

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4272535号  
(P4272535)

(45) 発行日 平成21年6月3日(2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/18 (2006.01)

C O 7 K 16/18

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

L

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

T

請求項の数 8 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-567383 (P2003-567383)  
 (86) (22) 出願日 平成15年2月11日 (2003.2.11)  
 (65) 公表番号 特表2005-521389 (P2005-521389A)  
 (43) 公表日 平成17年7月21日 (2005.7.21)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2003/000105  
 (87) 国際公開番号 W02003/068201  
 (87) 国際公開日 平成15年8月21日 (2003.8.21)  
 審査請求日 平成17年12月12日 (2005.12.12)  
 (31) 優先権主張番号 10/073,301  
 (32) 優先日 平成14年2月13日 (2002.2.13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504127647  
 テクニオン リサーチ アンド ディベロ  
 ップメント ファウンデーション リミテ  
 ッド  
 イスラエル国、ハイファ 32000、テ  
 クニオン シティ、 セネート ハウス  
 (74) 代理人 100103816  
 弁理士 風早 信昭  
 (74) 代理人 100120927  
 弁理士 浅野 典子  
 (72) 発明者 レイテル, ヨラム  
 イスラエル, 34 790 ハイファ,  
 ハシャーラヴ ストリート 20

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞受容体様特異性を有し、さらに高親和性の抗体ならびに癌、ウイルス感染、および自己免疫疾患の検出および治療でのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの産生方法  
 :

ヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I を発現する細胞を有する遺伝子操作された非ヒト哺乳動物を HLA 拘束性抗原 G9 - 209M と複合体形成された 1 本鎖 MHC クラス I ポリペプチドで免疫化する工程であって、前記 HLA 拘束性抗原は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなり、前記 1 本鎖 MHC クラス I ポリペプチドは、機能的ヒト MHC クラス I HLA - A2 重鎖アミノ酸配列のアミノ末端に共有結合された機能的ヒト - 2 ミクログロブリンアミノ酸配列を含む工程と、

前記非ヒト哺乳動物の抗体産生細胞から mRNA 分子を単離する工程と、

前記 mRNA 分子によってコードされるタンパク質分子をディスプレイするファージディスプレイライブラリーを産生する工程と、

前記ファージディスプレイライブラリーから少なくとも 1 つのファージを単離する工程であって、前記少なくとも 1 つのファージが前記ポリペプチドをディスプレイする工程。

【請求項 2】

前記非ヒト哺乳動物が自己 MHC クラス I 分子を欠く請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

免疫毒素の作製方法であって、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレームで毒素部分をコードする第 2 のポリ

ヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて前記免疫毒素を得る工程とを含む、免疫毒素の作製方法。

【請求項 4】

免疫標識の作製方法であって、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレームで同定可能な部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて前記免疫標識を得る工程とを含む、免疫標識の作製方法。

【請求項 5】

以下の工程を含む、細胞サンプル中の H L A 拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および / またはレベルの検出方法：

前記サンプルの細胞を、配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドと相互作用させる工程と、

前記相互作用をモニタリングして前記 H L A 拘束性抗原を提示する前記抗原提示細胞の存在および / またはレベルを検出する工程。

【請求項 6】

配列番号 8 に記載のヌクレオチド配列からなる単離ポリヌクレオチド。

【請求項 7】

配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含む単離タンパク質。

【請求項 8】

配列番号 9 に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、T 細胞受容体の特異性および高親和性を有する抗体、同定可能部分および / または治療部分とのその抱合体、前記抗体および抱合体の作製方法、前記抗体および抱合体をコードするポリヌクレオチド、ならびに癌、ウイルス感染、および自己免疫疾患の検出および治療における前記抱合体の使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞上の主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I 分子との複合体中の特異的ペプチドの発現は、癌および自己免疫疾患 ( 1 - 3 ) ならびにウイルス感染に関連することが示されている。癌では、ヒト腫瘍細胞がしばしば患者由来の細胞傷害性 T リンパ球 ( C T L ) によって認識される抗原を発現するという新規の十分に確立された所見からこれらのペプチドが発見された ( 1 - 5 ) 。

【0003】

さらに、腫瘍に対する免疫応答は腫瘍の後退に不十分であり、腫瘍細胞はこのような免疫攻撃の回避に有効な機構を発達させることができることが証明された ( 6 - 9 ) 。したがって、癌ペプチドワクチン、自家癌ワクチン、および癌 - 樹状細胞ハイブリッドワクチンを含む抗腫瘍免疫応答を増大させるための腫瘍ワクチン接種分野において多数のアプローチが開発されている ( 7 , 10 , 11 ) 。

【0004】

免疫応答の特異性がこれらのクラス I M H C - ペプチド複合体によって制御および指示されるので、正常な細胞には寛大でありながら癌細胞を消滅させるための標的としてこれらの非常に特異的且つ固有の分子細胞表面マーカーを使用することが可能なはずである。ウイルス感染細胞および自己免疫攻撃のための標的を提示する細胞を根絶させるために類似のアプローチに着手することができる。したがって、癌 / ウイルス / 自己免疫関連 M H C - ペプチド複合体に対する T 細胞抗原受容体 ( T C R ) の優れた固有の特異性を模倣

10

20

30

40

50

する可溶性形態の新規の分子を考察することが非常に望ましい。

【 0 0 0 5 】

1つの有望なアプローチは、T C Rと同一の特異性を有する癌細胞表面で発現するM H C - ペプチド複合体に結合する組換え抗体を作製することである。その後、これらの固有の抗体を、放射性同位体、細胞傷害薬、または毒素などの細胞傷害性エフェクター部分で武装することができる。例えば、癌細胞をターゲティングする抗体を、植物および細菌の両方由来の強力な毒素と遺伝的に融合し、それにより、組換え免疫毒素と呼ばれる分子を作製した( 1 2 )。

【 0 0 0 6 】

T細胞のM H C拘束性特異性を有する抗体は稀であり、B細胞は自己M H C拘束性を教育されないので従来のハイブリドーマ技術による作製が困難であった( 1 3 ~ 1 6 )。抗体ファージディスプレイテクノロジーの利点により、非常に定義されたエピトープに対する固有且つ稀な抗体のための巨大な抗体レパートリーを選択することも可能となる。ウイルスエピトープと複合体形成したマウスクラスI M H C H - 2 K<sup>k</sup>に対するT C R様拘束性抗体のファージディスプレイによる単離能力によってこれが証明された( 1 7 )。明らかに、マウスM H Cに指向するこの抗体は、ヒトの治療および診断で役に立たない。今までのところ、このグループによるヒトクラスI M H Cに対するT C R様拘束性抗体を開発する試みは失敗に終わっている。より最近では、H L A - A 1との複合体における黒色腫抗原M A G E - A 1と反応性を示す抗体が単離された；しかし、この抗体の親和性は低く、可溶性抗体としてではなくファージ上の多量体形態で発現した場合のみでこれを

【 0 0 0 7 】

したがって、上記制限のないヒトクラスI M H Cに対するT C R様拘束性抗体の必要性が広く認識されており、これを得ることは非常に有利である。

【 発明の開示 】

【 0 0 0 8 】

近年、多数の癌関連、ウイルス、および自己免疫関連M H C拘束性ペプチドが単離され、この高度に拘束された優れた特異性のために、これらは免疫療法および免疫診断における新規のアプローチのための望ましい標的である。T細胞抗原受容体と同一の特異性を有する癌関連、ウイルス、および自己免疫関連M H C - ペプチド複合体を認識することが

