

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-510257

(P2017-510257A)

(43) 公表日 平成29年4月13日(2017.4.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-554603 (P2016-554603)
 (86) (22) 出願日 平成27年3月5日 (2015.3.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年10月4日 (2016.10.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/050643
 (87) 国際公開番号 W02015/132598
 (87) 国際公開日 平成27年9月11日 (2015.9.11)
 (31) 優先権主張番号 1403905.1
 (32) 優先日 平成26年3月5日 (2014.3.5)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 1416908.0
 (32) 優先日 平成26年9月25日 (2014.9.25)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 507299817
 ユーシーエル ビジネス ピーエルシー
 イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティ
 ーピー ロンドン, トットナム コート
 ロード 97, ザ ネットワーク ビ
 ルディング
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞受容体ベータ定常領域に対する抗原結合ドメインを有するキメラ抗原抗体 (CAR)

(57) 【要約】

本開示は、T C R ベータ定常領域 1 (T R B C 1) または T R B C 2 に選択的に結合する抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) ; 細胞 ; そのような C A R を含むそのような T 細胞 ; および対象における T 細胞リンパ腫または白血病を処置するための、そのような細胞の使用に関する。本発明者らは、対象における悪性 T 細胞を、顕著な割合の健康な T 細胞に影響を及ぼすことなく枯渇させることを可能にする方法を考案した。具体的には、T 細胞悪性腫瘍の処置に使用するための T R B C 1 特異的キメラ抗原受容体 (C A R) および T R B C 2 特異的キメラ抗原受容体 (C A R) を開発した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T C R ベータ定常領域 1 (T R B C 1) または T R B C 2 に選択的に結合する抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) 。

【請求項 2】

T R B C 1 に選択的に結合する、請求項 1 に記載の C A R 。

【請求項 3】

前記抗原結合ドメインが、以下の相補性決定領域 (C D R) :

V H C D R 1 : 配列番号 7 ;

V H C D R 2 : 配列番号 8 ;

V H C D R 3 : 配列番号 9 ;

V L C D R 1 : 配列番号 10 ;

V L C D R 2 : 配列番号 11 ; および

V L C D R 3 : 配列番号 12

を含む可変重鎖 (V H) および可変軽鎖 (V L) を有する、請求項 2 に記載の C A R 。

【請求項 4】

前記抗原結合ドメインが、配列番号 1 で示される配列を有する可変重鎖 (V H) および配列番号 2 で示される配列を有する可変軽鎖 (V L) を含む、請求項 2 に記載の C A R 。

【請求項 5】

前記抗原結合ドメインが、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有する s c F v を含む、請求項 2 に記載の C A R 。

【請求項 6】

配列番号 4、5 および 6 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の C A R

【請求項 7】

T R B C 2 に選択的に結合する、請求項 1 に記載の C A R 。

【請求項 8】

前記請求項のいずれかに記載の C A R をコードする核酸配列。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の核酸配列を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の C A R を含む細胞。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の T 細胞。

【請求項 12】

請求項 10 または 11 に記載の細胞を作製するための方法であって、細胞に、請求項 8 に記載の核酸配列または請求項 9 に記載のベクターを形質導入またはトランスフェクトするステップを含む方法。

【請求項 13】

対象における T 細胞リンパ腫または白血病を処置するための方法における使用のための請求項 10 または 11 に記載の細胞であって、前記方法は、

前記 T C R B 1 または T C R B 2 選択的 C A R を含む前記細胞を前記対象に投与して、悪性 T 細胞と、前記悪性 T 細胞と同じ T R B C を発現する正常 T 細胞との選択的な枯渇を引き起こすが、前記悪性 T 細胞では発現されない T R B C を発現する正常 T 細胞の枯渇を引き起こさないステップを含む、細胞。

【請求項 14】

前記方法が、前記対象由来の悪性 T 細胞の T C R ベータ定常領域 (T C R B) を調査して、それが T R B C 1 または T R B C 2 を発現するかどうかを決定するステップも含む、請求項 13 に記載の使用のための細胞。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記 T 細胞リンパ腫または白血病が、特定不能末梢性 T 細胞リンパ腫 (P T C L - N O S) ; 血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫 (A I T L)、未分化大細胞型リンパ腫 (A L C L)、腸疾患関連 T 細胞リンパ腫 (E A T L)、肝脾 T 細胞リンパ腫 (H S T L)、節外性 N K / T 細胞リンパ腫鼻型、皮膚 T 細胞リンパ腫、原発性皮膚 A L C L、T 細胞前リンパ球性白血病および T 細胞急性リンパ芽球性白血病から選択される、請求項 1 3 または 1 4 に記載の使用のための細胞。

【請求項 1 6】

対象における T 細胞リンパ腫または白血病を診断するための方法であって、前記対象から単離された試料中の、T R B C 1 陽性または T R B C 2 陽性である総 T 細胞の百分率を決定するステップを含む方法。

10

【請求項 1 7】

約 8 0 % を超える T R B C 1 陽性または T R B C 2 陽性 T 細胞の百分率が、T 細胞リンパ腫または白血病の存在を示す、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記試料が末梢血試料または生検である、請求項 1 6 または 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

C D 3 に結合する作用因子を使用して前記試料中の総 T 細胞を同定するか、または前記試料から総 T 細胞を単離する、請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、T 細胞リンパ腫または白血病の処置において有用な細胞および作用因子に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

リンパ系悪性腫瘍は、T 細胞に由来するものまたは B 細胞に由来するもののいずれかに大きく分けることができる。T 細胞悪性腫瘍は、臨床的かつ生物学的に不均一な障害の群であり、合わせて非ホジキンリンパ腫の 1 0 ~ 2 0 % および急性白血病の 2 0 % を占める。最も一般的に同定される組織学的サブタイプは、特定不能末梢性 T 細胞リンパ腫 (P T C L - N O S) ; 血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫 (A I T L) および未分化大細胞型リンパ腫 (A L C L) である。全ての急性リンパ芽球性白血病 (A L L) のうちの一部 2 0 % が T 細胞表現型である。

30

【0 0 0 3】

これらの状態は、一般には、例えば B 細胞悪性腫瘍と比較して攻撃的に挙動し、推定 5 年生存率はわずか 3 0 % である。T 細胞リンパ腫の場合では、播種性疾患、好ましくない国際予後指標 (I P I : I n t e r n a t i o n a l P r o g n o s t i c I n d i c a t o r) スコアおよび節外性疾患の罹患率を示す患者の高い割合を伴う。化学療法単独では通常は有効ではなく、現行の処置で治癒する患者は 3 0 % 未満である。

40

【0 0 0 4】

さらに、B 細胞悪性腫瘍が抗 C D 2 0 モノクローナル抗体リツキシマブなどの免疫療法によって転帰が劇的に改善されるのとは異なり、T 細胞悪性腫瘍を処置するために利用可能な、同等に有効であり、毒性が最小である免疫療法薬は現在存在しない。T 細胞障害に対する免疫療法の開発における重要な難しさは、クローン T 細胞と正常 T 細胞のマーカー発現がかなり重複しており、クローン (悪性) 細胞を同定することが明白に可能な単一の抗原が存在しないことである。

【0 0 0 5】

B 細胞悪性腫瘍を処置するために汎 B 細胞抗原を標的とする場合にも同じ問題が存在する。しかし、この場合、B 細胞コンパートメントの同時枯渇により、大多数の患者により

50

容易に寛容される比較的軽微な免疫抑制がもたらされる。さらに、特に長期間にわたる正常Bコンパートメントの枯渇が生じる療法では、プールされた免疫グロブリンを投与することによって正常Bコンパートメントの喪失を大きく抑止することができる。T細胞悪性腫瘍を標的とする場合には状況が全く異なる。この場合、T細胞コンパートメントの同時枯渇により、重度の免疫抑制および重度の毒性が生じる。さらに、T細胞コンパートメントの喪失を減らす満足のいく方法は存在しない。

【0006】

毒性は、一部において、治療用モノクローナル抗体アレムツズマブの臨床効果によって例示される。この作用因子は、CD52を発現する細胞を溶解し、T細胞悪性腫瘍においていくらかの有効性がある。この作用因子の有用性は、T細胞の枯渇に大きく起因して細胞免疫不全が極めて大きく、感染のリスクが著しく上昇することによって著しく限定される。

10

【0007】

したがって、上記の不都合を伴わない、T細胞悪性腫瘍の標的化処置のための新しい方法が必要とされている。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、T細胞受容体/CD3複合体の図である。T細胞受容体は、6つの異なるタンパク質鎖から形成され、細胞表面上に発現するにはこれらが小胞体に集合しなければならない。CD3複合体の4つのタンパク質(CD3、CD3、CD3およびCD3)がT細胞受容体(TCR)を包む。このTCRは、複合体に特定の抗原特異性を与え、2つの鎖:TCRおよびTCRで構成される。各TCR鎖は、膜に対して遠位の可変成分および膜に対して近位の定常成分を有する。ほぼ全てのT細胞リンパ腫および多くのT細胞白血病でTCR/CD3複合体が発現する。

20

【図2】図2は、T細胞受容体再構成の間のT細胞受容体-定常領域(TRBC)-1とTRBC2との分離を示す図である。各TCRベータ鎖は、特定のベータ可変(V)領域、多様性(D)領域、連結(J)領域および定常(TRBC)領域のゲノム組換えにより形成される。ヒトゲノムは、TRBC1およびTRBC2として公知の2つの非常に類似した機能的に同等のTRBC遺伝子座を含有する。TCR遺伝子再構成の間、J領域がTRBC1またはTRBC2のいずれかと再結合する。この再構成は恒久的なものである。T細胞は、それらの表面上に単一のTCRの多くのコピーを発現し、したがって、各T細胞は、鎖定常領域がTRBC1またはTRBC2のいずれかによってコードされるTCRを発現する。

30

【図3】図3は、ヒトTRBC1およびヒトTRBC2のアミノ酸レベルでのアラインメントを示す図である。TRBC1によってコードされるTCR定常鎖とTRBC2によってコードされるTCR定常鎖は、4つのアミノ酸の差異でのみ異なる:TRBCの3位においてK/N;TRBCの4位においてN/K;TRBCの36位においてF/Y;TRBCの135位においてV/E。

【図4】図4は、JOVI-1抗体がTRBC1には結合するがTRBC2には結合しないことを決定的に実証するグラフである。細胞の遺伝子操作を使用して、JOVI-1モノクローナル抗体がTCR定常鎖のTRBC1パリアントを認識することを決定的に実証した。トリシストロン性レトロウイルスカセットを生成した。これは、マイナー組織適合性抗原HA1を認識するヒトTCRのTCR鎖およびTCR鎖の両方を、都合のよいマーカー遺伝子として切断型ヒトCD34と一緒にコードした。HA1TCRは元来はTRBC2である。TRBC1をTRBC2から弁別するTCR定常領域内の4つの残基をTRBC1によってコードされるものに変化させた以外は第1のレトロウイルスカセットと同一である第2のレトロウイルスカセットを生成した。TCR鎖とTCR鎖の両方をロックアウトしたジャーカットT細胞に、いずれかのベクターを用いて形質導入した。これらの細胞を、CD34に対する抗体とコンジュゲートした、汎TCR/CD3抗体またはモノクローナルJOVI-1のいずれかを用いて染色し、フローサイトメータ

40

50

ーで分析した。上の列は、汎 T C R / C D 3 抗体対 C D 3 4 (形質導入のマーカー)を用いた染色を実証し、下の列は J O V I - 1 対 C D 3 4 を用いた染色を実証する。形質導入された細胞において同様の T C R / C D 3 染色が実証されるが、T R B C 1 + v e 細胞のみが J O V I - 1 で染色される。したがって、J O V I - 1 は T R B C 1 に特異的であり、さらに、T R B C 1 および 2 種の T C R を区別するために抗体を使用することが可能である。

【図 5】図 5 は、J O V I - 1 m A b により、T R B C の残基 3 および 4 が認識されることによって T R B C 1 が T R B C 2 から弁別されることを示すグラフである。J O V I - 1 によってどのように T R B C 1 が T R B C 2 から識別されるかを正確に決定するために、上記の H A 1 T C R T R B C 2 構築物を変異させて 2 種の T R B C 1 / 2 ハイブリッドを作製した。T C R 定常鎖の残基 3 および 4 のみを T R B C 2 のものから T R B C 1 において見いだされるものに変化させるように追加的なバリエーションを生成した。残基 3 6 のみを T R B C 2 において見いだされるものから T R B C 1 において見いだされるものに変化させたさらなるバリエーションを作製した。T C R ノックアウトジャーカット T 細胞に、これらの新しい構築物を用いて形質導入した。図 4 に記載されている、T R B C 2 および T R B C 1 を形質導入した元のジャーカットを対照として使用した。ジャーカット T 細胞を J O V I - 1 で染色し、フローサイトメーターを用いて分析した。J O V I - 1 の染色を形質導入されていない T C R ノックアウトジャーカット T 細胞の染色の上に重ねている。J O V I - 1 により T R B C 1 T C R を発現するジャーカットは染色されたが、T R B C 2 T C R は染色されなかった。J O V I - 1 により T R B C 残基 3 および 4 のみ T R B C 1 のものである T R B C 1 / 2 ハイブリッドは染色された。J O V I - 1 により T R B C 残基 3 6 のみ T R B C 1 のものであるジャーカット T 細胞は染色されなかった。

【図 6】図 6 は、T R B C 1 の正常ドナー T 細胞発現の例を示すグラフである。正常ドナー末梢血単核細胞を C D 3 に対する抗体、C D 4 に対する抗体、C D 8 に対する抗体および J O V I - 1 に対する抗体で染色し、フローサイトメーターによって分析した。C D 4 + T 細胞集団および C D 8 + T 細胞集団が上のパネルに示されている。この集団の各々をゲーティングし、前方散乱対 J O V I - 1 染色をそれぞれ Y 軸および X 軸に示す。これらのデータから、C D 4 + コンパートメントおよび C D 8 + コンパートメントの両方が、T R B C 1 + v e である細胞および T R B C 1 - v e である細胞を含有することが示される。これは、1 ドナーからの代表的なデータである。

【図 7】図 7 は、何名かの正常ドナーにおける T R B C 1 + T 細胞を示すグラフである。10 名の正常ドナーから採血し、上の図 4 に記載の通り末梢血単核細胞を染色した。C D 4 コンパートメントおよび C D 8 コンパートメントの両方における T R B C 1 T 細胞の割合の集計データが、中央値および範囲と共に棒グラフに示されている。全てのドナーが T R B C 1 + コンパートメントおよび T R B C 1 - コンパートメントを有した。T R B C 1 + 細胞の % 中央値 = 36 %。

【図 8】図 8 は、J O V I - 1 で染色された T 細胞悪性腫瘍由来細胞株を示すグラフである。いくつかの細胞株が T 細胞悪性腫瘍から誘導されている。これらの細胞株の多くは、依然として T C R を発現する。ジャーカット (T 細胞白血病細胞株)、H P B - A L L (別の T 細胞白血病細胞株) および H D - M a r - 2 (T 細胞リンパ腫細胞株) を試験のために選択した。これらの細胞株を汎 T C R / C D 3 抗体で染色することにより、本発明者らは 3 種全てが T C R を発現することを実証することができた (左側のパネル、アイソタイプ対照染色の上に重ねた染色)。次に、J O V I - 1 を用いた染色により、本発明者らはこれらの T 細胞株が T R B C 1 陰性または T R B C 1 陽性のいずれかであることを決定することができた。ジャーカット細胞 (T R B C 1 +) のみが J O V I - 1 で染色され、H P B - A L L 細胞または H D - M a r - 2 (T R B C 2 +) 細胞は J O V I - 1 で染色されず、これにより、T R B C 1 または T R B C 2 が排他的に発現されることが裏付けられる。

【図 9】図 9 は、J O V I - 1 m A b を用いた T R B C 1 T 細胞の選択的な死滅を示

10

20

30

40

50

すグラフである。野生型ジャーカットT細胞(CD34⁻、TRBC1⁺)を、CD34マーカー遺伝子(CD34⁺TRBC2⁺)と共発現させたTRBC2を用いて形質導入したTCRノックアウトジャーカットT細胞と混合した。これらの細胞を、1時間にわたり、JOVI-1のみと一緒にインキュベートした、またはJOVI-1および補体と一緒にインキュベートした。細胞を洗浄し、CD34、アネキシンVおよび7-AADについて染色した。細胞をフローサイトメトリーによって分析した。アネキシン-V陰性かつ71AAD暗集団によって定義される生集団におけるCD34発現が下に示されている。(a)JOVI-1のみ；(b)JOVI-1と補体。TRBC1 T細胞の選択的な死滅(CD34⁻)が観察される。

【図10】図10は、ポリクローナルエプスタイン・バーウイルス(EBV)特異的T細胞を2つのほぼ同等のTRBC1/2集団に分割できることを示すグラフである。十分に確立された方法を使用して、発明者らは正常ドナーの末梢血からEBV特異的T細胞を選択的に増大させた。その後の株は、自己由来EBV感染B細胞(自己LCL)に対して高程度に選択的であり、同種異系EBV感染T細胞(非自己LCL)に対しては活性ではなく、また、非特異的NK活性もなかった(K562細胞に対して試験することによって測定した場合)。そのような株は、ドナーのEBV免疫を代表する。(b)JOVI-1を用いて染色したところ、これらのT細胞は、TRBC1およびTRBC2にほぼ同等に分類された。

【図11】図11は、JOVI-1 VHおよびVLのアノテートされた配列を示す図である。超可変領域に下線を引き、太字で示した。

【図12】図12は、末梢性T細胞リンパ腫はTRBC制限されるが、正常循環T細胞はTRBC制限されないことを実証するグラフである。循環T細胞リンパ腫細胞を有する患者から末梢血T細胞を採取した。末梢単核細胞を単離し、CD5、TCRおよびJOVI-1を含む抗体のパネルを用いて染色した。正常T細胞および悪性T細胞をフローにおいてCD5発現強度によって弁別することができた。CD5明(正常T細胞)は、ほぼ同等のTRBC1集団およびTRBC2集団を有した。CD5中間集団およびCD5暗集団(腫瘍)は全てTRBC2陽性であった。この患者にTRBC2を対象とする療法を行った場合、リンパ腫が根絶され、T細胞のおよそ半分が助かる。

【図13】図13は、JOVI-1に由来するVHおよびVLが正しかったこと、およびそれらを単鎖可変断片としてフォールディングさせることができることを実証するグラフである。元のハイブリドーマの上清、組換えJOVI-1抗体およびトランスフェクトされた293T細胞から生成したscFv-Fcを使用して、いくつかの細胞株：ジャーカットTCRノックアウト、野生型ジャーカット、eBFP2を共発現するベクターにおけるTRBC1 TCRを用いて形質導入したジャーカットTCRノックアウト；eBFP2を共発現するベクターにおけるTRBD2 TCRを用いて形質導入したジャーカットTCRノックアウトを染色した。染色をフローサイトメトリーによって分析した。組換え抗体およびscFvのどちらもTRBC2を発現する細胞に結合した。

【図14】図14は、異なる構成のJOVI-1に基づくCARを示す図である。CARは、一般には、結合ドメイン、スペーサー、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインで構成される。この試験では、JOVI-1 scFv；CD8ストーク(stalk)、FcR結合を除去する変異を有するヒトIgG1のヒンジ-CH2-CH3ドメインのいずれかに由来するスペーサー；またはヒトIgG1に由来するスペーサーで構成されるCARを生成した。

【図15】図15は、JOVI-1に基づくCARの機能を示すグラフである。正常ドナー末梢血T細胞に、上記の異なるCARを用いて形質導入した。また、対照としてCD19特異的CARを用いてT細胞に形質導入した。次いで、これらのT細胞に、標的細胞：ジャーカット-TCRノックアウト細胞およびジャーカット野生型細胞およびラジ細胞(CD19⁺B細胞リンパ腫株)を負荷した。異なる標的に対するエフェクターのクロム放出データが示されている。JOVI-1 CAR T細胞によりジャーカットは死滅したが、ラジ細胞またはTCRがノックアウトされたジャーカットは死滅しなかった。

10

20

30

40

50

【図16】図16は、JOVI-1 CAR T細胞培養物の自己パーージ (self-purging) を示すグラフである。T細胞は、ほぼ同じ数のTRBC1陽性T細胞またはTRBC2陽性T細胞のいずれかのT細胞で構成されるので、CARの導入後に、培養物の「兄弟殺し」または自己パーージが特定の量で起こる可能性がある。これが事実であることが実証された。本実施例では、形質導入後にCAR T細胞を染色し、フローサイトメトリーによって分析した。偽形質導入されたものと形質導入されたものとを比較することにより、T細胞集団がTRBC1陽性T細胞を失うことを観測することができる。

【図17】図17は、T細胞大顆粒白血病 (T-LGL) のクローン性の調査を示すグラフである - 患者A

【図18】図18は、T細胞大顆粒白血病 (T-LGL) のクローン性の調査を示すグラフである - 患者B

【図19】図19は、T細胞大顆粒白血病 (T-LGL) のクローン性の調査を示すグラフである - 患者C

【図20】図20は、ポリクローナルT細胞リンパ腫 (PCTL) のクローン性の調査を示すグラフである - 患者D

【図21】図21は、TRBCペプチドファージ選択戦略を示す図である。A) 表面上に直接または間接的に固定化したTRBCペプチドに対する2ラウンドの固相ファージディスプレイ選択。B) ビオチン化TRBCペプチドに対する3ラウンドの液相ファージディスプレイ選択。

【図22A】図22は、TRBCペプチドファージディスプレイ選択からのポリクローナルファージアウトプットの分析を示すグラフである。BSA/OAコンジュゲートとして直接固定化したTRBCペプチドに対して行った固相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (A)、ストレプトアビジン/ニュートラアビジンに固定化したTRBCペプチドに対する固相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (B) および液相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (C)。

【図22B】図22は、TRBCペプチドファージディスプレイ選択からのポリクローナルファージアウトプットの分析を示すグラフである。BSA/OAコンジュゲートとして直接固定化したTRBCペプチドに対して行った固相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (A)、ストレプトアビジン/ニュートラアビジンに固定化したTRBCペプチドに対する固相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (B) および液相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (C)。

【図22C】図22は、TRBCペプチドファージディスプレイ選択からのポリクローナルファージアウトプットの分析を示すグラフである。BSA/OAコンジュゲートとして直接固定化したTRBCペプチドに対して行った固相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (A)、ストレプトアビジン/ニュートラアビジンに固定化したTRBCペプチドに対する固相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (B) および液相選択からのポリクローナルファージを使用したTRF結合アッセイ (C)。

