

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-204358
(P2016-204358A)

(43) 公開日 平成28年12月8日(2016.12.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/30 (2006.01)	C07K 16/30 ZNA	4B024
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4B064
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B065
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4C084
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4C085

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-250957 (P2015-250957)
 (22) 出願日 平成27年12月24日 (2015.12.24)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-261852 (P2014-261852)
 (32) 優先日 平成26年12月25日 (2014.12.25)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-108966 (P2015-108966)
 (32) 優先日 平成27年5月28日 (2015.5.28)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

申請有り

(71) 出願人 304026696
 国立大学法人三重大学
 三重県津市栗真町屋町1577
 (71) 出願人 302019245
 タカラバイオ株式会社
 滋賀県草津市野路東七丁目4番38号
 (72) 発明者 珠玖 洋
 三重県津市江戸橋2丁目174 三重大学
 大学院医学系研究科内
 (72) 発明者 赤堀 泰
 三重県津市江戸橋2丁目174 三重大学
 大学院医学系研究科内
 (72) 発明者 米山 元裕
 三重県津市江戸橋2丁目174 三重大学
 大学院医学系研究科内

最終頁に続く

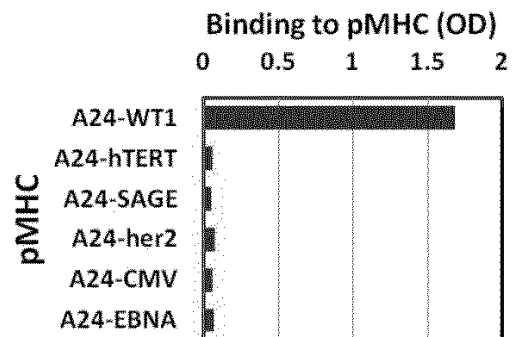
(54) 【発明の名称】 WT 1 由来ペプチド認識抗体

(57) 【要約】

【課題】 WT 1 ペプチド / H L A - A 2 4 複合体を特異的に認識する抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供すること。

【解決手段】 配列表の配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 及び配列番号 1 0 に示されるアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を含む重鎖、並びに、配列表の配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列からなる V L - C D R 1、配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列からなる V L - C D R 2 及び配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列からなる V L - C D R 3 を含む軽鎖からなる抗 WT 1 ペプチド / H L A - A 2 4 複合体抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列表の配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 及び配列番号 10 に示されるアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を含む重鎖、並びに、配列表の配列番号 11 に示されるアミノ酸配列からなる V L - C D R 1、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなる V L - C D R 2 及び配列番号 13 に示されるアミノ酸配列からなる V L - C D R 3 を含む軽鎖からなる抗 W T 1 ペプチド / H L A - A 2 4 複合体抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 2】

配列表の配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域 (V H) を含む重鎖及び配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域 (V L) を含む軽鎖からなる、請求項 1 記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 3】

W T 1 ペプチドが配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項 1 又は 2 記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4】

抗体の抗原結合性フラグメントが、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、又は一本鎖 F v (s c F v) である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗原結合性フラグメント。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントをコードする単離された核酸。

20

【請求項 6】

配列表の配列番号 6 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列及び配列番号 7 に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む請求項 5 記載の核酸。

【請求項 7】

請求項 5 又は 6 記載の核酸を含むベクター。

【請求項 8】

請求項 5 又は 6 記載の核酸又は請求項 7 のベクターを発現させる工程を含む、抗 W T 1 ペプチド / H L A - A 2 4 複合体抗体又はその抗原結合性フラグメントの製造方法。

30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントとシグナル伝達タンパク質の細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体。

【請求項 11】

シグナル伝達タンパク質が C D 3 鎖である請求項 10 記載のキメラ抗原受容体。

【請求項 12】

さらに C D 2 8 の細胞内ドメインを含む請求項 11 記載のキメラ抗原受容体。

40

【請求項 13】

請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載のキメラ抗原受容体をコードする核酸。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のキメラ抗原受容体をコードする核酸を含むベクター。

【請求項 15】

請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載のキメラ抗原受容体を発現する細胞。

【請求項 16】

請求項 15 記載の細胞を有効成分として含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、WT1ペプチド/HLA-A24複合体を特異的に認識する抗体又はその抗原結合性フラグメント、抗体又はその抗原結合性フラグメントをコードする核酸、この核酸を含むベクター、抗体又はその抗原結合性フラグメントの製造方法、抗体又はその抗原結合性フラグメントを含むキメラ抗原受容体、キメラ抗原受容体をコードする核酸、この核酸を含むベクター、キメラ抗原受容体を発現する細胞及びこれらを含む組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

WT1遺伝子は、Wilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして単離された遺伝子（非特許文献1）に由来し、成長因子遺伝子（PDGF鎖、CSF-1、IGF-II）、成長因子レセプター遺伝子（IGF-IR、EGFR）や、その他の遺伝子（RAR-、C-myc、C-myc、bcl-2、オルニチン脱炭酸酵素、N-myc）の転写を抑制する。一方、WT1遺伝子は、RbAp46、Dax-1、bcl-2遺伝子の転写を促進することが知られている。WT1遺伝子は、白血病や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現していると言われている（特許文献1）。これらの疾患においては腫瘍発生に関与し、固形癌や造血管腫瘍の発症や進展に重要な役割を果たしていると言われている。

10

【0003】

造血管腫瘍等を有する患者において、WT1由来のタンパク質に対する液性免疫反応及びCD8陽性T細胞による細胞性免疫反応が自然に誘導されることが知られている。また、WT1からCD8陽性T細胞が認識する複数の細胞傷害性Tリンパ球（CTL）エピーペプチドが同定されている。例えば、ヒト白血球型抗原HLA-A0201拘束性の126-134ペプチド、HLA-A2402拘束性の235-243ペプチドなどが報告されている。これらペプチドを認識するCTLは、WT1抗原を発現する腫瘍細胞をHLA拘束性に傷害することが報告されている。WT1遺伝子は正常造血幹細胞を除く正常細胞での発現は極めて低レベルであるが、正常造血幹細胞には腫瘍細胞と同等の発現があるとされている。しかし、WT1ペプチド特異的CTLを用いたヒトin vitroコロニー形成能阻害実験や、マウスにおけるWT1ペプチドワクチンによるin vivo実験においては、正常造血幹細胞への傷害性はみられていない（非特許文献2）。

20

30

【0004】

現在、様々な腫瘍細胞の表面に発現している腫瘍抗原が多数見出され、それぞれの腫瘍細胞や正常組織での発現強度が報告されている。これらの腫瘍抗原を標的とする細胞性免疫又は液性免疫に基づく治療が研究されているが、腫瘍と腫瘍抗原は多種多様であり、それぞれの腫瘍の治療に適切な腫瘍抗原の選択と選択した腫瘍抗原に基づく治療戦略を見出すべく試行錯誤が続けられている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第7696180号公報

40

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】モレキュラーセルバイオロジー（Mol. Cell. Biol.）、第11巻、第1707頁（1991）

【非特許文献2】ジャパニーズジャーナルオブクリニカルオンコロジー（Jpn. J. Clin. Oncol.）、第40巻、第377-387頁（2010）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、WT1ペプチド/HLA-A24複合体を特異的に認識する抗体又は

50

その抗原結合性フラグメントを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、WT1ペプチド/HLA-A24複合体を特異的に認識する抗体又はその抗原結合性フラグメントを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち本発明を概説すれば、

[1] 配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるVH-CDR1、配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるVH-CDR2及び配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるVH-CDR3を含む重鎖、並びに、配列表の配列番号11に示されるアミノ酸配列からなるVL-CDR1、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるVL-CDR2及び配列番号13に示されるアミノ酸配列からなるVL-CDR3を含む軽鎖からなる抗WT1ペプチド/HLA-A24複合体抗体又はその抗原結合性フラグメント、

[2] 配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域(VH)を含む重鎖及び配列番号7に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域(VL)を含む軽鎖からなる、[1]記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント、

[3] WT1ペプチドが配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるペプチドである、[1]又は[2]記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント、

[4] 抗体の抗原結合性フラグメントが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、又は一本鎖Fv(scFv)である、[1]～[3]のいずれか1項に記載の抗原結合性フラグメント、

[5] [1]～[4]のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントをコードする単離された核酸、

[6] 配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列及び配列番号7に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む[5]記載の核酸、

