

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7204484号
(P7204484)

(45)発行日 令和5年1月16日(2023.1.16)

(24)登録日 令和5年1月5日(2023.1.5)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
請求項の数 13 (全29頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2018-552775(P2018-552775)	(73)特許権者	517122578 アダプティミュン・リミテッド イギリス国, オックスフォードシャー オーエックス 14・4アールエックス 、アピンドン, ミルトン・パーク, ジュ ピリー・アヴェニュー 60
(86)(22)出願日	平成29年4月10日(2017.4.10)	(74)代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(65)公表番号	特表2019-516356(P2019-516356 A)	(74)代理人	100125380 弁理士 中村 綾子
(43)公表日	令和1年6月20日(2019.6.20)	(74)代理人	100142996 弁理士 森本 聡二
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/058578	(74)代理人	100180231 弁理士 水島 亜希子
(87)国際公開番号	WO2017/174823	(74)代理人	100096769
(87)国際公開日	平成29年10月12日(2017.10.12)		
審査請求日	令和2年4月1日(2020.4.1)		
(31)優先権主張番号	1606156.6		
(32)優先日	平成28年4月8日(2016.4.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		
前置審査			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T細胞受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

可溶性のT細胞受容体(TCR)を使用して、25、pH7.1から7.5の間での表面プラズモン共鳴により測定されるときに、約0.05μMから約20.0μMまでの解離定数で、HLA-A*0201と複合体形成したGVYDGEESHV(配列番号2)およびHLA-A*0201と複合体形成したGVYDGREHTV(配列番号1)に結合する特性を有するTCRであって、前記TCRが、TCRアルファ鎖可変ドメインおよびTCRベータ鎖可変ドメインを含み、前記TCR可変ドメインが、GVYDGEESHV(配列番号2)の少なくとも残基V2、Y3およびD4との接触を形成し、

(A)前記アルファ鎖可変ドメインにおいて、

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

(ii)アミノ酸残基28~33の配列が、VSPFSNであり、

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

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

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

(vi)アミノ酸91~105の配列が、CVVSGGTDSWGK L Q Fであり、かつ

(B)前記ベータ鎖可変ドメインにおいて、

(i) そのアミノ酸残基 1 ~ 4 5 の配列が、配列番号 4 の残基 1 ~ 4 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有し、

(i i) アミノ酸残基 4 6 ~ 5 0 の配列が、K G H D R であり、

(i i i) そのアミノ酸残基 5 1 ~ 6 7 の配列が、配列番号 4 のアミノ酸残基 5 1 ~ 6 7 の配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有し、

(i v) アミノ酸残基 6 8 ~ 7 2 の配列が、S F D V K または A F D V K であり、

(v) そのアミノ酸残基 7 3 ~ 1 0 9 の配列が、配列番号 4 のアミノ酸残基 7 3 ~ 1 0 9 の配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有し、

(v i) アミノ酸 1 1 0 ~ 1 2 3 の配列が、(a) C A T T G Q G A Y N E Q F F もしくは C A T T G Q G A Y E E Q F F もしくは C A T S G Q G A Y V E Q F F であり、ただし、前記アルファ鎖可変ドメインのアミノ酸残基 4 8 ~ 5 3 の配列が L T I V T F であるときには (b) C A T S G Q G A Y N E Q F F である、

T C R。

【請求項 2】

検出可能な標識、治療剤または P K 修飾部分と結合された、請求項 1 に記載の T C R。

【請求項 3】

前記アルファ鎖可変ドメインが、配列番号 3 または 7 のアミノ酸残基 1 ~ 1 0 5 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の T C R。

【請求項 4】

前記アルファ鎖可変ドメインが、配列番号 7 のアミノ酸残基 1 ~ 1 0 5 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 5】

前記ベータ鎖可変ドメインが、配列番号 4 および 1 0 ~ 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 6】

前記アルファ鎖可変ドメインが、配列番号 3 のアミノ酸配列を有し、かつ前記ベータ鎖可変ドメインが、配列番号 1 0 ~ 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、または前記アルファ鎖可変ドメインが、配列番号 7 のアミノ酸配列を有し、かつ前記ベータ鎖可変ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の T C R。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の T C R をコードする核酸。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の T C R を提示している、単離されたまたは天然に存在しない細胞。

【請求項 9】

T 細胞である、請求項 8 に記載の単離されたまたは天然に存在しない細胞。

【請求項 1 0】

(a) 単一のオープンリーディングフレーム内に、もしくはアルファ鎖およびベータ鎖をそれぞれコードする 2 つの異なるオープンリーディングフレーム内に、請求項 7 に記載の核酸を含む T C R 発現ベクター、または

(b) 請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の T C R のアルファ鎖をコードする核酸を含む第 1 の発現ベクター、および請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の T C R のベータ鎖をコードする核酸を含む第 2 の発現ベクターを宿している細胞。

【請求項 1 1】

1 種または複数の薬学的に許容される担体または添加剤と一緒に、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の T C R、請求項 7 の核酸、または請求項 8 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む医薬組成物。

【請求項 1 2】

10

20

30

40

50

薬における使用のための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の T C R、請求項 7 の核酸、または請求項 8 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 1 3】

がんを治療する方法における使用のための、請求項 1 2 に記載の使用のための T C R、核酸または細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[配列表]

本発明は、黒色腫関連抗原 (MAGE) B 2 タンパク質 (アミノ酸 230 ~ 239) 由来の H L A - A * 0 2 0 1 拘束デカペプチド G V Y D G E E H S V (配列番号 2)、および黒色腫関連抗原 (MAGE) A 4 タンパク質由来の H L A - A * 0 2 0 1 拘束デカペプチド G V Y D G R E H T V (配列番号 1) を結合する T 細胞受容体 (T C R) に関する。本発明の T C R は、これらの MAGE エピトープに対する優れた特異性プロファイルを示す。

10

【背景技術】

【0002】

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

20

【0003】

30 を超えるがん・精巢 (C T) 遺伝子が、染色体 X 上の遺伝子クラスター内に編成されている多遺伝子ファミリーのメンバーとして報告されている (C T - X 抗原)。C T 遺伝子クラスターは、X q 24 および X q 28 の間に位置し、MAGE および N Y - E S O - 1 などの遺伝子ファミリーを含む。I 型 MAGE 遺伝子クラスターは、最も広範囲に特徴付けられ、MAGE - A、MAGE - B および MAGE - C ファミリーを含む。MAGE - A タンパク質は、異なる 12 の MAGE - A 遺伝子ファミリーメンバー (MAGE - A 1 から MAGE - A 12) によってコードされ、MAGE 相同ドメイン (MHD) と呼ばれる、保存された 165 ~ 171 アミノ酸塩基によって定義される。MHD は、すべての MAGE - A ファミリーメンバーによって共有されたアミノ酸の領域のみに相当する。