【 0 0 0 9 】

本発明の実施およびこのような固有の優れた特異性を有する例示的分子の作製のために、H L A - A 2トランスジェニックマウスを、黒色腫分化抗原g p 1 0 0由来の共通の抗原T細胞H L A - A 2拘束性エピトープと複合体形成した可溶性単鎖H L A - A 2で免疫化した。ファージディスプレイを使用して、g p 1 0 0由来エピトープに対して特徴的なT C R様結合特異性を示すが、T C Rと異なってナノモル範囲で親和性を示す高親和性組換えs c F v抗体を単離した。T C R様抗体は、抗原提示細胞表面上に発現した天然のM H C - ペプチド複合体を認識する。さらに、切断細菌毒素形態の非常に強力な細胞傷害性エフェクター分子に融合する場合、ペプチド依存性様式でT C R様特異性を有する抗原提示細胞を特異的に死滅させることができた。これらの結果は、最初に、ヒト癌T細胞エピトープに指向するT細胞の抗原特異的M H C拘束性特異性を有する高親和性ヒト組換え抗体を単離する能力を証明する。選択されたT C R様抗体は、腫瘍細胞表面上の特異的M H C - ペプチド複合体、抗原を提示する他の細胞、およびリンパ様組織の発現のモニタリングおよび視覚化ならびに免疫療法用の新規のターゲティング薬ファミリーの開発に有用である。

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明の１つの態様によれば、ＨＬＡ拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスⅠと２０ナノモル未満、好ましくは１０ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む単離分子を提供する。

【００１１】

下記の本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、単離分子は、抗体に抱合する同定可能な部分をさらに含む。

【００１２】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、単離分子は、抗体に抱合する治療部分をさらに含む。

【００１３】

１つの例では、抗体は、配列番号９に記載のアミノ酸配列を有する単鎖抗体である。

【００１４】

本発明の別の態様によれば、ＨＬＡ拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスⅠと２０ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む治療有効量の分子を含み、前記分子は前記抗体に抱合する治療部分をさらに含む薬学的組成物を提供する。好ましくは、薬学的組成物は、薬学的に許容可能なキャリアをさらに含む。

【００１５】

本発明のさらに別の態様によれば、ＨＬＡ拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスⅠと２０ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む分子を含み、前記分子は前記抗体に抱合した同定可能な部分をさらに含む診断組成物を提供する。

【００１６】

本発明のさらに別の態様によれば、ＨＬＡ拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスⅠと２０ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第１のポリヌクレオチドを含む単離分子を提供する。

【００１７】

１つの例では、第１のポリヌクレオチドは、配列番号９に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする。特定の例では、第１のポリヌクレオチドは、配列番号８に記載の核酸配列を有する。

【００１８】

下記の本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、単離分子は、第１のポリヌクレオチドに連結し、治療部分をコードする第２のポリヌクレオチドをさらに含む。

【００１９】

下記の本発明の好ましい実施形態における別の特徴によれば、請求項２４に記載の単離分子は、第１のポリヌクレオチドに連結し、同定可能な部分をコードする第２のポリヌクレオチドをさらに含む。

【００２０】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、同定可能な部分は、結合対のメンバーおよび標識からなる群から選択される。

【００２１】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、結合対のメンバーは抗原である。

【００２２】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、標識は、蛍光タンパク質および酵素からなる群から選択される。

【００２３】

本発明のさらなる態様によれば、ヒト主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）クラスⅠを発現する細胞を有する遺伝子操作された非ヒト哺乳動物をＨＬＡ拘束性抗原と複合体形成され

10

20

30

40

50

た可溶性形態のMHCクラスI分子で免疫化する工程と、非ヒト哺乳動物の抗体産生細胞からmRNA分子を単離する工程と、前記mRNA分子によってコードされるタンパク質分子をディスプレイするファージディスプレイライブラリーを産生する工程と、前記ファージディスプレイライブラリーから少なくとも1つのファージを単離する工程と、少なくとも1つの前記ファージがHLA拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIと10ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をディスプレイすることを含む、HLA拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体の産生方法を提供する。

【0024】

10

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、非ヒト哺乳動物は自己MHCクラスI分子を欠く。

【0025】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、HLA拘束性抗原は腫瘍HLA拘束性抗原である。

【0026】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、HLA拘束性抗原はウイルスHLA拘束性抗原である。

【0027】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、HLA拘束性抗原は自己免疫HLA拘束性抗原である。

20

【0028】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、可溶性形態のMHCクラスI分子は、機能的ヒトMHCクラスI重鎖アミノ酸配列に直接または間接的に共有結合した機能的ヒト - 2ミクログロブリンアミノ酸配列を含む単鎖MHCクラスIポリペプチドである。

【0029】

本発明のなおさらなる態様によれば、癌を特徴づける腫瘍HLA拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む治療有効量の分子を必要とする被験体に投与する工程を含む癌の治療方法であって、前記分子が抗体に抱合した治療部分をさらに含み、MHCクラスI分子が被験体の内因性MHCクラスIと適合するように選択される、癌の治療方法を提供する。

30

【0030】

本発明のなおさらなる態様によれば、ウイルス感染に起因するウイルスを特徴付けるウイルスHLA拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む治療有効量の分子を必要とする被験体に投与する工程を含むウイルス感染の治療方法であって、前記分子が抗体に抱合した治療部分をさらに含み、MHCクラスI分子が被験体の内因性MHCクラスIと適合するように選択される、ウイルス感染の治療方法を提供する。

40

【0031】

本発明のなおさらなる態様によれば、自己免疫HLA拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む治療有効量の分子を必要とする被験体に投与する工程を含む自己免疫疾患の治療方法であって、前記分子が抗体に抱合した治療部分をさらに含み、MHCクラスI分子が被験体の内因性MHCクラスIと適合するように選択される、自己免疫疾患の治療方法を提供する。

【0032】

下記の本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、MHCクラスI分子は、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、H

50

L A - A 3 1、H L A - A 3 3、H L A - A 3 4、H L A - B 7、H L A - B 4 5、および H L A - C w 8 からなる群から選択される。

【 0 0 3 3 】

記載の好ましい実施形態におけるなおさらなる特徴によれば、治療部分は、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、および二重特異性抗体部分からなる群から選択される。

【 0 0 3 4 】

本発明の別の態様によれば、H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレーションで毒素部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて免疫毒素を得る工程とを含む、免疫毒素の作製方法を提供する。

10

【 0 0 3 5 】

本発明の別の態様によれば、H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレーションで同定可能な部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて免疫標識を得る工程とを含む、免疫標識の作製方法を提供する。

20

【 0 0 3 6 】

本発明の別の態様によれば、サンプルの細胞を H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体と相互作用させる工程と、相互作用をモニタリングして H L A 拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および / またはレベルを検出する工程とを含む、細胞サンプル中の H L A 拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および / またはレベルの検出方法を提供する。

【 0 0 3 7 】

適用に依存して、H L A 拘束性抗原は、腫瘍 H L A 拘束性抗原、ウイルス H L A 拘束性抗原、および自己免疫 H L A 拘束性抗原からなる群から選択される。

30

【 0 0 3 8 】

本発明は、T細胞受容体特異性およびその抗原に対する高親和性を有する抗体を提供することならびに免疫療法および免疫診断におけるその使用による現在公知の構成要素の欠点に首尾よく取り組む。

【 0 0 3 9 】

図面の簡単な記述

本発明を、本明細書中で、例示のみを目的として添付の図面を参照して記載する。ここでは詳細な図面を参照して、示した個々の事項は本発明の好ましい実施形態の例示および例示的考察のみを目的とし、最も有用と考えられるものを示すことおよび本発明の原理および概念的局面的説明が容易に理解されるために示すことを強調する。これに関して、本発明の基本的理解に必要とされる以上により詳細に本発明の構造細部を示すことを意図せず、図面と共に示した説明により、どのようにして本発明のいくつかの形態を実際に実施することができるのかが当業者に明らかとなる。

40

図面において、

図 1 A - B は組換え s c H L A - A 2 - ペプチド複合体に対するポリクローナルファージ E L I S A を示す棒グラフを示す。プレートに、以下の実施例に記載の表示の s c M H C - ペプチド複合体でコートする。最初のライブラリーのポリクローナルファージ集団 ( L ) または各パニングラウンド後に溶出したファージ ( I - I V ) の結合を示す。図 1 A - p C A N T A B s c F v ライブラリー由来のファージ ; 図 1 B - s c F v - C B D ライブラリー由来のファージ。ビオチン化 s c M H C - ペプチド複合体を使用した E L I S

50

Aによって結合特異性研究を行った。ELISAプレート(Falco)に、BSA - ビオチン(1 µg / ウェル)で一晩コートし、洗浄し、ストレプトアビジン(1 µg / ウェル)とインキュベートし(室温で1時間)、再度十分に洗浄し、0.5 µgのMHC / ペプチド複合体とさらにインキュベートした(室温で1時間)。プレートをPBS / 2 % ミルクでブロックし(室温で30分間)、ファージクローン(約10<sup>9</sup>以下のファージ / ウェル、室温で1時間)または0.5 ~ 1 µgの可溶性scFvまたはscFv - PE38とインキュベートし、その後1000倍希釈のHRP抱合 / 抗M13、抗myc抗体、または抗PE抗体でそれぞれ洗浄した。特異性研究のために使用したHLA - A2拘束性ペプチドは、gp100(154) : KTWGQYWQV(配列番号1) ; gp100(209) : IMDQVPFSV(配列番号2) ; gp100(280) : YLEPGPVTV(配列番号3) ; MUC1 : LLLTVLTVL(配列番号4) ; HTLV - 1(TAX) : LLFGYPVYV(配列番号5) ; hTERT(540) : ILAKFLHWL(配列番号6) ; hTERT(865) : RLVD DFLLV(配列番号7)である。

図2A - BはscHLA - A2 / gp100複合体へのモノクローナルファージクローンの異なる結合を示す棒グラフを示す。gp100由来エピトープと複合体形成した固定化scHLA - A2への結合についてモノクローナルファージを試験した。図2A - G9 - 209M ; 図2B - G9 - 280V。上記図1に記載のようにアッセイを行った。

図3Aは抗体G1scFvの核酸配列(配列番号8)およびアミノ酸配列(配列番号9)を示す。CDRを太字で示し、VHおよびVLドメインに連結したペプチドリンカーに下線を引いている。

図3B - Cは精製G1scFvおよびG1scFv - PE38のSDS - PAGEを示す。G1scFv遺伝子を、PCRによってファージクローンからレスキューし、SfiI - NotIクローニング部位を介してファージミドベクターpCANTAB6にサブクローニングした。Mycおよびヘキサヒスチジンタグを、scFv遺伝子のC末端に融合した。以前に記載のように(29)BL21 DE3細胞中でscFv抗体を発現させ、金属イオンアフィニティクロマトグラフィによってペリプラズム画分から精製した。G1scFv - PE38融合タンパク質の発現のために、scFv遺伝子をNcoI - NotIフラグメントとしてPEの転位およびADP - リボシル化ドメイン(PE38)をコードするプラスミドpIB - NNにサブクローニングした。BL21 DE3細胞での発現、封入体からの再折りたたみ、およびG1scFv - PE38の精製を、以前に記載のように行った(30)。

図4はG1scFv - PE38の結合特異性を示す棒グラフである。免疫プレートに、記載のように種々の表示のscHLA - A2 - ペプチド複合体でコートし、固定化複合体へのG1scFv - PE38の結合を、抗PE抗体を使用して検出した。

図5A - BはTCR様G1scFvの結合特性を証明するプロットを示す。5A - 精製された可溶性G1scFvの滴定ELISA。ウェルに以下の1実施例に記載のMHC - ペプチド複合体をコートした。5B - 精製されたG1scFv - PE38のHLA - A2 / G9 - 209M複合体への125I標識G1scFv - PE38の結合を阻害する能力の競合結合分析。組換えscFvの見かけ上の結合親和性を、<sup>125</sup>I標識トレーサーの結合の50%阻害に必要な競合物質(可溶性精製G1scFv - PE38)の濃度として決定した。可撓性ELISAプレートにBSA - ビオチンをコートし、scMHC - ペプチド複合体(100 µl中10 µg)を以前に記載のように固定した。組換えG1scFv - PE38を、Bolt on - Hunter 試薬を使用して[<sup>125</sup>I]で標識した。標識タンパク質を、競合物質として漸増濃度の冷G1scFv - PE38の存在下でトレーサーとしてウェルに添加し(3 ~ 5 × 10<sup>5</sup> CPM / ウェル)、PBS中にて室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSで完全に洗浄し、結合放射能をカウンターで決定した。G1scFv - PE38の見かけ上の親和性を、固定scMHC - ペプチド複合体への[<sup>125</sup>I]標識G1scFv - PE38結合の50%阻害の達成に必要な競合物質濃度の推定によって決定した。非特異的結合を、20 ~ 40倍過剰の非標識Fabの添加によって決定した。

10

20

30

40

50

図6A-CはG1 s c F vのAPCへの結合を証明するプロットを示す。RMAS-HHDまたはJY細胞を、表示のHLA-A2拘束性ペプチドと共に負荷した。次いで、ペプチド負荷細胞を、可溶性精製G1 s c F v抗体とインキュベートした。FITC標識抗My cを使用して結合を検出した。PMAS-HHD細胞をG9-209およびG9-280ペプチドと共に負荷し、コントロール非負荷細胞である抗HLA抗体w6/32(6A)または抗HLA-A2抗体BB7.2(6B)と共に染色して、負荷したペプチド表面でHLA-A2複合体の安定化/発現が証明されたが、ペプチド非負荷細胞では証明されなかった。G9-209またはG9-208ペプチド負荷細胞をG1 s c F vで染色し、分染を示す(6C)。単鎖 2M-HLA-A2遺伝子(26)またはEBV形質転換Bリンパ芽球JY細胞( $10^6$ 細胞)でトランスフェクトしたB細胞株RMAS-HHDを無血清RPMIで2回洗浄し、 $100\mu\text{M}$ のペプチドを含む培地中にて26 または37 でそれぞれ一晩インキュベートした。その後、APCを37 で2~3時間インキュベートしてMHC-ペプチド複合体の細胞表面発現を安定化し、その後 $100\mu\text{l}$ の組換えs c F v( $10\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、60~90分間、4 )とインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、FITC標識抗My c抗体とインキュベートし(30~45分間、4 )、最後に洗浄してFACSstarフローサイトメーター(Becton Dickinson)で分析した。黒色腫細胞に、37 で $1\sim 10\mu\text{M}$ のペプチドをパルスし、本明細書中に記載のようにs c F vで染色した。

10

図7A-Cはペプチド負荷APCに対するG1 s c F v-PE38の細胞傷害活性を証明するプロットおよび棒グラフである。RMAS-HHD(7A)またはJY(7B)細胞を、表示のHLA-A2拘束性ペプチドと共に負荷し、その後漸増濃度のG1 s c F v-PE38とインキュベートした。細胞タンパク質への $^3\text{H}$ -ロイシン取り込みによってタンパク質合成を決定した。(7C)では、過剰( $0.15\sim 0.25\text{mg}/\text{ml}$ )の表示のs c HLA-A2-ペプチド複合体をウェルに添加し、その後G1 s c F v-PE38( $25\sim 50\text{ng}/\text{ml}$ )を添加した。上記のように、RMAS-HHDおよびJY APCをG9-209ペプチドおよびコントロールペプチドと共に負荷した。その後、ペプチド負荷細胞を漸増濃度のG1 s c F v-PE38とインキュベートし、以前に記載のように(30)細胞タンパク質の $^3\text{H}$ -ロイシン取り込みの測定によってタンパク質合成阻害を決定した。タンパク質合成の50%阻害に必要なG1 s c F v-PE38濃度として $\text{IC}_{50}$ を決定した。競合アッセイでは、過剰の特異的および非特異的HLA-A2-ペプチド複合体( $35\sim 50\mu\text{g}/\text{ウェル}$ )を15分間ウェルに添加し、その後G1 s c F v-PE38を添加した。

20

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0040】

本発明は、T細胞受容体の特異性および高親和性を有する抗体、免疫毒素および免疫標識を作製するための同定可能部分および/または治療部分とのその抱合体、前記抗体および抱合体の作製方法、前記抗体および抱合体をコードするポリヌクレオチド、ならびに癌、ウイルス感染、および自己免疫疾患の検出および治療における前記抱合体の使用方法に関する。

【0041】

40

本発明の原理および操作は、図面および添付の説明を参照してより深く理解することができる。

【0042】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は以下の説明に記載されるか実施例で例示される詳細にその適用が制限されないと理解すべきである。本発明は、他の実施形態が可能であるか、種々の方法で実施または実行することができる。また、本明細書中で使用した用語および専門用語は説明を目的とし、制限と見なすべきではないと理解すべきである。

【0043】

免疫系は、ペプチド/主要組織適合性複合体(MHC)分子を特異的に認識するT細胞

50



受容体 ( T C R ) によって調節および制御される。

【 0 0 4 4 】

組換えクラス I M H C - ペプチド複合体およびその四量体アレイの適用の出現により、現在、抗原特異的 T 細胞の稀な集団を検出および研究することができる ( 2 5 , 3 5 , 3 6 ) 。しかし、抗原 ( M H C - ペプチド ) 提示の表現型 ( 別の見方では、 M H C - ペプチド - T C R 相互作用 ) の分析が可能な試薬の欠如のために、一般的な免疫学における基本的問題および抗原提示に関する特定の腫瘍免疫学における問題は未解決である。このような試薬を作製する 1 つの方法は、 T C R 様抗体の作製によるが、ハイブリドーマテクノロジーなどの従来の手段による自己 M H C 拘束性抗体の作製に関する刊行物はほんの僅かしか報告されていない ( 1 3 - 1 6 ) 。これらの過去の困難の主な理由を、 M H C - ペプチド複合体の分子の性質および解析された構造において見出すことができる。より詳細には、ペプチドは M H C 結合溝内に深く埋もれ、それにより M H C 残基と混ざりあったペプチド残基の広範なモザイクとして現れている。 1 0 0 ~ 3 0 0 <sup>2</sup> しか外側に面していないクラス I M H C 結合ペプチドを直接認識に利用可能であり、抗体認識タンパク質分子は約 8 0 0 <sup>2</sup> のそのリガンドと結合する ( 1 7 ) 。したがって、 T C R 様抗体を作製する場合、これらの分子はおそらくペプチドを認識するが、 M H C にも支配されなければならない。

10

【 0 0 4 5 】

これまで、種々の免疫化ストラテジーを使用してマウス M H C - ペプチド複合体に対して T C R 様特異性を有する抗体が作製されている ( 1 7 ) 。最近、巨大なヒト F a b ライブラリーを使用して、 H L A - A 1 - M A G E - A 1 特異的結合抗体が選択された ( 1 8 ) 。 T C R 様特異性を示すが 2 5 0 n M の比較的低い親和性を示す 1 つの特異的クローンである G 8 が選択された。

20

【 0 0 4 6 】

本発明の実施により、マウス s c F v フラグメントの免疫レパートリーからヒト T 細胞エピトープに指向する高親和性抗体を選択する能力を証明した。

【 0 0 4 7 】

本発明の態様によれば、 H L A 拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体の産生方法を提供する。本発明のこの態様による方法を、 ( i ) ヒト主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I を発現する細胞を有する遺伝子操作された非ヒト哺乳動物を H L A 拘束性抗原と複合体形成された可溶性形態の M H C クラス I 分子で免疫化することと、 ( i i ) 非ヒト哺乳動物の抗体産生細胞 ( 脾臓細胞など ) から m R N A 分子を単離することと、 ( i i i ) 前記 m R N A 分子によってコードされるタンパク質分子をディスプレイするファージディスプレイライブラリーを産生することと、 ( i v ) 前記ファージディスプレイライブラリーから少なくとも 1 つのファージを単離することと、少なくとも 1 つの前記ファージが H L A 拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I と 1 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をディスプレイすることとによって行う。次いで、本明細書中の以下にさらに記載のように、ファージ単離物の遺伝物質を使用して単鎖抗体または他の抗体形態を調製した。以下にさらに記載のようにファージ単離物の遺伝物質を使用して単鎖抗体または他の抗体形態を調製し、認識可能部分または治療部分に抱合する。好ましくは、非ヒト哺乳動物は、自己 M H C クラス I 分子を欠く。さらに好ましくは、 M H C I 分子の可溶性形態は、機能的ヒト M H C クラス I 重鎖アミノ酸配列に直接または間接的に共有結合した機能的ヒト - 2 ミクログロブリンアミノ酸配列を含む単鎖 M H C クラス I ポリペプチドである。

30

40

【 0 0 4 8 】

したがって、本発明の別の態様によれば、 H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む単離分子を提供する。このような抗体は、なおさらに高い T 細胞受容体特異性を有する。 1 つの非限定的な例では、抗体は、例えば、配列番号 8 に記

50

載のポリヌクレオチドによってコードされる配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有する単鎖抗体である。

【 0 0 4 9 】

一旦本明細書中に記載の T 細胞受容体特異性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドがクローン化されると、関連産物のスペクトルを得るための多数の方法の 1 つにおいて改変することができる。

【 0 0 5 0 】

1 つの例では、同定可能な部分に抱合した T 細胞受容体特異性を有する抗体（免疫標識）を産生するために、T 細胞受容体特異性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドを同定可能な部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドにライゲーションする。このような抱合体または免疫標識を、細胞サンプル中の H L A 拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および / またはレベルの検出方法で使用し、癌、ウイルス感染、または自己免疫疾患に使用することができる。本明細書中で使用される、語句「抗原提示細胞」には、H L A 拘束性抗原を提示することができるその表面上に M H C クラス I 分子を発現する全ての細胞が含まれる。抗原提示細胞は、癌細胞、免疫系の細胞、またはその表面上に M H C クラス I 分子を発現する任意の他の細胞であり得る。

【 0 0 5 1 】

したがって、本発明の別の態様によれば、H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（M H C）クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレイムで同定可能な部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて免疫標識を得る工程とを含む、免疫標識の作製方法を提供する。

【 0 0 5 2 】

さらに、本発明のさらに別の態様によれば、サンプルの細胞を H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（M H C）クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体と相互作用させる工程と、相互作用をモニタリングして H L A 拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および / またはレベルを検出する工程とを含む、細胞サンプル中の H L A 拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および / またはレベルの検出方法を提供する。

【 0 0 5 3 】

適用に依存して、H L A 拘束性抗原は、腫瘍 H L A 拘束性抗原、ウイルス H L A 拘束性抗原、および自己免疫 H L A 拘束性抗原（例を以下に記載する）であり得る。

【 0 0 5 4 】

本発明のさらに別の態様によれば、H L A 拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体（M H C）クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含み、前記分子は前記抗体に抱合した同定可能部分をさらに含む診断組成物を提供する。

【 0 0 5 5 】

同定可能部分は、さらなる結合対のメンバーとのその相互作用を介して同定可能な結合対のメンバーおよび直接視覚化される標識であり得る。1 つの例では、結合対のメンバーは、対応する標識化抗体によって同定される抗原である。1 つの例では、標識は、蛍光タンパク質または比色反応を示す酵素である。

【 0 0 5 6 】

別の例では、T 細胞受容体特異性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドに治療部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドをライゲーションして、治療部分に抱合した T 細胞受容体特異性を有する抗体を産生する。このような抱合体または免疫毒素を、癌、ウイルス感染、または自己免疫疾患の治療方法で 사용할 ことができる。

【 0 0 5 7 】

したがって、本発明の別の態様によれば、H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主

10

20

30

40

50

要組織適合性複合体 (MHC) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレーションで毒素部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて免疫毒素を得る工程とを含む、免疫毒素の作製方法を提供する。

【0058】

免疫毒素を以下の治療プロトコールの任意の 1 つで使用することができる。

【0059】

(i) 癌を特徴づける腫瘍 HLA 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む有効量の分子を必要とする被験体に投与する工程と、前記分子が抗体に抱合した治療部分をさらに含み、被験体の内因性 MHC クラス I と適合する MHC クラス I 分子が選択されることとを含む、癌の治療方法。

10

【0060】

(ii) ウイルス感染に起因するウイルスを特徴付けるウイルス HLA 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む有効量の分子を必要とする被験体に投与する工程と、前記分子が抗体に抱合した治療部分をさらに含み、被験体の内因性 MHC クラス I と適合する MHC クラス I 分子が選択されることとを含む、ウイルス感染の治療方法。

20

【0061】

(iii) 自己免疫 HLA 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む有効量の分子を必要とする被験体に投与する工程と、前記分子が抗体に抱合した治療部分をさらに含み、被験体の内因性 MHC クラス I と適合する MHC クラス I 分子が選択されることとを含む、自己免疫疾患の治療方法。

【0062】

本発明の別の態様によれば、HLA 拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む治療有効量の分子を含み、前記分子は前記抗体に抱合する治療部分をさらに含む薬学的組成物を提供する。好ましくは、薬学的組成物は、薬学的に許容可能なキャリアをさらに含む。

30

【0063】

治療部分は、例えば、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、および二重特異性抗体部分 (その例を以下に示す) であり得る。

【0064】

全ての適用では、MHC クラス I は、例えば、HLA - A 2、HLA - A 1、HLA - A 3、HLA - A 2 4、HLA - A 2 8、HLA - A 3 1、HLA - A 3 3、HLA - A 3 4、HLA - B 7、HLA - B 4 5、および HLA - C w 8 であり得る。

【0065】

以下の節は、本明細書中に記載の本発明のそれぞれの種々の態様についての特定の例および代替物を提供する。本発明を類似の、さらにいくらか異なる方法で実施することができるので、これらの例および代替物は、決して制限と見なすべきではない。しかし、これらの例は、当業者に本発明の種々の変更形態および実施形態をどのようにして実施するのかを教示する。

40

【0066】

抗体：本発明を説明するために使用される、用語「抗体」には、インタクトな分子ならびに HLA 拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I に特異的且つ高親和性で結合することができるその機能的フラグメント (Fab、Fab' )<sub>2</sub>、Fv、および scFv など) が含まれる。これらの機能的抗体フラグメントは、

50

以下のように定義される：(i) Fab (抗体分子の1価の抗原結合フラグメントを含み、全抗原の酵素パパイソンの消化によってインタクトな軽鎖および1つの重鎖の一部を得ることができるフラグメント)；(ii) Fab' (ペプシンでの全抗体の処理によって得ることができ、その後還元によってインタクトな軽鎖および重鎖の一部が得られる抗体分子のフラグメント)；(iii) F(ab')<sub>2</sub> (全抗体を酵素ペプシンで処置しその後還元しないで得ることができる抗体のフラグメント)；F(ab')<sub>2</sub> は2つのジスルフィド結合によって互いに保持された2つのFab'フラグメントの二量体である；(iv) Fv (2つの鎖として発現した軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝子操作されたフラグメントとして定義される)；および(c) scFvまたは「単鎖抗体」(「SCA」) (遺伝的に融合された単鎖分子として適切なポリペプチドリンカーによって連結された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝子操作された分子)。

10

## 【0067】

これらのフラグメントの作製方法は、当該分野で公知である(例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1998 (本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。

## 【0068】

抗体のタンパク質分解作用による加水分解またはフラグメントをコードするDNAのE. coliもしくは哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養物または他のタンパク質発現系)での発現によって本発明の抗体フラグメントを調製することができる。

20

## 【0069】

従来の方法による全抗体のペプシンまたはパパイソンの消化によって抗体フラグメントを得ることができる。例えば、F(ab')<sub>2</sub> と呼ばれる5Sフラグメントを得るためのペプシンでの抗体の酵素切断によって抗体フラグメントを産生することができる。このフラグメントをチオール還元剤を使用してさらに切断し、任意選択的にジスルフィド結合の切断に起因するスルフヒドリル基のために基をブロックして3.5SFab'の1価のフラグメントを得ることができる。あるいは、ペプシンを使用した酵素切断により、2つの1価のFab'フラグメントおよびFcフラグメントが直接得られる。これらの方法は、例えば、Goldenbergに付与された米国特許第4036945号および同第4331647号ならびにこれらに含まれる引例(特許全体が本明細書中で参考として援用される)に記載されている。Porter, R. R., Biochem. J., 73: 119-126, 1959もまた参照のこと。フラグメントがインタクトな抗体によって認識される抗原に結合する限り、1価の軽鎖-重鎖フラグメントを形成するための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、または他の酵素、化学、もしくは遺伝的技術などの他の抗体切断方法もまた使用することができる。

30

## 【0070】

Fvフラグメントは、V<sub>H</sub>鎖とV<sub>L</sub>鎖との結合を含む。Inbar et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 69: 2659-62, 1972に記載のように、この結合は非共有結合であり得る。あるいは、グルタルアルデヒドなどの化学物質による分子間ジスルフィド結合または架橋によって可変鎖を連結することができる。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリンカーによって連結されたV<sub>H</sub>鎖およびV<sub>L</sub>鎖を含む。これらの単鎖抗原結合タンパク質(sFv)を、オリゴヌクレオチドによって連結したV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子の構築によって調製する。構造遺伝子を発現ベクターに挿入し、その後E. coliなどの宿主細胞に移入する。組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを含む1つのポリペプチド鎖を合成する。sFvの産生方法は、例えば、Whitlow and Filpula, Methods, 2: 97-105, 1991; Bird et al., Science 242: 423-426, 1988; Pack et al., Bio/Technology 11: 1271-77, 1993; およびLadne

40

50

ret al. に付与された米国特許第 4946778 号（その全体が本明細書中で参考として援用される）に記載されている。

【0071】

抗体フラグメントの別の形態は、1つの相補性決定領域（CDR）をコードするペプチドである。目的の抗体の CDR をコードする遺伝子の構築によって CDR ペプチド（「最小認識単位」）を得ることができる。このような遺伝子を、例えば、抗体産生細胞の RNA 由来の可変領域を合成するためのポリメラーゼ連鎖反応の使用によって調製する。例えば、Larrick and Fry, Methods, 2:106-10, 1991 を参照のこと。

【0072】

非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、免疫グロブリンのキメラ分子、免疫グロブリン鎖、または非ヒト免疫グロブリン由来の模倣配列を含むそのフラグメント（Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、または抗体の他の抗原結合サブシーケンスなど）である。ヒト化抗体には、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来の残基を所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）の CDR 由来の残基に置換したヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が含まれる。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンの Fv フレームワーク残基を、対応する非ヒト残基に置換する。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体や導入された CDR またはフレームワーク配列のいずれにも見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、実質的に全ての少なくとも 1 つ、典型的には 2 つの可変ドメインを含み、全てまたは実質的に全ての CDR 領域は非ヒト免疫グロブリンの CDR 領域に対応し、全てまたは実質的に全ての FR 領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の FR 領域である。

【0073】

ヒト化抗体はまた、任意選択的に、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含む [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

【0074】

非ヒト抗体のヒト化方法は当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源由来のアミノ酸残基に移入された 1 つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば導入残基と呼ばれ、典型的には導入可変ドメインから得られる。げっ歯類 CDR または CDR 配列のヒト抗体の対応する配列への置換による Winter and co-workers (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)) の方法に従ってヒト化を本質的に行うことができる。したがって、このようなヒト化抗体は、実質的にインタクト未満のヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列に置換されたキメラ抗体（米国特許第 4816567 号）である。実際、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの CDR 残基およびおそらくいくつかの FR 残基がげっ歯類抗体中の類似の部位由来の残基に置換されたヒト抗体である。

【0075】

当該分野で公知の種々の技術（ファージディスプレイライブラリーを含む）を使用してヒト抗体を産生することもできる [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]。ヒトモノクローナル抗体の調製のための Cole et al. and Boerner et al. の技術も利用可能である (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) およ

び Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991) ]。同様に、トランスジェニック動物(例えば、外因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されているマウス)へのヒト免疫グロブリン遺伝子座の移入によってヒトを作製することができる。攻撃誘発時に、遺伝子の再配置、構築、および抗体レパートリーを含むあらゆる点でヒトで認められる非常に類似しているヒト抗体産生が認められている。このアプローチは、例えば、米国特許第 5545807 号、同第 5545806 号、同第 5569825 号、同第 5625126 号、同第 5633425 号、同第 5661016 号、および以下の科学刊行物: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995) に記載されている。

10

#### 【0076】

一旦抗体の CDR が同定されると、従来の遺伝子操作技術を使用して、本明細書中に記載の抗体の任意の形態またはフラグメントをコードする発現可能なポリヌクレオチドを考案することができることが認識される。

#### 【0077】

20

主要組織適合性複合体(MHC)クラスI: ヒト主要組織適合性複合体(MHC)は、マウスおよびヒトでのHLAにおいて集合的にH-2と呼ばれる連結した遺伝子座群によってコードされる抗原の複合体である。2つの主要なMHC抗原クラス(クラスIおよびクラスII)は、それぞれ組織型および移植片の適合性の決定で役割を果たす一組の細胞表面糖タンパク質を含む。移植反応では、細胞傷害性T細胞(CTL)は主に外来のクラスI糖タンパク質に応答し、ヘルパーT細胞は主に外来のクラスII糖タンパク質に応答する。

#### 【0078】

主要組織適合性複合体(MHC)クラスI分子は、ほぼ全ての細胞表面で発現される。これらの分子は、T細胞受容体との相互作用を介した主に内因性に合成されたタンパク質由来のペプチドのCD8+T細胞への提示において機能する。クラスIMHC分子は、12kDa軽鎖-2ミクログロブリンと非共有結合した46kDa重鎖から構成されるヘテロ二量体である。ヒトでは、例えば、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45、およびHLA-Cw8などのいくつかのMHCハプロタイプが存在し、その配列は、<http://immuno.bme.nwu.edu/kabbat> データベース(本明細書中で参考として援用される)で見出すことができる。

30

#### 【0079】

クラスI MHC分子に結合するペプチド; HLA拘束性抗原: 典型的には8~10アミノ酸長のクラスI MHC拘束性ペプチド(本明細書中で交換可能にHLA拘束性抗原、HLA拘束性ペプチド、MHC拘束性抗原ともいう)は、MHC分子中の対応する結合ポケットと相互作用する2つまたは3つのアンカー残基を介して重鎖1-2溝に結合する。-2ミクログロブリン鎖は、MHCクラスI細胞内輸送、ペプチド結合、および高次構造の安定性において重要な役割を果たす。ほとんどのクラスI分子について、MHCクラスI重鎖、ペプチド(自己または抗原)、および-2ミクログロブリンからなるヘテロ二量体の形成は、生合成の成熟および細胞表面発現に必要である。

40

#### 【0080】

クラスI MHC分子へのペプチドの結合における研究により、潜在的に免疫原性のウイルス、腫瘍、および自己抗原由来のペプチドのディスプレイで機能的な特異的MHCモ

50

チーフを定義することができ、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）からの特異的応答を誘発することができる。

【0081】

本明細書中で使用される、用語「ペプチド」は、天然のペプチド（分解産物または合成ペプチドのいずれか）、さらに、例えば、ペプチドをより安定にする一方で体内ではより高い免疫原性を示す改変を有し得るペプチドアナログであるペプトイドおよびセミペプトイドなどのペプチド模倣物をいう。このような改変には、環状化、N末端修飾、C末端修飾、ペプチド結合修飾（ $\text{CH}_2 - \text{NH}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{S}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{S} = \text{O}$ 、 $\text{O} = \text{C} - \text{NH}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{O}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$ 、 $\text{S} = \text{C} - \text{NH}$ 、 $\text{CH} = \text{CH}$ 、または $\text{CF} = \text{CH}$ が含まれるが、これらに限定されない）、骨格修飾、および残基修飾が含まれるが、これらに限定されない。ペプチド模倣物の調製方法は当該分野で周知であり、Quantitative Drug Design, C. A. Ramsden Gd., Chapter 17.2、F. Choplin Pergamon Press (1992)（本明細書中に完全に記載されているように参考として援用される）に記載されている。これに関するさらなる詳細を以下に示す。

10

【0082】

本明細書中および以下の特許請求の範囲で使用される、用語「アミノ酸」は、20種の天然に存在するアミノ酸（これらのアミノ酸はしばしば *in vivo* で翻訳後に修飾される（例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリン、およびホスホトレオニンが含まれる）；ならびに他の例外的なアミノ酸（2-アミノアジピン酸、ヒドロキシリジン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシン、およびオルニチンが含まれるが、これらに限定されない）を含むと理解される。さらに、用語「アミノ酸」には、D型およびL型アミノ酸が含まれる。本発明で使用可能なアミノ酸のさらなる詳細およびMHC-I HLA-A2認識可能なペプチド抗原で有用な非天然アミノ酸の例を、以下に記載する。

20

【0083】

蓄積された実験データに基づいて、現在、タンパク質のどのペプチドがMHCクラスIに結合するかを予想することが可能である。HLA-A2 MHCクラスIは、現時点では、他のHLAハプロタイプよりも良好に特徴付けられており、さらに予想および/または散発的データは、全ての他のハプロタイプで利用可能である。

30

【0084】

HLA-A2結合ペプチドに関して、9量体ペプチド中以下の位置を仮定する：

P1 - P2 - P3 - P4 - P5 - P6 - P7 - P8 - P9。

【0085】

P2およびP2の位置は、MHC分子への結合に関与する主な残基であるアンカー残基を含む。P2位およびP9位で結合するアミノ酸残基は、親水性脂肪族非電荷天然アミノ酸（例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Gln、Thr、Ser、Cys、好ましくはValおよびLeu）または非天然親水性脂肪族非電荷アミノ酸（例えば、ノルロイシン（Nle）、ノルバリン（Nva）、 $\alpha$ -アミノ酪酸）である。P1位およびP3位は、MHC分子への結合に関与するか補助するアミノ酸残基を含むことも公知であるが、これらの位置は、天然または非天然のアミノ酸を含むことができる。他の位置は、典型的には、結合に関与しないアミノ酸残基によって結合され、むしろこれらの残基は免疫細胞に提示される。MHC分子へのペプチドの結合に関するさらなる詳細を、Parker, K. C., Bednarek, M. A., Coligan, J. E., Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J Immunol. 152, 163-175, 1994（とくに、表Vを参照のこと）に見出すことができる。したがって、[http://www.bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla\\_bind/index.html](http://www.bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html)のワールドワイドウェブインターフェースからアプローチ可能なHLAペプチド結合推定ソフトウェアを使用してHLA-A2、

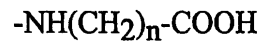
40

50

1 結合ペプチドをスコアリングすることができる。このソフトウェアは、ペプチド中の全アミノ酸の寄与による MHC - HLA - A2 . 1 への結合可能性についての分析タンパク質中の全ての可能なペプチドの蓄積データおよびスコアに基づく。理論的結合スコアは、HLA - A2 . 1 - ペプチド複合体の計算された半減期を示す。

#### 【0086】

P2 および P9 での親水性脂肪族天然アミノ酸を、合成アミノ酸（好ましくは、Nle、Nva1、および/または - アミノ酪酸）に置換することができる。P9 を、一般式 -HN(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH（式中、n = 3 ~ 5）の脂肪族アミノ酸ならびにその分岐誘導体（



（式中、R は、例えば、任意の 1 つまたは複数の n 炭素に存在するメチル、エチル、またはプロピルである）などが含まれるが、これらに限定されない）に置換することもできる。

#### 【0087】

アミノ末端残基（P1 位）を、正電荷の脂肪族カルボン酸（H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH（式中、n = 2 ~ 4）および H<sub>2</sub>N - C(NH) - NH(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>COOH（式中、n = 2 ~ 3）などであるが、これらに限定されない）ならびにヒドロキシリジン、N - メチルリジン、またはオルニチン（Orn）に置換することができる。さらに、アミノ末端残基を、拡大した芳香族残基（H<sub>2</sub>N - (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) - CH<sub>2</sub> - COOH、p - アミノフェニルアラニン、H<sub>2</sub>N - F(NH) - NH - (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) - CH<sub>2</sub> - COOH、p - グアニジノフェニルアラニン、またはピリジノアラニン（Pal）などであるが、これらに限定されない）に置換することができる。これらの後者の残基は、MHC - 1 N 末端結合ポケットでチロシン残基の OH<sup>-</sup> 部分と水素結合を形成すると同時に芳香族 - 芳香族相互作用を得ることができる。

#### 【0088】

P4 - P8 位でのアミノ酸残基の誘導により、これらの残基（Ser、Tyr、Lys、Cys または Orn など）は、OH、SH、または NH<sub>2</sub> などの側鎖を有するはずであり、アルキル、アリール、アルカノイル、またはアロイルにより得る。さらに、これらの位置での OH 基もまた、リン酸化および/またはグリコシル化によって誘導することができる。これらの誘導は、いくつかの場合、T 細胞受容体への結合を増強することが示されている。

#### 【0089】

第 2 のアンカーアミノ酸が P10 位に存在するより長い誘導体は、P9 にほとんどの L 型アミノ酸を含み得る。いくつかの場合、C 末端の酸が第 2 のアンカー残基として作用するより短い誘導体もまた適用可能である。

#### 【0090】

環状アミノ酸誘導体は、P4 位 ~ P8 位、好ましくは P6 位および P7 位で結合することができる。例えば、鎖中の種々の位置での Glu、Asp、Lys、Orn、ジアミノ酪酸（Dab）、ジアミノプロピオン酸（Dap）の組み込みによるアミド結合（-CO - NH 結合または -NH - CO 結合）の形成によって環状化することができる。式 H - N((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - COOH) - C(R)H - COOH または H - N((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - COOH) - C(R)H - NH<sub>2</sub>（n = 1 ~ 4、さらに、R はアミノ酸の任意の天然または非天然側鎖である）の修飾アミノ酸の組み込みによって、骨格 - 骨格環状化を得ることができる。

#### 【0091】

2 つの Cys 残基の組み込みによる S - S 結合形成を介した環状化も可能である。例え

10

20

30

40

50



ば、CysまたはホモCysの組み込みおよび例えばブロモアセチル化Lys、Orn、Dab、またはDapとその遊離SH基の反応による式 $-(-CH_2-)_n-S-CH_2-C-$ (式中、 $n=1$ または $2$ )の相互作用結合の形成によって側鎖環状化にさらなる側鎖を得ることができる。

【0092】

ペプチド内のペプチド結合 $(-CO-NH-)$ を、Nメチル化結合 $(-N(CH_3)-CO-)$ 、エステル結合 $(-C(R)H-CO-O-C(R)-N-)$ 、ケトメチレン結合 $(-CO-CH_2-)$ 、 $\alpha$ -アザ結合 $(-NH-N(R)-CO-)$ (式中、Rは、任意のアルキル(例えば、メチル))、カルバ結合 $(-CH_2-NH-)$ 、ヒドロキシエチレン結合 $(-CH(OH)-CH_2-)$ 、チオアミド結合 $(-CS-NH-)$ 、オレフィン二重結合 $(-CH=CH-)$ 、レトロアミド結合 $(-NH-CO-)$ 、ペプチド誘導体 $(-N(R)-CH_2-CO-)$ (式中、Rは、炭素原子上に天然に存在する「通常の」側鎖である)に置換することができる。