[7] [5]又は[6]記載の核酸を含むベクター、

[8] [5]又は[6]記載の核酸又は[7]のベクターを発現させる工程を含む、抗WT1ペプチド/HLA-A24複合体抗体又はその抗原結合性フラグメントの製造方法、

[9] [1]～[4]のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む組成物、

[10] [1]～[4]のいずれか1項記載の抗体又はその抗原結合性フラグメントとシグナル伝達タンパク質の細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体、

[11] シグナル伝達タンパク質がCD3鎖である[10]記載のキメラ抗原受容体、

[12] さらにCD28の細胞内ドメインを含む[11]記載のキメラ抗原受容体、

[13] [10]～[12]のいずれか1項記載のキメラ抗原受容体をコードする核酸、

[14] [13]に記載のキメラ抗原受容体をコードする核酸を含むベクター、

[15] [10]～[12]のいずれか1項記載のキメラ抗原受容体を発現する細胞、

[16] [15]記載の細胞を有効成分として含有する医薬組成物。

に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、WT1ペプチド/HLA-A24複合体を特異的に認識する抗体又はその抗原結合性フラグメント、抗体又はその抗原結合性フラグメントをコードする核酸、この核酸を含むベクター、抗体又はその抗原結合性フラグメントの製造方法、抗体又はその抗原結合性フラグメントを含むキメラ抗原受容体、キメラ抗原受容体をコードする核酸、この核酸を含むベクター、キメラ抗原受容体を発現する細胞及びこれらを含む組成物が提供される。WT1ペプチド/HLA-A24複合体を特異的に認識する抗体又はその抗原結合性フラグメントは、細胞医療、遺伝子治療の分野で使用することができ、WT1ペプチド/HLA-A24複合体を発現する腫瘍細胞の検出、治療及びそのための研究、試験

10

20

30

40

50

に極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本発明の抗体フラグメントの特異性を示す図である。

【図2】本発明の抗体フラグメントの結合特性を示す図である。

【図3】本発明の抗体フラグメントの結合特性の解析結果を示す図である。

【図4】WT1ペプチド/HLA-A24複合体を提示する細胞と本発明の抗体フラグメントとの結合を示す図である。

【図5】WT1ペプチド/HLA-A24複合体を提示する細胞と本発明の抗体フラグメントとの結合を示す図である。

【図6】WT1ペプチド/HLA-A24複合体を提示する細胞と本発明の抗体フラグメントとの結合を示す図である。

【図7】本発明のキメラ抗原受容体の細胞表面発現を示す図である。

【図8】本発明のキメラ抗原受容体により産生されるサイトカインを示す図である。

【図9】本発明のキメラ抗原受容体を発現する細胞の細胞傷害活性を示す図である。

【図10】本発明のキメラ抗原受容体を発現する細胞の生体での効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本明細書において「WT1」とは、前記の通りWilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして単離された遺伝子がコードするタンパク質である。アミノ酸配列はNCBI RefSeq: NP_000369.3に、塩基配列はNCBI RefSeq: NM_000378.4に記載される。細胞におけるWT1の発現は、例えば特許文献1に記載される方法で定量することができる。

【0013】

本明細書において「抗体」は、免疫系の抗原結合性タンパク質を指す。抗原結合性領域を有する完全長の天然に存在する抗体は、ジスルフィド結合により相互に連結された2つの重鎖(H鎖)及び2つの軽鎖(L鎖)を含む糖タンパク質である。各重鎖には、重鎖可変領域(VH)及び重鎖定常領域(CH)が含まれる。重鎖定常領域は、CH1、CH2、及びCH3の3つのドメインから構成される。各軽鎖には、軽鎖可変領域(VL)及び軽鎖定常領域(CL)が含まれる。軽鎖定常領域は、CLという1つのドメインから構成される。VH及びVLの領域はさらに、相補性決定領域(CDR)という超可変性を有する領域及びフレームワーク領域(FR)というある程度保存されている領域に細分することができる。VH及びVLではアミノ末端からカルボキシ末端へ、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に、3つのCDR及び4つのFRが、それぞれ配列されている。抗原との結合はCDR3が重要であることが知られている。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。

【0014】

本明細書において「HLA(Human Leukocyte Antigen:ヒト白血球型抗原)」とは、ヒトの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)を意味し、免疫細胞への抗原提示に必要とされる細胞表面分子をコードする遺伝子の複合体を指す。HLAはクラスIおよびクラスIIに分類することができる。クラスI HLAは、鎖と2-ミクログロブリンから構成される。クラスI HLAは、ほとんどすべての有核細胞により発現され、CD8陽性T細胞への抗原提示において機能することが示されている。クラスI HLAは、さらにHLA-A、HLA-B、およびHLA-Cに分類することができる。

【0015】

本明細書において「キメラ抗原受容体(CAR)」とは、抗原に結合する細胞外ドメイン、前記細胞外ドメインとは異なるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン及び少なくとも1つの細胞内ドメインを含む融合タンパク質をいう。「キメラ受容体」、「T-body」、「キメラ免疫受容体(CIR)」と呼ばれることがある。「抗原に結合する細胞外

10

20

30

40

50

ドメイン」は、ある抗原に結合することができる任意のオリゴ又はポリペプチドを示し、「細胞内ドメイン」は細胞内で生物学的プロセスの活性化又は阻害をもたらすシグナルを伝達するドメインとして機能することが知られている任意のオリゴ又はポリペプチドを意味する。

【0016】

本明細書において「抗原結合性フラグメント」は、抗原に結合し、抗原に対する特異性を抗体に付与する抗体の一部の領域、部分又はタンパク質の断片である。

【0017】

以下、本発明を具体的に説明する。

(1) 本発明の抗体又はその抗原結合性フラグメント及びこれらをコードする核酸

本発明の抗WT1ペプチド/HLA-A24複合体抗体は、HLA-A24拘束性であるWT1の235-243ペプチド(CMTWNQMN L: 配列番号1; 以下、WT1ペプチドと記載する)と、HLA-A24からなる複合体を特異的に認識し結合する抗体である。ここで、HLA-A24は、HLA-A24鎖(配列番号2)及び2-ミクログロブリン(配列番号3)から構成される。本発明の抗体は、単独で存在するWT1ペプチド又はHLA-A24に比べて、これらの複合体をより特異的に認識する。さらに、本発明の抗体は、WT1ペプチド以外のペプチドとHLA-A24の複合体及びWT1ペプチドとHLA-A24以外のHLAの複合体と結合しない、又は結合活性が低い。従って、本発明の抗体は、WT1ペプチド/HLA-A24複合体を特異的に検出又は標的化することができる。

【0018】

本発明の抗体は、配列表の配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるVH-CDR1、配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるVH-CDR2及び配列番号10に示されるアミノ酸配列からなるVH-CDR3を含む重鎖、並びに、配列表の配列番号11に示されるアミノ酸配列からなるVL-CDR1、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるVL-CDR2及び配列番号13に示されるアミノ酸配列からなるVL-CDR3を含む軽鎖からなる。

【0019】

本発明の一態様として、本発明の抗体は配列表の配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域(VH)を含む重鎖及び配列番号7に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域(VL)を含む軽鎖からなる。VHのアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号4に示され、VLのアミノ酸配列をコードする塩基配列は配列番号5に示される。さらに、前記の重鎖可変領域ならびに軽鎖可変領域のアミノ酸配列のうちの相補性決定領域以外の配列が他のアミノ酸配列、例えばヒト又は他の動物に由来する抗体のフレームワークのアミノ酸配列に置換された抗体も本発明に包含される。

【0020】

本発明の一態様として、本発明は抗WT1ペプチド/HLA-A24複合体抗体の抗原結合性フラグメントを含む。抗体には、抗原に特異的に結合する1又はそれ以上のフラグメントが含まれる。抗体の抗原結合領域を含む抗体のフラグメントは完全長抗体と同様に抗原を特異的に認識することが示されている。本発明の抗原結合性フラグメントに含まれる抗体の断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、又は一本鎖Fv(scFv)が挙げられる。FabはVL、VH、CL及びCH1ドメインから構成される一価の抗体フラグメントである。Fab'はVL、VH、CL、CH1ドメイン及びヒンジ部から構成される一価の抗体フラグメントである。F(ab')₂はヒンジ部のジスルフィド結合により結合した二つのFab断片を含む二価の抗体フラグメントである。Fvは抗体の単腕のVL及びVHから構成される一価の抗体フラグメントである。Fv断片の2つのドメインであるVL及びVHは、別々の遺伝子によりコードされており、遺伝子組換え技術によりこれらのドメインをリンカーで連結して1分子のタンパク質であるscFvを作製することができる。scFvはVH及びVLの間にリンカーを追加的に含む。前記リンカーはVH及びVLを人為的に連結し、scFv抗体の抗原結合能を安定化するた