30

【0004】

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

40

【0005】

いくつかの MAGE 遺伝子ファミリータンパク質は、生殖細胞およびがんにおいてのみ発現される (MAGE - A から MAGE - C ファミリー)。他は、正常組織において広範に発現される (MAGE - D から MAGE - H)。これらすべての MAGE タンパク質ファミリーは、他の MAGE タンパク質の配列と近似した相同領域を有し、かつ免疫認識において H L A / ペプチド複合体として提示されるペプチドを含む。したがって、所望の M

50

AGEペプチド/HLA-A2抗原に特異性が高いTCR臨床候補を選択することは重要である。

【0006】

MAGE-B2は、MAGE-B遺伝子ファミリーのCTAメンバーである。それは胚発生において役割を果たしうると考えられているが、その機能はまだ知られていない。腫瘍病因論では、それは、腫瘍形質転換または腫瘍進行の局面に関与するようである。MAGE-B2は、多数の腫瘍に関与している。ペプチドGVYDGEESHV(配列番号2)は、既知のMAGE-B2タンパク質のアミノ酸残基番号231~241に相当する。

【0007】

MAGE-A4は、MAGE-A遺伝子ファミリーのCTAである。MAGE-A4は、精巣および胎盤、ならびに多様な組織学的な型の腫瘍の顕著な画分において発現される。ペプチドGVYDGREHTV(配列番号1)は、MAGE-B2と交差反応性を示し、それによって、ある種のTCRが、両方のペプチドを提示しているHLA分子に結合することができるようになる。

10

【発明の概要】

【0008】

本発明者らは、MAGE-B2ペプチドGVYDGEESHV(配列番号2)を提示しているHLA分子ならびにMAGE-A4ペプチドGVYDGREHTV(配列番号1)を提示しているHLA分子に結合するTCRを開発した。第1の態様では、本発明は、可溶型のT細胞受容体(TCR)を使用して、25、pH7.1から7.5の間での表面プラズモン共鳴で測定されるときに、約0.05μMから約20.0μMまでの解離定数で、HLA-A*0201と複合体形成したGVYDGEESHV(配列番号2)およびGVYDGREHTV(配列番号1)に結合する特性を有するTCRを提供し、ここで、TCRは、TCRアルファ鎖可変ドメインおよびTCRベータ鎖可変ドメインを含み、ここで、TCR可変ドメインは、GVYDGEESHV(配列番号2)の少なくとも残基V2、Y3およびD4との接触ならびにGVYDGREHTV(配列番号1)の少なくとも残基V2、Y3およびD4との接触を形成する。

20

【0009】

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

30

【0010】

一部の実施形態では、TCRのアルファ鎖可変ドメインは、配列番号3(アルファ鎖)のアミノ酸残基1~105の配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ/またはベータ鎖可変ドメインは、配列番号4(ベータ鎖)のアミノ酸残基1~123の配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0011】

さらなる態様では、本発明は、HLA-A*0201と複合体形成したGVYDGEESHV(配列番号2)およびGVYDGREHTV(配列番号1)に結合する特性を有し、TCRアルファ鎖可変ドメインおよびTCRベータ鎖可変ドメインを含む、T細胞受容体(TCR)であって、

アルファ鎖可変ドメインは、配列番号3のアミノ酸残基1~105の配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ/または

ベータ鎖可変ドメインは、配列番号4のアミノ酸残基1~123の配列に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、TCRを提供する。

【0012】

50

G V Y D G R E H T V (配列番号 1) H L A - A 2 および G V Y D G R E H T V (配列番号 1) H L A - A 2 複合体は、本発明の T C R が標的とすることができるがんマーカーを提供する。本発明は、がん細胞に細胞傷害剤または免疫エフェクター剤を送達する目的に有用な、かつ/または養子療法における使用に有用な、こうした T C R を提供する。

【 0 0 1 3 】

T C R は、国際免疫遺伝学 (I M G T) T C R 命名法、および T C R 配列の I M G T 公的データベースへのリンクを使用して記載されている。天然のアルファ - ベータヘテロ二量体 T C R は、アルファ鎖およびベータ鎖を有する。概して、それぞれの鎖は、可変領域、連結領域および定常領域を含み、ベータ鎖は、通常、可変領域と連結領域との間に短い多様性領域も含むが、この多様性領域は、連結領域の部分とみなされることが多い。それぞれの可変領域は、フレームワーク配列内に埋め込まれた 3 つの C D R (相補性決定領域) を含み、1 つは、C D R 3 と命名された超可変領域である。それらのフレームワーク、C D R 1 および C D R 2 配列によって、ならびに部分的に定義された C D R 3 配列によって、区別されるいくつかの型のアルファ鎖可変 (V) 領域およびいくつかの型のベータ鎖可変 (V) 領域がある。V 型は、I M G T 命名法において固有の T R A V 番号によって称される。「T R A V 2 1」は、固有のフレームワークおよび C D R 1 および C D R 2 配列、ならびに、T C R 間で保存されているアミノ酸配列だけでなく T C R によって異なるアミノ酸配列をも含むアミノ酸配列によって部分的に定義される C D R 3 配列を有する T C R - V 領域を定義する。同様の方法で、「T R B V 5 - 1」は、固有のフレームワークおよび C D R 1 および C D R 2 配列を有する T C R - V 領域を定義するが、部分的にのみ定義された C D R 3 配列を有する。

【 0 0 1 4 】

T C R の連結領域は、固有の I M G T T R A J および T R B J 命名法によって、定常領域は、I M G T T R A C および T R B C 命名法によって、同様に定義される。

【 0 0 1 5 】

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

【 0 0 1 6 】

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

【 0 0 1 7 】

I M G T 命名法によって定義される固有の配列は、T C R 分野における当業者に広く知られており、利用可能である。例えば、それらは、I M G T 公的データベースにおいて見出されうる。“T c e l l R e c e p t o r F a c t s b o o k”, (2 0 0 1) L e F r a n c a n d L e F r a n c , A c a d e m i c P r e s s , I S B N 0 - 1 2 - 4 4 1 3 5 2 - 8 も、I M G T 命名法によって定義される配列を開示しているが、その公開日および結果として生じる時間のずれのため、その中の情報は、時に、I M G T データベースの参照による確認を必要とする。