【図23】図23は、pSANG10-3Fベクターの略図である。単鎖抗体 (scFv) をコードする遺伝子を、T7プロモーターおよびpelBリーダー (ペリプラズム移行のため) の下流のNcoI/NotI部位にクローニングした。当該ベクターは、精製およびトリ-FLAGタグ検出のためにC末端ヘキサ-ヒスチジンタグ (His6) も含有する。

【図24】図24は、TRBC1特異的結合物質およびTRBC2特異的結合物質についての一次スクリーニングを示すグラフである。TRBC1選択 (A) およびTRBC2選択 (B) からの94種のscFvの、ニュートラアビジン (10 µg/ml) でコーティングしたNunc Maxisorp (商標) 96ウェルプレートに固定化したビオチン化TRBC1およびTRBC2 (0.5 µg/ml) への結合。ユウロピウムとコンジュ

10

20

30

40

50

ゲートした抗FLAG抗体を使用して固定化したペプチドへのs c F v結合を検出した。

【図25】図25は、TRBC1を用いて免疫したウサギ#13174由来のポリクローナル抗体血清の、TRBC1ペプチドおよびTRBC2ペプチドに対する結合を示すグラフである。TRBC1特異的抗体の(A)3回目の免疫後(B)3回目の免疫および精製後。

【図26】図26は、TRBC2ペプチドを用いて免疫したウサギ#17363由来のポリクローナル抗体血清の、TRBC1ペプチドおよびTRBC2ペプチドに対する結合を示すグラフである。TRBC2特異的抗体の(A)3回目の免疫後(B)3回目の免疫および精製後。

【図27】図27は、TRBC2ペプチドを用いて免疫したウサギ#17364由来のポリクローナル抗体血清のTRBC1ペプチドおよびTRBC2ペプチドに対する結合を示すグラフである。TRBC2特異的抗体の(A)3回目の免疫後(B)3回目の免疫および精製後。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、対象における悪性T細胞を、顕著な割合の健康なT細胞に影響を及ぼすことなく枯渇させることを可能にする方法を考案した。具体的には、T細胞悪性腫瘍の処置に使用するためのTRBC1特異的キメラ抗原受容体(CAR)およびTRBC2特異的キメラ抗原受容体(CAR)を開発した。

【0010】

したがって、第1の態様では、本発明は、TCRベータ定常領域1(TRBC1)またはTRBC2に選択的に結合する抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。

【0011】

本発明の第1の態様の第1の実施形態では、TRBC1に選択的に結合するCARが提供される。この実施形態では、CARは、以下の相補性決定領域(CDR)を含む可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)を有する抗原結合ドメインを含んでよい：

- VH CDR1：配列番号7；
- VH CDR2：配列番号8；
- VH CDR3：配列番号9；
- VL CDR1：配列番号10；
- VL CDR2：配列番号11；および
- VL CDR3：配列番号12。

【0012】

CARは、配列番号1で示される配列を有する可変重鎖(VH)および配列番号2で示される配列を有する可変軽鎖(VL)を含む抗原結合ドメインを含んでよい。

【0013】

CARは、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するs c F vを含む抗原結合ドメインを含んでよい。

【0014】

CARは、配列番号33、34および35から選択されるアミノ酸配列を含んでよい。

【0015】

CARは、表1に列挙されているものからのVH CDR3および/またはVL CDR3を含んでよい。

CARは、

配列番号13～22で示されるs c F vのうちの1つからの

- (i) 重鎖CDR3および/もしくは軽鎖CDR3；
- (ii) 重鎖CDR1、CDR2およびCDR3ならびに/もしくは軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3；または

10

20

30

40

50

(i i i) 可変重鎖 (V H) および / もしくは可変軽鎖 (V L)
を含む抗体またはその機能性断片を含んでよい。

【 0 0 1 6 】

本発明の第 1 の態様の第 2 の実施形態では、 T R B C 2 に選択的に結合する C A R が提供される。

【 0 0 1 7 】

この実施形態に関連して、 C A R は、表 2 に列挙されているものからの V H C D R 3 および / または V L C D R 3 を含んでよい。

【 0 0 1 8 】

C A R は、
配列番号 2 3 ~ 3 2 で示される s c F v のうちの 1 つからの

(i) 重鎖 C D R 3 および / もしくは軽鎖 C D R 3 ;

(i i) 重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 ならびに / もしくは軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 ; または

(i i i) 可変重鎖 (V H) および / もしくは可変軽鎖 (V L)

を含む抗体またはその機能性断片を含んでよい。

【 0 0 1 9 】

第 2 の態様では、本発明は、本発明の第 1 の態様にしたがう C A R をコードする核酸配列を提供する。

【 0 0 2 0 】

第 3 の態様では、本発明の第 2 の態様にしたがう核酸配列を含むベクターが提供される。

【 0 0 2 1 】

第 4 の態様では、本発明の第 1 の態様にしたがう C A R を含む細胞が提供される。細胞は、T 細胞またはナチュラルキラー (N K) 細胞などの細胞溶解性免疫細胞であってよい。

【 0 0 2 2 】

第 5 の態様では、本発明の第 4 の態様にしたがう細胞を作製するための方法であって、細胞に、本発明の第 2 の態様にしたがう核酸配列または本発明の第 3 の態様にしたがうベクターを形質導入またはトランスフェクトするステップを含む方法が提供される。

【 0 0 2 3 】

第 6 の態様では、対象における T 細胞リンパ腫または白血病を処置するための方法であって、悪性 T 細胞と、その悪性 T 細胞と同じ T R B C を発現する正常 T 細胞との選択的な枯渇は引き起こすが、その悪性 T 細胞では発現されない T R B C を発現する正常 T 細胞の枯渇は引き起こさないように、 T C R B 1 または T C R B 2 選択的 C A R を含む細胞を対象に投与するステップを含む方法において使用するための、本発明の第 4 の態様にしたがう細胞が提供される。

【 0 0 2 4 】

方法は、対象由来の悪性 T 細胞の T C R ベータ定常領域 (T C R B) を調査して、それが T R B C 1 または T R B C 2 を発現するかどうかを決定するステップも含んでよい。

【 0 0 2 5 】

対象における T 細胞リンパ腫または白血病を処置するための方法であって、 T C R B 1 または T C R B 2 選択的作用因子を対象に投与するステップを含み、当該作用因子により、悪性 T 細胞と、その悪性 T 細胞と同じ T R B C を発現する正常 T 細胞との選択的な枯渇は引き起こされるが、その悪性 T 細胞では発現されない T R B C を発現する正常 T 細胞の枯渇は引き起こされない方法も提供される。

【 0 0 2 6 】

本発明のこの態様の第 1 の実施形態では、当該作用因子は、 T C R B 1 選択的作用因子である。本発明のこの態様の第 2 の実施形態では、当該作用因子は、 T R B C 2 選択的作用因子である。

10

20

30

40

50

【0027】

方法は、投与ステップの前に、悪性T細胞のTCRベータ定常領域（TRBC）を調査してTRBC1またはTRBC2を発現するかどうかを決定するステップも含んでよい。

【0028】

当該作用因子は、枯渇性モノクローナル抗体またはその断片であってよい。当該作用因子は、化学療法用実体を含んでよいコンジュゲート化抗体であってよい。

【0029】

当該作用因子は、二重特異性T細胞エンゲージャー（engager）であってよい。当該作用因子は、キメラ抗原受容体（CAR）発現T細胞であってよい。CARは、配列番号33、34および35からなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでよい。

10

【0030】

当該作用因子は、JOVI-1抗体またはその機能性断片を含んでよい。

【0031】

当該作用因子は、以下の相補性決定領域（CDR）を含む可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）：

VH CDR1：配列番号7；

VH CDR2：配列番号8；

VH CDR3：配列番号9；

VL CDR1：配列番号10；

VL CDR2：配列番号11；および

VL CDR3：配列番号12

を有する抗体またはその機能性断片を含んでよい。

20

【0032】

当該作用因子は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する可変重鎖（VH）および配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する可変軽鎖（VL）を含む抗体またはその機能性断片を含んでよい。

【0033】

当該作用因子は、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するScFvを含んでよい。当該作用因子は、医薬組成物として提供されてもよい。

【0034】

T細胞リンパ腫または白血病は、特定不能末梢性T細胞リンパ腫（PTCL-NOS）；血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫（AITL）、未分化大細胞型リンパ腫（ALCL）、腸疾患関連T細胞リンパ腫（EATL）、肝脾T細胞リンパ腫（HSTL）、節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型、皮膚T細胞リンパ腫、原発性皮膚ALCL、T細胞前リンパ球性白血病およびT細胞急性リンパ芽球性白血病から選択され得る。

30

【0035】

本発明は、そのような方法に従ってT細胞リンパ腫または白血病の処置に使用するための作用因子も提供する。

【0036】

本発明は、上で定義された通りの使用のための作用因子を含むキットも提供する。

40

【0037】

本発明は、上記の方法に従ってT細胞リンパ腫または白血病を処置するための医薬の製造における作用因子の使用も提供する。

【0038】

本発明は、対象におけるT細胞リンパ腫または白血病を診断するための方法であって、試料中のTRBC1陽性またはTRBC2陽性である総T細胞の百分率を決定するステップを含む方法も提供する。

【0039】

TRBC1陽性またはTRBC2陽性T細胞の百分率が約80%を超えることにより、T細胞リンパ腫または白血病の存在を示すことができる。

50

【 0 0 4 0 】

試料は、末梢血試料または生検であり得る。

【 0 0 4 1 】

総 T 細胞に結合する作用因子は C D 3 に結合し得る。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 2 】

本発明は、T R B C 1 または T R B C 2 に選択的に結合するキメラ抗原受容体 (C A R) などの作用因子を提供する。そのような作用因子は、対象における T 細胞リンパ腫または白血病を処置するための方法において有用である。T 細胞悪性腫瘍はクローン性であり、したがって、T R B C 1 または T R B C 2 のいずれかを発現する。T C R B 1 選択的作用因子または T C R B 2 選択的作用因子を対象に投与することによって、当該作用因子は、悪性 T 細胞と、その悪性 T 細胞と同じ T R B C を発現する正常 T 細胞との選択的な枯渇は引き起こすが、その悪性 T 細胞では発現されない T R B C を発現する正常 T 細胞の枯渇は引き起こさない。

10

【 0 0 4 3 】

T C R 定常領域 (T R B C)

T 細胞受容体 (T C R) は、T リンパ球の表面上に発現され、主要組織適合性遺伝子複合体 (M H C) 分子に結合した抗原の認識に参与する。T C R が抗原性ペプチドおよび M H C (ペプチド / M H C) と会合すると、関連する酵素、補助受容体、特殊アダプター分子、および活性化または放出された転写因子によって媒介される一連の生化学的事象を通じて T リンパ球が活性化される。

20

【 0 0 4 4 】

T C R は、通常、不変の C D 3 鎖分子との複合体の一部として発現される高度に可変性のアルファ () 鎖およびベータ () 鎖からなるジスルフィド連結した膜係留型ヘテロ二量体である。この受容体を発現する T 細胞は : (または) T 細胞と称される (総 T 細胞の約 9 5 %) 。少数の T 細胞は、可変性のガンマ () 鎖およびデルタ () 鎖によって形成される代替の受容体を発現し、これらは T 細胞と称される (総 T 細胞の約 5 %) 。

【 0 0 4 5 】

各 鎖および 鎖は、2つの細胞外ドメイン : 可変 (V) 領域および定常 (C) 領域で構成され、これらはどちらも、逆平行 - シートを形成する免疫グロブリンスーパーファミリー (I g S F) ドメインである。定常領域は細胞膜に対して近位にあり、その後ろに膜貫通領域および短い細胞質尾部があり、可変領域は、ペプチド / M H C 複合体に結合する (図 1 参照) 。T C R の定常領域は、システイン残基がジスルフィド結合を形成し、それにより 2 つの鎖間に連結が形成される、短い接続配列からなる。

30

【 0 0 4 6 】

T C R 鎖および 鎖の可変ドメインはどちらも 3 つの超可変または相補性決定領域 (C D R) を有する。鎖の可変領域は、追加的な領域の超可変性 (H V 4) も有するが、これは通常は抗原と接触せず、したがって、C D R とはみなされない。

T C R はまた、最大 5 つの不変鎖、 (集合的に C D 3 と称される) および も含む。C D 3 および サブユニットは、 または による抗原の認識後に第 2 のメッセージングおよびアダプター分子と相互作用する特異的な細胞質ドメインを通じて T C R シグナル伝達を媒介する。T C R 複合体の細胞表面発現の前に、サブユニットが対で集合し、そこでは T C R および ならびに C D 3 および の膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインの両方が役割を果たす。

40

【 0 0 4 7 】

したがって、T C R は、一般に C D 3 複合体と、T C R 鎖および 鎖とで構成され可、それが今度は変領域および定常領域で構成される (図 1) 。

【 0 0 4 8 】

T C R 定常領域 (T R B C) を供給する遺伝子座 (C h r 7 : q 3 4) は、進化の

50

歴史の中で複製されて、2つのほぼ同一であり機能的に同等な遺伝子：TRBC1およびTRBC2を生じ(図2)、これらは、各遺伝子から生じる成熟タンパク質内の4アミノ酸のみが異なる(図3)。各TCRは、相互排他的にTRBC1またはTRBC2のいずれかを含み、したがって、各T細胞は、TRBC1またはTRBC2のいずれかを相互排他的に発現する。

【0049】

本発明者らは、TRBC1の配列とTRBC2の配列は類似しているにもかかわらず、それらを識別することが可能であることを決定した。本発明者らは、TRBC1のアミノ酸配列およびTRBC2のアミノ酸配列を、細胞、例えばT細胞の表面上で*in situ*で識別することができることも決定した。

10

【0050】

悪性細胞

「悪性」という用語は、本明細書では、その標準の意味に従って使用され、その成長が自己限定されず、隣接組織内に侵入することができ、かつ、遠位組織に拡散することができる細胞を指す。そのように、「悪性T細胞」という用語は、本明細書では、リンパ腫または白血病の状況でクローン的に拡大したT細胞を指すために使用される。

【0051】

本発明の方法は、悪性T細胞のTRBCを決定することを伴う。これは、当技術分野で公知の方法を使用して実施することができる。例えば、これは、PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡法によって決定することができる。

20

【0052】

悪性T細胞によって発現されるTRBCが決定されたら、適切なTRBC1選択的作用因子またはTRBC2選択的作用因子を対象に投与する。「適切なTRBC選択的作用因子」とは、悪性T細胞がTRBC1を発現することが決定された場合にはTRBC1選択的作用因子を投与し、悪性T細胞がTRBC2を発現することが決定された場合にはTRBC2選択的作用因子を投与することを意味する。

【0053】

選択的作用因子

選択的作用因子は、TRBC1またはTRBC2のいずれかに相互排他的に結合する。

【0054】

上記の通り、各T細胞は、TRBC1またはTRBC2のいずれかを含むTCRを発現する。T細胞リンパ腫または白血病などのクローン性T細胞障害では、同じクローンに由来する悪性T細胞は全てTRBC1またはTRBC2のいずれかを発現する。

30

【0055】

したがって、本方法は、TRBC1選択的作用因子またはTRBC2選択的作用因子を対象に投与するステップを含み、当該作用因子により、悪性T細胞と、その悪性T細胞と同じTRBCを発現する正常T細胞との選択的な枯渇は引き起こされるが、その悪性T細胞とは他のTRBCを発現する正常T細胞の顕著な枯渇は引き起こされない。

【0056】

TRBC選択的作用因子により、悪性T細胞とは他のTRBCを発現する正常T細胞の顕著な枯渇は引き起こされないので、T細胞コンパートメント全体の枯渇は引き起こされない。対象のT細胞コンパートメント(すなわち、悪性T細胞と同じTRBCを発現しないT細胞)の割合を保持することにより、毒性が低下し、細胞性免疫不全および体液性免疫不全が低下し、それにより、感染のリスクが低下する。

40

【0057】

本発明の方法に従ってTRBC1選択的作用因子を投与することにより、TRBC1を発現するT細胞の5%、10%、20%、50%、75%、90%、95%または99%の枯渇、すなわち、数の減少をもたらすことができる。

【0058】

本発明の方法に従ってTRBC2選択的作用因子を投与することにより、TRBC2を

50

発現するT細胞の5%、10%、20%、50%、75%、90%、95%または99%の枯渇、すなわち、数の減少をもたらすことができる。

【0059】

TRBC1選択的作用因子は、TRBC2よりも少なくとも2倍、4倍、5倍、7倍または10倍高い親和性でTRBC1に結合し得る。同様に、TRBC2選択的作用因子は、TRBC1よりも少なくとも2倍、4倍、5倍、7倍または10倍高い親和性でTRBC2に結合し得る。

【0060】

TRBC1選択的作用因子により、細胞集団においてTRBC2発現細胞よりも大きな割合のTRBC1発現T細胞の枯渇が引き起こされる。例えば、TRBC1発現T細胞の枯渇とTRBC2発現細胞の枯渇との比率は、少なくとも60%：40%、70%：30%、80%：20%、90%：10%または95%：5%である。同様に、TRBC2選択的作用因子により、細胞集団においてTRBC2発現細胞よりも大きな割合のTRBC1発現T細胞の枯渇が引き起こされる。例えば、TRBC2発現T細胞の枯渇とTRBC1発現細胞の枯渇との比率は、少なくとも60%：40%、70%：30%、80%：20%、90%：10%または95%：5%である。

10

【0061】

本発明の方法を使用すると、対象において、顕著な割合の健康なT細胞に影響を及ぼすことなく悪性T細胞が欠失する。「顕著な割合」とは、対象におけるT細胞機能を維持するために、悪性T細胞とは異なるTRBCを発現するT細胞が十分な割合で生存することを意味する。作用因子により、他のTCRBを発現するT細胞集団の20%未満、15%未満、10%未満または5%未満の枯渇が引き起こされ得る。

20

【0062】

選択的作用因子は、以下に列挙する残基を識別するので、TRBC1またはTRBC2のいずれかに対して選択的であり得る：

- (i) TRBCの3位におけるNをKから識別；
- (ii) TRBCの3位におけるKをNから識別；
- (iii) TRBCの4位におけるKをNから識別；
- (iv) TRBCの4位におけるNをKから識別；
- (v) TRBCの36位におけるFをYから識別；
- (vi) TRBCの36位におけるYをFから識別；
- (vii) TRBCの135位におけるVをEから識別；および/または
- (viii) TRBCの135位におけるEをVから識別。

30

【0063】

選択的作用因子は、上記の差異の任意の組合せを識別することができる。

【0064】

抗体

本発明の方法で使用する作用因子は、枯渇性モノクローナル抗体(mAb)もしくはその機能性断片、または抗体模倣物であってよい。

【0065】

「枯渇性抗体」という用語は、従来の意味で使用され、標的T細胞上に存在する抗原に結合し、標的T細胞の死滅を媒介する抗体に関する。したがって、枯渇性抗体を対象に投与することにより、対象内の標的抗原を発現する細胞の数の低下/減少をもたらされる。

40

【0066】

本明細書で使用される場合、「抗体」とは、少なくとも1つの相補性決定領域CDRを含む抗原結合部位を有するポリペプチドを意味する。抗体は、3つのCDRを含み、ドメイン抗体(dAb)のものと同等の抗原結合部位を有し得る。抗体は、6つのCDRを含み、古典的な抗体分子のものと同等の抗原結合部位を有し得る。ポリペプチドの残りは、抗原結合部位のための適切な足場をもたらし、抗原との結合のために適した様式でこれをディスプレイする任意の配列であってよい。抗体は、免疫グロブリン分子全体、または、

50

F a b、F (a b) ' 2、F v、単鎖 F v (s c F v) 断片またはナノボディなど、それらの一部であってよい。抗体は、二機能性抗体であってよい。抗体は、非ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体または完全ヒト抗体であってよい。

【 0 0 6 7 】

したがって、抗体は、完全な抗体の抗原特異性を保持する任意の機能性断片であってよい。

【 0 0 6 8 】

T R B C 1 選択的抗体

本発明の方法で使用するための作用因子は、以下の相補性決定領域 (C D R) :

V H C D R 1 : G Y T F T G Y (配列番号 7) ;

V H C D R 2 : N P Y N D D (配列番号 8) ;

V H C D R 3 : G A G Y N F D G A Y R F F D F (配列番号 9) ;

V L C D R 1 : R S S Q R L V H S N G N T Y L H (配列番号 1 0) ;

V L C D R 2 : R V S N R F P (配列番号 1 1) ; および

V L C D R 3 : S Q S T H V P Y T (配列番号 1 2)

のうちの 1 つまたは複数を含む可変重鎖 (V H) および可変軽鎖 (V L) を有する抗体またはその機能性断片を含んでよい。

【 0 0 6 9 】

1 つまたは複数の C D R は、各々独立に、得られる抗体が T R B C 1 に選択的に結合する能力を保持するのであれば、配列番号 7 ~ 1 2 で示される配列と比較して 1 つまたは複数のアミノ酸変異 (例えば置換) を含んでもよく含まなくてもよい。

【 0 0 7 0 】

試験により、C D R L 3 および H 3 が抗原との高エネルギー相互作用に広く関与することが示されており、したがって、抗体またはその機能性断片は、上に概説されている通り V H C D R 3 および / または V L C D R 3 を含んでよい。

【 0 0 7 1 】

実施例 1 2 に記載の通り、ファージディスプレイを使用して、T R B C 2 よりも T R B C 1 に対して高度に選択的ないくつかの追加的な抗体結合ドメインが同定されている。

【 0 0 7 2 】

当該作用因子は、表 1 に示されている相補性決定領域 (C D R 3) のうちの 1 つまたは複数を含む可変重鎖 (V H) および / または可変軽鎖 (V L) を有する抗体またはその機能性断片を含んでよい。

