i m e r s a n d a n a s s e s s m e n t o f t h e e f f e c t o f D N A p o l y m e r a s e 3 ' t o 5 ' e x o n u c l e a s e a c t i v i t y . J o u r n a l o f i m m u n o l o g i c a l m e t h o d s , 2 3 3 , 1 6 7 - 1 7 7) 。正しいサイズの V H / V L アンプリコンが、アガロースゲル電気泳動によって検証された。P C R 増幅した V 遺伝子産物をアガロースゲルから切り取り、ゲル精製キット (Q i a g e n) によって精製し、製造者の指示に従って P C R 産物を T O P O ベクターにクローニングした。抗体遺伝子のシークエンシングは、T 3 / T 7 または M 1 3 F 、 M 1 3 R プライマー (M D A n d e r s o n D N A S e q u e n c i n g C o r e) のいずれかを用いて、サンガーシークエンシング法によって行った。少なくとも 4 つのクローンを使用して、N C B I B L A S T 上に V H 及び V L のコンセンサス配列を得た。抗体 C D R は、I M G T / V - Q u e s t ソフトウェア (i m g t . o r g / I M G T _ v q u e s t / v q u e s t で の ワー ル ド ・ ワ イ ド ・ ウェブ で 入 手 可 能) の 助 け を 借 り て 分 析 し た コ ン セ ン サ ス V H ま た は V L 配 列 を 用 い て 同 定 し た 。 (G i u d i c e l l i , V . , C h a u m e , D . a n d L e f r a n c , M . P . (2 0 0 4) I M G T / V - Q U E S T , a n i n t e g r a t e d s o f t w a r e p r o g r a m f o r i m m u n o g l o b u l i n a n d T c e l l r e c e p t o r V - J a n d V - D - J r e a r r a n g e m e n t a n a l y s i s . N u c l e i c a c i d s r e s e a r c h , 3 2 , W 4 3 5 - 4 4 0) 。 C D R 位 は 、 V - B a s e (v b a s e 2 . o r g で の ワー ル ド ・ ワ イ ド ・ ウェブ で 入 手 可 能) と 名 付 け ら れ た 別 の ソ フ ト ウェア によ っ て さ ら に 確 認 さ れ た 。

【 0 2 4 5 】

分子モデリング及びドッキング - 抗体ホモロジーモデリング及びドッキングを使用して、T C R アルファ鎖不変領域に向かって直鎖エピトープ特異性をもつ抗体 (7 9 A) C D R 中の残基のエネルギー寄与を試験した。P a r a t o m e サーバー (図 3 A) によって 7 9 A s c F v 配列に A B R 分析を施し、V H 及び V L 領域における C D R 残基の正しい位置決めが確認された。抗体ホモロジーモデルは、W A M サーバー (W h i t e l e g g , N . R . a n d R e e s , A . R . (2 0 0 0) W A M : a n i m p r o v e d a l g o r i t h m f o r m o d e l l i n g a n t i b o d i e s o n t h e

10

20

30

40

50

WEB . Protein engineering , 13 , 819 - 824) 及び SWISS - MODEL によって開発した (図 3 B) 。 SWISS - MODEL (Biasini , M . , Bienert , S . , Waterhouse , A . , Arnold , K . , Studer , G . , Schmidt , T . , Kiefer , F . , Cassarino , T . G . , Bertoni , M . , Bordoli , L . et al . (2014) SWISS - MODEL : modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information . Nucleic acids research , 42 , W252 - 258) を適用して、A79 がその重鎖中に非常に短い CDR3 を含有する際に VH ドメインを構築した。最終抗体モデル構造の品質は、PROCHECK でチェックした。79A 及び TCR - モデル (PDB 供給源) を ZDOCK サーバー上で使用して、ドッキングモデル (図 3 A 、 3 B 、 3 C) を作製した。モデルでは、ラマチャンドラプロットの最優遇領域または寛容な領域に位置したアミノ酸残基のパーセントは、99.4 % であった。A79 及び TCR のドッキングモデル [プロテインデータバンク (PDB) ID コード 1KGC4] は、ZDOCK サーバーで構築された (図 3 D) (Pierce , B . G . , Wiehe , K . , Hwang , H . , Kim , B . H . , Vreven , T . and Weng , Z . (2014) ZDOCK server : interactive docking prediction of protein - protein complexes and symmetric multimers . Bioinformatics (Oxford , England) , 30 , 1771 - 1773) 。ドッキングモデルの分析では、Fold X の経験的力場を適用した。Fold X の複合体「Ala スキャン」機能を使用して、結合親和性を増加させるように潜在的に変異させることができたアミノ酸残基を同定した。変異型 A79 モデルは、「モデル構築」機能を用いて生成した。相互作用エネルギー (G) の変化は、* ($G = G_{MU} - G_{WT}$) として算出した後、それを使用して、同族受容体に向かう (抗体結合領域の CDR における) 関連 AA のエネルギー寄与を定義した。総エネルギーは、変異体の結合エネルギー - 野生型の結合エネルギーとして定義した。

【0246】

Fold X ソフトウェアの複合体 - ALA - スキャン機能を使用して、潜在的なアミノ酸 (AA) 残基を同定した。その結果、TCR - アルファ鎖に向かう 79A CDR の親和性強化が可能になった (図 4 A 、 4 C) 。

【0247】

分子構築物及び抗体発現カセット - (切断型 IgG1 - Fc に融合した A79 変異型 scFv をコードする) 組換え抗体発現ベクターの概略図、すなわち、ベクター図を図 5 A 及び 5 B に提供する。簡単に言えば、抗体遺伝子発現カセットは、可変重鎖 (VH - 変種) 及び可変軽鎖 (VL - 変種) とフレーム結合した VH5 シグナルペプチドからなる。VH 及び VL を改変グリシンセリン G3S 配列によって連結し、A79 - scFv を生成した。4 つのこのような変種を作製した (S11 、 S13 、 S15 及び S23) 。4 つの変種のうち、G が改善した 2 つの異なるバージョン (S15 及び S23) を、機能性アッセイのために、全 IgG または K562 細胞表面上で発現された scFv のいずれかとして使用した。その後、A79 - scFv を切断型ヒト IgG1 - Fc 配列とフレームで融合した。変異体 A79 - scFv を表す cDNA は、遺伝原系生成物 (Geneart)) としてデノボ合成した後、プロモーターエレメントを SV40 ポリ A 尾部で終結した複製起点として、SV40 を含有するプラスミドバックボーンにクローニングした。指定された発現プラスミドを介して、哺乳動物細胞中の可溶性タンパク質として抗体を発現した。親和性精製 (プロテイン A) によって組織培養上清から分泌抗体を精製した後、PBS に透析した (pH 7.2) 。組換え抗体の純度を SDS - PAGE でチェックし、タンパク質濃度を BCA によって測定した (Thermoscientific) 。組換え抗体のアリコートは、使用するまで - 80 で凍結保存した。

【0248】

79A CDR中の部位特異的突然変異誘発は、変異型組換え抗体S15（一本鎖の親和性が最適化された新規の変異体15）の再フォーマット化をもたらし、これは、汎特異的TCRアルファ鎖への親和性及び立体配置特異的結合の改善を示した（図6A～6C）。ゲル電気泳動画像は、組換え変異体23（S23）のホモロジー及び純度を示す（図6D）。S15を用いて提供したさらなる結合データを図6Eに示す。

【0249】

K562 HLA C細胞上の組換え抗体S15のベクター設計及び表面発現 - 切断型CD8膜貫通（tCD8-TM）または切断型ヒトFc-tCD8-TMドメインのいずれかにS15配列を融合し（HAタグ有無（図7A））、共刺激リガンドC86、CD137L、及びIL15-15Raと一緒にK562細胞上で発現させた（図7B）。ベクター設計及び発現は、S23配列についても同様であった。

10

【0250】

細胞増殖アッセイ - 変異型scFvsを介したCD3複合体OKT3または - TCR関与を通じた刺激後の細胞の増殖を評価するため、CFSE色素希釈方法（CellTrace、ThermoFisher Scientific）を使用した。生細胞を（製造者のプロトコルに従って）5uMのCFSE色素と共にロードした後、OKT3、S15、S23を単独で、または10µg/mL濃度のCD28との組み合わせのいずれかで被覆されたポリスチレンプレート（Nunc）上に完全RPMI-1640培地（10% FBS、1xGlutamax、及びIL-2；50IU/mL IL-2）中で100万個の細胞/mLの密度で播種した。活性化細胞を1日目、2日目、及び6日目にサンプリングし、CFSE減少を定量化するためにフローサイトメトリー上で実施した。BD LSR-Fortessa上の適切なフィルターで、488nm励起でCFSE蛍光について生CD3+T細胞を分析した。T細胞の連続生成ごとの明確なピークとしてCFSE発現を示すヒストグラムとしてデータを表した（図7C及び7D）。CFSEをロードしたPBMCは、陽性対照として使用した。市販の抗CD28抗体は、T細胞シミュレーションのための実験抗体対照として使用した。

20

【0251】

K562操作された人工抗原提示細胞 - S15配列は、HAタグと一緒に切断型ヒトCD8膜貫通（tCD8TM）ドメインまたは切断型ヒトFc-tCD8TMドメインのいずれかに融合させた（図7A）。S15-tCD8TM-HAまたはS15-tCD8TM-tFc融合タンパク質を表すcDNAは、遺伝原系生成物（Geneart）として合成した。ゲートウェイ組換え法を用いて、S15は、HIV調節エレメント、ゲートウェイクロニング部位が隣接したIgカップリーダーペプチド配列を含有するプラスミドベクターpLV300にもどってクローン化した。293-METR細胞を、一過性発現のためにプラスミドでトランスフェクトした後、ウイルス粒子を培養から採取し、その後、Amicon超遠心分離濾過装置（Millipore）上で濃縮した。K562細胞をトランスフェクトし、CD86、CD137L、IL15-15RaなどのT細胞共刺激リガンドを発現させた。導入されたリガンドの表面発現は、CD86、CD137L、IL15-15Ra（BD）及びHA（Biolegend）の市販の抗体、または抗ヒトFc抗体（Life Tech）を用いて、フローサイトメトリーによって評価し、S15融合タンパク質を検出した。組換え抗体が共刺激の不在下でT細胞を刺激する有効性を評価するため、CD64を発現するようにK562細胞を操作した後、前述のように全抗体と共にロードした。

30

40

【0252】

K562-S15フィーダー細胞（AaPC）上のT細胞のエキスピボ増殖 - K562細胞を操作して、T細胞活性化が完全なエキスピボであるように、T細胞共刺激リガンドと一緒にS15またはその誘導体を発現させた。S15を単独で、または全抗体と共にロードした共刺激リガンドもしくはK562-CD64細胞と組み合わせて安定的に発現するK562細胞は、照射後にフィーダー細胞として使用した（図7B）。PBMCまたは臍帯血T細胞（UCB）由来の単核細胞を、IL-2（50IU/mL）と一緒に1：1の

50

比率で、操作された照射 K 5 6 2 と共培養させた。細胞を、K 5 6 2 - P B M C 共培養系で、7 日間隔で 2 回刺激した。生細胞をカウントすることで成長速度を監視した (N e x c e l o m (商 標) トリパンプルー色素排除) (図 7 C ~ 7 D)。免疫表現型は、拡張された T 細胞の特徴を確認するように完了した (図 7 E)。C D 3 + C D 5 6 n e g T 細胞集団の出現は、フローサイトメトリーによって評価した。絶対細胞数を監視して、異なる a A P C (K 5 6 2 細胞のみ、S 1 5 単独で / または共刺激リガンドと共に S 1 5 を有する K 5 6 2、抗 C D 3 m A b (O K T 3) 単独で / または共刺激と共に O K T 3 を有する K 5 6 2、または S 1 5、S 2 3、もしくは O K T 3 と共にロードした K 5 6 2 - C D 6 4) 上の細胞成長を推定した。エキスピボで拡張された T 細胞の免疫表現型検査を行い、マーカー関連の枯渇及びメモリー表現型を評価した (図 7 E 及び 7 F)。

10

【 0 2 5 3 】

フローサイトメトリー - B D L S R F o r t e s s a X - 2 0 を使用して、T 細胞のマルチパラメトリック免疫表現型分析を行った。簡単に言えば、健常なドナー P B M C またはエキスピボで培養した生 T 細胞を、2 % F B S と共に P B S を含有する冷却 F A C S 緩衝液で洗浄し、暗所で氷上にて 2 0 分間、蛍光色素結合抗体でインキュベートした。次に、細胞を F A C S 緩衝液で 2 回洗浄した後、生死染色用の固定可能生存可能色素で室温にて 5 分間インキュベートした。生細胞上でゲーティングを行い、ダンプチャネル上で単球 (C D 1 4 P o s) 及び B 細胞 (C D 1 9 P o s) を排除した。T 細胞を C D 3 P o s C D 5 6 n e g として同定した後、- T C R の発現、細胞分化 (C D 2 5、C D 6 9、C D 4 5 R A、及び C D 4 5 R O)、T h 表現型 (C D 2 9 4 及び C D 2 5)、及び枯渇 (P D 1、L A G 3、T I M 3、B L I M P) のマーカーを分析した。抗体希釈及び使用は、製造者のガイドラインに従って行った。マルチパラメーター分析の補償は、校正ビーズ (e B i o s c i e n c e) を用いて行った。補償データは、F l o w J o ソフトウェア V 1 0 によって分析し、ドットプロットとして表現した。各実験は、3 人以上のドナーで行った (図 7 G)。

20

【 0 2 5 4 】

高スループットディーブシークエンシングによる T C R レパートリー分析 - 活性化 T 細胞の V 遺伝子再構成は、T C R 遺伝子でコードされたヒト T C R - C D R 3 領域を標的にすることによって詳細に分析した (A d a p t i v e B i o t e c h n o l o g y のヒト T C R ディープレベルアッセイ)。アッセイは、合成免疫受容体の類似体を組み込んで、増幅バイアスを避けて、T C R B レパートリー I m m u S E Q T M ソフトウェアの定量化を正確にするために第 2 の P C R を含む、独自のマルチプレックス P C R プライマー、増幅ステップを伴う (R o b i n s , H . S . , C a m p r e g h e r , P . V . , S r i v a s t a v a , S . K . , W a c h e r , A . , T u r t l e , C . J . , K a h s a i , O . , R i d d e l l , S . R . , W a r r e n , E . H . a n d C a r l s o n , C . S . (2 0 0 9) C o m p r e h e n s i v e a s s e s s m e n t o f T - c e l l r e c e p t o r b e t a - c h a i n d i v e r s i t y i n a l p h a b e t a T c e l l s . B l o o d , 1 1 4 , 4 0 9 9 - 4 1 0 7 .)。結果を図 8 A ~ 8 B に示す。