【 0 0 1 8 】

本発明による 1 つの T C R は、配列番号 3 (T R A V 1 0 + T R A C) に示されているようなアルファ鎖細胞外ドメインおよび配列番号 4 (T R B V 2 4 - 1 + T R B C - 2) に示されているようなベータ鎖細胞外ドメインを含む。「親 T C R」、「親 M A G E - A 4 - T C R」という用語は、本明細書において同義的に使用され、配列番号 3 および 4 それぞれの細胞外アルファ鎖およびベータ鎖を含むこの T C R を指す。ペプチド - H L A 複

10

20

30

40

50

合体に対して親TCRよりも高い親和性および/または遅い解離速度を有する、親TCRに対して相対的に変異または修飾されたTCRを提供することは望ましい。

【0019】

こうした変異または修飾されたTCRの結合プロファイルが比較されうるものに対する参照TCRを提供する目的で、配列番号3に示されている親MAGE-A4-TCRアルファ鎖の細胞外配列および配列番号4に示されている親MAGE-A4-TCRベータ鎖の細胞外配列を有する本発明による可溶性TCRを使用することは都合がいい。そのTCRは、本明細書において、「参照TCR」または「参照MAGE-A4-TCR」と称される。

【0020】

本発明のTCRは、天然に存在しないものであってもよく、かつ/または精製および/もしくは改変されていてもよい。本発明のTCRは、親TCRに対して相対的なアルファ鎖可変ドメインおよび/またはベータ鎖可変ドメインに存在する2つ以上の変異を有していてもよい。「改変TCR」および「変異体TCR」は、本明細書において同義的に使用され、親TCRに対して相対的に、特に、そのアルファ鎖可変ドメインおよび/またはベータ鎖可変ドメイン内に、導入された1つまたは複数の変異を有するTCRを一般に意味する。これらの変異は、HLA-A*020101と複合体形成したGVYDGEESHV(配列番号2)に対する結合親和性を改良しうる。ある特定の実施形態では、アルファ鎖可変ドメイン内に1、2、3、4、5、6、7つまたは8つの変異、例えば、4つまたは8つの変異があり、かつ/またはベータ鎖可変ドメイン内に1、2、3、4つまたは5つの変異、例えば、5つの変異がある。一部の実施形態では、本発明のTCRの鎖可変ドメインは、配列番号3のアミノ酸残基1~105の配列に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、本発明のTCRの鎖可変ドメインは、配列番号4のアミノ酸残基1~123の配列に対して少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。

【0021】

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

【表1】

CDR2 M4	V
CDR3 S4	T
CDR3 S4	N

の変異を有していてもよく、かつ/または

ベータ鎖可変ドメインは、配列番号4に示されている番号付けを参照して

【表2】

CDR3 N10	G
CDR3 N10	V
CDR2 S1	A
CDR3 S4	T
CDR3 N10	E

10

20

30

40

50

の変異のうちの少なくとも1つを有していてもよい。

【0022】

本発明のTCRのアルファ鎖可変ドメインは、配列番号3もしくは7もしくは8もしくは9のアミノ酸残基1～105のアミノ酸配列

またはそのアミノ酸残基1～27、34～47および54～90がそれぞれ配列番号3もしくは7もしくは8のアミノ酸残基1～27、34～47および54～90の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有し、アミノ酸残基28～33、48～53および91～105がそれぞれ配列番号3もしくは7もしくは8もしくは9のアミノ酸残基28～33、48～53および91～105の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでいてもよい。

10

【0023】

アルファ鎖可変ドメインにおいて

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

(ii) アミノ酸残基28～33の配列は、V S P F S N (配列番号19)であり、

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

20

(iv) アミノ酸残基48～53の配列は、L T I M T F (配列番号20)またはL T R M T F (配列番号21)であってもよく、

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

(vi) アミノ酸91～105の配列は、C V V S G G T D S W G K L Q F (配列番号22)であってもよい。

【0024】

本発明のTCRのベータ鎖可変ドメインは、配列番号4もしくは6もしくは10～12のアミノ酸配列

またはそのアミノ酸残基1～45、51～67、74～109がそれぞれ配列番号4もしくは6もしくは10～12のアミノ酸残基1～45、51～67、74～109の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有し、アミノ酸残基46～50、68～73および109～123がそれぞれ配列番号4もしくは6もしくは10～12のアミノ酸残基46～50、68～73および109～123の配列に対して少なくとも90%もしくは95%の同一性を有するアミノ酸配列

を含んでいてもよい。

【0025】

ベータ鎖可変ドメインにおいて

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

(ii) アミノ酸残基46～50の配列は、K G H D R (配列番号23)またはK G R D R (配列番号24)であってもよく、

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

30

40

50

基を有していてもよく、

(i v) アミノ酸残基 6 8 ~ 7 3 の配列は、 S V F D K (配列番号 2 5) であってもよく、

(v) そのアミノ酸残基 5 4 ~ 9 0 の配列は、 (a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 5 4 ~ 9 0 の配列に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有していてもよく、または (b) (a) の配列に対して相対的に挿入もしくは欠失された 1 つ、 2 つまたは 3 つのアミノ酸残基を有していてもよく、

(v i) アミノ酸 1 0 9 ~ 1 2 3 の配列は、 C A T S G Q G A Y N E Q F F (配列番号 2 6) または C A T S G Q G A Y R E Q F F (配列番号 2 7) または C A T S G Q G A Y K E Q F F (配列番号 2 8) である。

【 0 0 2 6 】

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

10

20

30

40

50

【表 3】

アルファ鎖配列番号	ベータ鎖配列番号
3	4
3	6
3	10
3	11
3	12
5	4
5	6
5	10
5	11
5	12
7	4
7	6
7	10
7	11
7	12
8	4
8	6
8	10
8	11
8	12
9	4
9	6
9	10
9	11
9	12

10

20

30

40

【0027】

本明細書中に開示されている本発明のいずれのTCRの表現型的にサイレントなバリエーションも本発明の範囲内である。本明細書中で使用される場合、「表現型的にサイレントなバリエーション」という用語は、上記のものに加えて1つまたは複数のさらなるアミノ酸変更を組み込むTCRであって前記変更を含まない対応するTCRと類似した表現型を有するTCRを指すことが理解される。本出願の目的で、TCR表現型には、抗原結合特異性（ K_D および/または結合半減期）および抗原特異性が含まれる。表現型的にサイレントなバリエーションは、同一条件下で（例えば、25℃、同じSPRチップ上で）測定されたときに、前記変更を含まない対応するTCRの測定された K_D および/または結合半減期の1