10

20

30

40

50

めに当業界で通常利用されるペプチドである（参照文献：例えば、GSリンカーは Huston et al., Methods in Enzymology, 203: 46-88 (1991)、EKリンカーは Whitlow, et al., Protein Eng., 6: 989 (1993)）。前記リンカーは一般にグリシン及びセリンを含み、その長さは15～18アミノ酸である。

【0021】

本発明の一態様として、本発明は抗原結合性フラグメントの組合せを含む。このような分子は、Fab₃、Diabody、Triabody、Tetrabody、Minibody、Bis-scFv、(scFv)₂-Fc、intact-IgGが例示され、Holligerら、Nature Biotechnology、第23巻、第9号、p. 1126-36 (2005)に詳述される。

10

【0022】

本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、その特性に実質的な影響を及ぼさない限り、1つの、数個の又は1～9個のアミノ酸が改変され得る。例えば、定常領域やFR領域において、アミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入され得る。このような改変は、例えば、部位特異的変異導入法（点突然変異導入及びカセット式変異導入等）、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、及びPCR法等の当業者に周知の核酸の改変方法を組み合わせて、容易に実施することが可能である。

【0023】

本発明は、さらに、前記の本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントをコードする核酸を含む。本発明の一態様として、本発明の核酸は配列表の配列番号4に示される塩基配列及び配列番号5に示される塩基配列を含む。本発明の核酸は、コードするアミノ酸配列を変更させずに、宿主細胞に適したコドン（至適コドン）を使用するように改変することができる。このように至適コドンに改変することによって、宿主細胞内におけるポリペプチドの発現効率が向上する。

20

【0024】

本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、当業者に公知の方法、例えば、遺伝子工学的的手法又は化学合成等の各種手段を用いて製造することができる。遺伝子工学的的手法としては、例えば、本発明の核酸を含有する複製可能なクローニングベクター又は発現ベクターを作製し、当業者に公知の適当な方法でこのベクターを宿主細胞に導入し、宿主細胞を培養して核酸を発現させ、得られたポリペプチドを回収し、精製することによって製造することができる。本発明の核酸が複数の核酸分子からなる場合は、それぞれの核酸分子を含む複数のベクターの組合せ（セット）を宿主細胞に導入するか、又は複数の核酸を含む1つのベクターを宿主細胞に導入してもよい。なお、ポリペプチドを製造する際に、目的のポリペプチドにペプチドタグを連結させ、ペプチドタグを使用して精製することができる。

30

【0025】

本発明に使用可能なベクターは、適切な宿主中で本発明の核酸を発現するように、適切な制御配列と機能的に連結している。制御配列としては、本発明の核酸を転写させるためのプロモーター、転写を制御するための任意のオペレーター配列、リボソーム結合部位をコードしている配列、エンハンサー、ポリアデニル化配列、及び転写や翻訳の終了を制御する配列等が含まれる。さらにベクターには、当業者に公知の各種の配列、例えば、制限酵素切断部位、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子（選択遺伝子）、シグナル配列、リーダー配列等を必要に応じて使用しても良い。これらの各種配列又は部位は、発現させるポリペプチドの種類、使用する宿主細胞、培養培地等の条件に応じて、当業者が適宜選択して使用することができる。

40

【0026】

本発明に使用可能なベクターは、宿主のゲノムに組み込まれるベクター、組み込まれないベクター、細胞質に存在して自律的に複製するエピソームベクターのいずれもが使用できる。例えば、レトロウイルスベクター（オンコレトロウイルスベクター、レンチウイ

50

ルスベクター、シュードタイプベクターを包含する)、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター又はセンダイウイルスベクター、エプスタイン-バーウイルス(EBV)ベクター、HSVベクターなどのウイルスベクターが使用できる。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中でウイルスが自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。また、リポソーム及び陽イオン脂質などの縮合剤との併用により、非ウイルスベクターも使用することができる。更に、リン酸カルシウム形質移入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、パーティクルボンバードメントにより細胞に本発明の核酸を導入することができる。

【0027】

本発明の核酸を導入する宿主細胞としては当業者に公知の任意の細胞を使用することができるが、例えば、代表的な宿主細胞としては、大腸菌(E. coli)等の原核細胞、及び、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、ヒト由来細胞などの哺乳動物細胞、酵母、昆虫細胞等の真核細胞を挙げることができる。

【0028】

宿主細胞で発現された本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、宿主細胞の培養培地、宿主細胞の抽出物及び/又は溶解物から精製することができる。精製方法は当業者に公知の任意の方法を適宜組み合わせる行うことができる。例えば、遠心分離、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースでのクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン樹脂クロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム等)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、及びアフィニティクロマトグラフィーによって好適に精製される。アフィニティクロマトグラフィーは、ポリペプチドが有するペプチドタグとの親和力を利用した効率が高い好ましい精製技術の一つである。

【0029】

(2) 本発明の組成物

本発明は、前記(1)記載の本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントを含む組成物、ならびに本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントをコードする核酸を含む組成物を提供する。

【0030】

本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、WT1ペプチドとHLA-A24との複合体に対するプローブとして使用することができる。特に、WT1はがん細胞表面でHLAに提示されることが明らかとなっており、T細胞はその抗原認識に基づいてがん細胞を攻撃している。従って、本発明の本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、腫瘍(がん)細胞に対するプローブ、つまり検出用組成物又は診断用組成物として使用することが可能である。

【0031】

検出方法としては、慣用の一般的な検出方法、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、蛍光抗体アッセイ、放射性免疫アッセイ、放射性免疫沈降法、ドットプロットアッセイ、阻害または競合アッセイ、サンドイッチアッセイ、ラテックスビーズ凝集アッセイなどが挙げられるが、これらに制限されない。

【0032】

診断や検出の対象とするサンプルは、生物学的サンプル、例えば、疾患部位の組織又は細胞、血液、血清、血漿、リンパ液、尿などの体液、などである。これらのサンプル、もしくは必要に応じて予備精製、均質化、遠心分離、又は希釈を行ったサンプルに、適切な緩衝液中で、本発明の抗体を接触させ、抗原と抗体との複合体を上記の検出方法により検出する。この場合、本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントを標識してもよく、標識二次抗体を使用してもよい。標識は、酵素(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)、放射性同位元素(例えば³²P、³⁵S、³H、¹²⁵Iなど)

10

20

30

40

50

、蛍光性物質（例えばローダミン、フルオレサミン、ダンシルクロリド、それらの誘導体など）、タグペプチドなどである。

【0033】

本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、医薬を標的に送達するために使用することができる。医薬と連結させた本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、WT1ペプチドとHLA-A24との複合体を特異的に認識し、医薬を標的に送達する。連結可能な医薬として、サイトカイン（IL2、TNF、IFN- など）及びそれらの受容体などのタンパク質、細胞毒（リシン、ジフテリア、ゲロニンなど）、放射性核種（⁹⁰Y、¹³¹I、²²⁵Ac、²¹³Bi、²²³Ra、及び²²⁷Thなど）、細胞（T細胞、NK細胞など）又は低分子化合物（カリケアミシン、ドキシソルピシンなど）が挙げられる。

10

【0034】

本発明の医薬組成物の有効成分の有効量は、例えば治療目的、腫瘍の種類、部位及び大きさ等の投与対象における病状、患者の諸条件、及び投与経路等によって当業者が適宜決めることができる。典型的な1回の投与量又は日用量は、上記の条件に応じ、可能ならば、例えば当分野で既知の腫瘍細胞の生存又は成長についての検定法を使用して、まずインビトロで、そして次に、人間の患者のための用量範囲を外挿し得る適切な動物モデルで、適当な用量範囲を決定することができる。

【0035】

本発明の組成物を医薬組成物として使用する際には、有効成分の種類、薬剤形態、投与方法・目的、投与対象の病態等の各種条件に応じて、有効成分に加えて当業者に周知の薬学上許容し得る各種成分（例えば、担体、賦形剤、緩衝剤、安定化剤、等）を適宜添加することができる。本発明の医薬組成物は、上記各種条件に応じて、錠剤、液剤、粉末、ゲル、及び、噴霧剤、或いは、マイクロカプセル、コロイド状分配系（リボソーム、マイクロエマルジョン等）、及びマクロエマルジョン等の種々薬剤形態をとり得る。

