

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6378172号
(P6378172)

(45) 発行日 平成30年8月22日(2018.8.22)

(24) 登録日 平成30年8月3日(2018.8.3)

(51) Int.Cl.

F 1

| | | | | | |
|---------|--------|-----------|---------|--------|-------|
| C 0 7 K | 14/725 | (2006.01) | C 0 7 K | 14/725 | Z N A |
| C 0 7 K | 19/00 | (2006.01) | C 0 7 K | 19/00 | |
| C 1 2 N | 15/12 | (2006.01) | C 1 2 N | 15/12 | |
| C 1 2 N | 5/10 | (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | |
| G O 1 N | 33/574 | (2006.01) | G O 1 N | 33/574 | A |

請求項の数 29 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-514144 (P2015-514144)
 (86) (22) 出願日 平成25年5月22日 (2013.5.22)
 (65) 公表番号 特表2015-525208 (P2015-525208A)
 (43) 公表日 平成27年9月3日 (2015.9.3)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/042162
 (87) 國際公開番号 WO2013/177247
 (87) 國際公開日 平成25年11月28日 (2013.11.28)
 審査請求日 平成28年4月8日 (2016.4.8)
 (31) 優先権主張番号 61/650,020
 (32) 優先日 平成24年5月22日 (2012.5.22)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 510002280
 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208
 92-7660 ベトヘスダ エムエスシ
 -7660 スイテ325 エクエクトイ
 ブ ボウレバルド 6011 ナショナル
 インスティテュート オブ ヘルス オ
 フィス オブ テクノロジー トランسف
 ター
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マウス抗NY-ESO-1 T細胞受容体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

NY-ESO-1(配列番号1)に対する抗原特異性を有し、マウス可変領域およびマウス定常領域を含む、単離又は精製されたT細胞受容体(TCR)であって、TCRが、配列番号3の鎖相補性決定領域(CDR)1アミノ酸配列、配列番号4の鎖CDR2アミノ酸配列、配列番号5の鎖CDR3アミノ酸配列、配列番号6の鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号7の鎖CDR2アミノ酸配列、および配列番号8の鎖CDR3アミノ酸配列を含む、単離又は精製されたTCR。

【請求項2】

TCRが、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅(配列番号2)に対する抗原特異性を有する、請求項1に記載の単離又は精製されたTCR。 10

【請求項3】

配列番号9の鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号10の鎖可変領域アミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載の単離又は精製されたTCR。

【請求項4】

配列番号11及び12のアミノ酸配列を含む、請求項1~3のいずれか一項に記載の単離又は精製されたTCR。

【請求項5】

NY-ESO-1(配列番号1)に対する抗原特異性を有し、マウスTCR可変領域を含む、単離又は精製されたポリペプチドであって、ポリペプチドの前記マウスTCR可変領域が、配列番号3の鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号4の鎖CDR2アミノ酸配列、配列番号5の鎖CDR3

アミノ酸配列、配列番号6の 鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号7の 鎖CDR2アミノ酸配列、および配列番号8の 鎖CDR3アミノ酸配列を含む、単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号9の 鎖可変領域アミノ酸配列及び配列番号10の 鎖可変領域アミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号11及び12の両方のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチドの少なくとも1つを含む、単離又は精製されたタンパク質。 10

【請求項 9】

NY-ESO-1 (配列番号1) に対する抗原特異性を有し、マウスTCR可変領域を含む、単離又は精製されたタンパク質であって、タンパク質の前記マウスTCR可変領域が、配列番号3の 鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号4の 鎖CDR2アミノ酸配列、および配列番号5の 鎖CDR3アミノ酸配列を含む第一のポリペプチド鎖、及び配列番号6の 鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号7の 鎖CDR2アミノ酸配列、および配列番号8の 鎖CDR3アミノ酸配列を含む第二のポリペプチド鎖を含む、単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 10】

配列番号9の 鎖可変領域アミノ酸配列を含む第一のポリペプチド鎖、及び配列番号10の 鎖可変領域アミノ酸配列を含む第二のポリペプチド鎖を含む、請求項 9 に記載の単離又は精製されたタンパク質。 20

【請求項 11】

配列番号11のアミノ酸配列を含む第一のポリペプチド鎖、及び配列番号12のアミノ酸配列を含む第二のポリペプチド鎖を含む、請求項 9 または 10 に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 12】

タンパク質が融合タンパク質である、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のTCR、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド又は請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸。 30

【請求項 14】

ヌクレオチド配列がコドン最適化される、請求項 13 に記載の単離又は精製された核酸。

【請求項 15】

ヌクレオチド配列が、配列番号15及び16の両方、又は配列番号19及び20の両方を含む、請求項 13 又は 14 に記載の単離又は精製された核酸。

【請求項 16】

請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の核酸を含む、組換え発現ベクター。 40

【請求項 17】

ヌクレオチド配列が、相補性決定領域 (CDR) 1 、 CDR2 、 CDR3 を含む 鎖、および CDR1 、 CDR2 及び CDR3 を含む 鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、 CDR1 、 CDR2 及び CDR3 をコードするヌクレオチド配列が、 CDR1 、 CDR2 及び CDR3 をコードするヌクレオチド配列の 5' であって、切断可能なリンカーペプチドが 鎖と 鎖の間に配置されている、請求項 16 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 18】

ヌクレオチド配列が、 CDR1 、 CDR2 、 CDR3 を含む 鎖、および CDR1 、 CDR2 及び CDR3 を含む 鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、 CDR1 、 CDR2 及び CDR3 をコ 50

ードするヌクレオチド配列が、CDR1、CDR2 及びCDR3 をコードするヌクレオチド配列の3' であって、切断可能なリンカーペプチドが 鎖と 鎖の間に配置されている、請求項16に記載の組換え発現ベクター。

【請求項19】

配列番号17を含む、請求項17に記載の組換え発現ベクター。

【請求項20】

配列番号18を含む、請求項18に記載の組換え発現ベクター。

【請求項21】

請求項16～20のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターを含む、単離された宿主細胞。

10

【請求項22】

細胞がヒトである、請求項21に記載の宿主細胞。

【請求項23】

請求項21又は22に記載の宿主細胞の少なくとも1つを含む、細胞集団。

【請求項24】

請求項1～4のいずれか一項に記載のTCR、請求項5～7のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項8～12のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項13～15のいずれか一項に記載の核酸、請求項16～20のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター、請求項21若しくは22に記載の宿主細胞、又は請求項23に記載の細胞集団と、医薬上許容される担体とを含む、医薬組成物。

20

【請求項25】

哺乳動物において癌の存在を検出する方法であって、

(a) 請求項1～4のいずれか一項に記載のTCR、請求項5～7のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項8～12のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項13～15のいずれか一項に記載の核酸、請求項16～20のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター、請求項21若しくは22に記載の宿主細胞、請求項23に記載の細胞集団、又は請求項24に記載の医薬組成物と、哺乳動物由来の1以上の細胞を含むサンプルとをin vitroで接触させ、それにより複合体を形成すること、及び

(b) 該複合体を検出すること
を含み、ここで、該複合体の検出が、哺乳動物における癌の存在を示す、方法。

30

【請求項26】

請求項1～4のいずれか一項に記載のTCR、請求項5～7のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項8～12のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項13～15のいずれか一項に記載の核酸、請求項16～20のいずれか一項に記載の組換え発現ベクター、請求項21若しくは22に記載の宿主細胞、請求項23に記載の細胞集団、又は請求項24に記載の医薬組成物を含む、癌を治療又は予防するための医薬。

【請求項27】

哺乳動物における癌の治療又は予防のための医薬の製造における、請求項1～4のいずれか一項に記載のTCRの、請求項5～7のいずれか一項に記載のポリペプチドの、請求項8～12のいずれか一項に記載のタンパク質の、請求項13～15のいずれか一項に記載の核酸の、請求項16～20のいずれか一項に記載の組換え発現ベクターの、請求項21若しくは22に記載の宿主細胞の、請求項23に記載の細胞集団の、又は請求項24に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項28】

癌がメラノーマ、乳癌、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、卵巣癌又は滑膜細胞肉腫である、請求項25に記載の方法、又は請求項27に記載の使用。

【請求項29】

癌がメラノーマ、乳癌、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、卵巣癌又は滑膜細胞肉腫である、請求項26に記載の医薬。

50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願の相互参照**

本特許出願は2012年5月22日出願の米国仮特許出願第61/650,020号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）の利益を主張する。

【0002】**電子提出された物件の参照による組み込み**

本明細書と同時提出され以下のとおり特定される、コンピューターで読み取り可能な又クレオチド／アミノ酸配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：23,462バイトのASCII（テキスト）ファイル1件、名称「713415ST25.TXT」、2013年4月30日作成。

10

【背景技術】**【0003】****発明の背景**

養子細胞療法は、ある種の患者においては、癌に対する効果的な治療であり得る。しかし、養子細胞療法の全般的成功に対する障害が依然として存在する。例えば、メラノーマ腫瘍サンプルは、わずか50%しか腫瘍反応性T細胞を產生し得ない。非メラノーマ癌から腫瘍反応性T細胞を產生することもまた困難であり得る。さらに、多くの患者は、外科的切除の可能性がある腫瘍を有し得ない。従って、癌患者の治療に使用するためのT細胞受容体が必要とされている。

20

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【0004】****発明の簡単な要旨**

本発明は、NY-ESO-1に対する抗原特異性を有し、マウス（*murine*）可変領域を含む、単離又は精製されたT細胞受容体（TCR）を提供する。本発明はまた、関連するポリペプチド及びタンパク質、並びに関連する核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞及び細胞集団も提供する。さらに、本発明は、本発明のTCRと関連する、抗体又はその抗原結合部分、及び医薬組成物も提供する。

30

【0005】

本発明はさらに、哺乳動物において癌の存在を検出する方法、及び哺乳動物において癌を治療又は予防する方法を提供する。哺乳動物において癌の存在を検出する本発明の方法は、(i) 本明細書に記載の本発明のTCR、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、宿主細胞集団、又は抗体若しくはその抗原結合部分のいずれかと、癌細胞を含むサンプルとを接触させ、それにより複合体を形成すること、及び(ii) 該複合体を検出することを含み、ここで、該複合体の検出が、哺乳動物における癌の存在を示す。

【0006】

哺乳動物において癌を治療又は予防する本発明の方法は、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド若しくはタンパク質のいずれか、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、タンパク質のいずれかをコードする又は本明細書に記載の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組換えベクターを含む任意の宿主細胞若しくは宿主細胞集団を、哺乳動物において癌を治療又は予防するのに有効な量で、哺乳動物に投与することを含む。

40

【0007】**図面の各図の簡単な説明****【図面の簡単な説明】****【0008】**

【図1】図1A及び1Bは、様々な濃度のNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅をパルスした樹状細胞との共培養

50

に際し、マウス抗NY-ESO-1 TCR（影付き丸印）又はヒト抗NY-ESO-1 TCR（影なし丸印）がトランスフェクトされたヒトCD8+（図1A）又はCD4+（図1B）T細胞によるインターフェロン（IFN）- 分泌を示すグラフである。

【図2A】図2Aは、単独で培養するか（培地）、又はコントロールペプチドをパルスしたT2細胞、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスしたT2細胞、又は様々な腫瘍細胞株888mel（NY-ESO-1⁻）、Sk23mel（NY-ESO-1⁻）、COA-A2-CEA（NY-ESO-1⁻）、A375mel（NY-ESO-1⁺）、1363mel（NY-ESO-1⁺）若しくはCOS-A2-ESO（NY-ESO-1⁺）の一つと共に培養した、マウス抗NY-ESO-1 TCR（影付き棒グラフ）又はヒト抗NY-ESO-1 TCR（影なし棒グラフ）がトランスフェクトされたヒトCD8+（図2A）T細胞によるIFN- 分泌を示すグラフである。

【図2B】図2Bは、単独で培養するか（培地）、又はコントロールペプチドをパルスしたT2細胞、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスしたT2細胞、又は様々な腫瘍細胞株888mel（NY-ESO-1⁻）、Sk23mel（NY-ESO-1⁻）、COA-A2-CEA（NY-ESO-1⁻）、A375mel（NY-ESO-1⁺）、1363mel（NY-ESO-1⁺）若しくはCOS-A2-ESO（NY-ESO-1⁺）の一つと共に培養した、マウス抗NY-ESO-1 TCR（影付き棒グラフ）又はヒト抗NY-ESO-1 TCR（影なし棒グラフ）でトランスフェクトされたヒトCD4+（図2B）T細胞によるIFN- 分泌を示すグラフである。 10

【発明を実施するための形態】

【0009】

発明の詳細な説明

本発明は、NY-ESO-1に対する抗原特異性を有し、マウス可変領域を含む、単離又は精製されたT細胞受容体（TCR）を提供する。NY-ESO-1は癌精巣抗原（CTA）であり、これは、腫瘍細胞、並びにMHCを発現しない精巣及び胎盤生殖細胞にのみ発現する。NY-ESO-1は、メラノーマ、乳癌、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、卵巣癌及び滑膜細胞肉腫を含む（ただし、これらに限定されない）、様々なヒト癌に発現する。NY-ESO-1タンパク質は、配列番号1を含むか、配列番号1からなるか又は実質的に配列番号1からなってよい。 20

【0010】

TCRは、任意のNY-ESO-1タンパク質、ポリペプチド又はペプチドに対する抗原特異性を有してよい。本発明の一実施態様において、TCRは、配列番号1を含むか、配列番号1からなるか又は実質的に配列番号1からなるNY-ESO-1タンパク質に対する抗原特異性を有する。本発明の好ましい実施態様において、TCRは、SLLMWITQC（配列番号2）を含むか、該配列からなるか又は実質的に該配列からなるNY-ESO-1 157-165ペプチドに対する抗原特異性を有する。 30

【0011】

本明書で使用する場合、語句「抗原特異性を有する」とは、TCRがNY-ESO-1と特異的に結合し、NY-ESO-1を免疫学的に認識でき、その結果、TCRとNY-ESO-1との結合により免疫反応が引き起こされることを意味する。

【0012】

本発明の一実施態様において、本発明のTCRは、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスI依存的にNY-ESO-1を認識することができる。本明細書で使用する場合、「MHCクラスI依存的」とは、TCRが、MHCクラスI分子との関連の中で、NY-ESO-1との結合に際し免疫反応を引き起こすことを意味する。MHCクラスI分子は、当分野で公知の任意のMHCクラスI分子、例えばHLA-A分子などであり得る。本発明の一実施態様において、MHCクラスI分子は、HLA-A2分子である。 40

【0013】

本発明の一実施態様において、本発明のTCRはマウス可変領域を含む。本発明のTCRは、任意の適した種、例えばヒト又はマウスなどに由来する定常領域をさらに含んでよい。好ましくは、本発明のTCRは、マウス定常領域をさらに含む。特に好ましい実施態様において、本発明のTCRは、マウス可変領域とマウス定常領域をともに含むマウスTCRである。

【0014】

本明細書で使用する場合、用語「マウス（murine）」とは、本明細書に記載のTCR又は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、鎖及び

10

20

30

40

50

/又は鎖など)に関する場合、マウスに由来するTCR(又はその構成要素)、すなわち、マウスT細胞が起源であったか、又はかつてマウスT細胞により発現されたTCR(又はその構成要素)を意味する。望ましくは、TCR(又はその構成要素)は、ヒト宿主細胞の表面に発現する。

【0015】

本発明のTCRは、養子細胞移入のために使用される場合を含む、多くの利点を提供する。例えば、特定の理論又はメカニズムに拘束されるものではないが、NY-ESO-1は、複数(multiple)の癌種の細胞で発現することから、本発明のTCRは、複数の種類の癌細胞を破壊し、それゆえ複数の種類の癌を治療又は予防する能力を有利に提供すると考えられる。さらに、特定の理論又はメカニズムに拘束されるものではないが、NY-ESO-1は癌精巣抗原であり、腫瘍細胞、並びにMHCを発現しない精巣及び胎盤生殖細胞にのみ発現することから、本発明のTCRは、正常な非癌性細胞の破壊を最小化又は排除し、それにより、毒性を低下させながら、例えば、最小化又は排除しながら、癌細胞の破壊を有利に標的化すると考えられる。また、マウスTCRは、ヒトTCRと比較して、ヒト宿主細胞表面での発現の増加(例えば、より多数のTCR)、及び/又は機能性の増加(例えばサイトカイン放出や細胞毒性などにより測定されるように)を提供し得ると考えられる。メカニズムの特定の理論に拘束されるものではないが、発現及び/又は機能性の改善は、宿主細胞において、内因性及び外因性(形質導入された)TCR鎖の混合が低下することに起因すると考えられる。従って、マウスTCRは、外因性ヒトTCRよりも効率的に、ヒト宿主細胞表面上にて内因性TCRを置き換えることができると考えられる。また、マウスTCRは、外因性ヒトTCRと比較して、TCR鎖ペアリングの改善、及び/又はヒト宿主細胞により発現されるヒト宿主細胞のCD3複合体との相互作用の改善を提供すると考えられる。10
20

【0016】

本発明の実施態様は、2つのポリペプチド(すなわち、ポリペプチド鎖)、例えば、TCRの鎖、TCRの鎖、TCRの鎖、TCRの鎖、又はその組み合わせを含むTCRを提供する。本発明のTCRのポリペプチドは、TCRがNY-ESO-1に対する抗原特異性を有し、且つマウス可変領域を含むならば、任意のアミノ酸配列を含み得る。

【0017】

本発明の好ましい実施態様において、TCRは、2つのポリペプチド鎖であって、そのそれがTCRの相補性決定領域(CDR)1、CDR2及びCDR3を含む可変領域を含む、鎖を含む。好ましくは、第一のポリペプチド鎖は、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR1(鎖のCDR1)、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR2(鎖のCDR2)及び配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR3(鎖のCDR3)を含み、且つ第二のポリペプチド鎖は、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR1(鎖のCDR1)、配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR2(鎖のCDR2)及び配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR3(鎖のCDR3)を含む。この点について、本発明のTCRは、配列番号3~5、6~8、及び3~8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、TCRは、配列番号3~8のアミノ酸配列を含む。30

【0018】

代替的又は追加的に、TCRは、上記CDRを含むTCR可変領域のアミノ酸配列を含み得る。この点について、TCRは、配列番号9(鎖の可変領域)若しくは10(鎖の可変領域)、又は配列番号9及び10の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、本発明のTCRは、配列番号9及び10のアミノ酸配列を含む。40

【0019】

代替的又は追加的に、TCRは、TCRの鎖及びTCRの鎖を含み得る。本発明のTCRの鎖及び鎖はそれぞれ、任意のアミノ酸配列を独立して含み得る。好ましくは、鎖は、上記鎖の可変領域を含む。この点について、本発明のTCRは、配列番号11のアミノ酸配列を含み得る。このタイプの本発明のTCRは、TCRの任意の鎖とペアとなり得る。好ましくは、本発明のTCRの鎖は、上記鎖の可変領域を含む。この点について、本発明のTCRは、配列番号12のアミノ酸配列を含み得る、従って、本発明のTCRは、配列番号11若しくは12、又は配列番号11及び12の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、本発明のTCRは50

、配列番号11及び12のアミノ酸配列を含む。

【0020】

本発明はまた、本明細書に記載のTCRのいずれかの機能的部分を含む、単離又は精製されたポリペプチドを提供する。本明細書で使用する場合、用語「ポリペプチド」は、オリゴペプチドを含み、1以上のペプチド結合により結合されたアミノ酸の単一鎖をいう。

【0021】

本発明のポリペプチドに関して、機能的部分は、該機能的部分がNY-ESO-1と特異的に結合するならば、TCR（機能的部分はその一部である）の連続アミノ酸を含む任意の部分であり得る。用語「機能的部分」とは、TCRに関して用いられる場合、本発明のTCRの任意の部分又は断片（fragment）であって、その部分又は断片がTCR（その部分又は断片はその一部である）（親TCR）の生物学的活性を保持するものをいう。機能的部分は、例えば、親TCRと類似の程度、同程度又はより高い程度に、NY-ESO-1と特異的に結合する能力、又は癌を検出、治療若しくは予防する能力を保持するTCRの部分を包含する。親TCRに関連して、機能的部分は、例えば、親TCRの約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%又はそれ以上を含み得る。10