50

0%以内の、GVYDGEESHV（配列番号2）HLA-A*0201複合体またはGVYDGREHTV（配列番号1）HLA-A*0201複合体に対する K_D および/または結合半減期を有していてもよい。好適な条件は、実施例3においてさらに定義されている。抗原特異性は、以下でさらに定義されている。当業者に知られているように、GVYDGEESHV（配列番号2）HLA-A*0201複合体またはGVYDGREHTV（配列番号1）HLA-A*0201複合体との相互作用のための親和性を変えることなく、上記に詳述されているものと比較して、その定常ドメインおよび/または可変ドメイン内に変更を組み込むTCRを作製することが可能でありうる。特に、こうしたサイレントな変異は、抗原結合に直接に関与しないことが知られている配列の部分内（例えば、CDRの外側）に組み込まれうる。こうした些細なバリエーションは、本発明の範囲内に含まれる。1つまたは複数の保存的置換がなされているTCRも、本発明の部分構成する。

10

【0028】

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

20

【0029】

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

30

【0030】

本発明のTCRは、ヘテロ二量体であってもよくまたは単鎖形式であってもよい。単鎖形式には、V-L-V、V-L-V、V-C-L-VまたはV-L-V-C型のTCRポリペプチドが含まれ、VおよびVはそれぞれTCR可変領域およびTCR可変領域であり、CおよびCはそれぞれTCR定常領域およびTCR定常領域であり、Lはリンカー配列である。治療剤を抗原提示細胞に送達するためのターゲティング剤としての使用のために、TCRは、可溶型（すなわち、膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインを有していない）であってもよい。安定性のために、可溶性ヘテロ二量体TCRは、例えば、WO03/020763に、記載されているように、それぞれの定常ドメインの残基間に導入されたジスルフィド結合を有することが好ましい。本発明のヘテロ二量体内に存在する定常ドメインのうちの1つまたは両方は、例えば、多くとも15個、または多くとも10個もしくは多くとも8個の、またはそれよ

40

50

り少ないアミノ酸だけ、C末端でトランケートされていてもよい。養子療法における使用のために、ヘテロ二量体TCRは、例えば、細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインの両方を有する完全長の鎖としてトランスフェクトされてもよい。養子療法における使用のためのTCRは、自然界においてそれぞれのアルファ定常ドメインとベータ定常ドメインとの間に見出されるものと一致しているジスルフィド結合を含んでいてもよく、付加的にまたは代替的に、天然でないジスルフィド結合が存在していてもよい。

【0031】

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

10

【0032】

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

20

【0033】

結合親和性(平衡定数 K_D に反比例する)および結合半減期($T_{1/2}$ と表される)は、本明細書中の実施例3の表面プラズモン共鳴(BIACORE)法を使用して決定される。測定は、可溶型のTCRを使用して、25、pH7.1から7.5の間で行われうる。TCRの親和性が2倍になると、結果として K_D は半分になることは理解されよう。 $T_{1/2}$ は、解離速度(k_{off})によって除算された $\ln 2$ として算出される。したがって、 $T_{1/2}$ が2倍になると、結果として k_{off} は半分になる。TCRについての K_D および k_{off} 値は、通常、可溶型、すなわち、トランケートされて疎水性膜貫通ドメイン残基が除去された形態のTCRについて測定される。したがって、所与のTCRは、そのTCRの可溶型がその必要条件を満たす場合には、それが、GVYDGREHTV(配列番号1)-HLA-A2複合体およびGVYDGEHSV(配列番号2)-HLA-A2複合体に対する結合親和性、および/または結合半減期を有するという必要条件を満たすことが理解されるべきである。好ましくは、所与のTCRの結合親和性または結合半減期は、同じアッセイプロトコールを使用して、数回、例えば、3回以上測定され、結果の平均がとられる。参照TCRは、その方法によって測定されるように、約 $17 \mu M$ の K_D を有し、 $T_{1/2}$ は約1.6秒である。

30

【0034】

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

40

【0035】

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

【0036】

本発明は、本発明のベクター、好ましくは、TCR発現ベクターを宿している細胞も提供する。ベクターは、単一のオープンリーディングフレーム、または2つの異なるオープ

50

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

【0037】

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

10

【0038】

本発明の可溶性TCRは、抗原提示細胞および抗原提示細胞を含む組織に対する検出可能な標識または治療剤を送達するのに有用である。したがって、(GVYDGEESHV(配列番号2)またはGVYDGREHTV(配列番号1)-HLA-A2複合体を提示している細胞の存在を検出するためにTCRが使用される、診断目的のための)検出可能な標識;治療剤;または(例えば、ペグ化による)PK修飾部分と(共有結合または他の方法で)結合されていてもよい。

20

【0039】

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

【0040】

本発明のTCRと結合されうる治療剤としては、免疫調節物質、放射性化合物、酵素(例えばパーフォリン)または化学療法剤(例えばシスプラチン)が含まれる。毒性作用が望ましい部位において果たされることを確実にするために、毒素は、化合物がゆっくりと放出されるように、TCRに連結されたリポソームの中にあってもよい。これは、体内での輸送中の損傷作用を防止することになり、関連する抗原提示細胞に対するTCRの結合後に毒素が最も高い効果を有することを確実にする。

30

【0041】

他の好適な治療剤としては、

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

40

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

50

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

- ・ 免疫刺激剤、すなわち、免疫応答を刺激する免疫エフェクター分子。例えば、IL-2およびIFN- γ などのサイトカイン、
- ・ スーパー抗原およびその変異体；
- ・ TCR-HLA融合体；
- ・ ケモカイン、例えば、IL-8、血小板第4因子、黒色腫増殖刺激タンパク質など；
- ・ 抗T細胞または抗NK細胞決定因子抗体（例えば、抗CD3、抗CD28または抗CD16）を含む、抗体またはその断片；
- ・ 抗体様結合特性を有する代替のタンパク質足場
- ・ 補体活性化因子；
- ・ 異種のタンパク質ドメイン、同種異系のタンパク質ドメイン、ウイルス/細菌のタンパク質ドメイン、ウイルス/細菌のペプチド

が含まれる。

【0042】

好ましい一実施形態は、抗CD3抗体、または前記抗CD3抗体の機能的な断片もしくはバリエーション（通常、アルファ鎖またはベータ鎖のN末端またはC末端への融合によって）結合された本発明のTCRによって提供される。本明細書に記載の組成物および方法における使用に好適である抗体断片およびバリエーション/アナログとしては、ミニボディ、Fab断片、F(ab')₂断片、dsFvおよびscFv断片、Nanobodies（商標）（Abllynx（Belgium）によって市販されている、これらのコンストラクトは、ラクダ科動物（例えば、ラクダまたはラマ）抗体に由来する合成単一免疫グロブリン可変重鎖ドメインを含む）ならびにドメイン抗体（Domantis（Belgium）、親和性が成熟した単一の免疫グロブリン可変重鎖ドメインまたは免疫グロブリン可変軽鎖ドメインを含む）または抗体様結合特性を示す代替のタンパク質足場、ほんの少し例を挙げれば、Affibodies（Affibody（Sweden）、改変されたプロテインA足場を含む）またはAnticalins（Pieris（German）、改変されたアンチカリンを含む）などが含まれる。