20

【0036】

投与方法としては、静脈内、腹腔内、脳内、脊髄内、筋肉内、眼内、動脈内、特に胆管内、又は病変内経路による注入又は注射、及び持続放出型システム製剤による方法が挙げられる。本発明の医薬組成物は、輸液により連続的に、または大量注射により投与されることができる。

30

【0037】

本発明の組成物は、例えば慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）などの造血器腫瘍や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌、中皮腫等の固形癌の治療、診断、検出のために使用される。特にWT1陽性、HLA-A24陽性の腫瘍、癌の治療、診断、検出に有用である。

【0038】

(3) 本発明のキメラ抗原受容体

本発明は、前記(1)記載の本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントとシグナル伝達タンパク質の細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)を含む。本発明のCARは、WT1ペプチド/HLA-A24複合体に特異的に結合して、CARを発現する細胞にシグナルを伝達することができる。本発明のCARは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを含む。細胞外ドメインには本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントが含まれる。細胞外ドメインと前記複合体が特異的に結合すると、CARの細胞内ドメインを介して細胞内にシグナルが伝達され、CARを発現している細胞を刺激する。刺激を受けた細胞はサイトカイン等を産生し、前記複合体を発現している標的細胞に対し細胞傷害性を発揮し、又は他の免疫細胞の細胞傷害性を誘導することができる。

40

【0039】

CARの細胞内ドメインとして、同一分子内に存在する細胞外ドメインがWT1ペプチド/HLA-A24複合体と結合(相互作用)した際に、細胞内にシグナルを伝達するこ

50

とが可能な分子であるシグナル伝達タンパク質の細胞内ドメインが使用できる。本発明のCARに使用可能なシグナル伝達タンパク質としては、膜タンパク質、シグナル受容体、サイトカイン受容体から選択されるタンパク質が例示される。CARの細胞内ドメインは、CD3、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dに由来する一次細胞質シグナル伝達配列を含む細胞内ドメインが例示される。また、例えば、CD2、CD4、CD5、CD8、CD8、CD28、CD137、CD134、ICOS、GITR及びCD154に由来する二次細胞質シグナル（共刺激シグナル）伝達配列を含む細胞内ドメインが例示される。さらに、IL-2受容体、IL-21受容体に由来する三次細胞質シグナル伝達配列を含む細胞内ドメインが例示される。

10

【0040】

CARの膜貫通ドメインは、例えば、T細胞受容体の鎖、CD3鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITRの膜貫通ドメインを使用することができる。また、人為的に設計した配列でもよい。

【0041】

本発明は、本発明のCARをコードする核酸を含む。CARをコードする核酸は、適当なプロモーターの制御下に発現されるように別の核酸と連結することができる。プロモーターとしては構成的に発現を促進するもの、薬剤等（例えば、テトラサイクリン又はドキシソルピシン）により誘導されるもの等のいずれも用いることができる。例えば、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）プロモーター、Xistプロモーター、 α -アクチンプロモーター、RNAポリメラーゼIIプロモーター等の哺乳類由来プロモーター、SV40初期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター、各種レトロウイルスのLTRプロモーター等のウイルス由来プロモーターを使用することができる。また、核酸の効率のよい転写を達成するために、プロモーター又は転写開始部位と協同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列又はターミネーター配列を含む核酸を連結してもよい。また、更に核酸の発現を確認するためのマーカーとなりうる遺伝子（例えば薬剤耐性遺伝子、レポーター酵素をコードする遺伝子、又は蛍光タンパク質をコードする遺伝子等）を組み込んでよい。

20

30

【0042】

本発明のCARをコードする核酸は、前記（1）に記載した本発明に使用可能なベクターにより細胞に導入することができる。さらに、CARをコードする核酸は医薬用組成物の有効成分として使用することができる。CARをコードする核酸を含む医薬用組成物は前記（2）の記載のとおり、製造及び使用することができる。

【0043】

本発明の別の態様において、本発明には本発明のCARを発現する細胞が含まれる。当該細胞は、本発明のCARをコードする核酸を細胞に導入する工程により調製することができる。CARを発現する細胞は、CARを介してWT1ペプチド/HLA-A24複合体と結合することにより細胞内にシグナルが伝達され活性化される。細胞の活性化は、宿主細胞の種類や細胞内ドメインにより異なるが、例えば、サイトカインの放出、細胞増殖率の向上、細胞表面分子の変化等を指標として確認することができる。例えば、活性化された細胞からの細胞傷害性のサイトカイン（腫瘍壊死因子、リンホトキシンなど）の放出は、前記複合体を発現する腫瘍細胞の破壊をもたらす。また、サイトカイン放出や細胞表面分子の変化により、他の免疫細胞、例えば、B細胞、樹状細胞、NK細胞、マクロファージ等を刺激する。従って、本発明のCAR発現細胞は養子免疫療法、特にWT1陽性、HLA-A24陽性の腫瘍又は癌に対する養子免疫療法において有用である。

40

【0044】

CARをコードする核酸を細胞に導入する工程は、生体外（*ex vivo*）又は生体内（*in vivo*）で実施される。核酸を導入する細胞は、哺乳動物、例えばヒト由来

50

の細胞又はサル、マウス、ラット、ブタ、ウシ、イヌ等の非ヒト哺乳動物由来の細胞が使用できる。また、細胞の種類としては、例えば、血液（末梢血、臍帯血など）、骨髓などの体液、組織又は器官より採取、単離、精製、誘導された細胞を使用することができる。P B M C、免疫細胞〔樹状細胞、B細胞、造血幹細胞、マクロファージ、単球又はNK細胞、血球系細胞（好中球、好塩基球、単球）〕、造血幹細胞、臍帯血単核球、線維芽細胞、前駆脂肪細胞、肝細胞、血球細胞、皮膚角化細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、脂肪幹細胞、多能性幹細胞、各種がん細胞株又は神経幹細胞を使用することができる。本発明においては、特にT細胞、T細胞の前駆細胞（造血幹細胞、リンパ球前駆細胞等）、多能性幹細胞又はこれらを含む細胞集団の使用が好ましい。T細胞には、CD8陽性T細胞、又はCD4陽性T細胞、制御性T細胞、細胞傷害性T細胞、腫瘍浸潤リンパ球が含まれる。T細胞及びT細胞の前駆細胞を含む細胞集団には、P B M Cが含まれる。本発明で使用する細胞は生体より採取されたもの、それを拡大培養したもの又は細胞株として樹立されたもののどちらでもよい。核酸を導入した細胞又は当該細胞より分化させた細胞を生体に移植することが望まれる場合には、その生体自身又は同種の生体から採取された細胞に核酸を導入することが好ましい。

10

20

30

40

50

【0045】

本発明のCARを発現する細胞は、対象に投与する前に適切な培地及び/又は刺激分子を使用して培養及び/又は刺激を行ってもよい。刺激分子にはサイトカイン類、適当なタンパク質、その他の成分が含まれる。サイトカイン類としては、例えばIL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IFN-等が例示され、好適には、IL-2を含む培地が使用される。IL-2の培地中の濃度としては、特に限定はないが、例えば、好適には $0.01 \sim 1 \times 10^5$ U/mL、より好適には $1 \sim 1 \times 10^4$ U/mLである。また、適当なタンパク質としては、例えばCD3リガンド、CD28リガンド、抗IL-4抗体が例示される。また、この他、レクチン等のリンパ球刺激因子を添加することもできる。更に、培地中に血清や血漿を添加してもよい。これらの培地中への添加量は特に限定はないが、0超~20容量%が例示され、また培養段階に応じて使用する血清や血漿の量を変更することができる。例えば、血清又は血漿濃度を段階的に減らして使用することもできる。なお、血清又は血漿の由来としては、自己（培養する細胞と由来が同じであることを意味する）もしくは非自己（培養する細胞と由来が異なることを意味する）のいずれでも良いが、好適には安全性の観点から自己由来のものが使用される。