10

20

30

【表1】

表1

クローンID	VH生種細胞系ID	VL生種細胞系ID	重鎖CDR3	軽鎖CDR3	TRBC1結合	TRBC2結合
CP_01_E09	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_DPK1 (O18,08)	AHNSSSWSF.....DY	QQYDNL.....LT	403248	318
CP_01_D12	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_L12	GGDTYGLF.....DN	QQFNAY.....LT	392753	298
CP_01_D10	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK9 (O12,02)	GGGSFGAF.....DI	QQYNSYP.....LT	370612	306
CP_01_C08	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_DPK1 (O18,08)	GYSSWYL.....DY	QQYDNL.....LT	352814	426
CP_01_C11	Vh1_DP-8.75 (1-02)	Vlamba6_6a	GGAG.....WN	QSHDSSN.....VV	349231	622
CP_01_F03	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_DPK1 (O18,08)	GYXASSWSQ.....GL	QQYDNL.....PT	335088	306
CP_01_E07	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk2_DPK12 (A2)	DLGGSGGAF.....DI	MQSIQL.....YT	332307	394
CP_01_D03	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk3_DPK21 (L2)	NKQYGM.....DV	QQYHRWP.....LT	327666	452
CP_01_F06	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk4_DPK24 (B3)	DDGAM.....RY	QQYDSP.....YT	325058	286
CP_01_F02	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_A30	AGYSYA.....DY	LQHNSYP.....LT	301955	508
CP_02_C03	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk4_DPK24 (B3)	GGRYSSNYF.....DY	QQYFGT.....PT	274905	374
CP_02_D10	Vh3_DP-50 (3-33)	Vk3_L16	VGFGSAM.....DV	QQYNDWP.....LT	259066	517
CP_02_B01	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vlamba6_6a	VSSHYPSSGGYAGGF.....DY	QSFDTNSL.....VV	258840	343
CP_02_D02	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK1 (O18,08)	GRDSSSWSP.....AY	QQYDNL.....LT	256223	393
CP_02_A02	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba2_DPL11 (2a2)	VTTYSLDF.....DY	SSYSSST.....VV	252590	385
CP_02_D04	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_DPK9 (O12,02)	KGAVWVFGAL.....DY	QQYNSYP.....LT	252076	493
CP_01_E10	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK9 (O12,02)	NSLYGNSA.....DL	QQYTFITP.....IT	238172	679
CP_01_H08	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK1 (O18,08)	DGGGGRF.....DY	QQYDNL.....LT	223591	381
CP_01_F11	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vlamba6_6a	GGGALGRGM.....DV	QSYDTNN.....VV	222976	481
CP_01_F09	Vh6_DP-73 (5-51)	Vk1_DPK9 (O12,02)	LLRSGGQSYAF.....DI	QQYSTP.....LT	217934	308
CP_02_D05	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_DPK1 (O18,08)	GYSSWSF.....DY	QQYDNL.....LT	212579	440
CP_02_A09	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_DPK1 (O18,08)	AGSSGWT.....DY	QQYDNL.....LT	202054	336
CP_02_D03	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_DPK1 (O18,08)	DKGWGF.....DY	QQYDNL.....LT	199403	543
CP_02_C11	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlamba6_6a	LGVVRGVKMGF.....DY	QSYDSSN.....VV	189481	392
CP_01_H10	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK1 (O18,08)	SSYSSWGM.....DV	QQYDNL.....LT	179830	424
CP_02_C04	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK9 (O12,02)	ANSWSAGGM.....DV	QQYDDL.....LT	172937	722
CP_01_G03	Vh2_DP-46 (3-30.3)	Vk2_DPK13 (O11,01)	ERGRGYSYM.....DV	MORIEFF.....LT	168169	360
CP_01_G06	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vlamba6_6a	VARGHDAF.....DI	QSYDNRH.....VV	166703	307
CP_01_D06	Vh1_DP-8.75 (1-02)	Vlamba6_6a	RHGM.....DV	QSYDSSN.....VV	162763	287
CP_02_B03	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlamba6_6a	FDSSYY.....DY	QSYDSSN.....VV	158809	312
CP_02_A12	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk3_DPK21 (L2)	DLVTTGAF.....DT	QQHNDWP.....LT	152968	280
CP_01_H03	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	AIRVSGTPENG.....DV	QSYHSSN.....VV	151902	590
CP_01_G08	Vh6_DP-74 (6-1)	Vk2_DPK16 (A23)	VRIHGM.....DV	MQATHFF.....QT	137502	736
CP_01_A09	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk4_DPK24 (B3)	GKLA.....DI	QQYSTP.....YT	136525	354
CP_02_A04	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	NGDSSGHTSPNWF.....XL	QSYDSSN.....VV	130318	385
CP_01_F08	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba2_2c	VSTDSSSM.....DV	SSYAGSNTL.....FV	126690	545
CP_01_A08	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK6 (L19)	TSQDFGAF.....DI	QQANSFP.....LT	117913	270
CP_01_D01	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	AESGYSVSSNGM.....DV	QSYDSSN.....VV	116603	204
CP_02_A07	Vh3_DP-50 (3-33)	Vlamba6_6a	VDRVRSGM.....DV	QSYDSH.....VV	105730	496
CP_02_B08	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	IGQYCSSTSCYM.....DV	QSYDSSN.....VV	96003	795
CP_01_D09	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK1 (O18,08)	DLGGSGGAF.....DI	QQYDNL.....LT	92079	282
CP_01_G07	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	DSDAGYF.....DL	QSFSTL.....YV	77222	313
CP_01_A05	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk3_DPK21 (L2)	ASVASSGAF.....DI	QQYKWP.....LT	75698	705
CP_02_A08	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	AGGSNAF.....DI	QSYDSSN.....VV	73410	295
CP_02_D07	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	VSTDYGRQWV.....DP	QSYDSSN.....VV	72274	367
CP_01_C04	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK9 (O12,02)	QYTSGLAYYYHYM.....DV	QQYSTP.....RT	65702	286
CP_01_A07	Vh1_DP-8.75 (1-02)	Vlamba3_DPL16 (3)	GIRGAF.....DI	NSRDSSGNPN.....VV	63917	238
CP_01_H02	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	VGYSTTLQ.....DY	QSYDSSN.....VV	63410	266
CP_01_F10	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	MAGSYAF.....DI	QSYDSSN.....VV	58027	372
CP_02_C10	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba1_DPL2 (1c)	VGDYDSSGDLWYF.....DL	AVWDDRLNG.....VV	53460	488
CP_02_B05	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_L12	GSDTTFSV.....DY	QQYDSSN.....VV	51480	315
CP_01_G04	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba3_3p	AGHYYYM.....DV	QSADSSGTN.....MV	50811	354
CP_01_F08	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	VTVFYDYDSSGF.....DY	QSYDSSN.....VV	43115	562
CP_01_G05	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	VEGGPPYF.....DH	QSYDTRNQ.....VV	42289	409
CP_02_A02	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk4_DPK24 (B3)	NSLDNYGM.....DV	QQYSTP.....YT	39382	322
CP_01_B09	Vh5_DP-73 (5-51)	Vk1_DPK9 (O12,02)	LGTTKRAF.....DI	QQSYST.....RT	38766	803
CP_01_A10	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba1_DPL3 (1g)	VVVDHEGM.....DV	AAWDDSLF.....WL	38613	298
CP_01_H04	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk2_DPK13 (O11,01)	WSGSGF.....DY	MORIEFF.....LT	34030	305
CP_02_B04	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk4_DPK24 (B3)	DFGWGAF.....DI	QQYNTP.....LJ	30975	348
CP_02_A05	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlamba6_6a	VYVGTQH.....DY	QSYDSSN.....VV	30140	309
CP_01_F07	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	NWLLYGGDPQNAF.....DI	QSYDSTN.....VV	29443	331
CP_01_H01	Vh5_DP-73 (5-51)	Vk1_DPK9 (O12,02)	LYFDWFAQSNAF.....DI	QQYSTP.....LT	26847	349
CP_01_G10	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba3_DPL16 (3)	VGYQLLYADYF.....DY	NSRDSSGNH.....LV	26520	360
CP_01_G11	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk1_DPK9 (O12,02)	GAMGL.....DY	QQYSTP.....FT	26087	292
CP_01_G01	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba3_DPL16 (3)	VYLLSGVHAF.....DV	DSRDTRVNX.....WI	25464	423
CP_01_A12	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vk1_DPK1 (O18,08)	TERWLQF.....DY	QQYDNL.....FS	23458	331
CP_01_H05	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk2_DPK15 (A19A3)	NGDYAF.....DY	MQALQTP.....YT	20298	322
CP_02_B07	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	ASRYSGSYHF.....DY	QSYDSSN.....VV	19588	217
CP_01_G09	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vlamba2_DPL11 (2a2)	HGSQGGF.....DI	SSYSSST.....LV	18725	449
CP_02_C02	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk2_DPK15 (A19A3)	VGYMGM.....DV	MQALQTP.....YT	18320	468
CP_01_D05	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	NTPGIAAGP.....DS	QSYDSTNH.....VV	17240	299
CP_01_D08	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vlamba6_6a	VSTTIVTSF.....DY	QSYDSSN.....VV	16499	291
CP_02_A11	Vh3_DP-46 (3-30.3)	Vlamba6_6a	VSGPLNDAF.....DI	QSFDENIS.....VV	13370	329
CP_02_D08	Vh3_DP-49 (3-30.5)	Vk3_DPK22 (A27)	HSSGGAF.....DI	HQSATS.....LT	12277	560

【0073】

当該作用因子がドメイン抗体である場合、3つのCDR、すなわち、VH CDR1～CDR3またはVL CDR1～CDR3のいずれかを含んでよい。

【0074】

当該作用因子は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する可変重鎖(VH)および配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する可変軽鎖(VL)を含む抗体またはその機能性断片を含んでよい。

10

20

30

40

【化 1】

配列番号 1 Jovi-1 VH

EVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWVKQRPGQGLEWIGFINPYN
DDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAGYNFDGAYRFF
DFWGQGTTLTVSS

配列番号 2 Jovi-1 VL

DVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRV
SNRFPQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKR

10

【0075】

当該作用因子は、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有する S c F v を含んでよい。

【化 2】

配列番号 3 Jovi-1 scFv

EVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWVKQRPGQGLEWIGFINPYN
DDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAGYNFDGAYRFF
DFWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSS
QRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFPQVPDRFSGSGSGTDFTLKISR
VEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKR

20

【0076】

あるいは、当該作用因子は、

配列番号 13 ~ 22 で示される s c F v のうちの 1 つからの

(i) 重鎖 C D R 3 および / もしくは軽鎖 C D R 3 ;

(i i) 重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 ならびに / もしくは軽鎖 C D R 1、C
D R 2 および C D R 3 ; または

(i i i) 可変重鎖 (V H) および / もしくは可変軽鎖 (V L) ;

を含む抗体またはその機能性断片を含んでよい。

30

【0077】

配列番号 13 ~ 22 で示される配列では、配列の V H 部分および V L 部分が太字で示されており、重鎖および軽鎖の C D R 1 配列および C D R 2 配列に下線が引かれている。V H および V L の C D R 3 配列は表 1 に示されている。

【化 3 - 1】

配列番号 13_(CP_01_E09)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHN SSSWSFDY
WGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSI
SSYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATY
YCQQYDNLPLTFGGG TKVDIKRTAAA

10

配列番号 14 (CP_01_D12)

EVQLLES GGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGDTYGF LDN
WGQGT MVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSTLSASVGD RVTITCRASQS
ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFA
TYQCQQFNAYPLTFGGG TKVEIKRTAAA

配列番号 15 (CP_01_D10)

QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGGSFGAFDIW
GQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSI
RYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATY
YCQQYNSYPLTFGGG TKLEIKRTAAA

20

配列番号 16 (CP_01_C08)

EVQLLES GGGAVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGYSSSWYLDY
WGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCQASQD
ISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIAT
YYCQQYDNLPLTFGGG TKVEIKRTAAA

30

配列番号 17 (CP_01_C11)

QVQLVESGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGRINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCASGGAGWNWG
QGT MVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFM LTPHSVSESPGKTATISCTRSSGSIAS
NYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPF GVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEA
DYQCQSHDSSNVVFGGGTQLTVLGQPAA

40

【化 3 - 2】

配列番号 18 (CP_01_F03)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGY?ASSWSQG
LWQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVRDRVTITCQASQ
DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIA
TYYCQQYDNLPPTFGGGTKVEIKRTAAA

10

配列番号 19 (CP_01_E07)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGGSGGAFDI
WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIVMTQTPHSLSVTPGQPASISCKSSQS
LLYSDGKTYLYWYLQKPGQPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE
AEDVGVYYCMQSIQLYTFGQGTKVDIKRTAAA

配列番号 20 (CP_01_D03)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAPGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNKQYGMDVWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIVMTQSPATLSLAPGERATLSCRASQSVG
SNLAWYQQKPGQAPSLLIYDASTRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDIAVYY
CQQYHRWPLTFGGGTKVEIKRTAAA

20

配列番号 21 (CP_01_F06)

EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDGAMRYWGWG
GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLY
SSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA
EDVAVYYCQQYYDSPYTFGQGTKVDIKRTAAA

30

配列番号 22 (CP_01_F02)

QVQLVESGGGVVQPGRPLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGYSYADYWG
QGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIR
NDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATY
YCLQHNSYPLTFGGGTKVDIKRTAAA

40

【 0 0 7 8 】

T R B C 2 特異的

実施例 1 2 に記載の通り、ファージディスプレイを使用して、T R B C 1 よりも T R B C 2 との結合に対して高度に選択的ないくつかの抗体結合ドメインが同定されている。

【 0 0 7 9 】

当該作用因子は、表 2 に示されている相補性決定領域 (C D R 3) のうちの 1 つまたは複数を含む可変重鎖 (V H) および / または可変軽鎖 (V L) を有する抗体またはその機

50

能性断片を含んでよい。

【表 2】

表2

クローンID	VH dp番号	VL dp番号	CDR3群	重鎖CDR3	CDR3群	軽鎖CDR3	TRBC2 結合	TRBC1 結合
CP_03_E05	Vh3_DP-47 (3-23)	Vlambda6_6a	38	TRSSGAF.....DI	11	HSYDSNNH.....SV	217270	1617
CP_03_D05	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda3_DPL23 (3r)	33	PRGGRGSAF.....DI	27	QAWDTNLG.....G	212721	762
CP_03_H06	Vh3_DP-35 (3-11)	Vlambda6_6a	20	ARVGGM.....DV	19	QSFADALNH.....V ¹	167971	391
CP_03_C12	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vk2_DPK12 (A2)	27	DTGPI.....DY	5	MQGQLP.....PT	167371	789
CP_03_G02	Vh1_DP-7 (1-46)	Vk1_DPK1_O12,O2)	10	GVWNSGSVLF.....D	30	QQSYSTP.....LT	151586	787
CP_03_D04	Vh3_DP-46 (3-30,3)	Vlambda6_6a	28	GGFTVPGGAF.....DI	13	QSYDASN.....VI	143051	1210
CP_03_F10	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda2_2c	42	FGERYAF.....DI	9	SAYTGSN.....YV	139767	1683
CP_03_G09	Vh6_DP-74 (6-1)	Vlambda3_3j	34	DQWLANYYYYGM.....D	34	QVWDSNS.....W	138650	979
CP_03_F09	Vh1_DP-7 (1-46)	Vlambda6_6a	8	NRGGSYKSVGM.....E	36	QSYDEVS.....VV	131852	889
CP_03_D09	Vh1_DP-15 (1-08)	Vlambda6_6a	11	VSSYGM.....DV	28	QSYNSNH.....W	128690	544
CP_03_F02	Vh1_DP-15 (1-08)	Vlambda6_6a	3	AFASSAH.....DH	14	QSYDSH.....VW	127081	1507
CP_02_E03	Vh3_DP-46 (3-30,3)	Vk1_DPK9 (O12,O2)	16	QRGYYGM.....DI	12	QQRSTP.....LT	122650	1979
CP_03_H07	Vh3_DP-31 (3-09)	Vlambda2_DPL11 (2a2)	14	SSVAAGAF.....DI	22	SSYSSST.....WV	120948	1233
CP_03_C02	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlambda2_DPL10 (2b2)	13	LSRGLGF.....DY	10	SSYAGSNN.....W	100238	1904
CP_03_E09	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda2_DPL11 (2a2)	5	DHYF.....DY	21	NSYTRST.....LV	99580	1011
CP_03_D08	Vh3_DP-46 (3-30,3)	Vlambda6_6a	19	SGRRVTAL.....DY	8	QSYDDTN.....VV	92074	453
CP_03_E11	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda3_3h	37	MGRYS5S.....NI	3	QAWDTNIG.....G	91813	940
CP_03_B05	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlambda2_DPL10 (2b2)	12	HSRFGPAF.....DI	23	SSYAGSNN.....YV	88004	815
CP_03_H02	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda2_DPL23 (3r)	25	DREAF.....DI	3	QAWDTNIG.....G	87576	1829
CP_03_D02	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlambda2_DPL10 (2b2)	7	LRGRYSYGSDAF.....D	17	SSYAGSST.....FV	84907	1096
CP_03_E01	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda3_DPL16 (3l)	36	LNNAVTYAF.....DI	4	NSRDSSGF.....PV	81606	498
CP_03_C11	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda2_DPL11 (2a2)	2	IGVIGGF.....DY	18	SSYTSS.....IL	78572	1079
CP_03_B12	Vh3_DP-47 (3-23)	Vlambda6_6a	9	EYSSSPYF.....DY	16	QSYDSNNR.....VL	70734	1120
CP_03_E03	Vh1_DP-7 (1-46)	Vlambda3_DPL16 (3l)	18	DLLPITVITIGAF.....DI	7	SSRDSSGNH.....LV	69661	356
CP_03_F01	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda3_DPL23 (3r)	40	DSGSYS.....DY	3	QAWDTNIG.....G	66921	1633
CP_03_C01	Vh6_DP-74 (6-1)	Vlambda3_3j	31	ASYPYYYYYGM.....D	29	QVWDSSTAN.....V	58194	825
CP_03_G07	Vh6_DP-74 (6-1)	Vlambda6_6a	41	ALGHF.....DF	32	QSYDSNNH.....V	57147	1278
CP_03_E02	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlambda2_DPL11 (2a2)	35	FTTGSA.....YM	26	SSYAGSNN.....LV	52212	362
CP_03_C07	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda3_DPL23 (3r)	17	DASGY.....DY	3	QAWDTNIG.....G	43547	1074
CP_03_H04	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda1_DPL5 (1b)	1	DLGTYYGSGD.....DY	2	GTWDSLSAG.....Q	35180	1103
CP_03_E06	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda3_DPL16 (3l)	39	VGELLGAF.....DI	35	SSLDSNDNH.....PI	34777	917
CP_03_H03	Vh1_DP-5 (1-24)	Vlambda1_DPL2 (1c)	15	GL.....GV	37	AAWDDSLNG.....Y	33358	1405
CP_03_G11	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlambda2_DPL12 (2e)	23	HSGVGLAF.....DI	31	SSYAGSST.....YV	30854	836
CP_03_C01	Vh6_DP-74 (6-1)	Vk1_19	4	GCSIAAALAF.....DI	20	HQYDVYP.....PT	30762	1089
CP_03_H01	Vh1_DP-15 (1-08)	Vlambda3_DPL16 (3l)	30	VEYSRNGM.....DV	6	NSRDSSGNH.....LV	29826	1203
CP_03_F11	Vh1_DP-15 (1-08)	Vlambda6_6a	22	GRYN.....L	15	QSYDSN.....WV	24172	1152
CP_03_C05	Vh1_DP-14 (1-18)	Vlambda6_6a	32	LDYYGM.....DV	33	QSYDSN.....QV	23031	937
CP_03_D03	Vh1_DP-15 (1-08)	Vlambda6_6a	26	GGLSAAF.....DI	24	QSYDSN.....YV	22905	1283
CP_03_G05	Vh5_DP-73 (5-51)	Vlambda2_DPL12 (2e)	6	YGGGL.....DV	25	SSYAGSYT.....LV	22037	813
CP_03_G12	Vh3_DP-47 (3-23)	Vlambda2_DPL11 (2a2)	21	PDHLTVF.....DY	1	SSYTPSS.....VL	20349	942
CP_03_C10	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda3_DPL23 (3r)	24	VGYGM.....DV	3	QAWDTNIG.....G	18438	896
CP_03_F04	Vh1_DP-8,75 (1-02)	Vlambda3_DPL23 (3r)	29	YEGYAGF.....DY	3	QAWDTNIG.....G	13541	1047

10

20

30

40

【0080】

当該作用因子は、

配列番号 23 ~ 32 で示される s c F v のうちの 1 つからの

(i) 重鎖 C D R 3 および / もしくは軽鎖 C D R 3 ;

(i i) 重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 ならびに / もしくは軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 ; または

(i i i) 可変重鎖 (V H) および / もしくは可変軽鎖 (V L) ;

を含む抗体またはその機能性断片を含んでよい。

【0081】

配列番号 23 ~ 32 で示される配列では、配列の V H 部分および V L 部分が太字で示されており、重鎖および軽鎖の C D R 1 配列および C D R 2 配列に下線が引かれている。V H および V L の C D R 3 配列は表 2 に示されている。

【化 4 - 1】

配列番号 23 (CP_03_E05)

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFSISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTRSSGAFDIWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIAS
KYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDTSSNSASLTISGLRTEDEA
 DYYCHSYDSNNHVSFVGGGKVTVLGQPAA

10

配列番号 24 (CP_03_D05)

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGRINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCASPRGRGSAFDI
WGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASSYELTQPPSVSVSPGQTATISCSGDQLG
GKYGHWYQKKPGQSPVLVLYQDRKRPAGIPERFSGSSSGNTITLTISGTQAVDEA
 DYYCQAWDTNLGGVFGGKVTVLGQPAA

配列番号 25 (CP_03_H06)

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSS
GSTIYYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTAVYYCARARVGGMDVWGQ
GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASN
YVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEAD
 YYCQSFADNLHVVFGGGKLTVLGQPAA

20

配列番号 26 (CP_03_C12)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDTGPIDYWGQ
GTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHS
DGKTYLYWYLQKPGQPPQLLVYEVSNRFSGVDPKFSSGSGTDFTLKISRVEAED
 VGVYYCMQGIQLPPTFGGKVDIKRTAAA

30

【化 4 - 2】

配列番号 27 (CP_03_G02)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGIINPSG
GSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSIVYMELSLRSEDTAVYYCARGVWNSGSYLGF
YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ
DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF
ATYYCQQSYSTPLTFGGGTKLEIKRTAAA

10

配列番号 28 (CP_03_D04)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGFTVPGGAFD
IWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPHSVSDSPGKTVTISCTRSSG
RIGSNFVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPARFSGSIDSSNSASLTISGLTTA
DEAGYYCQSYDASNVIFGGGTKLTVLGQPAA

配列番号 29 (CP_03_F10)

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINP
NSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSEDTAVYYCARFGERYAFDIW
GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASQSELTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSTDV
GAFHFVSWYQHTPGKAPKLLISEVRKRASGVPDRFSGSRSGNTASLTVSGLQSED
EADYFCSAYTGSNYVFGSGTKLTVLGQPAA

20

配列番号 30 (CP_03_G09)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTY
YRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDQWLANY
YYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASSYELTQPLSVSVALGQTARITC
GGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDNNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISKAQ
AGDEADYYCQVWDSNSWVFGGGTKLTVLGQPAA

30

配列番号 31 (CP_03_F09)

QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFASYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINP
SGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSRLRSDDTAVYYCASNRGGSYKSV
GMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPQSVSESPGKTVTISCT
RSSGNFASKYVQWYQQRPGSSPTTVIYENYQRPSGVDPDRFSGSIDSSNSATLTIS
GLKTEADYYCQSYDEVSVVFGGGTQLTVLGQPAA

40

【化4-3】

配列番号 32 (CP_03_D09)

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCEASGYTFTSYAISWVRQAPGQGLEWMGWMNP
 NSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVSSYYGMDV
 WGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGASNFMLTQPLSVSESPGKTVTISCTRSSGSI
 ASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTED
 EADYYCQSYNSSNHWFVGGGKVTVLGQPAA

【0082】

10

上記のアミノ酸配列のバリエーションも、得られる抗体がTRBC1またはTRBC2に結合し、顕著に交差反応しないのであれば、本発明において使用することができる。一般には、そのようなバリエーションは、上記の配列のうちの1つと高程度の配列同一性を有する。

【0083】

比較のために配列をアラインメントする方法は当技術分野で周知である。

【0084】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) は、配列解析プログラム blastp、blastn、blastx、tblastn および tblastx と関連して使用するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI、Bethesda, Md.) を含めたいくつかの供給源から、およびインターネット上で利用可能である。このプログラムを使用して配列同一性をどのように決定するかについての記載は、インターネット上の NCBI ウェブサイトで利用可能である。

20

【0085】

VLドメインまたはVHドメインまたはscFvのバリエーションは、一般には、配列番号1~3、13~32で示される配列に対して少なくとも約75%、例えば、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0086】

一般には、バリエーションは、元のアミノ酸配列または核酸配列と比較して1つまたは複数の保守的アミノ酸置換を含有し得る。保守的置換とは、TRBC1またはTRBC2に結合する抗体の親和性に実質的に影響を及ぼさないまたはそれを低下させない置換である。例えば、TRBC1またはTRBC2に特異的に結合するヒト抗体は、配列番号1~3または13~32で示される配列のいずれかと比較して、VHまたはVLのいずれかまたはその両方の最大1個、最大2個、最大5個、最大10個、または最大15個の保守的置換を含んでよく、TRBC1またはTRBC2に対する特異的な結合を保持する。

30

【0087】

保守的置換によって交換することができる機能的に類似したアミノ酸は当業者には周知である。以下の6群は、互いに保守的置換とみなされるアミノ酸の例である：1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リシン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；および6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

40

【0088】

抗体の調製

抗体の調製は、標準の実験室技法を使用して実施することができる。抗体は、動物血清から得ることができ、あるいはモノクローナル抗体またはその断片の場合には、細胞培養物中で産生することができる。細菌または哺乳動物細胞培養物において、確立された手順に従って抗体を産生するために組換えDNA技術を使用することができる。

【0089】

モノクローナル抗体を産生するための方法は当技術分野で周知である。簡単に述べると

50

、モノクローナル抗体は、一般には、骨髄腫細胞を、所望の抗原を用いて免疫したマウスまたはウサギ由来の脾臓細胞と融合させることによって作製される。本明細書では、所望の抗原はTRBC1ペプチドもしくはTRBC2ペプチド、またはTRBC1もしくはTRBC2のいずれかを含むTCR鎖である。

【0090】

あるいは、抗体および関連する分子、特にscFvは、VH鎖のライブラリーとVL鎖のライブラリーを組換え様式で組み合わせることによって免疫系の外で作製することができる。そのようなライブラリーは、実施例12に記載の通り、ファージディスプレイ技術を使用して構築し、スクリーニングすることができる。

【0091】

TRBC1/TRBC2選択的抗体の同定

TRBC1またはTRBC2のいずれかに対して選択的な抗体は、当技術分野における標準の方法を使用して同定することができる。抗体の結合特異性を決定するための方法としては、これだけに限定されないが、ELISA、ウエスタンブロット、免疫組織化学的検査、フローサイトメトリー、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)、ファージディスプレイライブラリー、酵母ツーハイブリッド法、免疫共沈降、二分子蛍光補完法およびタンデムアフィニティー精製が挙げられる。

【0092】

TRBC1またはTRBC2のいずれかに対して選択的な抗体を同定するために、抗体のTRBC1およびTRBC2の各々に対する結合を評価した。一般には、これは、抗体の各TRBCに対する結合を別々に決定することによって評価する。選択的な抗体は、TRBC1またはTRBC2のいずれかに、他のTRBCに顕著に結合することなく結合する。

【0093】

抗体模倣物

あるいは、作用因子は、免疫グロブリンに由来するものではないまたは免疫グロブリンに基づくものではない分子であってよい。非抗体ポリペプチドの結合能力を活用するためにいくつもの「抗体模倣」設計反復タンパク質(DRP)が開発されてきた。

【0094】

アンキリンまたはロイシンリッチ反復タンパク質などの反復タンパク質は、抗体とは異なり細胞内および細胞外に存在する遍在的な結合分子である。それらの独特のモジュラーアーキテクチャにより反復構造単位(反復)が特徴付けられ、それらが共に積み重なって可変性のモジュラー標的結合表面を提示する伸長した反復ドメインが形成される。このモジュール性に基づいて、高度に多様化した結合特異性を有するポリペプチドのコンビナトリアルライブラリーを生成することができる。DARPin(s)(設計されたアンキリン反復タンパク質)はこの技術に基づく抗体模倣物の1つの例である。

【0095】

アンチカリン(anticalin)に関しては、結合特異性は、タンパク質のファミリーであるリポカリンに由来し、それは、化学的に感受性が高いまたは不溶性の化合物の生理的輸送および貯蔵に関連するin vivoにおけるある範囲の機能を果たす。リポカリンは、タンパク質の一末端において4つのループを支持する高度に保存された α -バレルを含むロバスタな内因性構造を有する。結合ポケットへの入口のためのこれらのループおよび分子のこの部分におけるコンフォメーションの差異が、異なるリポカリン間で結合特異性が変動する原因になっている。

【0096】

アビマーは、ヒト細胞外受容体ドメインの大きなファミリーからin vitroにおけるエクソンシャッフリングおよびファージディスプレイにより進化させ、結合特性および阻害特性を有する複数ドメインタンパク質を生成したものである。

【0097】

バーサボディ(versabody)は、大多数のタンパク質に存在する疎水性コアを

10

20

30

40

50

置き換えて、ジスルフィド密度の高い足場を形成するシステインを15%超有する3~5 kDaの小さなタンパク質である。疎水性コアを含む多数の疎水性アミノ酸を少数のジスルフィドで置き換えることにより、より小さく、より親水性であり、プロテアーゼおよび熱に対する抵抗性がより高く、T細胞エピトープの密度がより低いタンパク質をもたらされる。これら4つの性質の全てが、免疫原性が相当に低下したタンパク質をもたらす。それらは、E. coliにおいて製造することもでき、高度に可溶性かつ安定である。

【0098】

コンジュゲート

抗体または模倣物は、抗体または模倣物と、別の作用因子または抗体とのコンジュゲートであってよく、例えば、コンジュゲートは、検出可能な実体または化学療法用実体であってよい。

10

【0099】

検出可能な実体は、蛍光部分、例えば、蛍光ペプチドであってよい。「蛍光ペプチド」とは、励起後に検出可能な波長で光を放出するポリペプチドを指す。蛍光タンパク質の例としては、これだけに限定されないが、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)、アロフィコシアニン(APC)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、増強GFP、赤色蛍光タンパク質(RFP)、青色蛍光タンパク質(BFP)およびmCherryが挙げられる。

【0100】

検出可能な実体とコンジュゲートした選択的TRBC1またはTRBC2作用因子を使用して、悪性T細胞のTRBCを決定することができる。

20

【0101】

化学療法用実体とは、本明細書で使用される場合、細胞に対して破壊的である実体を指す、つまり、実体により細胞の生存能力が低下する。化学療法用実体は、細胞傷害性薬物であってよい。企図される化学療法剤としては、これだけに限定することなく、アルキル化剤、ニトロソウレア、エチレンイミン/メチルメラミン、スルホン酸アルキル、代謝拮抗薬、ピリミジン類似体、エピポドフィロトキシン(epipodophyllotoxin)、L-アスパラギナーゼなどの酵素; IFN、IL-2、G-CSFおよびGM-CSFなどの生物学的反応修飾物質; シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金配位錯体、アントラセンジオン、ヒドロキシウレアなどの置換尿素、N-メチルヒドラジン(MIH)およびプロカルバジンを含めたメチルヒドラジン誘導体、ミトタン(o,p'-DDD)およびアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制薬; プレドニゾンおよび等価物などの副腎皮質ステロイドアンタゴニストを含めたホルモンおよびアンタゴニスト、デキサメタゾンおよびアミノグルテチミド; カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロンおよび酢酸メゲストロールなどのプロゲステン; ジエチルスチルベストロールおよびエチニルエストラジオール等価物などのエストロゲン; タモキシフェンなどの抗エストロゲン薬; プロピオン酸テストステロンおよびフルオキシメステロン/等価物を含めたアンドロゲン; フルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン類似体およびロイプロリドなどの抗アンドロゲン薬; ならびにフルタミドなどの非ステロイド性抗アンドロゲン薬が挙げられる。

30

40

【0102】

化学療法用実体とコンジュゲートしたTRBC選択的作用因子により、TRBC1またはTRBC2のいずれかを発現する細胞に化学療法用実体を標的化送達することが可能になる。

【0103】

二重特異性T細胞エンゲージャー

抗体様結合ドメインを2つ有するという基本概念に基づく多種多様な分子が開発されてきた。

【0104】

二重特異性T細胞エンゲージ分子(Bispecific T-cell engag

50

ing molecule) は、主に抗がん薬として使用するために開発されてきた二重特異性抗体型分子のクラスである。これらは、宿主の免疫系、より具体的には、T細胞の細胞傷害活性をがん細胞などの標的細胞に対して方向付ける。これらの分子では、一方の結合ドメインがT細胞にCD3受容体を介して結合し、他方が腫瘍細胞などの標的細胞(腫瘍特異的分子を介して)に結合する。二重特異性分子は標的細胞およびT細胞の両方に結合するので、それにより標的細胞がT細胞と近づき、そうすることで、T細胞がその効果、例えば、がん細胞に対する細胞傷害効果を発揮することが可能になる。T細胞：二重特異性Ab：がん細胞複合体の形成により、T細胞におけるシグナル伝達が誘導され、それにより、例えば、細胞傷害性メディエーターの放出が導かれる。当該作用因子により標的細胞の存在下で所望のシグナル伝達のみが誘導され、選択的な死滅が導かれることが理想的である。

10

【0105】

二重特異性T細胞エンゲージ分子はいくつもの異なる構成で開発されてきたが、最も一般的なもののうちの1つは、異なる抗体の2つの単鎖可変断片(s c F v)からなる融合物である。これらは、時には、BiTE(二重特異性T細胞エンゲージャー)として公知である。

【0106】

本発明の方法で使用する作用因子は、TRBC1またはTRBC2を選択的に認識し、T細胞を活性化することができる二重特異性分子であってよい。例えば、作用因子は、BiTEであってよい。方法において使用する作用因子は、

20

(i) TRBC1またはTRBC2のいずれかに結合する第1のドメイン；および

(ii) T細胞を活性化することができる第2のドメイン

を含んでよい。

【0107】

二重特異性分子は、その産生を補助するためにシグナルペプチドを含んでよい。シグナルペプチドにより、二重特異性分子を宿主細胞から分泌させることができ、そうすることで、二重特異性分子を宿主細胞上清から回収することができる。

【0108】

シグナルペプチドは、分子のアミノ末端にあってよい。二重特異性分子は、一般式：シグナルペプチド-第1のドメイン-第2のドメインを有してよい。

30

【0109】

二重特異性分子は、第1のドメインを第2のドメインと接続し、2つのドメインを空間的に分離するためのスペーサー配列を含んでよい。

【0110】

スペーサー配列は、例えば、IgG1ヒンジまたはCD8ストークを含んでよい。あるいは、リンカーは、長さおよび/またはドメイン間隔の性質がIgG1ヒンジまたはCD8ストークと同様である代替リンカー配列を含んでよい。

【0111】

二重特異性分子は、上で定義されたJOVI-1またはその機能性断片を含んでよい。

【0112】

キメラ抗原受容体(CAR)

40

キメラ抗原受容体(CAR)は、キメラT細胞受容体、人工T細胞受容体およびキメラ免疫受容体としても公知であり、任意の特異性を免疫エフェクター細胞に移植する、工学的に作製された受容体である。古典的CARでは、モノクローナル抗体の特異性がT細胞に移植されている。CARをコードする核酸を、例えば、レトロウイルスベクターを使用してT細胞に移入することができる。この方法では、養子細胞移入のための多数のがん特異的T細胞を生成することができる。この手法の第I相臨床試験では有効性が示されている。

【0113】

CARの標的抗原結合ドメインは、一般に、スペーサーおよび膜貫通ドメインを介して

50

細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含むまたはそれと会合するエンドドメイン (e n d o d o m a i n) と融合させる。C A R が標的抗原に結合すると、それを発現するT細胞に活性化シグナルが伝達される。

【 0 1 1 4 】

本発明の方法で使用する作用因子は、T R B C 1 または T R B C 2 を選択的に認識するC A R であってよい。作用因子は、T R B C 1 または T R B C 2 に選択的に認識するC A R を発現するT細胞であってよい。

【 0 1 1 5 】

C A R は、膜にまたがる膜貫通ドメインも含んでよい。C A R は、疎水性アルファヘリックスを含んでよい。膜貫通ドメインは、良好な受容体安定性をもたらす、C D 2 8 に由来するものであってよい。

10

【 0 1 1 6 】

エンドドメインは、シグナル伝達に關与するC A R の部分である。エンドドメインは、細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含むか、またはそれと会合する。抗原認識後、受容体が密集し、シグナルが細胞に伝達される。最も一般的に使用されるT細胞シグナル伝達成分は、3つのI T A M を含有するC D 3 - ゼータのものである。これにより、抗原が結合した後、活性化シグナルがT細胞に伝達される。C D 3 - ゼータからは完全にコンピテントな活性化シグナルはもたらされず、追加的な共刺激シグナルが必要な場合がある。例えば、増殖/生存シグナルを伝達するためにキメラC D 2 8 およびO X 4 0 をC D 3 - ゼータと一緒に使用することができる、または3つ全てを一緒に使用することができる。

20

【 0 1 1 7 】

C A R のエンドドメインは、C D 2 8 エンドドメインおよびO X 4 0 およびC D 3 - ゼータエンドドメインを含んでよい。

【 0 1 1 8 】

C A R は、シグナルペプチドを含んでよく、そうすることで、C A R がT細胞などの細胞の内部で発現すると、新生タンパク質が小胞体、その後、それが発現されている細胞表面に方向付けられる。

【 0 1 1 9 】

C A R は、T R B C 結合ドメインを膜貫通ドメインに接続し、T R B C 結合ドメインをエンドドメインから空間的に分離するためにスペーサー配列を含んでよい。柔軟なスペーサーにより、T R B C 結合ドメインを異なる方向に向かせてT R B C との結合を可能とすることが可能になる。

30

【 0 1 2 0 】

スペーサー配列は、例えば、I g G 1 F c 領域、I g G 1 ヒンジもしくはC D 8 ストック、またはこれらの組合せを含んでよい。あるいは、リンカーは、I g G 1 F c 領域、I g G 1 ヒンジまたはC D 8 ストックと長さおよび/またはドメイン間隔の性質が同様である代替リンカー配列を含んでよい。

【 0 1 2 1 】

I g G 1 ヒンジまたはC D 8 ストックに基づくスペーサーを含むC A R により、ジャーカット細胞に対する最良の性能が示される (図 1 5) ことが見いだされた。したがって、スペーサーはI g G 1 ヒンジまたはC D 8 ストックを含んでもよく、これはI g G 1 ヒンジまたはC D 8 ストックと長さおよび/またはドメイン間隔の性質が同様であってもよい。

40

【 0 1 2 2 】

ヒトI g G 1 スペーサーは、F c 結合モチーフが除去されるように変更することができる。

【 0 1 2 3 】

C A R は、上で定義されたJ O V I - 1 抗体またはその機能性断片を含んでよい。

【 0 1 2 4 】

C A R は、配列番号33、34および35からなる群から選択されるアミノ酸配列を含

50

んでよい。

【化5 - 1】

> 配列番号 33 JOVI-1 CD8ストークスパーサーを有するCAR

METDTLLLWLLWIPGSTGEVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHW
 VKQRPGQGLEWIGFINPYNDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAV
 YYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQS
 PLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFP
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIKRSDPTTTPA
 PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVWVGGVLACYSL
 LVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDR
 LPPDAHKPPGGGSGFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
 NLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
 ERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

【化5 - 2】

> 配列番号 34 JOVI-1 H-CH2-CH3pvaa スパーサーを有するCAR

METDTLLLWLLWIPGSTGEVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHW
 VKQRPGQGLEWIGFINPYNDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAV
 YYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQS
 PLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFP
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIKRSDPAEPK
 SPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGKKDPKFWVLVWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP
 TRKHYPYAPPRDFAAYRSRDRQLPPDAHKPPGGGSGFRTPIQEEQADAHSTLAKIR
 VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQ
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR

20

30

> 配列番号 35 JOVI-1 IgG1ヒンジスパーサーを有する CAR

METDTLLLWLLWIPGSTGEVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHW
 VKQRPGQGLEWIGFINPYNDIQSNERFRGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAV
 YYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGQTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQS
 PLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFP
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIKRSDPAEPK
 SPDKTHTCPPCPKDPKFWVLVWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMN
 MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDRQLPPDAHKPPGGGSGFRTPIQEEQAD
 AHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPR

40

50

【0125】

上記のCAR配列では、6つのCDRのうちの1つまたは複数は、各々独立に、得られるCARがTRBC1に結合する能力を保持するのであれば、配列番号7～12で示される配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸変異（例えば置換）を含んでもよく、含まなくてもよい。

【0126】

上記のアミノ酸配列のバリエーションも、得られるCARがTRBC1またはTRBC2に結合し、顕著に交差反応しないのであれば、本発明において使用することができる。一般には、そのようなバリエーションは、配列番号33、34または35で示される配列のうちの1つに対して高程度の配列同一性を有する。

10

【0127】

CARのバリエーションは、一般には、配列番号33、34および35で示される配列のうちの1つに対して少なくとも約75%、例えば、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する。

【0128】

核酸

本発明は、BiTEまたは本発明の第1の態様のCARなどの作用因子をコードする核酸をさらに提供する。

【0129】

核酸配列は、配列番号33、34および35で示されるアミノ酸配列のうちの1つを含むCARをコードし得る。

20

【0130】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、互いに同義であるものとする。

【0131】

遺伝暗号の縮重の結果として、多数の異なるポリヌクレオチドおよび核酸が同じポリペプチドをコードする可能性があることが当業者には理解される。さらに、当業者は、ポリペプチドを発現する任意の特定の宿主生物体のコドン使用を反映するために、常套的な技法を使用して本明細書に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド配列に影響を及ぼさないヌクレオチド置換を行うことができることが理解されるべきである。

30

【0132】

本発明による核酸は、DNAまたはRNAを含んでもよい。核酸は一本鎖であっても二本鎖であってもよい。それは、合成または修飾されたヌクレオチドをその中に含むポリヌクレオチドであってもよい。オリゴヌクレオチドに対するいくつもの異なる型の修飾が当技術分野で公知である。これらとしては、メチルホスホネート骨格およびホスホロチオエート骨格、分子の3'末端および/または5'末端へのアクリジン鎖またはポリリシン鎖の付加が挙げられる。本明細書に記載の通り使用するために、当技術分野において利用可能な任意の方法によってポリヌクレオチドを修飾できることが理解されるべきである。そのような修飾は、目的のポリヌクレオチドの*in vivo*における活性または寿命を増強するために行うことができる。

40

【0133】

ヌクレオチド配列と関連した「バリエーション」、「相同体」または「誘導体」という用語は、配列からまたは配列への1つ（または複数）の核酸の任意の置換、変動、修飾、置き換え、欠失または付加を含む。

【0134】

ベクター

本発明は、本発明の1つまたは複数の核酸配列を含むベクター、またはベクターのキットも提供する。そのようなベクターを使用して核酸配列を宿主細胞に導入し、そうすることで宿主細胞に本発明の第1の態様に記載のCARを発現させることができる。

【0135】

50

ベクターは、例えば、プラスミドまたはレトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターなどのウイルスベクター、またはトランスポゾンに基づくベクターまたは合成 mRNA であってよい。

【0136】

ベクターは、T細胞またはNK細胞にトランスフェクトまたは形質導入することができるものであってよい。

【0137】

細胞

本発明は、本発明の第1の態様にしたがうCARを含む免疫細胞などの細胞にも関する。

10

【0138】

細胞は、本発明の核酸またはベクターを含んでよい。

【0139】

細胞は、T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞であってよい。

【0140】

T細胞は、細胞媒介性免疫において中心的な役割を果たすリンパ球の一種であるT細胞またはTリンパ球であってよい。これらは、細胞表面上にT細胞受容体(TCR)が存在することにより、B細胞およびナチュラルキラー細胞(NK細胞)などの他のリンパ球と区別することができる。下に要約されている通り、種々の型のT細胞が存在する。

【0141】

ヘルパーT細胞(TH細胞)は、B細胞の形質細胞およびメモリーB細胞への成熟化、ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含めた免疫学的プロセスにおいて他の白血球を補助する。TH細胞は、表面上にCD4を発現する。TH細胞は、抗原提示細胞(APC)の表面上のMHCクラスII分子によってペプチド抗原が提示されると活性化される。これらの細胞は、異なる型の免疫応答を促進するような異なるサイトカインを分泌する、TH1、TH2、TH3、TH17、Th9、またはTFHを含めたいくつかの亜型のうちの1つに分化し得る。

20

【0142】

細胞溶解性T細胞(TC細胞、またはCTL)は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、また、移植拒絶にも関係づけられる。CTLは、表面上にCD8を発現する。これらの細胞は、全ての有核細胞の表面上に存在するMHCクラスIに付随する抗原に結合することによってそれらの標的を認識する。調節性T細胞から分泌されるIL-10、アデノシンおよび他の分子を通じて、CD8+細胞を不活性化してアネルギーの状態にすることができ、それにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎などの自己免疫疾患を予防する。

30

【0143】

メモリーT細胞は、感染が消散した後、長期間存続する抗原特異的T細胞のサブセットである。これらは、同族抗原に再曝露されると直ちに増大して多数のエフェクターT細胞になり、そうすることで、過去の感染に対する「メモリー」による免疫系をもたらす。メモリーT細胞は、3つの亜型：セントラルメモリーT細胞(TCM細胞)およびエフェクターメモリーT細胞の2つの型(TEM細胞およびTEMRA細胞)を含む。メモリー細胞は、CD4+またはCD8+のいずれかであり得る。メモリーT細胞は、一般には、細胞表面タンパク質CD45ROを発現する。