【0043】

いくつかの目的のために、本発明のTCRは、数種類のTCRを含む複合体に凝集されて多価TCR複合体を形成していてもよい。多価TCR複合体の生成において使用される、多量体化ドメインを含むいくつかのヒトタンパク質がある。例えば、p53の四量体化ドメイン、これは、単量体scFv断片と比較して、血清残留性の上昇および解離速度の顕著な低下を示す、scFv抗体断片の四量体を生成するために利用されてきた（Willuda et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392）。ヘモグロビンも、この種類の適用に潜在的に使用されうる四量体化ドメインを有する。本発明の多価TCR複合体は、多量体でない野生型または本発明のT細胞受容体ヘテロ二量体と比較して、GVYDGREHTV（配列番号1）-HLA-A2複合体に対する増強された結合能力を有しうる。したがって、本発明のTCRの多価複合体も本発明の範囲内に含まれる。本発明によるこうした多価TCR複合体は、in vitroまたはin vivoで特定の抗原を提示している細胞をトラッキングまたはターゲティングするのに特に有用であり、こうした使用を有するさらなる多価TCR複合体の生成のための中間体としても有用である。

【0044】

当技術分野においてよく知られているように、TCRには、翻訳後修飾が行われうる。グリコシル化は、1つのこうした修飾であり、これは、TCR鎖における定められたアミノ酸に対するオリゴ糖部分の共有結合的付加を含む。例えば、アスパラギン残基、または

セリン/スレオニン残基は、よく知られているオリゴ糖付加のための部位である。特定のタンパク質のグリコシル化状態は、タンパク質配列、タンパク質高次構造および特定の酵素の有用性を含む、いくつかの要因に依存する。さらに、グリコシル化状態（すなわち、オリゴ糖型、共有結合および付加の総数）は、タンパク質機能に影響しうる。したがって、組換えタンパク質を製造するとき、グリコシル化を制御するのが望ましいことが多い。制御されたグリコシル化は、抗体に基づいた療法を改良するために使用されてきた。（*Jefferis R., Nat Rev Drug Discov. 2009 Mar; 8(3): 226-34.*）。本発明の可溶性TCRに対して、グリコシル化は、*in vivo*で、例えば、特定の細胞株を使用することによって、または*in vitro*で、化学修飾によって、制御されてもよい。グリコシル化は、薬物動態を改良すること、免疫原性を低下させること、および天然のヒトタンパク質をより近く模倣することができるので、こうした修飾は望ましい（*Sinclair AM and Elliott S., Pharm Sci. 2005 Aug; 94(8): 1626-35.*）。

10

【0045】

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

20

【0046】

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

【0047】

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

30

【0048】

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

【0049】

本発明によってさらに提供されるのは、以下である：

40

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

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

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

【0050】

本発明のそれぞれの態様の好ましい特徴は、必要な変更を加えて他の態様のそれぞれについてのものと同様である。本明細書において言及されている従来技術文献は、法律によ

50

って許可される最大限の範囲まで組み込まれている。

【0051】

本発明は、以下の非限定的な実施例においてさらに記載される。

【0052】

添付の配列が参照され、そこでは、

配列番号1は、MAGE - B2ペプチドであり

配列番号2は、MAGE - A4ペプチドであり

【0053】

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

10

【0054】

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

【0055】

配列番号7、8および9は、本発明のTCR内に存在しうるアルファ鎖の配列を示す。CDR領域を形成している部分配列、またはCDR領域の実質的な部分は、下線付きである。

20

【0056】

配列番号10~12は、本発明のTCR内に存在しうるベータ鎖の配列を示す。CDR領域を形成している部分配列、またはCDR領域の実質的な部分は下線付きである。

【0057】

配列番号13~18は、本出願の変異および選択の技術によって改良することができなかったTCRのアルファ鎖およびベータ鎖の配列を示す。

【実施例】

30

【0058】

[実施例1: pGMT7に基づく発現プラスミド内への参照MAGE - A4 - TCRアルファ鎖およびベータ鎖可変領域配列のクローニング]

それぞれ配列番号3および4の親MAGE - A4 - TCR可変アルファドメインおよびTCR可変ベータドメインは、C またはC のいずれかを含むpGMT7に基づく発現プラスミド内に、(SambrookおよびRussellによるMolecular Cloning a Laboratory Manual Third edition)に記載されている標準的な方法によってクローニングされた。プラスミドは、Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzerを使用してシーケンスされた。それぞれ配列番号4および5の参照MAGE - A4 - TCR可変アルファドメインおよびTCR可変ベータドメインは、同様の方法でクローニングされた。

40

【0059】

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

【0060】

ライゲーションされたプラスミドは、コンピテントな大腸菌(E. coli)株XL1-blue細胞内に形質転換され、100μg/mLのアンピシリンを含むLB/寒天プレート上に播種された。37°Cで一晩インキュベーション後、単一コロニーが採取され、100μg/mLのアンピシリンを含む5mLのLB中で37°Cで振盪しながら一晩培養

50

された。クローニングされたプラスミドは、Miniprepキット(Qiagen)を使用して精製され、プラスミドは、Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzerを使用してシーケンスされた。

【0061】

[実施例2：可溶性参照MAGE-A4-TCRの発現、リフォールディングおよび精製]

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

【0062】

約15mgのTCR鎖および15mgのTCR鎖の可溶化封入体が凍結ストックから解凍され、確実に完全に鎖変性するように、10mlのグアニジン溶液(6Mの塩酸グアニジン、50mMのTris-HCl(pH8.1)、100mMのNaCl、10mMのEDTA、10mMのDTT)中に希釈された。完全に還元および変性されたTCR鎖を含むグアニジン溶液は、次いで、0.5リットルの以下のリフォールディングバッファー：100mMのTris(pH8.1)、400mMのL-アルギニン、2mMのEDTA、5Mの尿素中に注入された。酸化還元対(塩酸システアミンおよび二塩酸シスタミン)がそれぞれ6.6mMおよび3.7mMの最終濃度まで添加され、約5分後に、変性されたTCR鎖が添加された。溶液は、約30分間放置された。リフォールディングされたTCRは、Spectrapor1メンブレン(Spectrum;製品番号132670)において10LのH₂Oに対して18~20時間透析された。この時間の後に、透析バッファーは、新しい10mMのTris(pH8.1)(10L)に2回交換され、透析は、5 \pm 3 $^{\circ}$ Cでさらに約8時間継続された。