【0022】

機能的部分は、該部分のアミノ末端若しくはカルボキシ末端又は両端に、更なるアミノ酸であって、親TCRのアミノ酸配列には見られないものを含み得る。望ましくは、更なるアミノ酸は、機能的部分の生物学的機能（例えば、NY-ESO-1と特異的に結合する、癌を検出、癌を治療又は予防する能力を有するなど）を妨害しない。さらに望ましくは、更なるアミノ酸は、親TCRの生物学的活性と比較して、その生物学的活性を増強する。20

【0023】

ポリペプチドは、本発明のTCRの鎖及び鎖のいずれか又は両方の機能的部分、例えば、本発明のTCRの鎖及び/又は鎖の可変領域のCDR1、CDR2及びCDR3の1つ以上を含む機能的部分などを含み得る。この点について、ポリペプチドは、配列番号3（鎖のCDR1）、4（鎖のCDR2）、5（鎖のCDR3）、6（鎖のCDR1）、7（鎖のCDR2）、8（鎖のCDR3）、又はその組み合わせのアミノ酸配列を含む機能的部分を含み得る。好ましくは、本発明のポリペプチドは、配列番号3～5、6～8、又は配列番号3～8の全てを含む機能的部分を含む。より好ましくは、ポリペプチドは、配列番号3～8のアミノ酸配列を含む機能的部分を含む。30

【0024】

代替的又は追加的に、本発明のポリペプチドは、例えば、上記CDR領域の組み合わせを含む本発明のTCRの可変領域を含み得る。この点について、TCRは、配列番号9（鎖の可変領域）若しくは10（鎖の可変領域）、又は配列番号9及び10の両方のアミノ酸配列を含み得る。好ましくは、ポリペプチドは、配列番号9及び10のアミノ酸配列を含む。

【0025】

代替的又は追加的に、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載のTCRの1つの鎖の全長を含み得る。この点について、本発明のポリペプチドは、配列番号11又は12のアミノ酸配列を含み得る。或いは、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載のTCRの両方の鎖を含み得る。例えば、本発明のポリペプチドは、配列番号11及び12の両方のアミノ酸配列を含み得る。40

【0026】

本発明はさらに、本明細書に記載のポリペプチドの少なくとも1つを含む、単離又は精製されたタンパク質を提供する。「タンパク質」とは、1つ以上のポリペプチド鎖を含む分子を意味する。

【0027】

本発明のタンパク質は、配列番号9のアミノ酸配列を含む第一のポリペプチド鎖、及び配列番号10のアミノ酸配列を含む第二のポリペプチド鎖を含み得る。本発明のタンパク質は、例えば、配列番号11のアミノ酸配列を含む第一のポリペプチド鎖、及び配列番号12のアミノ酸配列を含む第二のポリペプチド鎖を含み得る。この場合、本発明のタンパク質は50

TCRであり得る。或いは、例えば、タンパク質が配列番号11及び配列番号12を含む単一のポリペプチド鎖を含むか、又はタンパク質の第一及び／若しくは第二のポリペプチド鎖が、他のアミノ酸配列（例えば、免疫グロブリンをコードするアミノ酸配列又はその部分）をさらに含む場合には、本発明のタンパク質は融合タンパク質であり得る。この点について、本発明はまた、本明細書に記載の本発明のポリペプチドの少なくとも1つを、少なくとも1つの他のポリペプチドとともに含む融合タンパク質を提供する。他のポリペプチドは、融合タンパク質の別個（separate）のポリペプチドとして存在し得、或いは本明細書に記載の本発明のポリペプチドの1つとインフレーム（タンデムに）で発現するポリペプチドとして存在し得る。他のポリペプチドは、限定されないが免疫グロブリン、CD3、CD4、CD8、MHC分子、CD1分子（例えば、CD1a、CD1b、CD1c、CD1dなど）を含む、任意のペプチド性若しくはタンパク質性分子、又はその部分をコードし得る。

【0028】

融合タンパク質は、本発明のポリペプチドの1以上のコピー、及び／又は他のポリペプチドの1以上のコピーを含み得る。例えば、融合タンパク質は、本発明のポリペプチドの及び／又は他のポリペプチドの1、2、3、4、5又はそれ以上のコピーを含み得る。融合タンパク質を作製する適した方法は当分野で公知であり、例えば、組換え方法が含まれる。例えば、Choi et al., Mol. Biotechnol. 31: 193-202 (2005) を参照。

【0029】

本発明のいくつかの実施態様において、本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（機能的部分及び機能的変異体を含む）は、鎖及び鎖を連結するリンカーペプチドを含む単一のタンパク質として発現してよい。鎖及び鎖を連結するのに適した任意のリンカーペプチドを、本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（機能的部分及び機能的変異体を含む）に使用してよい。本発明の一実施態様において、リンカーペプチドはピコルナウイルス2Aペプチドである。この点について、本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（機能的部分及び機能的変異体を含む）は、配列番号13を含むアミノ酸配列を含むリンカーペプチドをさらに含んでよい。リンカーペプチドは、宿主細胞における、組換えTCR、ポリペプチド及び／又はタンパク質の発現を有利に促進してよい。リンカーペプチドを含む構築物の宿主細胞による発現に際し、リンカーペプチドを切断し、分離した及び鎖をもたらしてよい。

【0030】

本発明のタンパク質は、本明細書に記載の本発明のポリペプチドの少なくとも1つを含む組換え抗体であり得る。本明細書で使用する場合、「組換え抗体」とは、本発明のポリペプチドの少なくとも1つ、及び抗体のポリペプチド鎖又はその部分を含む組換え（例えば、遺伝子操作された）タンパク質をいう。抗体のポリペプチド又はその部分は、重鎖、軽鎖、重鎖若しくは軽鎖の可変又は定常領域、一本鎖可変断片（scFv）、又は抗体のFc、Fab若しくはF(ab)₂、断片などであり得る。抗体のポリペプチド鎖又はその部分は、組換え抗体の別個のポリペプチドとして存在し得る。或いは、抗体のポリペプチド鎖又はその部分は、本発明のポリペプチドとインフレーム（タンデムに）で発現するポリペプチドとして存在し得る。抗体のポリペプチド又はその部分は、任意の抗体又は任意の抗体断片（本明細書に記載の抗体及び抗体断片のいずれかを含む）のポリペプチドであり得る。

【0031】

本発明の範囲には、本明細書に記載の本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質の機能的変異体が含まれる。本明細書で使用する場合、用語「機能的変異体」とは、親TCR、ポリペプチド又はタンパク質と実質的又は顕著な配列同一性又は類似性を有するTCR、ポリペプチド又はタンパク質であって、該機能的変異体がTCR、ポリペプチド又はタンパク質（該機能的変異体はその変異体である）の生物学的活性を保持するものをいう。機能的変異体は、例えば、親TCR、ポリペプチド又はタンパク質と類似の程度に、同程度に、又はより高い程度に、NY-ESO-1と特異的に結合する能力を保持する、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド又はタンパク質（親TCR、ポリペプチド又はタンパク質）の変異体を包含する。親TCR、ポリペプチド又はタンパク質に関連して、機能的変異体は、親TCR、ポリペ

10

20

30

40

50

プチド又はタンパク質に対して、アミノ酸配列において、例えば、少なくとも約30%、50%、75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一であり得る。

【0032】

機能的変異体は、例えば、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を伴う親TCR、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列を含み得る。保存的アミノ酸置換は、当分野で公知であり、特定の物理的及び/又は化学的特性を有する1つのアミノ酸が、同じ化学的又は物理的特性を有する別のアミノ酸と交換されるアミノ酸置換が含まれる。例えば、保存的アミノ酸置換は、酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸での置換（例えば、Asp又はGlu）、非極性側鎖を有するアミノ酸の、非極性側鎖を有する別のアミノ酸での置換（例えば、Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Valなど）、塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸での置換（Lys、Argなど）、極性側鎖を有するアミノ酸の、極性側鎖を有する別のアミノ酸での置換（Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyrなど）などであり得る。10

【0033】

代替的又は追加的に、機能的変異体は、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を伴う親TCR、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列を含み得る。この場合、非保存的アミノ酸置換が、機能的変異体の生物学的活性を妨害又は阻害しないことが好ましい。好ましくは、非保存的アミノ酸置換は、親TCR、ポリペプチド又はタンパク質と比較して機能的変異体の生物学的活性が増加するように、機能的変異体の生物学的活性を増強する。20

【0034】

TCR、ポリペプチド又はタンパク質は、機能的変異体の他の構成要素（例えば、他のアミノ酸）が機能的変異体の生物学的活性を物質的に変化しないように、本明細書に記載の特定のアミノ酸配列（単数又は複数）から実質的になり得る。この点について、本発明のTCR、ポリペプチド又はタンパク質は、例えば、配列番号11若しくは12、又は配列番号11及び12の両方のアミノ酸配列から実質的になり得る。また、例えば、本発明のTCR、ポリペプチド又はタンパク質は、配列番号9若しくは10、又は配列番号9及び10の両方のアミノ酸配列から実質的になり得る。さらに、本発明のTCR、ポリペプチド又はタンパク質は、配列番号3（鎖のCDR1）、4（鎖のCDR2）、5（鎖のCDR3）、6（鎖のCDR1）、7（鎖のCDR2）、8（鎖のCDR3）、又はその任意の組み合わせ、例えば、配列番号3～5、6～8又は3～8などのアミノ酸配列から実質的になり得る。30

【0035】

本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（機能的部分及び機能的変異体を含む）は、TCR、ポリペプチド又はタンパク質（又はその機能的部分若しくは機能的変異体）が生物学的活性（例えば、NY-ESO-1に特異的に結合する、哺乳動物において癌を検出する、又は哺乳動物において癌を治療若しくは予防するなどの能力）を保持するならば、任意の長さのものであり得、すなわち、任意の数のアミノ酸を含み得る。例えば、ポリペプチドは、50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000又はそれ以上のアミノ酸長など、50～5000のアミノ酸長であり得る。この点について、本発明のポリペプチドはまた、オリゴペプチドも含む。40

【0036】

本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（機能的部分及び機能的変異体を含む）は、1つ以上の天然に存在するアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含み得る。かかる合成アミノ酸は、当分野で公知であり、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノn-デカン酸、ホモセリン、S-アセチルアミノメチル-システイン、トランス-3-及びトランス-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 α -フェニルセリン、 β -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 α -ナフチルアラニン、シクロヘキシリアルアラニン、シクロヘキシリルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、N'-ベンジル-N'-メチル-リジン、N',N'-ジベンジル-リジン、6-ヒドロキシリジン、オ
50

ルニチン、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 β -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 γ -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 δ -(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 ϵ -ジアミノ酪酸、 ζ 、 η -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン及び τ -tert-ブチルグリシンが挙げられる。

【0037】

本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（機能的部分及び機能的変異体を含む）は、グリコシリ化、アミド化、カルボキシリ化、リン酸化、エステル化、N-アシル化、環化（例えばジスルフィド架橋を介して）、又は酸付加塩に変換され、且つ／或いは任意選択で二量体化若しくは重合化、又はコンジュゲート化され得る。

【0038】

本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（機能的部分及び機能的変異体を含む）が塩の形態である場合には、好ましくは、ポリペプチドは医薬上許容される塩の形態である。適した医薬上許容される酸付加塩には、鉱酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、リン酸、メタリン酸、硝酸及び硫酸）由来の塩、及び有機酸（例えば、酒石酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、フマル酸、安息香酸、グリコール酸、グルコン酸、コハク酸、及び例えばp-トルエンスルホン酸などのアリールスルホン酸）由来の塩が含まれる。

【0039】

本発明のTCR、ポリペプチド及び／又はタンパク質（その機能的部分及び機能的変異体を含む）は、当分野で公知の方法により得ることができる。ポリペプチド及びタンパク質をde novo合成する適した方法は、例えば以下の参考文献に記載されている：Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000；及び米国特許第5,449,752号。また、ポリペプチド及びタンパク質は、標準的な組換え方法を用いて、本明細書に記載の核酸を使用して組換え產生され得る。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001；及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照。さらに、本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（その機能的部分及び機能的変異体を含む）のいくつかは、植物、細菌、昆虫、哺乳動物（例えば、マウス、ヒトなど）などの供給源から単離及び／又は精製され得る。単離及び精製の方法は当分野で周知である。或いは、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド及び／又はタンパク質（その機能的部分及び機能的変異体を含む）は、Synpep (Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) 及びMultiple Peptide Systems (San Diego, CA)などの企業によって商業的に合成され得る。これに関して、本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質は、合成、組換え、単離及び／又は精製され得る。

【0040】

本発明の範囲内には、本発明のTCR、ポリペプチド若しくはタンパク質（その機能的部分又は変異体のいずれかを含む）、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、宿主細胞集団、又は抗体若しくはその抗原結合部分のいずれかを含むコンジュゲート（例えば、バイオコンジュゲート）が含まれる。コンジュゲート、及び通常のコンジュゲートの合成方法は、当分野で公知である（例えば、Hudecz, F., *Methods Mol. Biol.* 298: 209-223 (2005) 及びKirin et al., *Inorg Chem.* 44(15): 5405-5415 (2005) を参照）。

【0041】

本発明はさらに、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド又はタンパク質（その機能的部分及び機能的変異体を含む）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。

【0042】

本明細書で使用する場合、「核酸」とは、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「核酸分子」を含み、一般にDNA又はRNAの重合体を意味し、これは一本鎖の又は

二本鎖の、合成された又は天然の供給源から得た（例えば、単離及び／又は精製された）ものであり得、天然、非天然又は変更されたヌクレオチドを含み得、修飾されていないオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間に見いだされるホスホジエステル結合の代わりに、天然、非天然又は変更されたヌクレオチド間結合（例えば、ホスホロアミデート（phosphoramidate）結合又はホスホロチオエート結合など）を含み得る。一般に、核酸は、挿入、欠失、逆位及び／又は置換を何れも含まないことが好ましい。しかし、本明細書で論じるように、ある場合には、核酸が1つ以上の挿入、欠失、逆位及び／又は置換を含むことが適切であるかもしれない。

【0043】

好ましくは、本発明の核酸は組換えである。本明細書で使用する場合、用語「組換え」とは、(i) 天然若しくは合成の核酸セグメントを、生きた細胞内で複製できる核酸分子と連結することにより、生きた細胞の外側で構築された分子、又は(ii) 上記(i)に記載した分子の複製から生じる分子をいう。本明細書の目的のために、複製は、*in vitro*複製又は*in vivo*複製であり得る。10

【0044】

核酸は、当分野で公知の手順を使用して、化学合成及び／又は酵素ライゲーション反応に基づいて構築され得る。例えば、Sambrook et al. (上記) 及びAusubel et al. (上記) を参照。例えば、核酸は、天然に存在するヌクレオチド、又は分子の生物学的安定性を増加させるように若しくはハイブリダイゼーションの際に形成される二重鎖の物理的安定性を増加させるように設計された多様な修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチド）を使用して、化学的に合成され得る。核酸を生成するために使用され得る修飾ヌクレオチドの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、*-D*-ガラクトシリルキューオシン(*beta-D-galactosylqueosine*)、イノシン、N⁶-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N⁶-置換アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、*-D*-マンノシリルキューオシン(*beta-D-mannosylqueosine*)、5'-メトキカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N⁶-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル(pseudouracil)、キューオシン(queosine)、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル及び2,6-ジアミノプリン。或いは、本発明の核酸の1つ以上は、Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) 及びSynthegen (Houston, TX)などの企業から購入できる。2030

【0045】

核酸は、本発明のTCR、ポリペプチド若しくはタンパク質、又はその機能的部分若しくは機能的変異体のいずれかをコードする、任意のヌクレオチド配列を含み得る。例えば、核酸は、配列番号19(野生型鎖)若しくは配列番号20(野生型鎖)、又は配列番号19及び20の両方を含むか、該配列番号からなるか、又は実質的に該配列番号からなるヌクレオチド配列を含み得る。40

【0046】

いくつかの実施態様において、ヌクレオチド配列はコドン最適化されてよい。特定の理論又はメカニズムに拘束されるものではないが、ヌクレオチド配列のコドン最適化は、mRNA転写産物の翻訳効率を増加させると考えられる。ヌクレオチド配列のコドン最適化は、天然のコドンを、同じアミノ酸をコードするが、細胞内でより容易に利用可能なtRNAにより翻訳され得る別のコドンで置換することを伴い、そのために転写効率が増加し得る。又50

クレオチド配列の最適化はまた、翻訳を妨げ得る二次mRNA構造を低下させ、そのために翻訳効率が増加し得る。本発明の一実施態様において、コドン最適化されたヌクレオチド配列は、配列番号15（コドン最適化された鎖）、配列番号16（コドン最適化された鎖）、配列番号21（コドン最適化された、鎖可変領域）、配列番号22（コドン最適化された、鎖可変領域）、配列番号15及び16の両方、配列番号21及び22の両方、配列番号15及び20の両方、又は配列番号16及び19の両方を含むか、該配列番号からなるか、又は実質的に該配列番号からなってよい。

【0047】

本発明の一実施態様において、本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質（その機能的部分及び機能的変異体を含む）をコードするヌクレオチド配列は、本発明の別の側面に關して本明細書に記載のリンカーペプチドのいずれかをコードするヌクレオチド配列をさらに含んでよい。本発明の一実施態様において、リンカーペプチドは、配列番号14を含むヌクレオチド配列によりコードされてよい。10

【0048】

本発明はまた、本明細書に記載の核酸のいずれかと少なくとも約70%又はそれ以上、例えば、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸も提供する。

【0049】

或いは、ヌクレオチド配列は、配列番号15、配列番号16、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号15及び16の両方、配列番号19及び20の両方、配列番号21及び22の両方、配列番号15及び20の両方、又は配列番号16及び19の両方に縮重するヌクレオチド配列を含み得る。好ましくは、核酸は、配列番号15、16、19、20、21若しくは22、配列番号15及び16、配列番号19及び20、配列番号21及び22、配列番号15及び20、又は配列番号16及び19を含むヌクレオチド配列、又はそれに縮重するヌクレオチド配列を含む。20

【0050】

本発明はまた、本明細書に記載のいずれかの核酸のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列、又は本明細書に記載のいずれかの核酸のヌクレオチド配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、単離又は精製された核酸も提供する。

【0051】

ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列は、好ましくは、高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする。「高ストリンジエンシー条件」とは、ヌクレオチド配列が、非特異的ハイブリダイゼーションよりも検出可能に強い量でターゲット配列（本明細書に記載のいずれかの核酸のヌクレオチド配列）に特異的にハイブリダイズすることを意味する。高ストリンジエンシー条件には、正確に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、又は数個の散らばったミスマッチのみを含むポリヌクレオチドを、ヌクレオチド配列にマッチした数個の小領域（例えば、3~10塩基）を偶然有するランダム配列から識別し得る条件が含まれる。かかる相補的な小領域は、14~17又はそれ以上の塩基の全長相補体よりも容易に融解され、高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーションにより、それらを容易に識別できる。比較的高ストリンジエンシーの条件には、例えば、低塩及び/又は高温条件（例えば、約0.02~0.1 MのNaCl又は等価物、約50~70 の温度により提供される）が含まれ得る。かかる高ストリンジエンシー条件は、存在したとしても、ヌクレオチド配列とテンプレート鎖又はターゲット鎖との間のミスマッチをほとんど許容せず、本発明のTCRのいずれかの発現を検出するのに特に適している。条件は、増加量のホルムアミドの添加によって、よりストリンジエントになり得ることが一般に理解される。40

【0052】

本発明の核酸は、組換え発現ベクター中に組み込まれ得る。この点について、本発明は、本発明の核酸のいずれかを含む組換え発現ベクターを提供する。本明細書の目的のために、用語「組換え発現ベクター」とは、宿主細胞によるmRNA、タンパク質、ポリペプチド

又はペプチドの発現を可能にする遺伝子改変オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド構築物を意味し、この場合、構築物は、mRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、ベクターは、細胞内でmRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを発現させるのに十分な条件下で細胞と接触させられる。本発明のベクターは、全体としては天然に存在するものではない。しかし、ベクターの一部は天然に存在するものであり得る。本発明の組換え発現ベクターは、DNA及びRNA（一本鎖又は二本鎖であり得、合成されるか、又は一部を天然供給源から得ることができ、天然、非天然又は変更されたヌクレオチドを含み得る）を含む（これらに限定されない）、任意のタイプのヌクレオチドを含み得る。組換え発現ベクターは、天然に存在するヌクレオチド間結合若しくは天然に存在しないヌクレオチド間結合、又は両方のタイプの結合を含み得る。好ましくは、天然に存在しない又は変更されたヌクレオチド又はヌクレオチド間結合は、ベクターの転写も複製も妨害しない。10

【0053】

本発明の組換え発現ベクターは、任意の適した組換え発現ベクターであり得、任意の適した宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために使用され得る。適したベクターとしては、増殖（propagation）及び増大（expansion）のため、若しくは発現のため、又はそれら両方のために設計されたベクター（例えば、プラスミド及びウイルス）が挙げられる。ベクターは、以下からなる群から選択され得る：pUCシリーズ（Fermentas Life Sciences）、pBluescriptシリーズ（Stratagene, LaJolla, CA）、pETシリーズ（Novagen, Madison, WI）、pGEXシリーズ（Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）及びpEXシリーズ（Clontech, Palo Alto, CA）。バクテリオファージベクター（例えば、GT10、GT11、ZapII（Stratagene）、EMBL4及びNM1149）もまた使用され得る。植物発現ベクターの例としては、pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121及びpBIN19（Clontech）が挙げられる。動物発現ベクターの例としては、pEUK-CI、pMAM及びpMAMneo（Clontech）が挙げられる。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又はレンチウイルスベクター）である。20

【0054】

本発明の組換え発現ベクターは、例えば、Sambrook et al.（上記）及びAusubel et al.（上記）に記載された標準的な組換えDNA技術を使用して調製できる。環状又は線状の発現ベクターの構築物は、原核生物又は真核生物の宿主細胞において機能的な複製系を含むように調製され得る。複製系は、例えば、ColE1、 2μ プラスミド、SV40、ウシパピローマウイルスなどに由来し得る。30

【0055】

望ましくは、組換え発現ベクターは、必要に応じて、そのベクターがDNAベースであるかRNAベースであるかを考慮して、ベクターが導入される宿主細胞タイプ（例えば、細菌、真菌、植物又は動物）に特異的な調節配列（例えば、転写及び翻訳の開始及び終止コドンなど）を含む。

【0056】

組換え発現ベクターは、形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つ以上のマーカー遺伝子を含み得る。マーカー遺伝子としては、殺生物剤耐性（例えば、抗生物質、重金属などに対する耐性）、栄養要求性宿主における原栄養を提供する補完などが挙げられる。本発明の発現ベクターに適したマーカー遺伝子としては、例えば、ネオマイシン/G418耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。40

【0057】

組換え発現ベクターは、TCR、ポリペプチド若しくはタンパク質（その機能的部分及び機能的変異体を含む）をコードするヌクレオチド配列、又はTCR、ポリペプチド若しくはタンパク質をコードするヌクレオチド配列と相補的であるか若しくはそれに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た、天然又は非天然のプロモーターを含み得る。プロモーターの選択（例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的及び発生特異的）50

は、当業者の技術範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモーターとの組み合わせ（combining）もまた、当業者の技術範囲内である。プロモーターは、非ウイルスプロモーター又はウイルスプロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター、及びマウス幹細胞ウイルスの長い末端反復配列中に見出されるプロモーター）であり得る。

【0058】

本発明の組換え発現ベクターは、一過性の発現のため、安定な発現のため、又はその両方のために設計され得る。また、組換え発現ベクターは、構成的発現又は誘導性発現のために製造され得る。さらに、組換え発現ベクターは、自殺遺伝子を含むように製造され得る。

10

【0059】

本明細書で使用する場合、用語「自殺遺伝子」とは、その自殺遺伝子を発現する細胞を死に至らしめる遺伝子をいう。自殺遺伝子は、その遺伝子が発現される細胞に対し薬剤（例えば、薬物）に対する感受性を付与し、細胞がその薬剤と接触したとき又はその薬剤に曝露されたときに細胞を死に至らしめる遺伝子であり得る。自殺遺伝子は当分野で公知であり（例えば、*Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews*, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004を参照）、例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、シトシンデアミナーゼ（daminase）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ及びニトロレダクターゼが挙げられる。

20

【0060】

本発明の組換え発現ベクターは、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列の5'に位置する、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を含んでよい。この点について、本発明の一実施態様は、CDR1、CDR2、CDR3、CDR1、CDR2及びCDR3をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを提供し、CDR1、CDR2及びCDR3をコードするヌクレオチド配列は、CDR1、CDR2及びCDR3をコードするヌクレオチド配列の5'である。同様に、CDR1、CDR2及びCDR3をコードするヌクレオチド配列は、CDR1、CDR2及びCDR3をコードするヌクレオチド配列の3'であってよい。本発明の別の実施態様において、組換え発現ベクターは、鎖可変領域及び鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含み、鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列の5'である。同様に、鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列の3'であってよい。本発明のさらに別の実施態様において、組換え発現ベクターは、鎖及び鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、鎖をコードするヌクレオチド配列は、鎖をコードするヌクレオチド配列の5'である。同様に、鎖をコードするヌクレオチド配列は、鎖をコードするヌクレオチド配列の3'であってよい。鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列の5'に位置する、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターは、配列番号17を含んでよい。

30

【0061】

本発明の組換え発現ベクターは、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列の3'に位置する、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を含んでよい。特定の理論又はメカニズムに拘束されるものではないが、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列が、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列の3'に位置する組換え発現ベクターによりコードされるTCR、ポリペプチド又はタンパク質（又はその機能的部分若しくは変異体）は、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列が、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列の5'に位置する組換え発現ベクターによりコードされるTCR、ポリペプチド又はタンパク質（又はその機能的部分若しくは機能的変異体）と比較して、機能性及び抗原認識の改善がもたらされると考えられる。この点について、本発明の一実施態様は、CDR1、CDR2、CDR3、CDR1、CDR2及びCDR3をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターを提供し、CDR1、CDR2及び

40

50

CDR3 をコードするヌクレオチド配列は、CDR1 、 CDR2 及びCDR3 をコードするヌクレオチド配列の3'である。同様に、CDR1 、 CDR2 及びCDR3 をコードするヌクレオチド配列は、CDR1 、 CDR2 及びCDR3 をコードするヌクレオチド配列の5'であってよい。本発明の別の実施態様において、組換え発現ベクターは、鎖可変領域及び鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含み、鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、

鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列の3'である。同様に、鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列の5'であってよい。本発明のさらに別の実施態様において、組換え発現ベクターは、鎖及び鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、鎖をコードするヌクレオチド配列は、鎖をコードするヌクレオチド配列の3'である。同様に、鎖をコードするヌクレオチド配列は、鎖をコードするヌクレオチド配列の5'であってよい。鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列の3'に位置する、鎖の全部又は一部をコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターは、配列番号18を含んでよい。

【 0 0 6 2 】

本発明の一実施態様において、組換え発現ベクターはDNAタグを含んでよい。DNAタグは、組換え発現ベクターを、同じタンパク質配列をコードする別のベクターと区別してよい。DNAタグは、本発明のTCR（その機能的部分及び機能的変異体を含む）、ポリペプチド又はタンパク質をコードするヌクレオチド配列内に含まれなくともよく、従って、その発現に影響を及ぼさなくてよい。DNAタグを含む組換え発現ベクターは、同じヌクレオチド配列を、複数の異なる細胞集団に入れ、その後、含まれるベクターに基づいて、それら集団を区別することを可能にする。

【 0 0 6 3 】

本発明はさらに、本明細書に記載の組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。本明細書で使用する場合、用語「宿主細胞」とは、本発明の組換え発現ベクターを含み得る任意のタイプの細胞をいう。宿主細胞は、真核生物細胞（例えば、植物、動物、真菌又は藻類）であり得、或いは原核生物細胞（例えば、細菌又は原生生物）であり得る。宿主細胞は、培養細胞又は初代細胞（すなわち、ヒトなどの生物から直接単離されたもの）であり得る。宿主細胞は、接着細胞又は浮遊細胞（すなわち、懸濁物中で増殖する細胞）であり得る。適した宿主細胞は当分野で公知であり、例えば、DH5 E. coli細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、サルVERO細胞、COS細胞、HEK293細胞などが挙げられる。組換え発現ベクターを増幅又は複製する目的のために、宿主細胞は、好ましくは、原核生物細胞（例えば、DH5 細胞など）である。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動物細胞である。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タイプのものであり得、任意の組織タイプに由来し得、任意の発生段階のものであり得るが、宿主細胞は、末梢血リンパ球（PBL）又は末梢血単核細胞（PMBC）であってよい。好ましくは、宿主細胞はT細胞であってよい。

【 0 0 6 4 】

本明細書の目的のために、T細胞は、例えば、培養T細胞（例えば初代T細胞）、又は培養T細胞株（例えば、Jurkat、SupT1など）由来のT細胞、又は哺乳動物から得られたT細胞など、任意のT細胞であり得る。哺乳動物から得られる場合、T細胞は、多数の供給源（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、これらに限定されない）から得ることができる。T細胞はまた、濃縮(enriched)又は精製され得る。T細胞はヒトT細胞であってよい。T細胞は、ヒトから単離されたT細胞であってよい。T細胞は、任意のタイプのT細胞であり得、任意の発生段階のものであり得る（CD4⁺ / CD8⁺ ダブルポジティブT細胞、CD4⁺ ヘルパーT細胞（例えば、Th₁及びTh₂細胞）、CD8⁺ T細胞、細胞傷害性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球細胞、メモリーT細胞、ナイーブT細胞などが含まれるが、これらに限定されない）。好ましくは、T細胞は、CD8⁺ T細胞又はCD4⁺ T細胞であってよい。

【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

本発明はまた、本明細書に記載の少なくとも1つの宿主細胞を含む細胞集団も提供する。細胞集団は、少なくとも1つの他の細胞（例えば、記載の組換え発現ベクターをいずれも含まない宿主細胞（例えばT細胞）、又はT細胞以外の細胞（例えば、B細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋細胞、脳細胞など））に加えて、記載の組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を含む、不均質な集団であり得る。或いは、細胞集団は、実質的に均質な集団であり得、この場合、該集団は、組換え発現ベクターを含む宿主細胞を主に含む（例えば、実質的にそれらからなる）。集団はまた、細胞のクローニング集団もあり得、この場合、集団の全ての細胞は、組換え発現ベクターを含む単一の宿主細胞のクローニングであり、その結果、集団の全ての細胞が組換え発現ベクターを含む。本発明の一実施態様において、細胞集団は、本明細書に記載されるような組換え発現ベクターを含む宿主細胞を含むクローニング集団である。

【0066】

本発明はさらに、本明細書に記載のTCRのいずれかの機能的部分と特異的に結合する、抗体又はその抗原結合部分を提供する。好ましくは、機能的部分、例えば、配列番号3（鎖のCDR1）、4（鎖のCDR2）、5（鎖のCDR3）、6（鎖のCDR1）、7（鎖のCDR2）、8（鎖のCDR3）、配列番号9、配列番号10、又はその組み合わせ（例えば、3～5、6～8、3～8又は9～10など）のアミノ酸配列を含む機能的部分は、NY-ESO-1と特異的に結合する。より好ましくは、機能的部分は、配列番号3～8のアミノ酸配列を含む。好ましい実施態様において、抗体又はその抗原結合部分は、6つのCDR（鎖のCDR1～3、及び鎖のCDR1～3）全てにより形成されるエピトープと結合する。抗体は、当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、任意のアイソタイプ（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgMなど）のものであり得る。抗体は、モノクローナル又はポリクローナルであり得る。抗体は、天然に存在する抗体、例えば、哺乳動物（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）から単離及び/又は精製された抗体であり得る。或いは、抗体は、遺伝子操作された抗体、例えば、ヒト化抗体又はキメラ抗体であり得る。抗体は、モノマー又はポリマー形態であり得る。また、抗体は、本発明のTCRの機能的部分に対し、任意のレベルの親和性又は結合活性を有し得る。望ましくは、抗体は、他のペプチド又はタンパク質と最小限の交差反応性であるように、本発明のTCRの機能的部分に対し特異的である。

【0067】

本発明のTCRの任意の機能的部分に結合する能力について抗体を試験する方法は、当分野で公知であり、任意の抗体-抗原結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ELISA、ウエスタンプロット、免疫沈降及び競合阻害アッセイ（例えば、Janeway et al.（下記）を参照）などが挙げられる。

【0068】

抗体の製造に適した方法は、当分野で公知である。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)、及びC.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY(2001))に記載されている。或いは、他の方法、例えば、EBV-ハイブリドーマ法 (Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984)、及びRoder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986))、及び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）などが当分野で公知である。さらに、非ヒト動物において抗体を產生する方法が、例えば、米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号及び同第5,714,352号に記載されている。

【0069】

さらにファージディスプレイが、本発明の抗体を產生するために使用され得る。この点について、抗体の抗原結合可変（V）ドメインをコードするファージライブラリーが、標準的な分子生物学及び組換えDNA技術を使用して作製され得る（例えば、Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor

10

20

30

40

50

Laboratory Press, New York (2001) を参照）。所望の特異性を有する可変領域をコードするファージが、所望の抗原への特異的結合について選択され、選択された可変ドメインを含む完全又は部分抗体が再構成される。再構成された抗体をコードする核酸配列は、適した細胞株（例えば、ハイブリドーマ産生に使用されるミエローマ細胞）中に導入され、その結果、モノクローナル抗体の特徴を有する抗体がこの細胞によって分泌される（例えば、Janeway et al. (上記)、Huse et al. (上記) 及び米国特許第6,265,150号を参照）。

【 0 0 7 0 】

抗体は、特定の重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックであるトランスジェニックマウスにより產生され得る。かかる方法は当分野で公知であり、例えば、米国特許第5,545,806号及び同第5,569,825号、並びにJaneway et al. (上記) に記載されている。10

【 0 0 7 1 】

ヒト化抗体を產生する方法は当分野で周知であり、例えば、Janeway et al. (上記)、米国特許第5,225,539号、同第5,585,089号及び同第5,693,761号、歐州特許第0239400B1号、並びに英國特許第2188638号に詳細に記載されている。ヒト化抗体はまた、米国特許第5,639,641号及びPedersen et al., J. Mol. Biol., 235, 959-973 (1994) に記載された抗体リサーフェシング (resurfacing) 技術を使用して生成され得る。

【 0 0 7 2 】

本発明はまた、本明細書に記載の抗体のいずれかの抗原結合部分を提供する。抗原結合部分は、少なくとも1つの抗原結合部位を有する任意の部分（例えば、Fab、F(ab')₂、dsFv、sFv、ダイアボディ (diabodies) 及びトリアボディ (triabodies) ）であり得る。20

【 0 0 7 3 】

一本鎖可変領域断片 (sFv) 抗体断片（これは、合成ペプチドを介して抗体軽鎖の可変 (V) ドメインに連結された抗体重鎖のVドメインを含む、切断型Fab断片からなる）は、慣用的な組換えDNA技術の技術を使用して生成され得る（例えば、Janeway et al. (上記) を参照）。同様に、ジスルフィド安定化可変領域断片 (dsFv) は、組換えDNA技術によつて調製され得る（例えば、Reiter et al., Protein Engineering, 7, 697-704 (1994) を参照）。しかし、本発明の抗体断片は、これらの例示的な抗体断片タイプに限定されない。30

【 0 0 7 4 】

また、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、フルオロフォア（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）及び元素粒子（例えば、金粒子）など）を含むように改変され得る。

【 0 0 7 5 】

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質（その機能的部分及び機能的変異体を含む）、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞（その集団を含む）、及び抗体（その抗原結合部分を含む）は、単離及び／又は精製され得る。本明細書で使用する場合、用語「単離された」とは、その天然の環境から取り出されていることを意味する。本明細書で使用する場合、用語「精製された」とは、純度が増加していることを意味し、ここで、「純度」とは相的な用語であつて、必ずしも絶対的純度と解釈されない。例えば、純度は、少なくとも約50%であり得、60%、70%若しくは80%より高くてあり得、又は約100%であり得る。

【 0 0 7 6 】

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質（その機能的部分及び変異体を含む）、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞（その集団を含む）、及び抗体（その抗原結合部分を含む）（これらは全て、本明細書中以下、集合的に「本発明のTCR材料」と称す）は、医薬組成物などの組成物へと製剤化され得る。この点について、本発明は、TCR、ポリペプチド、タンパク質、機能的部分、機能的変異体、核酸、発現ベクター、宿主細胞（その集団4050

を含む)、及び抗体(その抗原結合部分を含む)のいずれかと、医薬上許容される担体とを含む、医薬組成物を提供する。本発明のTCR材料のいずれかを含む本発明の医薬組成物は、1種より多い本発明のTCR材料(例えば、ポリペプチド及び核酸)又は2種以上の異なるTCRを含み得る。或いは、医薬組成物は、他の医薬上活性な薬剤又は薬物(例えば、化学療法剤、例えば、アスパラギナーゼ、ブルファン、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、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンプラスチン、ビンクリスチンなど)と組み合わせて、本発明のTCR材料を含み得る。

【0077】

好ましくは、担体は医薬上許容される担体である。医薬組成物に関して、担体は、従来使用される担体のいずれかであり得、化学-物理的考慮事項(例えば、溶解度、及び活性化合物との反応性の欠如)及び投与経路のみによって限定される。本明細書に記載の医薬上許容される担体(例えば、ビヒクル、アジュvant、賦形剤及び希釈剤)は、当業者に周知であり、公に容易に入手可能である。医薬上許容される担体は、活性薬剤に対し化学的に不活性な担体及び使用条件下で有害な副作用も毒性もない担体であることが好ましい。

【0078】

担体の選択は、本発明の特定のTCR材料によって、及び本発明のTCR材料を投与するために使用される特定の方法によって、一部決定されよう。従って、本発明の医薬組成物の適した製剤は多様である。非経口、皮下、静脈内、筋内、動脈内、髄腔内、及び腹腔内(interperitoneal)投与のための以下の製剤は、単なる例示であり、何ら限定ではない。本発明のTCR材料を投与するために1より多い経路が使用され得、ある場合には、特定の経路が、別の経路よりも迅速且つ有効な応答を提供し得る。

【0079】

非経口投与に適した製剤には、水性及び非水性の等張滅菌注射溶液(抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤を意図したレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る)、並びに水性及び非水性の滅菌懸濁物(懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤及び保存剤を含み得る)が挙げられる。本発明のTCR材料は、医薬上許容される界面活性剤(例えば、石鹼又は洗剤)、懸濁剤(例えば、ペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はカルボキシメチルセルロース)又は乳化剤及び他の医薬的アジュvantの添加あり又はなしの、医薬的担体(例えば、滅菌の液体又は液体混合物(水、生理食塩水、水性デキストロース及び関連の糖溶液、アルコール(例えば、エタノール又はヘキサデシルアルコール)、グリコール(例えば、プロピレングリコール又はポリエチレングリコール)、ジメチルスルホキシド、グリセロール、ケタール(例えば、2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール)、エーテル、ポリ(エチレングリコール)400、油、脂肪酸、脂肪酸エステル若しくはグリセリド、又はアセチル化脂肪酸グリセリドを含む)中の生理学的に許容される希釈剤中で投与され得る。

【0080】

非経口製剤で使用され得る油には、石油、動物油、植物油又は合成油が挙げられる。油の具体的な例としては、落花生油、大豆油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ油、ペトロラタム及び鉱油が挙げられる。非経口製剤での使用に適した脂肪酸には、オレイン酸、ステアリン酸及びイソステアリン酸が挙げられる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルが、適した脂肪酸エステルの例である。

【0081】

非経口製剤での使用に適した石鹼には、脂肪酸のアルカリ金属(fatty alkali metal)、アンモニウム及びトリエタノールアミン塩が挙げられ、適した洗剤には以下が挙げられる:(a)カチオン性洗剤(例えば、ジメチルジアルキルアンモニウムハライド及びアルキルピリジニウムハライド)、(b)アニオン性洗剤(例えば、アルキル、アリール及びオレフィンスルホン酸塩、アルキル、オレフィン、エーテル及びモノグリセリド硫酸塩及びスルホコハク酸塩)、(c)非イオン性洗剤(例えば、脂肪アミンオキシド、脂肪酸ア

10

20

30

40

50

ルカノールアミド及びポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマー)、(d)両性洗剤(例えば、アルキル-¹⁸-アミノプロピオン酸塩及び2-アルキル-イミダゾリン第4級アンモニウム塩)、並びに(e)それらの混合物。

【0082】

非経口製剤は典型的には、溶液中に約0.5重量%～約25重量%の本発明のTCR材料を含むであろう。保存剤及び緩衝液を使用してよい。注射部位での刺激を最小化又は排除するために、かかる組成物は、約12～約17の親水性-親油性バランス(HLB)を有する1つ以上の非イオン性界面活性剤を含んでよい。かかる製剤中の界面活性剤の量は、典型的には、約5重量%～約15重量%の範囲であろう。適した界面活性剤としては、ポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル(例えば、ソルビタンモノオレエート)、及びプロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合によって形成される、疎水性塩基とエチレンオキシドとの高分子量付加物が挙げられる。非経口製剤は、単一用量又は複数用量の密封容器(例えば、アンプル及びバイアル)中に提示され得、使用直前の滅菌液体賦形剤(例えば注射用水)の添加のみを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存され得る。即時注射溶液及び懸濁物は、以前に記載された種類の滅菌の粉末、顆粒及び錠剤から調製できる。

【0083】

注射可能な製剤は、本発明に従う。注射可能な組成物のための有効な医薬的担体の要件は、当業者に周知である(例えば、Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers eds., 238-250頁(1982)、及びASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., 622-630頁(1986)を参照)。好ましくは、細胞(例えば、樹状細胞)を投与する場合には、該細胞は注射を介して投与される。

【0084】

上記医薬組成物に加えて、本発明のTCR材料は、包接錯体(例えば、シクロデキストリン包接錯体)又はリポソームとして製剤化され得ることが当業者に理解されよう。

【0085】

本発明の目的のために、投与される本発明のTCR材料の量又は用量は、合理的な時間枠にわたって対象又は動物において、例えば治療応答又は予防応答をもたらすのに十分でなければならない。例えば、本発明のTCR材料の用量は、投与時点から約2時間又はそれ以上、例えば、12～24又はそれ以上の時間の期間において、NY-ESO-1と結合するため、又は癌を検出、治療若しくは予防するために、十分でなければならない。特定の実施態様において、この期間はさらに長くてもよい。用量は、本発明の特定のTCR材料の効力、及び動物(例えば、ヒト)の状態、並びに治療されるべき動物(例えば、ヒト)の体重によって決定されるだろう。

【0086】

投与される用量を決定するための多くのアッセイが当分野で公知である。本発明の目的のために、本発明のTCR、ポリペプチド又はタンパク質を発現するT細胞の所与の用量を哺乳動物に投与した際に、かかるT細胞によってターゲット細胞が溶解される又はIFN- γ が分泌される程度を、種々の用量のT細胞をそれぞれ与えた哺乳動物のセット間で比較することを含むアッセイが、哺乳動物に投与されるべき出発用量を決定するために使用され得る。特定の用量の投与の際にターゲット細胞が溶解される又はIFN- γ が分泌される程度は、当分野で公知の方法によってアッセイでき、これには、例えば、実施例3として本明細書に記載の方法が含まれる。

【0087】

本発明のTCR材料の用量はまた、本発明の特定のTCR材料の投与に伴い得る任意の有害な副作用の存在、性質及び程度によっても決定されよう。典型的には、処方医師は、様々な因子(例えば、年齢、体重、全身健康状態、食事、性別、投与されるべき本発明のTCR材料、投与経路、及び治療されるべき状態の重篤度)を考慮して、個々の患者それぞれを治療するための本発明のTCR材料の投与量を決定するだろう。本発明を限定する意図はない

10

20

30

40

50

が、その例として、本発明のTCR材料の用量は、約0.001～約1000 mg / 治療される対象の体重kg / 日、約0.01～約10 mg / kg体重 / 日、約0.01 mg～約1 mg / kg体重 / 日であり得る。

【 0 0 8 8 】

当業者は、本発明のTCR材料が、本発明のTCR材料の治療効力又は予防効力を改変によって増加させるように、任意の数の方法で改変され得ることを容易に理解するであろう。例えば、本発明のTCR材料は、直接的、又は架橋を介して間接的にかのいずれかで、標的化部分 (targeting moiety) にコンジュゲート化され得る。化合物（例えば、本発明のTCR材料）を標的化部分にコンジュゲート化する実務は、当分野で公知である。例えば、Wadsworth et al., J. Drug Targeting 3 : 111 (1995) 及び米国特許第5,087,616号を参照。本明細書で使用する場合、用語「標的化部分」とは、細胞表面受容体を特異的に認識し、結合する任意の分子又は薬剤をいい、その結果、標的化部分によって、本発明のTCR材料のデリバリーが、受容体を表面に発現する細胞集団へと向けられる。標的化部分としては、抗体若しくはその断片、ペプチド、ホルモン、成長因子、サイトカイン、及び任意の他の天然又は非天然リガンドであって、細胞表面受容体（例えば、上皮成長因子受容体(EGFR)）、T細胞受容体(TCR)、B細胞受容体(BCR)、CD28、血小板由来成長因子受容体(PDGF)、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)など）と結合するものなどが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用する場合、用語「架橋(bridge)」とは、本発明のTCR材料を標的化部分に架橋する任意の薬剤又は分子をいう。架橋及び／又は標的化部分が、本発明のTCR材料と結合した場合に、本発明のTCR材料の機能（すなわち、NY-ESO-1と結合する、又は癌を検出、治療若しくは予防する能力）を妨げないことを条件として、本発明のTCR材料の機能に必要ではない、本発明のTCR材料の部位が、架橋及び／又は標的化部分を結合するための理想的部位であると当業者は理解する。10

【 0 0 8 9 】

或いは、本発明のTCR材料は、デポー(depot)形態に改変され得、その結果、投与される身体中に本発明のTCR材料が放出される様式は、時間及び身体内の位置に関して制御される（例えば、米国特許第4,450,150号を参照）。本発明のTCR材料のデポー形態は、例えば、本発明のTCR材料、及び多孔性又は非多孔性の材料（例えばポリマー）を含む移植可能な組成物であって、本発明のTCR材料が、材料に封入されるか又は材料を通して拡散され、及び／又は非多孔性材料の分解によって拡散されるものであり得る。次いでデポーは、身体内の所望の位置に移植され、本発明のTCR材料が、所定の速度で移植植物から放出される。20

【 0 0 9 0 】

本発明の医薬組成物、TCR（その機能的部分又は変異体を含む）、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞又は細胞集団は、癌を治療又は予防する方法で使用され得ることが企図される。特定の理論又はメカニズムに拘束されるものではないが、本発明のTCRは、細胞により発現された場合に、TCR（又は関連する本発明のポリペプチド若しくはタンパク質、又はその機能的部分若しくは変異体）が、NY-ESO-1を発現する細胞に対して免疫応答を媒介できるように、NY-ESO-1と特異的に結合すると考えられる。この点について、本発明は、哺乳動物において癌を治療又は予防する方法であって、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド若しくはタンパク質のいずれか、本明細書に記載のTCR、ポリペプチド、タンパク質のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む任意の核酸若しくは組換え発現ベクター、又は本明細書に記載の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組換えベクターを含む任意の宿主細胞若しくは細胞集団を、哺乳動物において癌を治療又は予防するのに有効な量で、哺乳動物に投与することを含む、方法を提供する。30

【 0 0 9 1 】

本明細書で使用する場合、用語「治療する」及び「予防する」並びにそれらの派生語は、100%若しくは完全な治療又は予防を必ずしも意味しない。むしろ、当業者が潜在的な有益効果又は治療効果を有すると認識する、変動する程度の治療又は予防が存在する。こ4050

れに関して、本発明の方法は、哺乳動物における癌の任意のレベルの治療又は予防の任意の量を提供し得る。さらに、本発明の方法により提供される治療又は予防は、治療又は予防される疾患（例えば、癌）の1つ以上の状態又は症状の治療又は予防を含み得る。また、本明細書の目的のために、「予防」は、疾患、又はその症状若しくは状態の発症を遅延させることを包含し得る。

【0092】

また、哺乳動物において癌の存在を検出する方法も提供する。該方法は、(i) 本明細書に記載の本発明のTCR、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、又は抗体若しくはその抗原結合部分のいずれかと、癌細胞を含むサンプルとを接触させ、それにより複合体を形成すること、及び該複合体を検出することを含み、ここで、該複合体の検出が、哺乳動物における癌の存在を示す。10

【0093】

哺乳動物において癌を検出する本発明の方法に関して、癌細胞のサンプルは、全細胞、その溶解物又は全細胞溶解物の画分(fraction)（例えば、核又は細胞質画分、全タンパク質画分又は核酸画分）を含むサンプルであり得る。

【0094】

本発明の検出方法の目的のために、接触は、哺乳動物に関して *in vitro* 又は *in vivo* で行うことができる。好ましくは、接触は *in vitro* である。

【0095】

また、複合体の検出は当分野で公知の、任意の数の方法を通して起こり得る。例えば、本明細書に記載の本発明のTCR、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、又は抗体若しく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、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。20

【0096】

宿主細胞又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、哺乳動物に対して同種又は自己の細胞であり得る。好ましくは、細胞は、哺乳動物に対して自己性である。

【0097】

本発明の方法に関して、癌は、以下のいずれかを含む任意の癌であり得る：急性リンパ球性癌、急性骨髓性白血病、胞巣状横紋筋肉腫、骨癌、脳癌、乳癌、肛門、肛門管又は肛門直腸(anorectum)の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、頸部、胆嚢又は胸膜の癌、鼻、鼻腔又は中耳の癌、口腔の癌、外陰部の癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髓性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、消化管カルチノイド腫瘍。ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髓腫、鼻咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、膵臓癌、腹膜、網(omentum)及び腸間膜の癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌（例えば、腎細胞癌(RCC)）、小腸癌、軟組織癌、胃癌、滑膜細胞肉腫(synovial cell sarcoma)、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌、並びに膀胱癌。好ましくは、癌は、メラノーマ、乳癌、肺癌、前立腺癌、甲状腺癌、卵巣癌、又は滑膜細胞肉腫である。40

【0098】

本発明の方法で言及する哺乳動物は、任意の哺乳動物であり得る。本明細書で使用する場合、用語「哺乳動物」とは、任意の哺乳動物をいい、Rodentia目の哺乳動物（例えば、マウス及びハムスター）、及びLogomorpha目の哺乳動物（例えばウサギ）を含むが、これらに限定されない。哺乳動物は、Carnivora目(Felines(ネコ)及びCanines(イヌ)を含む)由来であることが好ましい。哺乳動物は、Artiodactyla目(Bovines(ウシ)及びSwines(ブタ)を含む)由来又はPerissodactyla目(Equines(ウマ)を含む)のものであることがより好ましい。哺乳動物は、Primates目、Ceboids又はSimoids(サル)のもの、又はAnthropoids目(ヒト及び類人猿)のものであることが最も好ましい。特に好ましい50

哺乳動物はヒトである。

【実施例】

【0099】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するが、その範囲を限定するものであると決して解釈すべきではないことは当然である。

【0100】

細胞株

メラノーマ株1300mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺)、624.38mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺)、A3 75mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺)、938mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁻)、888mel (NY-ESO-1⁻, HLA-A2⁻)、SK23mel (NY-ESO-1⁻, HLA-A2⁺)、1359mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁻)、1359-A2me l (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺)、624mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺)、及び1390mel (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺)を切除した腫瘍病変から作製し、10%ウシ胎児血清、2 mmol/L L-グルタミン、50 units/mL ペニシリソ、並びに50 μg/mL (Invitrogen) 及び25 mmol/L HEPES (GIBCO, Invitrogen) を補充したRPMI 1640からなるR10培地で培養した。使用した他の細胞株は以下を含む：子宮頸癌細胞株Caski (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺) (ATCC CRL-1550)、骨肉腫細胞株Saos2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺) (ATCC HTB-85)、及び神経芽細胞腫細胞株SK-NAS-A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺) (ATCC CRL-2137)、非小細胞肺癌細胞株H1299A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺)、乳癌細胞株MDA-MB-435S-A2 (NY-ESO-1⁺, HLA-A2⁺) (ATCC (登録商標) HTB-1 29)（これら3つはすべて、HLA-A^{*}0201を発現するためレトロウイルス構築物が形質導入された）(Naviaux et al., J. Virol., 70: 5701-05 (1996), Parkhurst et al., Clin. Cancer Res., 15: 169-180 (2009), Robbins et al., J. Immunol., 180: 6116-31 (2008), Wargo et al., Cancer Immunol. Immunother., 58: 394 (2009))、COS-A2-ESO (NY-ESO-1遺伝子を発現するレトロウイルスペクターが形質導入された)、並びにCOS-A2-CEA (CEA遺伝子を発現するレトロウイルスペクターが形質導入された)。

【0101】

実施例1

本実施例は、マウス抗NY-ESO-1 T細胞クローンの同定を実証する。

【0102】

HLA-A2トランシジェニックマウスを、100 μlの不完全フロイントアジュvant (IFA) 中100 μgのペプチド (NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅) 及び120 μgのヘルパーペプチド (B型肝炎ウイルスコアペプチド (HBVc) :128-140) を用いて、尾の付け根の皮下(s.c.)に免疫し(尾の両側それぞれに50 μgのNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチド)、それに続いて1週間後、同じ免疫でブーストした。

【0103】

0日目：二回目の免疫から1週間後、脾細胞を採取し、in vitroにて以下の1つで刺激した：(i) 1 μg/mlのプライミングペプチド及び10 μg/mlのヒト2-ミクログロブリンをパルスした、LPS活性化HLA-A2+脾細胞 (3,000 rads) (「LPSblast」) 又は(ii) 1、0.1又は0.01 μg/mlのペプチドをパルスしたT2細胞 (17,000 rads)。

【0104】

7日目：バルク培養物を、表1に記載の腫瘍細胞株の1つと共に培養した際のIFN 分泌を介して、特異的反応性について評価した。結果を表1に示す (1バルク刺激後のIFN- (pg/ml) ; 「nt」=試験せず)。サイトカイン放出は、HBVペプチドを負荷したT2細胞に反応して非常に高くなる場合があったことから、腫瘍標的に関する下線の値は、培地単独及びネガティブ腫瘍で得られたバックグラウンド値の2倍を示し、ペプチドに関する下線の値は、T2及びHBVペプチドで得られたバックグラウンド値の2倍を示す。

【0105】

【表1】

表1

| | <u>HLA-A2</u> | <u>NY-ESO-1</u> | <u>GAPDH 当たりの RNA コピー (x100)</u> | <u>LPS + 1 µg/ml ペプチド</u> | <u>T2 + 1 µg/ml ペプチド</u> | <u>T2 + 0.1 µg/ml ペプチド</u> | <u>T2 + 0.01 µg/ml ペプチド</u> |
|--------------|---------------|-----------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| T2+HBV | + | - | nt | 41 | 266 | 200 | 71 |
| T2+ESO:157 | + | + | nt | 549 | 4505 | 4,464 | 406 |
| 培地 | - | - | nt | 22 | 53 | 69 | 41 |
| 888mel | - | - | 0.02 | 36 | 133 | 110 | 88 |
| Sk23mel | + | - | 0.01 | 24 | 76 | 134 | 17 |
| 1359mel | - | + | 5.68 | 55 | 92 | 21 | 26 |
| 1359-A2 | + | + | nt | 22 | 98 | 73 | 48 |
| A375mel | + | + | 59.08 | 41 | 47 | 143 | 49 |
| 624mel | + | + | 4.14 | 41 | 73 | 200 | 22 |
| 1390mel | + | + | nt | - | - | - | - |
| 1363mel | + | + | nt | - | - | - | - |
| COS-A2-CEA | + | - | nt | 32 | 94 | 67 | 56 |
| COS-A2-ESO | + | + | nt | 33 | 92 | 65 | 61 |
| 293-A2-gp100 | + | - | nt | - | - | - | - |
| 293-A2-ESO | + | + | nt | - | - | - | - |

10

20

【0106】

11日目：ペプチド / 腫瘍反応性バルク培養物を、以下の条件下（条件当たり10プレート）、10細胞 / ウェルでクローニングした：(i) 1、0.1又は0.01 µg/mlのペプチドをパルスした照射T2細胞 (18,000 rads) : 5×10^4 細胞 / ウェル；(ii) 照射C57BL/6脾細胞フィーダー (3,000 rads) : 5×10^4 細胞 / ウェル；及び(iii) 10 CU/ml IL-2。

【0107】

25～30日目：増殖ポジティブウェルを選択し、以下の条件下、48ウェルプレート中で再刺激した：(i) 1、0.1又は0.01 µg/mlのペプチドをパルスした照射T2細胞 (18,000 rads) : 2×10^5 細胞 / ウェル；(ii) 照射C57BL/6脾細胞フィーダー (3,000 rads) : 1×10^6 細胞 / ウェル；及び(iii) 10 CU/ml IL-2。

30

【0108】

37～44日目：クローンを、表2に記載の腫瘍細胞株と共に培養した際のIFN 分泌を介して、特異的反応性について評価した。腫瘍細胞を、アッセイ前に、IFN (20 ng/ml) 及び腫瘍壞死因子 (3 ng/ml) で一晩処理した。

【0109】

0日目に、1 µg/mlのプライミングペプチド及び10 µg/mlのヒト2-ミクログロブリンをパルスしたLPS活性化HLA-A2+脾細胞 (3,000 rads) で刺激した脾細胞は、960のうち8の増殖ポジティブウェルをもたらした。2つの最も反応性のクローンに関するデータを表2に示す (1バルク刺激後；IFN- (pg/ml))。

【0110】

40

【表2】

表2

| | <u>HLA-A2</u> | <u>NY-ESO-1</u> | <u>GAPDH当たりのRNAコピー(x100)</u> | <u>B</u> | <u>H</u> |
|--------------|---------------|-----------------|------------------------------|-------------------|-------------------|
| T2+HBV | + | - | nt | 393 | 283 |
| T2+ESO:157 | + | + | nt | <u>>14,000</u> | <u>>14,000</u> |
| 培地 | - | - | nt | 404 | 292 |
| 888mel | - | - | 0.02 | 386 | 288 |
| Sk23mel | + | - | 0.01 | - | - |
| 1359mel | - | + | 5.68 | 354 | 285 |
| 1359-A2 | + | + | nt | <u>11,781</u> | <u>16,436</u> |
| A375mel | + | + | 59.08 | 383 | <u>1,954</u> |
| 624mel | + | + | 4.14 | 363 | <u>14,298</u> |
| 1390mel | + | + | nt | 288 | <u>17,567</u> |
| 1363mel | + | + | nt | <u>3,582</u> | - |
| COS-A2-CEA | + | - | nt | 348 | 289 |
| COS-A2-ESO | + | + | nt | <u>>14,000</u> | <u>>14,000</u> |
| 293-A2-gp100 | + | - | nt | 373 | 274 |
| 293-A2-ESO | + | + | nt | 335 | <u>8,813</u> |

【0111】

10

46~49日目：対象のクローンを、以下の条件下、24ウェルプレート中で再刺激した：(i) 1、0.1又は0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドをパルスした照射T2細胞 (18,000 rads) : 5×10^5 細胞/ウェル；(ii) 照射C57BL/6脾細胞フィーダー (3,000 rads) : 1×10^6 細胞/ウェル；及び(iii) 10 CU/ml IL-2。再刺激したクローンを、RNA調製のために急速凍結 (flash-frozen) した。

【0112】

20

実施例2

本実施例は、マウス抗NY-ESO-1 T細胞クローンの同定を実証する。

【0113】

30

実施例1に記載するように、HLA-A2トランスジェニックマウスを免疫し、脾細胞を採取し、刺激し、特異的反応性について評価した。

【0114】

11日目：バルク培養物を、以下の条件下、24ウェルプレート中で再刺激した：(i) 1、0.1又は0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドをパルスした照射T2細胞 (18,000 rads) : 4×10^5 細胞/ウェル；(ii) 照射C57BL/6脾細胞フィーダー (3,000 rads) : 1×10^6 細胞/ウェル；及び(iii) 10 CU/ml IL-2。

【0115】

30

19日目：バルク培養物（2回刺激後）を、表3に記載の腫瘍細胞株と共に培養した際のIFN- 分泌を介して、特異的反応性について評価した。腫瘍細胞を、アッセイ前に、IFN- (20 ng/ml) 及び腫瘍壊死因子 (3 ng/ml) で一晩処理した。結果を表3に示す (IFN- (pg/ml))。

【0116】

40

【表3】

表3

| | HLA-A2 | NY-ESO-1 | GAPDH 当たりの RNA コピー (x100) | 2 バルク刺激後 | | | |
|--------------|--------|----------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------------|
| | | | | LPS プラスト + 1 μg/ml ペプチド | T2 + 1 μg/ml ペプチド | T2 + 0.1 μg/ml ペプチド | T2 + 0.01 μg/ml ペプチド |
| T2+HBV | + | - | nt | 195 | 2,860 | 16,156 | 1,058 |
| T2+ESO:157 | + | + | nt | 79,524 | 72,730 | 47,871 | 1,899 |
| 培地 | - | - | nt | 137 | 131 | 156 | 406 |
| 888mel | - | - | 0.02 | 40 | 201 | 112 | 562 |
| Sk23mel | + | - | 0.01 | 79 | 245 | 562 | 424 |
| 1359mel | - | + | 5.68 | 73 | 169 | 188 | 357 |
| 1359-A2 | + | + | nt | 966 | 320 | 1,597 | 258 |
| A375mel | + | + | 59.08 | 150 | 176 | 258 | 332 |
| 624mel | + | + | 4.14 | 320 | 144 | 697 | 301 |
| 1390mel | + | + | nt | - | - | - | - |
| 1363mel | + | + | nt | - | - | - | - |
| COS-A2-CEA | + | - | nt | 226 | 369 | 400 | 308 |
| COS-A2-ESO | + | + | nt | 424 | 351 | 326 | 295 |
| 293-A2-gp100 | + | - | nt | - | - | - | - |
| 293-A2-ESO | + | + | nt | - | - | - | - |

【0117】

21日目：バルク培養物を、以下の条件下、24ウェルプレート中で再刺激した：(i) 1、0.1又は0.01 μg/mlのペプチドをパルスした照射T2細胞(18,000 rads) : 5×10^5 細胞/ウェル；(ii) 照射C57BL/6脾細胞フィーダー(3,000 rads) : 1×10^6 細胞/ウェル；及び(iii) 10 CU/ml IL-2。

【0118】

30日目：バルク培養物(3回刺激後)を、表4に記載の腫瘍細胞株と共に培養した際のIFN- 分泌を介して、特異的反応性について評価した。腫瘍細胞を、アッセイ前に、IFN- (20 ng/ml) 及び腫瘍壊死因子 (3 ng/ml) で一晩処理した。結果を表4に示す(IFN- (pg/ml))；*は、3回のバルク刺激後にクローニングしたバルク培養物を示す)。

【0119】

10

20

30

【表4】

表4

| | <u>HLA-A2</u> | <u>NY-ESO-1</u> | <u>GAPDH 当たりの RNA コピー (x100)</u> | <u>* LPS プラスト + 1 μg/ml ペプチド</u> | <u>* T2 + 1 μg/ml ペプチド</u> | <u>T2 + 0.1 μg/ml ペプチド</u> | <u>T2 + 0.01 μg/ml ペプチド</u> | <u>TE8 (ヒト T細胞 クローニング)</u> |
|--------------|---------------|-----------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| T2+HBV | + | - | nt | 1,794 | 4,700 | 28,797 | 23,897 | 16 |
| T2+ESO-157 | + | + | nt | <u>78,316</u> | <u>63,793</u> | <u>96,164</u> | 19,698 | <u>16,254</u> |
| 培地 | - | - | nt | 1,992 | 389 | 8,856 | 10,711 | 7 |
| 888mel | - | - | 0.02 | 1,268 | 188 | 6,611 | 7,614 | 13 |
| Sk23mel | + | - | 0.01 | 662 | 202 | 7,585 | 6,225 | 69 |
| 1359mel | - | + | 5.68 | 623 | 64 | 5,684 | 7,026 | 996 |
| 1359-A2 | + | + | nt | <u>27,572</u> | <u>7,774</u> | 10,324 | 7,204 | <u>7,936</u> |
| A375mel | + | + | 59.08 | 1,263 | 342 | 7,232 | 9,425 | <u>4,095</u> |
| 624mel | + | + | 4.14 | <u>14,098</u> | <u>3,211</u> | 10,061 | 8,727 | <u>3,262</u> |
| 1390mel | + | + | nt | 852 | 179 | 5,966 | 6,191 | <u>7,123</u> |
| 1363mel | + | + | nt | <u>42,970</u> | <u>15,673</u> | <u>20,398</u> | 9,958 | <u>12,149</u> |
| COS-A2-CEA | + | - | nt | 981 | 119 | 3,995 | 6,744 | 18 |
| COS-A2-ESO | + | + | nt | <u>19,523</u> | <u>3,334</u> | 9,116 | 8,187 | <u>14,662</u> |
| 293-A2-gp100 | + | - | nt | - | - | - | - | - |
| 293-A2-ESO | + | + | nt | - | - | - | - | - |

【0120】

33日目：選択したペプチド / 腫瘍反応性バルク培養物（3回刺激後）を、実施例1の11日目に記載するように、10細胞/ウェルでクローニングした。

【0121】

45～48日目：増殖ポジティブウェルを、表5に記載の腫瘍細胞株と共に培養した際のIFN- 分泌を介して、ペプチド反応性についてスクリーニングした。腫瘍細胞を、アッセイ前に、IFN- (20 ng/ml) 及び腫瘍壊死因子- (3 ng/ml) で一晩処理した。

【0122】

0日目に、1 μg/mlのプライミングペプチド及び10 μg/mlのヒト2-ミクログロブリンをパルスしたLPS活性化HLA-A2+脾細胞(3,000 rads)で刺激した脾細胞は、960のうち33の増殖ポジティブウェルをもたらした。4つの最も反応性のクローニング(Nos. 2, 5, 6及び8)に関するデータを表5に示す(3バルク刺激後；IFN- (pg/ml))。1 μg/mlのペプチドをパルスしたT2細胞(17,000 rads)で刺激した脾細胞は、960のうち104の増殖ポジティブウェルをもたらした。4つの最も反応性のクローニング(Nos. 1, 50, 51及び63)に関するデータを表5に示す。

【0123】

10

20

30

【表5】

| | <u>HLA-A2</u> | <u>NY-ESO-1</u> | <u>GAPDH 当たりの RNAコピ数 (x100)</u> | <u>2</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>8</u> | <u>1</u> | <u>50</u> | <u>51</u> | <u>63</u> |
|--------------|---------------|-----------------|---------------------------------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| T2+HBV | + | - | nt | 235 | 317 | 223 | 344 | 306 | 335 | 270 | 239 |
| T2+ESO:157 | + | + | nt | >14,000 | >14,000 | >14,000 | >14,000 | >14,000 | >14,000 | >14,000 | >14,000 |
| 培地 | - | - | nt | 221 | 314 | 231 | 563 | 266 | 232 | 258 | 222 |
| 888mel | - | - | 0.02 | 210 | 316 | 208 | 288 | 234 | 241 | 244 | 208 |
| Sk23mel | + | - | 0.01 | 216 | 309 | 210 | 297 | 278 | 208 | 222 | 207 |
| 1359mel | - | + | 5.68 | 243 | 383 | 206 | 422 | 347 | 271 | 212 | 229 |
| 1359-A2 | + | + | nt | <u>1,981</u> | <u>6,027</u> | <u>2,523</u> | <u>1,845</u> | <u>1,477</u> | <u>3,661</u> | <u>1,965</u> | <u>2,272</u> |
| A375mel | + | + | 59.08 | <u>523</u> | <u>388</u> | <u>232</u> | <u>1,455</u> | <u>556</u> | <u>557</u> | <u>556</u> | <u>737</u> |
| 624mel | + | + | 4.14 | 7,879 | <u>1,931</u> | <u>2,527</u> | <u>8,595</u> | <u>4,629</u> | <u>4,487</u> | <u>2,978</u> | <u>7,139</u> |
| 1390mel | + | + | nt | <u>1,124</u> | <u>17,567</u> | <u>352</u> | <u>900</u> | <u>517</u> | <u>379</u> | <u>914</u> | <u>716</u> |
| 1363mel | + | + | nt | - | - | - | - | - | - | - | - |
| COS-A2-CEA | + | - | nt | - | - | - | - | - | - | - | - |
| COS-A2-ESO | + | + | nt | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 293-A2-gp100 | + | - | nt | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 293-A2-ESO | + | + | nt | - | - | - | - | - | - | - | - |

【0 1 2 4】

10

20

30

40

50

46～49日目：本実施例の21日目に記載するように、ペプチド反応性クローンを24ウェルプレート中で再刺激した。再刺激したクローンをRNA調製のために急速凍結した。

【0125】

実施例3

本実施例は、マウス抗NY-ESO-1 TCRの単離、及び単離したTCRのNY-ESO-1に対する特異的反応性を実証する。

【0126】

5つのクローン（すなわち、クローンB、H、5、6、1、50及び63）からTCRを単離した。
各クローンのTCRをコードするヌクレオチド配列（RNA）を単離し、配列決定し、患者1及び2由来のヒト末梢血単核細胞（PBMC）にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、OKT3及びIL-2で刺激し、単独（培地）で培養するか、或いはコントロール（HBV）ペプチドをパルスしたT2細胞、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスしたT2細胞、COA-A2-CEA（NY-ESO-1⁻）、COS-A2-ESO（NY-ESO-1⁺）、又は様々なメラノーマ腫瘍細胞細胞株888meI（NY-ESO-1⁻）、Sk23meI（NY-ESO-1⁻）、A375meI（NY-ESO-1⁺）、1363meI（NY-ESO-1⁺）、1390（NY-ESO-1⁺）若しくは624（NY-ESO-1⁺）の1つとともに共培養した。IFN 分泌を測定した。結果を表6に示す（IFN （pg/ml））。

【0127】

【表6】

表6

| | T2+HBV | T2+ESO: 157 | 培地 | 888 | Sk23 | 1363 | 1390 | A375 | 624 | COS-A2- CEA | COS-A2- ESO |
|-------------------------------|--------|----------------|----|-----|------|---------|------|------|-----|----------------|----------------|
| HLA-A2 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| NY-ESO-1 | - | + | - | - | - | + | + | + | + | - | + |
| 患者 1 | | | | | | | | | | | |
| GFP | 326 | 180 | 8 | 198 | 134 | 220 | 325 | 632 | 32 | 94 | 74 |
| Avidex TCR | 235 | >10,000 | 7 | 188 | 81 | >10,000 | 1637 | 5752 | 531 | 52 | 2320 |
| TRAV7D-4/TRBV19 ¹ | 664 | >10,000 | 7 | 185 | 102 | 2262 | 489 | 893 | 39 | 72 | 449 |
| TRAV13D-2/TRBV14 ² | 197 | >10,000 | 8 | 152 | 88 | 134 | 159 | 338 | 26 | 75 | 55 |
| TRAV7D-3/TRBV14 ³ | 155 | 366 | 7 | 129 | 112 | 122 | 171 | 378 | 28 | 68 | 71 |
| TRAV6D/TRBV26 ⁴ | 198 | >10,000 | 11 | 255 | 156 | >10,000 | 3859 | 9973 | 782 | 91 | 3872 |
| TRAV7D-3/TRBV26 ⁵ | 190 | 1269 | 0 | 208 | 107 | 246 | 189 | 509 | 34 | 79 | 104 |
| 患者 2 | | | | | | | | | | | |
| GFP | 26 | 30 | 2 | 47 | 27 | 22 | 62 | 98 | 8 | 16 | 19 |
| Avidex TCR | 50 | >10,000 | 4 | 32 | 22 | 2484 | 208 | 192 | 150 | 11 | 588 |
| TRAV7D-4/TRBV19 ¹ | 183 | >10,000 | 2 | 34 | 15 | 149 | 47 | 39 | 7 | 13 | 90 |
| TRAV13D-2/TRBV14 ² | 22 | 7898 | 9 | 27 | 13 | 20 | 42 | 58 | 11 | 22 | 17 |
| TRAV7D-3/TRBV14 ³ | 24 | 23 | 11 | 28 | 13 | 21 | 30 | 39 | 5 | 7 | 13 |
| TRAV6D/TRBV26 ⁴ | 63 | >10,000 | 39 | 77 | 40 | 3597 | 777 | 344 | 133 | 32 | 683 |
| TRAV7D-3/TRBV26 ⁵ | 10 | 77 | 0 | 28 | 17 | 27 | 33 | 51 | 5 | 16 | 40 |

¹TRAV7D-4/TRBV19: クローン ESO (1 刺激 LPS) B (上表 2)²TRAV13D-2/TRBV14: クローン ESO (1 刺激 LPS) H (上表 2)³TRAV7D-3/TRBV14: クローン ESO (3 刺激 LPS) 5 (上表 5)⁴TRAV6D/TRBV26: クローン ESO (3 刺激 LPS) 6; ESO (3 刺激 T2) 1; ESO (3 刺激 T2) 63 (上表 5)⁵TRAV7D-3/TRBV26: クローン ESO (3 刺激 T2) 50 (上表 5)

【0128】

表6に示すように、TRAV6D/TRBV26 (配列番号11及び12) TCRは、最も高い特異的抗NY-ESO-1反応性を提供し、これを更なる研究のために選択した。

【0129】

TRAV6D/TRBV26 (配列番号11及び12) TCRをコードするヌクレオチド配列 (RNA) を、患者3及び4由来のヒトPBMCにトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、CD8+及びCD4+細胞についてポジティブに選択し、OKT3及びIL-2で刺激し、単独 (培地) で培養するか、或いはコントロール (HBV) ペプチドをパルスしたT2細胞、様々な濃度のNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスしたT2細胞、COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺)、COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻)、又は様々なメラノーマ腫瘍細胞細胞株888meI (NY-ESO-1⁻)、Sk23meI (NY-ESO-1⁻)、A375meI (NY-ESO-1⁺)、1363meI (NY-ESO-1⁺) 若しくは624 (NY-ESO-1⁺) の1つとともに共培養した。IFN 分泌を測定し、結果を表7に示す (IFN (pg/ml))。

【0130】

10

20

30

40

【表7】

| | | T2+HBV | | -----T2+ESO:157-165----- | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|-------|-----|----|-----|-----|
| | | 10 ⁻⁶ g/ml | 10 ⁻¹² g/ml | 10 ⁻¹¹ g/ml | 10 ⁻¹⁰ g/ml | 10 ⁻⁹ g/ml | 10 ⁻⁸ g/ml | 10 ⁻⁷ g/ml | 10 ⁻⁶ g/ml | | | | | | |
| | | CD8+ | TRAV6D/ TRBV26 | 243 | 238 | 1075 | 4257 | 6170 | 8996 | 5087 | 6142 | 122 | 90 | 70 | 419 |
| | | GFP | | 86 | 47 | 27 | 29 | 9 | 17 | 18 | 25 | 12 | 19 | 5 | 18 |
| | | 患者 3 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | TRAV6D/ TRBV26 | 127 | 67 | 69 | 1836 | 12835 | 19161 | 12495 | 14641 | 173 | 56 | 43 | 250 |
| | | Avidex | | 6 | 0 | 1 | 40 | 1147 | 2455 | 3538 | 5783 | 17 | 0 | 0 | 25 |
| | | GFP | | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 5 | 0 | 43 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD8+ | TRAV6D/ TRBV26 | 15 | 55 | 931 | 1713 | 2670 | 3721 | 2988 | 2878 | 0 | 0 | 0 | 48 |
| | | GFP | | 42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 6 | 5 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | TRAV6D/ TRBV26 | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | GFP | | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 30 | 0 | 0 | 28 | 14 |
| | | 患者 4 | | | | | | | | | | | | | |
| | | CD4+ | COS-A2/ CEA | 38 | 1 | 58 | 5774 | 18051 | 19691 | >20000 | 21 | 7 | 0 | 109 | 36 |
| | | Avidex | | 25 | 0 | 0 | 200 | 2923 | 15574 | >20000 | 18293 | 8 | 0 | 0 | 37 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |

表7に示すように、TRAV6D/TRBV26(配列番号11及び12)TCRでトランスフェクトされた細胞は、IFN 分泌により測定されるように、NY-ESO-1+メラノーマ腫瘍細胞を特異的に認識した。

【0132】

実施例4

本実施例は、NY-ESO-1ペプチドをパルスした樹状細胞と共に培養した際の、マウス抗NY-ESO-1 TCRでトランスフェクトされたヒトCD8+及びCD4+ T細胞の反応性を実証する。

【0133】

CD8+(図1A)又はCD4+(図1B)ヒトT細胞を、マウス抗NY-ESO-1 TCR(TRAV6D/TRBV26(配列番号11及び12))又はヒト抗NY-ESO-1 TCRでトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、様々な濃度のNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスした樹状細胞とともに共培養し、IFN 分泌を測定した。

【0134】

図1A及び1Bに示すように、マウス抗NY-ESO-1 TCR(TRAV6D/TRBV26(配列番号11及び12))でトランスフェクトされたCD8+及びCD4+ヒトT細胞は、IFN 分泌により測定されるように、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスした樹状細胞に対して反応性を示した。マウス抗NY-ESO-1 TCR(TRAV6D/TRBV26(配列番号11及び12))でトランスフェクトされたCD8+ヒトT細胞は、IFN 分泌により測定されるように、ヒト抗NY-ESO-1 TCRでトランスフェクトされたCD8+細胞と比較して、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスした樹状細胞に対して、より反応性を示した。

【0135】

実施例5

本実施例は、メラノーマ腫瘍細胞と共に培養した際の、マウス抗NY-ESO-1 TCRでトランスフェクトされたヒトCD8+及びCD4+T細胞の反応性を実証する。

【0136】

CD8+(図2A)又はCD4+(図2B)ヒトT細胞を、マウス抗NY-ESO-1 TCR(TRAV6D/TRBV26(配列番号11及び12))又はヒト抗NY-ESO-1 TCRでトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、単独(培地)で培養するか、或いはコントロールペプチドをパルスしたT2細胞、NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスしたT2細胞、COA-A2-CEA(NY-ESO-1⁻)、COS-A2-ESO(NY-ESO-1⁺)、又は様々なメラノーマ腫瘍細胞株888me1(NY-ESO-1⁻)、Sk23me1(NY-ESO-1⁻)、A375me1(NY-ESO-1⁺)若しくは1363me1(NY-ESO-1⁺)の1つとともに共培養した。IFN 分泌を測定した。

【0137】

図2A及び2Bに示すように、マウス抗NY-ESO-1 TCR(TRAV6D/TRBV26(配列番号11及び12))でトランスフェクトされたCD8+及びCD4+ヒトT細胞は、IFN 分泌により測定されるように、NY-ESO-1+メラノーマ腫瘍細胞を特異的に認識した。マウス抗NY-ESO-1 TCR(TRAV6D/TRBV26(配列番号11及び12))でトランスフェクトされたCD8+及びCD4+ヒトT細胞は、IFN 分泌により測定されるように、ヒト抗NY-ESO-1 TCRでトランスフェクトされたCD8+及びCD4+細胞と比較して、NY-ESO-1+腫瘍細胞株に対して、より反応性を示した。

【0138】

実施例6

本実施例は、メラノーマ腫瘍細胞と共に培養した際の、マウス抗NY-ESO-1 TCRをコードする野生型又はコドン最適化ヌクレオチド配列でトランスフェクトされたヒトCD8+及びCD4+T細胞の反応性を実証する。

【0139】

マウス抗NY-ESO-1 TCR(TRAV6D/TRBV26)をコードする野生型(配列番号19及び20)又はコドン最適化(配列番号15及び16)ヌクレオチド配列(RNA)を、患者5及び6由来のCD8+又はCD4+ヒトPBMCにトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、CD8+及びCD4+細胞についてポジティブに選択し、OKT3及びIL-2で刺激し、単独(培地)で培養するか、或いはコントロール(HBVc)ペプチドをパルスしたT2細胞、様々な濃度のNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅

10

20

30

40

50

γ -₁₆₅ペプチドをパルスしたT2細胞、COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻) 、COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺) 、又は様々なメラノーマ腫瘍細胞株888mel (NY-ESO-1⁻) 、Sk23mel (NY-ESO-1⁻) 、A375mel (NY-ESO-1⁺) 、1363mel (NY-ESO-1⁺) 、A375 (NY-ESO-1⁺) 若しくは624mel (NY-ESO-1⁺) の1つとともに共培養した。IFN 分泌を測定した。結果を表8に示す (IFN (pg/ml)) 。

【 0 1 4 0 】

【表 8】

| | 患者 5 CD4 | | | | 患者 5 CD8 | | | | 患者 6 CD4 | | | | 患者 6 CD8 | | | |
|----------------------------|------------|------|-----|------------|----------|-------|------------|-------|----------|------------|-------|-----|------------|-----|-----|----|
| | コドン 最適化 | 野生型 | GFP | コドン 最適化 | 野生型 | GFP | コドン 最適化 | 野生型 | GFP | コドン 最適化 | 野生型 | GFP | コドン 最適化 | 野生型 | GFP | 培地 |
| 培地 | 103 | 62 | 6 | 43 | 60 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| T2+HBV/c | 58 | 37 | 4 | 71 | 108 | 82 | 2 | 17 | 7 | 3 | 12 | 9 | 8 | | | |
| T2+10 ⁻¹² M ESO | 44 | 32 | 0 | 67 | 86 | 46 | 13 | 15 | 6 | 6 | 9 | 14 | 0 | | | |
| T2+10 ⁻¹¹ M ESO | 83 | 42 | 0 | 52 | 150 | 30 | 15 | 22 | 7 | 20 | 23 | 2 | 0 | | | |
| T2+10 ⁻¹⁰ M ESO | 69 | 27 | 3 | 221 | 175 | 43 | 13 | 18 | 4 | 193 | 176 | 0 | 0 | | | |
| T2+10 ⁻⁹ M ESO | 232 | 60 | 0 | 3149 | 2465 | 20 | 728 | 555 | 6 | 1979 | 3066 | 4 | 0 | | | |
| T2+10 ⁻⁸ M ESO | 5158 | 2979 | 0 | 13308 | 13394 | 56 | 15468 | 12906 | 7 | 5382 | 11217 | 0 | 0 | | | |
| T2+10 ⁻⁷ M ESO | 13987 | 9362 | 1 | >20000 | 37 | 23981 | 21321 | 8 | 8914 | 13127 | 0 | 0 | | | | |
| T2+10 ⁻⁶ M ESO | 15345 | 9417 | 0 | >20000 | >20000 | 51 | 26802 | 25225 | 8 | 14734 | 19766 | 2 | 0 | | | |
| 888mel (A2- ESO-) | 54 | 30 | 8 | 55 | 98 | 37 | 22 | 9 | 8 | 36 | 58 | 37 | 17 | | | |
| Sk23mel (A2+ ESO-) | 30 | 34 | 7 | 8 | 26 | 29 | 3 | 0 | 3 | 8 | 29 | 11 | 0 | | | |
| A375 (A2+ ESO+) | 239 | 204 | 75 | 525 | 925 | 55 | 114 | 146 | 82 | 190 | 480 | 22 | 0 | | | |
| 624mel (A2+ ESO+) | 102 | 81 | 57 | 176 | 211 | 24 | 44 | 42 | 6 | 89 | 125 | 0 | 0 | | | |
| 1363mel (A2+ ESO+) | 605 | 443 | 176 | 964 | 1421 | 28 | 525 | 576 | 153 | 426 | 1079 | 20 | nt | | | |
| COS-A2-CEA | 68 | 66 | 22 | 51 | 83 | 39 | 8 | 17 | 16 | 4 | 13 | 9 | 4 | | | |
| COS-A2-ESO | 429 | 92 | 2 | 1322 | 1436 | 22 | 1213 | 431 | 17 | 872 | 1372 | 10 | 0 | | | |

【0 1 4 1】

表8に示すように、マウス抗NY-ESO-1 TCR (TRAV6D/TRBV26) をコードする野生型又はコード最適化ヌクレオチド配列でトランスフェクトされたCD8+及びCD4+ヒトT細胞は、IFN 分泌により測定されるように、NY-ESO-1+メラノーマ腫瘍細胞を特異的に認識した。

【 0 1 4 2 】

実施例7

本実施例は、メラノーマ及び非メラノーマ腫瘍細胞と共に培養した際の、マウス抗NY-ESO-1 TCRをコードする野生型ヌクレオチド配列でトランスフェクトされたヒトCD8+T細胞の反応性を実証する。

【 0 1 4 3 】

マウス抗NY-ESO-1 TCR (TRAV6D/TRBV26) をコードするヌクレオチド配列 (RNA) (配列番号19及び20) を、患者7及び8由来のCD8+ヒトT細胞にエレクトロポレーションした。トランスフェクトされていない細胞 (mock) 又はトランスフェクトされた細胞を、CD8+T細胞についてポジティブに選択し、OKT3及びIL-2で刺激し、単独 (培地) で培養するか、或いはコントロール (HBVc) ペプチドをパルスしたT2細胞；様々な濃度のNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドをパルスしたT2細胞；COA-A2-CEA (NY-ESO-1⁻) ；COS-A2-ESO (NY-ESO-1⁺) ；様々なメラノーマ腫瘍細胞株888mel (NY-ESO-1⁻) 、Sk23mel (NY-ESO-1⁻) 、A375mel (NY-ESO-1⁺) 、1363mel (NY-ESO-1⁺) 、A375 (NY-ESO-1⁺) の1つ；骨原性肉腫 (osteogenic sarcoma) 細胞株Saos2 (NY-ESO-1⁺) ；グリオーマ細胞株LN-18 (NY-ESO-1⁺) ；ユエイング肉腫細胞株TC-71 (NY-ESO-1⁺) ；神経芽細胞腫細胞株SKN AS (NY-ESO-1⁺) 若しくはSKN A-S-A2 (NY-ESO-1⁺) ；又は乳癌細胞株MDA 453S (NY-ESO-1⁺) 若しくはMDA 453S-A2 (NY-ESO-1⁺) とともに共培養した。IFN 分泌を測定した。結果を表9に示す (IFN (pg/ml)) 。

【 0 1 4 4 】

【表 9】

表 9

| | --患者 7 CD8--- | | --患者 8 CD8--- | | 培地 | |
|---------------------------|---------------|------|---------------|------|-----|---|
| | ESO a/b | mock | ESO a/b | mock | | |
| 培地 | 21 | 0 | 0 | 6 | 0 | |
| T2+HBVc | 64 | 60 | 88 | 50 | 0 | |
| T2+10-12 M ESO | 50 | 58 | 107 | 59 | 0 | |
| T2+10-11 M ESO | 66 | 51 | 209 | 71 | 0 | |
| T2+10-10 M ESO | 332 | 66 | 1704 | 50 | 0 | |
| T2+10-9 M ESO | 3142 | 51 | 10886 | 55 | 0 | |
| T2+10-8 M ESO | 6505 | 52 | >20000 | 58 | 0 | |
| T2+10-7 M ESO | 6764 | 42 | >20000 | 51 | 0 | |
| T2+10-6 M ESO | 6550 | 55 | >20000 | 58 | 0 | |
| 888mel (A2- ESO -) | メラノーマ | 59 | 45 | 142 | 133 | 0 |
| Sk23mel (A2+ ESO-) | メラノーマ | 79 | 54 | 31 | 59 | 0 |
| A375mel (A2+ ESO+) | メラノーマ | 2986 | 240 | 1984 | 93 | 0 |
| 1363mel (A2+ ESO+) | メラノーマ | 1889 | 119 | 9858 | 137 | 0 |
| Saos2 (A2+ ESO+) | 骨原性肉腫 | 248 | 34 | 1253 | 28 | 0 |
| LN-18 (A2+ ESO+) | グリオーマ | 123 | 21 | 224 | 34 | 0 |
| TC-71 (A2+ ESO+) | ユエイング肉腫 | 159 | 116 | 183 | 127 | 3 |
| SKN AS (A2- ESO+) | 神経芽細胞腫 | 542 | 328 | 199 | 207 | 2 |
| SKN AS - A2 (A2+ ESO+) | 神経芽細胞腫 | 148 | 38 | 1004 | 39 | 0 |
| MDA 453S (A2- ESO+) | 乳癌 | 448 | 311 | 177 | 230 | 0 |
| MDA 453S -A2 (A2+ ESO+) | 乳癌 | 111 | 50 | 610 | 39 | 0 |
| COS-A2-CEA (A2+ ESO-) | | 45 | 51 | 50 | 63 | 7 |
| COS-A2-ESO (A2+ ESO+) | | 588 | 34 | 4109 | 63 | 0 |

【 0 1 4 5 】

10

20

30

40

50

表9に示すように、マウス抗NY-ESO-1 TCR (TRAV6D/TRBV26) をコードするヌクレオチド配列でトランスフェクトされたCD8+ヒトT細胞は、IFN 分泌により測定されるように、NY-ESO-1+メラノーマ、骨原性肉腫、ユーイング肉腫、神経芽細胞腫及び乳癌腫瘍細胞を特異的に認識した。

【 0 1 4 6 】

実施例8

本実施例は、マウス抗NY-ESO-1 TCRをコードする組換え発現ベクターの調製を実証する。

【 0 1 4 7 】

野生型ヒト抗NY-ESO-1 TCR (1G4) 、 1G4 TCRであってCDR3 鎖内に二重置換を有するもの（95位のトレオニンの代わりに、ロイシン及びチロシンが用いられる） (1G4-LY) (Robbins et al. , J. Clin. Oncol. , 29: 917-924 (2011) ; Robbins et al. , J. Immunol. , 180: 6116-6131 (2008)) 、又はマウス抗NY-ESO-1 TCR (TRAV6D/TRBV26) (配列番号11及び12) をコードするDNAを含むレトロウイルスベクターをMSGVIレトロウイルス骨格にクローニングし、TOP10細胞に形質転換した。ピコルナウイルス2Aペプチド (配列番号13) により、及び鎖をつなげた。マウスTRAV6D/TRBV26 TCRをコードする2つのベクターを作製した：1つは、鎖をコードするヌクレオチド配列の5'に位置する鎖をコードするヌクレオチド配列 (mESO) (配列番号17) を含み、1つは、鎖をコードするヌクレオチド配列の5'に位置する鎖をコードするヌクレオチド配列 (mESO) (配列番号18) を含んだ。TCRの及び鎖をコードする挿入物の存在は、Nco I及びNot I制限酵素での消化により確認した。マキシプレップ (maxiprep) により、ヒト及びマウスTCRのそれについて、1つのクローナーからDNAを生成した。

【 0 1 4 8 】

1G4 TCR及び1G4-LYベクター由来のDNAを293GP細胞にトランスフェクトして、上清を集め、その後の形質導入実験にてPBLを形質導入した。GFPをコードするベクターをコントロールとして使用した。

【 0 1 4 9 】

実施例9

本実施例は、マウス抗NY-ESO-1 TCRの形質導入効率を実証する。

【 0 1 5 0 】

末梢血リンパ球 (PBL) を0日目にOKT3で刺激した (S1) 。3日目及び4日目に実施例8の1G4、1G4-LY、mESO 又はmESO TCRベクターでPBLを形質導入した。7~11日目に、蛍光活性化セルソーティング (FACS) により形質導入効率を評価した。マウスTCRの可変領域を認識する抗体 (VB13.1) 及びマウスTCRの定常領域を認識する抗体 (mB) をFACSのために使用した。最初の刺激から7~11日後にFACSを実施した (S1D7-S1D11) 。結果を下表10に要約する。

【 0 1 5 1 】

【表 1 0 】

表 10

| | % VB13.1, mB+ 細胞プレ急速拡大 (REP) (5 ドナーについて) (S1D7-S1D11) |
|------------------------|----------------------------------------------------------|
| 非形質導入 (UT) | 0-6 |
| 緑色蛍光タンパク質 (GFP) | 67-90.5 |
| 1G4 TCR | 62-85 |
| 1G4-LY TCR | 37-85 |
| mESO $\alpha\beta$ TCR | 56-90 |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 56-91 |

40

50

【 0 1 5 2 】

表10に示すように、mESO 又はmESO TCRベクターが形質導入されたPBLは、1G4及び1G4-LY TCRをコードするベクターと比較して、同様の効率で形質導入された。

【 0 1 5 3 】**実施例10**

本実施例は、マウス抗NY-ESO-1 TCRをコードするベクターが形質導入された細胞の反応性を実証する。

【 0 1 5 4 】

実施例9に記載するように、5のドナー由来のPBLを刺激し、GFP、又は1G4-LY、mESO若しくはmESO TCRをコードするベクターで形質導入したか、又は形質導入しなかった。形質導入されたPBLを、下表11A若しくは11Bに列挙する様々な腫瘍細胞株の1つと共に培養するか、或いはSSXペプチド、ペプチドなし(T2)又は下表12に列挙する様々な濃度のNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドの1つをパルスしたT2細胞とともに共培養した。共培養物の24時間上清の酵素結合免疫吸着法(ELISA)により、IFN 分泌を測定した。最初の刺激から6、7又は10日後にELISAを実施した(S1D6、S1D7及びS1D10)。結果を表11A、11B及び12に示す(IFN pg/ml)。形質導入(Td)効率は、V 13.1+ m + 細胞のFACS分析に基づいた。

【 0 1 5 5 】

【表 1 1 A】

表 11A

| | % td 効率 | <u>888</u> | <u>938</u> | <u>COS-A2- gp100</u> | <u>624.38</u> | <u>H1299- A2</u> | <u>A375</u> | <u>COAS- A2-ESO</u> | <u>1300</u> |
|---------------------------|------------|------------|------------|--------------------------|---------------|----------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| 患者 1 (希釈 1:10; S1D7) | | | | | | | | | |
| 非形質導入 (UT) | N/A | 12 | 0 | 99 | 22 | 17 | 132 | 24 | 61 |
| GFP | 90 | 0 | 0 | 91 | 17 | 65 | 95 | 0 | 33 |
| <u>1G4-LY TCR</u> | <u>85</u> | <u>13</u> | <u>0</u> | <u>99</u> | <u>3316</u> | <u>8592</u> | <u>3059</u> | <u>1391</u> | <u>5732</u> |
| mESO $\alpha\beta$ TCR | 83 | 239 | 284 | 156 | <u>5523</u> | <u>9616</u> | <u>4430</u> | <u>1872</u> | <u>6922</u> |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 83 | 329 | 326 | 42 | <u>6721</u> | <u>9898</u> | <u>4178</u> | <u>2270</u> | <u>7798</u> |
| 患者 2 (希釈 1:5; S1D7) | | | | | | | | | |
| 非形質導入 (UT) | N/A | 44 | 43 | 46 | 44 | 42 | 53 | 46 | 42 |
| GFP | 67 | 42 | 42 | 43 | 44 | 40 | 50 | 41 | 41 |
| <u>1G4-LY TCR</u> | <u>63</u> | <u>53</u> | <u>43</u> | <u>44</u> | <u>346</u> | <u>1446</u> | <u>451</u> | <u>132</u> | <u>352</u> |
| mESO $\alpha\beta$ TCR | 56 | 43 | 44 | 45 | <u>372</u> | <u>1259</u> | <u>415</u> | 108 | <u>323</u> |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 56 | 43 | 46 | 45 | <u>327</u> | <u>1236</u> | <u>412</u> | 136 | <u>625</u> |
| 患者 3 (希釈 1:5; S1D10) | | | | | | | | | |
| 非形質導入 (UT) | N/A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 | 39 | - |
| GFP | 63 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| <u>1G4-LY TCR</u> | <u>76</u> | <u>0</u> | <u>305</u> | <u>0</u> | <u>546</u> | <u>770</u> | <u>1020</u> | 332 | - |
| mESO $\alpha\beta$ TCR | 63 | 0 | 0 | 0 | 111 | 38 | <u>292</u> | 13 | - |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 60 | 0 | 0 | 0 | <u>413</u> | <u>540</u> | <u>819</u> | <u>283</u> | - |

【 0 1 5 6 】

10

20

30

40

【表 1 1 B】

表 11B

| 患者 4 (希釈 1:5; S1D6) | | | | | | | | | |
|---------------------------|------------|----|-----|-----|-----------------|-------------|--------------|-------------|----------------|
| | % Td 効率 | 培地 | 888 | 938 | COS-A2 gp100 | 624.38 | H1299- A2 | A375 | COS-A2- ESO |
| 非形質導入 (UT) | NA | 52 | 155 | 35 | 294 | 195 | 122 | 476 | 212 |
| GFP | 91% | 34 | 91 | 22 | 78 | 106 | 62 | 306 | 50 |
| 1G4-LY TCR | 75% | 86 | 113 | 54 | 313 | <u>2172</u> | <u>7187</u> | <u>1671</u> | <u>2394</u> |
| mESO $\alpha\beta$ TCR | 84% | 41 | 131 | 98 | 185 | <u>1946</u> | <u>5744</u> | <u>1064</u> | <u>1490</u> |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 85% | 52 | 130 | 110 | 164 | <u>2812</u> | <u>7163</u> | <u>1262</u> | <u>1676</u> |
| 患者 5 (希釈 1:5; S1D6) | | | | | | | | | |
| | % Td 効率 | 培地 | 23 | 12 | 88 | 9 | 8 | 107 | 64 |
| 非形質導入 (UT) | NA | 42 | 23 | 12 | 88 | 9 | 8 | 107 | 64 |
| GFP | 87% | 15 | 20 | 15 | 76 | 0 | 11 | 98 | 62 |
| 1G4-LY TCR | 25% | 63 | 16 | 10 | 20 | <u>1172</u> | <u>3156</u> | <u>918</u> | <u>430</u> |
| mESO $\alpha\beta$ TCR | 74% | 19 | 55 | 22 | 57 | <u>444</u> | <u>917</u> | <u>233</u> | <u>372</u> |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 74% | 15 | 32 | 20 | 24 | <u>810</u> | <u>2417</u> | <u>603</u> | <u>380</u> |

【0 1 5 7】

【表 1 2】

表 12

| | % td 効率 | SSX | T2 | 1 μ g/ml | 100 ng/ml | 10 ng/ml | 1 ng/ml | 0.1 ng/ml |
|------------------------|------------|-----|----|--------------|--------------|-------------|-------------|------------|
| 患者 1 (希釈 1:5; S1D7) | | | | | | | | |
| 非形質導入 (UT) | NA | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GFP | 90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1G4 TCR | 85 | 0 | 0 | <u>2452</u> | <u>2475</u> | <u>1525</u> | <u>851</u> | 99 |
| 1G4-LY TCR | 85 | 0 | 0 | <u>2173</u> | <u>1599</u> | <u>1087</u> | <u>677</u> | 0 |
| mESO $\alpha\beta$ TCR | 83 | 0 | 0 | <u>2825</u> | <u>2210</u> | <u>1904</u> | <u>1060</u> | <u>278</u> |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 83 | 0 | 0 | <u>3018</u> | <u>2403</u> | <u>2020</u> | <u>1212</u> | <u>522</u> |
| 患者 2 (希釈 1:5; S1D7) | | | | | | | | |
| 非形質導入 (UT) | NA | 22 | 20 | 52 | 24 | 21 | 33 | 53 |
| GFP | 67 | 17 | 38 | 33 | 39 | 31 | 21 | 20 |
| 1G4 TCR | 62 | 19 | 15 | <u>1,963</u> | <u>1,104</u> | <u>860</u> | <u>397</u> | 41 |
| 1G4-LY TCR | 63 | 15 | 19 | <u>2441</u> | <u>1280</u> | <u>879</u> | <u>291</u> | 40 |
| mESO $\alpha\beta$ TCR | 56 | 20 | 42 | <u>4645</u> | <u>1854</u> | <u>1529</u> | <u>535</u> | 92 |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 56 | 38 | 27 | <u>7091</u> | <u>2302</u> | <u>1336</u> | <u>348</u> | <u>262</u> |

【0 1 5 8】

10

20

30

40

50

mESO 又はmESO TCRベクターが形質導入された細胞は、IFN 分泌により測定されるように、NY-ESO-1⁺/HLA-A^{*}0201⁺標的腫瘍細胞株を特異的に認識したが、HLA-A^{*}0201⁻/NY-ESO-1⁺又はHLA-A^{*}0201⁺/NY-ESO-1⁻細胞株は特異的に認識しなかった（表11A及び11B）。mESO 又はmESO TCRベクターが形質導入された細胞は、IFN 分泌により測定されるように、NY-ESO-1ペプチドをパルスしたT2細胞を特異的に認識した（表12）。NY-ESO-1の特異的認識は、5の異なるドナー由来の細胞間で一致した。マウス抗NY-ESO-1 TCRが形質導入された細胞の機能性は、ヒト抗NY-ESO-1 TCRが形質導入された細胞のものに匹敵した。mESO TCRベクターが形質導入された細胞の機能性は、mESO TCRベクターが形質導入された細胞のものと比較してわずかに高かった。mESO 又はmESO TCRベクターのいずれかが形質導入されたPBLは、わずか1 ng/mLでパルスされたT2細胞を認識し、これは、両方のmTCRが比較的高親和性（avidity）の受容体であることを示す。mESO 又はmESO TCRベクターを発現するPBLと、いずれのペプチドでもパルスしていないコントロールT2細胞との共培養により、バックグラウンドレベルのIFN-⁻が産生された。mESO TCRが形質導入された患者1の細胞は、同一レベルのペプチドについて、mESO TCRが形質導入された細胞と比較した場合、より高いレベルのIFN-⁻分泌を有した。mESO TCRが形質導入された患者2の細胞は、ペプチド濃度1 μg/ml、100 ng/ml及び0.1 ng/mlでの同一レベルのペプチドについて、mESO TCRが形質導入された細胞と比較した場合、より高いレベルのIFN-⁻分泌を有した。

【0159】

実施例11

本実施例は、マウス抗NY-ESO-1 TCRをコードするベクターが形質導入された細胞が、細胞数の拡大（expansion）後、マウス抗NY-ESO-1 TCRの発現を維持することを実証する。

【0160】

実施例9に記載するように、2のドナー由来のPBLを刺激し、GFP、又は1G4、1G4-LY、mESO 若しくはmESO TCRをコードするベクターで形質導入したか、又は形質導入しなかった。Riddell et al., Science, 257: 238-241 (1992) 及びDudley et al., Cancer J. Sci. Am., 6: 69-77 (2000) に記載されるように、PBLの数を拡大した。通常、PBLの数は、可溶性OKT3、照射フィーダー細胞及び高用量IL-2を用いて、3 logsまで拡大した。拡大した数（一度の拡大（expanded once））の細胞によるマウス抗NY-ESO-1 TCRの発現をFACSにより2回測定した（10及び20日目）。結果を表13に要約する（拡大後、% VB13.1, mB+細胞）。

【0161】

【表13】

表13

| ドナー | 1 | | 2 | |
|------------|-----|-----|-----|-----|
| | D10 | D20 | D10 | D20 |
| UT | 0 | <1 | 0 | <1 |
| GFP | 88 | 87 | 42 | 70 |
| 1G4 TCR | 59 | 80 | 50 | 59 |
| 1G4-LY TCR | 76 | 88 | 37 | 60 |
| mESOαβ TCR | 82 | 76 | 62 | 46 |
| mESOβα TCR | 82 | 74 | 62 | 50 |

【0162】

表13に示すように、mESO 又はmESO TCRベクターが形質導入されたPBLは、細胞数の拡大後、マウス抗NY-ESO-1 TCRの発現を維持した。

【0163】

実施例12

10

20

30

40

50

本実施例は、マウス抗NY-ESO-1 TCRをコードするベクターが形質導入された細胞が、形質導入された細胞数の拡大後、機能性を維持することを実証する。

【 0 1 6 4 】

実施例9に記載するように、2のドナー由来のPBLを刺激し、GFP、又は1G4-LY、mESO若しくはmESO TCRをコードするベクターで形質導入したか、又は形質導入しなかった。実施例11に記載するように、形質導入された細胞の数を拡大した。形質導入された拡大されたPBLを、単独（培地）で培養するか、或いは下表14に列挙する様々な腫瘍細胞株の1つと共に培養するか、又はSSXペプチド、ペプチドなし（T2）若しくは下表15に列挙する様々な濃度のNY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ペプチドの1つをパルスしたT2細胞とともに共培養した。2回目の刺激から9日後にELISAによりIFN 分泌を測定した（S2D9）。結果を表14及び15に示す（IFN pg/ml；希釈1：10）。

【 0 1 6 5 】

【表 14】

| | % td 効率 | 培地 | <u>888</u> | <u>938</u> | <u>COS-A2-gp100</u> | <u>624.38</u> | <u>H1299-A2</u> | <u>A375</u> | <u>COAS-A2-ESO</u> | <u>1300</u> |
|---------------|---------|-----|------------|------------|---------------------|---------------|-----------------|-------------|--------------------|-------------|
| 患者 1 | | | | | | | | | | |
| 非形質導入 (UT) | N/A | 282 | 181 | 91 | 515 | 78 | 128 | 779 | - | 91 |
| GFP | 88 | 95 | 87 | 44 | 216 | 44 | 48 | 783 | - | 53 |
| 1G4-LY TCR | 76 | 208 | 184 | 105 | 260 | 8233 | 12848 | <u>6454</u> | - | <u>2786</u> |
| mESOαβ TCR | 82 | 129 | 183 | 111 | 121 | <u>8132</u> | <u>11976</u> | <u>6152</u> | - | <u>3035</u> |
| mESOβα TCR | 82 | 92 | 194 | 130 | 148 | 9104 | 11381 | 6226 | - | <u>2654</u> |
| 患者 2 | | | | | | | | | | |
| (UT) | N/A | 297 | 276 | 195 | 231 | 151 | 144 | 353 | - | 167 |
| GFP37 | 42 | 393 | 380 | 205 | 272 | 146 | 186 | <u>465</u> | - | <u>168</u> |
| 1G4-LY TCR | 37 | 102 | 174 | 53 | 133 | <u>4571</u> | <u>5984</u> | <u>2420</u> | - | <u>2066</u> |
| mESOαβ TCR | 62 | 125 | 397 | 362 | 170 | <u>7382</u> | <u>9590</u> | <u>4681</u> | - | <u>3439</u> |
| mESOβα TCR | 62 | 137 | 323 | 370 | 130 | <u>6345</u> | <u>8250</u> | <u>4236</u> | - | <u>3054</u> |

【 0 1 6 6 】

【表 15】

| | % <u>toT</u> 効率 | <u>SSX</u> | <u>T2</u> | <u>1μg/ml</u> | <u>100 ng/ml</u> | <u>10 ng/ml</u> | <u>1 ng/ml</u> | <u>0.1 ng/ml</u> |
|---------------------|-----------------|------------|-----------|------------------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|
| 患者 1 | | | | | | | | |
| 非形質導入 (UT) | NA | 365 | 479 | 123 | 113 | 168 | 168 | 231 |
| GFP | 88 | 0 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1G4 TCR | 59 | 179 | 275 | <u>26446</u> | <u>19424</u> | <u>13530</u> | <u>6988</u> | <u>1277</u> |
| 1G4-LY TCR | 76 | 185 | 217 | <u>30639</u> | <u>21553</u> | <u>16246</u> | <u>7261</u> | <u>1328</u> |
| mESO α β TCR | 82 | 511 | 516 | <u>26427</u> | <u>22062</u> | <u>16950</u> | <u>8601</u> | <u>1873</u> |
| mESO β α TCR | 82 | 399 | 384 | <u>27813</u> | <u>23052</u> | <u>16872</u> | <u>8076</u> | <u>2174</u> |
| 患者 2 | | | | | | | | |
| 非形質導入 (UT) | NA | 976 | 1281 | 886 | 616 | 680 | 782 | 764 |
| GFP | 42 | 660 | 912 | 505 | 697 | 726 | 591 | 763 |
| 1G4 TCR | 50 | 279 | 364 | <u>19505</u> | <u>12698</u> | <u>7350</u> | <u>3553</u> | <u>747</u> |
| 1G4-LY TCR | 37 | 150 | 110 | <u>19416</u> | <u>10632</u> | <u>6799</u> | <u>2495</u> | <u>662</u> |
| mESO α β TCR | 62 | 386 | 460 | <u>19960</u> | <u>13887</u> | <u>9970</u> | <u>4488</u> | <u>1025</u> |
| mESO β α TCR | 62 | 379 | 611 | <u>16434</u> | <u>12708</u> | <u>9646</u> | <u>5266</u> | <u>1177</u> |

【0 1 6 7】

拡大した形質導入細胞の機能性を、クロム遊離アッセイによっても評価した。拡大した形質導入細胞（エフェクター細胞）を、様々なエフェクター：ターゲット（E:T）細胞比にて、標的メラノーマ細胞624.38細胞（表16A）又はA375細胞（表16B）とともに共培養し、溶解した標的細胞のパーセンテージを測定した。結果を表16A及び16Bに示す（溶解した標的細胞のパーセンテージ）。

【0168】

【表16A】

表 16A

| E:T 比 | IG4-LY TCR | mESO α/β TCR | mESO β/α TCR | GFP |
|-------|------------|-------------------------|-------------------------|------|
| 40:1 | 71.0 | 69.0 | 68 | 20.0 |
| 13:1 | 59.0 | 64.0 | 62 | 13.0 |
| 4:1 | 54.0 | 73.0 | 46 | 23.0 |
| 1.5:1 | 42.0 | 40.0 | 39 | 2.0 |

10

【0169】

【表16B】

表 16B

| E:T 比 | IG4-LY TCR | mESO α/β | mESO β/α | GFP |
|-------|------------|---------------------|---------------------|------|
| 40:1 | 43.0 | 49.0 | 51 | 21.0 |
| 13:1 | 43.0 | 47.0 | 50 | 16.0 |
| 4:1 | 36.0 | 28.0 | 32 | 8.0 |
| 1.5:1 | 29.0 | 31.0 | 32 | 6.0 |

20

【0170】

表14、15、16A及び16Bに示すように、マウス抗NY-ESO-1 TCRをコードするベクターが形質導入された細胞は、形質導入された細胞数の拡大後、機能性を維持した。

【0171】

実施例13

本実施例は、潜在的臨床適用のために、mESO TCRを産生するためのパッケージング細胞クローニングの产生方法を実証する。

30

【0172】

mESO TCRベクターのためのDNAを用いて、潜在的臨床適用のために必要とされる条件下、レトロウイルスベクターパッケージング細胞クローニングを産生した。6のPG13プロデューサー細胞クローニング由来の上清を用いてPBLを形質導入した。抗マウスTCR-鎖抗体を用いた、形質導入されたPBLのFACS分析により、各クローニングが、ポジティブTCR形質導入を媒介するウイルスを産生したことが明らかとなった（表17）。腫瘍細胞の特異的認識を評価するために、各PG13プロデューサー細胞クローニング由来のmTCR改変（engineered）PBLを、HLA-A^{*}0201⁺及びHLA-A^{*}0201⁻メラノーマ及び肺腫瘍由来細胞株のパネルと共に培養した（表17）。ELISAによりIFN- γ を測定した。6のmTCR PG13プロデューサークローニングの比較により、クローニングC1が形質導入されたT細胞が、HLA-A^{*}0201⁺/NY-ESO-1⁺腫瘍細胞標的H1299-A2に応答して高レベルのIFN- γ を放出することが示され、最も高い形質導入効率が実証された（表17）。各クローニングにより、NY-ESO-1⁺/HLA-A^{*}0201⁻細胞株及びNY-ESO-1⁻/HLA-A^{*}0201⁺細胞株に応答して、バックグラウンドレベルのIFN- γ が放出されたことから、これらの反応は特異的であった（図2）。この分析に基づき、適正製造規範（GMP）レトロウイルス上清をその後產生するためのマスターセルバンクの製造のために、クローニングC1を選択した。

40

【0173】

【表17】

表17

| クローン | % mTCR β | IFN- γ pg/ml | | | | |
|------|----------------|---------------------|-----|---------|--------|------|
| | | 培地 | 888 | H1299A2 | 624.38 | A375 |
| UT | 4 | 122 | 1 | 0 | 0 | 146 |
| B2 | 30 | 39 | 46 | 2923 | 670 | 382 |
| C1 | 63 | 0 | 0 | 7529 | 942 | 257 |
| C12 | 42 | 10 | 0 | 3332 | 661 | 351 |
| D8 | 36 | 64 | 90 | 5773 | 675 | 439 |
| F2 | 47 | 31 | 38 | 5533 | 579 | 488 |
| H4 | 44 | 34 | 38 | 7185 | 531 | 459 |

【0174】

実施例14

本実施例は、実施例13のパッケージング細胞クローン由来のレトロウイルス上清を用いてmESO TCRが形質導入された細胞の形質導入効率を実証する。

【0175】

各NY-ESO-1 TCR（マウス又はmTCR、対ヒト又はhTCR（1G4-LY TCR））を比較するため、抗マウスTCR-Vb鎖及び抗Vb13.1抗体を用いた、パッケージング細胞クローン由来のレトロウイルス上清で形質導入されたPBLのFACS分析を、OKT3での1回の刺激後及び急速拡大プロトコル（rapid expansion protocol）（REP）を用いた2回目の大規模拡大の後に実施した（表18）。結果は、mTCR及びhTCRがともに、刺激後に同等の形質導入パーセンテージを有し、mTCRは、REP後に同じ又はそれ以上の形質導入レベルを有したことを見た（表18）。

【0176】

【表18】

表18

| | %TCR | | | |
|------------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|
| | ドナー H | | ドナー E | |
| | OKT3 での 1 回 の刺激後 | 細胞数を 2 倍に 拡大後 | OKT3 での 1 回 の刺激後 | 細胞数を 2 倍に 拡大後 |
| UT | 4 | 13 | 4 | 8 |
| 1G4-LY TCR | 52 | 56 | 48 | 44 |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 56 | 61 | 46 | 66 |

【0177】

実施例15

本実施例は、実施例13のパッケージング細胞クローン由来のレトロウイルス上清を用いてmESO TCRが形質導入された細胞の反応性を実証する。

【0178】

mTCR及びhTCR形質導入T細胞を、NY-ESO-1ペプチドをパルスしたT2細胞との共培養に供することにより、各TCRの認識を評価した。mTCR及びhTCRはともに、OKT3での1回の刺激後及びREP後、用量依存的に、抗原性ペプチドとの遭遇時にIFN- γ を特異的に分泌した（表19）。1回の刺激後、mTCR及びhTCRはともに、わずか0.1 ng/mLでパルスされたT2細胞を認識し、これは、両方のmTCRが比較的高親和性の受容体であることを示す。細胞数の拡大後、mTCRは、各濃度のペプチドにて、hTCRベクター形質導入T細胞と比較して、高レベルのIFN- γ を放出した（表19）。NY-ESO-1 mTCR又はNY-ESO-1 hTCRを発現するPBLと、いずれの

10

20

30

40

50

ペプチドでもパルスされていないコントロールT2細胞との共培養により、バックグラウンドレベルのIFN- γ が産生された。

【0179】

【表19】

表19

| ペプチド濃度 | ペプチドなし のT2細胞 | IFN- γ pg/ml ドナーH(OKT3での刺激後) | | | |
|---------------------------|-----------------|----------------------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| | | 0.1 ng/ μ l | 1 ng/ μ l | 10 ng/ μ l | 100 ng/ μ l |
| UT | 400 | 380 | 329 | 350 | 285 |
| GFP | 633 | 455 | 424 | 410 | 412 |
| 1G4-LY TCR | 1259 | 1400 | 1710 | 3016 | 3775 |
| mESO β α TCR | 1070 | 1316 | 1660 | 3091 | 3744 |

| ペプチド濃度 | ペプチドなし のT2細胞 | IFN- γ pg/ml ドナーH(細胞数の拡大後) | | | |
|---------------------------|-----------------|--------------------------------------|---------------|----------------|-----------------|
| | | 0.1 ng/ μ l | 1 ng/ μ l | 10 ng/ μ l | 100 ng/ μ l |
| UT | 34 | 47 | 57 | 22 | 28 |
| GFP | 34 | 47 | 57 | 22 | 28 |
| 1G4-LY TCR | 24 | 89 | 512 | 2974 | 4341 |
| mESO β α TCR | 174 | 229 | 1456 | 6633 | 10683 |

【0180】

腫瘍細胞の特異的認識を評価するため、mTCR改変PBLを、HLA-A * 0201 $^+$ 及びHLA-A * 0201 $^-$ メラノーマ及び肺腫瘍由来細胞株のパネルと共に培養した。mTCR改変PBL及びhTCRはともに、HLA-A * 0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^+$ 細胞株と共に培養した場合に、IFN- γ の特異的放出が観察されたが、HLA-A * 0201 $^-$ /NY-ESO-1 $^+$ 又はHLA-A * 0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^-$ 細胞株の場合には観察されなかつた(表20(代表的実験を示す))。

【0181】

10

20

30

【表20】

| | | 患者 H | | | 患者 E | | |
|--------------------|-------|----------|--------|------|------|-----|-----|
| | | H1299-A2 | 624.38 | 1300 | 1300 | 938 | 938 |
| 非形質導入(UT) | 86 | 93 | | 118 | | 0 | 0 |
| GFP | 83 | 81 | | 91 | | 0 | 0 |
| 1G4-LY TCR | 14549 | 6171 | | 1507 | | 0 | 0 |
| mESO β α TCR | 8877 | 4248 | | 1326 | | 0 | 0 |
| | | 患者 H | | | 患者 E | | |
| | | H1299-A2 | 624.38 | 1300 | 1300 | 938 | 938 |
| 非形質導入(UT) | 64 | 72 | | 81 | | 0 | 0 |
| GFP | 70 | 72 | | 63 | | 0 | 0 |
| 1G4-LY TCR | 7483 | 2149 | | 452 | | 0 | 0 |
| mESO β α TCR | 10646 | 3548 | | 986 | | 0 | 0 |

【0 1 8 2】

10

20

30

40

50

実施例16

本実施例は、実施例13のパッケージング細胞クローニング由来のレトロウイルス上清を用いてmESO TCRが形質導入された細胞によるメラノーマ細胞の特異的溶解を実証する。

【0183】

mTCR及びhTCRによるメラノーマ細胞株の特異的溶解も比較した。形質導入されたPBLがHLA-A^{*}0201⁺/NY-ESO-1⁺腫瘍細胞を溶解する能力を、CytoTox-Gloバイオルミネッセンスアッセイ (Promega, Madison, WI) を用いて測定した。このアッセイは、発光原 (luminogenic) ペプチド基質であるAAF-Glo基質を利用して、細胞膜の完全性を失った細胞から放出される死細胞プロテアーゼ活性を測定するものであり、これにより、サンプル中の死細胞数に比例して、「グロー・タイプ (glow-type)」の発光シグナルの生成がもたらされる。AF-Glo基質は、生細胞のインタクトな細胞膜を通過することができず、生細胞集団からは感知可能ないずれのシグナルも生成されない。これらのアッセイにおいて、96ウェルU底プレート中、TCR改変PBLをAIM-V培地にて、増加比率の標的細胞 (E:T) とともに37で4時間 (hr.) 共インキュベートした。培地中のバイオルミネッセンス放出により溶解を測定した：パーセント特異的溶解 = [特異的放出 - (自然 (spontaneous) エフェクター放出+自然標的放出)] / 全標的放出 - 自然標的放出 × 100% (4連サンプルの平均)。ネガティブ値として、細胞溶解はほとんど又は全く測定されない。

【0184】

表21に示すように、mTCR及びhTCR形質導入PBLはともに、メラノーマNY-ESO-1⁺/HLA-A^{*}0201⁺腫瘍細胞株624.38me1に対して類似の溶解活性を実証した。HLA-A^{*}0201⁻細胞株938 me1の溶解はほとんど又は全く存在せず、GFP形質導入PBLは、標的細胞のいずれに対しても全く反応性を示さなかった (表21)。

【0185】

【表21】

表21

| ポジティブターゲット: 624.38 細胞 | | | |
|-----------------------|------|------|------|
| エフェクター: ターゲット比 | 10:1 | 30:1 | 60:1 |
| GFP | -9 | -3 | -2 |
| 1G4-LY TCR | 29 | 59 | 58 |
| mESOβα TCR | 31 | 59 | 60 |
| ネガティブターゲット: 938 細胞 | | | |
| エフェクター: ターゲット比 | 10:1 | 30:1 | 60:1 |
| GFP | -19 | -22 | -34 |
| 1G4-LY TCR | -13 | -11 | -10 |
| mESOβα TCR | -13 | -10 | -10 |

【0186】

実施例17

本実施例は、実施例13のパッケージング細胞クローニング由来のレトロウイルス上清を用いてmESO TCR又はヒトTCRが形質導入された細胞の抗腫瘍活性を実証する。

【0187】

mTCR及びhTCRが形質導入されたCD4+Tリンパ球の抗腫瘍活性も検証した。NY-ESO-1 hTCR 及びNY-ESO-1 mTCR形質導入PBLを、CD4+磁気ビーズで濃縮し、次いで、HLA-A^{*}0201⁺及びHLA-A^{*}0201⁻メラノーマ及び肺腫瘍由来細胞株のパネルとともに16時間共培養した。mTCR及びhTCRが形質導入されたCD4+Tリンパ球はともに、HLA-A^{*}0201⁺/NY-ESO-1⁺細胞株と共に培養した場合にIFN-γの特異的放出を有したが、HLA-A^{*}0201⁻/NY-ESO-1⁺細胞株の場合は有さなかった (表22)。

【0188】

10

20

30

40

50

【表22】

表22

| | IFN- γ pg/ml (ドナー I) | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------|-----|
| | H1299A2 | 624.38 | 938 |
| 非形質導入 | 0 | 31 | 0 |
| 1G4-LY TCR | 22684 | 7020 | 0 |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 21376 | 3754 | 41 |
| IFN- γ pg/ml (ドナー J) | | | |
| | H1299A2 | 624.38 | 938 |
| 非形質導入 | 1158 | 0 | 0 |
| 1G4-LY TCR | 22786 | 2594 | 0 |
| mESO $\beta\alpha$ TCR | 22331 | 481 | 14 |

【0189】

実施例18

本実施例は、実施例13のパッケージング細胞クローニング由来のレトロウイルス上清を用いてmESO $\beta\alpha$ TCRが形質導入された細胞による、異なる腫瘍組織像(histologies)の特異的認識を実証する。

【0190】

様々な腫瘍組織像の特異的認識を評価するため、NY-ESO-1 mTCR形質導入PBLを、メラノーマ(A375)、非小細胞肺癌(H1299-A2)、神経芽細胞腫(SKN AS-A2)、乳癌(MDA-435S-A2)及び骨肉腫(Saos2)由来の異なるHLA-A * 0201 $^+$ /NY-ESO-1 $^+$ 細胞株と共に培養した。IFN- γ の特異的放出を観察した(表23)。

【0191】

【表23】

表23

| | IFN- γ pg/ml | |
|-------------|---------------------|------------------------|
| | 非形質導入 | mESO $\beta\alpha$ TCR |
| A375 | 0 | 5710 |
| H1299-A2 | 132 | 21222 |
| MDA-435S-A2 | 1181 | 3057 |
| SKN AS-A2 | 1417 | 5097 |
| Saos2 | 117 | 12092 |

【0192】

実施例19

本実施例は、mESO $\beta\alpha$ TCRが形質導入されたPBLによる、DAC処理腫瘍細胞の認識を実証する。

【0193】

増加濃度のDNA脱メチル化剤、5-アザ-2'-デオキシシチジン(デシタビン; DAC)は、肺癌細胞において、様々な癌精巣抗原の発現を誘導する(Rao et al., Ther. Tar. and Chem. Bio., 71: 4192-4204 (2011))。特定の理論又はメカニズムに拘束されるものではないが、DACは、癌細胞においてNY-ESO-1発現を潜在的に上方制御し得、これにより、TCRがNY-ESO-1を認識する能力が高められると考えられる。

【0194】

NY-ESO-1 mTCR形質導入又は非形質導入PBLを、異なる組織像の腫瘍標的細胞株(表24A~24Bに示す)であって表24A~24Bに示す濃度でDACに72時間暴露したものと16時間共培養

10

20

30

40

50

した。インターフェロン レベルを測定した。結果を表24A～24Bに示す。

【0195】

【表24A】

表 24A

| 前立腺癌 (pC3A2 細胞) | | |
|-----------------|---------------|------------------------|
| DAC 濃度 (mM/L) | IFN-γ (pg/ml) | |
| | 非形質導入 | クローン C1 由来の mESOβα TCR |
| 非処理 | 159 | 336 |
| 0.1 | 289 | 1566 |
| 0.5 | 188 | 1766 |
| 1.0 | 282 | 1912 |
| 10 | 361 | 1520 |

【0196】

【表24B】

表 24B

| 結腸直腸癌 (SW480 細胞) | | |
|------------------|---------------|------------------------|
| DAC 濃度 (mM/L) | IFN-γ (pg/ml) | |
| | 非形質導入 | クローン C1 由来の mESOβα TCR |
| 非処理 | 118 | 135 |
| 0.1 | 141 | 196 |
| 0.5 | 169 | 239 |
| 1.0 | 98 | 255 |
| 10 | 80 | 388 |

【0197】

表24A及び24Bに示すように、mESO TCRが形質導入されたPBLは、非処理標的細胞と比較して、それぞれDAC処理標的前立腺癌及び結腸直腸癌に対して、より高い反応性を実証した。

【0198】

実施例20

本実施例は、mESO TCR又はヒトTCRが形質導入されたPBLによる、アラニン置換NY-ESO-1ペプチドをパルスしたT2細胞の認識を実証する。

【0199】

非形質導入ヒトPBL、又はmTCR (クローンC1由来のmESO) 、hTCR (1G4-LY TCR) 若しくは緑色蛍光タンパク質 (GFP) が形質導入されたヒトPBLを、非処理T2細胞、又は表25A及び25Bに示すように異なる濃度のペプチドを予めパルスしたT2細胞とともに16時間共培養した。インターフェロン を測定した。結果を表25A及び25Bに示す。表25A及び25Bに示すように、mTCRが配列番号24を認識する一方、hTCRは認識しない。さらに、hTCRは配列番号27を認識するが、mTCRは認識しない。

【0200】

10

20

30

40

【表 25 A】

表 25A (ドナー K)

| | | IFN- γ (pg/ml) | | | |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------|-----|------------|----------------|
| | パルスされた ペプチド (ng/ μ L) | 非形質導入 | GFP | 1G4-LY TCR | mESO β a |
| 非処理 T2 細胞 | - | 943 | 358 | 641 | 443 |
| SLLMWITQC (配列番号 2) | 10 | 0 | 0 | 3759 | 5741 |
| SLLMWITQC (配列番号 2) | 1 | 0 | 0 | 678 | 2111 |
| MART | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MART | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SL <u>A</u> MWITQC (配列番号 23) | 10 | 0 | 0 | 3271 | 6287 |
| SL <u>A</u> MWITQC (配列番号 23) | 1 | 0 | 0 | 1785 | 2421 |
| SLL <u>A</u> WITQC (配列番号 24) | 10 | 0 | 0 | 0 | 2701 |
| SLL <u>A</u> WITQC (配列番号 24) | 1 | 0 | 0 | 0 | 3172 |
| SLLM <u>A</u> ITQC (配列番号 25) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SLLM <u>A</u> ITQC (配列番号 25) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SLLMW <u>A</u> TQC (配列番号 26) | 10 | 0 | 0 | 1114 | 1194 |
| SLLMW <u>A</u> TQC (配列番号 26) | 1 | 0 | 0 | 884 | 921 |
| SLLMW <u>A</u> QC (配列番号 27) | 10 | 0 | 0 | 5672 | 0 |
| SLLMW <u>A</u> QC (配列番号 27) | 1 | 0 | 0 | 457 | 0 |
| SLLMWIT <u>A</u> C (配列番号 28) | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SLLMWIT <u>A</u> C (配列番号 28) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

【0201】

【表 25B】

表 25B (ドナー L)

| | | IFN- γ (pg/ml) | | | |
|------------------------|------------------------------|-----------------------|-----|------------|----------------|
| | パルスされた ペプチド (ng/ μ L) | 非形質導入 | GFP | 1G4-LY TCR | mESO β a |
| 非処理 T2 細胞 | - | 162 | 126 | 131 | 188 |
| SLLMWITQC (配列番号 2) | 10 | 124 | 120 | 754 | 1168 |
| SLLMWITQC (配列番号 2) | 1 | 199 | 112 | 184 | 273 |
| MART | 10 | 230 | 136 | 123 | 102 |
| MART | 1 | 155 | 152 | 112 | 108 |
| SLAMWITQC (配列番号 23) | 10 | 145 | 168 | 1383 | 1541 |
| SLAMWITQC (配列番号 23) | 1 | 120 | 139 | 370 | 505 |
| SLLAWITQC (配列番号 24) | 10 | 128 | 121 | 185 | 616 |
| SLLAWITQC (配列番号 24) | 1 | 123 | 111 | 225 | 1000 |
| SLLMAITQC (配列番号 25) | 10 | 183 | 163 | 294 | 137 |
| SLLMAITQC (配列番号 25) | 1 | 119 | 112 | 148 | 214 |
| SLLMWATQC (配列番号 26) | 10 | 96 | 80 | 297 | 375 |
| SLLMWATQC (配列番号 26) | 1 | 74 | 70 | 220 | 280 |
| SLLMWIAQC (配列番号 27) | 10 | 78 | 95 | 1026 | 76 |
| SLLMWIAQC (配列番号 27) | 1 | 123 | 72 | 208 | 86 |
| SLLMWITAC (配列番号 28) | 10 | 78 | 83 | 97 | 76 |
| SLLMWITAC (配列番号 28) | 1 | 85 | 75 | 82 | 74 |

【0202】

刊行物、特許出願及び特許を含む、本明細書に引用した全ての参考文献は、それぞれの参考文献が参照によって組み込まれることが個々に且つ具体的に示され、その全体が本明細書に記載されているのと同程度まで、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0203】

本発明の説明に関して（特に、以下の特許請求の範囲に関して）、用語「a」及び「an

10

20

30

40

50

」及び「the」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書に特記がないか文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方をカバーすると解釈すべきである。用語「含む（comprising）」、「有する（having）」、「含む（including）」及び「含む（containing）」は、特記のない限り、オープンエンドの用語（すなわち、「～を含むがそれらに限定されない」を意味する）と解釈すべきである。本明細書中の値の範囲の記述は、本明細書に特記のない限り、その範囲内に入る各個別の値に個々に言及する省略方法として働くことのみを意図しており、各個別の値は、それが本明細書に個々に記述されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に特記がないか文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施できる。本明細書で提供される任意の及び全ての例又は例示的用語（例えば、「など（such as）」）の使用は、本発明をよりよく説明することのみを意図しており、特段特許請求されない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書の全ての用語は、特許請求されていない任意の要素を本発明の実施に必須のものとして示していると解釈すべきではない。

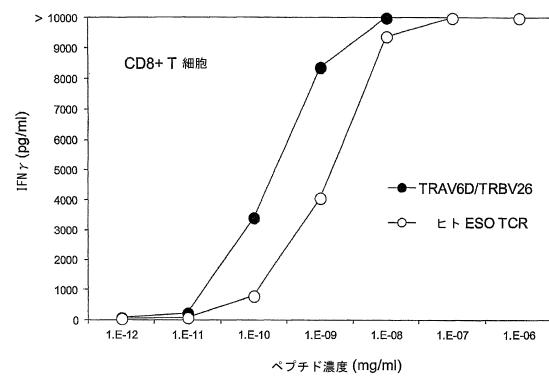
[0 2 0 4]

発明を実施するために発明者が知る最良の形態を含む、本発明の好ましい実施態様が本明細書に記載される。これらの好ましい実施態様のバリエーションは、上述の説明を読めば当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者がかかるバリエーションを適宜使用することを予期しており、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されたのとは異なる方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明は、適用法によって許容されるとおり、本明細書に添付した特許請求の範囲に記載される対象の全ての改変及び等価物を含む。さらに、その全ての可能なバリエーションでの上記要素の任意の組み合わせが、本明細書に特記がないか文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。

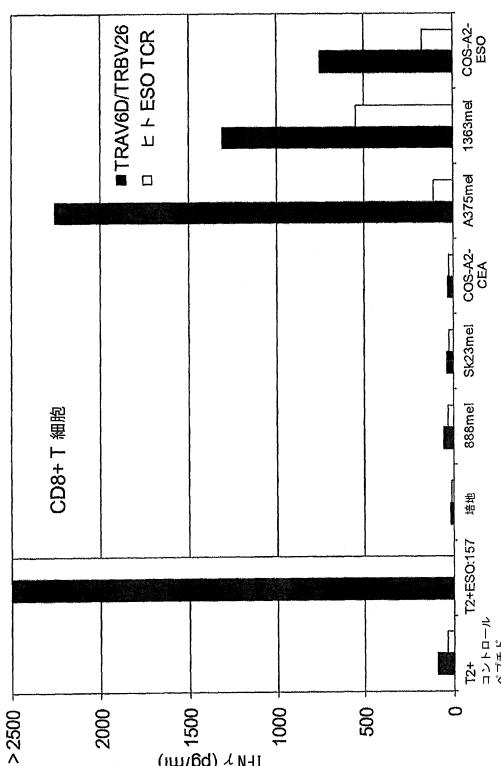
10

30

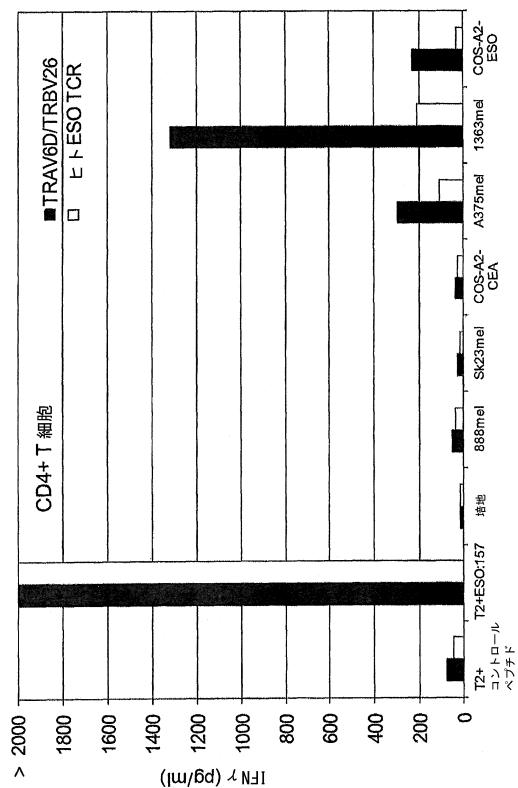
(1)



【 2 A 】



【図 2 B】



【配列表】

[0006378172000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 38/17 (2006.01) A 6 1 K 38/17
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子
 (74)代理人 100117743
 弁理士 村田 美由紀
 (74)代理人 100163658
 弁理士 小池 順造
 (74)代理人 100174296
 弁理士 當麻 博文
 (72)発明者 パークハースト、マリア、アール。
 アメリカ合衆国、メリーランド州 21043、エリコット シティ、グレース コート 493
 8
 (72)発明者 モーガン、リチャード、エイ。
 アメリカ合衆国、メリーランド州 21044、コロンビア、トーリング ベルズ コート 69
 22
 (72)発明者 ローゼンバーグ、スティーヴン、エイ。
 アメリカ合衆国、メリーランド州 20854、ポトマック、アイアン ゲート ロード 101
 04
 (72)発明者 ロザッティ、シャノン、フェイス
 アメリカ合衆国、メリーランド州 20852、ロックビル、アシュリー ドライヴ 11217

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 國際公開第2009/042570 (WO, A1)
 Robbins PF et al., Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1., J Clin Oncol., 2011年, 29(7), 917-924
 Wargo JA et al., Recognition of NY-ESO-1+ tumor cells by engineered lymphocytes is enhanced by improved vector design and epigenetic modulation of tumor antigen expression., Cancer Immunol Immunother., 2009年, 58(3), 383-394
 Schmitt TM et al., T cell receptor gene therapy for cancer., Hum Gene Ther., 2009年, 20(11), 1240-1248
 Cohen CJ et al., Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (T CR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability., Cancer Res., 2006年, 66(17), 8878-8886.
 Davis JL et al., Development of human anti-murine T-cell receptor antibodies in both responding and nonresponding patients enrolled in TCR gene therapy trials., Clin Cancer Res., 2010年, 16(23), 5852-5861
 Parkhurst MR et al., Characterization of genetically modified T-cell receptors that recognize the CEA:691-699 peptide in the context of HLA-A2.1 on human colorectal cancer cells., Clin Cancer Res., 2009年, 15(1), p.169-180
 HULSMAYER M. et al., J. Biol. Chem., vol.280, no.4(2005), p.2972-2980
 Biddison W.E. et al., J. Immunol., 171(2003), p.3064-3074
 PANKA D.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85(1988), p.3080-3084
 Parkhurst MR et al., Characterization of genetically modified T-cell receptors that re

cognize the CEA:691-699 peptide in the context of HLA-A2.1 on human colorectal cancer cells, Clin Cancer Res., 2009年, 15(1), 169-180.

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 K 1 4 / 7 2 5

C 0 7 K 1 9 / 0 0

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 / 1 2

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / R E G I S T R Y / W P I D S
(S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q