40

【0144】

調節性T細胞(Treg細胞)は、以前はサブレッサーT細胞として公知であり、免疫寛容を維持するために極めて重要である。それらの主要な役割は、T細胞媒介性免疫をシャットダウンして免疫反応の終わりに向かわせること、および胸腺における負の選択のプロセスを免れた自己反応性T細胞を抑制することである。

【0145】

2種の主要なクラスのCD4+Treg細胞が記載されている - 天然に存在するTreg細胞および適応性Treg細胞。

50

【0146】

天然に存在するTreg細胞(CD4+CD25+FoxP3+Treg細胞としても公知)は、胸腺において生じ、発達中のT細胞と、TSLPで活性化された骨髄樹状細胞(CD11c+)および形質細胞様樹状細胞(CD123+)との間の相互作用に関連付けられている。天然に存在するTreg細胞は、FoxP3と称される細胞内分子が存在することにより、他のT細胞と区別することができる。FOX P3遺伝子の変異により、調節性T細胞の発生が妨げられ、それにより、致死的な自己免疫疾患IPEXが引き起こされる可能性がある。

【0147】

適応性Treg細胞(Tr1細胞またはTh3細胞としても公知)は、正常な免疫応答の間に生じる可能性がある。

10

【0148】

細胞は、ナチュラルキラー細胞(またはNK細胞)であってよい。NK細胞は、自然免疫系の一部を形成する。NK細胞により、ウイルス感染細胞からの生得的なシグナルに対する迅速な応答がMHC非依存的にもたらされる。

【0149】

NK細胞(生得的なリンパ系細胞の群に属する)は、大型顆粒リンパ球(LGL)と定義され、Bリンパ球およびTリンパ球を生成する共通のリンパ系前駆細胞から分化する第3の種類の細胞を構成する。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃および胸腺において分化および成熟し、次いでそこから循環中に入ることが公知である。

20

【0150】

本発明のCAR細胞は、上記の細胞型のいずれであってもよい。

【0151】

本発明の第1の態様にしたがうCARを発現するT細胞またはNK細胞は、患者自身の末梢血(第一者)、またはドナー末梢血からの造血幹細胞移植の状況で(第二者)、または無関係のドナー由来の末梢血(第三者)のいずれかからex vivoで創出することができる。

【0152】

あるいは、本発明の第1の態様にしたがうCARを発現するT細胞またはNK細胞は、誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞のT細胞またはNK細胞へのex vivoにおける分化から誘導されてもよい。あるいは、その溶解機能を保持し、治療薬としての機能を果たし得る不死化T細胞株を使用することができる。

30

【0153】

これらの実施形態の全てにおいて、CAR細胞は、ウイルスベクターを用いた形質導入、DNAまたはRNAを用いたトランスフェクションを含めた多くの手段のうちの1つによってCARをコードするDNAまたはRNAを導入することにより生成される。

【0154】

本発明のCAR細胞は、対象に由来するex vivoのT細胞またはNK細胞であってよい。T細胞またはNK細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)試料に由来するものであってよい。T細胞またはNK細胞は、本発明の第1の態様にしたがうCARをコードする核酸を用いて形質導入する前に、例えば、抗CD3モノクローナル抗体を用いて処理することによって活性化および/または増大させることができる。

40

【0155】

本発明のT細胞またはNK細胞は、

(i) 対象または上に列挙されている他の供給源由来のT細胞またはNK細胞を含有する試料の単離; および

(ii) T細胞またはNK細胞へに本発明のCARをコードする核酸配列の形質導入またはトランスフェクト

によって作製することができる。

【0156】

50

次いで、T細胞またはNK細胞を、精製、例えば、抗原結合ポリペプチドの抗原結合ドメインの発現に基づいて選択することができる。

【0157】

本発明は、本発明の第1の態様にしたがうCARを含むT細胞またはNK細胞を含むキットも提供する。

【0158】

医薬組成物

本発明は、本発明の第1の態様のCARを発現する複数の細胞を含有する医薬組成物にも関する。医薬組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤をさらに含んでよい。医薬組成物は、任意選択で、1つまたは複数のさらなる薬学的に活性なポリペプチドおよび/または化合物を含んでよい。そのような製剤は、例えば、静脈内注入に適した形態であってよい。

【0159】

T細胞リンパ腫および/または白血病

本発明は、T細胞リンパ腫および/または白血病を処置するための作用因子、細胞および方法に関する。

【0160】

T細胞リンパ腫および/または白血病を処置するための方法は、作用因子の処置的使用に関する。本明細書では、疾患に伴う少なくとも1つの症状を和らげる、軽減または改善するため、および/または疾患の進行を遅らせる、軽減または遮断するために、T細胞リンパ腫および/または白血病の現存する疾患を有する対象に作用因子を投与することができる。

【0161】

本発明の方法は、定常領域を含むT細胞受容体(TCR)を発現する細胞のクローン性増大に関連する任意のリンパ腫および/または白血病を処置するために使用することができる。そのように、本発明は、TRBCを含むTCRを発現する悪性T細胞を伴う疾患を処置する方法に関する。

【0162】

本発明の方法は、悪性T細胞がTRBCを含むTCRを発現するT細胞リンパ腫を処置するために使用することができる。「リンパ腫」とは、本明細書では、その標準の意味に従って使用され、一般には、リンパ節において発生するが、脾臓、骨髄、血液および他の器官にも影響を及ぼす可能性があるがんを指す。リンパ腫は、一般には、リンパ系細胞の固形腫瘍として存在する。リンパ腫に関連する一次性症状はリンパ節腫脹であるが、二次性(B)症状として、発熱、寝汗、体重減少、食欲の喪失、疲労、呼吸窮迫およびそう痒を挙げることができる。

【0163】

本発明の方法は、悪性T細胞がTRBCを含むTCRを発現するT細胞白血病を処置するために使用することができる。「白血病」とは、本明細書では、その標準の意味に従って使用され、血液または骨髄のがんを指す。

【0164】

以下は、本発明の方法によって処置することができる疾患の例示的な、包括的ではない一覧である。

【0165】

末梢性T細胞リンパ腫

末梢性T細胞リンパ腫は、比較的稀なリンパ腫であり、全ての非ホジキンリンパ腫(NHL)の10%未満を占める。しかし、それらは侵襲性の臨床経過を伴い、大多数のT細胞リンパ腫の原因および正確な細胞起源は未だ十分に定義されていない。

【0166】

リンパ腫は、通常、まず頸部、脇の下または鼠径部の腫脹として現れる。例えば脾臓内など、他のリンパ節が位置する場所に追加的な腫脹が生じる可能性がある。一般に、腫大

10

20

30

40

50

したリンパ節は、血管、神経、または胃の空間を侵害し、それぞれ腕および脚の膨張、刺痛およびしびれ、または満腹感が生じる可能性がある。リンパ腫の症状としては、発熱、悪寒、不明の体重減少、寝汗、嗜眠、およびそう痒などの非特異的な症状も挙げられる。

【0167】

WHO分類では、末梢性T細胞リンパ腫に関して予後および治療に意味のあるカテゴリー化を詳細に説明するために、形態的特徴および免疫表現型特徴と、臨床的態様およびいくつかの症例では遺伝学を併せて利用する (Swerdlowら; WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 第4版; Lyon: IARC Press; 2008年)。腫瘍性T細胞の解剖学的局在化は、一部において、それらの提唱された正常細胞対応物および機能と並行し、そのため、T細胞リンパ腫はリンパ節および末梢血に関連する。この手法により、細胞分布、形態のいくつかの態様、さらには関連する臨床所見を含めた、T細胞リンパ腫の顕在化のいくつかをよりよく理解することが可能になる。

10

【0168】

最も一般的なT細胞リンパ腫は、特定不能末梢性T細胞リンパ腫 (PTCL-NOS) であり、これが全体の25%を占め、その次に血管免疫芽細胞性T細胞リンパ腫 (AITL) (18.5%)が続く。

【0169】

特定不能末梢性T細胞リンパ腫 (PTCL-NOS)

PTCL-NOSは、全ての末梢性T細胞リンパ腫およびNK/T細胞リンパ腫の25%超を占め、最も一般的な亜型である。これは、除外診断によって決定され、現行のWHO 2008に列挙されている特定の成熟T細胞リンパ腫実体のいずれにも対応しない。そのため、これは、特定不能びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (DLBCL-NOS) と類似している。

20

【0170】

大多数の患者は成人であり、年齢の中央値は60歳であり、男女比は2:1である。大多数の症例は結節起源であるが、患者のおよそ13%で結節外症状が生じ、最も一般的には皮膚および胃腸管が関与する。

【0171】

細胞学的スペクトルは非常に広範であり、多形から単一形までにわたる。リンパ類上皮 (レンネルト) パリアント、Tゾーンパリアントおよび濾胞パリアントを含めた、3つの形態学的に定義されたパリアントが記載されている。PTCLのリンパ類上皮パリアントは、豊富なバックグラウンド類上皮細胞組織球を含有し、一般にCD8について陽性である。それは、より良い予後と関連付けられている。PTCL-NOSの濾胞パリアントは、潜在的に別個の臨床病理学的実体として出現し始めている。

30

【0172】

大多数のPTCL-NOSは成熟T細胞表現型を有し、大多数の症例はCD4陽性である。症例の75%で少なくとも1つの汎T細胞マーカー (CD3、CD2、CD5またはCD7) の可変性の喪失が示され、CD7およびCD5は、最もしばしば下方制御される。CD30および稀にCD15が発現する場合があります。CD15は有害な予後の特徴である。CD56発現も、稀であるが、負の予後の影響を有する。追加的な有害な病理的予後因子としては、KI-67発現に基づいて増殖率が25%を超えること、および形質転換された細胞が70%超存在することが挙げられる。これらのリンパ腫の免疫表現分析からもたらされるそれらの生物学への洞察はわずかである。

40

【0173】

血管免疫芽球性T細胞リンパ腫 (AITL)

AITLは、リンパ節が関与する多形浸潤、顕著な高内皮細静脈 (HEV) および濾胞樹状細胞 (FDC) 網目構造の血管周囲増大を特徴とする全身性疾患である。AITLは、通常は胚中心において見いだされる、濾胞ヘルパー型のT細胞 (TFH) に由来するデノボのT細胞リンパ腫と考えられる。

50

【 0 1 7 4 】

A I T L は、末梢性 T 細胞リンパ腫および N K / T 細胞リンパ腫の中で 2 番目に一般的な実体であり、症例の約 1 8 . 5 % を占める。それは、中年～高齢の成人において生じ、年齢の中央値は 6 5 歳であり、発生率は男性と女性でほぼ同等である。臨床的に、患者は、通常、全身リンパ節腫脹、肝脾腫および顕著な体質性症状を伴う進行期疾患を有する。そう痒を伴う皮疹が一般に存在する。多くの場合、自己免疫性現象に関連したポリクローナル高ガンマグロブリン血症が存在する。

【 0 1 7 5 】

A I T L では 3 つの異なる形態的パターンが記載されている。A I T L の初期病変 (パターン I) では、通常、特徴的な過形成性卵胞を伴う保存されたアーキテクチャが示される。腫瘍性増殖が卵胞の末梢に局在している。パターン I I では、結節のアーキテクチャが部分的に消滅し、わずかに退行した卵胞が保持される。被膜下洞は保存され、さらには拡大する。傍皮質は分枝 H E V を含有し、B 細胞卵胞を超えて F D C が増殖する。新生物細胞は小～中サイズであり、細胞学的な非定型性は最小である。それは、多くの場合、澄明～ぼんやりした細胞質を有し、はっきりした細胞膜を示し得る。通常は多形炎症性バックグラウンドが明らかである。

10

【 0 1 7 6 】

A I T L は T 細胞悪性腫瘍であるが、B 細胞および形質細胞が特徴的に増大し、これは、新生物細胞の T F H 細胞としての機能を反映すると思われる。E B V 陽性 B 細胞および E B V 陰性 B 細胞が両方存在する。場合によって、非定型 B 細胞はホジキンノリード・シユテルンベルク様細胞と形態学におよび免疫表現型的に類似するときがあり、時には、その実体との診断的錯乱が生じる。A I T L における B 細胞増殖は広範囲にわたる可能性があり、一部の患者では二次性 E B V 陽性びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (D L B C L) またはより稀に E B V 陰性 B 細胞腫瘍が発生し、多くの場合、形質細胞性分化を伴う。

20

【 0 1 7 7 】

A I T L の腫瘍性 C D 4 陽性 T 細胞は、C D 1 0 および C D 2 7 9 (P D - 1) の強力な発現を示し、そして、C X C L 1 3 について陽性である。C X C L 1 3 により、H E V への接着を介したリンパ節への B 細胞動員の増加、B 細胞活性化、形質細胞性分化および F D C 網目構造の増大が導かれ、これらは全て、A I T L の形態的特徴および臨床的特徴に寄与する。濾胞周囲の腫瘍細胞における強い P D - 1 発現が、A I T L パターン I と反応性濾胞および傍皮質過形成との区別に特に役立つ。

30

【 0 1 7 8 】

P T C L - N O S の濾胞バリエーションは、T F H 表現型を有する別の実体である。A I T L と対比して、それは、顕著な H E V または F D C 網目構造の濾胞外増大を有しない。新生物細胞が、B 細胞濾胞性リンパ腫を模倣する濾胞内凝集体を形成する可能性があるが、濾胞間の成長パターンを有するまたは外套帯の増大を伴う可能性もある。臨床的に、P T C L - N O S の濾胞バリエーションは、患者が部分的なリンパ節の関与を伴う初期疾患を示す頻度がより多く、そして A I T L に関連する体質性症状がない場合があるので、A I T L とは別個のものである。

40

【 0 1 7 9 】

未分化大細胞型リンパ腫 (A L C L)

A L C L は、A L C L - 「未分化リンパ腫キナーゼ」 (A L K) + または A L C L - A L K - に細分され得る。

【 0 1 8 0 】

A L C L - A L K + は、末梢性 T 細胞リンパ腫の中で最もよく定義された実体の 1 つであり、蹄鉄形の核を有し、A L K および C D 3 0 を発現する特徴的な「特質細胞」を有する。それは、全ての末梢性 T 細胞および N K - 細胞リンパ腫の約 7 % を占め、人生の最初の 3 0 年で最も一般的なものである。患者は、多くの場合リンパ節腫脹を示すが、結節外の部位 (皮膚、骨、軟部組織、肺、肝臓) への関与および B 症状が一般的である。

50

【0181】

A L C L、A L K + は広い形態スペクトルを示し、5つの異なるパターンが記載されているが、全てのバリエーションが何らかの特質細胞を含有する。特質細胞は偏心性の蹄鉄形または腎臓形の核、および顕著な核周囲の好酸性ゴルジ領域を有する。腫瘍細胞は、洞関与に偏好した粘着性パターンで成長する。小細胞バリエーションではより小さな腫瘍細胞が優性であり、リンパ組織球性バリエーションでは、豊富な組織球により腫瘍細胞の存在が遮蔽され、その多くが小さなものである。

【0182】

定義によれば、全症例でA L KおよびC D 3 0陽性が示され、発現は、通常はより小さな腫瘍細胞においてより弱い。多くの場合、汎T細胞マーカーが欠如し、症例の75%でC D 3の表面発現が欠如している。

10

【0183】

A L K発現は、キメラタンパク質の発現をもたらす、第2染色体p 2 3上のA L K遺伝子の、多くのパートナー遺伝子のうちの1つへの再構成からなる特徴的な再発性遺伝子変更の結果である。症例の75%において生じる最も一般的なパートナー遺伝子は、第5染色体q 3 5上のヌクレオフォスミン(N P M 1)であり、t(2;5)(p 2 3;q 3 5)をもたらす。異なる転座バリエーションにおけるA L Kの細胞分布は、パートナー遺伝子に応じて変動し得る。

【0184】

A L C L - A L K - は、2008 WHO分類に暫定的なカテゴリーとして含まれる。それは、粘着性成長パターンおよび特質細胞の存在を伴い、形態学的にはA L C L - A L K + と区別できないが、A L Kタンパク質の発現を欠くC D 3 0陽性T細胞リンパ腫と定義される。

20

【0185】

患者は、通常、40歳から65歳の間の成人であり、これは、小児および若年成人においてより一般的であるA L C L - A L K + とは対照的である。A L C L - A L K - では、リンパ節および結節外組織のどちらも関与する可能性があるが、後者はA L C L - A L K + において見られるよりも一般的でない。A L C L - A L K - の大多数の症例で、典型的な「特質」特徴を有する粘着性新生物細胞のシートによるリンパ節アーキテクチャの消滅が実証される。A L C L - A L K + とは対照的に、小細胞形態バリエーションは認識されていない。

30

【0186】

A L C L - A L K - では、そのA L K + 対応物とは異なり、表面T細胞マーカー発現のより大きな保存が示されるが、細胞傷害性マーカーおよび上皮膜抗原(E M A)の発現は可能性がより低い。遺伝子発現シグネチャおよび再発性染色体不均衡はA L C L - A L K - とA L C L - A L K + とで異なり、これらが分子レベルおよび遺伝子レベルで別個の実体であることが確認される。

【0187】

A L C L - A L K - は、A L C L - A L K + およびP T C L - N O Sのどちらとも臨床的に別個のものであり、これらの3つの異なる実体で予後に顕著な差がある。A L C L - A L K - の5年全生存率は49%と報告されており、これはA L C L - A L K + の5年全生存率(70%)ほど良好ではないが、同時に、P T C L - N O Sの5年全生存率(32%)よりも顕著に良好である。

40

【0188】

腸疾患関連T細胞リンパ腫(E A T L)

E A T Lは、腸の上皮内T細胞に由来すると考えられる侵襲性新生物である。2008 WHO分類ではE A T Lの形態学的、免疫組織化学的かつ遺伝学的に別個の型が2種類認識されている：I型(大多数のE A T Lを表す)およびII型(症例の10~20%を占める)。

【0189】

50

I型EATLは、通常、顕性または臨床的に無症候性のグルテン過敏性腸症を伴い、北欧人血統の患者において見られることがより多く、これは、この集団ではセリアック症の分布率が高いことに起因する。

【0190】

最も一般的に、EATLの病変は空腸または回腸において見られ（症例の90%）、稀に十二指腸、結腸、胃、または胃腸管の外部の領域において現れる。腸の病変は通常は多巣性であり、粘膜の潰瘍形成を伴う。EATLの臨床経過は侵襲性であり、大多数の患者が疾患または疾患の合併症で1年以内に死亡する。

【0191】

EATL I型の細胞学的スペクトルは広範であり、いくつかの症例は未分化の細胞を含有する場合がある。いくつかの症例では、腫瘍性成分を不明瞭にさせ得る多形炎症性バックグラウンドが存在する。腫瘍に隣接する領域内の腸粘膜は、多くの場合、病変性前駆細胞を表し得る絨毛の平滑化および上皮内リンパ球（IEL）の数の増加を伴うセリアック症の特徴を示す。

10

【0192】

免疫組織化学によると、新生物細胞は、多くの場合、CD3 + CD4 - CD8 - CD7 + CD5 - CD56 - F1 + であり、細胞傷害性顆粒関連タンパク質（TIA-1、グランザイムB、パーフォリン）を含有する。ほとんど全ての症例でCD30が部分的に発現される。粘膜ホーミング受容体であるCD103がEATLで発現される可能性がある。

20

【0193】

II型EATLは、単形性CD56 + 腸T細胞リンパ腫とも称され、CD8とCD56との両方を発現する小～中型の単形性T細胞で構成される腸の腫瘍と定義される。多くの場合、粘膜内で腫瘍が側方拡散し、炎症性バックグラウンドは存在しない。大多数の症例でTCRが発現されるが、TCRを伴う症例もある。

【0194】

II型EATLは、I型EATLよりも世界的に分布しており、多くの場合、セリアック症が稀であるアジア人またはラテンアメリカ系集団において見られる。ヨーロッパ血統の個体では、EATL、IIは腸T細胞リンパ腫の約20%を表し、症例の少なくともサブセットにおいてセリアック症の病歴を伴う。臨床経過は侵襲性である。

30

【0195】

肝脾T細胞リンパ腫（HSTL）

HSTLは、一般に自然免疫系の細胞傷害性T細胞に由来する侵襲性の全身性新生物であるが、稀な症例ではT細胞に由来することもあり得る。これは最も稀なT細胞リンパ腫の1つであり、一般には、青年および若年成人（年齢の中央値、35歳）に影響を及ぼし、強力に男性優性である。

【0196】

節外性NK/T細胞リンパ腫鼻型

節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型は、侵襲性疾患であり、多くの場合、破壊的な正中病変および壊死を伴う。大多数の症例はNK細胞に由来するが、いくつかの症例は細胞傷害性T細胞に由来する。これは、普遍的にエプスタイン・バーウイルス（EBV）に関連する。

40

【0197】

皮膚T細胞リンパ腫

本発明の方法は、皮膚T細胞リンパ腫を処置するためにも使用することができる。

【0198】

皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）は、悪性T細胞の皮膚への遊走を特徴とし、これにより種々の病変が出現する。これらの病変は疾患が進行するにつれて形状が変化し、一般には、発疹と思われるもので始まり、最終的にプラークおよび腫瘍が形成された後、体の他の部分に転移する。

50

【0199】

皮膚T細胞リンパ腫としては、以下の例示的な、包括的ではない一覧に記載されるものが挙げられる；菌状息肉腫、パジェット様細網症、セザリー症候群、肉芽腫様弛緩皮膚、リンパ腫様丘疹症、慢性苔癬状靴擦疹、CD30+皮膚T細胞リンパ腫、続発性皮膚CD30+大細胞型リンパ腫、非菌状息肉腫CD30-皮膚大T細胞リンパ腫、多形T細胞リンパ腫、レンネルトリンパ腫、皮下T細胞リンパ腫および血管中心性リンパ腫。

【0200】

CTCLの徴候および症状は、特定の疾患に応じて変動し、そのうち2つの最も一般的な型は菌状息肉腫およびセザリー症候群である。古典的な菌状息肉腫は3つの病期：

斑（萎縮性または非萎縮性）：非特異的皮膚炎、体幹下部および臀部の斑；そう痒が最小／存在しない；

ブランク：強いそう痒性ブランク、リンパ節腫脹；および

腫瘍：潰瘍形成易発性

に分けられる。

【0201】

セザリー症候群は、紅皮症および白血病によって定義される。徴候および症状としては、浮腫状皮膚、リンパ節腫脹、手掌および／または足底の角質増殖、脱毛症、爪ジストロフィー、外反および肝脾腫が挙げられる。

【0202】

全ての原発性皮膚リンパ腫の中で、65%がT細胞型である。最も一般的な免疫表現型はCD4陽性である。皮膚T細胞リンパ腫という用語には多種多様な障害が含まれるので、これらの疾患には共通の病態生理は存在しない。

【0203】

皮膚T細胞リンパ腫（すなわち、菌状息肉腫）の発生についての一次的な病因機構は解明されていない。菌状息肉腫には、T細胞媒介性慢性炎症性皮膚疾患が先行する可能性があり、これは、場合によって、致死性リンパ腫に進行する場合がある。

【0204】

原発性皮膚ALCL（C-ALCL）

C-ALCLは、多くの場合、形態ではALC-ALK-と区別できない。これは、細胞の75%超がCD30を発現する未分化形態、多形性形態または免疫芽球性形態の大細胞の皮膚腫瘍と定義される。リンパ腫様丘疹症（LyP）と共に、C-ALCLは一次皮膚CD30陽性T細胞リンパ球増殖性障害のスペクトルに属し、これは群として、菌状息肉腫の次に2番目に多い皮膚T細胞リンパ球増殖の群を含む。

【0205】

免疫組織化学的染色プロファイルは、ALCL-ALK-とかなり類似しており、細胞傷害性マーカーについて染色陽性である症例の割合がより大きい。腫瘍細胞の少なくとも75%がCD30について陽性のはずである。CD15も発現し、そして、リンパ節の関与が生じた場合、古典的なホジキンリンパ腫との弁別が難しい可能性がある。ALCL-ALK+の稀な症例は、局在する皮膚病変を示す可能性があり、そしてC-ALCLと類似する可能性がある。

【0206】

T細胞急性リンパ芽球性白血病

T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）は、小児コホートのALLの約15%を占め、成人コホートのALLの約25%を占める。患者は、通常、高白血球数を有し、そして臓器肥大、特に縦隔肥大およびCNSの関与を示す可能性がある。

【0207】

本発明の方法は、TRBCを含むTCRを発現する悪性T細胞に関連するT-ALLを処置するために使用することができる。

【0208】

T細胞前リンパ球性白血病

10

20

30

40

50

T細胞前リンパ球性白血病(T-PLL)は、侵襲性の挙動ならびに血液、骨髄、リンパ節、肝臓、脾臓、および皮膚の関与への偏好を伴う成熟T細胞白血病である。T-PLLは、主に30歳を超える成人に影響を及ぼす。他の名称として、T細胞慢性リンパ球性白血病、「こぶ状」型T細胞白血病、およびT前リンパ球性白血病/T細胞リンパ球性白血病が挙げられる。

【0209】

末梢血では、T-PLLは、場合によってプレブまたは突起を伴う単一の核小体および好塩基性細胞質を有する中型リンパ球からなる。核は、通常、丸形から卵形の形状であり、患者は場合によって、セザリー症候群において見られる大脳様核形状と同様の、核の輪郭がより不規則な細胞を有する。小細胞バリエーションは全てのT-PLL症例の20%を占め、セザリー細胞様(大脳様)バリエーションは症例の5%に見られる。

10

【0210】

T-PLLは成熟(胸腺後)Tリンパ球の免疫表現型を有し、新生物細胞は、一般には汎T抗原CD2、CD3、およびCD7について陽性であり、TdTおよびCD1aについては陰性である。免疫表現型CD4+/CD8-は症例の60%に存在し、CD4+/CD8+免疫表現型は25%に存在し、CD4-/CD8+免疫表現型は症例の15%に存在する。

【0211】

医薬組成物

本発明の方法は、当該作用因子を医薬組成物の形態で投与するステップを含み得る。

20

【0212】

作用因子は、薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤またはアジュバントと共に投与することができる。医薬担体、賦形剤または希釈剤の選択は、意図された投与経路および標準の薬務に関して選択される。医薬組成物は、担体、賦形剤または希釈剤として(またはそれに加えて)、任意の適切な結合物質、滑沢剤、懸濁剤、コーティング剤、可溶化剤、および他の担体剤を含んでよい。

【0213】

投与

当該作用因子の投与は、活性成分が生物により利用可能になるような種々の経路のいずれかを使用して実現することができる。例えば、当該作用因子は、経口経路および非経口経路によって、腹腔内に、静脈内に、皮下に、経皮的に、筋肉内に、局所送達によって、例えばカテーテルまたはステントによって投与することができる。

30

【0214】

一般には、個々の対象に最も適した実際の投与量は医師により決定され、投与量は、特定の患者の年齢、体重および応答によって変動する。投与量は、TRBC1またはTRBC2のいずれかを発現するクローン性T細胞の数を減少または枯渇させるために十分であるようなものである。

【0215】

使用

本発明は、第1の態様の方法に従ったT細胞リンパ腫の処置において使用するための作用因子も提供する。作用因子は上で定義された任意の作用因子であってよい。

40

【0216】

本発明は、第1の態様の方法に従ったT細胞リンパ腫の処置のための医薬の製造における、上で定義された作用因子の使用にも関する。

【0217】

キット

本発明は、第1の態様の方法に従ったT細胞リンパ腫の処置において使用するための、上で定義された作用因子を含むキットをさらに提供する。

【0218】

キットは、悪性T細胞のTRBCを決定するために適した試薬も含んでよい。例えば、

50

キットは、T R B C 1 または T R B C 2 のいずれかに特異的な P C R プライマーまたは抗体を含んでよい。

【0219】

T細胞リンパ腫および/または白血病を決定するための方法

本発明は、さらに、対象におけるT細胞リンパ腫または白血病の存在を決定するための方法であって、対象由来の試料中のT R B C 1 陽性またはT R B C 2 陽性のいずれかであるT細胞の割合を決定するステップを含む方法に関する。

【0220】

T細胞リンパ腫は、個々の悪性T細胞のクローン性増大を伴う。そのため、患者由来の試料中のT R B C 1 T細胞またはT R B C 2 T細胞のいずれかの割合を決定することによって、対象におけるT細胞リンパ腫の存在を同定することができる。

10

【0221】

試料は、末梢血試料、リンパ液試料または腫瘍から直接取得した試料、例えば、生検試料であってよい。

【0222】

T細胞リンパ腫または白血病の存在を示す、T R B C 1 陽性またはT R B C 2 陽性である総T細胞の割合は、例えば、総細胞集団の80%、85%、90%、95%、98%または99%であってよい。

【0223】

方法は、生検材料または試料中の別個のT細胞集団による浸潤を決定するステップを伴ってよい。本明細書では、T細胞リンパ腫または白血病の存在は、試料中のT細胞の総集団の80%、85%、90%、95%、98%または99%がT R B C 1 またはT R B C 2 のいずれかである場合に示される。

20

【0224】

試料中の総T細胞は、C D 3、C D 4、C D 8 および/またはC D 4 5 を発現する試料中の細胞の数を決定することによって同定することができる。これらのマーカーの組合せも使用することができる。

【0225】

T R B C 1 またはT R B C 2 のいずれかを発現する試料中の総T細胞の割合は、当技術分野で公知の方法、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学または蛍光顕微鏡を使用して決定することができる。

30

【0226】

ここで本発明を実施例によってさらに記載し、これは、当業者が本発明を実行するのを補助するのに役立つように意味付けられ、いかなる形でも本発明の範囲の限定を意図するものではない。

【実施例】

【0227】

(実施例1)

T R B C 1 発現細胞およびT R B C 2 発現細胞の識別

J O V I - 1 抗体はV i n e y ら (H y b r i d o m a ; 1 9 9 2 年 ; 1 1 巻 (6 号) ; 7 0 1 ~ 7 1 3 頁) によって以前に開示されており、市販されている (A b c a m、a b 5 4 6 5)。本発明者らは、J O V I - 1 により、T R B C 1 またはT R B C 2 の特異的な発現に基づいて細胞を識別することができることを決定した。

40

【0228】

本発明者らは、T C R の完全な可変領域および定常領域を供給し、T R B C 1 またはT R B C 2 のいずれかの発現においてのみが異なる2種のプラスミドベクターを生成した。これらのプラスミドを使用して、293T細胞を一過性トランスフェクションすることによってレトロウイルス上清を生成した。この上清を使用して、ジャーカットT C R ノックアウトT細胞 (T C R ベータ鎖遺伝子座に、この鎖の発現を妨げ、それにより、表面T C R / C D 3 複合体全体の発現を妨げる変異を有するT - A L L 細胞株) に安定的に形質導

50

入した。この結果、T R B C 1 または T R B C 2 のいずれかの発現以外は同一である細胞株が生じた。これらの細胞株の染色により、表面 T C R / C D 3 複合体の完全な発現、および T R B C 1 を発現する細胞のみが J O V I - 1 抗体で染色されることが明らかになった (図 4)。

【 0 2 2 9 】

(実施例 2)

正常なドナー C D 4 + T 細胞および C D 8 + T 細胞は、別々の T R B C 1 陽性集団および T R B C 1 陰性集団を含有する

本発明者らは、J O V I - 1 抗体を正常ドナーの初代ヒト T 細胞に対して試験した。これらの分析により、全てのドナーが、ある割合の T R B C 1 を発現する C D 4 + T 細胞および C D 8 + T 細胞の両方とある割合の T R B C 1 を発現しないそれぞれを有することが明らかになった。正常な C D 4 + T 細胞および C D 8 + T 細胞のおよそ 20 ~ 50 % が T R B C 1 + v e である (図 6 および 7)。

【 0 2 3 0 】

(実施例 3)

T C R を発現するクローン性 T 細胞株は、T R B C 1 陽性または陰性である

細胞株は、患者における元のクローン性腫瘍集団に由来するものである。T C R を発現する T 細胞株の染色により、T 細胞が T R B C 1 または T R B C 2 のいずれかを発現することが示され、これがクローン性のマーカーとして確認される。試験した 3 つの T 細胞株のうち、ジャーカット細胞 (T R B C 1 + であることが分かっている) は J O V I - 1 で染色され、H P B - A L L 細胞または H D - M a r - 2 細胞 (T R B C 2 + であることが分かっている) は J O V I - 1 で染色されず、T R B C 1 または T R B C 2 のいずれかが排他的に発現されることが支持される (図 8)。

【 0 2 3 1 】

(実施例 4)

T 前リンパ球性白血病の患者における初代クローン性 T 細胞は T R B C 1 陽性または陰性である

T 前リンパ球性白血病 (T - P L L) の患者の末梢血から抽出したクローン性 T 細胞は、均一に T R B C 1 陽性または T R B C 1 陰性のいずれかである。

【 0 2 3 2 】

(実施例 5)

T C B C 1 に独特の残基の変異の影響

T C R 鎖定常領域におけるハイブリッド T R B C 1 / 2 変異以外は同一である、T C R をコードするプラスミドベクターを生成した。分析から、J O V I - 1 が T C R 定常鎖の 3 位および 4 位の残基の差異を認識することが示され、これらの残基が抗体認識に利用可能なものであり、T R B C 1 を T R B C 2 から、または T R B C 2 を T R B C 1 から識別する作用因子を生成するための最良の標的であり得ることが示された (図 5)。

【 0 2 3 3 】

(実施例 6)

T R B C 1 T C R 発現 T 細胞は特異的に溶解されるが T R B C 2 T C R 発現 T 細胞は特異的に溶解されない。

野生型ジャーカット T 細胞 (C D 3 4 - 、T R B C 1 +) を、C D 3 4 マーカー遺伝子と同時発現させた T R B C 2 を用いて形質導入した T C R ノックアウトジャーカット T 細胞 (C D 3 4 + T R B C 2 +) と混合した。これらの細胞を、1 時間にわたり、J O V I - 1 のみと一緒に、または J O V I - 1 および補体と一緒にインキュベートした。細胞を洗浄し、C D 3 4、アネキシン V および 7 - A A D について染色した。細胞をフローサイトメトリーによって分析した。

【 0 2 3 4 】

アネキシン - V 陰性および 7 1 A A D 暗集団によって定義される生集団における C D 3 4 発現が図 9 に示されている。T R B C 1 T 細胞 (C D 3 4 -) の選択的な死滅が観察

10

20

30

40

50

された(図9)。

【0235】

野生型ジャーカットT細胞は、天然にTRBC1+であり、切断型CD34マーカー遺伝子を発現しない。上記の通り、本発明者らは、TCRノックアウトジャーカットT細胞に、TRBC2TCRならびに切断型CD34マーカー遺伝子をコードするレトロウイルスベクターを用いて形質導入することによってTRBC2+ジャーカット株を誘導した。次いで、これらのT細胞を混合した。次に、本発明者らは、T細胞を、1時間にわたり、JOVI-1のみと一緒に、またはJOVI-1および補体と一緒にインキュベートした。都合よく、本発明者らは、CD34マーカー遺伝子について染色することによってTRBC1集団とTRBC2集団とを識別することができ、そうすることで、抗TCRmAbへの長期曝露後のTCR内部移行に起因するTRBC1TCRの検出失敗を回避した。細胞を洗浄し、CD34、アネキシンVおよび7-AADについて染色した。細胞をフローサイトメトリーによって分析した。生細胞(すなわち、アネキシンV陰性および7-AAD暗である細胞)に関してゲーティングすることにより、本発明者らは、TRBC1T細胞が補体の存在下でJOVI-1によって選択的に死滅することを決定することができた(図9)。

10

【0236】

(実施例7)

ポリクローナルエプスタイン・バーウイルス(EBV)特異的T細胞は2つのほぼ同等のTRBC1/2集団に分割することができる。

20

正常血液ドナーから末梢血T細胞を採取した。単核細胞を単離し、細胞の大部分を凍結保存した。少数の細胞にEBVの実験室株(B95-8)を感染させた。数週間を越えて、リンパ芽球様細胞株(LCL)として公知の不死化EBV感染細胞株が現れた。そのような細胞株は、異なるEBV抗原の大きな集合を示すことが公知である。予め凍結保存しておいた単核細胞を解凍し、このLCL株を用い、IL2の存在下で週に1回、4週間にわたって繰り返し刺激した。このプロセスにより、末梢血単核集団からEBV特異的T細胞が選択的に増大する。そのようなプロセスにより、T細胞の90%超がEBV特異的であり、ドナーのEBV免疫系を表すポリクローナル株がもたらされることも公知である。この株の特異性は、自己由来LCLは高程度に死滅するが同種異系LCLまたはK562細胞は死滅しないことが示されることによって確認される(図10a)。次いで、この細胞株をJOVI-1で染色し、TRBC1T細胞およびTRBC2T細胞のほぼ同等の混合物を含有することが示された(図10b)。

30

【0237】

したがって、TRBC1コンパートメントまたはTRBC2コンパートメントのいずれかを枯渇させる治療剤を投与すると、適切なEBV免疫が残る。EBV免疫は免疫応答のモデル系とみなされるので、他の病原体に対するその免疫も同等に保存されると仮定することは妥当である。

【0238】

(実施例8)

循環末梢性T細胞リンパ腫のJOVI1染色。

40

仮説は、クローン性であるT細胞リンパ腫は、TRBC1T細胞受容体またはTRBC2T細胞受容体のいずれかを発現するが、ポリクローナルである正常T細胞は、TRBC1を有するものとTRBC2を有するものの混合物であるT細胞集団で構成されるというものであった。これを実証するために、リンパ腫が末梢血中を循環している患者からT細胞リンパ腫の血液試料を得た。末梢血単核細胞を単離し、CD5およびJOVI1を含む抗体のパネルを用いて染色した。T細胞の総集団(リンパ腫および正常T細胞の両方を含有する)を最初に同定した。この集団は、正常(明るい)CD5発現を有するT細胞および中間/暗いCD5発現を有するT細胞で構成されていた。前者は正常T細胞を代表し、後者はリンパ腫を代表する。次にJOVI-1結合を調査し、図12に結果が示されている。

50

【0239】

CD5中間集団およびCD5暗集団（腫瘍）は全てTRBC2陽性であった。

【0240】

（実施例9）

J O V I - 1のV H / V L配列の解明

マウスI g G C H 1の定常領域およびマウスカッパの定常領域にアニーリングするプライマーを用いた5' R A C Eを使用して、本発明者らは、ハイブリドーマJ O V I - 1から単一の機能性V H配列および単一の機能性V L配列を単離した。V HおよびV Lの配列はそれぞれ配列番号1および2である（上記を参照されたい）。V HおよびV Lのアノテートされた配列が図11に示されている。

10

【0241】

これらのV H配列およびV L配列をそれぞれマウスI g G重鎖およびカッパ軽鎖とインフレームでクローニングし戻した。さらに、V HおよびV Lを融合して単鎖可変断片（s c F v）を形成し、これをマウスI g G 2 aのヒンジ - C H 2 - C H 3領域と融合してs c F v - F vを創出した。s c F vのアミノ酸配列は発明の詳細な説明で配列番号3として示されている。組換え抗体および組換えs c F v - F cを293T細胞へのトランスフェクションによって生成した。ハイブリドーマ由来のJ O V I - 1と一緒に、以下の細胞を染色した：TCRがノックアウトされたジャーカット；野生型ジャーカット；e B F P 2と共発現させたTRBC1を形質導入したTCRノックアウトジャーカットおよびe B F P 2と共発現させたTRBC2を形質導入したTCRノックアウトジャーカット。組換え抗体およびJ O V Iに由来するs c F v - F cはどちらもTRBC2に結合し、本発明者らが正確なV H / V Lを同定し、そしてJ O V I - 1 V H / V Lをs c F vとしてフォールディングさせることができることを確認した。この結合データが図13に示されている。

20

【0242】

（実施例10）

J O V I - 1に基づくC A Rの機能

J O V I - 1 s c F vをC A R構成にクローニングした。いずれのスペーサー長により最適なJ O V I - 1に基づくC A Rがもたらされるかを解明するために、ヒトF cスペーサー、ヒトCD8ストークスペーサーまたはI g G 1ヒンジに由来するスペーサーのいずれかを用いて第3世代C A Rを生成した（図4）。正常ドナー由来の初代ヒトT細胞にこれらのC A Rを形質導入し、ジャーカットおよびTCRがノックアウトされたジャーカットの死滅を比較した。I g G 1ヒンジスペーサーまたはCD8ストークスペーサーのいずれかを有するJ O V I - 1 s c F vを有するC A Rにより、ジャーカットは死滅したが、TCRがノックアウトされたジャーカットは死滅せず（図5）、これにより、予測された特異性が実証された。C A Rを形質導入した正常ドナーT細胞はT R B 1 / 2 T細胞の混合物を有するはずであるので、培養物が「自己ページ」することが予測された。実際に、これが観察された。100%TRBC2陰性になったC A R T細胞培養物のJ O V I - 1染色が図6に示されている。

30

【0243】

材料および方法

J O V I - 1の特異性の実証

よく特徴付けられたヒトTCRならびに都合のよいマーカー遺伝子をコードするトリシストロン性レトロウイルスカセットを生成した。TCR鎖および鎖のコード配列を、デノボ遺伝子合成を使用してオーバーラッピングオリゴヌクレオチドから生成した。これらの鎖を口蹄疫2Aペプチドとインフレームで接続して共発現を可能にした。切断型CD34マーカー遺伝子をPCRによってcDNAからクローニングし、内部リボソーム進入配列（internal ribosome entry sequence）（IRES）を使用してTCR鎖と共発現させた。このカセットをレトロウイルスベクターに導入した。この構築物のバリエーションを、所望の変異を導入するプライマーを用いたオーバーラ

40

50

ップPCRによってスプライシングすることによって生成した。構築物の正確さを、サンガー配列決定によって確認した。ジャーカット76株は、TCR鎖および鎖の両方がノックアウトされた、ジャーカットT細胞株のよく特徴付けられた誘導体である。このジャーカット株に上記のレトロウイルスベクターを用いて、標準の技法を使用して形質導入した。

【0244】

ジャーカット、末梢血T細胞および細胞株の染色および分析

ジャーカットをE C A C Cから得、上記の通り操作した。他のT細胞株もE C A C Cから得た。正常ドナーから静脈穿刺によって末梢血を採取した。血液をフィコール処理して単核細胞を単離した。細胞をJ O V I - 1ならびに全てのTCRおよびCD3を認識する市販のモノクローナル抗体で染色した。操作したT細胞の場合には、細胞を、CD34を認識する抗体で染色した。末梢血単核細胞の場合には、細胞を、CD4およびCD8を認識する抗体で染色した。抗体は、適切なフルオロフォアとコンジュゲートした状態で購入し、そうすることで、フローサイトメーターを用いた細胞の分析中に独立した蛍光シグナルを得ることができた。

10

【0245】

T R B C 1 T細胞の特異的な溶解の実証

野生型ジャーカットT細胞(T R B C 1 - T C R)、およびT R B C 2 T C Rを導入したジャーカットT細胞T C R K Oを1:1の比率で混合した。次いで、このジャーカットの混合物を1 μg/mlのJ O V I - 1モノクローナル抗体と一緒に、補体の不在下または存在下でインキュベートした。4時間後、細胞をアネキシン-Vおよび7 A A DおよびCD34で染色した。都合よく、マーカー遺伝子CD34により、野生型(T R B C 1)ジャーカットとトランスジェニック(T R B C 2)ジャーカットとを区別することができる。細胞集団をフローサイトメトリーによって分析した。生細胞を、アネキシン-V陰性かつ7 A A D暗であるフローサイトメトリー事象に関してゲーティングすることによって選択的に試験した。このように、トランスジェニック(T R B C 2)T細胞の生存と野生型(T R B C 1)T細胞の生存を試験した。

20

【0246】

(実施例11)

T細胞リンパ球増殖性障害のクローン性の調査

悪性細胞が均一にT R B C 1陽性または陰性のいずれかであることを確認するために、4名の患者：T細胞大型顆粒リンパ球増殖性障害(T - L G L)3名；および末梢性T細胞リンパ腫(P C T L)1名を試験した。

30

【0247】

Tリンパ球増殖性障害の患者から全血または骨髓を収集した。末梢血単核細胞(P B M C)をフィコール勾配遠心分離によって得た。新しく得たP B M Cをペレット化し、適切な予めコンジュゲートした抗体を用いて20分にわたって染色した。次いで、細胞を洗浄し、B D L S R F o r t e s s a I Iでの即時フローサイトメトリー分析のためにリン酸緩衝生理食塩水に再懸濁した。生リンパ球をF S c / S S c性質および死細胞識別色素を取り込めないことによって同定した。抗TCRアルファ/ベータ抗体を用いて染色することによってT細胞を同定した。各試料について、適切な細胞表面染色を使用し、臨床検査室分析によって予め同定された免疫表現型に基づいて、腫瘍T細胞集団および正常T細胞集団を同定した。