【0063】

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

【0064】

10

20

30

40

50

[実施例 3]

< 結合特性評価 >

< B I A c o r e 解析 >

表面プラズモン共鳴バイオセンサー (B I A c o r e 3 0 0 0 (商 標)) は、可溶性 T C R の、そのペプチド - M H C リガンドに対する結合を解析するために使用される。これは、ストレプトアビジンでコーティングされた結合表面 (センサーチップ) に固定される可溶性ビオチン化ペプチド - H L A (「 p H L A 」) 複合体を作製することによって容易になる。センサーチップは、異なる 4 種の p H L A 複合体に対する T 細胞受容体の結合を同時に測定することを可能にする 4 つの個別のフローセルを含む。 p H L A 複合体の手動注入により、固定されたクラス I 分子の正確なレベルを容易に操作することが可能となる。

10

【 0 0 6 5 】

ビオチン化されたクラス I の H L A - A * 0 2 0 1 分子は、構成サブユニットタンパク質および合成ペプチドを含む、細菌で発現された封入体から *in vitro* でリフォールディングされ、その後、精製されて、*in vitro* で酵素によりビオチン化された (O ' C a l l a g h a n e t a l . (1 9 9 9) A n a l . B i o c h e m . 2 6 6 : 9 - 1 5) 。 H L A - A * 0 2 0 1 重鎖は、適切なコンストラクトにおいてタンパク質の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを置き換える C 末端ビオチン化タグ付きで発現された。1 リットルの細菌培養液あたり約 7 5 m g の封入体発現レベルが得られた。M H C 軽鎖または 2 - ミクログロブリンも、適切なコンストラクトから大腸菌における封入体

20

【 0 0 6 6 】

大腸菌細胞は溶解され、封入体は約 8 0 % の純度まで精製された。封入体からのタンパク質は、6 M のグアニジン - H C l 、 5 0 m M の T r i s (p H 8 . 1) 、 1 0 0 m M の N a C l 、 1 0 m M の D T T 、 1 0 m M の E D T A 中で変性され、0 . 4 M の L - アルギニン、1 0 0 m M の T r i s (p H 8 . 1) 、 3 . 7 m M の二塩酸シスタミン、6 . 6 m M の塩酸システアミン、H L A - A * 0 2 分子によるロードが必要とされる 4 m g / L の M A G E - A 4 - G V Y D G R E H T V (配列番号 1) または M A G E - B 2 - G V Y D G E E H S V (配列番号 2) ペプチド中に、3 0 m g / リットルの重鎖、3 0 m g / リットルの 2 m の濃度で、変性タンパク質の単一パルスを < 5 のリフォールディングバッファ中に添加することによってリフォールディングされた。リフォールディングは、4

30

で少なくとも 1 時間で完了に到達することが可能にされた。

【 0 0 6 7 】

バッファは、1 0 容量の 1 0 m M の T r i s (p H 8 . 1) 中での透析によって交換された。バッファの 2 回の交換は、溶液のイオン強度を十分に低下させるために必要とされた。次いで、タンパク質溶液は、1 . 5 μ m のセルロースアセテートフィルターを通して濾過され、P O R O S 5 0 H Q 陰イオン交換カラム (8 m l のベッド容量) 上にロードされた。タンパク質は、A k t a 精製装置 (G E H e a l t h c a r e) を使用して 1 0 m M の T r i s (p H 8 . 1) 中の直線的な 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配で溶出された。H L A - A * 0 2 0 1 - ペプチド複合体は、約 2 5 0 m M の N a C l で溶出され、ピーク画分が収集されて、プロテアーゼ阻害剤のカクテル (C a l b i o c h e m) が

40

【 0 0 6 8 】

ビオチンタグ付き p H L A 分子は、1 0 m M の T r i s (p H 8 . 1) 、 5 m M の N a C l 中で平衡化された G E H e a l t h c a r e の高速脱塩カラムを使用して、同バッファ中にバッファ交換された。溶出されるとすぐに、タンパク質含有分画は氷上で冷却され、プロテアーゼ阻害剤カクテル (C a l b i o c h e m) が添加された。次いで、ビオチン化試薬 : 1 m M のビオチン、5 m M の A T P (p H 8 に緩衝された) 、 7 . 5 m M の M g C l 2 、 および 5 μ g / m l の B i r A 酵素 (O ' C a l l a g h a n e t a l . (1 9 9 9) A n a l . B i o c h e m . 2 6 6 : 9 - 1 5 に従って精製された) が

50

添加された。次いで、この混合物は、室温で一晩インキュベート可能にされた。

【0069】

ビオチン化された pH LA - A*0201 分子は、ゲル濾過クロマトグラフィーを使用して精製された。GE Healthcare Superdex 75 HR 10/30 カラムは、濾過された PBS で予め平衡化されて 1 ml のビオチン化反応混合物がロードされ、そのカラムは、Akt a 精製装置 (GE Healthcare) を使用して PBS を用いて 0.5 ml / 分で展開された。ビオチン化された pH LA - A*0201 分子は、約 15 ml で単一のピークとして溶出された。タンパク質を含む画分は、プールされて、氷上で冷却され、プロテアーゼ阻害剤カクテルが添加された。タンパク質濃度は、クマシー結合アッセイ (PerBio) を使用して決定され、ビオチン化された pH LA - A*01 分子の一定分量は、-20 で凍結保存された。

10

【0070】

こうした固定された複合体は、T 細胞受容体および補助受容体 CD8 の両方を結合することができ、その両方が可溶相に注入されうる。可溶性 TCR の pH LA 結合特性は、TCR が可溶相または固定相のいずれかにおいて使用される場合、質的にも量的にも類似していることが認められる。これは、可溶種の部分活性についての重要な対照であり、ビオチン化 pH LA 複合体が生物学的に非ビオチン化複合体と同じくらい活性であることも示唆する。

【0071】

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

20

【0072】

< 平衡結合定数 >

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

30

【0073】

動態パラメーター

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

【0074】

高親和性 TCR (下記の実施例 4 を参照されたい) のために、 K_D は、解離速度定数、

40

50

k_{off} 、および結合速度定数、 k_{on} を実験的に測定することによって決定された。平衡定数 K_D は、 k_{off} / k_{on} として算出された。

【0075】

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

10

【0076】

[実施例4：本発明の高親和性TCRの調製]