【0046】

細胞の培養に使用される細胞培養用器材としては、特に限定はないが、例えば、シャーレ、フラスコ、バッグ、大型培養槽、バイオリアクター等を使用することができる。なお、バッグとしては、細胞培養用CO₂ガス透過性バッグを使用することができる。また、工業的に大量の細胞集団を製造する場合には、大型培養槽を使用することができる。また、培養は開放系、閉鎖系のいずれでも実施することができるが、好適には得られる細胞集団の安全性の観点から閉鎖系で培養を行うことが好ましい。

【0047】

本発明には、CARを発現する細胞を有効成分として含む医薬組成物が含まれる。本発明の医薬組成物は、非経口的に対象に投与して用いる。非経口的な投与方法としては、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、及び皮下投与などの方法が包含される。抗腫瘍作用を高めるため、髄膜腫又は近傍の組織、例えば皮下に投与することもできる。また、投与量は、対象の状態、体重、年齢等に応じて適宜選択されるが、通常、細胞数として、体重60kgの対象に対し、1回当たり、 $10^7 \sim 10^9$ 細胞程度、好ましくは、 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 細胞程度投与される。本発明の医薬組成物は、1回又は複数回にわたって投与することができる。本発明の医薬組成物は、非経口投与に適した公知の形態、例えば、注射又は注入剤とすることができる。本発明の医薬組成物は、適宜、薬理的に許容できる賦形剤を含んでもよい。本発明の医薬組成物は、また、細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、培地等を含んでもよい。培地としては、特に限定するものではないが、RPMI、AIM-V、X-VIVO10などの培地が

一般的に挙げられる。

【実施例】

【0048】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

実施例1 WT1ペプチド/HLA-A24複合体特異的s c F vのスクリーニング

(1) WT1ペプチド/HLA-A24複合体の調製

配列番号1に示すアミノ酸配列を有するWT1ペプチドを合成した(北海道バイオシステムズ社)。また、C末端にビオチン化サイトを有するHLA-A24重鎖の細胞外フラグメント(配列番号2)及び配列番号3に示すアミノ酸配列を有する2-ミクログロブリン(2M)を大腸菌で発現させ精製した。10mgのWT1ペプチド、13.2mgの2M、18.6mgのHLA-A24重鎖の細胞外フラグメントを200mLの溶液(100mM Tris-HCl(pH8)、400mM L-Arginine-HCl、2mM Na₂EDTA、5mM red. glutathione、0.5M oxid. glutathione、0.1mM PMSF、0.2mg pepstatin、0.2mg leupeptin)中で混合したのち、蒸留水による透析、Labscale TFFシステム(ミリポア社製)及びアミコンウルトラ10k(ミリポア社製)による濃縮を行った。濃縮物をAKTA(GE社製)による分画に供してWT1ペプチド/HLA-A24複合体を取得した。WT1ペプチドと同様に、hTERT(ヒトテロメラーゼ逆転写酵素)、SAGE(肉種抗原)、Her2(ヒト表皮成長因子受容体2型)、CMV(サイトメガロウイルス)、EBNA(エプステインバーウイルス核内抗原)由来のHLA-A24拘束性ペプチドとHLA-A24の複合体を調製した。次いでWT1ペプチド/HLA-A24複合体をビオチンリガーゼ(AVIDITY社製)によりビオチン化した。ビオチン化物についてAKTAにて再度の精製を行い、これをA24-WT1とした。

10

20

【0049】

(2) s c F vのスクリーニング

実施例1-(1)で調製したA24-WT1 20μgを、ストレプトアビジンを結合させた磁気ビーズ200mgと混ぜ、0.05% Tween/PBS溶液中、4で通夜反応させたのち、これに3μLの2mM ビオチン/PBSを入れて1時間反応させた。これを0.05% Tween/PBS溶液にて2回洗浄したのち、0.05% Tween/PBS溶液400μLに懸濁し、これを抗原ビーズ液とした。

30

反応液として、ヒトBリンパ細胞に由来する抗体のファージライブラリ溶液 1×10^{13} cfu相当、100μgのストレプトアビジン(PIERCE社製)、実施例1-(1)で調製した50μgのA24-CMV、50μgのA24-Her2、1% Triton X-100/PBSを作製し、これを室温で1時間回転混和したのち、抗原ビーズ液100μLを混ぜて1時間回転混和した。

【0050】

その後、マグネットトラッパー(東洋紡社製)にてトラップした磁性ビーズを1% Triton X-100/PBSにて5回洗浄したのちPBSにて1回洗浄した。洗浄後に回収した磁性ビーズを培養した大腸菌DH12Sに加え、37にて1時間感染させた。それを200μg/mL アンピシリン、1% glucoseを含む2xYT培地(2xYT AG)500mLにて30 通夜培養した。

40

【0051】

1mLの培養液に200mM アンピシリンを含む2xYT培地(2xYTA)5mL及びヘルパーファージM13KO7 50μLを入れ、37にて1時間培養したのち、50μM カナマイシン、200μM アンピシリンを含む2xYT(2xYTA K)500mLを入れ、30 通夜培養した。これを遠心して得られた上清に100mLの20% PEG#600、2.5M NaCl溶液を入れて混和し、遠心して沈殿を回収した。これを10mL PBSにて懸濁したのち、フィルター滅菌した。抗原ビーズ液とのイ

50

ンキュベーションからフィルター滅菌までの操作を4回繰り返し、4回目終了後、回収された大腸菌をLBGA plate (200 µg/mL アンピシリン、0.1% glucoseの入った普通寒天培地(日水社製))に蒔いた。30℃にて培養し、得られたコロニーを2×YTAG培地にて30℃通夜培養し、培養液の一部を使用してmini prep DNA kit (QIAGEN社製)にてDNAを調整し、配列決定を行った。この段階で19個のクローンが陽性、すなわちA24-WT1との結合能を有すると判断した。また、培養液50 µLを1.5 mLの2×YTAI (0.5 mMのIPTGを入れた2×YTA培地)と混ぜ、30℃通夜培養したのち、遠心して上清のファージ液をとった。このファージ液をELISA法に使用した。

【0052】

(3) WT1ペプチド/HLA-A24複合体特異的クローンの取得

Maxisoploose (NUNC社製)にPBS 50 µLに懸濁された500 ng neutraavidin (PIERCE社製)を入れて4℃にて通夜振盪しプレートにneutraavidinを固定化した。終了後、液を捨て、200 µLの2% BSA/PBSを入れ、通夜静置した。このプレートに、実施例1-(1)で調製したA24-WT1を300 ng/50 µL PBSとなるように入れ、4℃にて通夜振盪した。終了後、PBSにて洗浄し抗原plateとした。コントロールとして、実施例1-(1)で調製したA24-hTERT、A24-SAGE、A24-Her2、A24-CMV、A24-EBNAのHLA-A24拘束性ペプチドを使用し、実施例1-(1)と同様にビオチン化したHLA-A24複合体を調製して抗原固定化プレートを調製した。

それぞれの抗原固定化プレートに実施例1-(2)で調製したファージ液100 µLを入れ、室温にて1時間振盪したのち、プレートをPBSにて洗浄し、次いで0.05% Tween20/PBSにて2000倍希釈した抗cp3ウサギ抗体100 µLを入れて室温にて1時間振盪した。プレートをPBSにて洗浄したのち、0.05% Tween20/PBSにて4000倍希釈したHRP標識抗ウサギIgG (MBL社製)100 µLを入れて室温にて1時間振盪した。プレートをPBSにて洗浄したのち、0.01% H₂O₂、0.1M Na₂PO₄、0.1M citric acid (pH5.1)にて懸濁させたOPD (WAKO社製)を反応させ、発色を確認したら2N 硫酸にて停止させ、SpectraMax M2 (モレキュラーデバイス社製)にて490 nmの波長にて吸光度を測定した。

【0053】

実施例1-(2)で取得したファージクローン19個の中から、WT1ペプチド/HLA-A24複合体と特異的に結合するWT#213クローンを取得した。さらに、WT#213クローンの濃度を变化させてWT1ペプチド/HLA-A24複合体とのアフィニティーを確認した。その結果を図1及び図2に示す。なお、図2の縦軸は吸光度、横軸はWT#213クローンの希釈度を示す。図1及び図2から、WT#213クローンが提示しているscFvは、WT1ペプチド/HLA-A24複合体との結合特異性が非常に高く、アフィニティーが高いことを確認した。

