

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6639233号  
(P6639233)

(45) 発行日 令和2年2月5日(2020.2.5)

(24) 登録日 令和2年1月7日(2020.1.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 07 K	14/725	(2006.01)	C 07 K	14/725	Z N A
C 12 N	15/12	(2006.01)	C 12 N	15/12	
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	5/10	
C 12 P	21/02	(2006.01)	C 12 P	21/02	Z
A 61 K	38/17	(2006.01)	A 61 K	38/17	

請求項の数 13 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-554209 (P2015-554209)  
 (86) (22) 出願日 平成26年1月29日 (2014.1.29)  
 (65) 公表番号 特表2016-505635 (P2016-505635A)  
 (43) 公表日 平成28年2月25日 (2016.2.25)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2014/051726  
 (87) 國際公開番号 WO2014/118236  
 (87) 國際公開日 平成26年8月7日 (2014.8.7)  
 審査請求日 平成29年1月30日 (2017.1.30)  
 (31) 優先権主張番号 13153081.8  
 (32) 優先日 平成25年1月29日 (2013.1.29)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
歐州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者 513030983  
マックス-デルブリュック-セントラム  
フェア モレクラーレ メディツイン (エ  
ムディーザー) ベルリン-ブッフ  
ドイツ 13125 ベルリン, ロベル  
ト-レッシーストラッセ 10  
(74) 代理人 100088904  
弁理士 庄司 隆  
(72) 発明者 ブランケンシュタイン, トーマス  
ドイツ, 12209 ベルリン, キースシ  
ュトラーゼ 46  
(72) 発明者 オーベナウス, マティアス  
ドイツ, 10999 ベルリン, リーダニ  
ツツアーシュトラーゼ 38/39

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MAGE-A1 を認識する高結合活性結合分子

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

抗原認識構成物であって、抗原認識構成物は、T細胞受容体 (TCR) 又はその抗原結合断片であって、該抗原認識構成物は、MAGE-A1抗原と特異的に結合し、該抗原認識構成物は、

a : 配列番号40に示されるCDR1配列、配列番号41に示されるCDR2配列、及び配列番号1に示されるCDR3配列を含む鎖；及び配列番号46に示されるCDR1配列、配列番号47に示されるCDR2配列、及び配列番号4に示されるCDR3配列を含む鎖又は

b : 配列番号42に示されるCDR1配列、配列番号43に示されるCDR2配列、及び配列番号2に示されるCDR3配列を含む鎖；及び配列番号48に示されるCDR1配列、配列番号49に示されるCDR2配列、及び配列番号5に示されるCDR3配列を含む鎖又は

c : 配列番号44に示されるCDR1配列、配列番号45に示されるCDR2配列、及び配列番号3に示されるCDR3配列を含む鎖；及び配列番号50に示されるCDR1配列、配列番号51に示されるCDR2配列、及び配列番号6に示されるCDR3配列を含む鎖を含む、抗原認識構成物。

## 【請求項 2】

ヒトMAGE-A1<sub>278-286</sub>エピトープに特異的に結合する、請求項1に記載の抗原認識構成物。

## 【請求項 3】

前記抗原認識構成物が、TCRであって、該TCRが、少なくとも1つの及び／又は TCR

10

20

鎖を含むものであって、

a : ここで該TCR鎖が、少なくとも1つの核酸によりコードされ、該核酸が、(i)配列番号13～21に含まれるTCR鎖をコードするヌクレオチド配列、又は(ii)遺伝子コードの縮重の結果、配列番号13～21に含まれるTCR鎖をコードするヌクレオチド配列と異なるヌクレオチド配列であって、配列番号13～21に含まれるTCR鎖のヌクレオチド配列にコードされるアミノ酸配列が同一である、ヌクレオチド配列

から選択されるヌクレオチド配列を含むものであって；又は

b : ここで該TCR鎖が、配列番号22～39に示されるTCR鎖のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含むものである。

請求項1又は2に記載の抗原認識構成物。

10

#### 【請求項4】

前記抗原認識構成物が、免疫応答を誘導し、若しくは、免疫応答を誘導し該免疫応答が、インターフェロン(IFN)レベルの増加を特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗原認識構成物。

#### 【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の抗原認識構成物をコードする核酸。

#### 【請求項6】

請求項5に記載の核酸を含むベクター。

#### 【請求項7】

請求項1～4のいずれか1項に記載の抗原認識構成物、又は請求項5に記載の核酸、又は請求項6に記載のベクターを含む宿主細胞。

20

#### 【請求項8】

前記宿主細胞が、リンパ球、又は、CD4陽性T細胞若しくはCD8陽性T細胞のTリンパ球である、請求項7に記載の宿主細胞。

#### 【請求項9】

請求項1～4のいずれか1項に記載の前記抗原認識構成物、又は請求項5に記載の核酸、又は請求項6に記載のベクター、又は請求項7若しくは8に記載の宿主細胞を含む医薬。

#### 【請求項10】

悪性腫瘍性疾患若しくは良性腫瘍性疾患の増殖性疾患の診断、予防及び／又は治療における使用のため、若しくは、悪性腫瘍性疾患若しくは良性腫瘍性疾患の増殖性疾患の診断、予防及び／又は治療における使用のための医薬であって、該腫瘍性疾患が、MAGE-A1抗原の差次的発現を特徴とする疾患である、請求項9に記載の医薬。

30

#### 【請求項11】

前記医薬の使用が、免疫療法、若しくは、養子T細胞療法における使用である、請求項9又は10に記載の医薬。

#### 【請求項12】

MAGE-A1特異的な抗原認識構成物(ARC)発現細胞系列の製造方法であって；

a : 適切な宿主細胞を提供すること、

b : ARCをコードする遺伝子構成物を提供することであって、該ARCが、請求項1～4のいずれか1項に記載のARCであること、

40

c : 該適切な宿主細胞に該遺伝子構成物を導入すること、

d : 該適切な宿主細胞により該遺伝子構成物を発現することを含む、製造方法。

#### 【請求項13】

前記細胞からの前記ARCの精製又は、前記細胞からの前記ARCの精製とT細胞において翻訳されたARC断片の再構成を更に含む、請求項12に記載の製造方法。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

50

本発明は、メラノーマ関連抗原（MAGE）A1に特異的に結合する抗体又はT細胞受容体等の新規な高結合活性（high avidity）抗原認識構成物（ARC）に関する。本発明の構成物は、MAGE-A1抗原の特異的発現を特徴とする腫瘍性疾患の診断、予防又は治療に特に有用である。本発明の抗原認識構成物をコード、含有又は提示するCD4又はCD8陽性T細胞等の核酸、ベクター及び宿主細胞が更に提供される。したがって、本発明は、癌治療のための免疫療法、特にアダプティブなT細胞療法（adoptive T cell therapy）のための新しい手法を提供する。

【背景技術】

【0002】

癌と診断された患者に利用可能な診断及び治療の選択肢における目覚ましい技術的進歩にもかかわらず、予測に関しては多くの場合、なお困難であり、多くの患者が治療できていない。免疫療法は、正常組織を損傷することなく、悪性腫瘍細胞を根絶する可能性を有する、様々な腫瘍を診断された患者に対する、有力な、なお標的とされる、治療法の提供に有望である。理論上、免疫系のT細胞は、腫瘍細胞に特異的なタンパク質パターンの認識及び多様なエフェクターメカニズムを介したそれらの破壊を介在することが可能である。アダプティブなT細胞療法では、患者自身のT細胞の腫瘍根絶能力を利用及び増幅し、その後それらが効果的に残りの腫瘍を削除するが、正常組織を損傷しない状態で、患者にこれらのエフェクターを戻すことが試みられる。このアプローチは、腫瘍免疫学の分野にとって新しいものではないが、アダプティブなT細胞療法の臨床的利用におけるなお多くの欠点が、癌治療において、このアプローチの完全な利用を害する。

【0003】

TCRは、シグナル伝達の介在に関するCD3複合体のインバリアントのタンパク質に関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、  
α  
及び  
β  
型にて存在し、それらは構造的に類似であるが、解剖学的位置とおそらく機能が全く異なる。生來のヘテロ二量体  
TCRの細胞外部分は、それぞれが膜近位の定常ドメインと膜遠位の可変ドメインを有する2つのポリペプチドからなる。定常及び可変ドメインのそれぞれが、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）に類似して高度多型ループ（highly polymorphic loops）を含む。TCR遺伝子療法の利用は、多数の現在のハードルを克服する。望まれる特異性を患者自身のT細胞に備えさせること及び枯渇を回避して、短期間に十分な数のT細胞の生成を可能にする。TCRは、セントラルメモリーT細胞又は移入（transfer）の際のより良い残留性及び機能を保証し得る、幹細胞の特徴を有するT細胞に形質導入される。TCR操作（TCR-engineered）T細胞は、効果的な生着を可能にするが免疫抑制を阻害する、化学療法又は放射線療法によりリンパ球減少性を与えられた癌患者に注入される。ヒトMHC分子及び多様なヒトTCRレパートリーを発現しているトランスジェニックマウスは、ペプチド抗原が、免疫原性であるかどうか、すなわち、MHC分子により効率的にプロセシングされ、提示されるか、免疫化に続いてT細胞反応を効率的に誘導するか、を迅速に分析するためのツールとして役立つ（Li et al. 2010 Nat Med）。Liらにより公表されたABabDIIマウスを用いたアダプティブなT細胞療法の概念を図1に示す。

【0004】

要約すると、ABabDIIマウス中のCD8+ T細胞は、ヒトMHCクラスI分子により提示される抗原を認識するヒトT細胞受容体（TCR）を有する。ヒトとは反対に、ABabDIIマウスは、ヒト腫瘍関連抗原（TAA）に寛容ではない。したがって、ヒトTAAを接種された場合、ABabDIIマウスは、高結合活性抗原特異的T細胞の増大を含む外来性抗原に対する効率的な獲得免疫を生み出す（図1右側）。適合するヒトTAAによる免疫化後、ABabDIIマウスの高結合活性TCRをコードする遺伝情報を抽出できる（図1中央）。これらのTCRは、レトロウイルス形質導入を通して、腫瘍患者由来のT細胞において、続けて再発現（re-expressed）できる。それらのリターゲティングされる（re-targeted）T細胞は、腫瘍を患う患者に戻すことができる（図1左側）。

【0005】

10

20

30

40

50

ヒトTCRトランスジェニックマウスを用いて、マウスゲノムによりコードされない、任意のヒトペプチド配列は、以上のように免疫化に適合でき、最適な親和性(optimal affinity)を有するTCRをもたらすことができる。最適な親和性とは、T細胞が、ヒト自己MHC分子に拘束され、ペプチド抗原を外来性と認識することを意味し、例えば、非寛容レパートリーを意味する。トランスジェニックマウスの特異的T細胞が、ペプチド/MHC多量体を用いることにより、例えば単細胞PCRによって、単離されたヒトTCR、内因性TCRとの不対合形成を回避しつつ、効率的な発現に最適化され、患者T細胞へのウイルスベクターの形質導入に使用されたTCRを識別できた(Uckert et al. 2008 Cancer Immunol Immunother; Kammerhoens T et al. 2009 Eur J Immunol)。

## 【0006】

10

メラノーマ抗原遺伝子(MAGE-A)は、異なる組織学的起源の様々な腫瘍において発現されることが発見された。MAGE遺伝子によりコードされたタンパク質は、腫瘍拒絶抗原であり、それは、癌細胞を認識し、殺す能力を有する特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を誘導できる。MAGE遺伝子およびタンパク質は、以上のように免疫療法により癌と戦う新規な薬剤の開発の優先的な標的である。MAGE-Aタンパク質は、主として発現される癌精巣抗原のサブファミリーを構成するが、生殖細胞系列中に限られるわけではない。しかし、それらは、更に様々なヒト癌においても発現され、そこで、悪性と結びつき、悪性に至らせるかも知れない。腫瘍及び正常組織を囲む非正常組織(not the normal)の中のMAGE抗原との特異的発現は、この抗原のファミリーを標的とするアダプティブなT細胞移入を非常に興味深いものにしている。しかし、現在まで、満足な免疫療法は、特異的かつ高結合活性の抗体若しくはMAGE抗原を標的とするT細胞受容体の欠如により、知られていない。

20

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

背景技術において、上述の主要な欠点の観点から、本発明の目的は、高結合活性とMAGE-A抗原に対する特異性を有する新規な抗原認識構成物を提供することである。更に、本発明は、当該構成物の生産を可能にする新規な方法を提供することを意図する。より一般的な言葉で表すと、本発明は、免疫癌治療法の新規な方法を提供しようとするものである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

30

上記課題は、第一の態様において、配列番号1～6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%又は100%の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む抗原認識構成物により解決される。配列番号1～6は、本願の図4に示されるCDR3領域に相当する。驚くべきことに、本発明の実施例において提供されるTCRは、MAGE抗原を対象とする現状水準のTCRと比較して、高い結合性を有する(highly avid)ことを発見した。本発明の好ましい実施態様において、抗原認識構成物は、配列番号1～6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%又は100%の配列相同性を有する相補性決定領域3(CDR3)を含む。

## 【0009】

40

本発明との関係において好ましくは、抗原認識構成物は、TRAV5、TRAV13-1、TRAV12-3、TRBV28、TRBV29-1、TRBV13、TRBV20、TRBV12から選択される1つのVエレメント(V element)、及び/又はTRAJ41、TRAJ29、TRAJ31、TRAJ49、TRAJ34、TRBJ2-7、TRBJ2-2、TRBJ2-6、TRBJ7、TRBJ1-2から選択される1つのJエレメント(J element)をさらに含み、好ましくは表1に示されるような組み合わせにおいて含む。

## 【0010】

本発明に従った抗原認識構成物は、メラノーマ関連抗原MAGEファミリーの抗原に特異的である及び/又は特異的に結合する。多数のタンパク質は、いくつかの偽遺伝子も含むMAGEファミリーの一部であることが知られている。MAGEファミリーの全てのメンバーより共有される1つの相同領域は、MAGE保存ドメインと命名された一続きの約200のアミノ酸で

50

ある。MAGE保存ドメインは、いくつかのタンパク質において、より中央の位置においてもみられるが、通常C末端に接近して位置する。MAGE保存ドメインは、通常シングルコピーとして存在するが、いくつかのタンパク質においては重複している。本発明の抗原認識構成物により検出可能なMAGE遺伝子は、MAGE-B1、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-A2B、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-B1、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B18、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B6B、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-D1、MAGE-D2、MAGE-D4、MAGE-E1、MAGE-E2、MAGE-F1、MAGE-H1、MAGE-L2、NDN、NDNL2から選択される。本発明との関係において好ましくは、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、又はMAGE-A12から選択される 12 の相同的なMAGEタンパク質である。最も好ましくは、MAGE-A1に対する特異性を有する抗原認識構成物である。  
10

#### 【0011】

本願で使用される「特異性 (specificity)」又は「抗原特異性 (antigen specificity)」又は所与の抗原「に対して特異的 (specific for)」の用語は、抗原認識構成物が前記抗原、好ましくはMAGE-A1、より好ましくは高結合活性で、特異的に結合でき、免疫学的に認識できることを意味する。例えば、TCRは、TCRを発現しているT細胞が、MAGE-A1 HLA-A02拘束性MAGE-A1<sub>278-286</sub>ペプチド等の低濃度のMAGEペプチド（例えば、約10<sup>-11</sup>mol/l、10<sup>-10</sup> mol/l、10<sup>-9</sup> mol/l、10<sup>-8</sup> mol/l、10<sup>-7</sup> mol/l、10<sup>-6</sup> mol/l、10<sup>-5</sup> mol/l）をパルスした標的細胞との共培養に際し、少なくとも約200 pg/ml以上（例えば、250 pg/ml以上、300 pg/ml以上、400 pg/ml以上、500 pg/ml以上、600 pg/ml以上、700 pg/ml以上、100 20 pg/ml以上、2,000 pg/ml以上、2,500 pg/ml以上、5,000 pg/ml以上）のインターフェロン（INF-）を分泌する場合に、MAGE-A1に対する「抗原特異性」を有するとみなされてもよい。代替的に又は付加的に、TCRは、TCRを発現しているT細胞が低濃度のHLA-A02拘束性MAGE-A1をパルスした標的細胞との共培養に際し、形質導入されていないバックグラウンドレベルのIFN- の少なくとも2倍のIFN- を分泌する場合に、MAGE-A1に対して「抗原特異性」を有するとみなされてもよい。当該「特異性」は、例えば、ELISAにより分析できる。

#### 【0012】

本発明の好ましい実施態様は、抗体、又はその誘導体若しくは断片、又はTCR受容体（TCR）、又はその誘導体若しくは断片の形の抗原認識構成物を開示する。本願で開示される抗体又はTCRの断片若しくは誘導体は、好ましくは依然として、オリジナルの抗体又はTCRと同様に、それぞれ抗原特異性（抗原に関する結合機能）を有する。  
30

#### 【0013】

生来の - ヘテロ二量体TCRは、鎖と鎖を有する。各鎖は、可変領域、連結領域及び定常領域を含み、鎖は、更に、通常、可変領域と連結領域の間に短い多様性領域 (diversity region) を含むが、この多様性領域は、多くの場合に連結領域の一部としてみなされる。各可変領域は、フレームワーク配列中に埋め込まれた3つのCDR（相補性決定領域）を含み、1つは、CDR3と命名された超可変領域である。そのフレームワーク、CDR1及びCDR2配列により、並びに部分的に定義されたCDR3配列により識別される、数種類の鎖可変（V）領域及び数種類の鎖可変（V）領域がある。V型は、固有のTRAV番号によりIMGT命名法で参照される。  
40

#### 【0014】

したがって、本発明の更なる実施態様は、鎖可変領域を含むARCに関するものであって、ここで前記鎖可変領域は、V - 型TRAV5（IMGT命名法による）のCDR1及びCDR2並びにCDR3 : CAESIGNSGYALNF；又はV - 型TRAV13-1のCDR1及びCDR2並びにCDR3 : CAARPNSGNTP LVF；又はV - 型TRAV12-3のCDR1及びCDR2並びにCAMS D T G N Q F Y Fに相当するアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は好ましくは100%同一であるアミノ酸配列を含む、CDR1、CDR2及びCDR3を含む。

本発明の別の実施態様は、鎖可変領域を含むARCに関するものであって、ここで前記鎖可変領域は、V - 型TRBV28（IMGT命名法による）のCDR1及びCDR2並びにCDR3 : CASRGL  
50

AGYEQYF；又はV -型TRBV29-1のCDR1及びCDR2並びにCDR3：CSVEQDTNTGELFF；又はV -型TRBV13のCDR1及びCDR2並びにCDR3：CASSFRGGGANVLTFのそれぞれのアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は好ましくは100%同一であるアミノ酸配列を含む、CDR1、CDR2及びCDR3を含む。

【0015】

1つの好ましい実施態様において、上述のARCは、上記の可変領域を有する鎖及び鎖を含み、好ましくは、下記の表1において示されるような組み合わせにおいて含む。

【0016】

好ましくは、本発明のARCは、少なくとも1つ、好ましくは3つのCDR配列CDR1、CDR2及びCDR3の全てを含む。本発明のARCは、以下を含んでもよい：

それぞれの既知のV 及びV 型のCDR 1及びCDR2領域は、IMGTデータベースによるものである：

TRAV5： CDR1：DSSSTY（配列番号40）、CDR2：IFSNMDM（配列番号41）

TRAV13-1： CDR1：DSASNY（配列番号42）、CDR2：IRSNVGE（配列番号43）

TRAV12-3： CDR1：NSAFQY（配列番号44）、CDR2：TYSSGN（配列番号45）

TRBV28： CDR1：MDHEN（配列番号46）、CDR2：SYDVKM（配列番号47）

TRBV29-1： CDR1：SQVTM（配列番号48）、CDR2：ANQGSEA（配列番号49）

TRBV13： CDR1：PRHDT（配列番号50）、CDR2：FYEKMQ（配列番号51）。

【0017】

したがって、好ましい実施態様における本発明のARCは、配列番号40、41及び1；又は配列番号42、43及び2；又は配列番号44、45及び3に示されるCDR配列を含む鎖を含む。代替的に又は付加的に、本発明のARCは、配列番号46、47及び4；又は配列番号48、49及び5；又は配列番号50、51及び6に示される配列を有する鎖を含む。

【0018】

本発明による好ましい実施態様は、

a. 配列番号40、41及び1に示されるCDR配列を含む鎖；及び配列番号46、47及び4に示されるCDR配列を含む鎖；又は

b. 配列番号42、43及び2に示されるCDR配列を含む鎖；及び配列番号48、49及び5に示されるCDR配列を含む鎖；又は

c. 配列番号44、45及び3に示されるCDR配列を含む鎖；及び配列番号50、51及び6に示されるCDR配列を含む鎖

を有する、TCR若しくは抗体、又はそれらのそれぞれの抗原性結合断片である。

【0019】

ARCは、好ましい実施態様において、抗体又はTCRから選択されるが、TCRが好ましい。

【0020】

本発明のために、TCRは、少なくとも1つのTCR 及び/又はTCR 可変ドメインを有する部分である。一般に、それらはTCR 可変ドメイン及びTCR 可変ドメインの両方を含む。それらは、ヘテロ二量体でもよく、又は単鎖フォーマットでもよい。アダプティブな療法で使用するために、ヘテロ二量体TCRは、例えば、細胞質及び膜貫通ドメインの両方を有する完全長鎖として形質導入してもよい。所望により、それぞれの定常ドメインの残基間に導入されたジスルフィド結合が存在してもよい。

【0021】

本発明の第一の態様の1つの好ましい実施態様において、抗原認識構成物は、上述のようにTCRである。TCRは、好ましくは、少なくとも1つの 及び/又は TCR鎖を含み、ここで、前記TCR鎖は、少なくとも1つの核酸によりコードされ、該核酸は、(i)配列番号13～21に含まれる配列をコードするTCR鎖、又は(ii)配列番号13～21に含まれる配列をコードするTCRに対して少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%若しくは100%の同一性を有する配列、又は(iii)遺伝子コードの縮重により、配列番号13～21に含まれるTCRをコードする配列のいずれか1つと同一のTCRをコードするが、異

10

20

30

40

50

なる配列を有する配列、から選択されるヌクレオチド配列を含む。

**【0022】**

配列番号13～21は、図8～16のベクターマップのヌクレオチド配列を示す。これらのベクターのそれぞれは、本発明のTCRの 及び 鎖を含む。鎖は、図中で 鎖配列の上流に位置する。以下でも説明するように、本発明は、TCR鎖の定常ドメインのオリジナルの配列のマウス化 (murinization) により、異なる程度まで最適化された、3つの単離されたTCRを例示的に記載する。ベクター命名における略称「hc」は、TCRの完全なヒトバリアントを表し、「mc」は、TCR鎖中の完全なマウス化された定常ドメインを表し、一方、「<sub>m</sub>mc」は、TCR鎖の定常ドメイン中の最小のマウス化を表す。ベクターマップ中の（及び対応する配列中の） 及び 鎖の正確な位置は、図面の簡単な説明において説明する。

10

**【0023】**

前記の(i)の代替の1つの好ましい実施態様において、TCRは、配列番号13～21のいずれか1つを共に構成する 及び 鎖配列を含む。

**【0024】**

本発明の第一の態様の1つの更なる好ましい実施態様において、抗原認識構成物は、上述のようにTCRである。TCRは、好ましくは、少なくとも1つの 及び / 又は TCR鎖を含み、ここで、前記TCR鎖は、配列番号22～39に示されるTCR鎖のいずれか1つに一致するアミノ酸配列、又は配列番号22～39に示されるアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%若しくは100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

**【0025】**

scTCRは、第1のTCR鎖（例えば 鎖）の可変領域のポリペプチド及び全（完全長の）第2のTCR鎖（例えば 鎖）のポリペプチド、又はその逆の組み合わせ、を含むことができる。更に、scTCRは、2つ以上のポリペプチドをともに連結する1つ以上のリンカーを任意に含むことができる。リンカーは、例えば、本願に記載したように、2本の単鎖を連結するペプチドであり得る。

**【0026】**

更に、本発明は、IL-2、IL-7又はIL-15等のヒトサイトカインと融合する、scTCRを提供する。

**【0027】**

本発明による抗原認識構成物は、少なくとも2つのscTCR分子を含む、多重結合の複合体の形においても提供することができ、ここで、前記scTCR分子は、少なくとも1つのビオチン部分とそれ融合し、ここで、前記scTCRは、前記多重結合の複合体の形成を可能にする、ビオチン-ストレプトアビジン (streptavidin) 相互作用により相互連結される。更に、本発明は、本発明の2つ以上のscTCRを含む、高次の多重結合の複合体を提供する。

30

**【0028】**

1つの実施態様において、本発明の抗原認識構成物は、抗体、又はその断片である。多様な文法形式における「抗体 (antibody)」という用語は、本願において免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部位、すなわち、抗体結合部位又はパラトープを含む分子を参照するために使用される。当該分子は、免疫グロブリン分子の「抗原結合断片 (antigen binding fragments)」としても参照される。本発明は、更に、本願に記載した抗原に対して特異的に結合する抗体、又はその抗原結合部分を提供する。抗体は、当該技術分野において既知である任意の型の免疫グロブリンであってもよい。例えば、抗体は、任意のアイソタイプ、例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM等であってもよい。抗体は、モノクローナル又はポリクローナルであってもよい。抗体は、天然の抗体であってもよく、例えば、哺乳類から単離及び / 又は精製された抗体であってもよく、例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒト等から単離及び / 又は精製された抗体であってもよい。代替的に、抗体は、遺伝子操作した抗体であってもよく、例えば、ヒト化抗体又はキメラ抗体であってもよい。抗体は、单量体型又は多量体型であってもよい。

40

50

**【 0 0 2 9 】**

本発明は、更に、本願に記載された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')2、dsFv、sFv、二重特異性抗体（diabodies）、及び三重特異性抗体（triabodies）等の少なくとも1つの抗原結合部位を有する任意の部分であってもよい。単鎖可変領域フラグメント（sFv）抗体断片は、合成ペプチドを介して、抗体軽鎖のVドメインに結合した、抗体重鎖の可変（V）ドメインを含む不完全なFabフラグメントを含み、日常的な組換えDNA技術の手法を用いて生成できる。同様に、ジスルフィド安定化（disulfide-stabilized）可変領域フラグメント（dsFv）は、組換えDNA技術により準備できるが、本発明の抗体断片は、これらの代表的な抗体断片の型に限定されない。更に、抗体、又はその抗原結合部分は、検出可能な標識、例えば、放射性同位体、蛍光体（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（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）、及び素粒子（例えば、金粒子）等を含むように修飾してもよい。  
10

**【 0 0 3 0 】**

本発明の1つの実施態様において、抗原認識構成物は、ヒト白血球抗原（HLA）提示ペプチド、好ましくは、MAGEのHLA-A02による提示ペプチドに結合する。1つの好ましい実施態様において、抗原認識構成物は、特に、ヒトMAGE-A1<sub>278-286</sub>エピトープに特異的に結合する。

**【 0 0 3 1 】**

1つの好ましい実施態様において、抗原認識構成物は、ヒトTCR、又はその断片若しくは誘導体である。ヒトTCR又はその断片若しくは誘導体は、対応するヒトTCR配列の50%以上を含むTCRである。好ましくは、TCR配列の小部分のみが、人工的な起源又は他種由来である。しかしながら、キメラTCR、例えば、定常ドメイン中にマウス配列を有するヒト起源のものは、有利であることが知られている。したがって、特に好ましくは、定常ドメインの細胞外部分にマウス配列を含む、本発明によるTCRである。  
20

**【 0 0 3 2 】**

したがって、本発明の抗原認識構成物は、ヒト白血球抗原（HLA）依存的様式において、好ましくは、HLA-A02依存的様式において、その抗原を認識できることが更に好ましい。本発明との関係において、「HLA依存的様式（HLA dependent manner）」という用語は、抗原認識構成物が、抗原性ペプチドがHLAにより提示されるイベントにおいてのみ、抗原に結合することを意味する。  
30

**【 0 0 3 3 】**

1つの好ましい実施態様において、本発明による抗原認識構成物は、免疫応答を誘導し、好ましくは、ここで、該免疫応答がインターフェロン（IFN）レベルの増加を特徴とする。

**【 0 0 3 4 】**

本発明の好ましい実施態様は、T細胞受容体であり、並びに鎖中に配列番号1～3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%又は100%の配列相同性を有するCDR3を含み、及び／又は鎖中に配列番号4～6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%又は100%の配列相同性を有するCDR3を含む、抗原認識構成物に関する。更に好ましくは、TCRであって、ここで、鎖が、配列番号1と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は100%の配列相同性を有するCDR3を含み、鎖が、配列番号4と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は100%の配列相同性を有するCDR3を含み；又は、ここで鎖が、配列番号2と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は100%の配列相同性を有するCDR3を含み、鎖が、配列番号5と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は100%の配列相同性を有するCDR3を含み；又は、ここで鎖が、配列番号3と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は100%の配列相同性を有するCDR3を含み、鎖が、配列番号6と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は100%の配列相同性を有するCDR3を含む。好ましくは、CDR3領域は、いずれか1の図にお  
40  
50

いて示されるような、特に図4に示される組み合わせにおいて、CDJエレメント(CDJ element)と結合された。

#### 【0035】

更に好ましくは、本発明の抗原認識構成物は、T細胞受容体であり、配列番号22～39に示されるアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は100%の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む。特に好ましくは、TCR1367hc、TCR1367mc、TCR1367mmc、TCR1405hc、TCR1405mc、TCR1405mmc、TCR1705hc、TCR1705mc及びTCR1705mmcから選択されるTCRと少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%又は100%の配列相同性を有するTCRである。最も好ましくは、TCR1367hc、TCR1367mc、TCR1367mmc、TCR1405hc、TCR1405mc、TCR1405mmc、TCR1705hc、TCR1705mc及びTCR1705mmcを含む群から選択されるTCRである。本発明の上述のTCRのアミノ酸配列は、配列番号22～39に示される。

10

#### 【0036】

本発明による抗原認識構成物は、高結合活性のTCRである。

#### 【0037】

本発明の課題は、別の態様において、本発明による抗原認識構成物をコードする核酸を提供することにより解決する。核酸は、好ましくは、(a)本発明による抗原認識構成物をコードするストランドを有し；(b)(a)におけるストランドに相補的なストランドを有し；又は(c)(a)又は(b)に記載された分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするストランドを有する。ストリンジェントな条件は、通常の技術を有する当業者に、具体的には、Sambrookらの「Molecular Cloning」により既知である。加えて、核酸は、必要に応じて、タンパク質に対応する核酸配列の発現、具体的には、哺乳類／ヒト細胞における発現に必要である更なる配列を有する。使用される核酸は、細胞中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中に含まれてもよい。しかし、核酸は、提示細胞の形質転換のために使用してもよく、それら自体がそれらの細胞表面上の対応するタンパク質を産生するように、樹状細胞等の典型的な抗原提示細胞に限定されないものとする。

20

#### 【0038】

本願で使用する「核酸(nucleic acid)」に関しては、「ポリヌクレオチド(poly nucleotide)」、「オリゴヌクレオチド(oligonucleotide)」、及び「核酸分子(nucleic acid molecule)」を含み、通常DNA又はRNAのポリマーを意味し、一本鎖若しくは二本鎖、合成若しくは天然物由来(例えば、単離及び／又は精製されたもの)であってもよく、天然、非天然又は改変ヌクレオチドを含んでもよく、非修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間に存在するホスホジエステルの代わりに、ホスホロアミダート結合又はホスホロチオエート結合等の天然、非天然又は改変されたヌクレオチド間結合を含んでもよい。

30

#### 【0039】

好ましくは、本発明の核酸は、遺伝子組換え体である。本願で使用する「遺伝子組換え体(recombinant)」という用語は、(i)生細胞中で複製できる核酸分子に、天然又は合成の核酸断片を接続することによって、生細胞の外側で構築される分子、又は(ii)上記(i)で記載された分子の複製の結果生じる分子について参照している。ここでの目的のために、複製は、生体外の複製又は生体内の複製であってもよい。核酸は、本願で説明された、TCR、ポリペプチド、若しくはタンパク質のいずれかをコードする任意のヌクレオチド配列、又はその機能的部分若しくは機能的バリエントを含んでもよい。

40

#### 【0040】

更に、本発明は、上述のように、本発明による核酸を含むベクターを提供する。望ましくは、ベクターは、発現ベクター又は組換え発現ベクターである。「組換え発現ベクター(recombinant expression vector)」という用語は、本発明との関係において、適切な宿主細胞中のmRNA、タンパク質又はポリペプチドの発現を可能とする核酸構成物を参照する。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ってもよく、任意の適切な宿主に形質転換又は形質移入するために使用されてもよい。適切なベクター

50

は、プラスミド及びウイルス等、増殖 (propagation) 及び拡大 (expansion) のため若しくは発現のため又はその両方のために設計されたものを含む。

#### 【 0 0 4 1 】

動物発現ベクターの例として、pEUK-C1、pMAM及びpMAMneoを含む。好ましくは、組換え発現ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターである。組換え発現ベクターは、ベクターが導入され、本発明の核酸の発現が行われる、宿主細胞（例えば、細菌、菌類、植物、又は動物）の種類に特異的な、転写開始コドン、転写終結コドン、翻訳開始コドン及び翻訳終結コドン等の調節配列を含む。更に、本発明のベクターは、形質転換又は形質移入された宿主の選抜を可能とする、1以上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、本発明の構成物をコードするヌクレオチド配列、又は本発明の構成物をコードするヌクレオチド配列に相補的である若しくはハイブリダイズするヌクレオチド配列に動作可能に結合した、天然の又は規範的なプロモーターを含んでもよい。10

#### 【 0 0 4 2 】

プロモーターの選択は、例えば、強力な、弱い、誘導可能な、組織特異的な及び発生特異的なプロモーターを含む。プロモーターは、非ウイルス性プロモーター又はウイルス性プロモーターであってもよい。本発明の組換え発現ベクターは、一過性発現、安定発現のいずれか、又は両方のために設計してもよい。更に、組換え発現ベクターは、恒常的な発現又は誘導可能な発現のために作製してもよい。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明は、更に、本発明による抗原認識構成物を含む宿主細胞に関する。具体的には、本発明の宿主細胞は、核酸、又は上述のベクターを含む。宿主細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、菌類若しくは藻類であってもよく、又は原核細胞、例えば、細菌若しくは原生生物であってもよい。宿主細胞は、培養細胞又は初代細胞、すなわち、生物、例えばヒトから直接単離された細胞であってもよい。宿主細胞は、付着性細胞又は懸濁細胞、すなわち、懸濁液中で成長する細胞であってもよい。20

#### 【 0 0 4 4 】

組換えTCR、ポリペプチド、又はタンパク質を産生する目的のために、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、どの細胞型であってもよく、どの種類の組織由来でもよく、どの発生段階でもよいが、宿主細胞は、好ましくは、末梢血白血球 (PBL) 又は末梢血単核細胞 (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、培養T細胞、例えば、初代T細胞、又は培養T細胞系列由来のT細胞、例えば、Jurkat、SupT1等、又は哺乳類由来のT細胞等の任意のT細胞であってもよく、好ましくは、ヒト患者由来のT細胞若しくはT細胞前駆体であってもよい。哺乳類から得る場合は、T細胞は、血液、骨髓、リンパ節、胸腺、又は他の組織若しくは体液を含むが、限定されない、多数のソースから得てもよい。30

#### 【 0 0 4 5 】

T細胞は、濃縮又は精製されてもよい。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陽性及び/又はCD8陽性、CD4陽性ヘルパーT細胞、例えば、Th1及び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)、メモリーT細胞、未感作T細胞等を含むが、限定されない、どの型のT細胞であってもよく、どの発生段階であってもよい。好ましくは、T細胞は、CD8陽性T細胞又はCD4陽性T細胞である。40

#### 【 0 0 4 6 】

好ましくは、本発明の宿主細胞は、リンパ球、好ましくは、CD4又はCD8陽性T細胞等のTリンパ球である。更に好ましくは、宿主細胞は、MAGE-A1発現腫瘍細胞に特異的な腫瘍反応性T細胞である。

#### 【 0 0 4 7 】

本発明の1つの更なる態様は、医療における使用のための、本願に開示される抗原認識構成物、核酸、ベクター及び/又は宿主細胞に関する。1つの好ましい実施態様において50

、医療における使用は、悪性又は良性腫瘍性疾患等の増殖性疾患の診断、予防及び／又は治療における使用を含む。

**【0048】**

したがって、本発明は、本発明により開示されるような、抗原認識構成物、核酸、ベクター及び／又は宿主細胞の投与を含む、腫瘍又は腫瘍性疾患を患う対象を治療するための方法を更に提供する。好ましくは、対象は、そのような治療が必要な対象である。好ましい実施態様において、対象は、哺乳類対象、好ましくは、腫瘍又は腫瘍性疾患を患うヒト患者である。

**【0049】**

本発明の1つの好ましい態様において、腫瘍又は腫瘍性疾患は、上述のようにMAGE抗原の発現を特徴とする疾患である。最も好ましくは、腫瘍又は腫瘍性疾患は、MAGE-A1抗原を発現し、更に好ましくは、ここで、腫瘍又は腫瘍性疾患がHLAを介してMAGE-A1<sub>278-286</sub>エピトープを提示する。更に好ましくは、腫瘍又は腫瘍性疾患は、正常組織と比較して、MAGE-A1抗原の差次の発現を特徴とする。MAGE-A1抗原は、正常（非癌性）細胞中であまり広がらずに（to a low extend）発現してもよいが、該抗原は、腫瘍細胞中では、著しくより強力に発現する。

**【0050】**

更に、本発明の1つの好ましい態様において、腫瘍中のMAGE-A1の発現は、事前の薬理的治療により、例えば、5-アザ-2-デオキシシチジン（5-aza-2-deoxycytidine）を用いて、誘導又は促進される。

10

20

**【0051】**

本発明との関係において、「腫瘍（tumor）」又は「腫瘍性疾患（tumor disease）」という用語は、頭、首、肺又は食道の未分化癌、結腸直腸癌、軟骨肉腫、骨肉腫、髄芽腫、神経芽細胞腫、頭又は首の非扁平上皮癌、卵巣腫瘍、リンパ腫、急性及び慢性のリンパ球性白血病、急性及び慢性の骨髓性白血病、膀胱癌、前立腺癌、膵臓腺癌、乳癌及び胃癌のみならず、メラノーマ、肝細胞癌、肝臓内及び肝臓外の胆管細胞癌、扁平上皮癌、腺癌から選択される疾患を意味する。好ましくは、本発明に係る物及び／又は方法により、治療される疾患は、メラノーマ、非小細胞肺癌、膵臓腺癌及び胆管細胞癌を含む。

**【0052】**

本発明の1つの好ましい医薬用途は、免疫療法、好ましくは、アダプティブなT細胞療法に関する。本発明に係る物と方法は、アダプティブなT細胞療法との関係において、特に有用である。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細胞の点滴を含んでもよい。好ましくは、当該T細胞は、本発明の核酸又は抗原認識構成物を生体外で形質導入した患者の自己T細胞である。

30

**【0053】**

1つの更なる態様において、本発明は、MAGE-A1特異的抗原認識構成物（ARC）発現細胞系列の製造方法を開示し、以下を含む；

- a. 適切な宿主細胞を提供すること、
- b. ARCをコードする遺伝子構成物を提供すること、ここで該ARCは、配列番号1～6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%又は100%の配列相同性を有するアミノ酸配列を有するCDR3を含むものであって、
- c. 前記遺伝子構成物を前記適切な宿主細胞に導入すること、
- d. 前記適切な宿主細胞により前記遺伝子構成物を発現すること。

40

**【0054】**

1つの好ましい実施態様において、上記方法は、前記ARCの細胞表面提示を含む工程を更に含んでもよい。

**【0055】**

言うまでもなく、更に好ましくは、本発明のこの態様との関係において、前記ARCは、上述の本発明の態様によるARCである。この点で、更に付加的に又は代替的に好ましくは、前記ARCは、哺乳類由来であり、好ましくは、ヒト由来である。

50

**【 0 0 5 6 】**

本発明の方法における使用のための好ましい適切な宿主細胞は、哺乳類細胞であり、特にヒトT細胞等のヒト細胞である。本発明での使用のためのT細胞は、詳しく上述されている。

**【 0 0 5 7 】**

本発明の方法により生産されたARCは、1つの実施態様において、TCRである。例えば、付加的な（機能的な）ドメインを有するTCR又は代替的なドメインを備えたTCR、例えば、膜アンカーとして外来性の膜貫通ドメインを備えたTCRが更に含まれる。本発明により生産されるTCRは、例えば、 / TCR、 / TCR又は単鎖TCR（scTCR）である。更に、本発明に含まれるTCR型は、通常、当該技術分野において既知の任意のTCRであって、具体的には、上述のTCRである。10

**【 0 0 5 8 】**

望ましくは、本発明による方法における使用の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。当該システムは、通常の技術を有する当業者に周知である。。

**【 0 0 5 9 】**

本発明の1つの実施態様は、細胞からARCを精製する追加の方法の工程及び、任意に、T細胞中の翻訳されたARC断片の再構成を更に含む。

**【 0 0 6 0 】**

本発明の代替的態様において提供されるT細胞は、腫瘍細胞に特異的で、上述のように高結合活性を有する、T細胞受容体（TCR）の生産のための方法により、得られたもの又は入手可能なものである。当該T細胞は、本発明の方法において使用される宿主細胞、例えば、ヒト又は非ヒトT細胞、好ましくはヒトTCRに依存している。20

**【 0 0 6 1 】**

したがって、本発明は、本発明に記載された物、具体的には、任意のタンパク質、核酸又は宿主細胞のいずれかを含む医薬組成物を更に提供する。好ましい実施態様において、医薬組成物は、免疫療法のためのものである。

**【 0 0 6 2 】**

本発明に有用な医薬的に許容される担体又は希釈剤の例は、SPGA等の安定化剤、炭水化物（例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ショ糖、グルコース、デキストラン）、アルブミン又はカゼイン等のタンパク質、牛血清又は脱脂乳等のタンパク質含有剤及び緩衝液（例えば、リン酸緩衝液）を含む。30

**【 0 0 6 3 】**

本発明は、以下の実施例において、付随する図及び配列に関して更に記載するが、しかし、これに限定されない。本発明のために、本願に引用された全ての文献は、参照によりそれらの全部を組み込まれる。

**【図面の簡単な説明】****【 0 0 6 4 】**

【図1】図1は、アダプティブなT細胞療法の概念を示す。

【図2】図2は、MAGE-A1及びそのエピトープ局在を示す。40

【図3】図3は、ABabDIIマウスにおけるMAGE-A1に対する免疫応答を示す。

【図4】図4は、TCRベクターの概略図を示す。

【図5】図5は、TCR形質導入Jurkat76細胞のFACSの結果を示す。

【図6】図6は、MAGE-A1特異的T細胞の機能的結合活性を示す。

【図7】図7は、本発明のMAGE-A1特異的TCRを形質導入されたT細胞による、腫瘍細胞認識MAGE-A1を示す。

【図8】pMP71-TCR1367hcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号13の1041番目と2864番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と1970番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2037番目と2864番目のヌクレオチドの間に局在する。50

【図9】pMP71-TCR1367mcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号14の1041番目と2834番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と1952番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2019番目と2834番目のヌクレオチドの間に局在する。

【図10】pMP71-TCR1367mmcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号15の1041番目と2864番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と1970番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2037番目と2864番目のヌクレオチドの間に局在する。

【図11】pMP71-TCR1405hcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号16の1041番目と2855番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と1967番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2034番目と2855番目のヌクレオチドの間に局在する。  
10

【図12】pMP71-TCR1405mcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号17の1041番目と2825番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と1949番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2016番目と2825番目のヌクレオチドの間に局在する。

【図13】pMP71-TCR1405mmcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号18の1041番目と2854番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と1967番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2034番目と2854番目のヌクレオチドの間に局在する。  
20

【図14】pMP71-TCR1705hcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号19の1041番目と2894番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と2006番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2073番目と2894番目のヌクレオチドの間に局在する。

【図15】pMP71-TCR1705mcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号20の1041番目と2864番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と1988番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2055番目と2864番目のヌクレオチドの間に局在する。

【図16】pMP71-TCR1705mmcのベクターマップ。TCRコード配列は、配列番号21の1041番目と2894番目のヌクレオチドの間に局在する。TCR鎖は、1041番目と2006番目のヌクレオチドの間に局在し、鎖は、2073番目と2894番目のヌクレオチドの間に局在する。  
30

【図17】T2細胞は、MAGE-A1<sub>278-286</sub>の濃度上昇を伴って培養され、示したような異なるTCRを形質導入されたヒトT細胞と共に培養された。12時間後、機能的応答が、培養液中のIFNを測定することにより評価された。

【図18】T2細胞は、10<sup>-5</sup> mol/LのMAGE-A1<sub>278-286</sub>又は2アミノ酸のみMAGE-A1<sub>278-286</sub>と異なるヒトプロテオームの中で最も類似する2つのエピトープ(MAGE-B16及びMAGE-B5)をロードされ、TCR改変T細胞と共に培養された。機能的応答は、IFN産生に基づいて評価された。

【図19】T2細胞は、10<sup>-5</sup> mol/Lの濃度で114の異なるHLA-A2拘束性自己ペプチドのうちの1つをロードされ、TCR1367を形質導入された2人の異なるドナー由来のT細胞と共に培養された。ドナー1の結果は、黒点で示され、ドナー2の結果は白点で示される。  
40

#### 【0065】

配列番号1～6は、本発明のTCRの及びCDR3配列を示す。

配列番号7～10は、健康人の及び鎖CDR3配列を示す。

配列番号11～12は、ヒト(11)及びマウス(12)MAGE-A1のエピトープ配列を示す。

配列番号13～21は、図8～16のベクターヌクレオチド配列を示す。

配列番号22～39は、本発明のTCRの及び鎖の完全アミノ酸配列を示す。

配列番号40～51は、V及びV遺伝子のCDR1、CDR2、CDR1及びCDR2配列を  
50

示す。

【実施例】

【0066】

実施例1：ABabDIIマウスを使用したMAGEエピトープを有するT細胞の生成

図2は、HLA-A2拘束性エピトープMAGE-A1<sub>278-286</sub>の位置を示し、全長のMAGE-A1タンパク質に関連付けて示される（上図）。ヒトMAGE-A1<sub>278-286</sub>エピトープは、ABabDIIマウスにおいてヒトMAGE-A1<sub>278-286</sub>に対する寛容性を防止するために十分に、そのマウスホモログから異なる（下図）。

【0067】

MAGE-A1は、様々なヒト腫瘍において発現するが、一方で正常ヒト組織におけるその発現は、精巣に限られると考えられている。したがって、MAGE-A1発現細胞の特異的ターゲティングは、毒性を最小限に限るべきである。

【0068】

ABabDIIマウスは、不完全フロイントアジュvant（incomplete Freund's adjuvant）においてCpGを加えた九量体MAGE-A1<sub>278-286</sub>を含む30量体ペプチドで免疫された。追加免疫は、不完全フロイントアジュvantにおいてCpGを加えた九量体MAGE-A1<sub>278-286</sub>で行われた。解析の日に、血液が採取され、MAGE-A1/HLA-A2特異的四量体及び特定のTRBV鎖（IMGT命名法）に対する抗体で染色された。数回の追加免疫の後、MAGE-A1特異的T細胞の单一クローニング集団が、ABabDIIマウスの血液中で検出可能である。図3は、免疫された動物の免疫応答と免疫計画を示す。免疫した細胞のFACS解析における有意なシフトは、MAGE特異的なT細胞が生成されたことを示す四量体染色により観察された。

【0069】

実施例2：T細胞受容体の単離及び特徴付け

実施例1において生成されたMAGE-A1特異的T細胞クローニングからのcDNAは、5'-RACEにより增幅され、配列決定された。

【0070】

表1は、ABabDIIマウスからの3つの異なるTCRと健康人から得られた2つのTCRの及び鎖の相補性決定領域3（CDR3）のアミノ酸配列を示す（Ottaviani, S., Zhang, Y., Boon, T., & van der Bruggen, P. (2005). A MAGE-1 antigenic peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 tumor cells. Cancer Immunology, Immunotherapy: CII, 54(12), 1214-1220.）。

【0071】

表1：3つの異なるMAGE-A1特異的TCRのCDR3領域のアミノ酸配列。

【表1】

TCR	α鎖CDR3	β鎖CDR3
1367	TRAV5-CAESIGNSNGYALNF-TRAJ41 (SEQ ID No. 1)	TRBV28-CASRGLAGYEQYF-TRBJ2-7 (SEQ ID No. 4)
1405	TRAV13-1-CAARPNSGNPLVF-TRAJ29 (SEQ ID No. 2)	TRBV29-1-CSVEQDTNTGELFF-TRBJ2-2 (SEQ ID No. 5)
1705	TRAV12-3-CAMSDTGNQFYF-TRAJ49 (SEQ ID No. 3)	TRBV13-CASSFRGGGANVLTF-TRBJ2-6 (SEQ ID No. 6)
CTL27*	TRAV5-CAESYNARLMF-TRAJ31 (SEQ ID No. 7)	TRBV20-CSAREPGQGPYEQYFG-TRBJ7 (SEQ ID No. 9)
CTL89*	TRAV5-CAGSGGGTDKLIF-TRAJ34 (SEQ ID No. 8)	TRBV12-CASLSGVYTGF-TRBJ1-2 (SEQ ID No. 10)

表中、\*は以下を参照するヒトレパートリーである：Ottaviani et al. (2005). Cancer Immunology, Immunotherapy, 54(12), 1214-1220.

【0072】

上記のCDR3配列を含む単離されたTCRは、その後クローニングされた。レトロウイルス

10

20

30

40

50

ベクターMP71は、初代ヒト末梢血リンパ球(hPBLs)の形質導入のために用いられる。それぞれのTCRの および 遺伝子は、両方の鎖の等モル発現(equimolar expression)を確実にする(ensuring)、導入されたTCRの翻訳の間に、細胞プロテアーゼにより切断される、P2Aエレメント(P2A element)と関連付けられる(図4)。

#### 【0073】

全ての遺伝子は、最適な発現のためにコドン最適化される。hPBL中の発現を更に最適化するために、更なる修飾が野生型TCR定常領域に導入された。TCR鎖の定常領域の完全な(図4A)及び最小の(図4B)マウス化(murinization)は、修飾されていないヒト定常領域(図4C)よりも、通常hPBL中の高い発現レベルをもたらす。

#### 【0074】

その後、hCD8+ Jurkat 76細胞は、ABabDIIマウス及びヒトボランティア由来の異なるTCRを導入された。導入細胞は、CD3陽性を染色する。全ての導入細胞は、MAGE-A1/HLA-A2四量体に特異的に結合する(図5)。

#### 【0075】

驚くべきことに、本発明のTCRは、現状水準のTCRと比較して、著しく高い結合活性を提供する。hPBLは、異なるMAGE-A1特異的TCRを導入された。導入されたPBLは、その後異なる濃度のMAGE-A1<sub>278-286</sub>ペプチドをパルスされたT2細胞とともに培養された。一晩培養後、IFN 産生がELISAにより測定された。

#### 【0076】

ペプチドをパルスされたT2細胞による刺激に応答して、ABabDIIマウス由来のTCR(図6、灰色の丸)は、寛容なヒトシステム由来のTCR(図6、白丸)よりも、より低いペプチド濃度での応答及びより多量のIFN 産生を示す。

#### 【0077】

このことは、本発明のTCRを用いた腫瘍細胞認識の試験により、更に確認された(図7)。導入されたhPBLは、異なる腫瘍細胞系列とともに培養された。一晩培養後、IFN 産生は、ELISAにより測定された。導入されたhPBLは、HLA-A2拘束性の提示において、特異的にMAGE-A1を認識する。ABabDIIマウス由来のTCRを導入されたPBL { 1367、1405、1705(full bars) } は、MAGE-A1発現腫瘍細胞系列とともに培養された場合に、ヒトレパートリー由来のTCRを導入されたPBL { CTL27、CTL89(shaded bars) } よりも多量のIFN を産生する。

#### 【0078】

#### 実施例3：本発明のTCRの感受性及び特異性

MAGE-A1<sub>278-286</sub>抗原は、T2細胞上で提示された。抗原提示T2細胞は、本発明のTCR発現T細胞又は対照のTCR発現T細胞(CTL27)とともに共培養された。図17に示したように、ABabDIIマウス由来の本発明のTCRで改変されたT細胞(実線)は、ヒトTCRで改変されたT細胞(一点鎖線)よりも少量の抗原に応答する。(3回の独立した実験のうちの1回の代表的例を示す)。これらの結果は、現状水準のTCRの状態と比較して、本発明のTCRの驚くほどに(少なくとも1桁)改善された感受性を示すものである。

#### 【0079】

密接に関連するMAGE抗原エピトープを越える本発明のTCRの特異性を試験するために、TCR導入細胞(TCRs)をMAGE抗原であるKVLEFVAKV(MAGE-B16)及びKVLEYLAKV(MAGE-B5)と接触させた。抗原はT2細胞により提示され、T2細胞は、その後、本発明及び対照のTCRを発現しているT細胞と共に培養された。インターフェロン放出は、測定された。図18にみられるように、本発明のTCRは、MAGE-A1<sub>278-286</sub>抗原を顕著に認識し、該エピトープのバリエントは有意に認識しなかった。特異性は、対照のTCRと比較して、非常に良好であった。

#### 【0080】

本発明のTCRの高い特異性は、144のヒトHLA-A2拘束性自己抗原を試験した実験において確認された。図19は、TCR 1367を形質移入されたドナーT細胞が、他の試験された自己抗原ではなく、MAGE-A1を特異的に認識したことを示し、本発明のTCRの驚くほど高度な特

10

20

30

40

50

異性を証明している。

【0081】

更に、 $10^6$ のマウスMAGE-A1発現線維肉腫細胞は、免疫不全マウスに注入され、臨床的に適切なサイズである約 $500 \text{ mm}^3$ の腫瘍体積まで増殖された。腫瘍を治療する(treat)ため、ABabDIIマウス(1367、1405)又はヒトTCR(CTL27)の2つのTCRのうちのいずれか1つを有する $10^6$ のMAGE-A1特異的T細胞は、注入された。対照群では、無関係なTCRを有する $10^6$ のT細胞が注入された。

【0082】

治療反応性(treat response)は、腫瘍体積に基づいたT細胞注入14日後に評価された。結果は、下記の表2に示す。ABabDII TCRで治療された群では、100%及び67%のマウスが、治療に反応した。逆に、ヒトTCR又は無関係なTCRを導入されたT細胞で治療された動物は、反応しなかった。

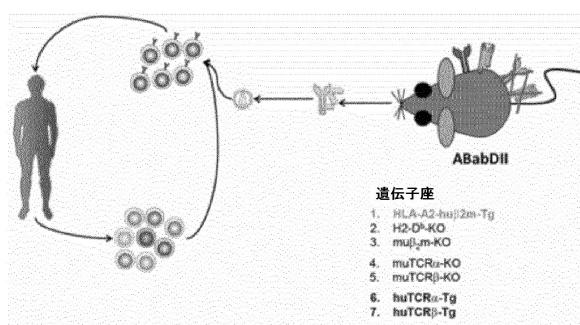
【表2】

投与群	反応率
1367	5/5 (100%)
1405	4/6 (67%)
CTL27(ヒト)	0/6 (0%)
無関係なTCR	0/3 (0%)

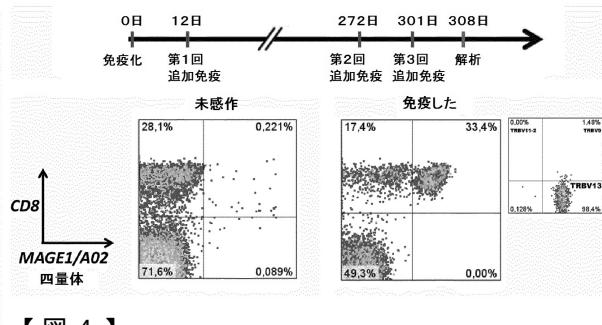
10

20

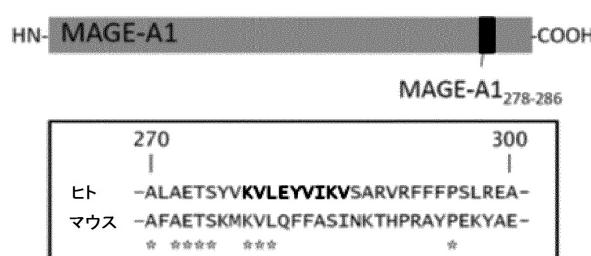
【図1】



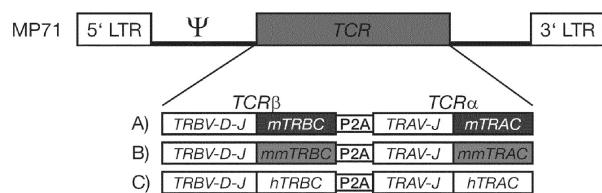
【図3】



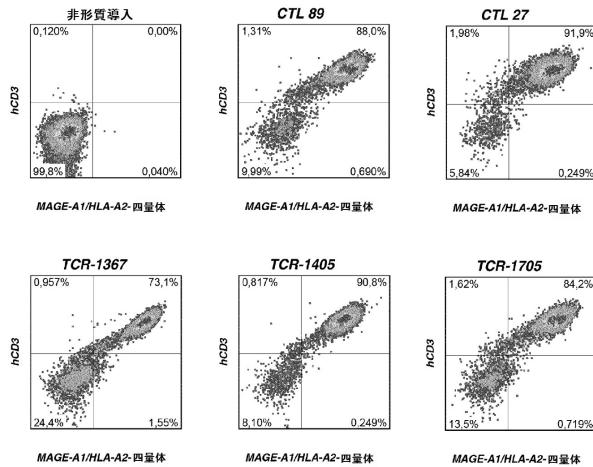
【図2】



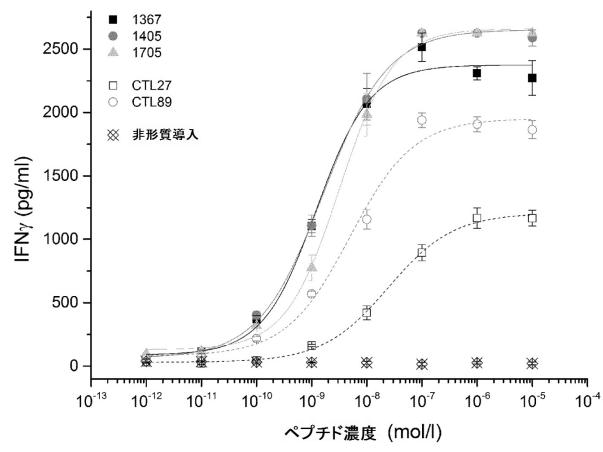
【図4】



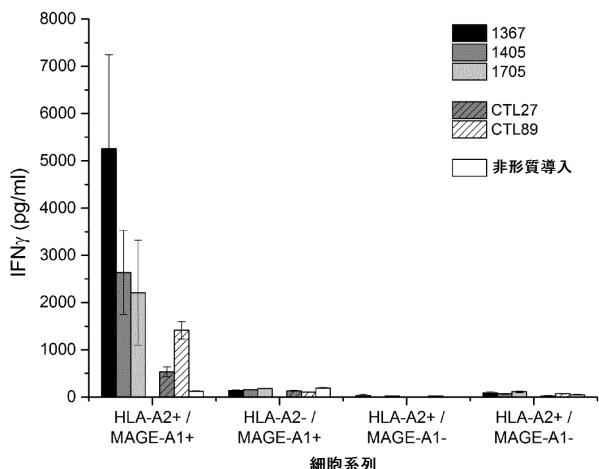
【図5】



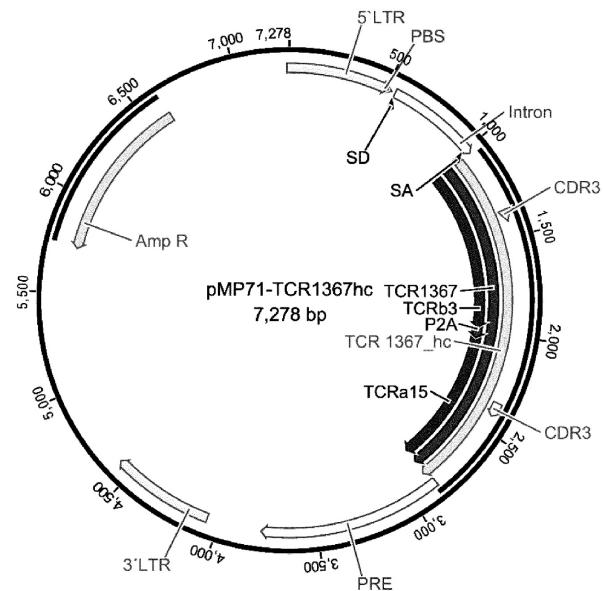
【図6】



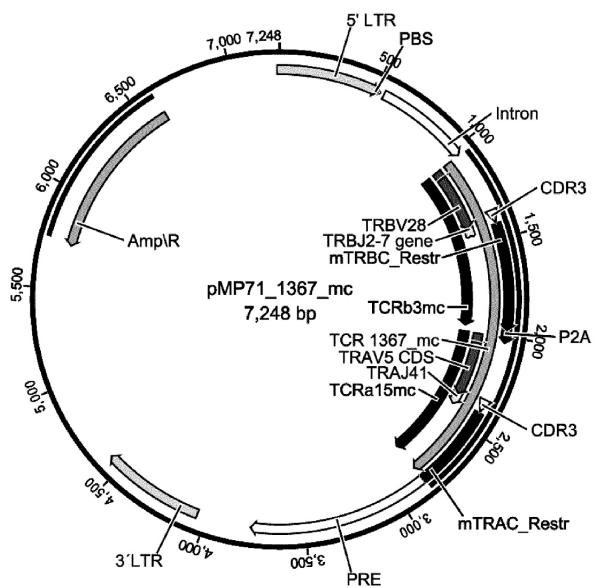
【図7】



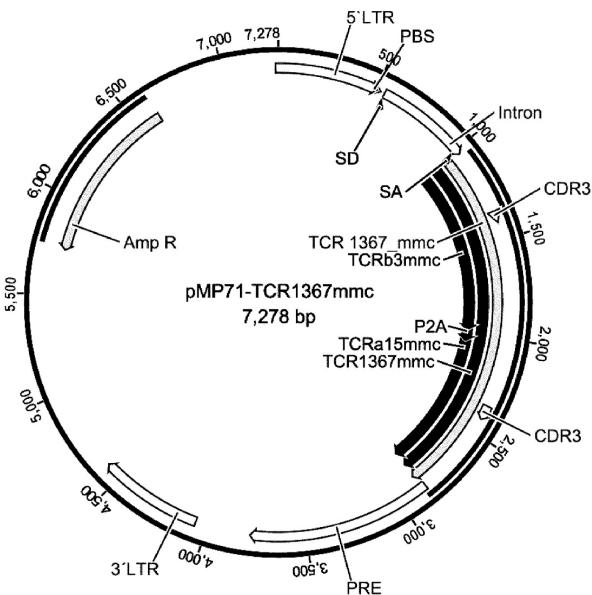
【図8】



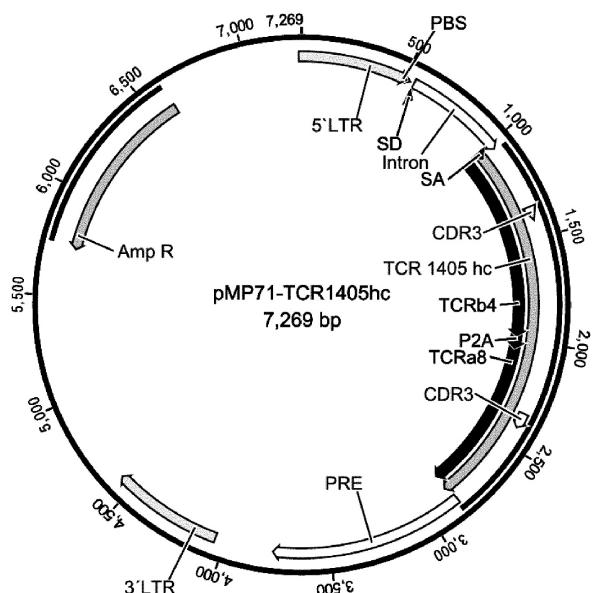
【図9】



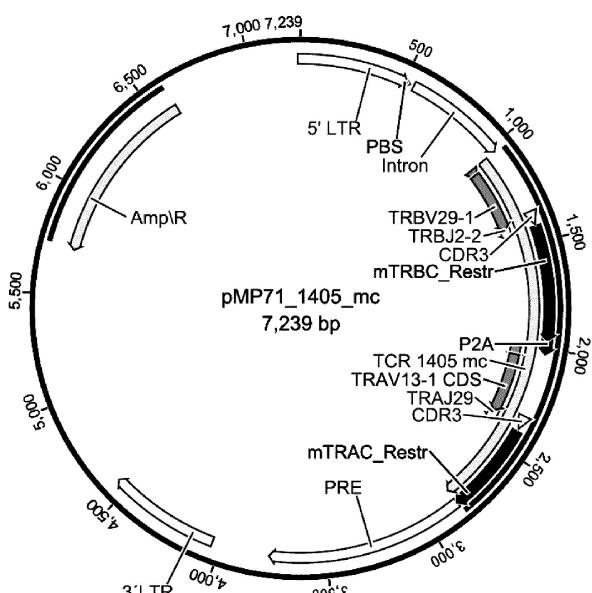
【図10】



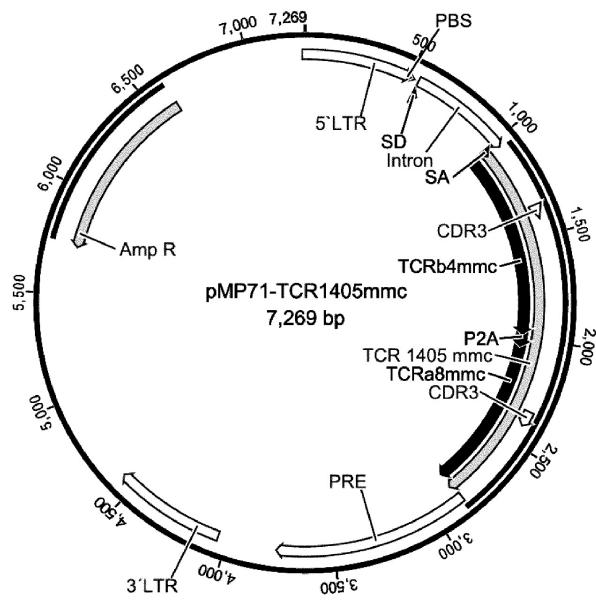
【図11】



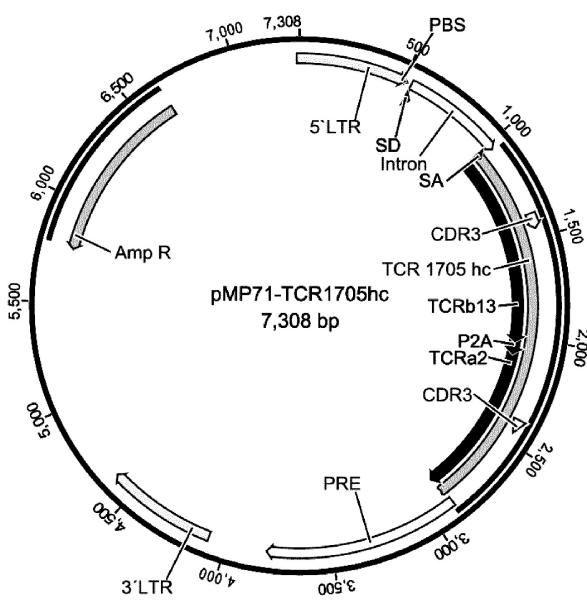
【図12】



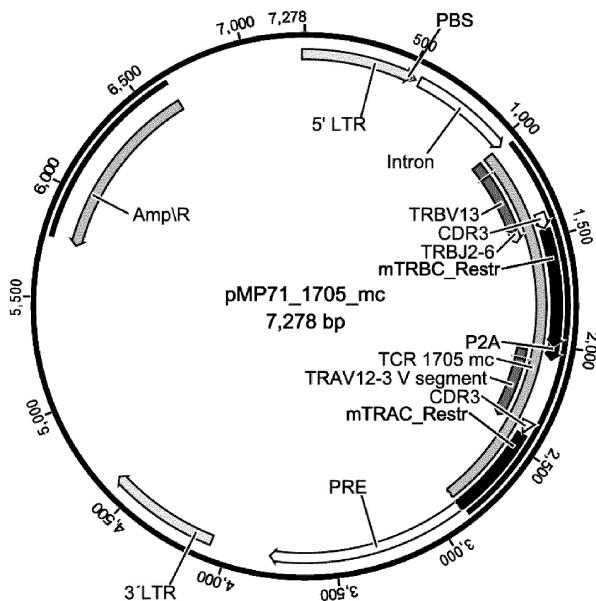
【図13】



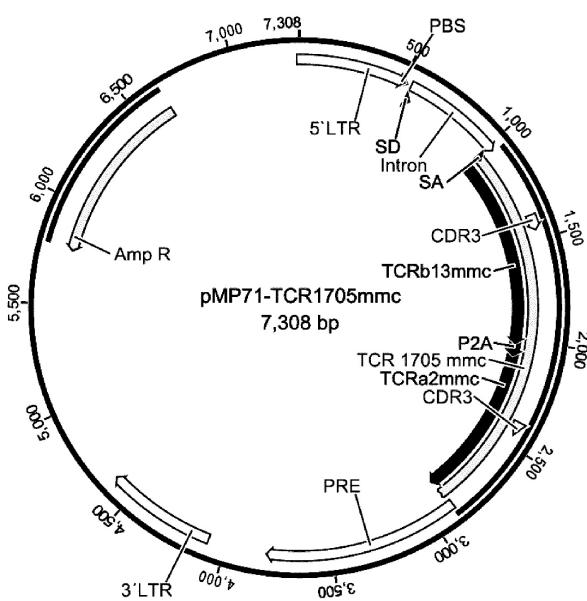
【図14】



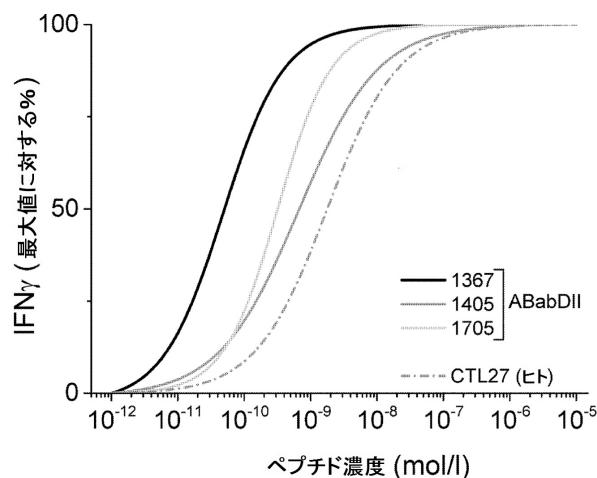
【図15】



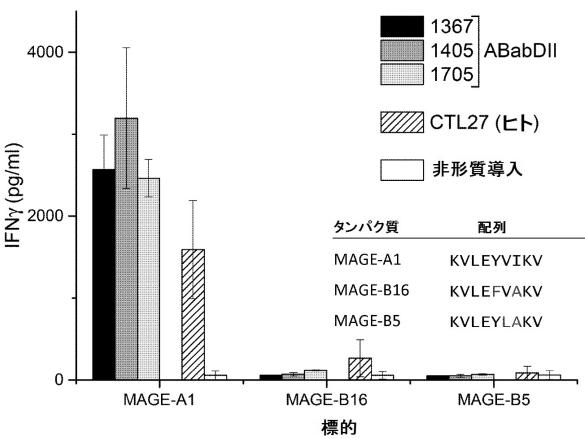
【図16】



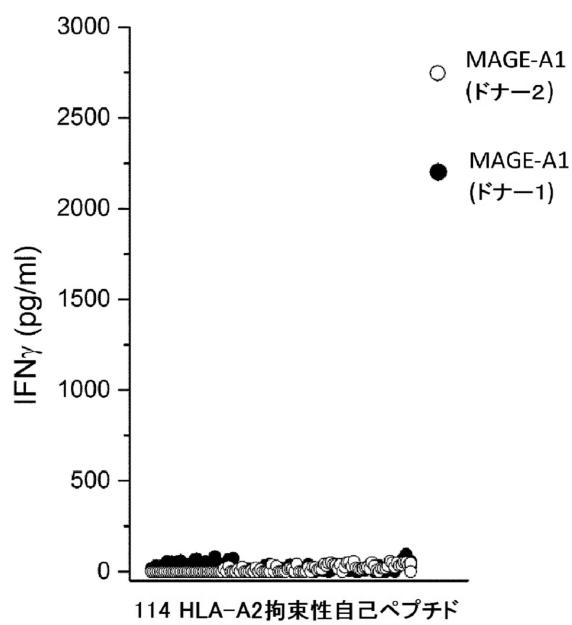
【図17】



【図18】



【図19】



【配列表】

0006639233000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I

A 6 1 K 35/17	(2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(72)発明者 レイトン, カタリナ

ポルトガル, ペ - 1 5 0 0 - 0 3 9 リスボン, オソロ エニ 1 2 2 アー, ルア アナ デ  
カストロ

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 Nature Medicine, 2010年, Vol.16, No.9, p.1029-1034

PNAS, 2000年, Vol.97, No.14, p.7969-7974

Croat Med. J., 2011年, Vol.52, p.171-177

Cancer Immunol. Immunother., 2005年, Vol.54, p.1214-1220

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 K 3 8 / 1 7

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M  
B A S E / B I O S I S ( S T N )

W P I D S / W P I X ( S T N )

P u b M e d

C 1 2 P 2 1 / 0 2