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

【表4】

TCR ID	アルファ鎖配列番号	ベータ鎖配列番号
TCR1(親)	3	4
TCR2	7	4
TCR3	8	4
TCR4	3	9
TCR5	3	10
TCR6	3	11
TCR7	3	12

20

30

【0077】

プラスミドが大腸菌株BL21pLysS内に別々に形質転換され、単一のアンピシリン耐性コロニーをTYP(アンピシリン100μg/ml)培地中で37℃で約0.6~0.8のOD₆₀₀まで培養した後に、0.5mMのIPTGでタンパク質発現を誘発した。細胞は、導入3時間後に、Beckman J-6B内で4000rpmで30分間の遠心分離によって回収された。細胞ペレットは、MgCl₂およびDNアーゼIの存在下で25mlのBug Buster(Novagen)で溶解された。封入体ペレットは、Beckman J2-21遠心分離機内で13000rpmで30分間の遠心分離によって回収された。次いで、3回の界面活性剤での洗浄が行われて細胞デブリおよび膜成分が除去された。封入体ペレットは、毎回、Tritonバッファー(50mMのTris-HCl(pH8.0)、0.5%のTriton-X100、200mMのNaCl、10mMのNaEDTA)中でホモジナイズされた後に、Beckman J2-21内で13000rpmで15分間の遠心分離によってペレット化された。次いで、以下のバッファー：50mMのTris-HCl(pH8.0)、1mMのNaEDTA中での同様の洗浄によって界面活性剤および塩が除去された。最終的に、封入体は、30mgの一定分量に小分けされて-70℃で凍結された。封入体タンパク質の収量は、6Mのグアニジン-HClで可溶化することによって定量化され、OD測定は、日立U-2001分

40

50

光光度計上で行われた。次いで、吸光係数を使用してタンパク質濃度が算出された。

【 0 0 7 8 】

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

10

【 0 0 7 9 】

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

20

【 0 0 8 0 】

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

30

【表 5】

	MAGE A4 K _D (μM)	MAGE-B2 K _D (μM)
参照(TCR1)	65.1	17
TCR2	6.8	2.1
TCR3	7.6	1.7
TCR4	3.15	0.15
TCR5	14.2	6.4
TCR6	1.349	0.348
TCR7	1.65	6.227

40

【 0 0 8 1 】

配列番号 1 3 / 1 4 、 1 5 / 1 6 、 1 7 / 1 8 の組合せに基づいた高親和性 T C R を調

50

製するために試行も行われた。

【0082】

配列番号13のアルファ鎖と配列番号14のベータ鎖とを合わせ持つ、TCR-Aの場合には、MAGE-A1、MAGE-A10およびPRAMEの間で交差反応性が認められた。変異および選択によってこの交差反応性をなくすことは不可能であった。

【0083】

TCR-Bは、配列番号15のアルファ鎖と配列番号16のベータ鎖とを合わせ持つ。TCR-Bは、可溶性TCRを形成するようにフォールディングさせることができなかったため、結合特性評価は不可能であった。

【0084】

TCR-Cは、配列番号17のアルファ鎖と配列番号18のベータ鎖とを合わせ持つ。このTCRは、発現されたときに可溶性であってかつ抗原に結合することができた。しかし、T細胞において発現されたときには、TCR-Cは、活性を示さなかった。

【0085】

[実施例5：親MAGE-A4-TCRおよびバリエーションMAGE-A10 TCRでのT細胞のトランスフェクション]

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

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

【0086】

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

【0087】

別の1.5mLのマイクロチューブ内で、予め混合されたパッケージング混合物一定分量(18μgのpRSV.REV(Rev発現プラスミド)、18μgのpMDLg/p.RRE(Gag/Pol発現プラスミド)、7μgのpVSV-G(VSV糖タンパク質発現プラスミド)を含む、通常約22μL)に15μgのプラスミドDNAが添加され、DNA混合物を確実に均一にさせるために上および下にピペティングされた。このDNA混合物に約1mLのExpress-In/無血清培地を滴下で添加され、次いで、上および下に穏やかにピペティングされた後に、残りのExpress-In/無血清培地に移し戻された。チューブは、3~4回逆さにされて、室温で15~30分間インキュベートされた。細胞のフラスコから古い培地が除去された。293T細胞の直立型フラスコの底にExpress-In/培地/DNA(3mL)複合体が直接に添加された。ゆっくりと、フラスコは、細胞を覆うように平らに置かれ、確実に分散するようにきわめて穏やかに揺動された。1分後、22mLの新しい培地(R10+HEPES:RPMI1640、熱失活された10%FBS、1%ペニシリン/ストレプトマイシン/L-グルタミン、10mM HEPES)が添加され、フラスコは、インキュベーターに注意深く戻された。これは、37/5%CO₂で一晩インキュベートされた。24時間後、パッ

10

20

30

40

50

ケーシングされたレンチウイルスベクターを含む培地が回収された。

【0088】

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

【0089】

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

10

パッケージングされたレンチウイルスベクターでの形質導入前に、健康な志願者の血液からヒトT細胞（CD8もしくはCD4または必要条件によっては両方）が単離された。これらの細胞は、計数され、48ウェルプレート内で、50U/mLのIL-2を含むR10中、1mLあたり 1×10^6 細胞（0.5mL/ウェル）で、1細胞あたり3個のビーズの比率で、予め洗浄された抗CD3/CD28抗体コーティング付きマイクロビーズ（Dynabeads（登録商標）T cell expander、Invitrogen）と共に一晩インキュベートされた。

【0090】

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

20

30

【0091】

[実施例6：MAGE-B2-TCR改変T細胞の活性化]

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

【0092】

<ELISPOT>

<試薬>

アッセイ培地：10%FCS（Gibco、カタログ番号2011-09）、88%RPMI1640（Gibco、カタログ番号42401）、1%グルタミン（Gibcoカタログ番号25030）および1%ペニシリン/ストレプトマイシン（Gibcoカタログ番号15070-063）。

40

洗浄バッファー：0.01M PBS/0.05%Tween20

PBS（Gibcoカタログ番号10010）

関連したAEC基質セット（BD Bioscience、カタログ番号551951）

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

【0093】

50

< 方法 >

< 標的細胞の調製 >

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

【0094】

< エフェクター細胞調製 >

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

【0095】

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

【0096】

次いで、以下の順序でアッセイの成分がELISPOTプレートに添加された：

50μLの標的細胞10⁶細胞/ml（合計50,000個の標的細胞/ウェルにする）

50μLの培地（アッセイ培地）

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

【0097】

プレートは、次いで、一晩インキュベートされた（37℃/5%CO₂）。翌日、プレートは、洗浄バッファーで3回洗浄され（プログラム1、プレート型2、Ultrawash Plus 96ウェルプレート洗浄機、DyneX）、ペーパータオル上で軽く叩かれて乾燥されて余分な洗浄バッファーが除去された。100μlの一次検出抗体は、次いで、各ウェルに添加された。一次検出抗体は、製造業者の説明書に明記された希釈を使用して、10mlの希釈バッファー（単一のプレートに必要とされる容量）中に希釈された。プレートは、次いで、室温で少なくとも2時間インキュベートされた後に洗浄バッファーで3回洗浄された（プログラム1、プレート型2、Ultrawash Plus 96ウェルプレート洗浄機、DyneX）；余分な洗浄バッファーは、プレートをペーパータオル上で軽く叩くことによって除去された。

