

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6666342号
(P6666342)

(45) 発行日 令和2年3月13日 (2020.3.13)

(24) 登録日 令和2年2月25日 (2020.2.25)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C O 7 K 14/725 (2006.01)
 C O 7 K 19/00 (2006.01)
 C O 7 K 16/28 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/12 Z N A
 C O 7 K 14/725
 C O 7 K 19/00
 C O 7 K 16/28
 C 1 2 N 5/10

請求項の数 30 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-525625 (P2017-525625)
 (86) (22) 出願日 平成27年11月12日 (2015.11.12)
 (65) 公表番号 特表2017-536821 (P2017-536821A)
 (43) 公表日 平成29年12月14日 (2017.12.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/060282
 (87) 国際公開番号 W02016/077525
 (87) 国際公開日 平成28年5月19日 (2016.5.19)
 審査請求日 平成30年11月8日 (2018.11.8)
 (31) 優先権主張番号 62/079,713
 (32) 優先日 平成26年11月14日 (2014.11.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 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 ベトヘスタ エムエスシ
 ー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 トランスフ
 ザー
 (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 光宜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗サイログロブリンT細胞レセプター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト・サイログロブリン (T G) に対する抗原特異性を有し、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む 鎖相補性決定領域 (C D R) 1 と、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む 鎖 C D R 2 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む 鎖 C D R 3 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む 鎖 C D R 1 と、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む 鎖 C D R 2 と、及び配列番号 8 のアミノ酸配列を含む 鎖 C D R 3 とを含む、単離又は精製された T 細胞受容体 (T C R)。

【請求項 2】

前記 T C R が配列番号 2 の T G₄₇₀₋₄₇₈ アミノ酸配列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 T C R。

10

【請求項 3】

配列番号 9 のアミノ酸配列を含む 鎖可変領域、及び配列番号 10 のアミノ酸配列を含む 鎖可変領域を含む、請求項 1 又は 2 に記載の単離又は精製された T C R。

【請求項 4】

配列番号 13 のアミノ酸配列を含む 鎖定常領域、及び配列番号 14 のアミノ酸配列を含む 鎖定常領域をさらに含む、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 T C R。

【請求項 5】

配列番号 11 のアミノ酸配列を含む 鎖、及び配列番号 12 のアミノ酸配列を含む 鎖

20

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離又は精製された T C R。

【請求項 6】

自己切断型ウイルスリンカーペプチドを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離又は精製された T C R。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R の機能的部分を含む単離又は精製されたポリペプチドであって、前記機能的部分が、配列番号 3 ~ 8 のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R の機能的部分を含む単離又は精製されたポリペプチドであって、前記機能的部分が、配列番号 9 及び 1 0 のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R の機能的部分を含む単離又は精製されたポリペプチドであって、前記機能的部分が、配列番号 1 1 及び 1 2 のアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 1 0】

自己切断型ウイルスリンカーペプチドを含む、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の単離又は精製されたポリペプチド。

【請求項 1 1】

20

配列番号 3 ~ 5 のアミノ酸配列を含む第 1 ポリペプチド鎖、及び配列番号 6 ~ 8 のアミノ酸配列を含む第 2 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 1 2】

配列番号 9 のアミノ酸配列を含む第 1 ポリペプチド鎖、及び配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む第 2 ポリペプチド鎖を含む、請求項 1 1 に記載の単離又は精製されたタンパク質。

【請求項 1 3】

配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む第 1 ポリペプチド鎖、及び配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む第 2 ポリペプチド鎖を含む、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の単離又は精製されたタンパク質。

30

【請求項 1 4】

前記タンパク質が融合タンパク質である、請求項 1 1 ~ 1 3 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 1 5】

前記タンパク質が組換え抗体である、請求項 1 1 ~ 1 4 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 1 6】

自己切断型ウイルスリンカーペプチドを含む、請求項 1 1 ~ 1 5 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 1 7】

40

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 1 1 ~ 1 6 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。

【請求項 1 8】

配列番号 2 2 ~ 2 7 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 7 に記載の核酸。

【請求項 1 9】

配列番号 1 5 及び 1 6 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 7 又は 1 8 に記載の核酸。

【請求項 2 0】

配列番号 1 9 及び 2 0 のヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の核酸。

50

【請求項 2 1】

配列番号 1 7 及び 1 8 のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 2 2】

請求項 1 7 ~ 2 1 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。

【請求項 2 3】

配列番号 2 1 のヌクレオチド配列を含む、請求項 2 2 に記載の組換え発現ベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 又は 2 3 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。

【請求項 2 5】

前記細胞がヒトである、請求項 2 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 6】

請求項 2 4 又は 2 5 に記載の少なくとも 1 つの宿主細胞を含む、細胞集団。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R の機能的部分に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分であって、前記機能的部分が、配列番号 3 ~ 8 のアミノ酸配列を含む、抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 2 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 1 7 ~ 2 1 に記載の核酸、請求項 2 2 若しくは 2 3 に記載の組換え発現ベクター、請求項 2 4 若しくは 2 5 に記載の宿主細胞、請求項 2 6 に記載の細胞集団、又は請求項 2 7 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分と、医薬的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の T C R、請求項 7 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド、請求項 1 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載のタンパク質、請求項 1 7 ~ 2 1 に記載の核酸、請求項 2 2 若しくは 2 3 に記載の組換え発現ベクター、請求項 2 4 若しくは 2 5 に記載の宿主細胞、請求項 2 6 に記載の細胞集団、又は請求項 2 7 に記載の抗体若しくはその抗原結合部分を含む、哺乳動物におけるがんを検出、治療又は予防するための医薬組成物。

【請求項 3 0】

前記がんが甲状腺癌又は神経芽細胞腫である、請求項 2 9 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願のクロス・リファレンス

本願は、2014年11月14日に出願された米国仮特許出願第62/079,713号について優先権を主張し、その全体が本明細書に援用される。

【0002】

電子的に提出された物件の参照による援用

本明細書と同時に提出され、コンピューターで読み取り可能な以下のヌクレオチド/アミノ酸配列リストは、その全体が本明細書に援用される：2015年11月1日付けの「722275_ST25.txt」という名前の68,835バイトのASCII (テキスト) ファイル 1 件

【背景技術】

【0003】

米国における甲状腺癌の発生率は、過去40年間にわたって増加している (Davies et al., JAMA Otolaryngol Head Neck Surg., 140(4):317-322(2014))。甲状腺摘除術やアジュバント放射性ヨウ素 (RAI) 療法などの治療法の進歩にもかかわらず、甲状腺癌、特に進行性又は転移性の甲状腺癌の予後は不良である場合がある。したがって、がん、特に甲状腺癌のためのさらなる治療について満たされていない必要性が存在する。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【0004】

本発明の一実施形態は、ヒト・サイログロブリン（TG）に対して抗原特異性を有し、配列番号3のアミノ酸配列を含むアルファ（ α ）鎖の相補性決定領域（CDR）1と、配列番号4のアミノ酸配列を含む鎖のCDR2と、配列番号5のアミノ酸配列を含む鎖のCDR3と、配列番号6のアミノ酸配列を含むベータ（ β ）鎖のCDR1と、配列番号7のアミノ酸配列を含む鎖のCDR2と、及び配列番号8のアミノ酸配列を含む鎖のCDR3とを含む、単離又は精製されたT細胞受容体（TCR）を提供する。

【0005】

本発明の一実施形態は、ヒトTGに対して抗原特異性を有し、そして配列番号44のアミノ酸配列を含む鎖のCDR1と、配列番号45のアミノ酸配列を含む鎖のCDR2と、配列番号46のアミノ酸配列を含む鎖のCDR3と、配列番号47のアミノ酸配列を含む鎖のCDR1と、配列番号48のアミノ酸配列を含む鎖のCDR2と、及び配列番号49のアミノ酸配列を含む鎖のCDR3とを含む、単離又は精製されたT細胞受容体（TCR）を提供する。

【0006】

本発明はさらに、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を提供する。本発明によりさらに提供されるのは、抗体又はその抗原結合部分及びTCR（その機能的部分及びその機能的変異体を含む）に関連する医薬組成物である。

【0007】

本発明によって、哺乳動物におけるがんの存在を検出する方法及び哺乳動物におけるがんを治療又は予防する方法が、さらに提供される。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1Aは、2個の正常甲状腺試料（正常甲状腺1及び2）、1個の原発性甲状腺癌試料及び3個のリンパ節転移試料（リンパ節転移1、2及び3）における、TG（黒棒）、フォークヘッドボックスE1（FOX E1）（横縞棒）、ヨードチロシン脱ヨウ素酵素（IYD）（斜線のバー）、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）（箱入り棒）、及びペアード・ボックス8（PAX8）（縦縞棒）のRNAコピー数を、 1×10^5 （ 10^5 ）コピーのアクチンRNAに対する相対値で示すグラフである。

【図2】図1Bは、様々な正常組織試料で測定した、 1×10^4 コピーのアクチンRNAに対する、TGの相対的なRNAコピー数を示すグラフである。

【図3】図2は、TGをコードするアデノウイルスでワクチン処理したマウスに由来する脾細胞から分泌されたマウス・インターフェロン（IFN）-（pg/ml）の量を示すグラフであり、ペプチド2（NLFGGKFLV（配列番号2））又はペプチド5（ILQRRFLAV（配列番号32））で、インビトロで2回刺激すると共に、以下と共培養したときのものである（左から順番に）：MART-1対照ペプチドでパルスした標的T2細胞（T2/MART）（陰影のない棒）、TG類縁ペプチド（ペプチド2又は5）でパルスした標的T2細胞（灰色棒）、対照緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するようにトランスフェクトしたCos7-HLA-A*0201細胞（CosA2/GFP）（後向斜線棒）、TGを発現するようにトランスフェクトしたCos7-HLA-A*0201細胞（CosA2/TG）（前向斜線棒）、悪性上皮性腫瘍細胞株XTC（縦縞棒）又はHLA-A0201を発現するように形質導入したXTC細胞（XTC/A2）（横縞棒）。

【図4】図3Aは、種々の濃度（nM）のMART-1ペプチド（黒丸）又はTGペプチドNLFGGKFLV（配列番号2）（白三角）でパルスした標的T2細胞とエフェクター非形質導入（UN）PBLとの共培養、種々の濃度（nM）のMART-1ペプチド（白四角）又はTGペプチドNLFGGKFLV（配列番号2）（菱形）でパルスした標的T2細胞と抗MART-1 TCRを誘導したエフェクターPBLとの共培養、種々の濃度（nM）のMART-1ペプチド（黒三角）又はTGペプチドNLFGGKFLV（配列番号2）（白丸）でパル

10

20

30

40

50

スした標的T2細胞とネズミ(murine)抗TG-TCR(mTG-TCR)(配列番号11及び12)を形質導入したエフェクターPBLとの共培養において測定したIFN-量(pg/ml)を示すグラフである。

【図5】図3Bは、CosA2/GFP細胞(小チェック棒)、CosA2/MART細胞(大チェック棒)、CosA2/TG細胞(横縞棒)、624Mel細胞(縦縞棒)、938Mel細胞(MART-1を発現していない悪性黒色腫由来細胞株)(前向斜線棒)、XTC細胞(後向斜線棒)又はXTC/A2細胞(箱入棒)の対象細胞を、誘導されていないPBL(UT)又は抗MART-1 TCR(MART)若しくはネズミ抗TG-TCR(mTG-TCR)(配列番号11及び12)で形質導入したPBLのエフェクター細胞と共培養したときに測定されたIFN-の量(pg/ml)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

本発明の一実施形態は、ヒトTGに対する抗原特異性を有する、単離又は精製されたTCRを提供する。本発明のTCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は、任意のヒトTGタンパク質、ポリペプチド又はペプチドに対して抗原特異性を有してもよい。本発明の一実施形態では、該TCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は配列番号1のアミノ酸配列を含む又はそれからなるヒトTGタンパク質に対して抗原特異性を有する。本発明の一実施形態において、該TCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は、NLFGGKFLV(配列番号2)のアミノ酸配列を含む若しくはそれからなるヒトTG₄₇₀₋₄₇₈ペプチド、又はLVLEIFTLL(配列番号58)のアミノ酸配列を含む若しくはそれからなるヒトTG₃₋₁₁ペプチドに対して、抗原特異性を有する。本発明の好ましい実施形態では、該TCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は、NLFGGKFLV(配列番号2)のアミノ酸配列を含む又はそれからなるヒトTG₄₇₀₋₄₇₈ペプチドに対する抗原特異性を有する。

20

【0010】

本発明の一実施形態では、本発明のTCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は、主要組織適合複合体(MHC)クラスI依存性様式で、ヒトTGを認識することができる。本明細書で使用される「MHCクラスI依存性様式」は、該TCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)がMHCクラスI分子との関係の中で、TGへの結合の際に免疫応答を引き起こすことを意味する。該MHCクラスI分子は、当該分野で公知の任意のMHCクラスI分子、例えば、HLA-A分子であり得る。本発明の好ましい実施形態では、該MHCクラスI分子はHLA-A2分子である。

30

【0011】

本発明のTCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は、養子細胞移植のために使用される細胞によって発現される場合を含む、多くの利点を提供する。TGは、分化した甲状腺癌、正常な甲状腺及び甲状腺癌患者で既に除去されたかも知れない重要でない組織においてのみ高いレベルの発現を示す。TGは神経芽細胞腫でも発現している。特定の理論又は機構に縛られることなく、本発明のTCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は、正常な非がん性の非甲状腺細胞の破壊を最小化又は排除し、それによって毒性を低減、例えば、最小化又は排除しつつ、有利にがん細胞を破壊すると考えられる。さらに、本発明のTCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は、例えば、化学療法、外科手術又は放射線治療などの他のタイプの治療に応答しないTG陽性がんを有利に、成功裏に、治療又は予防してもよい。加えて、本発明のTCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)は、TGへの高度に貪欲な認識を提供し、これは有利には、未操作の腫瘍細胞(例えば、インターフェロン(IFN)-で処置されていない、TG及びHLA-A2の一方又は両方をコードするベクターでトランスフェクトされていない、TG₄₇₀₋₄₇₈ペプチドでパルスされていない、又はそれらの組み合わせで処理されていない腫瘍細胞)を認識する能力を提供してもよい。

40

50

【0012】

本明細書中で使用される場合、「抗原特異性 (antigenic specificity)」という文言は、該TCR (その機能的部分及びその機能的変異体を含む) が、高い結合性をもってTGに特異的に結合すること及び免疫学的に認識し得ることを意味する。例えば、TCR (又はその機能的部分若しくはその機能的変異体を含む) を発現しているT細胞を、(a) 低濃度のTGペプチド (例えば、約0.05 ng/mLから約5 ng/mLで、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、又は上記の任意の2つの値により規定される範囲) でパルスした抗原陰性HLA-A2⁺ 標的細胞、又は(b) 標的細胞がTGを発現するようにTGをコードするヌクレオチド配列を導入したHLA-A2⁺ 標的細胞と共培養したときに、該T細胞が、少なくとも約200 pg/mL以上 (例えば、200 pg/mL以上、300 pg/mL以上、400 pg/mL以上、500 pg/mL以上、600 pg/mL以上、700 pg/mL以上、1,000 pg/mL以上、5,000 pg/mL以上、7,000 pg/mL以上、10,000 pg/mL以上、20,000 pg/mL以上、又は上記の任意の2つの値により規定される範囲) のIFN- γ を分泌している場合、TCR (その機能的部分及びその機能的変異体を含む) は、TGに対する「抗原特異性」を有すると考えられる。本発明のTCR (その機能的部分及びその機能的変異体を含む) を発現している細胞はまた、より高濃度のTGペプチドでパルスした抗原陰性HLA-A2⁺ 標的細胞との共培養の際にIFN- γ を分泌してもよい。

10

【0013】

代替的に又は追加的に、TCR (又はその機能的部分若しくはその機能的変異体を含む) を発現しているT細胞を、(a) 低濃度のTGペプチドでパルスした抗原陰性HLA-A2⁺ 標的細胞、又は(b) 標的細胞がTGを発現するようにTGをコードするヌクレオチド配列を導入したHLA-A2⁺ 標的細胞と共培養したときに、陰性対照で発現するIFN- γ の量と比較して、該T細胞が少なくとも2倍のIFN- γ を分泌する場合、TCR (機能的部分及びその機能的変異体を含む) は、TGに対して「抗原特異性」を有すると考えられる。その陰性対照は、例えば、(i) TCR (又はその機能的部分若しくはその機能的変異体) を発現しているT細胞であって、(a) 同じ濃度の無関係のペプチド (例えば、TGペプチドとは異なる配列を有するいくつかの他のペプチド) でパルスした抗原陰性HLA-A2⁺ 標的細胞若しくは(b) 標的細胞が無関係のペプチドを発現するように、無関係のペプチドをコードするヌクレオチド配列を導入したHLA-A2⁺ 標的細胞と共培養したもの、又は(ii) 非形質導入T細胞 (例えば、TCR、又は機能的部分若しくはその機能的変異体が発現しないPBMCに由来する) を、(a) 同じ濃度のTGペプチドでパルスした抗原陰性HLA-A2⁺ 標的細胞若しくは(b) 標的細胞がTGを発現するように、TGをコードするヌクレオチド配列を導入したHLA-A2⁺ 標的細胞と共培養したものであってもよい。IFN- γ 分泌は、当該分野で公知の方法、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 法によって測定されてもよい。

20

30

【0014】

代替的に又は追加的に、(a) 低濃度のTGペプチドでパルスした抗原陰性HLA-A2⁺ 標的細胞、又は(b) 標的細胞がTGを発現するように、TGをコードするヌクレオチド配列を導入したHLA-A2⁺ 標的細胞と共培養することにより、IFN- γ を分泌する陰性対照T細胞の数と比較して、IFN- γ を分泌するTCR (又はその機能的部分若しくはその機能的変異体) を発現しているT細胞の数が少なくとも2倍であるとき、TCR (その機能的部分及びその機能的変異体を含む) は、TGに対して「抗原特異性」を有すると考えられる。ペプチドの濃度及び陰性対照は、本発明の他の態様に関しても、本明細書で記載される通りであってもよい。IFN- γ を分泌する細胞の数は、当該分野で公知の方法、例えば、ELISPOT法によって測定されてもよい。

40

【0015】

本発明は、2つのポリペプチド (すなわち、ポリペプチド鎖)、例えば、TCRのアルファ () 鎖、TCRのベータ () 鎖、TCRのガンマ () 鎖、TCRのデルタ () 鎖、

50

鎖、又はそれら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TGに対して抗原特異性を有する限り、任意のアミノ酸配列を含むことができる。

【0016】

本発明の一実施形態では、該TCRは2つのポリペプチド鎖を含み、その各々は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。本発明の一実施形態では、該TCRは、配列番号3又は44(鎖のCDR1)のアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号4又は45(鎖のCDR2)のアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号5又は46(鎖のCDR3)のアミノ酸配列を含むCDR3とを含む第1のポリペプチド鎖、及び配列番号6又は47(鎖のCDR1)のアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号7又は48(鎖のCDR2)のアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号8又は49(鎖のCDR3)のアミノ酸配列を含むCDR3とを含む第2のポリペプチド鎖を含む。これに関して、本発明のTCRは、配列番号3~8又は配列番号44~49からなる群から選択される任意の1以上のアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、該TCRは配列番号3~5、配列番号6~8、配列番号44~46又は配列番号47~49のアミノ酸配列を含む。特に好ましい実施形態では、該TCRは配列番号3~8の全て又は配列番号44~49の全てのアミノ酸配列を含む。

10

【0017】

本発明の一実施形態では、該TCRは、上記のCDRセットを含むTCRの可変領域のアミノ酸配列を含む。これに関して、該TCRは、配列番号9若しくは50(鎖の可変領域)；配列番号10若しくは51(鎖の可変領域)；配列番号9及び10の両方；又は配列番号50及び51の両方のアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、本発明のTCRは配列番号9及び10の両方、又は配列番号50及び51の両方のアミノ酸配列を含む。

20

【0018】

本発明の一実施形態では、該TCRはTCRの定常領域のアミノ酸配列をさらに含む。これに関して、該TCRは、配列番号13若しくは52(鎖の定常領域)、配列番号14若しくは53(鎖の定常領域)、配列番号13及び14の両方、又は配列番号52及び53の両方のアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、本発明のTCRは配列番号13及び14の両方、又は配列番号52及び53の両方のアミノ酸配列を含む。

30

【0019】

本発明の一実施形態では、本発明のTCRは可変領域と定常領域との組み合わせを含んでもよい。これに関して、該TCRは、配列番号9(鎖の可変領域)及び配列番号13(鎖の定常領域)の両方のアミノ酸配列を含む鎖；配列番号10(鎖の可変領域)及び配列番号14(鎖の定常領域)の両方のアミノ酸配列を含む鎖；配列番号50(鎖の可変領域)及び配列番号52(鎖の定常領域)の両方のアミノ酸配列を含む鎖；配列番号51(鎖の可変領域)及び配列番号53(鎖の定常領域)の両方のアミノ酸配列を含む鎖；配列番号9、10、13及び14の全てのアミノ酸配列；又は配列番号50~53の全てのアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、本発明のTCRは配列番号9、10、13及び14の全て、又は配列番号50~53の全てのアミノ酸配列を含む。

40

【0020】

本発明の一実施形態では、本発明のTCRは本明細書中に記載される任意のCDR領域と定常領域との組み合わせを含んでもよい。これに関して、該TCRは、配列番号3~5及び13の全てのアミノ酸配列を含む鎖；配列番号6~8及び14の全てのアミノ酸配列を含む鎖；又は配列番号3~8及び13~14の全てのアミノ酸配列を含むことができる。本発明の一実施形態では、該TCRは、配列番号44~46及び52の全てのアミノ酸配列を含む鎖；配列番号47~49及び53の全てのアミノ酸配列を含む鎖；又は配列番号44~49及び52~53の全てのアミノ酸配列を含むことができる。

【0021】

50

本発明の一実施形態では、本発明のTCRはTCRの鎖及びTCRの鎖を含むことができる。本発明のTCRの鎖及び鎖の各々は独立して任意のアミノ酸配列を含むことができる。これに関して、本発明のTCRの鎖は配列番号11又は54のアミノ酸配列を含むことができる。この型の鎖は、TCRの任意の鎖と対になることができる。これに関して、本発明のTCRの鎖は配列番号12又は55のアミノ酸配列を含むことができる。従って、本発明のTCRは、配列番号11、配列番号12、配列番号54、配列番号55、配列番号11及び12の両方、又は配列番号54及び55の両方のアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、本発明のTCRは配列番号11及び12の両方、又は配列番号54及び55の両方のアミノ酸配列を含む。

【0022】

本発明の一実施形態では、該TCRは、ネズミTCR又はヒトTCRである。本明細書中で使用される場合、「ネズミ(murine)」又は「ヒト(human)」という用語は、本明細書中に記載される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/又は鎖)に言及する場合、それぞれ、マウス又はヒト由来のTCR(又はその構成要素)(すなわち、それぞれ、マウスT細胞、又はヒトT細胞に由来するか、又はかつてそれらによって発現されたTCR(又はその構成要素))を意味する。本発明の一実施形態では、(i)配列番号3~8の全て;(ii)配列番号9及び10;(iii)配列番号11及び12;(iv)配列番号3~8及び13~14の全て;又は(v)配列番号9、10、13及び14の全てを含むTCRは、ネズミTCRである。本発明の一実施形態では、(i)配列番号44~49の全て;(ii)配列番号50及び51;(iii)配列番号54及び55;(iv)配列番号44~49及び52~53の全て;又は(v)配列番号50~53の全てを含むTCRは、ヒトTCRである。本発明の一実施形態では、該ネズミTCR(その機能的部分及びその機能的変異体を含む)はNLFGGKFLV(配列番号2)のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるヒトTG₄₇₀₋₄₇₈ペプチドに対する抗原特異性を有し、該ヒトTCRは、LVLEIFTL(配列番号58)のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなるヒトTG₃₋₁₁ペプチドに対する抗原特異性を有する。

【0023】

本明細書に記載の本発明のTCRの機能的変異体は、本発明の範囲に含まれる。本明細書中で使用する場合、「機能的変異体(functional variant)」という用語は、親(parent)TCR、ポリペプチド又はタンパク質と実質的又は有意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を指し、そしてその機能的変異体は、変異体のTCR、ポリペプチド又はタンパク質の生物学的活性を保持している。機能的変異体は、例えば、親TCRが抗原特異性を有するか、親TCR、ポリペプチド又はタンパク質と同様に、親ポリペプチド又はタンパク質が特異的に結合するTGに対して、類似する程度に、同じ程度に、又はより高い程度において、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)の変異体を含む。親TCR、ポリペプチド又はタンパク質に準拠して、機能的変異体は、例えば、アミノ酸配列において少なくとも約30%、50%、75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上、親TCR、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列と一致している。

【0024】

該機能的変異体は、例えば、少なくとも1つの保存的(conservative)アミノ酸置換を有する、親TCR、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列を含むことができる。保存的アミノ酸置換は当該技術分野で公知であり、そして特定の物理的及び/又は化学的性質を有する1つのアミノ酸が、同じ化学的又は物理的性質を有する別のアミノ酸と交換されるアミノ酸置換を含む。例えば、該保存的アミノ酸置換は、酸性アミノ酸が別の酸性アミノ酸(例えば、Asp又はGlu)に置換し、非極性側鎖を有するアミノ酸が別の非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Valなど)に置換し、塩基性アミノ酸が他の塩基性アミノ酸

10

20

30

40

50

(Lys、Argなど)に置換し、極性側鎖を有するアミノ酸が別の極性側鎖を有するアミノ酸が(例えば、Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyrなど)に置換したものであり得る。

【0025】

代替的に又は追加的に、該機能的変異体は、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を有する親TCR、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列を含むことができる。この場合、該非保存的アミノ酸置換は、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、該非保存的アミノ酸置換は、機能的変異体の生物学的活性が親TCR、ポリペプチド又はタンパク質と比較して上昇するように、機能的変異体の生物学的活性を増強するものである。

10

【0026】

該TCR(又はその機能的変異体)、ポリペプチド又はタンパク質は、該TCR(又はその機能的変異体)、ポリペプチド又はタンパク質の他の構成要素、例えば、他のアミノ酸が、該TCR(又はその機能的変異体)、ポリペプチド又はタンパク質の生物学的活性を実質的に変化させないように、本質的に特定のアミノ酸配列、又は本明細書に記載の配列からなることができる。これに関して、本発明のTCR(又はその機能的変異体)、ポリペプチド又はタンパク質は、例えば、本質的には、配列番号11、配列番号12、配列番号54、配列番号55、配列番号11及び12の両方、又は配列番号54及び55の両方のアミノ酸配列からなる。また、例えば、本発明のTCR(その機能的変異体を含む)、ポリペプチド又はタンパク質は、本質的に、配列番号9、配列番号10、配列番号50、配列番号51、配列番号9及び10の両方、又は配列番号50及び51の両方のアミノ酸配列(複数可)からなる。さらに、本発明のTCR(その機能的変異体を含む)、ポリペプチド又はタンパク質は、本質的には、配列番号3若しくは44(鎖のCDR1)、配列番号4若しくは45(鎖のCDR2)、配列番号5若しくは46(鎖のCDR3)、配列番号6若しくは47(鎖のCDR1)、配列番号7若しくは48(鎖のCDR2)、配列番号8若しくは49(鎖のCDR3)、又はそれらの任意の組み合わせ、例えば、配列番号3~5; 6~8; 3~8; 44~46; 47~49; 44~49のアミノ酸配列からなることができる。

20

【0027】

また、本発明によって、本明細書に記載の任意のTCR(又はその機能的変異体)の機能的部分を含むポリペプチドが提供される。本明細書中で使用される場合、用語「ポリペプチド(polypeptide)」は、オリゴペプチドを含み、1以上のペプチド結合によって連結されたアミノ酸の一本鎖を指す。

30

【0028】

本発明のポリペプチドに関して、該機能的部分がTGに特異的に結合する場合、該機能的部分は、該TCR(又はその機能的変異体)の連続するアミノ酸を含む任意の部分であり得る。用語「機能的部分(functional portion)」は、TCR(又はその機能的変異体)に関して使用される場合、本発明のTCR(又はその機能的変異体)の任意の部分又は断片を指し、そしてその部分又は断片は、その一部(その親TCR又はその親機能的変異体)である該TCR(又はその機能的変異体)の生物学的活性を保持している。機能的部分は、例えば、TGに特異的に結合する能力(例えば、HLA-A2依存的な様式で)又はがんを検出、治療若しくは予防する能力を、該親TCR(又はその機能的変異体)と、類似する程度、同じ程度、又はより高い程度に、維持しているTCR(又はその機能的変異体)の機能的部分を含む。該親TCR(又はその機能的変異体)に準拠して、該機能的部分は、例えば、該親TCR(又はその機能的変異体)の、約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%、又はそれ以上を含むことができる。

40

【0029】

該機能的部分は、該親TCR又はその機能的変異体のアミノ酸配列に見られない追加のアミノ酸を、該部分のアミノ末端若しくはカルボキシ末端に、又はその両方の末端に含む

50

ことができる。望ましくは、該追加のアミノ酸が、該機能的部分の生物学的機能、例えば、T Gに特異的に結合する能力；及び／又はがんを検出し、がんを治療し若しくは予防する能力などを妨害しない。より望ましくは、該追加のアミノ酸は、該親T C R又はその機能的変異体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。

【 0 0 3 0 】

該ポリペプチドは、本発明のT C R又はその機能的変異体の鎖及び鎖のいずれか、又は両方の機能的部分を含むことができる。例えば、本発明のT C R又はその機能的変異体の鎖及び／又は鎖の可変領域（複数可）のC D R 1、C D R 2及びC D R 3の1以上（one of more）を含む機能的部分である。本発明の一実施形態では、該ポリペプチドは、配列番号3若しくは44（鎖のC D R 1）、4若しくは45（鎖のC D R 2）、5若しくは46（鎖のC D R 3）、6若しくは47（鎖のC D R 1）、7若しくは48（鎖のC D R 2）、8若しくは49（鎖のC D R 3）、又はそれらの組み合わせのアミノ酸配列を含む、機能的部分を含むことができる。好ましくは、本発明のポリペプチドは、配列番号3～5；6～8；44～46；47～49；配列番号3～8の全て；又は配列番号44～49の全てのアミノ酸配列を含む、機能的部分を含む。より好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号3～8の全て、又は配列番号44～49の全てのアミノ酸配列を含む機能的部分を含む。

10

【 0 0 3 1 】

本発明の一実施形態では、本発明のポリペプチドは、例えば、上記のC D R領域の組み合わせを含む、本発明のT C R、又はその機能的変異体の可変領域を含むことができる。これに関して、該ポリペプチドは、配列番号9若しくは50（鎖の可変領域）、配列番号10若しくは51（鎖の可変領域）、配列番号9及び配列番号10の両方、又は配列番号50及び51の両方のアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号9及び10の両方、又は配列番号50及び51の両方のアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 3 2 】

本発明の一実施形態では、本発明のポリペプチドは、上記の本発明のT C R又はその機能的変異体の定常領域を、さらに含むことができる。これに関して、該ポリペプチドは、配列番号13若しくは52（鎖の定常領域）、配列番号14若しくは53（鎖の定常領域）、配列番号13及び配列番号14の両方、又は配列番号52及び53の両方のアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号13及び14の両方、又は配列番号52及び53の両方のアミノ酸配列を含む。

30

【 0 0 3 3 】

本発明の一実施形態では、本発明のポリペプチドは、本発明のT C R又はその機能的変異体の可変領域及び定常領域の組み合わせを含んでもよい。これに関して、該ポリペプチドは、配列番号9（鎖の可変領域）及び配列番号13（鎖の定常領域）の両方、配列番号10（鎖の可変領域）及び配列番号14（鎖の定常領域）の両方、又は配列番号9、10、13及び14の全てのアミノ酸配列を含むことができる。一実施形態では、該ポリペプチドは、配列番号50（鎖の可変領域）及び配列番号52（鎖の定常領域）の両方、配列番号51（鎖の可変領域）及び配列番号53（鎖の定常領域）の両方、又は配列番号50～53の全てのアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号9、10、13及び14の全て、又は配列番号50～53の全てのアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 3 4 】

本発明の一実施形態では、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載の任意のC D R領域と、本発明のT C R又はその機能的変異体の定常領域との組み合わせを含んでもよい。これに関して、該ポリペプチドは、配列番号3～5及び13の全て、配列番号6～8及び14の全て、又は配列番号3～8及び13～14の全てのアミノ酸配列を含むことができる。本発明の一実施形態では、該ポリペプチドは、配列番号44～46及び52の全て、配列番号47～49及び53の全て、又は配列番号44～49及び52～53の全て

50

のアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号 3 ~ 8 及び 13 ~ 14 の全て、又は配列番号 44 ~ 49 及び 52 ~ 53 の全てのアミノ酸配列を含む。

【0035】

本発明の一実施形態において、本発明のポリペプチドは、本明細書に記載の TCR 又はその機能的変異体の鎖又は鎖の全長を含むことができる。これに関して、本発明のポリペプチドは、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 54、配列番号 55、配列番号 11 及び 12 の両方、又は配列番号 54 及び 55 の両方のアミノ酸配列を含むことができる。好ましくは、該ポリペプチドは、配列番号 11 及び 12 の両方、又は配列番号 54 及び 55 の両方のアミノ酸配列を含む。

10

【0036】

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 つを含むタンパク質を提供する。「タンパク質 (protein)」とは、1 以上のポリペプチド鎖を含む分子を意味する。

【0037】

一実施形態では、本発明のタンパク質は、配列番号 3 ~ 5 又は配列番号 44 ~ 46 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 6 ~ 8 又は配列番号 47 ~ 49 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含むことができる。代替的又は追加的に、本発明のタンパク質は、配列番号 9 又は 50 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 10 又は 51 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含むことができる。該タンパク質は、例えば、(i) 配列番号 9 及び 13 の両方若しくは配列番号 3 ~ 5 及び 13 の全てのアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 10 及び 14 の両方若しくは配列番号 6 ~ 8 及び 14 の全てのアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含むことができ、又は (ii) 配列番号 50 及び 52 の両方若しくは配列番号 44 ~ 46 及び配列番号 52 の全てのアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖と、配列番号 51 及び 53 の両方若しくは配列番号 47 ~ 49 及び 53 の全てのアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含むことができる。代替的又は追加的に、本発明のタンパク質は、配列番号 11 又は 54 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 12 又は 55 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチド鎖を含むことができる。この例においては、本発明のタンパク質は、TCR であり得る。代替的に、例えば、該タンパク質が、配列番号 11 及び 12 の両方、配列番号 54 及び 55 の両方のアミノ酸配列を含む単一のポリペプチド鎖を含む場合、又は該タンパク質の第 1 及び / 又は第 2 のポリペプチド鎖 (複数可) が更に他のアミノ酸配列、例えば、免疫グロブリン又はその一部をコードするアミノ酸配列を含む場合、本発明のタンパク質は、融合タンパク質であり得る。これに関して、本発明はまた、少なくとも 1 つの他のポリペプチドとともに、本明細書に記載された本発明のポリペプチドの少なくとも 1 つを含む融合タンパク質を提供する。該他のポリペプチドは、融合タンパク質の別個のポリペプチドとして存在することができるか、又は本明細書に記載される本発明のポリペプチドの 1 つとフレーム (タンデム) で発現されるポリペプチドとして存在することができる。該他のポリペプチドは、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、任意のペプチド分子若しくはタンパク質性の分子又はその部分をコードすることができるが、これらの例に限定されない。

20

30

40

【0038】

該融合タンパク質は、本発明のポリペプチドの 1 以上のコピー及び / 又は該他のポリペプチドの 1 以上のコピーを含むことができる。例えば、該融合タンパク質は、1、2、3、4、5 又はそれ以上の本発明のポリペプチド及び / 又は他のポリペプチドのコピーを含むことができる。融合タンパク質を作製する適切な方法は、当該分野で公知であり、例えば、組換えによる方法が挙げられる。

【0039】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明の TCR (及びその機能的部分及び機能的変

50

異体)、ポリペプチド及びタンパク質は、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されてもよい。これに関して、配列番号11及び12の両方、配列番号54及び55の両方、配列番号9及び配列番号10の両方、配列番号50及び51の両方、配列番号3～8の全て、配列番号44～49の全て、配列番号9、10、13及び14の全て、配列番号50～53の全て、配列番号3～8及び13～14の全て、又は配列番号44～49及び52～53の全てを含む本発明のTCR(及びその機能的部分及び機能的変異体)、ポリペプチド及びタンパク質は、リンカーペプチドをさらにも含んでもよい。該リンカーペプチドは、宿主細胞中の組換えTCR(その機能的部分及び機能的変異体を含む)、ポリペプチド及び/又はタンパク質の発現を有利に促進してもよい。該リンカーペプチドは、任意の適切なアミノ酸配列を含んでもよい。本発明の一実施形態では、該TCR(若しくはその機能的部分又はその変異体)、ポリペプチド又はタンパク質は、自己切断性の、ウイルスリンカーペプチドを含む。例えば、該リンカーペプチドは、配列番号28を含んでもよい。該リンカーペプチドを含むコンストラクトを宿主細胞で発現させた場合、該リンカーペプチドが切断され、分離した鎖及び鎖となってもよい。

10

【0040】

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。本明細書中で使用される場合、「組換え抗体(recombinant antibody)」は、本発明のポリペプチドの少なくとも1つと、抗体のポリペプチド鎖又はその一部を含む組換え(例えば、遺伝子操作された)タンパク質を指す。抗体又はその一部のポリペプチドは、重鎖、軽鎖、重鎖若しくは軽鎖の可変領域若しくは定常領域、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一部は、該組換え抗体とは異なるポリペプチドとして存在することができる。代替的に、抗体のポリペプチド鎖又はその一部は、本発明のポリペプチドとフレーム(タンデム)で発現するポリペプチドとして存在することができる。抗体のポリペプチド又はその一部は、本明細書に記載の任意の抗体及び抗体断片を含む、任意の抗体又は任意の抗体断片のポリペプチドであり得る。

20

【0041】

本発明(それらの機能的変異体を含む)のTCR、ポリペプチド及びタンパク質は、該TCR、ポリペプチド若しくはタンパク質(又はそれらの機能的変異体)が、それらの生物学的活性、例えば、TGに特異的に結合し;哺乳動物のがんを検出し;又は哺乳動物におけるがんを処置若しくは予防するなどの能力を保持する限り、任意の長さ、すなわち、任意の数のアミノ酸を含むことができる。例えば、該ポリペプチドは、約50～約5000アミノ酸長の範囲で、例えば、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の長さであり得る。これに関して、本発明のポリペプチドはオリゴペプチドも含む。

30

【0042】

本発明のTCR、ポリペプチド及びタンパク質(その機能的変異体を含む)は、天然に存在する1以上のアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含むことができる。そのような合成アミノ酸は、当該技術分野において公知であり、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、 α -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、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、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-ヒドロキシリシン、オルニチン、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 α -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 α -アミノシクロヘブ

40

50

タンカルボン酸、 α - (2 - アミノ - 2 - ノルボルナン) - カルボン酸、 β - ジアミノ酪酸、 γ - ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニン、 α - t e r t - ブチルグリシンが挙げられる。

【 0 0 4 3 】

本発明の T C R、ポリペプチド及びタンパク質（その機能的変異体を含む）は、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、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たものの、又は酸付加塩への変換及び／又は適切な二量体化若しくは重合化又はコンジュゲート化することができる。

【 0 0 4 4 】

本発明の T C R、ポリペプチド及び／又はタンパク質（その機能的変異体を含む）は、例えば、デノボ合成のような当該技術分野で公知の方法によって得ることができる。また、ポリペプチド及びタンパク質は、標準的な組換え法により本明細書に記載の核酸を用いて、組換えにより作製することができる。例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY(2012)を参照されたい。代替的には、本明細書に記載の T C R、ポリペプチド及び／又はタンパク質（その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)のような企業によって商業的に合成することができる。これに関して、本発明の T C R（その機能的変異体を含む）、ポリペプチド及びタンパク質は、合成、組換え、単離及び／又は精製することができる。

【 0 0 4 5 】

コンジュゲート、例えば、本発明の任意の T C R、ポリペプチド若しくはタンパク質（それらの任意の機能的変異体を含む）、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を含むバイオ・コンジュゲートは本発明の範囲に含まれる。コンジュゲートを合成する一般的な方法と同じく、コンジュゲートは、当該技術分野で公知である。

【 0 0 4 6 】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載されている、任意の T C R（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を含む核酸を提供する。本明細書で使用する「核酸（n u c l e i c a c i d）」は、「ポリヌクレオチド（p o l y n u c l e o t i d e）」、「オリゴヌクレオチド（o l i g o n u c l e o t i d e）」及び「核酸分子（n u c l e i c a c i d m o l e c u l e）」を含み、一般に D N A 又は R N A のポリマーを意味し、一本鎖又は二本鎖であり、天然の材料から合成又は取得する（例えば、単離及び／又は精製する）ことができる。それらは、天然、非天然又はは改変されたヌクレオチドを含むことができ、そして天然、非天然又はは改変されたヌクレオチド間結合を含むことができる。例えば、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みられるホスホジエステルの代わりに、ホスホロアミデート結合又はホスホロチオエート結合のようなものである。一実施形態では、該核酸は相補的 D N A（c D N A）を含む。該核酸が、任意の挿入、欠失、逆位及び／又は置換を含まないことが一般には好ましい。しかし、本明細書で考察されるように、核酸が 1 以上の挿入、欠失、逆位、及び／又は置換を含んでいても、いくつかの例においては適切である。

【 0 0 4 7 】

好ましくは、本発明の核酸は組換え体である。本明細書で使用される場合、用語「組換え（r e c o m b i n a n t）」は、（i）天然又は合成の核酸セグメントを、生細胞内で複製することができる核酸分子に加えることによって、生細胞の外に構築される分子、又は（i i）上記（i）に記載されたものの複製で得られる分子を指す。本明細書の目的のためには、該複製はインビトロ複製、又はインビボ複製であり得る。

【 0 0 4 8 】

該核酸は、当該技術分野で公知の手順を用いて、化学合成及び／又は酵素的ライゲーション

10

20

30

40

50

ン反応に基づいて構築することができる。例えば、上記のGreen and Sambrookらを参照されたい。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ため、若しくはハイブリダイゼーション時に形成される二本鎖の物理的安定性を高めるため（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）に設計された、様々な修飾ヌクレオチドを用いて化学的に合成することができる。該核酸を合成するために使用することができる修飾されたヌクレオチドの例は、5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、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、 β - D - ガラクトシルクエオシン、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、 β - D - マンノシルクエオシン、5' - メトキシ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)、ウィプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、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 - ジアミノプリンであるが、これらに限定されない。代替的には、本発明の核酸の1以上は、Macromolecular Resources (Fort Collins, CO)及びSynthegen (Houston, TX)のような企業から購入することができる。

【0049】

該核酸は、本明細書に記載の、任意の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任意のヌクレオチド配列を含むことができる。本発明の一実施形態では、該核酸は、配列番号22（鎖のCDR1）；配列番号23（鎖のCDR2）；配列番号24（鎖のCDR3）；配列番号25（鎖のCDR1）；配列番号26（鎖のCDR2）；又は配列番号27（鎖のCDR3）のヌクレオチド配列を含んでもよい。好ましくは、該核酸は、配列番号22～24の全て；配列番号25～27の全て；又は配列番号22～27の全てのアミノ酸配列を含む。特に好ましい実施形態では、該核酸は、配列番号22～27の全てのヌクレオチド配列を含む。本発明の一実施形態では、該核酸は、配列番号15（鎖可変領域）；配列番号16（鎖可変領域）；又は配列番号15及び16の両方のヌクレオチド配列を含んでもよい。好ましくは、該核酸は、配列番号15及び16の両方のヌクレオチド配列を含む。本発明の別の実施形態では、該核酸は、配列番号17若しくは56（鎖全長）；配列番号18若しくは57（鎖全長）；配列番号17及び18の両方、又は配列番号56及び57の両方のヌクレオチド配列を含んでもよい。好ましくは、該核酸は、配列番号17及び18の両方、又は配列番号56及び57の両方のヌクレオチド配列を含む。

【0050】

本発明の一実施形態では、該核酸は、TCR 又は 鎖の定常領域をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。これに関して、本明細書中に記載される任意の核酸は、配列番号19（鎖の定常領域）；配列番号20（鎖の定常領域）；又は配列番号19及び20の両方のヌクレオチド配列をさらに含んでもよい。好ましくは、該核酸は、配列番号15及び19の両方；配列番号16及び20の両方；配列番号15～16及び19～20の全て；配列番号22～24及び19の全て；配列番号25～27及び20の全て；又は配列番号22～27及び19～20の全てを含む。特に好ましい実施形態では、該核酸は、配列番号15～16及び19～20の全て、又は配列番号22～27及び19～20の全てのヌクレオチド配列を含む。

【0051】

本発明の一実施形態では、配列番号56及び57のヌクレオチド配列を含む核酸はヒト

T C Rをコードする。本発明の一実施形態では、配列番号22～24の全て；配列番号25～27の全て；配列番号22～27の全て；配列番号15及び16の両方；配列番号17及び18の両方；配列番号15及び19の両方；配列番号16及び20の両方；配列番号15～16及び19～20の全て；配列番号22～24及び19の全て；配列番号25～27及び20の全て；又は配列番号22～27及び19～20の全てのヌクレオチド配列を含む核酸はネズミT C Rをコードする。

【0052】

本発明はまた、本明細書に記載の任意の核酸のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、又は本明細書に記載の任意の核酸のヌクレオチド配列にストリンジェ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核酸を提供する。

10

【0053】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする該ヌクレオチド配列は、好ましくは高度にストリンジェンシーな条件下でハイブリダイズする。「高度にストリンジェンシーな条件 (high stringency condition)」とは、該ヌクレオチド配列が、非特異的なハイブリダイゼーションよりも検出可能な程度に強く、標的配列 (本明細書に記載の任意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。高度にストリンジェンシーな条件には、正確に相補的な配列を有するポリヌクレオチド又はヌクレオチド配列と一致するいくつかの小さな領域 (例えば、3～10塩基) を偶然有するランダム配列からわずかに異なった (scattered) ミスマッチを含むポリヌクレオチドを区別しうる条件が含まれる。そのような相補性の小領域は、14～17塩基又はそれ以上の完全長の相補鎖よりも容易に融解し、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションによりそれらを容易に区別することができる。比較的高度にストリンジェンシーな条件には、例えば、約50～70の温度で、約0.02～0.1MのNaCl又はそれと同等な条件によって提供されるような、低塩及び/又は高温条件が含まれる。そのような高度にストリンジェンシーな条件は、ヌクレオチド配列と鋳型又は標的鎖との間のミスマッチがあれば、ほとんど許容せず、任意の本発明のT C R (その機能的部分及び機能的変異体を含む) の発現を検出するのに特に適している。ホルムアミド添加量を増加することにより、条件をより厳しくすることができることは一般的に理解されている。

20

【0054】

本発明はまた、本明細書に記載の任意の核酸に対して、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を提供する。これに関して、該核酸は、本質的に、本明細書に記載の任意のヌクレオチド配列からなってもよい。

30

【0055】

本発明の核酸は、組換え発現ベクターに組み込むことができる。これに関して、本発明は、本発明の任意の核酸を含む組換え発現ベクターを提供する。本発明の一実施形態では、該組換え発現ベクターは、鎖、鎖及びリンカーペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。例えば、一実施形態では、該組換え発現ベクターは、配列番号21 (配列番号11及び12の 及び 鎖、及びそれらの間に位置するリンカーをコードする) のヌクレオチド配列を含む。

40

【0056】

本明細書の目的のために、用語「組換え発現ベクター (recombinant expression vector)」は、コンストラクトが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む場合、宿主細胞によってmRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドが発現されるような遺伝子改変オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド・コンストラクトを意味し、該ベクターは、細胞内で発現されるmRNA、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドを有するのに十分な条件下で細胞と接触する。本発明のベクターは、全体として自然発生的ではない。しかしながら、ベクターの部分は天然に存在し得る。本発明の組換え発現ベクターは、一本鎖又は二本鎖で

50

あり、天然の材料から部分的に合成又は取得することができ、そして天然、非天然又は改変されたヌクレオチドを含むことができる、DNA及びRNAを含む任意の型のヌクレオチドを含むことができるが、それらに限定されない。該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、天然に存在しないヌクレオチド間結合、又はその両方の型の結合を含むことができる。好ましくは、非天然で生じた若しくは改変されたヌクレオチド又はヌクレオチド間結合は、ベクターの転写又は複製を妨害しない。

【0057】

本発明の組換え発現ベクターは、任意の適切な組換え発現ベクターであることができ、任意の適切な宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために用いることができる。適切なベクターには、例えば、プラスミド及びウイルスのように増殖及び拡大 (expansion) のため、若しくは発現又はその両方のために設計されたものが挙げられる。該ベクターは、pUCシリーズ (Fermentas Life Sciences)、pBluescriptシリーズ (Stratagene, La Jolla, 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) からなる群の中から選択することができる。バクテリオファージベクター、例えば、GT10、GT11、Zapll (Stratagene)、EMBL4及びNM1149もまた使用することができる。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-C1、pMAM及びpMAMneo (Clontech) が挙げられる。好ましくは、該組換え発現ベクターはウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターである。特に好ましい実施形態では、該組換え発現ベクターはMSGV1ベクターである。

【0058】

本発明の組換え発現ベクターは、例えば、上記のGreen and Sambrookらに記載されている、標準的な組換えDNA技術を用いて調製することができる。環状又は線状である発現ベクターのコンストラクトは、原核又は真核宿主細胞において機能的である複製システムを含むように調製することができる。複製システムは、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するものであり得る。

【0059】

望ましくは、該組換え発現ベクターは、ベクターがDNAベースであるのか、又はRNAベースであるのかを考慮して適切な形で、ベクターが導入される宿主細胞 (例えば、細菌、真菌、植物又は動物) の型に特異的な転写及び翻訳の開始及び終止コドンなどの、調節配列を含む。

【0060】

該組換え発現ベクターは、形質転換又はトランスフェクトした宿主細胞の選択を可能にする1以上のマーカー遺伝子を含むことができる。マーカー遺伝子は、殺生物剤耐性、例えば、抗生物質、重金属などに対する耐性、原栄養性を提供するための栄養要求性宿主細胞における相補性などを含む。本発明の発現ベクターのための適切なマーカー遺伝子は、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である。

【0061】

該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 (その機能的変異体を含む) をコードするヌクレオチド配列に相補的であるか若しくは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した天然又は非天然プロモーターを含むことができる。プロモーターの選択、例えば、強、弱、誘導性、組織特異性及び発生段階特異性は、当業者の通常の技術の範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモーターの組み合わせも当業者の技術の範囲内である。該プロモーターは、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、及びネズミ幹細胞ウイルスの長い末端反復に見出されるプロモーターであり得る。

【 0 0 6 2 】

本発明の組換え発現ベクターは、一過性の発現若しくは安定した発現のいずれかのために、又はその両方のために、設計することができる。また、組換え発現ベクターは、構成的発現又は誘導発現のために作製することができる。さらに、該組換え発現ベクターは、自殺遺伝子を含むように作製することができる。

【 0 0 6 3 】

本明細書において、「自殺遺伝子 (suicide gene) 」という用語は、自殺遺伝子を発現する細胞を死滅させる遺伝子を指す。該自殺遺伝子は、遺伝子が発現される細胞における作用因子、例えば、薬剤に対する感受性を付与し、細胞がその作用因子と接触、又はそれに対して曝露した場合に細胞を死滅させる遺伝子であり得る。自殺遺伝子は、当該技術分野で公知であり、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、シトシンダミナーゼ (cytosine deaminase) 、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。

10

【 0 0 6 4 】

本発明の別の実施形態は、本明細書に記載の任意の組換え発現ベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。本明細書中で使用される場合、用語「宿主細胞 (host cell) 」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。該宿主細胞は、真核細胞、例えば、植物、動物、菌類若しくは藻類又は原核細胞、例えば、バクテリア又は原生動物であり得る。該宿主細胞は、培養細胞又は初代細胞、すなわち生物、例えば、ヒトから直接単離した細胞であり得る。該宿主細胞は、付着細胞又は懸濁細胞、すなわち懸濁液中で増殖する細胞であり得る。適切な宿主細胞は当該技術分野で公知であり、例えば、DH5 大腸菌細胞、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、該宿主細胞は好ましくは原核細胞、例えば、DH5 細胞である。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、該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、該宿主細胞は、ヒト細胞である。宿主細胞は、任意の細胞型であり、任意のタイプの組織に由来し、任意の発生段階であり得るが、好ましくは末梢血リンパ球 (PBL) 又は末梢血単核細胞 (PBMC) である。より好ましくは、該宿主細胞はT細胞である。

20

【 0 0 6 5 】

本明細書の目的のために、該T細胞は、培養T細胞のような任意の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細胞であり得る。哺乳動物から得られたものである場合、該T細胞は、血液、骨髄、リンパ節、胸腺又は他の組織若しくは体液を含む多数の供給源から得ることができるが、これらに限定されない。T細胞は濃縮又は精製されていてもよい。好ましくは、該T細胞はヒトT細胞である。該T細胞は、CD4⁺/CD8⁺二重陽性T細胞、CD4⁺ヘルパーT細胞、例えば、Th1及びTh2細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞 (例えば、細胞傷害性T細胞)、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 、記憶T細胞 (例えば、中央記憶T細胞及びエフェクター記憶T細胞)、ナイーブT細胞などを含む、任意のタイプのT細胞及び任意の発生段階のT細胞であり得るが、これらに限定されない。

30

40

【 0 0 6 6 】

また、本発明は、本明細書で記載の少なくとも1つの宿主細胞を含む細胞集団を提供する。該細胞集団は、記載された任意の組換え発現ベクターを含む宿主細胞を含む、遺伝的に不均一な集団であり得る。加えて、少なくとも1つの他の細胞、例えば、任意の組換え発現ベクターを含まない宿主細胞 (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、筋肉細胞、脳細胞などが挙げられる。代替的に、該細胞集団は、集団が、組換え発現ベクターを含む宿主細胞を主に含む (例えば、本質的にそれからなる)、実質的に均質な集団であり得る。該集団は細胞のクローン集団であってもよく、集団の全ての細胞が組換え発現ベクターを含むような、集団の全ての細胞が組換え発現ベクターを含む単一の宿主細胞のクローンで

50

あってもよい。本発明の一実施形態では、該細胞集団は、本明細書に記載の組換え発現ベクターを含む宿主細胞を含むクローン集団である。

【0067】

本発明の一実施形態においては、集団の細胞数は急速に増加してもよい。T細胞数の増殖は、例えば、米国特許第8,034,334号；米国特許第8,383,099号；米国特許出願公開第2012/0244133号；Dudleyら, J. Immunother., 26:332-42 (2003)；及びRiddellら, J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990)に記載されているように、当該技術分野において公知である方法の任意の1つによって達成することができる。一実施形態において、T細胞数の増殖は、T細胞をOKT3抗体、IL-2及びフィーダーPBMC（例えば、放射線照射した同種異形のPBMC）と共に培養することで実施される。

10

【0068】

本発明は、さらに、本明細書に記載の任意のTCR（又はその機能変異体）の機能的部分に特異的に結合する抗体、又はその抗原結合部位を提供する。好ましくは、該機能的部位が、特異的にがん抗原、例えば、配列番号3若しくは44（鎖のCDR1）、配列番号4若しくは45（鎖のCDR2）、配列番号5若しくは46（鎖のCDR3）、配列番号6若しくは47（鎖のCDR1）、配列番号7若しくは48（鎖のCDR2）、配列番号8若しくは49（鎖のCDR3）、配列番号9若しくは50（鎖の可変領域）、配列番号10若しくは51（鎖の可変領域）、又はそれらの組み合わせ、例えば、配列番号3～5；44～46；6～8；47～49；3～8；44～49；9；10；50；51；9～10若しくは50～51のアミノ酸配列を含む機能的部位に結合する。さらに好ましくは、該機能的部分が、配列番号3～8、44～49、9及び10、又は50及び51のアミノ酸配列を含む。好ましい一実施形態においては、該抗体又はその抗原結合部位が、6つのCDR全て（鎖のCDR1～3及び鎖のCDR1～3）によって形成されるエピトープに結合する。該抗体は、当該分野において公知の任意の型の免疫グロブリンであり得る。例えば、該抗体は、任意のアイソタイプ、例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgMなどであり得る。該抗体は、モノクローナル又はポリクローナルであり得る。該抗体は、自然界に存在する抗体、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/又は精製した抗体であり得る。代替的には、該抗体は、遺伝子工学的に作製した抗体、例えば、ヒト化抗体又はキメラ抗体であり得る。該抗体は、単量体又は多量体であり得る。また、該抗体は、本発明のTCR（又はその機能変異体）の機能的部分に対して、任意のアフィニティレベル又はアビディティレベルを有することができる。望ましくは、他のペプチド又はタンパク質との交差反応が最小限であるように、抗体は、本発明のTCR（又はその機能変異体）の機能的部分に対して特異的である。

20

30

【0069】

本発明のTCRの任意の機能的部分又は機能変異体に対する抗体の結合能力を試験する方法は、当該技術分野において公知であり、例えば、放射免疫測定（RIA）、ELISA、ウェスタンブロット、免疫沈降及び競合的阻害アッセイのような任意の抗体-抗原結合アッセイを含む。

【0070】

抗体を作製するために適した方法は、当該技術分野において公知である。例えば、標準的なハイブリドーマ法は、例えば、C.A. Janewayら. (eds.), Immunobiology, 8th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2011)に記載されている。代替的には、EBV-ハイブリドーマ法、非ヒト動物において抗体を産生する方法、バクテリオファージベクター発現システム、のような他の方法が、当該技術分野において公知である。

40

【0071】

ファージディスプレイは、本発明の抗体を作製するためにも用いることができる。これに関連して、抗体の抗原結合可変（V）ドメインをコードするファージ・ライブラリーは、標準的な分子生物学及び組換えDNA技術（例えば、Green and Sambrookら. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4th Edition, Cold Spring Harbor Laborator

50

y Press, New York (2012)を参照)を用いて作製することができる。望ましい抗原に対して特異的に結合するように、望ましい特異性を有する可変領域をコードするファージは選択され、完全抗体又は部分抗体は、選択した可変ドメインを含むように再構築される。再構築した該抗体をコードする核酸配列は、ハイブリドーマ作製に用いられるミエローマ細胞のような、好適な細胞株に導入され、モノクローナル抗体の性質を有する抗体が、該細胞によって分泌される(上記のJanewayらを参照)。

【0072】

ヒト化抗体の作製方法は、当該技術分野において公知である。抗体は、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の遺伝子に特異的な遺伝子組換えがなされたトランスジェニックマウスによっても産生することができる。そのような方法は当該技術分野において公知であり、例えば、上記Janewayらに記載されている。

10

【0073】

本発明は、本明細書に記載の任意の抗体の抗原結合部位も提供する。該抗原結合部位は、Fab、F(ab')₂、dsFv、sFv、ダイアボディ(diabodies)、トリアボディ(triabodies)のような、少なくとも一つの抗原結合部位を有する任意の部位であり得る。

【0074】

1本鎖可変領域断片(sFv)抗体断片は、合成ペプチドによって抗体重鎖の可変(V)ドメインと抗体軽鎖のVドメインとが結合されているものを含む、短くしたFab断片からなり、所定の組換えDNA技術を用いることで作製することができる(例えば、上記のJanewayらを参照)。同様に、ジスルフィド結合で安定化した可変領域断片(dsFv)は組換えDNA技術を用いて作製することができる。しかしながら、本発明の抗体断片は、これらの典型的な抗体断片の型に限定されない。

20

【0075】

また、該抗体又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、アルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ)及び元素粒子(例えば、金粒子)のような検出可能なラベルを含むように改変することができる。

【0076】

30

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質(その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/又は精製することができる。本明細書で用いられる用語「単離する」とは、自然環境から取り出すことを意味する。本明細書で用いられる場合、用語「精製する(purified)」とは、純度が増すことを意味し、「純度(purity)」とは相対的な用語であって、絶対的な純度として解釈される必要はない。例えば、純度は、少なくとも約50%であり、60%、70%、80%、90%、95%を超えていても良く又は100%であり得る。

【0077】

本発明のTCR、ポリペプチド、タンパク質(その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(それらの抗原結合部分を含む)、これらは本明細書において、以降は「発明のTCR材料(inventive TCR materials)」と称され、医薬組成物などの組成物に製剤化することができる。これに関して、本発明は、本明細書に記載された任意のTCR、ポリペプチド、タンパク質、機能性部分、機能的変異体、核酸、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)を含む医薬組成物、及び医薬的に許容される担体を提供する。任意の本発明のTCR材料を含有する本発明の医薬組成物は、1を超える発明のTCR材料、例えば、ポリペプチド及び核酸、又は2以上の異なるTCR(その機能的部分及び機能的変異体を含む)を含むことができる。代替的に、医薬組成物は、アスパラギナーゼ(asparaginase)、ブスルファン(busulfan)、カルボプラチン(carboplatin)、

40

50

シスプラチン (cisplatin)、ダウノルビシン (daunorubicin)、ドキソルビシン (doxorubicin)、フルオロウラシル (fluorouracil)、ゲムシタピン (gemcitabine)、ヒドロキシ尿素 (hydroxyurea)、メトトレキサート (methotrexate)、パクリタキセル (paclitaxel)、リツキシマブ (rituximab)、ビンブラスチン (vinblastine)、ビンクリスチン (vincristine) などの化学療法剤のように、他の医薬的な活性がある薬剤 (複数可) 又は薬物 (複数可) と組み合わせた本発明の TCR 材料を含むことができる。

【0078】

好ましくは、該担体は医薬的に許容される担体である。医薬組成物に関して、該担体は、特定の本発明の TCR 材料のために慣用的に使用が考慮される任意の物であり得る。そのような医薬的に許容される担体は、当業者に周知であり、一般に容易に入手可能である。医薬的に許容される担体は、使用条件下で有害な副作用又は毒性を有さないものであることが好ましい。

10

【0079】

担体の選択は、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と同様に、特定の本発明の TCR 材料によって部分的に決定される。従って、本発明の医薬組成物の種々の適切な製剤が存在する。適切な製剤は、経口、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内又は腹腔内投与のための任意の製剤を含んでもよい。本発明の TCR 材料を投与するために 1 超の経路を使用することができ、ある場合には、特定の経路は、別の経路よりも迅速かつ効果的な応答を提供することができる。

20

【0080】

好ましくは、本発明の TCR 材料は、注射、例えば、静脈内に投与される。本発明の TCR 材料が、本発明の TCR (又はその機能的変異体) を発現する宿主細胞である場合、該注射用細胞のための医薬的に許容される担体は、例えば、通常の生理食塩水 (水に溶解した、約 0.90% w/v の NaCl、約 300 mOsm/L の NaCl、又は水約 1 L 当たり約 9.0 g の NaCl)、NORMOSOL R 電解質溶液 (Abbott, Chicago, IL)、PLASMALYTE A (Baxter, Deerfield, IL)、水に溶解した 5% のデキストロース又はリンゲル乳酸塩などの任意の等張な担体を含んでもよい。一実施形態では、医薬的に許容される該担体に、ヒト血清アルブミンが補充される。

【0081】

本発明の目的のために、投与される本発明の TCR 材料の量又は投与量 (例えば、本発明の TCR 材料が 1 以上の細胞である場合は細胞数) は、十分な効果、例えば、妥当な時間枠で、対象又は被験動物において、治療又は予防応答、を達成するのに十分であるべきである。例えば、本発明の TCR 材料の投与量は、がん抗原 (例えば、ヒト Tg) に結合するのに十分でなければならず、又は投与から約 2 時間以上、例えば、12 ~ 24 時間若しくはそれ以上の期間にがんを検出し、治療し若しくは予防するのに十分でなければならない。特定の実施形態では、該期間はさらに長くなる可能性がある。該投与量は、治療される動物 (例えば、ヒト) の体重と同様に、特定の本発明の TCR 材料の有効性及び動物 (例えば、ヒト) の状態によって決定される。

30

【0082】

投与量を決定するための多くのアッセイは、当技術分野で公知である。本発明の目的のために、標的細胞が溶解される程度、又は T 細胞の異なる投与量がそれぞれ与えられた哺乳動物のセット中で、そのような T 細胞を哺乳動物に所与の投与量で投与した際に、本発明の TCR (又はその機能的変異体若しくは機能的部分)、ポリペプチド又はタンパク質を発現する T 細胞によって分泌される IFN- γ の程度を比較することを含むアッセイ法を、哺乳動物への初期投与量を決定するために用いることができる。ある用量の投与の際に標的細胞が溶解される又は IFN- γ が分泌される程度は、当該技術分野で公知の方法によってアッセイすることができる。

40

【0083】

本発明の TCR 材料の投与量はまた、特定の本発明の TCR 材料の投与に伴う任意の有害な副作用の存在、性質及び程度によって決定される。典型的には、主治医は、年齢、体

50

重、一般的健康状態、食事、性別、投与される本発明のTCR材料、投与経路及び治療されるがんの重篤度などの様々な要因を考慮に入れて、個々の患者を治療する本発明のTCR材料の投与量を決定する。本発明のTCR材料が細胞集団である実施形態では、1回の注入当たりに投与される細胞数は、例えば、約 1×10^6 ~ 約 1×10^{12} 細胞、又はそれ以上で変化してもよい。ある実施形態では、 1×10^6 未満の細胞を投与してもよい。

【0084】

当業者であれば、改良によって本発明のTCR材料の治療効果又は予防効果が増大するように、本発明のTCR材料を任意の数の方法で改良することができ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、直接的又は間接的な架橋のいずれかを介して標的部分に結合させることができる。標的部分に化合物、例えば、本発明のTCR材料を結合させることは当該技術分野で公知である。本明細書中で使用される場合、用語「標的部分 (targeting moiety)」は、標的部分が、本発明のTCR材料を表面に受容体が発現している細胞集団に向かわせることを指揮するように、細胞表面受容体の特異的に認識して結合する任意の分子又は作用物質をいう。標的部分としては、抗体又はその断片、ペプチド、ホルモン、成長因子、サイトカイン及び細胞表面受容体 (例えば、上皮増殖因子受容体 (EGFR)、T細胞受容体 (TCR)、B細胞受容体 (BCR)、CD28、血小板由来増殖因子受容体 (PDGF)、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) など) に結合する任意の他の天然又は非天然リガンドが挙げられるが、それらに限定されない。本明細書で使用される用語「架橋」という用語は、本発明のTCR材料を標的部分に連結する任意の作用物質又は分子を指す。当業者は、本発明のTCR材料の機能のために必要でない本発明のTCR材料上の部位は、架橋及び/又は標的部分を結合させるための理想的な部位であることを認識している。但し、一旦本発明のTCR材料に結合したその架橋及び/又は標的部分は、本発明のTCR材料の機能、すなわちTGに結合する能力又はがんを検出、治療若しくは予防する能力を妨害しないことが条件である。

【0085】

本発明の医薬組成物、TCR (その機能的変異体を含む)、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、がんを治療又は予防する方法において使用することができるものと期待される。特定の理論に拘束されるものではないが、本発明のTCR (及びその機能的変異体) は、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及びその機能的変異体) が、細胞によって発現されるとき、TGを発現する標的細胞に対する免疫応答を媒介することができるように、TGに特異的に結合すると考えられる。これに関して、本発明は、哺乳動物のがんを治療又は予防する方法を提供するものであって、哺乳動物のがんを治療又は予防するための有効量で、本明細書に記載の任意の医薬組成物、TCR (及びその機能的変異体)、ポリペプチド若しくはタンパク質、又は明細書に記載の任意のTCR (及びその機能的変異体)、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任意のTCR (及びその機能的変異体)、ポリペプチド若しくはタンパク質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類に投与すること含んでいる。

【0086】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載の任意の医薬組成物、TCR (及びその機能的変異体)、ポリペプチド若しくはタンパク質、又は本明細書に記載の任意のTCR (及びその機能的変異体)、ポリペプチド、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む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任意のTCR (及びその機能的変異体)、ポリペプチド若しくはタンパク質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提供するものであり、哺乳動物におけるがんの治療又は予防に使用される。

【0087】

本明細書で使用される場合、用語「治療 (treat)」及び「予防 (prevent)

10

20

30

40

50

）」ならびにそれに由来する用語は、100%又は完全な治療又は予防を意味する必要はない。むしろ、当業者が潜在的な利益又は治療効果を有すると認識する様々な程度の治療又は予防が存在する。これに関して、本発明の方法は、哺乳類におけるがんの治療又は予防の任意のレベルを提供することができる。さらに、本発明の方法によって提供される治療又は予防は、治療又は予防されるがんの1以上の状態若しくは症状の治療又は予防を含むことができる。例えば、治療又は予防は、腫瘍の退行を促進することを含むことができる。また、本明細書の目的のためには、「予防 (p r e v e n t i o n) 」は、がんの兆候又はその症状若しくは状態を遅延させることを包含することができる。

【0088】

また、哺乳動物のがんの存在を検出する方法も提供される。該方法は、(i) 本明細書に記載された任意の本発明のTCR (及びその機能的変異体) 、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞集団、抗体若しくはその抗原結合部位又は医薬組成物と、哺乳動物由来の1以上の細胞を含む試料を接触させることを含んでいる。それによって複合体を形成し、該複合体を検出し、該複合体の検出が哺乳動物におけるがんの存在を示す指標となる。

【0089】

哺乳動物におけるがんを検出する本発明の方法に関して、細胞の試料は、全細胞、その溶解物又は全細胞溶解物の一部、例えば、核若しくは細胞質画分、全タンパク質画分又は核酸画分を含むことができる。

【0090】

本発明の検出方法の目的のために、該接触を哺乳動物に関して、インビトロ又はインビボで行うことができる。好ましくは、該接触はインビトロで行う。

【0091】

また、該複合体の検出は、当技術分野で公知の任意の数の方法によって行うことができる。例えば、本明細書に記載の本発明のTCR (及びその機能的変異体) 、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、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 (F I T C) 、フィコエリトリン (P E)) 、酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ) 及び元素粒子 (例えば、金粒子) で標識することができる。

【0092】

本発明の方法の目的のために、宿主細胞又は細胞集団が投与されるが、該細胞は、哺乳動物に対して同種又は自己由来であり得る。好ましくは、該細胞は哺乳動物に対して自己由来である。

【0093】

本発明の方法に関して、該がんは以下を含む任意のがんであり得る。任意の急性リンパ球性がん、急性骨髄性白血病、肺胞横紋筋肉腫、骨癌、脳癌、乳癌、肛門・肛門管若しくは肛門直腸の癌、眼の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、頸部・胆嚢若しくは胸膜の癌、鼻・鼻腔若しくは中耳の癌、口腔の癌、膣の癌、外陰部の癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、消化管カルチノイド腫瘍、神経膠腫、ホジキンリンパ腫、下喉頭癌、腎臓癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌、悪性中皮腫、メラノーマ、多発性骨髄腫、鼻咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞腫、中咽頭癌、卵巣癌、陰茎癌、膵臓癌、腹膜癌、大網癌、腸間膜癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、皮膚癌、小腸癌、軟部組織癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌、尿管癌及び膀胱癌である。好ましいがんは、甲状腺癌又は神経芽細胞腫である。

【0094】

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。本明細書で使用される場合、用語「哺乳動物 (m a m m a l) 」は、マウス及びハムスターのようなげっ歯類の哺乳動物及びウサギのようなウサギ目の哺乳動物を含む、任意の哺乳動物を意味するが、これらに限定されない。好ましくは、哺乳動物はネコ科 (ネコ) 及びイヌ科 (イヌ科)

10

20

30

40

50

を含む食肉目である。より好ましくは、哺乳動物はウシ属（ウシ）及びイノシシ属（ブタ）を含むウシ目、又はウマ科（ウマ）を含むウマ目である。最も好ましくは、哺乳動物は霊長目、セボイド目若しくはシモイド目（サル）又は類人猿（ヒト及び類人猿）である。特に好ましい哺乳動物はヒトである。

【0095】

以下の実施例において、本発明をさらに説明するが、言うまでもなく、その範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0096】

以下の材料及び方法を実施例1～7に用いた。

【0097】

細胞株、組織、ペプチド、及び抗体

10%ウシ胎児血清（FBS；Sigma, St. Louis, MO）、10IU/L甲状腺刺激ホルモン（TSH；Sigma-Aldrich）、インスリン-トランスフェリン-セレン（Life Technologies）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（Life Technologies, Carlsbad, CA）中で、ヒュルトレがん細胞株XTC（内分泌外科部門、NCI）を維持した。HLA-A2を発現するXTC株（XTC/A2）を、HLA-A*0201を有するレトロウイルスでXTCを形質導入することにより樹立した（手術部門、NCI）。使用した細胞株はTopalian et al., J. Immunol., 142(10): 3714-25(1989)に記載のように、手術部門において切除腫瘍から作製したメラノーマ株624及び938を含んでいた。Cos7、T2及び293GP細胞株を、NCIの手術部門から入手した。線維芽細胞（手術部門、NCI）及び小気道上皮細胞（Lonza, Walkersville, MD）を含む正常なヒト初代培養株を実験の対照として使用し、10%FBSを含むRPMI 1640培地（Life Technologies）で維持した。対照として用いたがん細胞株は以下の通り：MDA231（乳癌；HLA-A2⁺）、MDA468（乳癌；HLA-A2⁻）、H2087（肺癌；HLA-A2⁺）、BE-3（食道下部のバレット食道関連腺癌；HLA-A2⁺）、SK-BR3（乳癌；HLA-A2⁻）、SK-OV3（卵巣腺癌；HLA-A2⁻）、BIC（ヒト食道腺癌、HLA-A2⁺）及び4つの腎細胞癌腫株（HLA-A2⁺；外科部門、NCI）。

【0098】

全てのペプチド（Pi Prometrics, Huntsville, AL）をHLA-A*0201結合アルゴリズムに基づいて合成した。インビトロ刺激のために、20個の最良なHLA-A2結合性9マー（-mers）及び10個の最良な10マー（-mers）を選択した。ペプチド1～8は、以下のTGエピトープを表す：1-TLLASICWV（配列番号29）、2-NLFGGKFLV（配列番号2）、3-ELPEFLLFL（配列番号30）、4-ALVLEIFTL（配列番号31）、5-ILQRRFLAV（配列番号32）、6-ALLRSGPYM（配列番号33）、7-LVEIFTLL（配列番号34）、8-VQQVQCWCV（配列番号35）。

【0099】

TAQMANリアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）

RNAを、外科的に切除した組織から採取するか、又は商業的に購入した（Clontech, Mountain View, CA）。相補的DNA（cDNA）を、高容量cDNA逆転写キット、又はSUPERScript III First-Strand cDNA合成システム（Life Technologies）によって合成した。抗原の比較のために、以下のRT-PCR Taqmanプローブを使用した：3'TG（009680_47_m1）、TPO（Hs00374163_A1）、IYD（Hs00416923_A1）、FOX E1（Hs0091508_5_S1）、PAX8（Hs00247586_m1）、及びACTB（Hs03023880_g1）（Life Technologies）。TGについては、正常組織パネルにおけるTGの低発現を評価するために、カスタムデザインのTaqmanプライマー/プローブを用いた。絶対コピー数を、7500FASTリアルタイムPCRシステム（Life Technologies）を用いて、各cDNAをコードするプラスミドを対照として作成した標準曲線に基づいて算出した。

【0100】

アデノウイルスの調製

正常な甲状腺に由来する全RNAを、RNeasy miniキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて手術標本から精製し、ランダムヘキサマーをプライマーとしたcDNAを、SUPERS CRIP T III First-Strand cDNA合成システム (Life Technologies) により合成した。TG₄₂₋₈₃₄₈の5'側に由来する2つの短いcDNA断片 (TG₄₂₋₂₁₈₆及びTG₂₁₇₂₋₄₂₉₂) をPCR増幅し、In-Fusionクローニングキット (Clon etech) を用いてpShuttle2ベクターにクローニングした。配列確認後、pShuttle2/TG₄₂₋₄₂₉₂プラスミドをHEK293細胞にトランスフェクションし、ウエスタンブロッティング (抗体: sc-7836, Santa Cruz Biotechnology) を行うことにより、TGタンパク質の産生を調べた。pShuttle2/TG₄₂₋₄₂₉₂プラスミドから、制限酵素消化によりサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター-TG₄₂₋₄₂₉₂断片を得て、pAdeno-Xプラスミドにクローニングした。このプラスミドを、製造者の指示 (ADENO-X発現システム1, Clon etech) に従って、組換えアデノウイルスを増幅するために使用した。増幅したウイルスをADENO-X maxi精製キット (Clon etech, Mountain View, CA) で精製し、PD10ゲルろ過カラム (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) を用いて緩衝液をPBSと交換した。感染性ウイルスの力価を、ADENO-X rapidタイターキット (Clon etech) を用いて測定した。

【0101】

Yeti/A2マウスの免疫

Yeti/HLA-A*0201 (Yeti/A2) を作製するために、Yetiマウス (Stetson et al., J.Exp.Med., 198(7): 1069-76(2003)) を、HLA-A*0201トランスジェニックマウスと交配させた。マウスはまた、IFN-レポーター遺伝子である黄色蛍光タンパク質 (YFP) のトランスジェニックであった。Yetiシステムでは、YFPの発現はIFN-プロモーターによって駆動される。これらのマウスの細胞がIFN-を産生する場合、細胞がYFPも発現するのを蛍光顕微鏡で視覚化することができ、又は蛍光活性化細胞スキャン (FACS) によって検出することができる。1億コロニー形成単位 (CFU) の組換えアデノウイルス/TG₄₂₋₄₂₉₂を用いて、2週間の間隔でYeti/A2を免疫した (半分には尾基部の静脈注射、他方の半分には尾基部への皮下注射を行った)。2回目のアデノウイルスを用いた免疫の2週間後、脾臓細胞を採取し、10%ウシ胎児血清 (FBS; Life Technologies)、55 µM 2-メルカプトエタノール (Life Technologies)、1 mM ビルビン酸ナトリウム (Life Technologies)、1 x MEM 非必須アミノ酸 (Life Technologies)、10 µg/mL ゲンタマイシン (Life Technologies)、10 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン (Life Technologies) 及び250 ng/mL のアンホテリシン B (Life Technologies) を含むRPMI (Life Technologies) に組換えヒト・インターロイキン (IL) -2 (30 IU/mL) を添加した中で、細胞濃度が100万細胞/ウェルとなるように24ウェルプレート上に播種した。個々のペプチドを、最終濃度で1 µM となるように添加した。1週間での再刺激を、以下に記載するように行った。HLA-A*0201陽性のエプスタイン-バーウイルスで形質転換したBリンパ芽球様T2細胞を100 Gyで照射し、1 µMの濃度で各ペプチドを室温で2時間パルスした。培地で3回洗浄した後、T2細胞をYeti脾細胞におよそ1:1の細胞数比となるよう加えた。2回目のインビトロ刺激の2日後、蛍光顕微鏡 (AX10, Zeiss) 及びフローサイトメトリー (FACS; FACSCanto II, BD Biosciences) を用いて黄色蛍光タンパク質 (YFP) 発現を分析した。YFPを発現した培養細胞を、TG発現標的細胞 (TGを発現するようにトランスフェクトしたXTC/A2及びCosA2) との共培養のために選択し、IFN-分泌によって反応性を調べた。T細胞受容体遺伝子をクローニングする目的で、RNeasyキットを用いてTG反応性を有する培養細胞からRNAを精製した。

【0102】

レトロウイルス上清の作製

Robbins et al., J. Clin. Oncol, 29(7): 917-24 (2011)に記載されているように、リ

ポフェクタミン2000 (Life Technologies) を用いて、抗TG - TCR及びエンペロープタンパク質 (RD114) をコードするレトロウイルスベクターで、293GP細胞を共トランスフェクションすることにより、レトロウイルス上清を作製した。リポフェクションの翌日、培地を新しい培地と交換した。上清を48時間後に回収し、抗CD3で刺激した末梢血リンパ球 (PBL) を形質導入するために使用した。

【0103】

抗CD3で刺激したPBLのレトロウイルス導入

全てのPBLは、施設内治験審査委員会が承認した試験に登録された患者からの白血球除去輸血によって収集した。Cohen et al., Cancer Res., 66(17): 8878-86 (2006)に記載のように、5%ヒト血清 (Valley Biomedical Inc., Winchester, VA)、及びPBLにとって300IU/mlとなる濃度のIL-2 (Prometheus, San Diego, CA) を含有するAIM-V培地 (Life Technologies) を用いて、リンパ球を培養した。同種異系ドナーに由来するPBLを、形質導入が行われる前の2日間、可溶性の抗CD3 (OKT3、50ng/ml) 及びIL-2 (300IU/ml) で刺激した。刺激後、レトロネクチン (10µg/mlの濃度で400µLのPBSに溶解されている; 宝酒造、日本) で最初にコートした24ウェルプレートに、細胞を加え、続いてウイルス含有培養上清を添加し、遠心分離 (2000×g、32、2時間) した。ウイルスを添加した後、刺激したPBLを1ウェル当たり 5×10^5 細胞の濃度で添加し、プレートを1000×gで10分間遠心分離した。プレートを5%CO₂インキュベーター内において、37で一晩インキュベートした。翌日、新しいレトロネクチンでコーティングし、ウイルスを添加した24ウェルプレートに細胞を移すことで、2回目の形質導入を行った。細胞を $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlの間の細胞密度に維持した。形質導入効率を、形質導入したPBLにおけるマウスTCR - 発現のFACS分析で確認した。

【0104】

サイトカイン放出アッセイ

既に、Wang et al., J. Immunol Methods, 366(1-2): 43-51 (2011)に記載のように、形質導入したPBLによるインターフェロン (IFN) - の放出を決定した。簡潔には、10%FBSを含むRPMI中で37、5%CO₂条件下で、レトロウイルス形質導入細胞 (1×10^5) を18~22時間、 5×10^4 標的細胞 (XTC、XTC/A2、CosA2又はTGでトランスフェクトしたCosA2) 又は対照腫瘍細胞株と共に培養した。後日、IFN - 分泌を、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により決定した。

【0105】

実施例1

この実施例は、TGが正常組織、原発性甲状腺癌及びリンパ節転移癌において発現していることを実証する。

【0106】

甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、ペアード・ボックス8 (PAX8)、フォークヘッドボックスE1 (FOX E1)、ヨードチロシン脱ヨウ素酵素 (IYD) 及びサイログロブリン (TG) (van Staveren et al., Cancer Res., 67(17): 8113-20 (2007)) を含む甲状腺特異的抗原の発現を、TAQMAN定量的RT - PCRによって調べた。これらの全ての甲状腺特異的抗原のうち、TGは正常な甲状腺、原発性甲状腺癌、及び甲状腺癌のリンパ節転移癌、において最高の発現を維持した (図1A)。非甲状腺、正常ヒト組織で、TGの低発現を観察した。甲状腺組織におけるTG発現は、他の正常な組織における発現よりも高かった (図1B)。これらのデータに基づいて、養子細胞治療のための甲状腺特異的標的抗原の候補としてTGを同定した。

【0107】

実施例2

この実施例はTG₄₇₀₋₄₇₈によるYeti/A2脾細胞の刺激を実証する。

【0108】

10

20

30

40

50

H L A - A 0 2 0 1 制限ネズミ T 細胞は、H L A - A 0 2 0 1 及び I F N - レポーター遺伝子（黄色蛍光タンパク質）をトランスジェニックした Y e t i マウスを、T G 遺伝子の 5' 半分（T G₄₂₋₄₂₉₂）をコードするアデノウイルスでワクチンすることによって作製した。該マウスは、T G 含有アデノウイルスでワクチン接種した日を 0 日目とし、14 日目に同じアデノウイルスで 2 回目のワクチン接種を行った。28 日目に脾臓細胞を採取し、採取して直ぐインビトロで T G ペプチドによって刺激し、35 日目に 2 回目のインビトロでの T G ペプチド刺激を行った。

【0109】

2 回目のインビトロ刺激の 2 日後、Y e t i / A 2 脾細胞による I F N - レポーター遺伝子 Y F P の発現を、フローサイトメトリーによって測定した。T G 類縁ペプチドでパルスした T 2 細胞との共培養後、刺激した脾細胞における Y F P 発現を、また紫外線顕微鏡法で評価した。

10

【0110】

T G₄₇₀₋₄₇₈ エピトープ（NLFGGKFLV；配列番号 2）を表すペプチド 2 で刺激した細胞は、フローサイトメトリー及び顕微鏡検査によって決定したように、Y F P シグナルを産生した。このバルク培養細胞を、無関係（T 2 / M A R T）又は T G₄₇₀₋₄₇₈ ペプチド（T 2 / T G）でパルスした T 2 細胞、G F P 又は T G c D N A でトランスフェクトした C O S A 2 細胞（C o s A 2 / G F P 及び C o s A 2 / T G）、H L A - A 2 でトランスフェクションした若しくはしなかった T G⁺ 甲状腺癌細胞株である X T C 細胞に対する反応性について試験した（図 2）。ペプチド 2 で刺激した脾細胞は、X T C / A 2 細胞、C o s A 2 / T G 細胞及び類縁ペプチドでパルスした T 2 細胞に対して強い反応性を示した。

20

【0111】

実施例 3

この実施例は実施例 2 の T G₄₇₀₋₄₇₈ で刺激した脾細胞からのネズミ抗 T G - T C R の単離を実証する。

【0112】

全 R N A を、R N A 単離キット（RNeasy, Qiagen）によりバルク培養細胞から単離した。T C R 及び 鎖の c D N A の 5' 末端の増幅を、SMARTer 5'RACE キット（Clontech）によって、以下のプライマーを用いて行った：ユニバーサルプライマー A ミックス（Clontech）、特異的プライマー 5'-GGCTACTTTCAGCAGGAGGA-3'（配列番号 36）、特異的プライマー 5'-AGGCCTCTGCACTGATGTTTC-3'（配列番号 37）。T C R 及び 鎖の c D N A 分子を T A クローニングにより T O P O ベクターに挿入した。鎖及び 鎖の 48 の個々のコロニーからのプラスミドを精製し、配列決定した。この配列分析によってオリゴクローニングを明らかにした。鎖が TRAV3D-3*02/J22*01 であるのは 27 / 48 コロニー、鎖が TRAV15N-1*01 であるのは 21 / 48 コロニー及び 鎖が TRBV26*01/D2*01/J2-5*01 であるのは 45 / 47 コロニーであった。TRAV15N-1*01 は非生産的組換えであったため無視した。シーケンスデータに基づいて、以下のプライマーを合成した（Life Technologies）：

30

鎖については T C R フォワード（配列番号 38）及び T C R リバーズ（配列番号 39）及び 鎖については T C R フォワード（配列番号 43）及び T C R リバーズ（配列番号 40）。R T - P C R により 鎖及び 鎖の全長 c D N A を単離した。鎖及び 鎖 c D N A は、それぞれ配列番号 11 及び 12 をコードした。

40

【0113】

実施例 4

この実施例は実施例 3 のネズミ抗 T G - T C R をコードするレトロウイルス組換え発現ベクターの作製を実証する。

【0114】

実施例 3 に記載の全長の 鎖及び 鎖を単離した後、配列番号 41、42 及び 43 を 7 : 2 : 1 のモル比で混合したものをフォワードプライマー、配列番号 40 をリバーズプライマーとして用いて、自己切断 2 A ペプチド配列を 鎖の 5' に導入した。

50

【 0 1 1 5 】

増幅後、鎖及び 2 A - 鎖を、ネズミ幹細胞ウイルス・ベースのレトロウイルスベクター p M S G V (Zhao et al., J. Immunol., 174(7): 4415-23 (2005)) の変異物であるレトロウイルスベクター M S G V 1 (配列番号 2 1) に、I n F u s i o n 反応 (Clonetechnology) によりクローニングした。マウス抗 T G - T C R をコードするプラスミドは、自己切断 p 2 A 領域 (配列番号 2 8) によって隔てられた鎖及び鎖 (それぞれ、配列番号 1 1 及び 1 2) をコードする 7 3 9 4 塩基対の配列であった。サンガーシーケンシングによりプラスミドの配列を確認した。

【 0 1 1 6 】

実施例 5

この実施例は、ネズミ抗 T G - T C R をコードするレトロウイルスベクターによるドナー P B L の形質導入を実証する。

【 0 1 1 7 】

抗 C D 3 で刺激したヒト・ドナー P B L を、実施例 4 のベクターにより、レトロウイルスで形質導入した。形質導入の 3 日後、T 細胞を、抗 C D 3、抗 C D 8 及びマウス抗 T C R 鎖又は抗 M A R T - 1 / H L A - A 2 四量体に対する抗体で標識することにより F A C S 分析を実施した。3 人のドナー患者に由来する P B L の形質導入効率は高く (80 ~ 90%)、C D 4 + T 細胞と C D 8 + T 細胞との間に有意差はなかった。実験を 5 回以上実施し、それぞれで同様の結果であった。

【 0 1 1 8 】

実施例 6

この実施例は H L A - A * 0 2 0 1 + / T G + 標的に対するネズミ抗 T G - T C R の反応性を実証する。

【 0 1 1 9 】

抗 C D 3 で刺激した P B L を、実施例 4 のネズミ抗 T G - T C R 又は抗 M A R T - 1 T C R をコードするレトロウイルスベクターで形質導入した。非形質導入細胞を、対照として使用した。形質導入の 3 日後に、 1×10^5 の形質導入細胞又は対照細胞を、T G (NLFGGKFLV (配列番号 2)) (T 2 / T G) 又は M A R T - 1 (T 2 / M A R T - 1) ペプチドのいずれかでパルスした 5×10^4 の T 2 細胞と共培養した。ネズミ抗 T G - T C R (配列番号 1 1 及び 1 2) を発現する P B L は、非常に低い濃度 (< 0.1 nM) でペプチドを認識し、抗 M A R T - 1 T C R 対照を認識しなかった (図 3 A)。

【 0 1 2 0 】

マウス抗 T G - T C R (配列番号 1 1 及び 1 2) をコードするベクターで形質導入した P B L について、腫瘍細胞株又は T G を発現するようにトランスフェクトした細胞株との共培養後に、ヒト I F N - γ の放出を決定することによって反応性を分析した。X T C / A 2 及び C o s A 2 / T G を含む、H L A - A 2 + T G + 細胞株に応答するネズミ抗 T G - T C R (配列番号 1 1 及び 1 2) をコードするベクターで形質導入した P B L は、高レベルの I F N - γ を放出した (図 3 B)。

【 0 1 2 1 】

実施例 7

この実施例は H L A - A * 0 2 0 1 + / T G + 標的に対するネズミ抗 T G - T C R の特異性を実証する。

【 0 1 2 2 】

X T C、X T C / A 2、並びに H 2 0 8 7、B I C、B E - 3、S K - O V 3、S K - B R 3、M D A 2 3 1、M D A 4 6 8、4 つの腎細胞癌株、正常ヒト線維芽細胞及び小気道上皮細胞を含む、T G 及び H L A - A * 0 2 0 1 のいずれか又は両方を発現しない細胞株パネル及び正常組織に対する反応性を分析することによって、ネズミ抗 T G - T C R (配列番号 1 1 及び 1 2) の特異性を試験した (表 1)。表 1 に示すように、全ての細胞株は X T C / A 2 を除き、H L A - A * 0 2 0 1 - 及び T G - のいずれか又は両方であった。ネズミ抗 T G - T C R (配列番号 1 1 及び 1 2) をコードするベクターで形質導入した

10

20

30

40

50

P B Lは、H L A - A 2 ⁺ / T G ⁺ X T C / A 2細胞株に対してのみ反応性を示し、T G陰性又はH L A - A ^{*} 0 2 0 1 陰性の任意の細胞株に対して反応性を示さなかった。H L A - A ^{*} 0 2 0 1 ⁻ 患者及びH L A - A ^{*} 0 2 0 1 ⁺ 患者由来の、T Gを発現している、新しい切除組織、正常な組織、原発性甲状腺組織に対するネズミ抗T G - T C Rの更なる試験により、ネズミ抗T G - T C R形質導入P B Lは、I F N - γ を分泌し、H L A - A ^{*} 0 2 0 1 ⁺ / T G ⁺ に対する反応性を示したが、H L A - A ^{*} 0 2 0 1 ⁻ / T G ⁺ 組織に対する反応性を示さなかった。

【 0 1 2 3 】

【表 1】

表 1

細胞株	HLA-A2 ⁺	Tg ⁺
XTC	-	+
XTC/A2	+	+
mel624	+	-
mel938	+	-
線維芽細胞	+	-
小気道上皮細胞	-	-
MDA231	+	-
MDA468	-	-
SK-OV3	-	-
SK-BR3	-	-
H2087	+	-
BE-3	+	-
BIC	+	-
RCC#1	+	-
RCC#2	+	-
RCC#3	+	-
RCC#4	+	-

【 0 1 2 4 】

実施例 8

この実施例はヒト抗T G - T C Rの単離及びP B Lへのヒト抗T G - T C Rの形質導入効率を実証する。

【 0 1 2 5 】

T G _{4 2 - 4 2 9 2} 由来の 3 0 個のコンピューターアルゴリズムで予測したH L A - A

10

20

30

40

50

2 高結合ペプチドで、ヒトの P B L を個別に 4 回刺激した。4 回のインビトロ刺激後、T G₃₋₁₁ ペプチド (LVLEIFTLL、配列番号 5 8) で刺激した培養細胞は X T C / A 2 に対して反応性を示した。この培養細胞について限界希釈クローニングを行い、分析した 2 8 クローンのうち、1 つのクローン 1 4 が T G 特異的の反応性を有していた。細胞の増殖後、5' R A C E、続いて R T - P C R によって T C R 及び 遺伝子をクローニングした (それぞれ配列番号 5 4 及び 5 5 をコードする)。P B L を、ヒト抗 T G - T C R をコードするレトロウイルス発現ベクターで形質導入した。

【 0 1 2 6 】

形質導入した P B L におけるヒト抗 T G - T C R 発現の形質導入効率を、F A C S 分析で確認した。2 人のドナー患者由来の P B L の形質導入効率は高く (7 5 ~ 8 0 %)、C D 4⁺ T 細胞と C D 8⁺ T 細胞との間に有意差はなかった。

【 0 1 2 7 】

実施例 9

この実施例においては実施例 8 のヒト抗 T G - T C R の反応性を示す。

【 0 1 2 8 】

実施例 8 のヒト抗 T G - T C R を形質導入した P B L を種々の濃度の M A R T - 1 又は T G₃₋₁₁ でパルスした T 2 細胞と共培養し、I F N - γ を測定した (p g / m l)。結果を表 2 A に示す。

【 0 1 2 9 】

【表 2】

表 2 A

パルスしたペプチド濃度	IFN- γ (pg/ml)	
	T2/MART-1	TG ₃₋₁₁
1000 nM	73.4	29734.3
100 nM	73.6	28600.9
10 nM	64.7	16848.2
1 nM	68.2	2522.1
0.1 nM	54.5	325.5
0.01 nM	89.2	93.2
0.001 nM	81.8	72.9
0 nM	70.3	75.7

【 0 1 3 0 】

実施例 3 のネズミ抗 T G - T C R で形質導入した P B L を、種々の濃度の M A R T - 1 又は T G₄₇₀₋₄₇₈ でパルスした T 2 細胞と共培養した。結果を表 2 B に示す。

【 0 1 3 1 】

【表 3】

表 2 B

パルスしたペプチド濃度	IFN- γ (pg/ml)	
	T2/MART-1	T2/TG ₄₇₀₋₄₇₈
1000 nM	373.7	47261.6
100 nM	125.8	33459.2
10 nM	50.2	27326.8
1 nM	41.5	13124.8
0.1 nM	36.5	8680
0.01 nM	41	1236.8
0.001 nM	38.2	136.1
0 nM	37.7	55.8

10

20

【0132】

表 2 A 及び 2 B に示すように、ネズミ抗 TG - TCR の反応性は、ヒト抗 TG - TCR の反応性よりも優れていたが、ヒト抗 TG - TCR で形質導入した PBL は、TG₃₋₁ でパルスした細胞に対して反応性であった。

【0133】

実施例 8 のヒト抗 TG - TCR 又は実施例 3 のマウス抗 TG - TCR で形質導入した PBL を、COSA2 / GFP 細胞、COSA2 / TG 細胞、624Me1 細胞、XTC 細胞又は XTC / A2 細胞と共培養し、IFN- を測定した (pg / ml)。結果を表 3 に示す。

【0134】

30

【表 4】

表 3

	IFN- γ (pg/ml)				
	COSA2/ GFP	COSA2/ TG	624Me1	XTC	XTC/A2
ヒト抗TG TCR	15.5	8794.7	1.8	5.7	735.3
ネズミ抗TG TCR	19.2	25298.4	7.2	2.3	21371.9

40

【0135】

表 3 に示すように、マウス抗 TG - TCR の反応性はヒト抗 TG - TCR の反応性よりも優れていたが、ヒト抗 TG - TCR で形質導入した PBL は、HLA - A2⁺ / TG⁺ 細胞株に対して反応性であった。

【0136】

別の実験において、形質導入していない (UT)、又は実施例 8 のヒト抗 TG - TCR、実施例 3 のマウス抗 TG - TCR 若しくは抗 MART - 1 TCR で形質導入した 2 人の患者由来の PBL を、COSA2 / GFP 細胞、COSA2 / MART - 1 細胞、TG を発現するよう形質導入した Cos7 - HLA - A^{*}01 細胞 (COSA1 / TG 細胞)、COSA2 / TG 細胞、624Me1 細胞 (MART - 1⁺)、938Me1 細胞、X

50

T C 細胞又は X T C / A 2 細胞と共培養し、I F N - を測定した (p g / m l) 。結果を表 4 A (患者 1) 及び表 4 B (患者 2) に示す。

【 0 1 3 7 】

【表 5】

表 4 A

	IFN-γ (pg/ml)			
	UT	抗 MART-1 TCR	ヒト抗 TG TCR	ネズミ抗 TG TCR
COSA2/GFP	0	0	0	0
COSA2/MART-1	0	20000	0	0
COSA1/TG	0	0	0	0
COSA2/TG	0	0	15500	20000
624Me1	0	7000	0	0
938Me1	0	0	0	0
XTC	0	0	0	0
XTC/A2	0	0	500	20000

【 0 1 3 8 】

【表 6】

表 4 B

	IFN-γ (pg/ml)			
	UT	抗 MART-1 TCR	ヒト抗 TG TCR	ネズミ抗 TG TCR
COSA2/GFP	0	0	0	0
COSA2/MART-1	0	20000	0	0
COSA1/TG	0	0	0	0
COSA2/TG	0	0	14800	20000
624Me1	0	3800	0	0
938Me1	0	0	0	0
XTC	0	0	0	0
XTC/A2	0	0	300	17900

【 0 1 3 9 】

H L A - A * 0 2 0 1 - 患者及び H L A - A * 0 2 0 1 + 患者に由来する、T G を発現し、新しく切除した、正常な、原発性甲状腺組織に対するヒト抗 T G - T C R のさらなる試験によって以下を実証した。I F N - 分泌を測定した場合、ヒト抗 T G - T C R を形質導入した P B L は H L A - A * 0 2 0 1 + / T G + に対して反応性であったが、H L A - A * 0 2 0 1 - / T G + 組織に対しては反応性ではなかった。

【 0 1 4 0 】

本明細書中に引用した刊行物、特許出願及び特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個別にかつ具体的に援用され、その全体が本明細書に記載されているのと同程度に本明

10

20

30

40

50

細書に援用される。

【0141】

本発明を記載する文脈（特に添付の特許請求の範囲の文脈）における用語「a」、「an」、「the」及び「少なくとも1つの(at least one)」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中で別段の指示がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、単数及び複数形を含むものとして解釈されるべきである。「少なくとも1つ(at least one)」という用語に続く1以上の項目のリスト（例えば、「A及びBの少なくとも1つ(at least one of A and B)」）の使用は、別段の記載がない限り、又は文脈によって明確に矛盾しない限り、リストした項目（A若しくはB）から選択した1つの項目又は2以上の任意の組み合わせ、を意味するものと解釈されるべきである。「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」及び「含有する(containing)」という用語は、別段の記載がない限り、制限のない用語（すなわち、「含むが、これに限定されない(including, but not limited to)」を意味する）として解釈されるべきである。本明細書中の値の範囲の列挙は、本明細書中に別段の指示がない限り、範囲内の各別個の値を個別に指す簡略方法として役立つことを意図しており、本明細書において個々の値はそれぞれ個別に列挙されているかのように、個々の値が明細書に取り込まれる。本明細書中に記載された全ての方法は、本明細書中で他に指示されない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供される任意の及び全ての例又は例示的な言語（例えば、「など(such as)」）の使用は、単に本発明を

10

20

【0142】

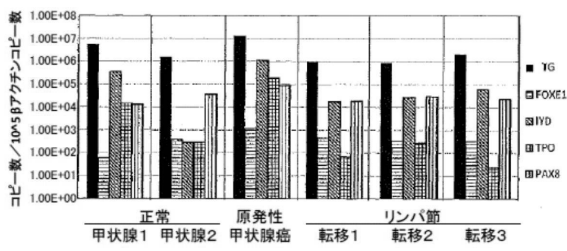
本発明の好ましい実施形態は、本発明を実施するために本発明者らに知られている最良の形態を含むものとして、本明細書に記載する。これらの好ましい実施形態の変形形態は、上記の明細書を読むことによって当業者にとって明らかになるであろう。本発明者らは、当業者がこのような変形を適切に使用することを期待しており、本発明者らは本発明が本明細書に具体的に記載されたものとは別の方法で実施されることを意図する。したがって、本発明は適用法によって許容されるように、本明細書に添付した特許請求の範囲に記載された主題の全ての改変及び均等物を含む。さらに、本明細書中で他に指示されない限り、又は文脈によって明らかに否定されない限り、それらの全ての可能な変形例における上記要素の任意の組み合わせが本発明に包含される。

30

【図 1】

図 1 A

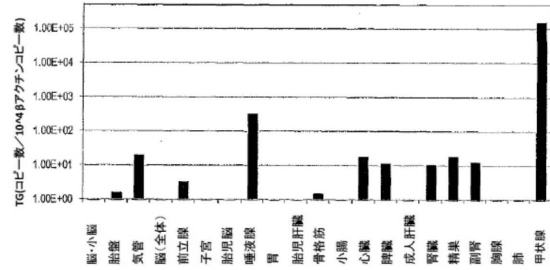
A



【図 2】

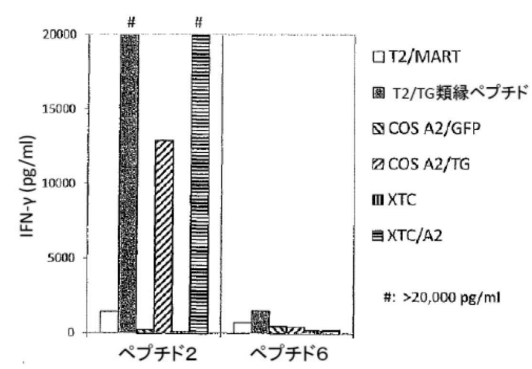
図 1 B

B



【図 3】

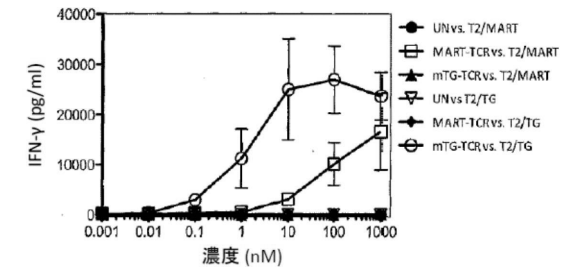
図 2



【図 4】

図 3 A

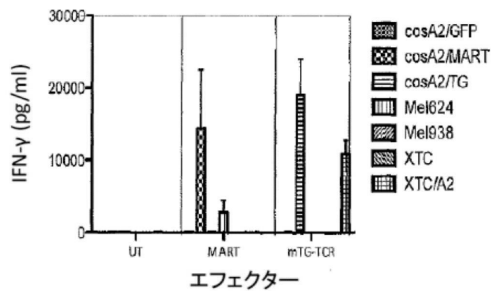
A



【図 5】

図 3 B

B



【配列表】

0006666342000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P 5/14

(74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子

(74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100137729
弁理士 赤井 厚子

(74)代理人 100151301
弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 花田 賢一
アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 1 7、ベセスダ、コンウェイ ロード 5 8 2 2

(72)発明者 ワン、チョン ジェイ .
アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 5 4、ポトマック、アンシン サークル ドライヴ 1
2 4 3 1

(72)発明者 ヤン、ジェームズ シー .
アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 1 4、ベセスダ、ルーズヴェルト ストリート 5 3 0
5

(72)発明者 ユ、ジャ
アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 5 4、ポトマック、ベッドフォードシャー コート 9
9 1 6

審査官 清野 千秋

(56)参考文献 J. Clin. Endocrinol. Metab. , 2 0 1 2 年 , 97(4) , 1347-1354

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
WPIDS/WPIX(STN)