30

【 0 2 5 5 】

エキスピボで繁殖された T 細胞の免疫レパートリーは、T C R - C D R 3 をコードする T C R 遺伝子の次世代ディーブシークエンシングによって評価した (h T C R ディープレベルアッセイ、A d a p t i v e B i o t e c h)。C D 3 + T 細胞 (P B M C 対照) またはエキスピボで拡張された T 細胞から単離されたゲノム DNA を T C R レパートリー分析に使用した。アッセイに使用した様々な A P C グループは、K 5 6 2 C - (未改変対照)、S 1 5 のみを発現する K 5 6 2 C -、共刺激分子 (C D 8 6、C D 1 3 7 L、及び I L 1 5 - 1 5 R a) と一緒に S 1 5 を発現する K 5 6 2 C -、O K T 3 (抗 C D 3 m A b)、及び共刺激分子 (C D 8 6、C D 1 3 7 L、及び I L 1 5 - 1 5 R a) と共にロードした K 5 6 2 C - であった。ベンダー提供キットで提供された独自のプライマー混合物を介した多重化によってアンプリコンを生成した (C a r l s o n , C . S . , E m

40

50

erson, R. O., Sherwood, A. M., Desmarais, C., Chung, M. W., Parsons, J. M., Steen, M. S., LaMadrid-Herrmannsfeldt, M. A., Williamson, D. W., Livingston, R. J. et al. (2013) Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. *Nature communications*, 4, 268). 2段階増幅プロセスは、合成免疫受容体の類似体をTCRレパートリーの不偏推定のために導入した場合に行った。(Robins, H. S., Campregher, P. V., Srivastava, S. K., Wachter, A., Turtle, C. J., Khasai, O., Riddell, S. R., Warren, E. H. and Carlson, C. S. (2009) Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alpha beta T cells. *Blood*, 114, 4099-4107)。TCRライブラリーは、Illumina miSEQプラットフォーム上で生成され、データは、標準的なQCチェック後にImmunoSEQアナライザーによって分析した(Adaptive Biotech)。免疫シーケンシングデータは、活性化T細胞の各群、ならびに操作していない健常なドナーPBMC T細胞から得られた。全てのデータは、操作の前後に比較した(一次T細胞対活性化T細胞)。TCRV遺伝子頻度、CDR3鎖長、対合遺伝子頻度を表すデータが報告された。トップクローン分布もまた、試料群内の個体クローンごとに占めるシーケンシングリードのパーセンテージに基づいて追跡した。散布図分析は、試料群ごとのクローンの出現頻度を推定するために提供した。シャノンエントロピーに対するクローン性スコア、ピアソン係数値(r^2)は、異なる戦略によって活性化されたT細胞の各群の間で起きているクローン重複を確かめるために算出した(操作していないドナーPBMC T細胞と比較した、S15対OKT3)(図8D)。

【0256】

議論 - 発明者らは、臨床品質のT細胞を生成するための、T細胞を活性化し、エキスピボで増殖する別の方法を説明している。スーパーアゴニスト抗CD28 mAbと一緒にCD3 特異的mAb OKT3を介したCD3複合体活性化とは対照的に、K562 - AaPCに繋ぎ止められた操作されたTCRアルファ鎖特異的組換え抗体断片を介した - TCR架橋によってT細胞を活性化した(活性化及び増殖細胞)。

【0257】

- TCR + T細胞への高親和性を有する、一本鎖の親和性が最適化された新規の変種15及び23(S15及びS23)を使用して、TCR架橋によって、培養中の一次T細胞を活性化し、繁殖させた。S15 - AaPC媒介T細胞活性化の成長速度及び表現型は、CD3 特異的OKT3 mAb刺激によって達成されたものと類似していた。

【0258】

活性化T細胞のゲノムDNAの高スループットディープシーケンシングにより、S15を介したTCR架橋によって、クローン集団の異なるV遺伝子再構成及び保存が明らかになった。分析により、機能性V遺伝子再構成の予期しないいずれの変化も免疫レパートリーのいずれのゆがみも示されなかった。TCR架橋を介して生成された + TCR + T細胞は、クローン集団の保存がエキスピボでの活性化及び増殖後に望ましい状況下で役立つことができる(図9 ~ 11を参照)。

【0259】

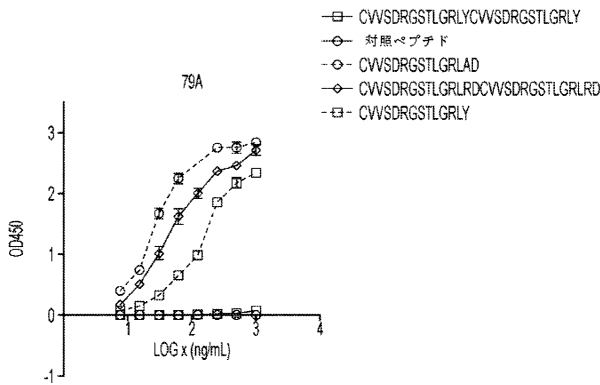
本明細書に開示され特許請求された方法の全ては、本開示に照らせば、過度の実験なしに実施及び実行され得る。本発明の組成物及び方法は、好ましい実施形態に関して記載されてきたが、バリエーションが、本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなしに、本明細書に記載される方法に、及び方法のステップまたは一連のステップにおいて適用され得ることが、当業者に明らかである。より具体的には、化学的及び生理学的の両方で関連するある特定の作用物質(agent)が、同じまたは類似の結果を達成する限り、本明細書に記載される作用物質の代わりに用いられてもよいことが、明らかである。当業者に

明らかな全てのかかる類似の代用物及び改変は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲及び概念の範囲内であるとみなされる。

【図面】

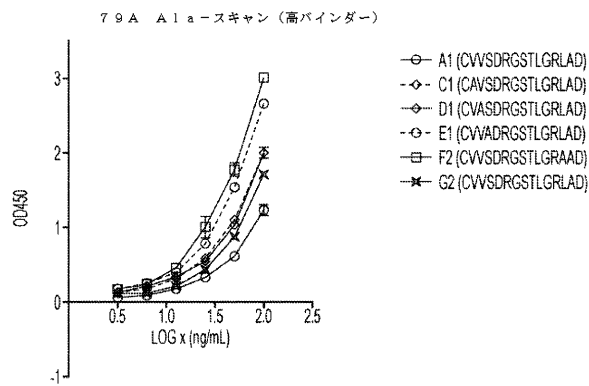
【図 1 A】

【図 1 A】



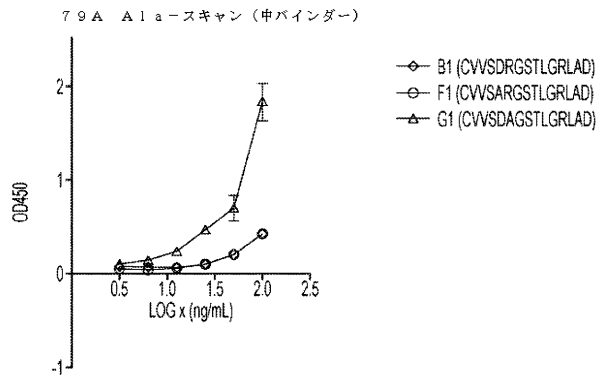
【図 1 B】

【図 1 B】



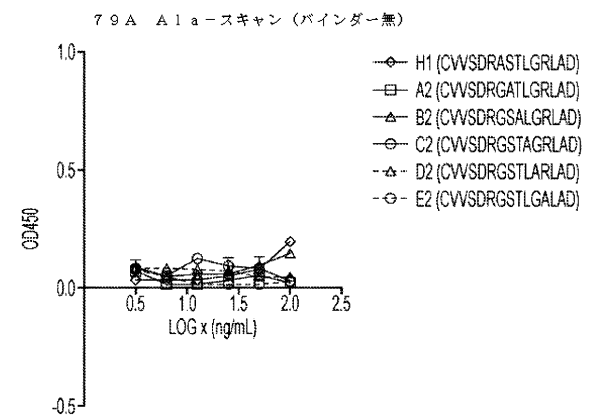
【図 1 C】

【図 1 C】



【図 1 D】

【図 1 D】



10

20

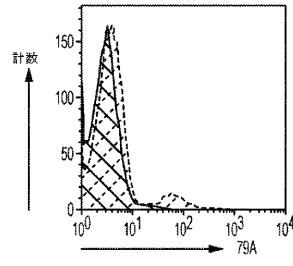
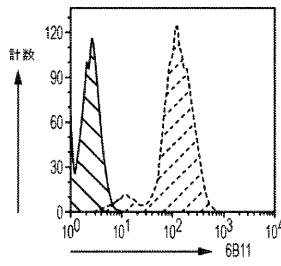
30

40

50

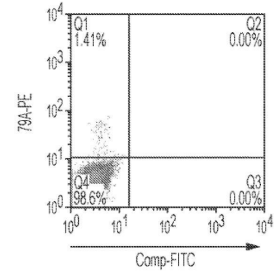
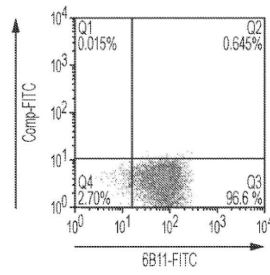
【図 1 E - 1】

【図 1 E (i)】



【図 1 E - 2】

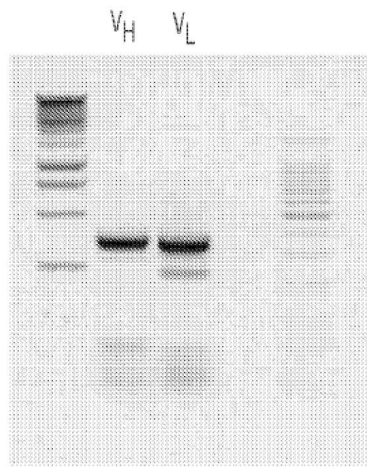
【図 1 E (ii)】



10

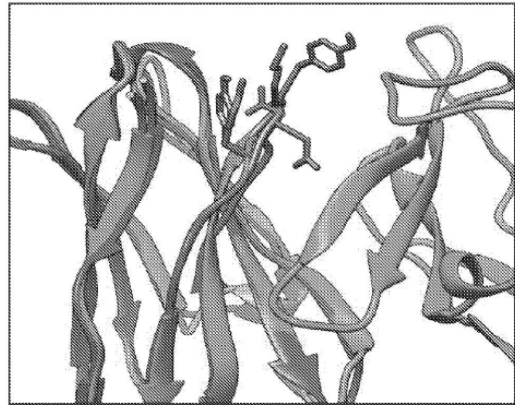
【図 2】

【図 2】



【図 3 A】

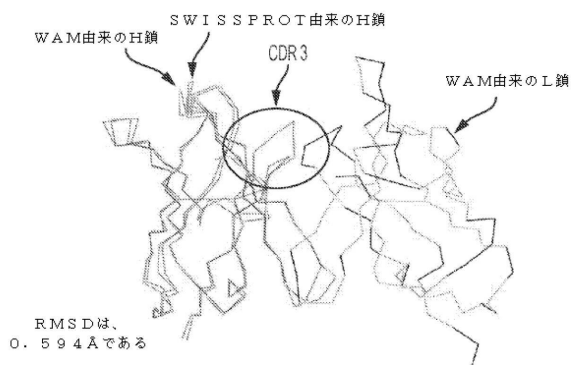
【図 3 A】



20

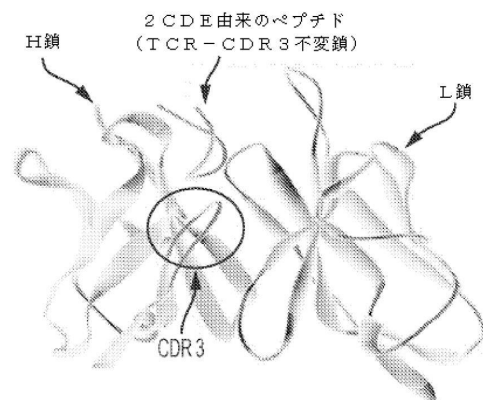
【図 3 B】

【図 3 B】



【図 3 C】

【図 3 C】



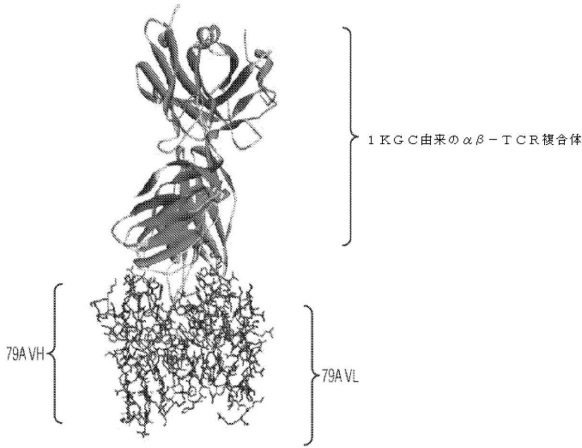
30

40

50

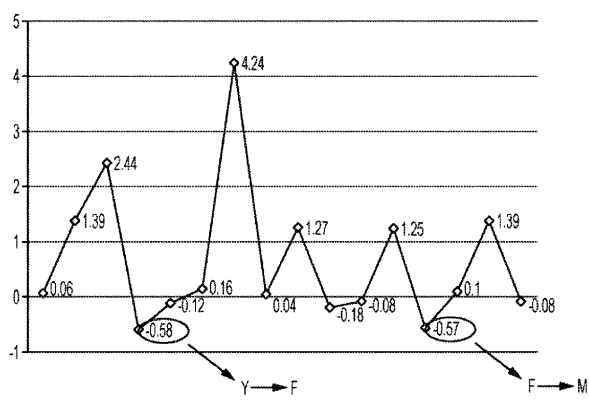
【図 3 D】

【図 3 D】



【図 4 A】

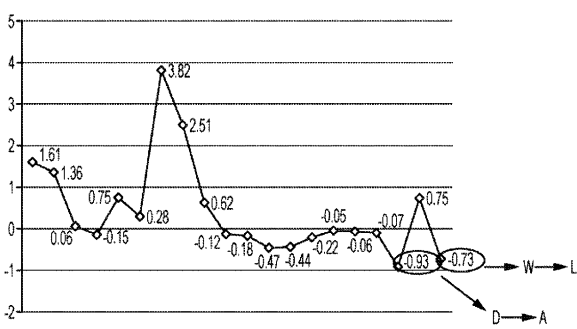
【図 4 A】



10

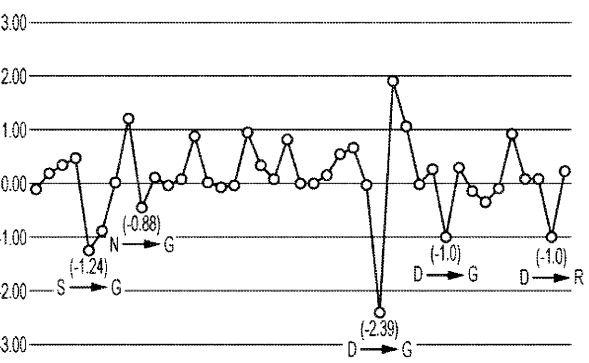
【図 4 B】

【図 4 B】



【図 4 C】

【図 4 C】



20

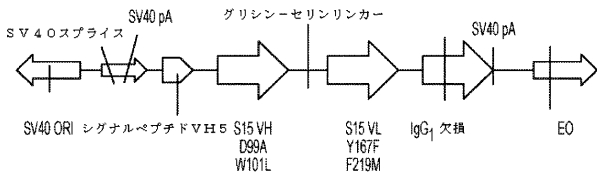
30

40

50

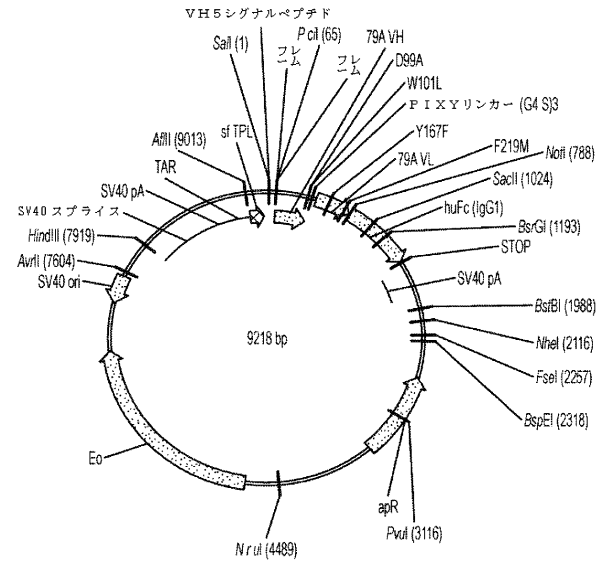
【図 5 A - 1】

【図 5 A (i)】



【図 5 A - 2】

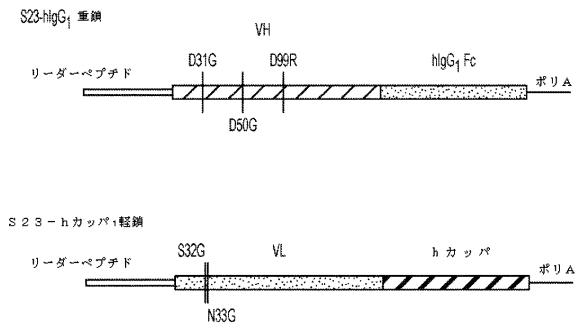
【図 5 A (ii)】



10

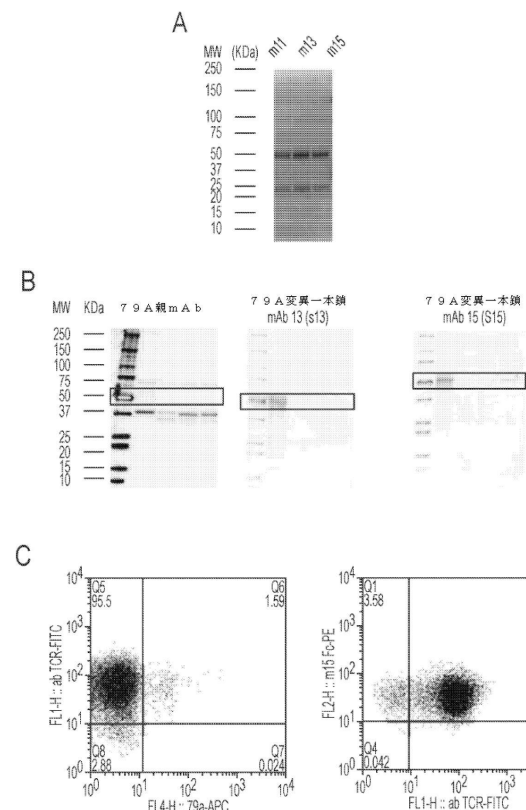
【図 5 B】

【図 5 B】



【図 6 - 1】

【図 6 - 1】



20

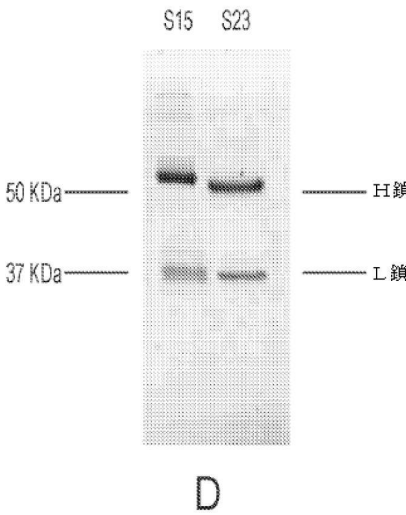
30

40

50

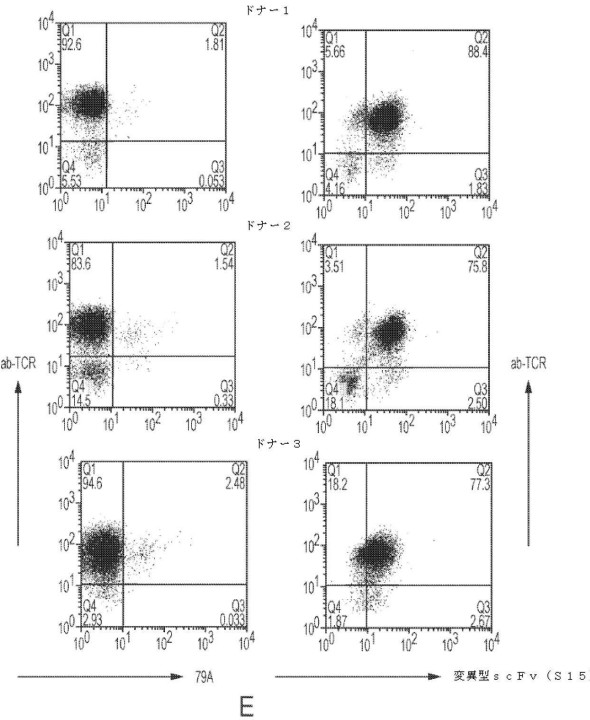
【図 6 - 2】

【図 6 - 2】



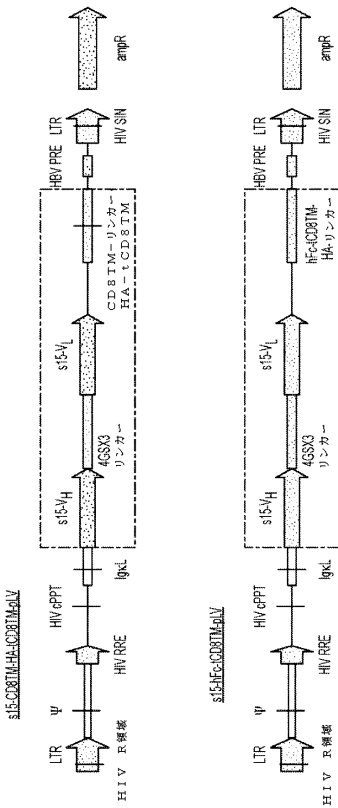
【図 6 - 3】

【図 6 - 3】



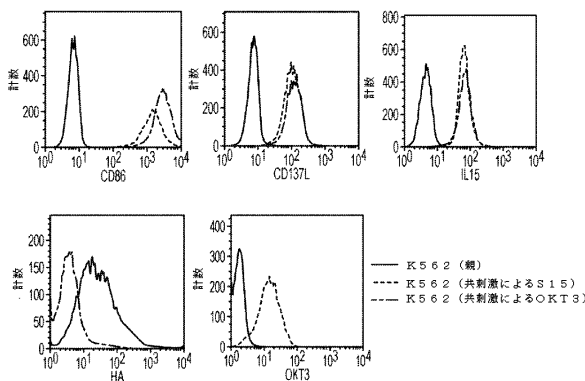
【図 7 A】

【図 7 A】



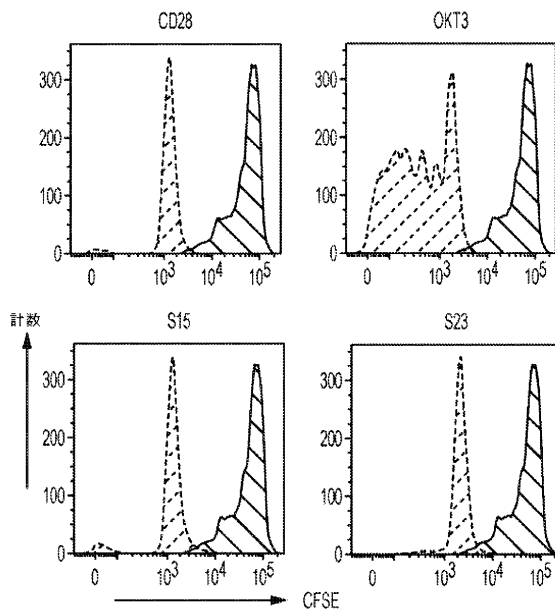
【図 7 B】

【図 7 B】



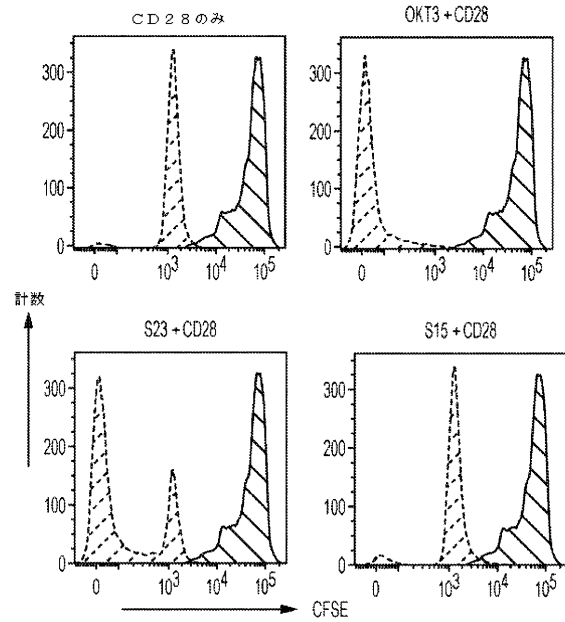
【図 7 C】

【図 7 C】



【図 7 D】

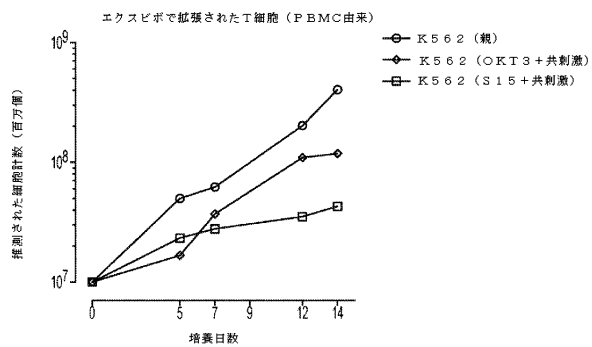
【図 7 D】



10

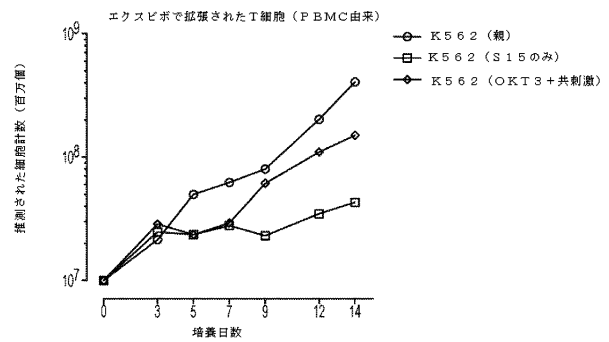
【図 7 E】

【図 7 E】



【図 7 F】

【図 7 F】



20

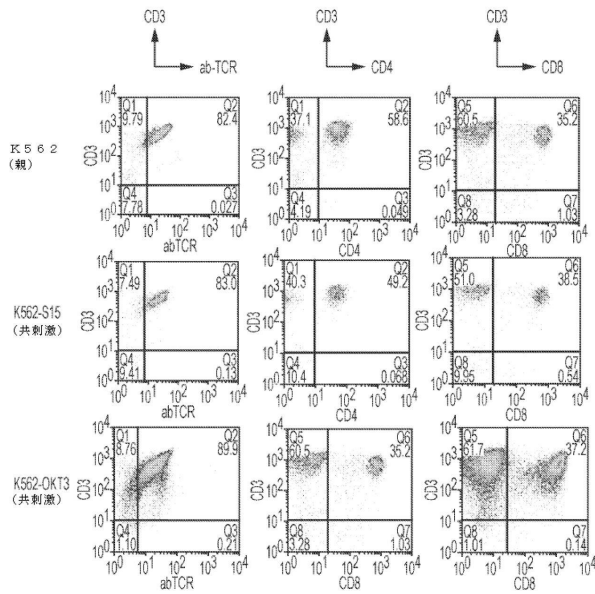
30

40

50

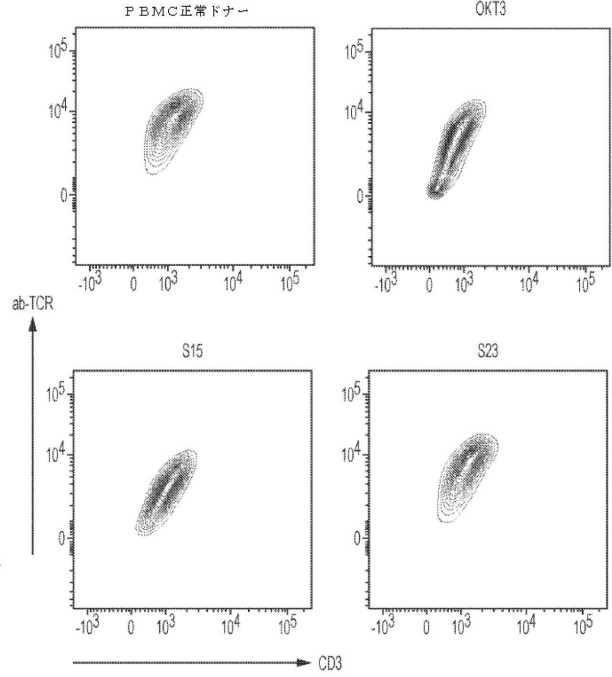
【図 7 G】

【図 7 G】



【図 7 H】

【図 7 H】

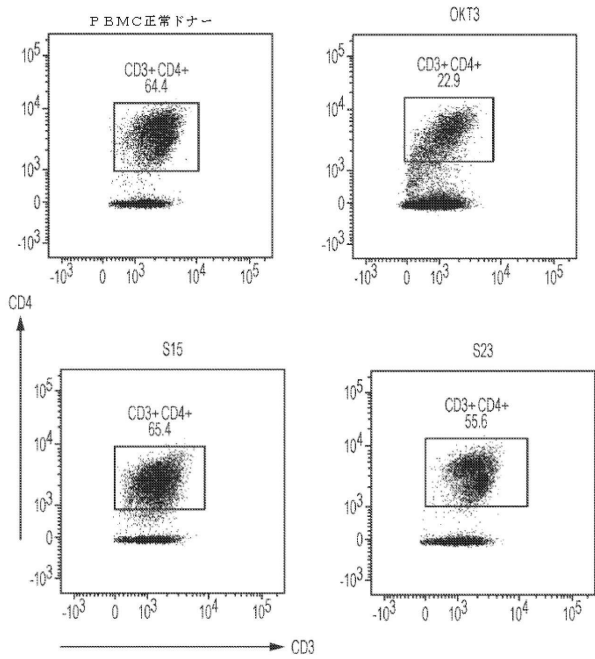


10

20

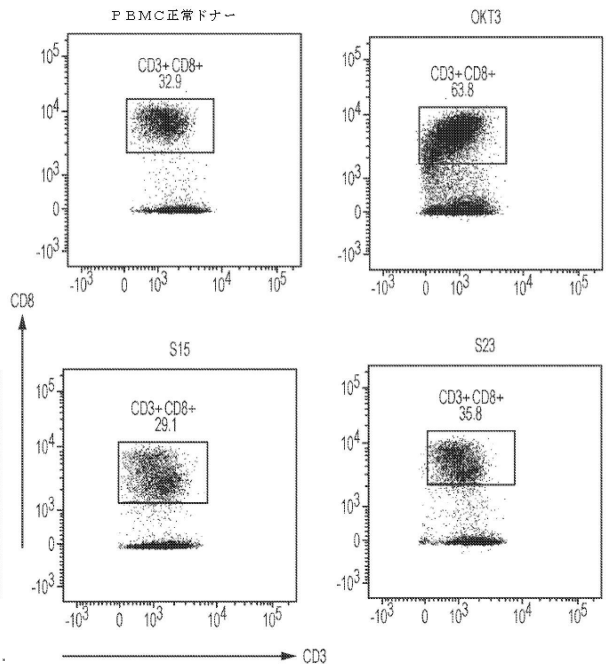
【図 7 I】

【図 7 I】



【図 7 J】

【図 7 J】



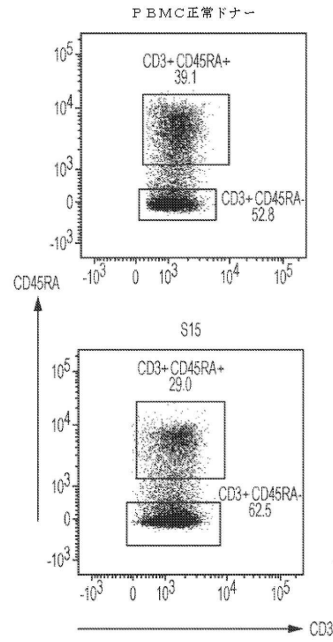
30

40

50

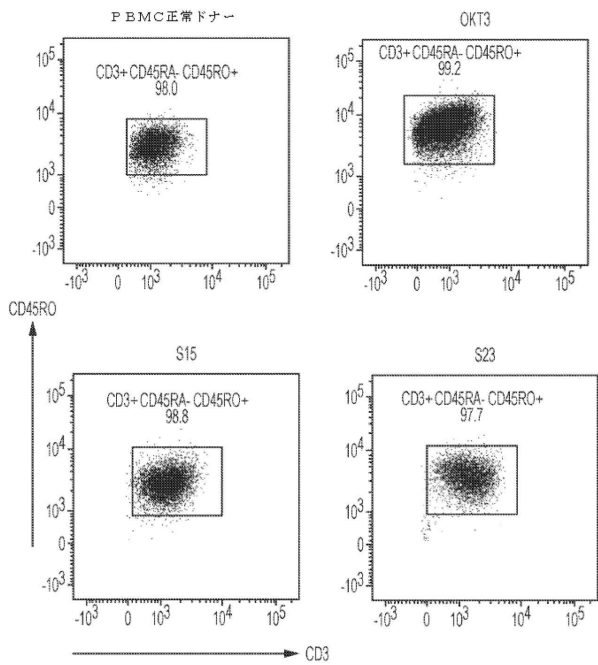
【図 7 K】

【図 7 K】



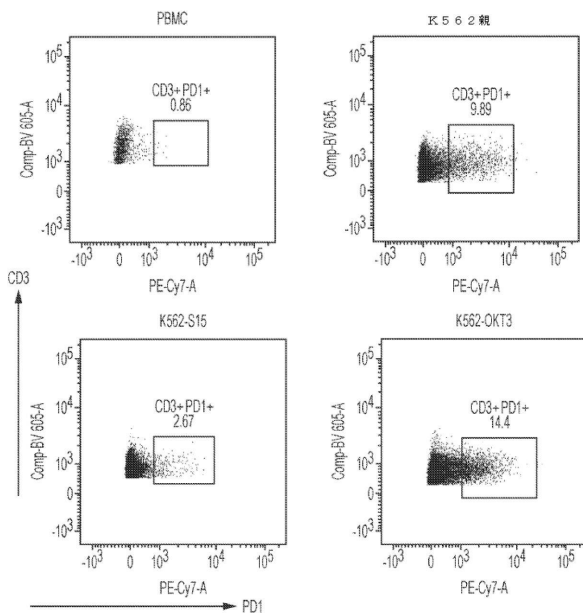
【図 7 L】

【図 7 L】



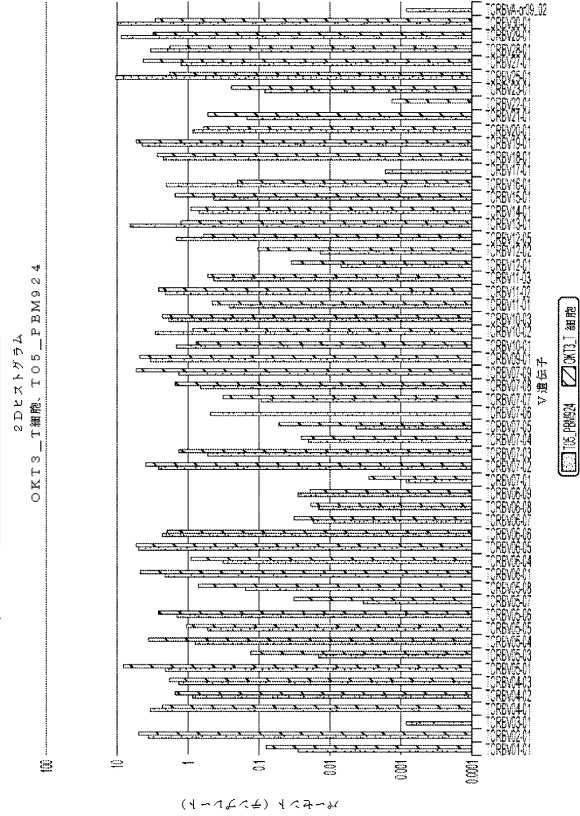
【図 7 M】

【図 7 M】



【図 8 A - 1】

【図 8 A】



10

20

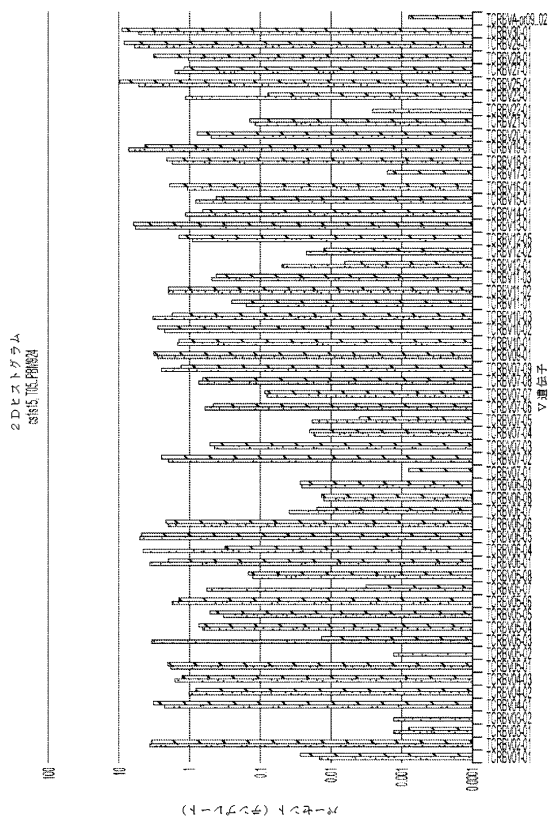
30

40

50

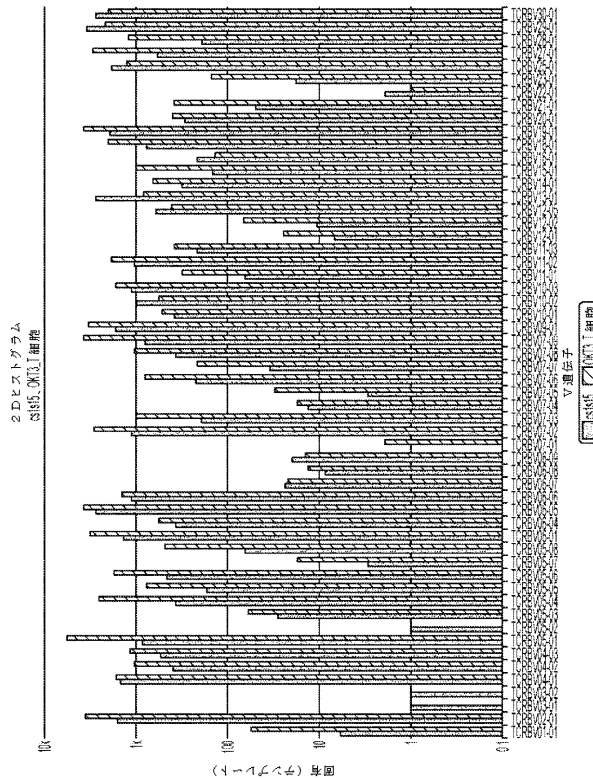
【 図 8 A - 2 】

【図 8 A の続き】



【 図 8 B 】

【例 8 B】

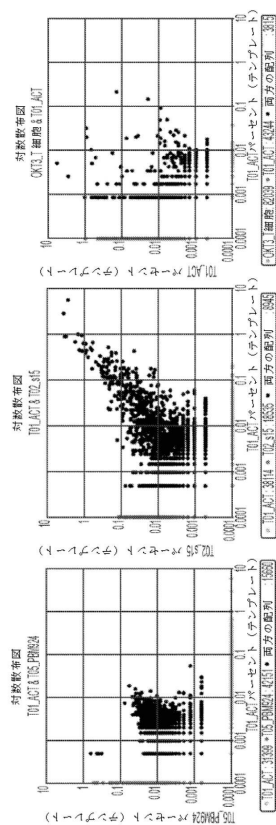


10

20

【 図 8 C 】

【図 8 C】



【 図 8 D 】

【图 8 D】

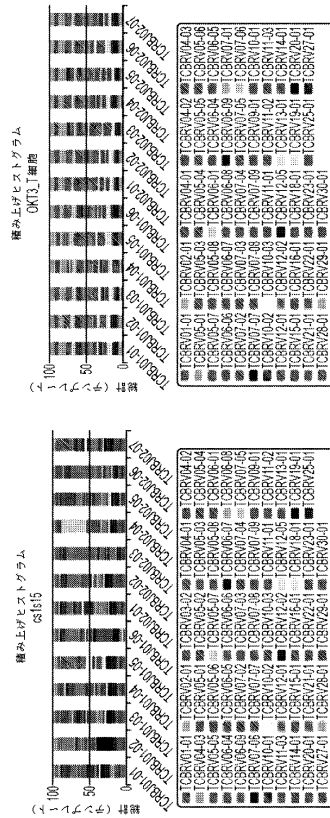
	OKT3T 細胞	PBMC_T 細胞	CS1S15
OKT3T 細胞		$r^2=0.055$ $O=0.172$	$r^2=0.040$ $O=0.224$
PBMC_T 細胞	$r^2=0.055$ $O=0.172$		$r^2=0.043$ $O=0.472$
CS1S15	$r^2=0.040$ $O=0.224$	$r^2=0.043$ $O=0.472$	

30

40

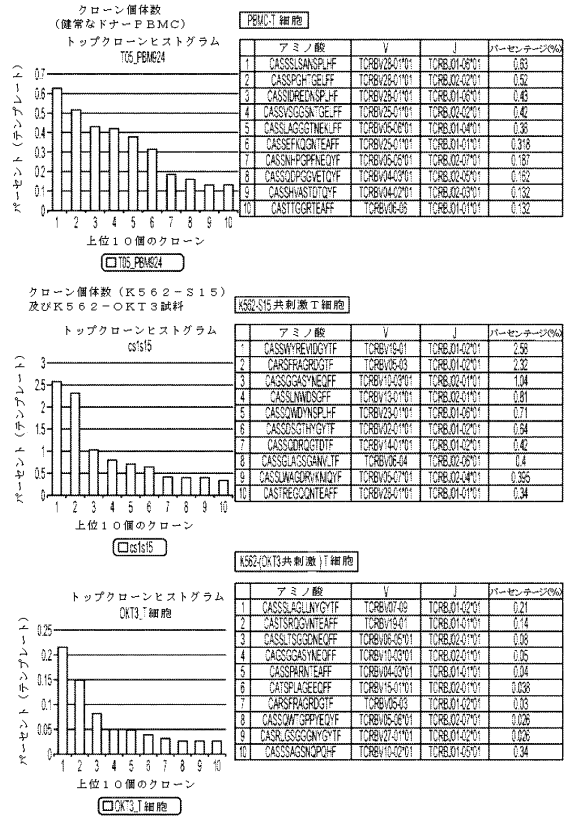
【図 9】

【図 9】



【図 10】

【図 10】

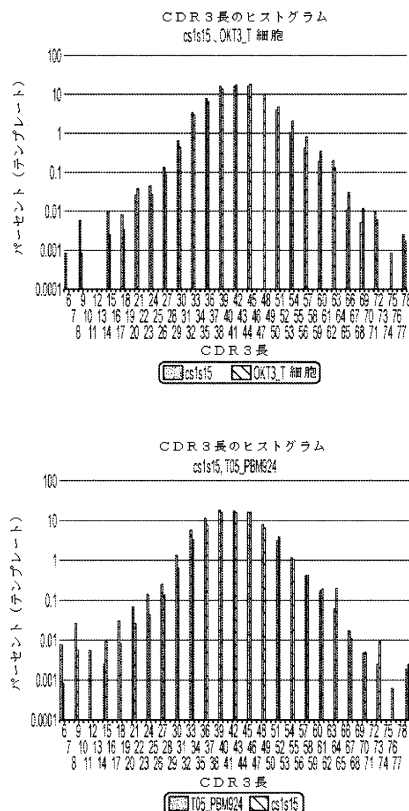


10

20

【図 11】

【図 11】



30

40

50

【配列表】

0007020687000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	K
		G 0 1 N	33/53	N

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 クーパー, ローレンス ジェイ. エヌ.

アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, ホルコム ブールバード 1515, ユニット 907

(72)発明者 ジェナ, ビブレンデュ

アメリカ合衆国 テキサス 77054, ヒューストン, ケンブリッジ ストリート 7900

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第2011/150454(WO, A1)

国際公開第90/006758(WO, A1)

国際公開第2014/078475(WO, A2)

国際公開第2014/140368(WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00 - 15/90

C 0 7 K 1/00 - 19/00

C a p l u s / R E G I S T R Y (S T N)