【0054】

(4) WT#213クローンの評価

WT#213クローンのscFvとWT1ペプチド/HLA-A24複合体の解離定数測定は、Biacore (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を使用した。WT#213クローンを固定化し、WT1ペプチド/HLA-A24複合体をアナライトとして測定した。ランニングバッファーとしてHBSバッファー (0.01M HEPES (pH7.4)、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% (v/v) Surfactant P20)を用いた。データの解析には、分析ソフトウェアを用いて、結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)及びアフィニティー(K_D)を算出した。その結果は、k_a値は3.01e⁴、k_d値は0.117、K_D値は3.89 µMであった。解析グラフを図3に示す。図3から、WT#213クローンのscFvはK_D値が高く、k_dの曲線もなだらかであることから、このscFvは抗原との結合力が強く、かつ離

10

20

30

40

50

れにくいことが確認された。

【0055】

実施例2 WT#213 scFvの評価

(1) WT1 scFvテトラマーの調製

WT#213クローンのscFvのVHの塩基配列を配列番号4に、VLの塩基配列を配列番号5に示す。また、VHのアミノ酸配列を配列番号6に、VLのアミノ酸配列を配列番号7に示す。なお、VHのCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列を配列番号8、9、10に、VLのCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号11、12、13にそれぞれ示す。

さらに、scFvをコードするDNAフラグメントを、WT#213クローンから抽出したDNAを鋳型としたPCRにより調製した。プライマーは、Fプライマー（配列番号14）及びRプライマー（配列番号15）を使用した。米国科学アカデミー紀要（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）、2003年、第100巻、第13号、第7480-7485頁を参考に、増幅したDNAフラグメントをpHisAviの制限酵素サイトSalI-AscIに挿入し、得られたプラスミドをpWT#213 scFv HisAviとした。pWT#213 scFv HisAviは、PelBリーダー、Hisタグ、WT#213 scFv及びAviタグを有する融合タンパク質、並びにPelBリーダー及びピオチンリガーゼ（BirA）を有する融合タンパク質を発現する。pWT#213 scFv HisAviで形質転換した大腸菌DH5 株を、0.5 mg/mL IPTG及び2 μM ピオチンを含む2×YTA培地（2×YTAB培地）500 mLで、30 通夜培養した。培養液を遠心（8000 rpm、4 で10分）して得られた上清に硫酸145.5 gを入れて50%飽和とし、完全に溶解させた。これを遠心（8000 rpm、4 で10分）して回収した沈殿をcomplete（ロシュ社製）を入れたPBSにて懸濁した。懸濁液を遠心（100,000 rpm、4 で30分）したのち、回収した上清を0.45 μmフィルター（ミリポア社製）にてろ過し、次いでろ液をNi-NTA agarose（QIAGEN社製）カラムにアプライし、さらにカラムを0.1% Tween 20/PBS、及びPBSにて洗浄した。カラムに結合したタンパク質を50 mM citrate（pH 2.5）にて溶出したのち、3 M Trisにて中和した。次いで、PBSによる透析を行い、アミコンウルトラ（ミリポア社製）による濃縮を行った。

【0056】

以上の操作で得られたタンパク質13 μgをPE標識Streptavidin（Prozyme社製）4 μgと混ぜ、全体容量を400 mLになるよう、0.05% Na₃N/PBSを加え、遮光して4 にてゆっくりと通夜回転混和し、WT#213 scFvテトラマーを調製した。

【0057】

(2) WT1ペプチドパルスLCLとWT#213 scFvとの反応性

RPMI培地中で、HLA-A24陽性細胞であるリンパ芽球様細胞株（lymphoblastoid cell line、以下LCL）を実施例1-(1)で調製したWT1ペプチドで24時間パルスした。パルスしたLCLをPBSで洗浄し、実施例2-(1)で調製したWT#213 scFvテトラマーを添加し、4 で1時間静置した。LCLをPBSで洗浄し、1% パラホルムアルデヒドを含むPBSで固定化して、フローサイトメトリーを実施した。コントロールとしてペプチドをパルスしないLCLを同様に調製した。結果を図4に示す。図4から、WT#213 scFvはWT1ペプチドをパルスしたLCLに反応性を示すことが確認された。

【0058】

(3) WT1ペプチドパルスT2A24とWT#213 scFvとの反応性

HLA-A24陽性細胞であるT2A24を使用し、実施例2-(2)と同様にWT1ペプチドをパルスし、WT#213 scFvの反応性を確認した。コントロールとして、CMVペプチドをパルスした細胞を調製した。結果を図5に示す。図5から、WT#21

10

20

30

40

50

3 s c F v は W T 1 ペプチドに特異的に反応することが確認された。

【 0 0 5 9 】

(4) W T 1 発現腫瘍細胞と W T # 2 1 3 s c F v との反応性

H L A - A 2 4 陽性細胞で内因性に W T 1 を発現しているヒト巨核芽球白血病細胞株である M E G - 0 1 を使用して、 W T # 2 1 3 s c F v との反応性を実施例 2 - (2) と同様に確認した。コントロールとして、 H L A - A 2 4 陽性細胞であるが W T 1 を発現しないヒト口腔扁平上皮がん細胞株である H S C - 2 を使用した。結果を図 6 に示す。また、コントロールとして、 H L A - A 2 及び W T 1 を発現する K 5 6 2 - A 2 細胞も使用し、 W T # 2 1 3 s c F v に反応性が見られないことを確認した。以上より、 W T # 2 1 3 s c F v は W T 1 ペプチドを H L A - A 2 4 拘束性に反応することが確認された。

10

【 0 0 6 0 】

実施例 3 キメラ抗原受容体 (C A R)

(1) W T # 2 1 3 s c F v を有する C A R を発現するレトロウイルスプラスミドの調製

国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 1 7 1 8 号パンフレットに記載される p M S 3 - E G F R - L C - z G - C A R プラスミドベクターの、 E G F R に対する s c F v 及びヒト I g G - C L (軽鎖定常領域) ドメインコードする D N A を、実施例 2 - (1) で調製した W T # 2 1 3 s c F v をコードする D N A フラグメントに置換して p M S 3 - W T # 2 1 3 - z G - C A R プラスミドベクターを調製した。このベクターは、 N 末端から順に、リーダー配列、 W T # 2 1 3 s c F v 、 C D 2 8 膜貫通領域 (T M) 、 C D 3 鎖細胞内ドメイン、 G I T R (グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体) 細胞内ドメインを有する C A R を発現する。この C A R を W T # 2 1 3 C A R とする。

20

【 0 0 6 1 】

(2) レトロウイルス溶液の作製

実施例 3 - (1) で作製したプラスミドベクターにより大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換し、形質転換体を得た。これら形質転換体の保持するプラスミド D N A を N u c l e o B o n d X t r a M i d i K i t (マッハライナーゲル社製) を用いてそれぞれ精製し、トランスフェクション用 D N A として以下の操作に供した。

調製したトランスフェクション用 D N A のそれぞれと R e t o r o v i r u s P a c k a g i n g K i t E c o (タカラバイオ社製) に含有される p G P ベクター、 p E e c o ベクターを 2 9 3 T 細胞にそれぞれトランスフェクトした。この操作は前記キットの製品プロトコールに従って行った。得られた形質導入細胞のそれぞれよりエコトロピックウイルスを含有する上清液を獲得し、 0 . 4 5 μ m フィルター (M i l e x H V 、 ミリポア社製) にてろ過した。この上清を用いて、ポリブレンを使用する方法により P G 1 3 細胞 (A T C C C R L - 1 0 6 8 6) にエコトロピックウイルスを感染させた。得られた細胞の培養上清を回収し、 0 . 4 5 μ m フィルターによりろ過し、 W T # 2 1 3 C A R 発現用レトロウイルス溶液とした。

30

【 0 0 6 2 】

(3) W T # 2 1 3 C A R の発現

インフォームドコンセントを得て採取されたヒト末梢血より分離した末梢血単核球 (P B M C) に、実施例 3 - (2) で作製した W T # 2 1 3 C A R 発現用レトロウイルス溶液を、レトロネクチン (登録商標、タカラバイオ社製) を用いた標準的な方法で 2 回感染させ、 W T # 2 1 3 C A R 発現 P B M C を作製した。