40

【0248】

結果が図18~21に示されている。

【0249】

患者A(T - L G L、図18)では、正常T細胞はCD7明であり、混合CD4/CD8細胞、そしてT R B C 1またはT R B C 1 - 細胞の混合集団を含有した。対照的に、悪性細胞はCD7 - またはCD7暗であり、均一にCD8 + CD4 - であり、均一にT R B C 1 - であった。

50

【0250】

患者B (T-LGL、図19)では、悪性細胞はCD4⁻、CD8⁺、CD7⁺、CD57⁺により同定され、クローン性にTRBC1⁻であった(強調表示されているパネル)。正常なCD4⁺CD8⁻T細胞およびCD4⁻CD8⁺T細胞はTRBC1⁺集団およびTRBC1⁻集団を含有した。

【0251】

患者C (T-LGL、図20)では、正常なCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞集団は30~40%TRBC1⁺であった。悪性細胞はCD4⁻、CD8⁺、CD7⁺、CD57⁺によって同定され、クローン性にTRBC1⁺であった(強調表示されているパネル、細胞の84%がTRBC1⁻であり残りの16%には「正常」T細胞が混入している可能性があることに留意されたい)。正常CD4⁺CD8⁻T細胞およびCD4⁻CD8⁺T細胞は、TRBC1⁺集団およびTRBC1⁻集団を含有した。

10

【0252】

患者D (PTCL-NOS、図21)では、FSC高 CD5暗 CD4暗に基づいて同定された骨髄における悪性細胞は均一にTRBC1⁺であったが、CD4⁺CD8⁻T細胞およびCD4⁻CD8⁺T細胞はTRBC1⁺集団とTRBC1⁻集団との両方を含有した。

【0253】

(実施例12)

ファージディスプレイを使用した、T細胞受容体 鎖定常ドメインの2つのアイソフォームを区別するモノクローナルヒト抗体の生成

20

TRBC2ペプチドとTRBC1ペプチドとを区別する抗体を生成するために、2つのTRBCアイソフォームの間の領域の差異を包含する断片を合成した。TRBC2とTRBC1との間の4つのアミノ酸の差異のうち、2つは定常ドメインの始めに見いだされる。これらの領域を表すペプチド(以下を参照されたい)を合成し、抗体生成のために使用した。

【化6】

TRBC2 VLEDLKNVFPPEVAV (配列番号 36)

TRBC1 VLEDLNKVPPEVAV (配列番号 37)

30

【0254】

これらのペプチドを、ビオチン化した形態、ビオチン化していない形態、システイン修飾した形態(C末端システインを付加することによる)で調製した。システイン修飾した形態のTRBC1およびTRBC2は、その後、改変ウシ血清アルブミン(Imm-Link BSA、Innova 462-001)またはオボアルブミン(Imm-Link Ovalbumin、Innova 461-001)と、製造者により推奨される条件に従ってコンジュゲートした。

【0255】

結果

40

抗体ファージディスプレイ選択

ヒトファージディスプレイライブラリーを構築し、(Schofieldら、2007年、Genome Biol 8巻、R254頁)に記載の通りファージ選択を行った。抗体ライブラリーからTRBC1特異的抗体およびTRBC2特異的抗体を同定するために、複数のラウンドのファージディスプレイ選択を行った。2つのファージ選択戦略を並行して使用して、特異的な結合物質の大きなパネルが生成する機会を最大限にした。これらの戦略は、固相選択および液相選択として公知である(図21)。固相選択では、ファージ抗体を、固体表面に固定化した標的抗原に結合させる(Schofieldら、2007年、上記の通り)。液相選択では、ファージ抗体を溶液中のビオチン化した抗原に結合させ、次いで、ファージ抗体-抗原複合体をストレプトアビジンまたはニュートラアビ

50

ジンでコーティングした常磁性ビーズによって捕捉する。固相選択戦略の中で、2つの異なる固定化または抗原提示手法を用いた。第1の手法を使用する場合、ウシ血清アルブミン(BSA)またはオボアルブミン(OA)とコンジュゲートしたTRBCペプチドをMaxisorp(商標)immunotube上に直接吸着によって固定化した。第2の手法を使用する場合、ビオチン化TRBCペプチドを、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンで予めコーティングしたMaxisorp(商標)immunotubeチューブ上に間接的に固定化した。

【0256】

10 所望のペプチドに特異的な抗体を選択するために、全ての選択を、過剰な対立するペプチドの存在下で行った。例えば、全てのTRBC1選択を、10倍モル過剰のビオチン化していないTRBC2の存在下で行った。この方法は、「選択解除」として公知であり、両方のTRBCペプチドに共有されるエピトープを認識する抗体が溶液中の過剰なTRBC2に優先的に結合するので、これらの抗体が枯渇することが予測された。担体タンパク質(BSAもしくはOA)または固定化パートナー(Thermo Fisher Scientificからのストレプトアビジンまたはニュートラアビジン)に結合する抗体クローンが濃縮されるのを回避するために、2つの戦略を組み合わせて用いた。

【0257】

20 第1の戦略は、コンジュゲーションまたは固定化パートナーを選択のラウンド間で切り換えることであった。直接固定化したペプチドについては、選択の第1のラウンドをBSA-ペプチドで行い、ラウンド2についてはOA-ペプチドコンジュゲートを使用した。同様に、ラウンド1についてはビオチン化TRBCペプチドをストレプトアビジンに固定化し、ラウンド2における固定化にはニュートラアビジンを使用した。

【0258】

30 第2の戦略は、ラウンド1において「選択解除」を実施することによって、コンジュゲーション/固定化パートナーに対する任意の結合物質のファージライブラリーを枯渇させることであった。直接固定化したペプチドについて、10倍モル過剰の溶液中遊離BSAの存在下でファージ-ペプチド結合ステップを実行することによって「選択解除」を実施した。ストレプトアビジンに固定化したビオチン化したペプチドの場合には、ファージライブラリーを、ストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズと一緒にブレインキュベートした。ビーズを取り出した後、ファージを抗原チューブに添加し、それにより、ストレプトアビジン結合物質の選択への進入を制限した。使用した異なる選択条件が図21に要約されている。選択条件に関する詳細な情報については表3を参照されたい。

【0259】

40 ラウンド2選択アウトプットから調製したポリクローマルファージを、ペプチドまたは支持タンパク質の種々の提示を使用してELISAで試験した。これには、BSAもしくはOAコンジュゲートのいずれかとして直接固定化したTRBCペプチドまたはストレプトアビジンもしくはニュートラアビジンに間接的に固定化したビオチン化したペプチドを含めた。含めた対照タンパク質は、ストレプトアビジン、ニュートラアビジン、BSAおよび無関連の抗原であった。マウス抗M13抗体(GE Healthcare)、その後、ユウロピウム(Perkin Elmers)で標識した抗マウスFc抗体を使用して、時間分解蛍光を使用してファージ結合を検出した(図22)。この結果により、ポリクローマルファージ集団がそれぞれのTRBCペプチドに優先的に結合する(対立するTRBCペプチドと比較して)ことが実証された。例えば、TRBC1選択から調製されたポリクローマルファージでは、TRBC1に対してTRBC2よりも顕著に高い結合シグナルが示され、逆もまた同じであった。固定化またはコンジュゲーションパートナーおよび無関連の抗原に対しては結合が限定されたまたは結合しなかった。

【0260】

単鎖抗体(scfv)サブクロニングおよびモノクローマルスクリーニング

ラウンド2およびラウンド3選択アウトプットからのscfv集団をpSANG10-3F発現ベクターにサブクロニングし、E.coli BL21(DE3)細胞へと形

10

20

30

40

50

質転換した。1128種の個々の形質転換体(564クローン/TRBCペプチド)を選び取って12×96ウェル培養プレート(94クローン/プレート)に入れ、自己誘導培地を使用して抗体発現を誘導した。一晚の誘導後に培養上清中に分泌された組換えモノクローナル抗体を、ニュートラアビジンでコーティングされたNunc Maxisorp(商標)96ウェルプレートに固定化したビオチン化TRBC1およびTRBC2への結合について試験した。TRBC1選択からスクリーニングされた564クローンのうち、255クローンが、TRBC1に特異的であることが見いだされた(TRBC1に対して>10000TRF単位およびTRBC2に対して<1000TRF単位)。TRBC2選択からスクリーニングされた564クローンから、138種のTRBC2特異的結合物質(TRBC2に対して>10000TRF単位およびTRBC1に対して<2000TRF単位)が同定された。図24に、TRBC1(図24A)またはTRBC2(図24B)のいずれかに対する選択から生じた単一の96ウェルプレートからの代表的な結合プロファイルが示されている。異なる選択条件を使用して生成した特異的な結合物質の詳細が表5に要約されている。

10

【0261】

配列解析およびさらなる特徴付けのために、TRBC1選択およびTRBC2選択から、それぞれ142種および138種の特異的な結合物質を選び取った。入念に選び取ったクローンの配列を、BigDye(登録商標)terminator v3.1 cycle sequencing kit(Life technologies)を使用してサンガー配列決定によって生成した。DNA配列を分析してタンパク質配列を決定し、VHドメインおよびVLドメインのCDRを同定した。VH CDR3領域およびVL CDR3領域の分析により、74種の独特のTRBC1クローンおよび42種の独特のTRBC2クローンが同定された(独特とは、VH CDR3配列およびVL CDR3配列のいずれかの組合せと定義される)。TRBC1特異的クローンならびにそれらのVH CDR3配列およびVL CDR3配列が上の表1に要約されている。TRBC2特異的クローンおよびそれらのVH CDR3配列およびVL CDR3配列が上の表2に要約されている。

20

【表 3 A】

表3A.固相TRBC選択の詳細

固相選択					
選択用抗原	ラウンド数	抗原濃度	固定化	ラウンド1 選択解除用 抗原	ラウンド2 選択解除用 抗原
BSA TRBC1 (ラウンド1)、 OA TRBC1 (ラウンド2)	2	10 μ g/ml	直接	BSA (100 μ g/ ml), TRBC2 (30 μ M)	TRBC2 (30 μ M)
BSA TRBC2 (ラウンド1)、 OA TRBC2 (ラウンド2)	2	10 μ g/ml	直接	BSA (100 μ g/ ml), TRBC1 (30 μ M)	TRBC1 (30 μ M)
Bio-TRBC 1(ラウンド1&2)	2	3 μ g/ml	ストレプトアビジ ンビーズ(ラウン ド1)、ニュートラ アビジン (ラウンド2)	ストレプトアビジ ンビーズ、TRBC 2(30 μ g/ml)	ニュートラア ビジンビーズ 、TRBC2(30 μ g/ml)
Bio-TRBC2 (ラウンド1&2)	2	3 μ g/ml	ストレプトアビジ ンビーズ(ラウン ド1)、ニュートラ アビジン (ラウンド2)	ストレプトアビジ ンビーズ、TRBC 1(30 μ g/ml)	ニュートラア ビジンビーズ 、TRBC1(30 μ g/ml)

10

20

30

【 0 2 6 2 】

【表 3 B】

表3B.液相TRBC選択の詳細

液相選択					
選択用抗原	ラウンド数	抗原濃度	ラウンド1 選択解除用 抗原	ラウンド2 選択解除用 抗原	ラウンド3 選択解除用 抗原
Bio-TRBC1 (ラウンド1、 2&3)	3	500 nM	ストレプトアビジン ンビーズ、TRBC 2 (5 μ M)	ストレプトアビジン ンビーズ、TRBC 2 (5 μ M)	ニュートラアビジン ンビーズ、TRBC 2 (5 μ M)
Bio-TRBC2 (ラウンド1、 2&3)	3	500 nM	ストレプトアビジン ンビーズ、TRBC 1 (5 μ M)	ストレプトアビジン ンビーズ、TRBC 1 (5 μ M)	ニュートラアビジン ンビーズ、TRBC 1 (5 μ M)

10

20

【 0 2 6 3 】

【表 4】

表4:選択アウトプット数

選択型	ラウンド数	抗原	プラーク形成 単位の数 (ラウンド1)	プラーク形成 単位の数 (ラウンド2)	プラーク形成 単位の数 (ラウンド3)
固相	2	BSA/OA TRBC1	1.0×10^4	6.0×10^5	検出されず
固相	2	BSA/OA TRBC2	1.5×10^3	2.2×10^6	検出されず
固相	2	Bio-TRBC1	5.0×10^3	2.0×10^5	検出されず
固相	2	Bio-TRBC2	3.0×10^3	1.0×10^4	検出されず
液相	3	Bio-TRBC1	1.5×10^6	$>10^8$	$>10^8$
液相	3	Bio-TRBC2	2.7×10^5	$>10^8$	$>10^8$

30

40

【 0 2 6 4 】

【表 5】

表5:モノクローナルスクリーニングの詳細

選 択 番 号	選 択 型	選 択 用 抗 原	選 択 ア ウ ト プ ット	ス ク リ ー ニ ング した ク ロー ン の 数	特 異 的 な 結 合 物 質 の 数
262	固相、間接的な固 定化	TRBC1	ラウンド2	186	93
263	固相、間接的な固 定化	TRBC2	ラウンド2	186	68
264	液相	TRBC1	ラウンド2	186	83
265	液相	TRBC2	ラウンド2	186	29
266	液相	TRBC1	ラウンド3	94	47
267	液相	TRBC2	ラウンド3	94	33
268	固相、直接固定化 (BSA/OA)	TRBC1	ラウンド2	94	32
269	固相、直接固定化 (BSA/OA)	TRBC2	ラウンド2	94	9

10

20

【 0 2 6 5 】

(実 施 例 1 3)

ウサギのペプチド免疫化によるTRBCポリクローナル抗体の産生

30

TRBC2とTRBC1とを区別する抗体を生成するために、2つのTRBCアイソフォーム間を区別する原理領域を包含する2つのペプチドを合成し、ウサギを免疫化するために使用した。以下のペプチド配列を使用した：

【 化 7 】

TRBC1: VLEDLNKVPPEVAVC (配列番号 38)

TRBC2: VLEDLKNVPPEVAVC (配列番号 39)

【 0 2 6 6 】

TRBC1ペプチドおよびTRBC2ペプチド15mgを合成した。キーホールリンペットヘモシアニンをTRBC1ペプチドおよびTRBC2ペプチドと、ペプチド上に存在するC末端システインを介してコンジュゲートした。各ペプチドについてニューイングランドウサギ2匹を、KLHコンジュゲートTRBC1またはTRBC2ペプチドを用いて合計3回免疫化した。3回目の免疫化後、ウサギを屠殺し、採血し、精製のために血清を収集した。ウサギから得た粗血清を、免疫化のために使用したペプチドをカップリングした、架橋したビーズアガロース樹脂カラムを通過させて、ペプチドの共通セグメントおよびTRBCアイソフォーム特異的エピトープに特異的な抗体を収集した。次いで、最初に精製された上清を、代替ペプチドを固定化したカラムをさらに通して精製して、ペプチドの共通セグメントに特異的な抗体を除去した。

40

E L I S A の 設 定

コーティング抗原：A：ペプチドTRBC1

50

B : ペプチド T R B C 2

コーティング濃度 : 4 u g / m l 、 1 0 0 μ l / ウェル

コーティング緩衝液 : リン酸緩衝生理食塩水、p H 7 . 4

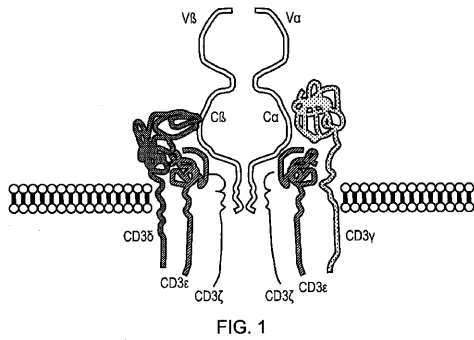
二次抗体 : ペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗ウサギ I g G (H & L) (ヤギ)

抗体

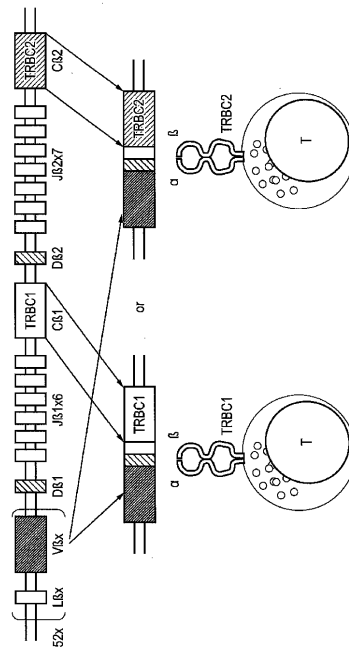
【 0 2 6 7 】

結果が図 2 5 および 2 6 に示されている。この方法により、T R B C 1 特異的抗体または T R B C 2 特異的抗体を含むポリクローナル血清を作製することが可能である。

【 図 1 】



【 図 2 】



【 3 】

TRBC1 1 **DNKLPKPPAVVETHPSPFISHIDKALVQVLAICH**EPHVE-SWVWAGKVFHSVAVSIFIDQ
 TRBC2 1 **SKLPPKPPAVVETHPSPFISHIDKALVQVLAICH**EPHVE-SWVWAGKVFHSVAVSIFIDQ
 TRBC1 61 **PKKQFANNSKICVSSRIKASATFFQNPNNERQVQVYIGSDNEDWIDQAAKVVQIVM**
 TRBC2 61 **PKKQFANNSKICVSSRIKASATFFQNPNNERQVQVYIGSDNEDWIDQAAKVVQIVM**
 TRBC1 121 **SAWAGRADQGFVSYGGVQVISA-LINFLGATVIVAVLSVIMVWVWVKKDQ**
 TRBC2 121 **SAWAGRADQGFVSYGGVQVISA-LINFLGATVIVAVLSVIMVWVWVKKDQ**

FIG. 3

【 4 】

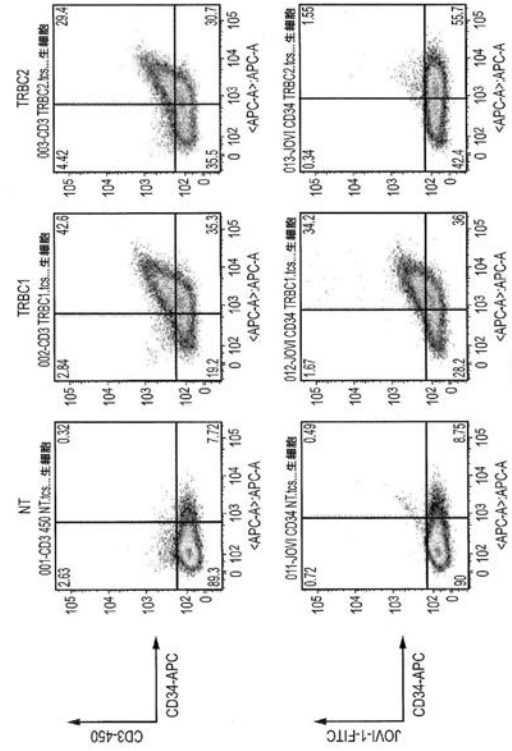


FIG. 4

【 5 】

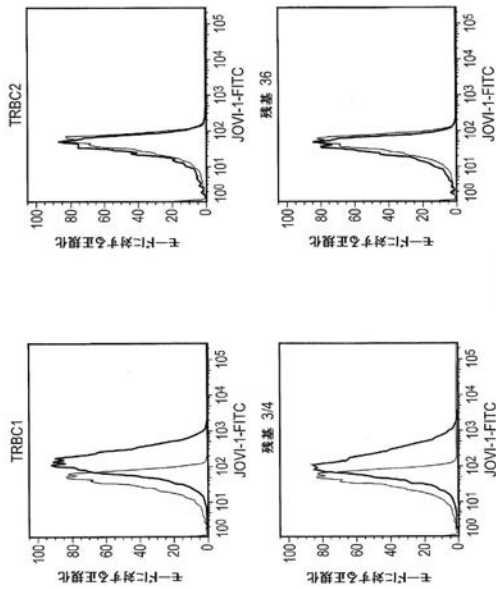


FIG. 5

【 6 】

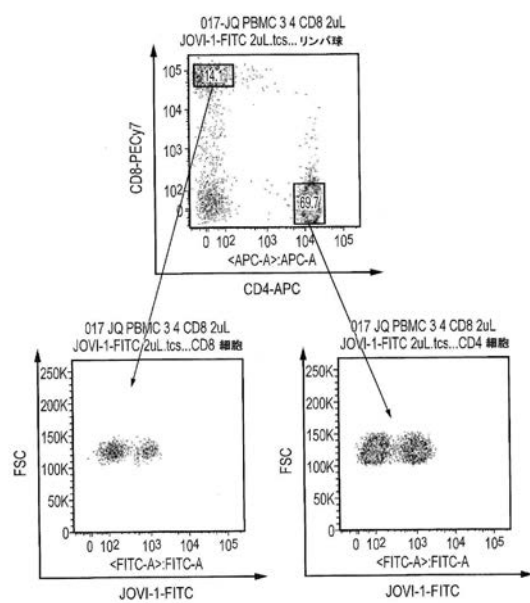


FIG. 6

【 図 7 】

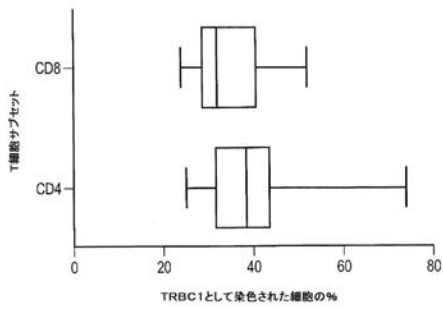


FIG. 7

【 図 8 】

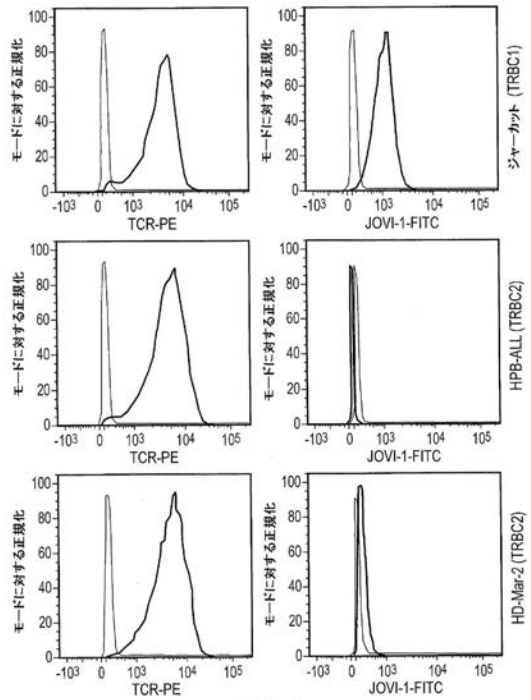


FIG. 8

【 図 9 】

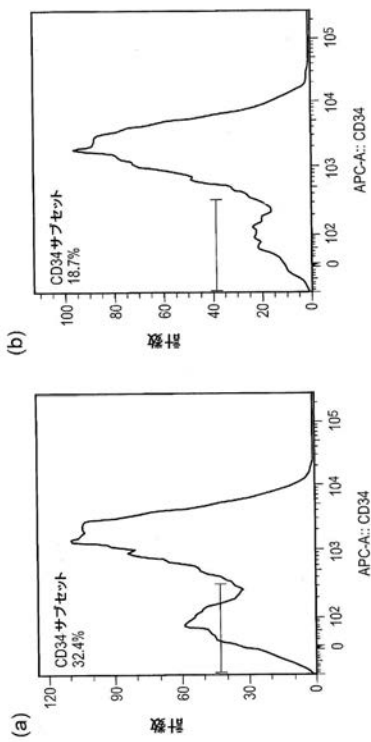


FIG. 9

【 図 10 】

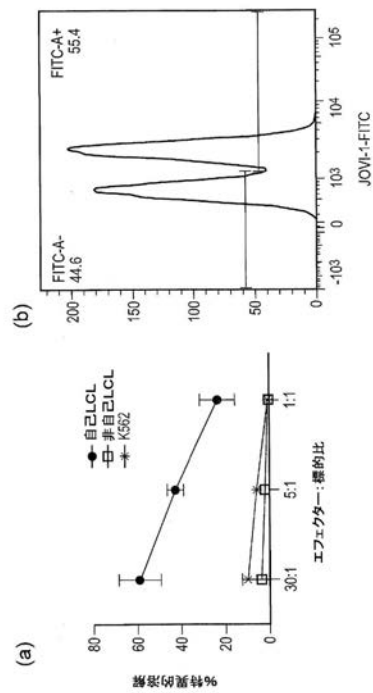


FIG. 10

【 図 1 1 】

>VH
 EVRLQQSGPDLKPGASVKMSCKASGYTFGYVMHWVKQRP
 GQGLEWIGFIPYNDQIQSNERFRGKATLTSDKSSTAYMELSS
 LTSEDAVYVCARGAGYFDGAYRFDYWGQGTTLTVSS