【0098】

10

20

30

40

50

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

10

【0099】

[実施例7：すべての代替アミノ酸での置換による結合モチーフの同定]

それぞれの位置のアミノ酸残基が19種すべての天然に存在する代替のアミノ酸で順次置き換えられた天然のMAGE - B2ペプチドのバリエーションが得られ、それによって、全部で171種のペプチドが調製された。天然のペプチドおよびアミノ酸置換されたペプチドが、抗原提示細胞上にパルスされ、ELISpotアッセイを使用して測定されるような、インターフェロン（IFN）産生が、TCR2で形質導入されたT細胞の活性化についての読み出しとして使用された。不可欠な位置は、天然のペプチドに対して相対的に50%を超えるT細胞活性における低下によって定義された。

20

【0100】

ELISpotアッセイは、実施例6に記載のように行われた。

【0101】

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

30

【0102】

40

50

【表 6】

位置	許容される残基
1	<u>G</u>
2	<u>VI</u>
3	WF <u>Y</u>
4	<u>D</u>
5	<u>GN</u>
6	CDMAGSETQFKVLIHNR(配列番号29)
7	YSWTFQMHP LANGDICE(配列番号30)
8	FWVLMAYRKCTIQSHGPN(配列番号31)
9	VNLPMTKQRIYW <u>S</u> AFEGH(配列番号32)
10	FMV <u>A</u> ILT(配列番号33)

10

20

【0103】

したがって、抗原提示細胞の表面上でHLA-A*0201と複合体形成しているときに、MAGE-B2TCR2が、ペプチド(配列番号1)の少なくともV2、Y3およびD4と接触することは明らかである。

【0104】

配列番号1 MAGE-A4エピトープ

【化1】

GVYDGREHTV

配列番号2 MAGE-B2エピトープ

【化2】

GVYDGEEHSV

配列番号3 アルファ可変鎖

【化3】

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSN
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQE

配列番号4 ベータ可変鎖

30

40

50

【化 4】

MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
 LGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQATALYFCATSGQGAYNE
QFF

配列番号 5 アルファ鎖 可溶型

【化 5】

MKKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQD
 TGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSW
 GKLQFGAGTQVVVTPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYIT
 DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

10

配列番号 6 ベータ鎖 可溶型

【化 6】

MASLLFFCGAFYLLGTGSMADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
 LGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSESAIPNQATALYFCATSGQGAYNE
 QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWV
 GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN
 DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD

20

配列番号 7 変異型アルファ可変鎖

【化 7】

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGGRGPVSLTIIVTFSENTKSN
 GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

30

配列番号 8 変異型アルファ可変鎖

【化 8】

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGGRGPVSLTIITTFSENTKSN
 GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

配列番号 9 変異型アルファ可変鎖

【化 9】

MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGGRGPVSLTINTTFSENTKSN
 GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

40

配列番号 10 変異型ベータ可変鎖

50

【化 1 0】

MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
LGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQATALYFCCATSGQGAYVE
QFF

配列番号 1 1 変異型ベータ可変鎖

【化 1 1】

MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
LGLRLIYYAFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQATALYFCCATTGQGAYNE
QFF

10

配列番号 1 2 変異型ベータ可変鎖

【化 1 2】

MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDPG
LGLRLIYYAFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQATALYFCCATTGQGAYEE
QFF

20

配列番号 1 3 アルファ鎖 可溶型

【化 1 3】

METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTPIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPG
KGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVGGYSTLTFGK
GTVLLVSPDNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD
MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLN
FQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

30

配列番号 1 4 ベータ鎖 可溶型

【化 1 4】

MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCAQDMNHNYMYWYRQDPG
MGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASSYSRWSP
LHFGNGTRLTVTEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVN
GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSEN
DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALV
LMAMVKRKDF

40

配列番号 1 5 アルファ鎖 可溶型

50

【化 1 5】

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKED
GRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVAVKMANQAGTALIFGKGTTLVSSNIQNP
PAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAW
SNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

配列番号 1 6 ベータ鎖 可溶型

10

【化 1 6】

MQDGGITQSPKFQVLRGTGQSMTLLCAQDMNHEMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITD
QGEVPNGYNVSRNLKREFSLRLESAAPSQTSVYFCASLGGLADEQFFGPGTRLTVLEDLK
NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPL
KEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV
SAEAWGRAD

20

配列番号 1 7 アルファ鎖 可溶型

【化 1 7】

MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQE
PGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAERNNGAGS
YQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITD
KTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET
DTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

30

配列番号 1 8 ベータ鎖 可溶型

【化 1 8】

MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSNPRHKITKRGQNVTFRCDPSEHNRLYWYRQTLG
QGPEFLTYFQNEAQLKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLFSGV
NTEAFFGQGTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSW
WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGL
SENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV
SALVLMAMVKRKDF

40

【配列表】

0007204484000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K	38/17	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z

有原 幸一

(72)発明者

トリプル, ニコラス

イギリス国, オックスフォードシャー オーエックス14・4アールワイ, アビンドン, ミルトン・パーク, パーク・ドライブ 101, アダプティミュン・リミテッド内

(72)発明者

ローレンス, ウィリアム

イギリス国, オックスフォードシャー オーエックス14・4アールワイ, アビンドン, ミルトン・パーク, パーク・ドライブ 101, アダプティミュン・リミテッド内

(72)発明者

バッグ, エリノア

イギリス国, オックスフォードシャー オーエックス14・4アールワイ, アビンドン, ミルトン・パーク, パーク・ドライブ 101, アダプティミュン・リミテッド内

審査官 上村 直子

(56)参考文献

特開2015-163067(JP, A)

特表2003-518911(JP, A)

特表2019-516355(JP, A)

特表2019-513383(JP, A)

特表2019-516357(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 12 - 15 / 90

C 0 7 K 14 / 7 2 5 - 19 / 0 0

C 1 2 N 5 / 1 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq