

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6964351号  
(P6964351)

(45) 発行日 令和3年11月10日 (2021. 11. 10)

(24) 登録日 令和3年10月21日 (2021. 10. 21)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)	C 1 2 N 15/12 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/13 (2006. 01)	C 1 2 N 1/13
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

請求項の数 16 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-508259 (P2019-508259)	(73) 特許権者	506258073
(86) (22) 出願日	平成29年7月4日 (2017. 7. 4)		イマティクス バイオテクノロジーズ ゲー ーエムペーハー
(65) 公表番号	特表2019-528061 (P2019-528061A)		ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, パ ウルーエンリヒエシュトラッセ 1 5
(43) 公表日	令和1年10月10日 (2019. 10. 10)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/066630	(74) 代理人	100088904
(87) 国際公開番号	W02018/033291		弁理士 庄司 隆
(87) 国際公開日	平成30年2月22日 (2018. 2. 22)	(72) 発明者	アルテン, レオニー
審査請求日	令和2年1月7日 (2020. 1. 7)		ドイツ, 7 2 0 7 6 テュービンゲン, ア ーピーピー, 1 6 1, ヴァイスドルンヴェ ーグ 1 4
(31) 優先権主張番号	102016115246.3	(72) 発明者	マウラー, ドミニク
(32) 優先日	平成28年8月17日 (2016. 8. 17)		ドイツ, 7 2 1 1 6 メッシンゲン, フレ イネルヴェーグ 7
(33) 優先権主張国・地域又は機関	ドイツ (DE)		
(31) 優先権主張番号	62/376, 059		
(32) 優先日	平成28年8月17日 (2016. 8. 17)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規T細胞受容体およびそれを用いた免疫療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

相補性決定領域 (C D R s) を含む T 細胞受容体 (T C R) 可変鎖領域を含んでなる抗原認識コンストラクトが、配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列を有する C O L 6 A 3 抗原ペプチドに特異的および/または選択的に結合でき、：

(i) それぞれ、配列番号 1 3、配列番号 1 4 および配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2 および C D R 3、またはそれぞれ、配列番号 1 9、配列番号 2 0 および配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2 および C D R 3、または  
(ii) それぞれ、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2 および C D R 3、またはそれぞれ、配列番号 7、配列番号 8 および配列番号 9 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2 および C D R 3、または  
(iii) それぞれ、配列番号 2 5、配列番号 2 6 および配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2 および C D R 3、またはそれぞれ、配列番号 3 1、配列番号 3 2 および配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する C D R 1、C D R 2 および C D R 3、  
を含んでなる抗原認識コンストラクト。

【請求項 2】

前記抗原認識コンストラクトが、抗体、またはその誘導体または断片、または T 細胞受容体 (T C R)、またはその誘導体または断片であって、誘導体または断片は配列番号 5 8 に示されるアミノ酸配列を有する C O L 6 A 3 抗原ペプチドへの結合能力を保持するものである、請求項 1 に記載の抗原認識コンストラクト。

10

20

## 【請求項 3】

前記抗原認識コンストラクトが、一本鎖 T C R ( scTCR ) である、請求項 2 に記載の抗原認識コンストラクト。

## 【請求項 4】

前記抗原認識コンストラクトが、T C R 可変鎖領域および T C R 可変鎖領域を含んでなり、

( i ) T C R 可変鎖領域が配列番号 1 6 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 1 6 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、および、該 T C R 可変鎖領域が配列番号 1 3、1 4 および 1 5 である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含んでなり、T C R 可変鎖領域が、配列番号 2 2 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 2 2 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、および、該 T C R 可変鎖領域が配列番号 1 9、2 0 および 2 1 である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含んでなり、または、

( ii ) T C R 可変鎖領域が配列番号 4 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 4 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、および、該 T C R 可変鎖領域が配列番号 1、2 および 3 である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含んでなり、T C R 可変鎖領域が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 1 0 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、および、該 T C R 可変鎖領域が配列番号 7、8 および 9 である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含んでなり、または、

( iii ) T C R 可変鎖領域が配列番号 2 8 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 2 8 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、および、該 T C R 可変鎖領域が配列番号 2 5、2 6 および 2 7 である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含んでなり、T C R 可変鎖領域が、配列番号 3 4 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 3 4 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでなり、および、該 T C R 可変鎖領域が配列番号 3 1、3 2 および 3 3 である C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含んでなる、

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクト。

## 【請求項 5】

前記抗原認識コンストラクトが、T C R 鎖と T C R 鎖、または 鎖と 鎖を含んでなる T C R であって、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクト。

## 【請求項 6】

前記抗原認識コンストラクトが、T C R 鎖および T C R 鎖から構成される T C R、またはその断片であって、さらに、T C R が、それぞれ配列番号 5 および 1 1、またはそれぞれ 1 7 および 2 3；またはそれぞれ 2 9 および 3 5 の 鎖および 鎖から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する定常領域を含んでなる、

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクト。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクトをコードする核酸。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の核酸を含んでなるベクター。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクトまたは請求項 7 に記載の核酸または請求項 8 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞、または該宿主細胞が、リンパ球、Tリンパ球またはTリンパ球前駆体、または C D 4 または C D 8 陽性 T 細胞である、宿主細胞。

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクト、または請求項 7 に記載の核酸、または請求項 8 に記載のベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞、および薬

10

20

30

40

50

学的に許容可能な担体、安定剤および／または賦形剤を含んでなる、医薬組成物。

【請求項 1 1】

医療または増殖性疾患の診断、予防、および／または治療で使用するための、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクト、または請求項 7 に記載の核酸、または請求項 8 に記載のベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞、または請求項 1 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 2】

前記増殖性疾患が、がん、または C O L 6 A 3 陽性悪性腫瘍、または急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、肺胞横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門がん、肛門管がん、肛門直腸がん、眼がん、肝臓内胆管がん、関節がん、頸部がん、胆嚢がん、胸膜がん、鼻がん、鼻腔がん、中耳がん、口腔がん、膣がん、外陰部がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、口腔咽頭がん、卵巣がん、陰茎がん、膵臓がん、腹膜がん、大網がん、腸間膜がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、皮膚がん、小腸がん、軟部組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、尿管がん、もしくは膀胱がんから選択される、請求項 1 1 に記載の抗原認識コンストラクト、核酸、ベクター、宿主細胞、もしくは医薬組成物。

【請求項 1 3】

a . 適切な宿主細胞を提供するステップと、  
b . 請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクトをコードするコード配列を含んでなる遺伝子コンストラクトを提供するステップと、  
c . 前記遺伝子コンストラクトを前記適切な宿主細胞に導入するステップと、  
d . 前記適切な宿主細胞によって前記遺伝子コンストラクトを発現させるステップとを含んでなる、C O L 6 A 3 特異的抗原認識コンストラクトを発現する細胞株を製造する方法。

【請求項 1 4】

前記適切な宿主細胞からの前記抗原認識コンストラクトの単離および精製、または前記適切な宿主細胞からの前記抗原認識コンストラクトの単離および精製と T 細胞内の前記抗原認識コンストラクトの再構成とをさらに含んでなる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

医薬品の製造のための、または増殖性疾患の診断、予防、および／または治療をするための医薬品の製造のための、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の抗原認識コンストラクト、または請求項 7 に記載の核酸、または請求項 8 に記載のベクター、または請求項 9 に記載の宿主細胞、または請求項 1 0 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 1 6】

前記増殖性疾患が、がん、または C O L 6 A 3 陽性悪性腫瘍、または前記 C O L 6 A 3 陽性悪性腫瘍が急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、肺胞横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門がん、肛門管がん、肛門直腸がん、眼がん、肝臓内胆管がん、関節がん、頸部がん、胆嚢がん、胸膜がん、鼻がん、鼻腔がん、中耳がん、口腔がん、膣がん、外陰部がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、口腔咽頭がん、卵巣がん、陰茎がん、膵臓がん、腹膜がん、大網がん、腸間膜がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、皮膚がん、小腸がん、軟部組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、尿管がん、もしくは膀胱がんから選択される、請求項 1 5 に記載の抗原認識コンストラクト、核酸、ベクター、宿主細胞、または医薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、COL6A3抗原に対する抗原認識コンストラクトに関する。本発明は、特に、腫瘍発現抗原COL6A3に対して選択的かつ特異的な、新規T細胞受容体(TCR)ベースの分子を提供する。本発明のTCR、およびそれに由来するCOL6A3抗原結合断片は、がん性疾患を発現するCOL6A3の診断、治療、および予防に有用である。さらに、本発明の抗原認識コンストラクトをコードする核酸、これらの核酸を含んでなるベクター、抗原認識コンストラクトを発現する組換え細胞、および本発明の化合物を含んでなる医薬組成物が提供される。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

コラーゲンは様々な組織の完全性を維持する上で役割を果たす、タンパク質のスーパーファミリーである。コラーゲンは細胞外マトリックスタンパク質であり、それらの共通の構造要素として三重らせんドメインを有する。コラーゲンVIは、ミクロフィブリルの主要構成要素である。コラーゲンVIの基本的な構造単位は、1(VI)、2(VI)、および3(VI)コラーゲン鎖のヘテロ三量体である。1(VI)および2(VI)鎖は、それぞれCOL6A1およびCOL6A2遺伝子によってコードされる。COL6A3遺伝子によってコードされるタンパク質は、VI型コラーゲンの3サブユニット(3(VI)コラーゲン鎖)である(Bertini et al., 2002 Eur. J. Paediatr. Neurol 6:193-8)。COL6A3の遺伝子発現は、乳がんの進行に関連し大腸がんでは上昇する(Smith MJ, et al. "A  
analysis of differential gene expression  
in colorectal cancer and stroma using fl  
uorescence-activated cell sorting purifi  
cation"British journal of cancer. 2009;10  
0:1452-1464;Tilman G et al."Human periost  
in gene expression in normal tissues, tum  
ors and melanoma: evidences for periostin  
production by both stromal and melanoma  
cells"Mol Cancer. 2007;6:80)ことが以前示されており、  
結腸直腸がんの予後マーカーであることが示されている(Qiao J et al. "Stroma derived COL6A3 is a potential pro  
gnosis marker of colorectal carcinoma re  
vealed by quantitative proteomics"Oncota  
rget. 2015 Oct 6;6(30):29929-29946)。COL6A3  
遺伝子はヒトゲノムの2q37に位置し、44のエクソンを含む。COL6A3タンパク  
質は、3177個のアミノ酸を有し、12個のフォンヴィレブランド因子A型(vWA)  
ドメイン、1個のフィブロネクチン3型ドメイン、および1個のBPTI/クニッツファ  
ミリーのセリンプロテアーゼ阻害剤(KU)ドメインを含む。

## 【 0 0 0 3 】

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

## 【 0 0 0 4 】

細胞性免疫応答の特異的要素は、腫瘍細胞を特異的に認識して破壊できる。腫瘍浸潤性細胞集団からの、または末梢血からのT細胞の単離は、がんに対する自然免疫防御において、このような細胞が重要な役割を果たすことを示唆する。特に、細胞質ゾル内に位置するタンパク質または欠陥リボソーム産物(DRiP)に由来する、通常は8~10アミノ酸残基の主要組織適合性複合体(MHC)保有ペプチドのクラスI分子を認識するCD8

10

20

30

40

50

陽性Ｔ細胞が、この応答において重要な役割を果たす。ヒトのＭＨＣ分子はまた、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）とも称される。

#### 【０００５】

ＴＣＲは、シグナル伝達媒介に關与するＣＤ３複合体のインバリアントタンパク質に關連する、免疫グロブリンスーパーファミリーのヘテロ二量体細胞表面タンパク質である。ＴＣＲは および 形態で存在し、それらは構造的に類似しているが、かなり異なる解剖学的位置と、恐らくは機能とを有する。天然のヘテロ二量体 ＴＣＲの細胞外部分は２つのポリペプチドからなり、そのそれぞれは膜近位定常ドメインおよび膜遠位可変ドメインを有する。定常ドメインおよび可変ドメインのそれぞれは、鎖内ジスルフィド結合を含む。可変ドメインは、抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）に類似した、高度に多型のループを含有する。ＴＣＲ遺伝子治療の使用は、いくつかの現在のハードルを克服する。それは、患者自身のＴ細胞に所望の特異性を与えて、十分な数のＴ細胞を短期間で生成できるようにし、それらの枯渇を回避する。ＴＣＲは、中央記憶Ｔ細胞または幹細胞の特徴を有するＴ細胞に形質導入され、それは移植時におけるより良好な持続性と機能を実証にしてもよい。ＴＣＲ操作Ｔ細胞は、化学療法または照射によってリンパ球減少症になったがん患者に注入され、効率的な生着を可能にするが、免疫抑制は阻害する。

10

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【０００６】

がん治療のための分子標的薬の開発が進歩しているものの、当該技術分野において、がん細胞に高度に特異的な分子を特異的に標的化する新たな抗がん剤を開発する必要性がなおある。

20

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【０００７】

本明細書は、新規ＣＯＬ６Ａ３ ＴＣＲ、各組換えＴＣＲコンストラクト、核酸、ベクター、および開示されるようなＣＯＬ６Ａ３エピトープに特異的に結合する宿主細胞と；がんの治療においてこのような分子を使用する方法とを提供することによって、必要性に対処する。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【０００８】

本発明の目的は、配列番号３、９、１５、２１、２７、および３３から選択されるアミノ酸配列と少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、または好ましくは１００％の配列同一性を有する、少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）３を含んでなる抗原認識コンストラクトによって、第１の態様において解決される。

30

#### 【０００９】

別の追加的または代替的实施形態では、抗原認識コンストラクトは、ＣＤＲ１および／またはＣＤＲ２ドメイン配列をさらに含んでなってもよい。可変ドメイン内で、ＣＤＲ１およびＣＤＲ２は、ポリペプチド鎖の可変（Ｖ）領域に見いだされ、ＣＤＲ３は、Ｖの一部と、多様性（Ｄ）および連結（Ｊ）領域の全てを含む。ＣＤＲ３は最も可変性であり、抗原を特異的かつ選択的に認識することに関与する主要ＣＤＲである。ＣＤＲ１およびＣＤＲ２配列は、ヒト可変鎖対立遺伝子のＣＤＲ配列から選択されてもよい。

40

#### 【００１０】

天然 - ヘテロ二量体ＴＣＲは、鎖および鎖を有する。各鎖は可変領域、連結領域、および定常領域を含んでなり、鎖は通常、可変領域と連結領域の間の短い多様性領域もまた含有するが、この多様性領域はしばしば連結領域の一部と見なされる。各可変領域はフレームワーク配列に埋め込まれた３つのＣＤＲ（相補性決定領域）を含んでなり、そのうちの１つはＣＤＲ３と命名される超可変領域である。それらのフレームワークによって、ＣＤＲ１およびＣＤＲ２配列によって、ならびに部分的に定義されたＣＤＲ３配列によって区別される、数種類の鎖可変（Ｖ）領域および数種類の鎖可変（Ｖ）領

50

域がある。V 型は、I M G T 命名法では固有の T R A V 番号によって示され、V 型は固有の T R B V 番号によって示される。

【 0 0 1 1 】

したがって、1つの追加的または代替的实施形態では、本発明の抗原認識コンストラクトは、以下の表1に示すように組み合わせられたC D R 1、C D R 2および、C D R 3配列を含んでなり、それはC D R 3配列と共にそれぞれの可変鎖対立遺伝子を提示する。したがって、少なくとも1つの、好ましくは3つ全てのC D R 配列C D R 1、C D R 2、およびC D R 3を含んでなる本発明の抗原認識コンストラクトが好ましい。好ましくは、本発明の抗原認識コンストラクトは、本明細書で開示される本発明のT C R可変領域の一個体の各C D R 1 ~ C D R 3を含んでなる。

10

【 0 0 1 2 】

「特異性」または「抗原特異性」または所与の抗原「に特異的な」という用語は、本明細書の用法では、抗原がH L A、好ましくはH L A A 2による場合、抗原認識コンストラクトが、前記抗原に、好ましくはC O L 6 A 3抗原に、より好ましくは高い結合活性で、特異的に結合し得ることを意味する。T C Rを発現し、そしてH L Aを提示するC O L 6 A 3と接触したT細胞が、以下で提供される本明細書の抗原でパルス処理されたC O L 6 A 3エピトープなどの低濃度（例えば、約 $10 \sim 11 \text{ mol/l}$ 、 $10 \sim 10 \text{ mol/l}$ 、 $10 \sim 9 \text{ mol/l}$ 、 $10 \sim 8 \text{ mol/l}$ 、 $10 \sim 7 \text{ mol/l}$ 、 $10 \sim 6 \text{ mol/l}$ 、 $10 \sim 5 \text{ mol/l}$ ）のC O L 6 A 3抗原標的細胞との同時培養時に、少なくとも約 $200 \text{ pg/ml}$ 以上（例えば、 $250 \text{ pg/ml}$ 以上、 $300 \text{ pg/ml}$ 以上、 $400 \text{ pg/ml}$ 以上、 $500 \text{ pg/ml}$ 以上、 $600 \text{ pg/ml}$ 以上、 $700 \text{ pg/ml}$ 以上、 $1000 \text{ pg/ml}$ 以上、 $2,000 \text{ pg/ml}$ 以上、 $2,500 \text{ pg/ml}$ 以上、 $5,000 \text{ pg/ml}$ 以上）のインターフェロン（I F N - ）を分泌する場合、例えば、抗原認識コンストラクトとしてのT C Rは、C O L 6 A 3抗原に対する「抗原特異性」を有すると見なされてもよい。代案としては、またはそれに加えて、T C Rを発現する細胞が、低濃度のC O L 6 A 3抗原でパルス処理された標的細胞との同時培養時に、I F N - の非形質導入バックグラウンドレベルの少なくとも2倍量のI F N - を分泌する場合、T C Rは、C O L 6 A 3に対する「抗原特異性」を有すると見なされてもよい。上記のようなこのような「特異性」は、例えば、E L I S Aを用いて分析され得る。

20

【 0 0 1 3 】

本発明の1つの代替的または追加的実施形態では、抗原認識コンストラクトは、C O L 6 A 3抗原に選択的に結合し；好ましくはC O L 6 A 3抗原は、配列番号58 ~ 67、最も好ましくは配列番号58に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質エピトープまたはペプチド、またはその変異型であり、変異型は、3つ以下、好ましくは2つ、最も好ましくは1つ以下のアミノ酸位置のアミノ酸欠失、付加、挿入または置換である。

30

【 0 0 1 4 】

「選択性」または「選択的に認識/結合する」という用語は、好ましくは1つの特異的エピトープのみを選択的に認識しまたはそれに結合し、好ましくは別のエピトープに対する交差反応性を示さないかまたは実質的に示さない、T C Rまたは抗体などの抗原認識コンストラクトの特性を指すものと理解される。好ましくは「選択性」または「選択的に認識/結合する」は、好ましくは1つの特異的エピトープのみを選択的に認識しまたはそれに結合し、好ましくは別のエピトープに対する交差反応性を示さないかまたは実質的に示さない、抗原認識コンストラクト（例えばT C R）を意味し、前記エピトープは1つのタンパク質に固有であり、その結果、抗原認識コンストラクトは、その他のエピトープおよびその他のタンパク質に対して交差反応性を示さないかまたは実質的に示さない。

40

【 0 0 1 5 】

本発明によるコンストラクトを認識する抗原は、好ましくは抗体、またはその誘導体または断片、またはT細胞受容体（T C R）、またはその誘導体または断片から選択される。本発明の抗体またはT C Rの誘導体または断片は、好ましくは、親分子の抗原結合/認識能力、特に上で説明したようなその特異性および/または選択性を保持しなければなら

50

ない。そのような結合機能は、本明細書で定義される C D R 3 領域の存在によって保持されてもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明の一実施形態では、本発明の T C R は、主要組織適合遺伝子複合体 ( M H C ) クラス I 依存性様式で C O L 6 A 3 抗原を認識できる。「 M H C クラス I 依存性様式」は、本明細書の用法では、 T C R が、 M H C クラス I 分子の文脈内で、 C O L 6 A 3 抗原への結合時に免疫応答を誘発することを意味する。 M H C クラス I 分子は、例えば、 H L A - A 分子などの当該技術分野で公知の任意の M H C クラス I 分子であり得る。本発明の好ましい実施形態では、 M H C クラス I 分子は、 H L A - A 2 分子である。

【 0 0 1 7 】

本発明は、コンストラクトを認識する一本鎖抗原と、コンストラクトを認識する二本鎖との双方を提供する。

【 0 0 1 8 】

本発明は、特に抗原認識コンストラクトとしての T C R 、またはその断片または誘導体を提供する。 T C R は、好ましくはヒト T C R であり、それはヒト T C R 遺伝子座から生じ、したがってヒト T C R 配列を含んでなるものとして理解される。さらに、本発明の T C R は、ヒト起源であること、そして C O L 6 A 3 抗原を特異的に認識することを特徴としてもよい。

【 0 0 1 9 】

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

【 0 0 2 0 】

本発明の T C R は、一本鎖 または 、または および 、分子として、または代案としては、 および 鎖、または および 鎖の双方から構成される、二本鎖コンストラクトとして提供されてもよい。

【 0 0 2 1 】

本発明の抗原認識コンストラクトは、 T C R または 鎖 ; および / または T C R または 鎖を含んでなってもよく ; T C R または 鎖は、配列番号 3 、 1 5 、および 2 7 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の配列同一性を有する C D R 3 を含んでなり、および / または T C R または 鎖は、配列番号 9 、 2 1 、および 3 3 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の配列同一性を有する C D R 3 を含んでなる。

【 0 0 2 2 】

最も好ましくは、本開示が、本明細書で開示される T C R 鎖 ( 表 1 を参照されたい ) の C D R 1 ~ C D R 3 領域の任意の 1 つ、 2 つまたは全てを含んでなる抗原認識コンストラクトに言及するいくつかの追加的な実施形態では、 3 つ、 2 つ、好ましくは 1 つのみの修飾アミノ酸残基を有する各 C D R 配列を含んでなる抗原認識コンストラクトが、好ましくあってもよい。修飾されたアミノ酸残基は、アミノ酸の挿入、欠失または置換から選択されてもよい。最も好ましくは、 3 つ、 2 つ、好ましくは 1 つの修飾アミノ酸残基は、それぞれの C D R 配列の最初または最後のアミノ酸残基である。修飾が置換である場合、いくつかの実施形態では、置換は保存的アミノ酸置換であることが好ましい。

【 0 0 2 3 】

本発明の抗原認識コンストラクトが、二本鎖 T C R などの少なくとも 2 つのアミノ酸鎖またはその抗原結合断片から構成される場合、抗原認識コンストラクトは、第 1 のポリペプチド鎖中の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列、および第 2 のポリペプチド鎖中の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列 ; 第 1 のポリペプチド鎖中の配列番号 1 5 に記載のアミノ酸配列、および第 2 のポリペプチド鎖中の配列番号 2 1 に記載のアミノ酸配列 ; 第 1 のポリペプチド鎖中の配列番号 2 7 に記載のアミノ酸配列、および第 2 のポリペプチド鎖中の配列

10

20

30

40

50

番号 33 に記載のアミノ酸配列を含んでなってもよい。前述の二本鎖 T C R、またはその抗原結合断片のいずれか 1 つが、本発明の好ましい T C R である。いくつかの態様において、本発明の二本鎖 T C R の C D R 3 は変異していてもよい。上記の配列番号 9 ~ 28 の C D R 3 配列の変異は、好ましくは 3 つ以下、好ましくは 2 つ、そして最も好ましくは 1 つ以下のアミノ酸残基の置換、欠失、付加または挿入を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は T C R または 鎖であってもよく、第 2 のポリペプチド鎖は T C R または 鎖であってもよい。または T C R の組み合わせが好ましい。

#### 【 0 0 2 4 】

T C R、またはその抗原結合断片は、いくつかの実施形態では、T C R 鎖と T C R 鎖、または 鎖と 鎖から構成される。このような二本鎖 T C R は各鎖内に可変領域を含んでなり、可変領域はそれぞれ 1 つの C D R 1、1 つの C D R 2、および 1 つの C D R 3 配列を含んでなる。T C R は、配列番号 4 および配列番号 10、または配列番号 16 および配列番号 22 ( R 4 P 3 F 9 ) ; または配列番号 28 および配列番号 34 ( R 4 P 3 H 3 ) の可変鎖アミノ酸配列 ( R 4 P 1 D 1 0 ) に含まれる C D R 1 ~ C D R 3 の配列を含んでなる。

10

#### 【 0 0 2 5 】

本発明のいくつかの実施形態は、T C R および T C R 鎖から構成される T C R、またはその断片に関し、前記 T C R は、それぞれ配列番号 4 および 10、またはそれぞれ 16 および 22 ; またはそれぞれ 28 および 34 に記載の および 鎖から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、または好ましくは 100 % の配列同一性を有する可変領域配列を含んでなる。

20

#### 【 0 0 2 6 】

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

#### 【 0 0 2 7 】

本発明のいくつかの実施形態は、T C R および T C R 鎖から構成される T C R、またはその断片に関し、前記 T C R は、それぞれ配列番号 5 および 11、またはそれぞれ 17 および 23 ; またはそれぞれ 29 および 35 に記載の および 鎖から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、または好ましくは 100 % の配列同一性を有する定常領域配列を含んでなる。

30

#### 【 0 0 2 8 】

本発明の T C R または 鎖は、配列番号 1、13、および 25 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する C D R 1 ; および / または配列番号 2、14、および 26 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する C D R 2 をさらに含んでなってもよい。

40

#### 【 0 0 2 9 】

本発明によれば、T C R または 鎖は、配列番号 1、19、および 31 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する C D R 1 ; および / または配列番号 8、20、および 32 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、または 100 % の配列同一性を有する C D R 2 をさらに含んでなってもよい。

#### 【 0 0 3 0 】

抗原認識コンストラクトは、さらなる実施形態では、T C R 結合断片を含んでなっても

50



よく、前記結合断片は、任意選択的に、配列番号 1、2、3、または 7、8、9 または 13、14、15、または 19、20、21、または 25、26、27 または 31、32、33 のアミノ酸配列を有する CDR1 ~ CDR3 配列から選択される CDR1 ~ CDR3 を含んでなる。

#### 【0031】

本発明のさらなる実施形態では、本明細書で前述した抗原認識コンストラクトは、少なくとも 1 つの TCR 鎖配列および 1 つの TCR 鎖配列から構成される、TCR またはその断片であり、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列を有する CDR1 ~ CDR3 配列を含んでなり、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 7 ~ 9 のアミノ酸配列を有する CDR1 ~ CDR3 配列を含んでなり；または前記 TCR 鎖配列は、配列番号 13 ~ 15 のアミノ酸配列を有する CDR1 ~ CDR3 配列を含んでなり、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 19 ~ 21 のアミノ酸配列を有する CDR1 ~ CDR3 配列を含んでなり；または前記 TCR 鎖配列は、配列番号 25 ~ 27 のアミノ酸配列を有する CDR1 ~ CDR3 配列を含んでなり、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 31 ~ 33 のアミノ酸配列を有する CDR1 ~ CDR3 配列を含んでなる。

10

#### 【0032】

本発明のさらなる実施形態では、本明細書で前述した抗原認識コンストラクトは、少なくとも 1 つの TCR 鎖配列および 1 つの TCR 鎖配列を含んでなる、TCR またはその断片であり、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する可変領域配列を含んでなり、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する可変領域配列を含んでなり、または前記 TCR 鎖配列は、配列番号 16 のアミノ酸配列を有する可変領域配列を含んでなり、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 22 のアミノ酸配列を有する可変領域配列を含んでなり、または前記 TCR 鎖配列は、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する可変領域配列を含んでなり、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する可変領域配列を含んでなる。

20

#### 【0033】

本発明のさらなる実施形態では、本明細書で前述した抗原認識コンストラクトは、TCR またはその断片であり、配列番号 5、11、17、23、29、および 35 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する TCR 定常領域をさらに含んでなり、好ましくは前記 TCR は、少なくとも、1 つの TCR および 1 つの TCR 鎖配列から構成され、前記 TCR 鎖配列は、配列番号 5、17、および 29 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する定常領域を含んでなる。

30

#### 【0034】

配列番号 6 のアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する第 1 の TCR 鎖と、配列番号 12 のアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する第 2 の TCR 鎖とを含んでなる、本明細書で前述した抗原認識コンストラクトもまた開示される。本発明はまた、配列番号 18 のアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する第 1 の TCR 鎖と、配列番号 24 のアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する第 2 の TCR 鎖とを含んでなる TCR も提供する。さらなる実施形態では、本発明は、TCR である抗原認識コンストラクトを提供し、それは、配列番号 30 のアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する第 1 の TCR 鎖と、配列番号 36 のアミノ酸配列と少なくとも 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有する第 2 の TCR 鎖とを含んでなる。

40

50

## 【0035】

本明細書の用法では、「マウス」または「ヒト」という用語は、抗原認識コンストラクト、またはTCR、または本明細書に記載のTCRの任意の構成要素（例えば、相補性決定領域（CDR）、可変領域、定常領域、鎖、および/または鎖）に言及する場合、それぞれ、マウスまたはヒト非再構成型TCR遺伝子座に由来するTCR（またはその構成要素）を意味する。

## 【0036】

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

10

## 【0037】

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

## 【0038】

本発明のTCRは、一本鎖TCR（scTCR）として提供されてもよい。scTCRは、第1のTCR鎖（例えば、鎖）の可変領域のポリペプチドと、全（完全長）第2のTCR鎖（例えば、鎖）のポリペプチドとを含んでなり得て、または逆もまた然りである。さらに、scTCRは、任意選択的に、2つ以上のポリペプチドと一緒に連結する、1つまたは複数のリンカーを含んでなり得る。リンカーは、例えば、本明細書に記載されるように、2つの一本鎖と一緒に結合するペプチドであり得る。また、IL-2、IL-7またはIL-15などのヒトサイトカインに融合された本発明のscTCRも提供される。

20

## 【0039】

本発明による抗原認識コンストラクトはまた、少なくとも2つのscTCR分子を含んでなる多量体複合体の形態で提供され得て、前記scTCR分子は、それぞれ、少なくとも1つのビオチン部分に融合され、前記scTCRは、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用によって相互連結され前記多量体複合体が形成できるようにする。多量体TCRを作製するための同様のアプローチもまた可能であり、本開示に含まれる。本発明のscTCRを2つを超えて含んでなる、より高次の多量体複合体もまた提供される。

## 【0040】

30

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

## 【0041】

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

40

## 【0042】

したがって、本発明の抗原認識コンストラクトが、ヒト白血球抗原（HLA）依存的様式、好ましくはHLA-A02依存的様式で、その抗原を認識することもまた好ましい。「HLA依存的様式」という用語は、本発明の文脈では、抗原ペプチドが前記HLAによって提示される場合にのみ、抗原認識コンストラクトが抗原に結合することを意味する

50

。

## 【 0 0 4 3 】

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

## 【 0 0 4 4 】

例えば、実施例セクションおよび表 1 に記載の R 4 P 1 D 1 0、R 4 P 3 F 9、および R 4 P 3 H 3 から選択される T C R のいずれか 1 つなどの、本明細書に記載の T C R（またはその機能性変異型）のいずれかの機能性部分を含んでなるポリペプチドもまた、本発明によって提供される。「ポリペプチド」という用語は、本明細書の用法では、オリゴペプチドを含み、1 つまたは複数のペプチド結合によって連結されたアミノ酸の一本鎖を指す。本発明のポリペプチドに関して、機能性部分は、機能性部分が、好ましくは本明細書の表 2 で開示されるような C O L 6 A 3 抗原およびペプチド A 1 ~ A 9（配列番号 5 9 ~ 6 7）に特異的に結合するという条件で、それがその一部である連続アミノ酸を含んでなる T C R（またはその変機能性異型）の任意の部分であり得る。「機能性部分」という用語は、T C R（またはその機能性変異型）に関して使用される場合、本発明の T C R（またはその機能性変異型）の任意の部分または断片を指し、その部分または断片は、それがその一部である（親 T C R またはその親機能性変異型）、T C R（またはその機能性変異型）の生物学的活性を保持する。機能性部分は、例えば、T C R（またはその機能性変異型）の部分を含む親 T C R（またはその機能性変異型）と同様の程度に、同一程度に、またはより高い程度に、C O L 6 A 3 抗原に（H L A - A 2 依存的様式で）特異的に結合する能力を保持し、またはがんを検出し、治療し、または予防する。親 T C R（またはその機能性変異型）に関して、機能性部分は、例えば、約 1 0 %、2 5 %、3 0 %、5 0 %、6 8 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、またはそれ以上の親 T C R の可変配列（またはその機能性変異型）を含んでなり得る。

## 【 0 0 4 5 】

機能性部分は、部分のアミノまたはカルボキシ末端に、または両端端に、追加的なアミノ酸を含んでなり得て、追加的なアミノ酸は、親 T C R またはその機能性変異型のアミノ酸配列中に見いだされない。望ましくは、追加的なアミノ酸は、例えば、C O L 6 A 3 抗原に特異的に結合する；および/またはがん検出し、がんを治療または予防するなどの能力を有する、機能性部分の生物学的機能に干渉しない。より望ましくは、追加的なアミノ酸は、親 T C R またはその機能性変異型の生物学的活性と比較して、生物学的活性を增強する。

## 【 0 0 4 6 】

ポリペプチドは、本発明の T C R またはその機能性変異型の鎖および/または鎖の可変領域の C D R 1、C D R 2、および（好ましくは）C D R 3 の 1 つまたは複数を含んでなる機能性部分などの、本発明の T C R またはその機能性変異型の鎖および鎖のどちらかまたは双方の機能性部分を含んでなり得る。本発明の一実施形態では、ポリペプチドは、配列番号 3、9、1 5、2 1、2 7、および 3 3 のアミノ酸配列を含んでなる機能性部分（本発明の T C R の可変領域の C D R 3）、またはそれらの組み合わせを含んでなり得る。本発明の一実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えば、上記の C D R 領域の組み合わせを含んでなる、本発明の T C R の可変領域またはその機能性変異型を含んでなり得る。この点において、ポリペプチドは、配列番号 4、1 0、1 6、2 2、2 8、および 3 4 のいずれかのアミノ酸配列（本発明の T C R の鎖または鎖の可変領域）を含んでなり得る。

## 【 0 0 4 7 】

場合によっては、本発明のコンストラクトは、配列番号 1 ~ 3 6 のいずれかに記載の配列（C D R 配列、定常領域および可変領域、および完全長配列）、またはその機能性断片を含んでなる、1 つまたは 2 つのポリペプチド鎖を含んでなってもよく、例えば、免疫グロブリンまたはその一部をコードするアミノ酸配列などのその他のアミノ酸配列をさらに

含んでなり、本発明のタンパク質は融合タンパク質であり得る。この点において、本発明はまた、少なくとも1つの他のポリペプチドと共に、本明細書に記載される本発明のポリペプチドの少なくとも1つを含んでなる融合タンパク質も提供する。もう1つのポリペプチドは、融合タンパク質の別個のポリペプチドとして存在し得るか、または本明細書に記載される本発明のポリペプチドの1つと共にフレーム（タンデム）で発現されるポリペプチドとして存在し得る。もう1つのポリペプチドとしては、免疫グロブリン、CD3、CD4、CD8、MHC分子、例えば、CD1a、CD1b、CD1c、CD1dなどのCD1分子をはじめとするが、これに限定されるものではない、任意のペプチド分子またはタンパク分子、またはその一部が挙げられる。

#### 【0048】

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

#### 【0049】

既に上述したように、本発明のTCRの結合機能性は、抗体のフレームワークにおいて提供されてもよい。その様々な文法的形態における「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子を指すために、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗原結合部位またはパラトープを含有する分子を指すために、本明細書で使用される。このような分子は、免疫グロブリン分子の「抗原結合断片」とも称される。本発明は、本明細書に記載の抗原に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合部分をさらに提供する。抗体は、当該技術分野で公知の任意のタイプの免疫グロブリンであり得る。例えば、抗体は、例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgMなどの任意のアイソタイプであり得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。抗体は、例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒトなどの哺乳類から単離されたおよび/または精製された抗体などの天然抗体であり得る。代案としては、抗体は、例えば、ヒト化抗体またはキメラ抗体などの遺伝子改変抗体であり得る。抗体は、単量体または重合体形態であり得る。

#### 【0050】

本発明はまた、本明細書に記載の任意の抗体の抗原結合部分を提供する。抗原結合部分は、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、dsFv、sFv、二特異性抗体、および三特異性抗体などの少なくとも1つの抗原結合部位を有する任意の部分であり得る。合成ペプチドを介して軽抗体鎖のVドメインに連結される抗体重鎖の可変(V)ドメインを含んでなる切断型Fab断片からなる、一本鎖可変領域断片(sFv)抗体フラグメントが、ルーチン組換えDNA技術を用いて生成され得る。同様に、ジスルフィド安定化可変領域断片(dsFv)は、組換えDNA技術によって調製され得るが、本発明の抗体断片は、これらの例示

10

20

30

40

50

的なタイプの抗体断片に限定されない。また、抗体、またはその抗原結合部分は、例えば、放射性同位体、フルオロフォア（例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン（FITC）、フィコエリトリン（PE））、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、および元素粒子（例えば、金粒子）などの検出可能な標識を含んでなるように修飾され得る。場合によっては、TCR CDR3配列は、配列番号3、9、15、21、27、および33に提供されるCDR9配列と比較して、好ましくは3つ以下のアミノ酸残基で、好ましくは2つのみ、最も好ましくは1つのみのアミノ酸位置で、わずかに修飾されてもよい。好ましくは、抗体は、表1で本発明のTCRについて示されるように、CDR3、好ましくは、組み合わされたCDR1～CDR3領域の全てを含んでなる。

10

#### 【0051】

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

20

#### 【0052】

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

30

40

#### 【0053】

上記の問題は、本発明の抗原認識コンストラクトをコードする核酸、または前述のタンパク質またはポリペプチドコンストラクトのいずれかによってさらに解決される。核酸は、好ましくは、(a) 本発明による抗原認識コンストラクトをコードする鎖を有し；(b) (a) の鎖に相補的な鎖を有し；(c) ストリンジェントな条件下で(a) または(b) に記載の分子にハイブリダイズする鎖を有する。ストリンジェントな条件は、特にSambrook et al, "Molecular Cloning" から当業者に知られている。それに加えて、核酸は、タンパク質に対応する核酸配列を発現するために、特に

50

哺乳類／ヒト細胞における発現のために必要なさらなる配列を任意選択的に有する。使用される核酸は、細胞内のペプチドに対応する核酸配列の発現を可能にするのに適したベクターに含まれ得る。しかし、核酸は、それら自体がそれらの細胞表面に対応タンパク質を産生するように、樹状細胞などの古典的抗原提示細胞に限定されなくてもよい抗原提示細胞を形質転換するためにも使用され得る。

#### 【 0 0 5 4 】

「核酸」は、本明細書の用法では、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸分子」を含み、一般にDNAまたはRNAのポリマーを意味し、それは、合成されたまたは天然原料から取得された（例えば、単離および／または精製された）一本鎖または二本鎖であり得て、天然、非天然または改変ヌクレオチドを含有し得て、未修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間に見いだされるリン酸ジエステルの代わりに、ホスホロアミデート結合またはホスホロチオエート結合などの天然、非天然または改変ヌクレオチド間結合を含有し得る。

10

#### 【 0 0 5 5 】

好ましくは、本発明の核酸は組換え体である。本明細書の用法では、「組換え体」という用語は、( i ) 天然または合成核酸断片を生きている細胞内で自己複製し得る核酸分子に連結することで、生きている細胞の外部に構築される分子、または( i i ) 上記( i ) に記載されるものの複製から生じる分子を指す。本明細書の目的のために、自己複製は生体外複製または生体内複製であり得る。核酸は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、またはタンパク質、またはその機能性部分または機能性変異型のいずれかをコードする任意のヌクレオチド配列を含んでなり得る。

20

#### 【 0 0 5 6 】

さらに、本発明は、上記の本発明による核酸を含んでなるベクターを提供する。望ましくは、ベクターは、発現ベクターまたは組換え発現ベクターである。「組換え発現ベクター」という用語は、本発明の文脈では、適切な宿主細胞におけるmRNA、タンパク質またはポリペプチドの発現を可能にする核酸コンストラクトを指す。本発明の組換え発現ベクターは、任意の適切な組換え発現ベクターであり得て、任意の適切な宿主を形質転換または形質移入するために使用され得る。適切なベクターとしては、例えば、プラスミドおよびウイルスなどの、増殖および拡張のために、または発現またはその双方のために、設計されたものなどのベクターが挙げられる。動物発現ベクターの例としては、pEUK-C1、pMAM、およびpMAMneoが挙げられる。好ましくは、組換え発現ベクターは、例えば、レトロウイルスベクターなどのウイルスベクターである。組換え発現ベクターは、その中にベクターが導入され、その中で本発明の核酸の発現が実施されてもよい、宿主細胞のタイプ（例えば、細菌、真菌、植物、または動物）に特異的な、転写および翻訳開始および終止コドンなどの制御配列を含んでなる。さらに、本発明のベクターは、形質転換または形質移入された宿主の選択を可能にする、1つまたは複数のマーカー遺伝子を含んでもよい。組換え発現ベクターは、天然または規範的プロモーターを含んでなり得て、それは本発明のコンストラクトをコードするヌクレオチド配列に、または本発明のコンストラクトをコードするヌクレオチド配列と相補的なまたはそれとハイブリダイズするヌクレオチド配列に、作動可能に連結される。プロモーターの選択肢としては、例えば、強いプロモーター、弱いプロモーター、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーター、および発達特異的プロモーターが挙げられる。プロモーターは、非ウイルスプロモーターまたはウイルスプロモーターであり得る。本発明の組換え発現ベクターは、一過性発現、安定発現のどちらか、またはその双方のために設計され得る。また、組換え発現ベクターは、構成的発現または誘導的発現のために作製され得る。

30

40

#### 【 0 0 5 7 】

本発明はまた、本発明による抗原認識コンストラクトを含んでなる宿主細胞にも関する。具体的には、本発明の宿主細胞は、上記の本明細書中に記載されるような核酸またはベクターを含んでなる。宿主細胞は、例えば、植物、動物、真菌、または藻類などの真核細胞であり得て、または例えば、細菌または原虫など原核細胞であり得る。宿主細胞は、培

50

養細胞または初代細胞、すなわち、例えばヒトなどの生物から直接単離された細胞であり得る。宿主細胞は、接着細胞または懸濁細胞、すなわち、懸濁状態で増殖する細胞であり得る。組換えTCR、ポリペプチド、またはタンパク質を生成する目的のために、宿主細胞は、好ましくは哺乳類細胞である。最も好ましくは、宿主細胞はヒト細胞である。宿主細胞は任意の細胞型であり得て、任意の種類型に由来し得て、任意の発達段階であり得るものの、宿主細胞は好ましくは、末梢血白血球(PBL)または末梢血単核細胞(PBMC)である。より好ましくは、宿主細胞はT細胞である。T細胞は、例えば、一次T細胞などの培養T細胞などの任意のT細胞；または例えば、ジャーカット、SupT1などの培養T細胞株由来のT細胞；または哺乳類から得られたT細胞、好ましくはヒト患者由来のT細胞またはT細胞前駆体であり得る。哺乳類から得られた場合、T細胞は、血液、骨髓、リンパ節、胸腺、またはその他の組織または体液をはじめとするが、これに限定されるものではない多数の起源から得られ得る。T細胞はまた、富化または精製され得る。好ましくは、T細胞はヒトT細胞である。より好ましくは、T細胞はヒトから単離されたT細胞である。T細胞は、CD4陽性および/またはCD8陽性、CD4陽性ヘルパーT細胞、例えば、Th1およびTh2細胞、CD8陽性T細胞(例えば、細胞傷害性T細胞)、腫瘍浸潤性細胞(TIL)、記憶T細胞、未感作T細胞などをはじめとするが、これに限定されるものではない、任意のT細胞型であり得て、任意の発達段階のものであり得る。好ましくは、T細胞は、CD8陽性T細胞またはCD4陽性T細胞である。

10

【0058】

好ましくは、本発明の宿主細胞は、リンパ球、好ましくはCD4陽性またはCD8陽性T細胞などのTリンパ球である。宿主細胞は、さらに好ましくは、COL6A3発現腫瘍細胞に特異的な腫瘍反応性T細胞である。

20

【0059】

本発明のさらなる一態様は、医療で使用するための本明細書で開示された抗原認識コンストラクト、核酸、ペプチド、医薬組成物および/または宿主細胞に関する。医療における使用は、好ましい一実施形態では、悪性または良性腫瘍疾患などの腫瘍疾患の診断、予防および/または治療における使用を含む。腫瘍疾患は、例えば、前記腫瘍疾患のがんまたは腫瘍細胞におけるCOL6A3の発現によって特徴付けられる腫瘍疾患である。

【0060】

抗原認識コンストラクトおよびそれに由来するその他の物質の前述の医療用途に関して、治療および/または診断されるがんは、急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、肺泡横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門がん、肛門管がん、または肛門直腸がん、眼がん、肝臓内胆管がん、関節がん、頸部がん、胆嚢がん、または胸膜がん、鼻がん、鼻腔がん、または中耳がん、口腔がん、膣がん、外陰部がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、口腔咽頭がん、卵巣がん、陰茎がん、睪臓がん、腹膜がん、大腸がん、および腸間膜がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、皮膚がん、小腸がん、軟部組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、尿管がん、および膀胱がんなどの任意のがんであり得る。好ましいがんは、子宮頸部、口腔咽頭、肛門、肛門管、肛門直腸、膣、外陰部、または陰茎のがんである。特に好ましいがんは、胃腸がんおよび胃がんなどのCOL6A3陽性がんである。

30

40

【0061】

本発明のコンストラクト、タンパク質、TCR抗体、ポリペプチドおよび核酸は、特に免疫療法、好ましくは養子T細胞療法における使用のためのものである。本発明の化合物の投与は、例えば、前記患者への本発明のT細胞の注入を伴い得る。好ましくは、このようなT細胞は患者の自己T細胞であり、本発明の核酸または抗原認識コンストラクトで生体外形質導入されたものである。

【0062】

国際公開第2016/011210号パンフレットは、NK細胞およびT細胞をはじめ

50

とする養子療法のための操作された細胞、細胞を含有する組成物、およびそれらを対象に投与する方法を開示する。細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）および共刺激受容体などの抗原に特異的に結合する、遺伝子操作された抗原受容体を含有し得る。

【0063】

本発明の目的はまた、

a．適切な宿主細胞を提供するステップと、  
b．本明細書で開示される発明による抗原認識コンストラクトをコードするコード配列を含んでなる遺伝子コンストラクトを提供するステップと、  
c．前記遺伝子コンストラクトを前記適切な宿主細胞に導入するステップと、  
d．前記適切な宿主細胞によって前記遺伝子コンストラクトを発現させるステップと  
を含んでなる、細胞株を発現するCOL6A3特異的抗原認識コンストラクトを製造する方法によっても解決される。

10

【0064】

方法はさらに、前記適切な宿主細胞上で、前記抗原認識コンストラクトを細胞表面提示させるステップをさらに含んでなってもよい。

【0065】

その他の好ましい実施形態では、遺伝子コンストラクトは、前記コード配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含んでなる、発現コンストラクトである。

【0066】

好ましくは、前記抗原認識コンストラクトは、哺乳類起源、好ましくはヒト起源である。本発明の方法で使用するための好ましい適切な宿主細胞は、ヒト細胞、特にヒトTリンパ球などの哺乳類細胞である。本発明で使用するためのT細胞は、上記の本明細書中で詳述される。

20

【0067】

前記抗原認識コンストラクトが修飾TCRであり、前記修飾が標識または治療活性物質などの機能ドメインの付加である実施形態もまた、本発明に包含される。さらに、内在性膜貫通領域の代わりに代案の膜アンカードメインなどの代案のドメインを有する、TCRが包含される。

【0068】

望ましくは、遺伝子コンストラクトを前記適切な宿主細胞に導入するための形質移入システムは、レトロウイルスベクターシステムである。このようなシステムは、当業者に周知である。

30

【0069】

一実施形態における、細胞からの抗原認識コンストラクトの単離および精製の追加的方法ステップ、任意選択的に、T細胞中の翻訳された抗原認識コンストラクト断片の再構成もまた、本発明に含まれる。

【0070】

本発明の代案の態様では、T細胞は、上記の本明細書に記載されるように、腫瘍細胞に特異的であり高い結合活性を有するT細胞受容体（TCR）を製造する方法によって提供され、入手され、または入手可能である。このようなT細胞は、本発明の方法で 사용되는宿主細胞、例えば、ヒトまたは非ヒトT細胞、好ましくはヒトTCRに依存する。

40

【0071】

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質（その機能性変異型を含む）、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞（その集団を含む）、および抗体（その抗原結合部分を含む）は、単離および/または精製され得る。「単離された」という用語は、本明細書の用法では、その天然環境から取り出されていることを意味する。そして「精製された」という用語は、本明細書の用法では、純度が上昇していることを意味し、「純度」は相対的用語であり、必ずしも絶対的な純度として解釈されるべきではない。例えば、純度は、少なくとも約50%であり得て、60%、70%、80%、90%、95%を超え得て、または100%であり得る。

50



## 【 0 0 7 2 】

本明細書で以後、集合的に「本発明のＴＣＲ材料」と称される、本発明の抗原認識コンストラクト、ＴＣＲ、ポリペプチド、タンパク質（その機能性変異型を含む）、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞（その集団を含む）、および抗体（その抗原結合部分を含む）は、医薬組成物などの組成物に調合され得る。この点において、本発明は、本明細書に記載の抗原認識コンストラクト、ＴＣＲ、ポリペプチド、タンパク質、機能性部分、機能性変異型、核酸、発現ベクター、宿主細胞（その集団を含む）、および抗体（その抗原結合部分を含む）のいずれかと、薬学的に許容可能な担体、賦形剤および／または安定剤とを含んでなる、医薬組成物を提供する。本発明のＴＣＲ材料のいずれかを含有する本発明の医薬組成物は、例えば、ポリペプチドおよび核酸などの２つ以上の発明のＴＣＲ材料、または、２つ以上の異なるＴＣＲ（その機能性部分および機能性変異型を含む）を含んでなり得る。代案としては、医薬組成物は、例えば、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、ピンクリスチンなどの化学療法剤のような別の薬学的に活性な薬剤または薬物と組み合わせられた、発明のＴＣＲ材料を含んでなり得る。好ましくは、担体は、薬学的に許容可能な担体である。医薬組成物に関して、担体は、検討中の特定の本発明のＴＣＲ材料のために従来使用されているもののいずれかであり得る。このような薬学的に許容される担体は当業者に周知であり、一般に容易に入手可能である。薬学的に許容可能な担体は、使用条件下で有害な副作用または毒性がないものであることが好ましい。

10

20

## 【 0 0 7 3 】

したがって、本明細書に記載される本発明の任意の生成物および本発明のＴＣＲ材料、具体的には任意のタンパク質、核酸または宿主細胞を含んでなる医薬組成物もまた提供される。好ましい実施形態では、医薬組成物は、免疫療法、好ましくは養子細胞療法のためのものである。

## 【 0 0 7 4 】

好ましくは、本発明のＴＣＲ材料は、例えば静脈内などの注射によって投与される。本発明のＴＣＲ材料が本発明のＴＣＲ（またはその機能性変異型）を発現する宿主細胞である場合、注射用細胞のための薬学的に許容可能な担体は、例えば、生理食塩水（水中の約 0.90% w/v の NaCl、水中の約 300 mOsm/L の NaCl、または水 1 リットルあたり約 9.0 g の NaCl）、NORMOSOLR 電解質溶液（Abbott, Chicago, IL）、PLASMA-LYTE A（Baxter, Deerfield, IL）、水中の約 5% デキストロース、または乳酸リンゲル液などの任意の等張性担体を含んでもよい。一実施形態では、薬学的に許容可能な担体にはヒト血清卵白が添加されている。

30

## 【 0 0 7 5 】

本発明の目的のために、投与される本発明のＴＣＲ材料の量または用量（例えば、本発明のＴＣＲ材料が１つまたは複数の細胞である場合は細胞数）は、妥当な時間枠にわたり対象または動物において、例えば、治療的または予防的応答などの影響を及ぼすのに十分であってもよい。例えば、本発明のＴＣＲ材料の用量は、投与時から例えば 12 ~ 24 時間以上などの約 2 時間以上の期間において、がん抗原に結合し、またはがんを検出し、治療または予防するのに十分であるべきである。特定の実施形態では、期間はさらに長くなり得る。用量は、特定の本発明のＴＣＲ材料の有効性および動物（例えば、ヒト）の病状、ならびに治療される動物（例えば、ヒト）の体重によって決定されるであろう。

40

## 【 0 0 7 6 】

本発明の医薬組成物、ＴＣＲ（それらの機能的変異型を含む）、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、または細胞集団は、がんまたは COL6A3 陽性前がんを治療または予防する方法で使用され得ることが検討される。本発明のＴＣＲ（およびその機能性変異型）は、COL6A3 抗原と特異的に結合すると考えられ、その結果、ＴＣＲ（または関連する発明のポリペプチドまたはタンパク質およびその機能性

50

変異型)は、細胞によって発現されると、本発明のCOL6A3抗原を発現する標的細胞に対する免疫応答を媒介できる。この点において、本発明は、本明細書に記載の医薬組成物、特にTCR(およびその機能性変異型)である抗原認識コンストラクト、ポリペプチド、またはタンパク質;本明細書に記載のTCR(およびその機能性変異型)とポリペプチドとタンパク質とのいずれかをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、任意の核酸または組換え発現ベクター;または本明細書に記載の本発明のコンストラクト(およびその機能性変異型)またはポリペプチドまたはタンパク質のいずれかをコードする組換えベクターを含んでなる、任意の宿主細胞または細胞集団のいずれかを哺乳類において病状を治療または予防するのに有効な量で、哺乳類に投与するステップを含んでなる、哺乳類における病状、特にがんを治療または予防する方法を提供し、病状は、がん、好ましくはCOL6A3陽性がんである。

10

#### 【0077】

本発明で有用な薬学的に許容可能な担体または希釈剤の例としては、SPGA、炭水化物(例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、グルコース、デキストラン)、アルブミンまたはカゼインなどのタンパク質、ウシ乳清または脱脂乳などのタンパク質含有作用物質などの安定剤および緩衝剤(例えばリン酸緩衝液)が挙げられる。

#### 【0078】

「治療する」および「予防する」という用語、ならびにそれから生じる用語は、本明細書の用法では、必ずしも100%または完全な治療または予防を暗示しない。むしろ、当業者が潜在的利益または治療効果を有すると認識する、様々な程度の治療または予防がある。この点において、本発明の方法は、哺乳類における病状の任意の量の任意のレベルの治療または予防を提供し得る。さらに、本発明の方法によって提供される治療または予防は、例えば、治療または予防されるがんなどの1つまたは複数の病状または病状の症状の治療または予防を含み得る。例えば、治療または予防としては、腫瘍退縮の促進が挙げられる。また、本明細書の目的のために、「予防」は、病状または症状またはその病状の発生を遅延させることを包含し得る。

20

#### 【0079】

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

30

#### 【0080】

a)細胞を前記対象から単離するステップと;  
b)細胞を本発明の抗原認識コンストラクトをコードする少なくとも1つのベクターで形質転換して、形質転換細胞を生成するステップと;  
c)形質転換細胞を増殖させて、複数の形質転換細胞を生成するステップと;  
d)複数の形質転換細胞を前記対象に投与するステップと  
を含んでなる、それを必要とする対象においてがんを治療する方法もまた提供される。

#### 【0081】

a)細胞を健常ドナーから単離するステップと;  
b)細胞を本発明の抗原認識コンストラクトをコードするベクターで形質転換して、形質転換細胞を生成するステップと;  
c)形質転換細胞を増殖させて、複数の形質転換細胞を生成するステップと;  
d)複数の形質転換細胞を前記対象に投与するステップと  
を含んでなる、それを必要とする対象においてがんを治療する方法もまた提供される。

40

#### 【0082】

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

#### 【0083】

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

50

される。

【0084】

哺乳類において病状の存在を検出する方法もまた提供される。方法は、(i)哺乳類由来の1つまたは複数の細胞を含んでなるサンプルを、本発明のTCR(およびその機能性変異型)、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、抗体、またはその抗原結合部分、または本明細書に記載される医薬組成物のいずれかに接触させ、それによって複合体を形成し、複合体を検出するステップを含んでなり、複合体の検出は、哺乳類における病状の存在の指標となり、病状は、COL6A3陽性悪性腫瘍などのがんである。

【0085】

哺乳類における病状を検出する本発明の方法に関して、細胞サンプルは、全細胞、その溶解産物、または例えば、核または細胞質画分、全タンパク質画分、または核酸画分などのホールセル溶解産物の画分を含んでなる、サンプルであり得る。

【0086】

本発明の検出方法の目的のために、接触は哺乳類に関して生体外または生体内で行われ得る。好ましくは、接触は生体外である。

【0087】

また、複合体の検出は、当該技術分野で公知の多数の様式を通じて行い得る。例えば、本明細書に記載される、本発明の抗原認識コンストラクト(およびその機能性変異型)、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、または抗体またはTCR、またはその抗原結合部分は、例えば、放射性同位体、フルオロフォア(例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)、フィコエリトリン(PE))、酵素(例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ)、および元素粒子(例えば、金粒子)などの検出可能な標識で標識され得る。

【0088】

宿主細胞または細胞集団が投与される本発明の方法の目的のために、細胞は哺乳類にとって同種異系または自己由来の細胞であり得る。好ましくは、細胞は哺乳類に対して自己由来である。

【0089】

本発明のTCR材料の前述の医療用途に関して、治療および/または診断されるがんは、急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、肺胞横紋筋肉腫、骨がん、脳がん、乳がん、肛門がん、肛門管がん、または肛門直腸がん、眼がん、肝臓内胆管がん、関節がん、頸部がん、胆嚢がん、または胸膜がん、鼻がん、鼻腔がん、または中耳がん、口腔がん、膣がん、外陰部がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性がん、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、消化管カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、肝臓がん、肺がん、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、口腔咽頭がん、卵巣がん、陰茎がん、膵臓がん、腹膜がん、大網がん、および腸間膜がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎臓がん、皮膚がん、小腸がん、軟部組織がん、胃がん、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、尿管がん、および膀胱がんのいずれかなどの任意のがんであり得る。好ましいがんは、子宮頸部、口腔咽頭、肛門、肛門管、肛門直腸、膣、外陰部、または陰茎のがんである。特に好ましいがんは、胃腸がんまたは胃がんなどのCOL6A3陽性がんである。

【0090】

一般に、本発明は、本発明によって開示されるような抗原認識コンストラクト、核酸、ベクター、医薬組成物および/または宿主細胞を投与するステップを含んでなる、腫瘍または腫瘍疾患に罹患している対象を治療する方法を提供する。好ましくは、対象は、このような治療を必要とする対象である。好ましい実施形態では対象は、COL6A3陽性の腫瘍または腫瘍疾患に罹患している哺乳類対象、好ましくはヒト患者である。

【0091】

添付の図面および配列を参照しながら、本発明を以下の実施例においてさらに説明する

10

20

30

40

50

が、それでもなおそれらに限定されるものではない。本発明の目的で、本明細書で引用される全ての参考文献は、その内容全体が参照により援用される。

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】COL6A3-002ペプチド（配列番号58）、様々なCOL6A3-002の1～9位アラニンまたはグリシン置換変異型（配列番号59～67）、またはNYESO1-001対照ペプチド（配列番号68）が負荷された、K562-A2標的細胞（Hirano N. et al; Blood. 2006 Feb 15; 107(4): 1528-36を参照されたい）との同時インキュベーション後における、それぞれTCR R4P1D10の および 鎖RNA（表1）で電気穿孔された、1人のドナーのヒト初代CD8+T細胞のIFN 放出（左軸）およびHLA-A\*02/COL6A3-002四量体染色（右軸）である。

10

【図2】標的細胞COL6A3-002ペプチド（配列番号58）、同種であるが無関係のペプチドAGRN-001、CLASP-001、COL6A1-001、COL6A2-001、COL6A3-006、COL6A3-008、COL6A3-014、VWA2-001、VWF-001（配列番号49～57）またはNYESO1-001対照ペプチド（配列番号68）が負荷された、K562-A2との同時インキュベーション後における、それぞれTCR R4P1D10の および 鎖RNA（表1）で電気穿孔された、1人のドナーのヒト初代CD8+T細胞のIFN 放出（左軸）およびHLA-A\*02/COL6A3-002四量体染色（右軸）である。電気穿孔CD8+T細胞単独（E単独）が、対照の役割を果たす。

20

【0093】

【図3】それぞれ、TCR R4P1D10またはRNA NYESO1-001特異的対照TCR 1G4の および 鎖（表1）で電気穿孔された、J.RT3-T3.5細胞のHLA-A\*02/COL6A3-002四量体およびHLA-A\*02/NYESO1-001四量体染色である。模擬電気穿孔J.RT3-T3.5細胞が、対照の役割を果たす。

【図4】それぞれ、TCRR4P1D10orNYESO1-001特異的対照TCR1G4（表1）の および 鎖RNAで電気穿孔された、SUP-T1細胞のHLA-A\*02/COL6A3-002四量体およびHLA-A\*02/NYESO1-001四量体染色である。模擬電気穿孔SUP-T1細胞が、対照の役割を果たす。

30

【図5】それぞれ、TCR R4P1D10またはNYESO1-001特異的対照TCR1G4（表1）の および 鎖RNAで電気穿孔された、1人のドナーのヒト初代CD8+T細胞のHLA-A\*02/COL6A3-002四量体およびHLA-A\*02/NYESO1-001四量体染色である。模擬電気穿孔CD8+T細胞が、対照の役割を果たす。

【図6】それぞれ、標的細胞COL6A3-002ペプチド（配列番号58）、様々なCOL6A3-002の1～9位アラニンまたはグリシン置換変異型（配列番号59～67）、またはNYESO1-001対照ペプチド（配列番号68）が負荷された、K562-A2との同時インキュベーション後における、TCR R4P3F9（表1）の および 鎖RNAで電気穿孔された、1人のドナーのヒト初代CD8+T細胞のIFN 放出である。

40

【図7】それぞれ、標的細胞COL6A3-002ペプチド（配列番号58）、同種であるが無関係のペプチドAGRN-001、CLASP-001、COL6A1-001、COL6A2-001、COL6A3-006、COL6A3-008、COL6A3-014、VWA2-001、VWF-001（配列番号49～57）またはNYESO1-001対照ペプチド（配列番号68）が負荷されたK562-A2との同時インキュベーション後における、TCR R4P3F9（表1）の および 鎖RNAで電気穿孔された1人のドナーのヒト初代CD8+T細胞のIFN 放出である。模擬電気穿孔CD8+T細胞（E単独）が、対照の役割を果たす。

50

【図 8】それぞれ、TCR R4P3F9またはNYSEO1-001特異的対照TCR 1G4の および 鎖RNA(表1)で電気穿孔された、J.RT3-T3.5細胞のHLA-A\*02/CO L6A3-002四量体およびHLA-A\*02/NY ESO1-001四量体染色である。模擬電気穿孔J.RT3-T3.5細胞が、対照の役割を果たす。

【図 9】それぞれ、TCR R4P3F9またはNYSEO1-001特異的対照TCR 1G4の および 鎖RNA(表1)で電気穿孔された、SUP-T1細胞のHLA-A\*02/CO L6A3-002四量体およびHLA-A\*02/NY ESO1-001四量体染色である。模擬電気穿孔SUP-T1細胞が、対照の役割を果たす。

【図 10】それぞれ、標的細胞CO L6A3-002ペプチド(配列番号58)、様々なCO L6A3-002の1~9位アラニンまたはグリシン置換変異型(配列番号59~67)またはNYSEO1-001対照ペプチド(配列番号68)が負荷されたK562-A2との同時インキュベーション後における、TCR R4P3H3の および 鎖RNA(表1)で電気穿孔された1人のドナーのヒト初代CD8+T細胞のIFN 放出である。

【図 11】それぞれ、標的細胞CO L6A3-002ペプチド(配列番号58)、同種であるが無関係のペプチドAGRN-001、CLASP-001、CO L6A1-001、CO L6A2-001、CO L6A3-006、CO L6A3-008、CO L6A3-014、VWA2-001、VWF-001(配列番号49~57)またはNYSEO1-001対照ペプチド(配列番号68)が負荷されたK562-A2との同時インキュベーション後における、TCR R4P3H3の および 鎖RNA(表1)で電気穿孔された1人のドナーのヒト初代CD8+T細胞のIFN 放出である。模擬電気穿孔CD8+T細胞(E単独)が、対照の役割を果たす。

【図 12】それぞれ、TCR R4P3H3またはNYSEO1-001特異的対照TCR 1G4の および 鎖RNA(表1)で電気穿孔された、SUP-T1細胞のHLA-A\*02/CO L6A3-002四量体およびHLA-A\*02/NY ESO1-001四量体染色である。模擬電気穿孔SUP-T1細胞が、対照の役割を果たす。

【0094】

表1: 本発明のTCR配列

【表 1 - 1】

配列番号:	TCR	鎖	領域	配列
1	R4P1D10	$\alpha$	CDR1	DRGSQS
2	R4P1D10	$\alpha$	CDR2	IY
3	R4P1D10	$\alpha$	CDR3	CAVNFHDKIIF
4	R4P1D10	$\alpha$	可変ドメイン	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQL NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVN
5	R4P1D10	$\alpha$	定常ドメイン	NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT FFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAG FNLLMTLRWSS
6	R4P1D10	$\alpha$	完全長	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQL NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAVNFHDKIIFGKGTRELHIL PNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSV

【表 1 - 2】

				YITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
7	R4P1D10	$\beta$	CDR1	SGDLS
8	R4P1D10	$\beta$	CDR2	YYNGEE
9	R4P1D10	$\beta$	CDR3	CASSVASAYGYTF
10	R4P1D10	$\beta$	可変ドメイン	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERAKGNILERFSAQ QFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSV
11	R4P1D10	$\beta$	定常ドメイン	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVEL SWWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF WQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWGRA DCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMV KRKDF
12	R4P1D10	$\beta$	完全長	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERAKGNILERFSAQ QFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSVASAYGYTFGSGTRLT VVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHV ELSWWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA TFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVIVSAEAWG RADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMV KRKDF
13	R4P3F9	$\alpha$	CDR1	DRGSQS
14	R4P3F9	$\alpha$	CDR2	IY
15	R4P3F9	$\alpha$	CDR3	CAAYSGAGSYQLTF
16	R4P3F9	$\alpha$	可変ドメイン	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQL NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCA
17	R4P3F9	$\alpha$	定常ドメイン	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVY ITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT FPPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
18	R4P3F9	$\alpha$	完全長	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQL NKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKGTKL SVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSII PEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
19	R4P3F9	$\beta$	CDR1	SGDLS
20	R4P3F9	$\beta$	CDR2	YYNGEE
21	R4P3F9	$\beta$	CDR3	CASSVESSYGYTF
22	R4P3F9	$\beta$	可変ドメイン	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERAKGNILERFSAQ QFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSV
23	R4P3F9	$\beta$	定常ドメイン	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVEL SWWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF

10

20

30

40

【表 1 - 3】

				WQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA DCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMV KRKDF
24	R4P3H9	$\beta$	完全長	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS PRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERFSAQ QFPDLHSELNLSLELGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTRLT VVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHV ELSWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSA TFWQNPVHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG RADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMA MVKRDF
25	R4P3H3	$\alpha$	CDR1	DRGSQS
26	R4P3H3	$\alpha$	CDR2	IY
27	R4P3H3	$\alpha$	CDR3	CAVKAGNQFYF
28	R4P3H3	$\alpha$	可変ドメイン	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQL NKASQYVSLIIRDSQPSDSATYLCAV
29	R4P3H3	$\alpha$	定常ドメイン	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKSDSVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT FFPSPESCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAG FNLLMTLRLWSS
30	R4P3H3	$\alpha$	完全長	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLN CTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQL NKASQYVSLIIRDSQPSDSATYLCAVKAGNQFYFGTGTSLTVI PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKSDSVY YITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPED TFPSPESCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
31	R4P3H3	$\beta$	CDR1	SGHVS
32	R4P3H3	$\beta$	CDR2	FQNEAQ
33	R4P3H3	$\beta$	CDR3	CASSLLTSGGDNEQFF
34	R4P3H3	$\beta$	可変ドメイン	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSQSPRYKVAKRQDVALRCD PISGHVSLFWYQQALGGPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFA ERPEGSVSTLKIQTQQEDSAVYLCASSL
35	R4P3H3	$\beta$	定常ドメイン	EDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVEL SWVWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF WQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA DCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMV KRKDSRG
36	R4P3H3	$\beta$	完全長	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSQSPRYKVAKRQDVALRCD PISGHVSLFWYQQALGGPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFA ERPEGSVSTLKIQTQQEDSAVYLCASSLLTSGGDNEQFFGPG TRLTVLEDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSA EAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSA VLMAMVKRDSRG

10

20

30

40

【表 1 - 4】

37	1G4	$\alpha$	CDR1	DSAIYN
38	1G4	$\alpha$	CDR2	IQS
39	1G4	$\alpha$	CDR3	CAVRPTSGGSYIPTF
40	1G4	$\alpha$	可変ドメイン	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQIPAALSVPEGENLVNCS FTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLD KSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AVR
41	1G4	$\alpha$	定常ドメイン	YIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVY ITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDT FFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLK VAG FNLLMTLRLWSS
42	1G4	$\alpha$	完全長	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVQIPAALSVPEGENLVNCS FTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLASLD KSSGRSTLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTS IVHPYIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNSI PEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
43	1G4	$\beta$	CDR1	MNHEY
44	1G4	$\beta$	CDR2	SVGAGI
45	1G4	$\beta$	CDR3	CASSYVGTGELFF
46	1G4	$\beta$	可変ドメイン	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVS RSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSY
47	1G4	$\beta$	定常ドメイン	EDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVEL S W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S E S Y Q Q G V L S A T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S R G
48	1G4	$\beta$	完全長	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSM TLQCA QDMNHEYMSWYRQDPGMGLRL IHYSVGAGITDQGEVPNGYNVS RSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVGTGELFFGEGSRL TVLEDLKNVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPH VELS W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y C L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S E S Y Q Q G V L S A T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S R G

【 0 0 9 5 】

表2：本発明のペプチド配列



【表 2】

ペプチドコード	配列	配列番号：
AGRN-001	ALLDGRVQL	49
CLASP1-001	RLLDGAFKL	50
COL6A1-001	ILLDGSASV	51
COL6A2-001	FLLDGSERL	52
COL6A3-006	FLFDGSANLV	53
COL6A3-008	FLFDGSANL	54
COL6A3-014	FLLDGSEGV	55
VWA2-001	FLLDGSNSV	56
VWF-001	FLLDGSSRL	57
COL6A3-002	FLLDGSANV	58
A1	ALLDGSANV	59
A2	FALDGSANV	60
A3	FLADGSANV	61
A4	FLLAGSANV	62
A5	FLLDASANV	63
A6	FLLDGAANV	64
A7	FLLDGSGNV	65
A8	FLLDGSAAV	66
A9	FLLDGSANA	67
NYES01-001	SLLMWITQV	68

10

20

30

## 【実施例】

## 【0096】

一態様では、アロ反応性設定を使用して自己免疫寛容を回避し、自己由来設定、すなわち、患者に由来するT細胞と比較してより高い結合活性を有する、T細胞をもたらす。このような設定の例としては、そのそれぞれが参照によりその内容全体が援用される、アロHLA反応性ペプチド特異的T細胞の生体外生成(Sadovnikova et al. 1998; Savage et al. 2004; Wilde et al. 2012)、およびヒトMHCまたはヒトTCRについて遺伝子組換えであるマウスの免疫化(Stanislawski et al. 2001; Li et al. 2010)が挙げられる。

40

## 【0097】

アロ反応性設定から高結合活性T細胞を単離するために、告知に基づく同意を得た後に、HLA-A\*02陰性健常ドナーからのPBMCを使用する。COL6A3-002を含有する、組換えピオチン化HLA-A\*02クラスI単量体およびA2蛍光性四量体は、MBLI(マサチューセッツ州のWoburn)から入手される。リン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈した抗CD20SAと共に、PBMCを室温で1時間培養し、洗浄して、ピオチン化HLA-A\*02/COL6A3-002単量体と共に室温で30分間培養し、洗浄して、24ウェルプレート内の002%ヒトAB血清添加RPMIに、 $3 \times 10^6$ 細胞/ウェルで播種する。インターロイキン7(IL-7; ミネソタ州ミネアポリスのR

50

& D systems) を 1 日目に  $10 \text{ ng/mL}$  で添加し、IL-2 (英国ヘアフィールドの Chiron) を 4 日目に  $10 \text{ U/mL}$  で添加した。5 週間にわたり、細胞を新鮮な PBMC で毎週再刺激し、応答性細胞と 1 : 1 の比で混合して、24 ウェルプレートに  $3 \times 10^6$  / ウェルで播種した。

#### 【0098】

高結合活性 T 細胞を得るために、およそ  $10^6$  の PBMC を HLA-A\*02/CO L6A3-002 四量体フィコエリトリン (PE) (MBL I から得た) と共に、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間培養し、それに続いて抗 CD8 イソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) / アロフィコシアニン (APC) と共に  $4^\circ\text{C}$  で 20 分間培養し、蛍光活性化細胞分類がそれに続いた。ウェル当たり、 $2 \times 10^5$  個の選別された細胞、フィーダーとしての  $2 \times 10^6$  個の照射 A2 陰性 PBMC、 $2 \times 10^4$  個の CD3 / CD28 ビーズ / mL (ノルウェイ国オスロの Dynal)、および IL-2 ( $1000 \text{ U/mL}$ ) を使用して、選別された四量体陽性細胞を 24 ウェルプレート内で増殖させた。次に、このようにして得られた高結合活性 T 細胞を使用して、単細胞 5' RACE (cDNA 末端の迅速増幅) などの当該技術分野で公知の技術を用いて、TCR を同定し単離した。次に、アミノ酸 / DNA 配列決定と発現ベクターへのクローニングのために、非重複 TCR DNA を分析した。

#### 【0099】

それぞれ、腫瘍特異的 TCR - および TCR - 鎖をコードする 3 つの CO L6A3-002 特異的 TCR (R4P1D10、R4P3F9、および R4P3H3、表 2 を参照されたい) を健常ドナーの T 細胞から単離し、増幅した。健常ドナー由来の細胞は、以前記載された方法に従って生体外で刺激した (Walter et al., 2003 J Immunol., Nov 15; 171 (10): 4974-8)。CO L6A3 ペプチド提示は、以前記載されたようにして行った。(Hirano N. et al; Blood. 2006 Feb 15; 107 (4): 1528-36)。HLA-A\*02 多量体を用いて標的特異的細胞を単細胞ソートし、次に引き続く TCR 単離のために使用した。例えば、Molecular Cloning a laboratory manual fourth edition by Green and Sambrook に記載されるように、標準法によって 5' RACE を通じて TCR 配列を単離した。TCR R4P1D10、R4P3F9、および R4P3H3 の および 可変領域を配列決定し、さらなる機能特性解析のためにクローン化した。R4P1D10 および R4P3H3 は、HLA-A\*02 陽性ドナーに由来し、R4P3F9 は、HLA-A\*02 陰性ドナーに由来する (アロ反応性設定)。

#### 【0100】

表 3: COL6A3-002 および NYES01-001 TCR の SPR 親和性

【表 3】

TCR	HLA-A02 /COL6A3-002 複合体の平衡解離定数 ( $K_D$ ) ( $\mu\text{M}$ )	HLA-A02 /NYES01-001 複合体の平衡解離定数 ( $K_D$ ) ( $\mu\text{M}$ )
R4P1D10	16	結合なし
R4P3F9	62	結合なし
R4P3H3	102	結合なし
1G4	結合なし	7

#### 【0101】

実施例 1: T 細胞受容体 R4P1D10

例えば、方法についてその内容全体が参照により本明細書に援用される、米国特許第 8,519,100 号明細書に記載されているように、以前記載されているように、TCR R4P1D10 の および 鎖をクローン化した。TCR R4P1D10 は、HLA-A\*02 提示 CO L6A3-002 に限定されている (上記の表 3 を参照されたい)。

#### 【0102】

表4：R4P1D10 鎖の特性：

## 【表4】

開始	停止	説明	配列
1	21	L セグメント (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (配列番号 69)
1	113	V 鎖 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCT YSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLLRDSQPSDSATYLCVN
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	120	CDR3	CAVNFHDKIIF
116	130	J セグメント (TRAJ30)	DKIIFGKGRHLHP
131	272	定常領域 (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYIT DKTVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMT LRLWSS

10

## 【0103】

表5：R4P1D10 鎖の特性：

## 【表5】

開始	停止	説明	配列
1	19	L セグメント (TRBV9)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPV (配列番号 70)
1	114	V 鎖 (TRBV9)	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVD SGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRS GDLSVYWYQQSLDQGLQFLIHYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLH SELNLSLELGDSALYFCASSV
46	50	CDR1	SGDLS
68	73	CDR2	YYNGEE
110	122	CDR3	CASSVASAYGYTF
118	131	J 鎖 (TRBJ1-2)	YGYTFGSGTRLTVV
132	308	定常領域 (TRBC1)	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RN HFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPTQIVSAEAWGRADCGFTSVSY QQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF

20

30

## 【0104】

R4P1D10はCOL6A3-002を特異的に認識するが、それは、このTCRを再発現するヒト初代CD8+T細胞が、それぞれCOL6A3-002ペプチドまたはCOL6A3-002のアラニンおよびグリシン置換変異型(図1)、あるいはCOL6A3-002と高度の配列類似性を示す異なるペプチド(図2)のいずれかが負荷されたHLA-A\*02+標的細胞との同時インキュベーション時にIFNを放出し、HLA-A\*02四量体に結合するためである。NYESO1-001ペプチドが、陰性対照として使用される。

40

## 【0105】

R4P1D10の再発現は、J.RT3-T3.5ジャーカット細胞(図3)、SUP-T1細胞(図4)、およびヒト初代CD8+T細胞(図5)において、HLA-A\*02/COL6A3-002四量体の選択的結合をもたらすが、HLA-A\*02/NYESO1-001四量体の選択的結合はもたらさない。各細胞型について、NYESO1-001特異的TCR1G4の再発現および模擬発現が対照として使用される。

## 【0106】

以前記載された方法(Willcox BE et al., 1999 Protein Sci., Nov; 8(11): 2418-23)に従って可溶性TCRとして表される、R4P1D10のSPR(表面プラズモン共鳴)結合解析、およびHLA-A\*0

50

2 / COL6A3 - 002 複合体は、 $K_D = 16 \mu M$  の親和性を明らかにする（表 3）。1G4 TCR および HLA - A \* 02 / NYESO1 - 001 の SPR 結合データが対照として使用される。

# 【 0 1 0 7 】

実施例 2：T 細胞受容体 R4P3F9

例えば、方法についてその全体が参照により本明細書に援用される、米国特許第 8,519,100 号明細書に記載されているように、以前記載されているように、TCR R4P3F9 の および 鎖をクローン化した。TCRR4P3F9 は、HLA - A2 提示 COL6A3 - 002 に限定されている（上記の表 3 を参照されたい）。

# 【 0 1 0 8 】

表 6：R4P3F9 鎖の特性

## 【表 6】

開始	停止	説明	配列
1	21	L セグメント (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (配列番号 71)
1	111	V 鎖 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCT YSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLLRDSQPSDSATYLCA
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	123	CDR3	CAAYSGAGSYQLTF
113	133	J セグメント (TRAJ28)	YSGAGSYQLTFGKGTKLSVIP
134	274	定常領域 (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMT LRLWSS

# 【 0 1 0 9 】

表 7：R4P3F9 鎖の特性

## 【表 7】

開始	停止	説明	配列
1	19	L セグメント (TRBV9)	MGFRLCCVAFCLLGAGPV (配列番号 72)
1	114	V 鎖 (TRBV9)	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCS SGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIHYNGEERAKGNILERFSAQQFPD LHSELNLSSLELGDSALYFCASSV
46	50	CDR1	SGDLS
68	73	CDR2	YYNGEE
110	122	CDR3	CASSVESSYGYTF
118	131	J 鎖 (TRBJ1-2)	YGYTFGSGTRLTVV
132	308	定常領域 (TRBC1)	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVIIVSAEAWGRADCGFTS VSYQQVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDF

# 【 0 1 1 0 】

R4P3F9 は COL6A3 - 002 を特異的に認識するが、それは、この TCR を再発現するヒト初代 CD8 + T 細胞が、それぞれ、COL6A3 - 002 ペプチドまたは COL6A3 - 002 のアラニンおよびグリシン置換変異型（図 6）または COL6A3 - 002 との高度な配列類似性を示す異なるペプチド（図 7）のいずれかが負荷された HLA - A \* 02 + 標的細胞との同時インキュベーション時に、IFN を放出するためである。NYESO1 - 001 ペプチドが、陰性対照として使用される。

## 【 0 1 1 1 】

R 4 P 3 F 9 の再発現は、J . R T 3 - T 3 . 5 ジャーカット細胞（図 8 ）および S U P - T 1 細胞（図 9 ）において H L A - A \* 0 2 / C O L 6 A 3 - 0 0 2 四量体の選択的結合をもたらすが、H L A - A \* 0 2 / N Y E S O 1 - 0 0 1 四量体の選択的結合はもたらさない。各細胞型について、N Y E S O 1 - 0 0 1 特異的 T C R 1 G 4 の再発現および模擬発現が対照として使用される。

## 【 0 1 1 2 】

以前記載された方法（W i l l c o x B E e t a l . , 1 9 9 9 P r o t e i n S c i . , N o v ; 8 ( 1 1 ) : 2 4 1 8 - 2 3 ）に従って可溶性 T C R として表される、R 4 P 3 F 9 の S P R 結合解析、および H L A - A \* 0 2 / C O L 6 A 3 - 0 0 2 複合体は、 $K_D = 62 \mu M$  の親和性を明らかにする（表 3 ）。1 G 4 T C R および H L A - A \* 0 2 / N Y E S O 1 - 0 0 1 の S P R 結合データが、対照として使用される。

## 【 0 1 1 3 】

実施例 3 : T 細胞受容体 R 4 P 3 H 3

例えば、その全体が参照により本明細書に援用される、米国特許第 8 , 5 1 9 , 1 0 0 号明細書に記載されているように、以前記載されているように、T C R R 4 P 3 H 3 のおよび鎖をクローン化した。T C R R 4 P 3 H 3 は、H L A - A 2 提示 C O L 6 A 3 - 0 0 2 に限定されている（上記の表 3 を参照されたい）。

## 【 0 1 1 4 】

表 8 : R4P3H3 鎖の特性

## 【表 8】

開始	停止	説明	配列
1	21	L セグメント (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (配列番号 73)
1	112	V 鎖 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCT YSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLIRDSQPSDSATYLCAY
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	120	CDR3	CAVKAGNQFYF
115	130	J セグメント (TRAJ49)	GNQFYFGTGTSLTVIP
131	271	定常領域 (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMT LRLWSS

## 【 0 1 1 5 】

表 9 : R4P3H3 鎖の特性

10

20

30

【表 9】

開始	停止	説明	配列
1	19	L セグメント (TRBV7-8)	MGTRLLCWVVLGFLGTDHT (配列番号 74)
1	115	V 鎖 (TRBV7-8)	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSQSPRYKVAKRQGDVALRCDP ISGHVSLFWYQQALGGQPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFAER PEGSVSTLKIQRQQEDSAVYLCASSL
46	50	CDR1	SGHVS
68	73	CDR2	FQNEAQ
111	126	CDR3	CASSLLTSGGDNEQFF
122	135	J 鎖 (TRBJ2-1)	NEQFFGPGTRLTVL
136	314	定常領域 (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDQPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ NPRNHFRQCQVFYGLSENDEWTQDRAKPTQIVSAEAWGRADCG FTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVKRKD SRG

10

## 【0116】

R4P3H3はCOL6A3-002を特異的に認識するが、それはこのTCRを再発現するヒト初代CD8+T細胞が、それぞれ、COL6A3-002ペプチドまたはCOL6A3-002のアラニンおよびグリシン置換変異型(図10)またはCOL6A3-002との高度な配列類似性を示す異なるペプチド(図11)のいずれかが負荷されたHLA-A\*02+標的細胞との同時インキュベーション時に、IFNを放出するためである。NYSEO1-001ペプチドが、陰性対照として使用される。

20

## 【0117】

R4P3H3の再発現は、SUP-T1細胞において、HLA-A\*02/COL6A3-002四量体の選択的結合をもたらすが、HLA-A\*02/NYEO1-001四量体の選択的結合はもたらさない(図12)。NYSEO1-001特異的TCR1G4の再発現および模擬発現が対照として使用される。

## 【0118】

以前記載された方法(Willcox BE et al., 1999 Protein Sci., Nov; 8(11):2418-23)に従って可溶性TCRとして表される、R4P3H3のSPR結合解析、およびHLA-A\*02/COL6A3-002複合体は、 $K_D = 102 \mu M$ の親和性を明らかにする(表3)。1G4 TCRおよびHLA-A\*02/NYEO1-001のSPR結合データが、対照として使用される。

30

图1:

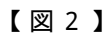


图2:

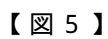


图5:

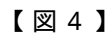


图4:

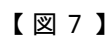


图7:

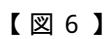


图6:

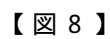
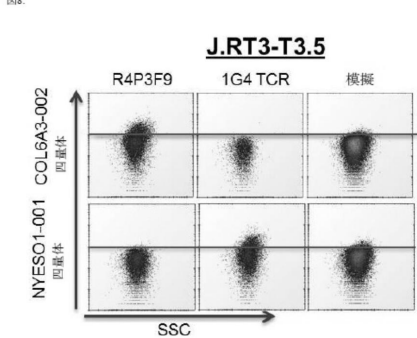
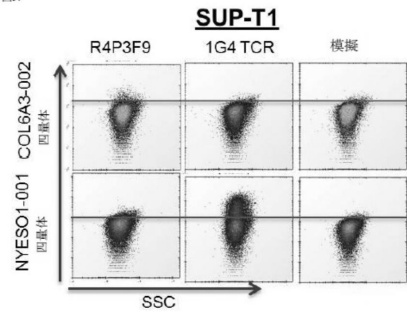


图8:



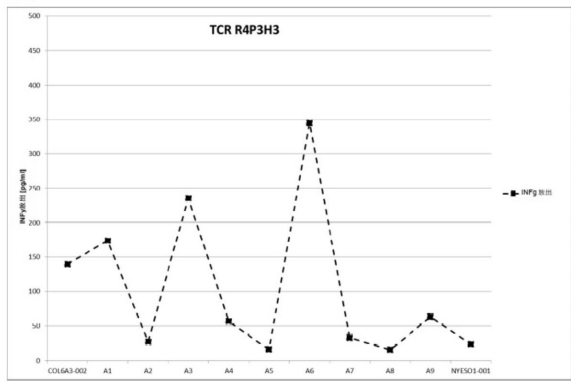
【 図 9 】

図9:



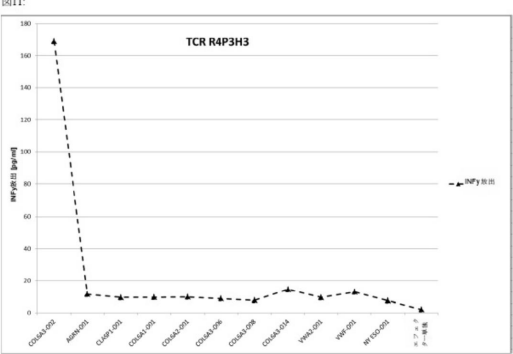
【 図 1 0 】

図10:



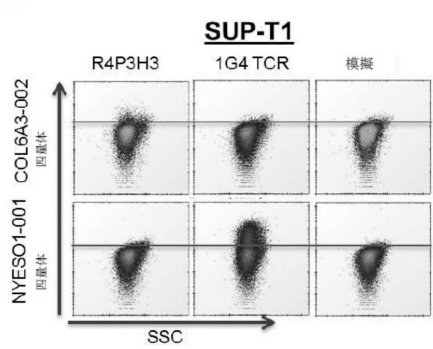
【 図 1 1 】

図11:



【 図 1 2 】

図12:



【 配 列 表 】

0006964351000001.app



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	14/725	(2006.01)	C 0 7 K	14/725	
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/17	Z
			A 6 1 P	35/00	

(31)優先権主張番号 62/376,632

(32)優先日 平成28年8月18日(2016.8.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

## 前置審査

(72)発明者 ウォルター, ステファン  
アメリカ, テキサス州 77005, ヒューストン, 2901 ロクストン ロード(72)発明者 バンク, ゼバステアン  
ドイツ, 72074 テュービンゲン, ゲルトルート - ボイマーエステーエル, 19/1

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第2006/023382(WO, A2)  
EMBO Molecular Medicine, 2013年, vol.5, p.935-948

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N	1 5 / 1 2
C 1 2 N	1 5 / 6 3
C 1 2 N	1 / 1 3
C 1 2 N	1 / 1 5
C 1 2 N	1 / 1 9
C 1 2 N	5 / 1 0
C 0 7 K	1 4 / 7 2 5
C 0 7 K	1 6 / 3 0
C 1 2 P	2 1 / 0 2
A 6 1 K	3 9 / 3 9 5
A 6 1 K	4 8 / 0 0
A 6 1 K	3 5 / 1 7
A 6 1 P	3 5 / 0 0