>VL
 DVVMTQSPPLSLPVSLGDAQISCSRSSORLVHSNGNTYLHWYL
 QKPGQSPKLLIYRVSNRFPVDRFSGSGSGDFTLKISRVEAE
 DLGIYFCQSTHVPYTFGGGTGLEIKR

FIG. 11

【 図 1 2 】

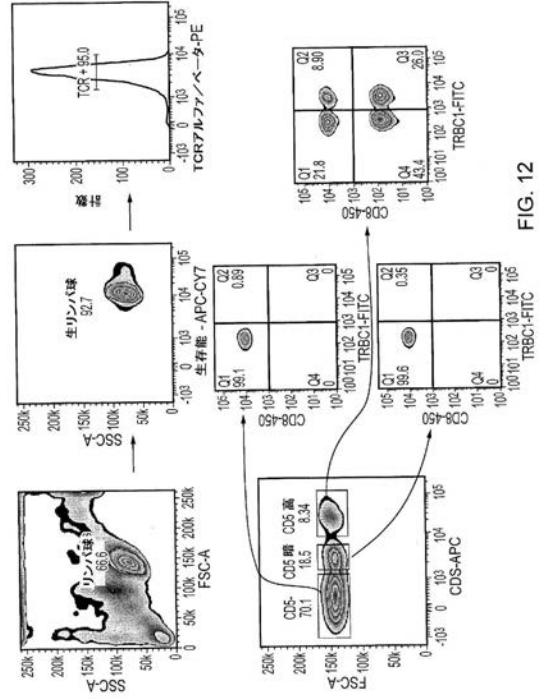


FIG. 12

【 図 1 3 】

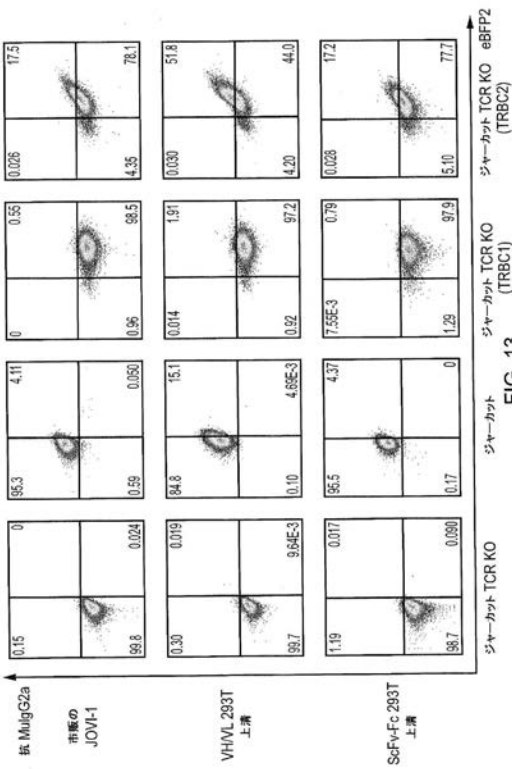


FIG. 13

【 図 1 4 】

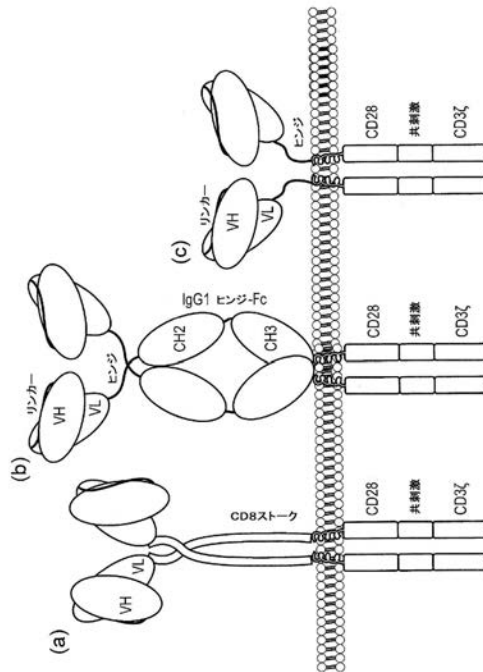


FIG. 14

【 図 1 5 】

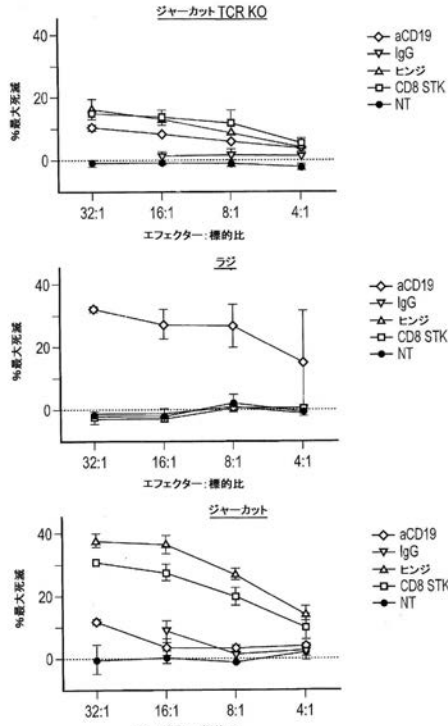


FIG. 15

【 図 1 6 】

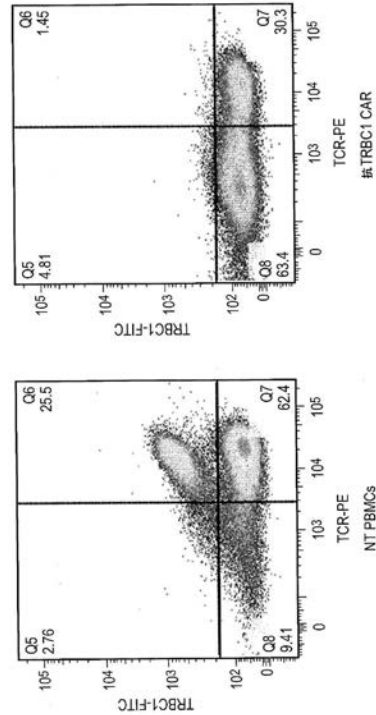


FIG. 16

【 図 1 7 】

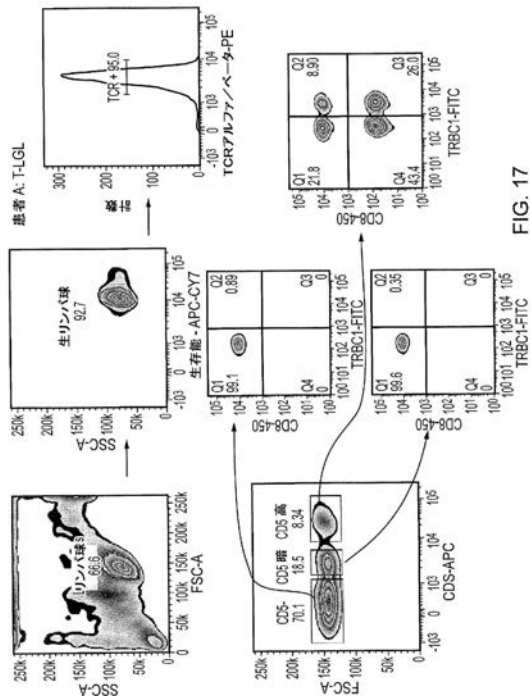


FIG. 17

【 図 1 8 】

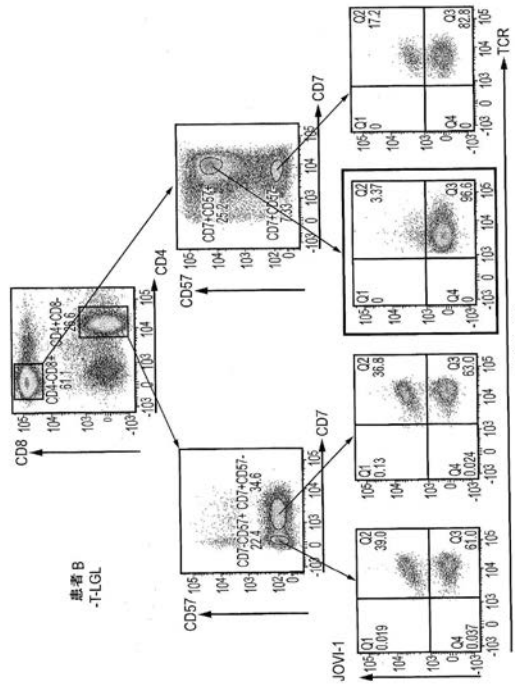


FIG. 18

【 図 1 9 】

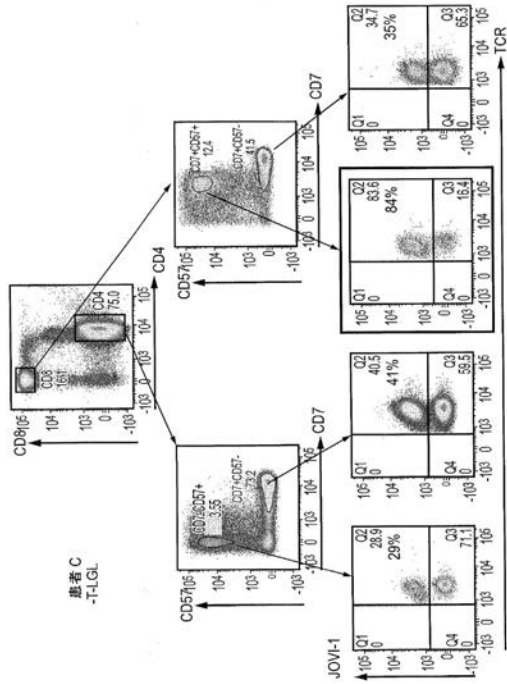
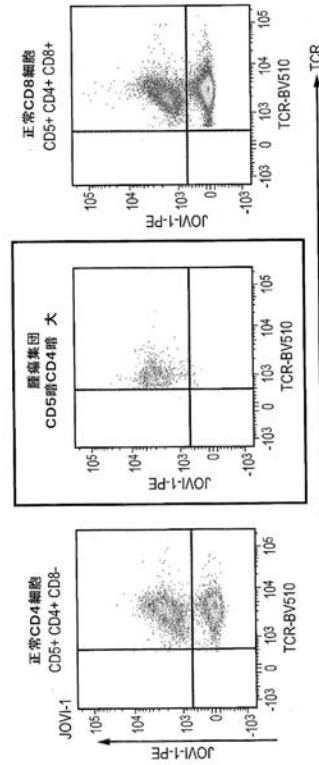


FIG. 19

【 図 2 0 】



患者D: PTCL-NOS

FIG. 20

【 図 2 1 】

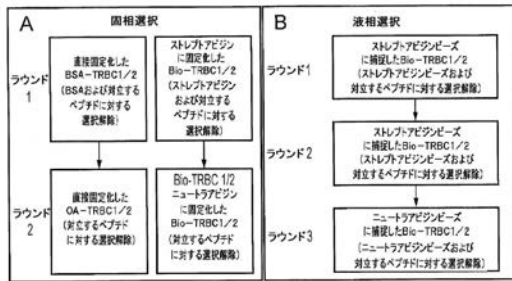
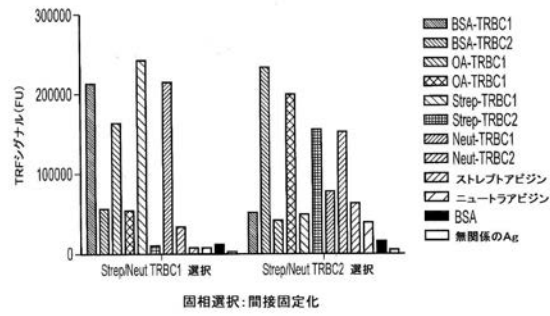


FIG. 21

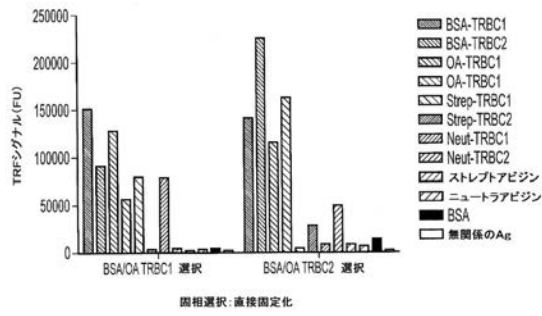
【 図 2 2 B 】



固相選択: 間接固定化

FIG. 22B

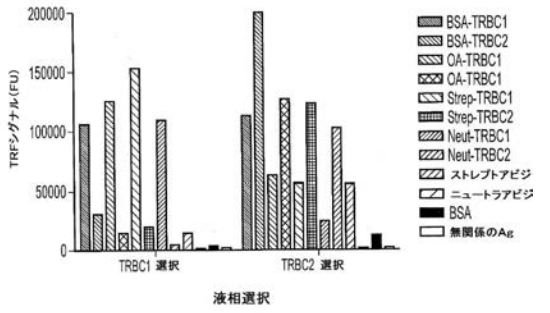
【 図 2 2 A 】



固相選択: 直接固定化

FIG. 22A

【 図 2 2 C 】



液相選択

FIG. 22C

【 図 2 3 】

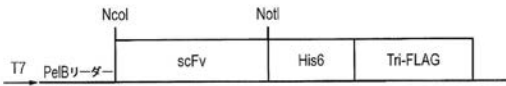


FIG. 23

【 図 2 4 】

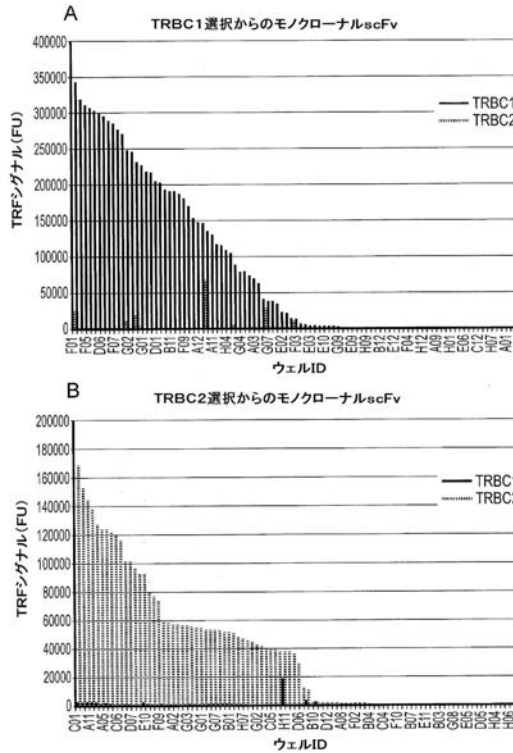


FIG. 24

【 図 2 5 】

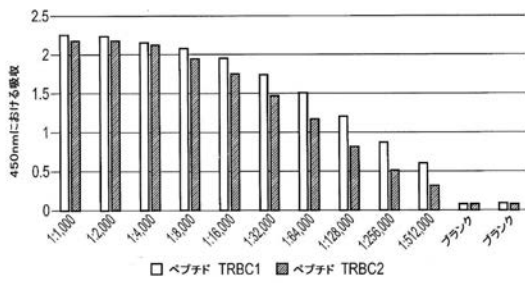


FIG. 25

【 図 2 6 】

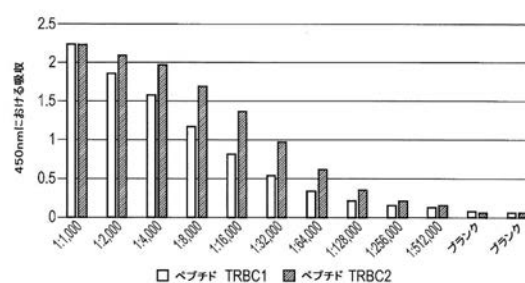
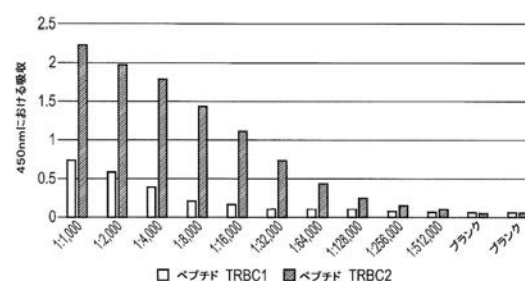
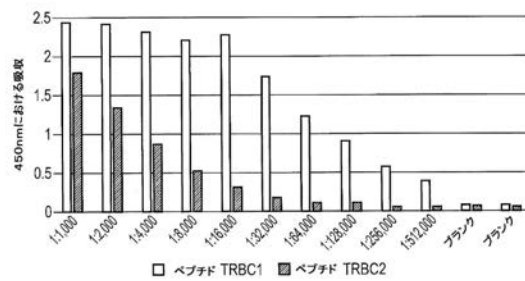


FIG. 26



【 図 27 】

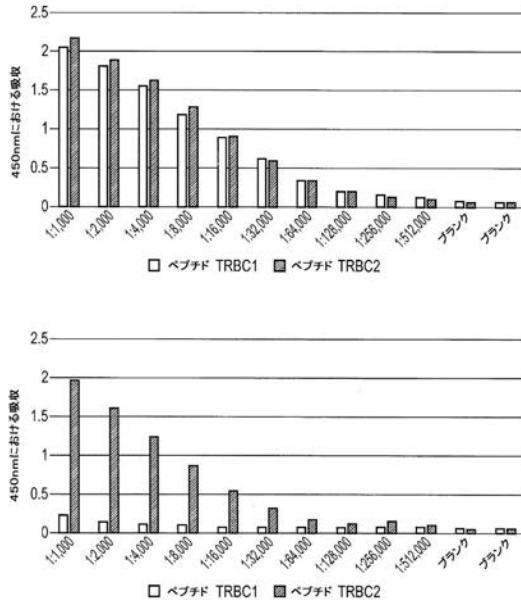


FIG. 27

【 配列表 】

2017510257000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2015/050643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 A61K47/48 C07K16/28 C07K14/725 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/093318 A1 (GENPAT77 PHARMACOGENETICS AG [DE]; UTKU NALAN [DE]) 13 November 2003 (2003-11-13) (see examples 1,2; claims 1-14 -----	1-19
Y	WO 2013/074916 A1 (UNIV TEXAS [US]) 23 May 2013 (2013-05-23) See paragraphs 68, 75-78; examples 4, 5, claims 1-36) -----	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 June 2015		09/07/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nauche, Stéphane

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2015/050643

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/050643

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 03093318	A1	13-11-2003	AU 2003233197 A1	17-11-2003
			CA 2484182 A1	13-11-2003
			EP 1497332 A1	19-01-2005
			JP 2006506954 A	02-03-2006
			US 2007274998 A1	29-11-2007
			WO 03093318 A1	13-11-2003

WO 2013074916	A1	23-05-2013	US 2014349402 A1	27-11-2014
			WO 2013074916 A1	23-05-2013

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	K
	C 1 2 Q 1/02	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 プーレ, マーティン

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 マシオシア, ポール

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR40 QR72

QR77 QS25 QS34

4B065 AA94X AB01 BA02 CA44

4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 NA14 ZB27

4H045 AA11 AA20 AA30 DA50 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017510257A5	公开(公告)日	2018-02-22
申请号	JP2016554603	申请日	2015-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	UCL商业有限公司		
申请(专利权)人(译)	Yushieru业务PLC		
[标]发明人	プーレマーティン マシオシアポール		
发明人	プーレ, マーティン マシオシア, ポール		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C12N5/10 A61K35/17 A61P35/02 G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/02		
CPC分类号	C07K16/2809 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/622 G01N33/57426 A61K47/6849 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K14/7051 C07K2317/34 C07K2319/00 A61K47/6803 C07K2317/56 G01N2333/7051		
FI分类号	C12N15/00.A C07K14/705.ZNA C12N5/10 A61K35/17.Z A61P35/02 G01N33/574.A G01N33/574.D G01N33/53.K C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/ /QR35 4B063/QR40 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB65 4C087/NA14 4C087/ /ZB27 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	2014003905 2014-03-05 GB 2014016908 2014-09-25 GB		
其他公开文献	JP2017510257A		

摘要(译)

本公开涉及嵌合抗原受体 (CAR) , 其包含选择性结合TCR β 恒定区1 (TRBC1) 或TRBC2的抗原结合结构域;细胞;包含此类CAR的此类T细胞;使用此类细胞治疗T细胞淋巴瘤或白血病。本发明人设计了一种方法, 其允许受试者中的恶性T细胞被耗尽而不影响显著比例的健康T细胞。具体而言, 我们开发了TRBC1特异性嵌合抗原受体 (CAR) 和TRBC2特异性嵌合抗原受体 (CAR) , 用于治疗T细胞恶性肿瘤。