40

ウイルス感染から 1 4 日後の細胞 (G M C) 及びコントロールとしてベクターを導入しなかった P B M C (N G M C) を、抗ヒト I g G L a m b d a 抗体及び A l e x a F l o u r 4 8 8 標識抗 R a b b i t I g G 抗体により染色した。また別に、 P E (フィコエリスリン : ベクトンディッキンソン社製) 標識 W T 1 - A 2 4 テトラマーを添加した。フローサイトメーターを使用し、染色後の細胞について、蛍光標識陽性である細胞の割合、すなわち C A R が陽性である細胞及び W T 1 ペプチド / H L A - A 2 4 複合体に結合する C A R が陽性である細胞の割合を測定した。その結果を図 7 に示す。図 7 に示す

50

ように、高いCAR陽性率が確認され、細胞表面にWT1ペプチド/HLA-A24複合体に結合するCARが発現していることが分かった。

【0063】

(4) WT#213CAR発現細胞の機能評価(サイトカイン産生、マーカーの発現)
 実施例3-(3)で調製したウイルス感染14日後のWT#213CAR発現細胞を回収し、96-wellプレートにて細胞内サイトカインの染色を以下の通り行った。細胞内輸送阻害剤BrefeldinA(シグマ社製)を含む培地で上記WT#213CAR発現細胞(GMC)及びコントロールとしてベクターを導入しなかったPBMC(NGMC)を 1.0×10^6 cells/mLとなるように懸濁した懸濁液を、前記プレートの1ウェルあたり100 μ L添加した。さらに、T2A24細胞株にWT1ペプチドをパルスした細胞の 1.0×10^6 cells/mL懸濁液を100 μ L添加し、5時間共培養させた。コントロールとして、WT1ペプチドをパルスしないT2A24細胞株及びCMVペプチドをパルスしたT2A24細胞株を使用し、同様の操作を行った。それぞれ共培養させた細胞を抗Human CD8抗体及び抗Human CD4抗体により染色した後、IntraPrep Reagent(ベックマンコールター社製)処理を行い、抗Human IFN 抗体、抗Human CD107a抗体及び抗Human Mip 1b抗体により染色を行った。フローサイトメーターを使用し、染色後の細胞について、CD8陽性細胞中又はCD4陽性細胞中の各サイトカイン産生細胞の割合を測定した。図8に結果を示す。図8に示す通り、WT#213CAR発現細胞(GMC)は、WT1ペプチドを認識して各種サイトカイン、マーカーを産生することが確認された。

10

20

【0064】

(5) WT#213CAR発現細胞の機能評価(細胞傷害活性)
 実施例3-(3)で調製したウイルス感染14日後のWT#213CAR発現細胞(GMC)を回収し、96-wellプレートにてCalsein release assayによって細胞傷害活性を測定した。Calsein-AM(同仁化学社製)を取り込ませたT2A24細胞株、K562-A2細胞株及びMEG-01細胞株を 1.0×10^5 cells/mLとなるように懸濁した。T2A24細胞株については、WT1ペプチドをパルスした細胞、CMVペプチドをパルスした細胞及びパルスしない細胞を準備した。各細胞1ウェルあたり100 μ L添加し、上記WT#213CAR発現細胞及びコントロールとしてベクターを導入しなかったPBMC(NGMC)を懸濁し、ET比が20、10、5、2.5となるように100 μ L添加した。PBMCの代わりに、Low controlとして培地を、High controlとして0.1% Triton X-100を100 μ L添加するウェルを用意した。細胞及びコントロールを調製した後、96-wellプレートを5.0% CO₂ガスで平衡化した37 CO₂インキュベーター中で4時間保温した。次いで、上清100 μ Lについて $e_x = 490$ nm、 $e_m = 515$ nmにて蛍光強度を測定し、放出Calsein量を測定した。細胞傷害活性(Lysis)を下式によって算出した結果を図9に示す。

30

【0065】

細胞傷害活性(%) = $100 \times (\text{各ウェルの測定値} - \text{Low controlの測定値}) / (\text{High controlの測定値} - \text{Low controlの測定値})$

40

【0066】

図9に示すように、WT1ペプチドをパルスしたT2A24細胞株においてWT#213CARを導入したPBMCによる高い細胞傷害活性が見られた。CMVペプチドをパルスした細胞株及びペプチドをパルスしていない細胞株に対して反応性を示さないことから、WT#213CARは高い特異性を有していることが確認された。また、共にWT1を内因性に発現しているK562-A2細胞株及びMEG-01細胞株について、HLA-A24陽性のMEG-01細胞株に対する細胞傷害活性が確認された。また、HLA-A24陰性のK562-A2細胞株特異的な細胞傷害活性は確認されなかつたこのことは、WT#213CARはWT1ペプチドをHLA-A24拘束性に反応することを示している。

50

【 0 0 6 7 】

実施例 4 担癌動物を用いた評価

(1) WT # 2 1 3 C A R 発現 T 細胞群の調製

インフォームドコンセントを得て採取されたヒト末梢血より分離した P B M C $5 . 3 \times 10^5$ cells を、0 . 2 % のヒト血清アルブミン (H S A)、6 0 0 I U / m L の I L - 2、0 . 6 % の血漿を含む G T - T 5 0 3 培地 (タカラバイオ社製) 中に懸濁し、5 μ g / m L の O K T - 3 (e B i o s c i e n c e 社製) 及び 2 5 μ g / m L の レトロネクチン (タカラバイオ社製) を固層化したプレートに播種し、5 . 0 % C O ₂ ガスで平衡化した 3 7 C O ₂ インキュベーター中で 4 日間培養し T 細胞の拡大培養を行った。この T 細胞に、実施例 3 - (2) で作製した WT # 2 1 3 C A R 発現用 レトロウイルス溶液を、標準的な方法で 2 回感染させた。感染させた T 細胞を、0 . 2 % のヒト血清アルブミン (H S A)、6 0 0 I U / m L の I L - 2、0 . 6 % の血漿を含む G T - T 5 0 3 培地でさらに 4 日間培養し、WT # 2 1 3 C A R 発現 T 細胞群を調製した。培養開始後 8 日目の T 細胞群の C A R の発現を実施例 3 - (3) と同様の方法で測定した。その結果、T 細胞群に含まれるリンパ球のうち 8 7 . 7 % が C D 8 陽性細胞で、そのうち 9 4 % の細胞が C A R を発現していることを確認した。また、T 細胞群に含まれるリンパ球のうち 7 . 8 % が C D 4 陽性細胞で、そのうち 9 8 % の細胞が C A R を発現しており、WT # 2 1 3 C A R の高い発現率を確認した。

10

【 0 0 6 8 】

(2) 担癌マウスにおける WT # 2 1 3 C A R 発現 T 細胞の効果

8 ~ 1 0 週令の N O G マウス (N O D / S h i - s c i d、I L - 2 K O) ((財) 実験動物中央研究所) に 2 . 5 G y の放射線照射を行った。翌日、各マウスの左背部に、WT 1 陽性、H L A - A 2 4 陰性の K 5 6 2 細胞株 $2 . 5 \times 10^6$ cells を皮下注射し、右背部に WT 1 陽性、H L A - A 2 4 陽性の K 5 6 2 - A 2 4 細胞株 $2 . 5 \times 10^6$ cells を皮下注射した。同時に、実施例 4 - (1) で調製した WT # 2 1 3 C A R 発現 T 細胞 $1 . 0 \times 10^7$ cells を静脈注射した。また、コントロールとして、ウイルス液を感染させていない T 細胞を注射したマウス及び T 細胞の代わりに P B S を注射したマウスを用意した。マウスは各群 5 匹を使用した。注射後 2 ~ 3 日毎に腫瘍径及び体重を測定した。腫瘍径は、腫瘍の最大直径と最小直径を測定してその数値を乗じることにより算出した。

20

30

【 0 0 6 9 】

腫瘍径 (mm^2) = 最大直径 (mm) \times 最小直径 (mm)

【 0 0 7 0 】

図 1 0 にそれぞれのマウスにおける K 5 6 2 細胞株及び K 5 6 2 - A 2 4 細胞株の腫瘍径と体重の経時変化を示す。図中、G M C は WT # 2 1 3 C A R 発現 T 細胞を静脈注射したマウス、N G M C はウイルス液を感染させていない T 細胞を注射したコントロールのマウス、P B S は T 細胞の代わりに P B S を注射したコントロールのマウスをそれぞれ示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍径の積を示す。WT # 2 1 3 C A R 発現 T 細胞を輸注したマウスでのみ、K 5 6 2 - A 2 4 細胞株の腫瘍の増殖抑制が確認された。このことは、WT # 2 1 3 C A R は WT 1 ペプチドを H L A - A 2 4 拘束性に腫瘍増殖を抑制することを示している。また、各マウスの体重に差が見られず、WT # 2 1 3 C A R の高い安全性を確認した。

40

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 7 1 】

本発明により、WT 1 ペプチド / H L A - A 2 4 複合体を特異的に認識する抗体又はその抗原結合性フラグメント、抗体又はその抗原結合性フラグメントをコードする核酸、この核酸を含むベクター、抗体又はその抗原結合性フラグメントの製造方法、抗体又はその抗原結合性フラグメントを含むキメラ抗原受容体、キメラ抗原受容体をコードする核酸、この核酸を含むベクター、キメラ抗原受容体を発現する細胞及びこれらを含む組成物が提供される。WT 1 ペプチド / H L A - A 2 4 複合体を特異的に認識する抗体又はその抗原

50

結合性フラグメントは、細胞医療、遺伝子治療の分野で使用することができ、WT1ペプチド/HLA-A24複合体を発現する腫瘍細胞の検出、治療及びそのための研究、試験に極めて有用である。

【配列表フリーテキスト】

【0072】

SEQ ID NO:1: WT1 peptide sequence

SEQ ID NO:2: Extracellular domain of HLA-A24 heavy chain amino acid sequence

SEQ ID NO:3: beta 2M amino acid sequence

SEQ ID NO:4: VH nucleic acid sequence

SEQ ID NO:5: VL nucleic acid sequence

SEQ ID NO:6: VH amino acid sequence

SEQ ID NO:7: VL amino acid sequence

SEQ ID NO:8: VH-CDR1 amino acid sequence

SEQ ID NO:9: VH-CDR2 amino acid sequence

SEQ ID NO:10: VH-CDR3 amino acid sequence

SEQ ID NO:11: VL-CDR1 amino acid sequence

SEQ ID NO:12: VL-CDR2 amino acid sequence

SEQ ID NO:13: VL-CDR3 amino acid sequence

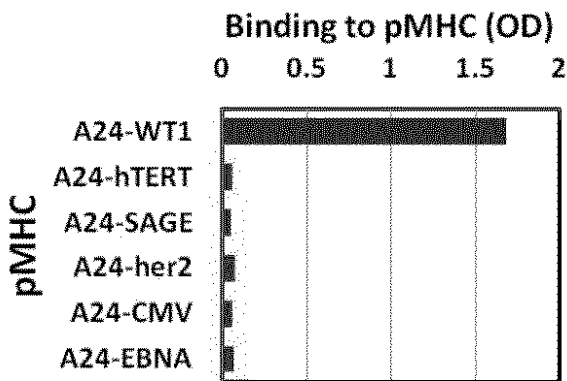
SEQ ID NO:14: F primer sequence

SEQ ID NO:15: R primer sequence

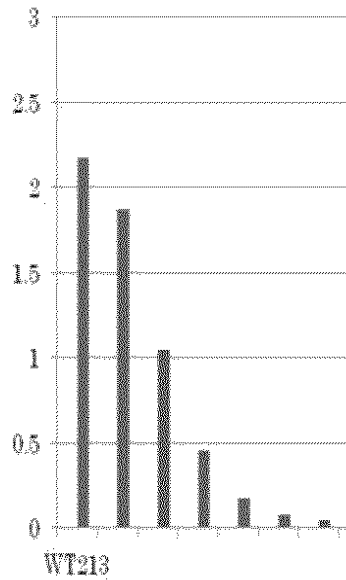
10

20

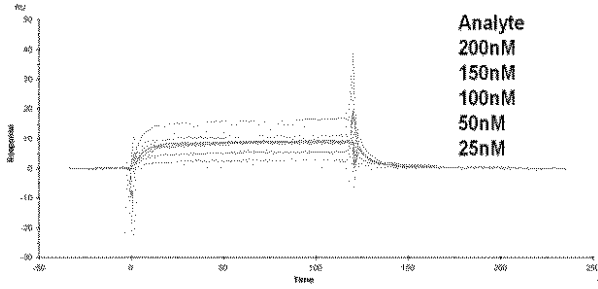
【図1】



【図2】

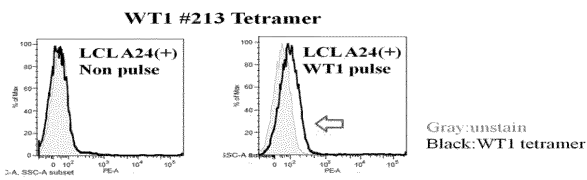


【 3 】

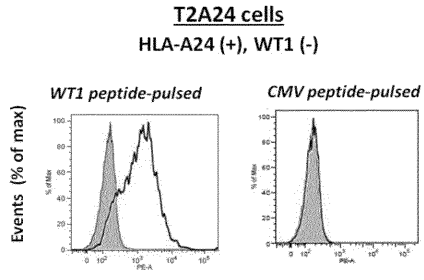


WT213pp-immob
WT1/HLA-A24ana 100nM
Ka Kd KD Chi
3.01e4 0.117 3.89e-6 0.0315

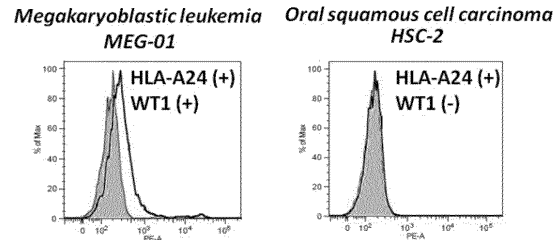
【 4 】



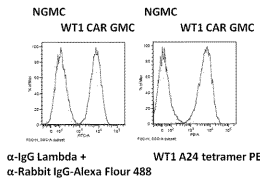
【 5 】



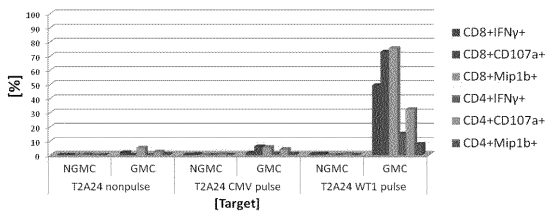
【 6 】



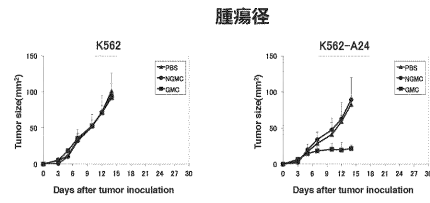
【 7 】



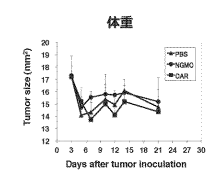
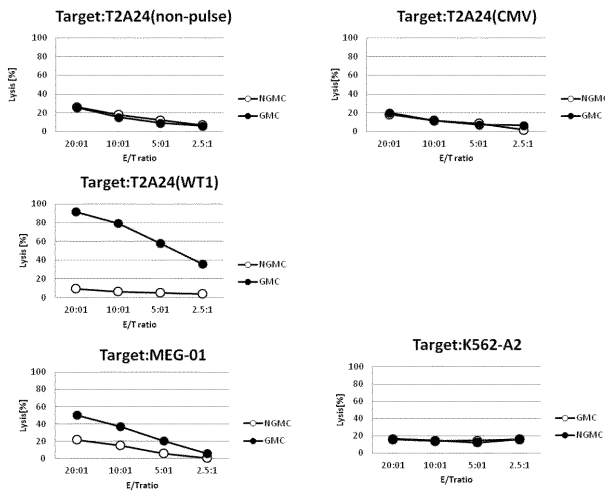
【 8 】



【 10 】



【 9 】



【配列表】

2016204358000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28		4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D	4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/12 (2015.01)		A 6 1 K 35/12		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19		
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		

(72)発明者 天石 泰典
滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内

(72)発明者 岡本 幸子
滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内

(72)発明者 峰野 純一
滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA61 CA01 DA02 DA03 DA06 EA02 EA03 EA04
FA02 FA10 GA11 GA12 GA13 GA14 HA08 HA09 HA11 HA17
4B064 AG27 CA19 CC24 CE06 CE12 DA01
4B065 AA93X AB01 BA01 CA25 CA44 CA46
4C084 AA13 NA14 ZB26
4C085 AA13 DD62 EE01
4C087 AA01 AA02 BB65 NA14 ZB26
4H045 AA11 CA41 DA50 DA75 EA20 EA51 FA74 GA21 GA23 GA26