10

【0093】

これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った任意の結合で起こり、これは数個(2~3個)同時に起こり得る。好ましくは、全ての場合で必要ではないが、これらの修飾はアンカーアミノ酸を排除すべきである。

【0094】

天然の芳香族アミノ酸(Trp、Tyr、およびPhe)を、TIC、ナフチルアミン(Nol)、Pheの環メチル化誘導体、Pheのハロゲン化誘導体、またはo-メチル-Tyrなどの合成非天然酸に置換することができる。

20

【0095】

腫瘍HLA拘束性抗原：以下の表で引用された引例は、ヒトMHCクラスI、腫瘍関連抗原(TAA)由来の腫瘍HLA拘束性ペプチド、または種々の癌と結合したタンパク質マーカーを提供する。腫瘍関連抗原(TAA)由来のさらなる腫瘍HLA拘束性ペプチドは、<http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/>で見出すことができる。

【0096】

癌	TAA/マーカー	HLA	引例
一過性細胞癌	ウロプラキン II	HLA-A2	WO 00/06723
一過性細胞癌	ウロプラキン Ia	HLA-A2	WO 00/06723
前立腺癌	前立腺特異的抗原	HLA-A2	WO 00/06723
前立腺癌	前立腺特異的膜抗原	HLA-A2	WO 00/06723
前立腺癌	前立腺酸ホスファターゼ	HLA-A2	WO 00/06723
乳癌	BA-46	HLA-A2	WO 00/06723
乳癌	Muc-1	HLA-A2	WO 00/06723
黒色腫	Gp100	HLA-A2	引例 54
黒色腫	MART1	HLA-A2	引例 54
全ての腫瘍	テロメラーゼ	HLA-A2	引例 54
白血病	TAX	HLA-A2	引例 54
癌	NY-ESO	HLA-A2	引例 54
黒色腫	MAGE-A1	HLA-A2	引例 54
黒色腫	MAGE-A3	HLA-A24	引例 54
癌	HER2	HLA-A2	引例 54
黒色腫	$\beta$ -カテニン	HLA-A24	引例 54
黒色腫	チロシナーゼ	HLA-DRB1	引例 54
白血病	Bcr-abl	HLA-A2	引例 54
頭頸部	カスパーゼ 8	HLA-B35	引例 54

## 【 0 0 9 7 】

ウイルス H L A 拘束性抗原：以下の表で引用した引例は、種々の癌に関連するウイルス抗原由来のヒト M H C クラス I ウイルス H L A 拘束性ペプチドの例を提供する。

## 【 0 0 9 8 】

疾患	ウイルス抗原	HLA	引例
AIDS (HTLV-1)	HIV-1 RT 476-484	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
インフルエンザ	G I L G F V F T L (配列番号:10)	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
CMV 疾患	CMV	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
バーキット型リンパ腫	TAX	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
C型肝炎	HCV	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
B型肝炎	HBVプレSタンパク質 85-66 STNRQSG RQ (配列番号11)	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
HTLV-1白血病	HTLV-1 tax 11-19	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>
肝炎	HBV表面抗原 185-194	HLA-A2	<a href="http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/">http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/</a>

10

20

## 【0099】

自己免疫HLA拘束性抗原：ウェブサイト<http://www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi/>は、自己免疫抗原従来のヒトMHCクラスI自己免疫HLA拘束性ペプチドの例を提供する。

## 【0100】

可溶性MHCクラスI分子：可溶性であり、且つ大量に産生することができる組換えMHCクラスIおよびクラスII複合体は、例えば、引例23、24、および41～53ならびにさらに米国特許出願第09/534966号およびPCT/IL01/00260号(WO01/72768号として公開)(そのすべてが本明細書中に参考として援用される)に記載されている。可溶性MHCクラスI分子を利用可能であるか、例えば、PCT/IL01/00260号の教示にしたがって任意のMHCハプロタイプ(例えば、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45、およびHLA-Cw8など)(その配列は公知であり、<http://www.immuno.bme.nwu.edu/>のkabbaデータベース(サイトの内容は本明細書中で参考として援用される)で見出すことができる)を産生することができる。以下にさらに詳述するように、このような可溶性MHCクラスI分子を、適切なHLA拘束性抗原と共に負荷し、ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIを発現する細胞を有する非ヒト哺乳動物のワクチン接種に使用することができる。

30

40

## 【0101】

ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIを発現する細胞を有する非ヒト哺乳動物：ヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIを発現し、且つ自己主要組織適合性複合体(MHC)クラスIを欠く細胞を有する非ヒト哺乳動物を、以下を使用して産生することができる：(i)本明細書中で参考として援用され、且つヒトMHCハプロタイプ(例えば、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45、およびHLA-Cw8など)に関する<http://www.immuno.bme.nw>

50

u.edu/のkabbatデータベースで提供される配列情報、(ii)例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren et al., (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)に記載の従来の構築物調製技術、および(iii)例えば、米国特許第5487992号、同第5464764号、同第5387742号、同第5360735号、同第5347075号、同第5298422号、同第5288846号、同第5221778号、同第5175385号、同第5175384号、同第5175383号、同第4736866号、国際公開WO94/23049号、WO93/14200号、WO94/06908号、およびWO94/28123号、ならびにBurke and Olson, Methods in Enzymology, 194:251-270, 1991; Capecchi, Science 244:1288-1292, 1989; Davies et al., Nucleic Acids Research, 20(11):2693-2698, 1992; Dickinson et al., Human Molecular Genetics, 2(8):1299-1302, 1993; Duff and Lincoln, “Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells”, Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, 1995; Huxley et al., Genomics, 9:742-750, 1991; Jakobovits et al., Nature, 362:255-261, 1993; Lamb et al., Nature Genetics, 5:22-29, 1993; Pears on and Choi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:10578-82; Rothstein, Methods in Enzymology, 194:281-301, 1991; Schedl et al., Nature, 362:258-261, 1993; Strauss et al., Science, 259:1904-1907, 1993(その全てが本明細書中で参考として援用される)に記載の従来の遺伝子ノックイン/ノックアウト技術。ヒトHLA-A2.1、H2Db、およびHHD MHCクラスI分子を発現し、且つマウスMHCクラスIを欠くマウスの調製を記載したJ. Exp. Med. 185:2043-2051, 1997で発表されたPacolo et al.の論文が特に興味深い。

#### 【0102】

同定可能部分：いくつかの態様では、本発明は、抗体と同定可能部分との抱合体を使用する。この目的を達成するために、1つの例では、免疫標識をコードさせるために抗体および同定可能部分をそれぞれコードする第1および第2のポリヌクレオチドをインフレームでライゲーションする。以下の表は、同定可能部分の配列の例を提供する。

#### 【0103】

同定可能部分	アミノ酸配列 (Genebank アクセッション番号)	核酸配列 (Genebank アクセッション番号)
緑色蛍光タンパク質	AAL33912	AF435427
アルカリホスファターゼ	AAK73766	AY042185
ペルオキシダーゼ	NP_568674	NM_124071
ヒスチジンタグ	AAK09208	AF329457
Myc タグ	AF329457	AF329457
ビオチンリガーゼタグ	NP_561589	NC_003366
橙色蛍光タンパク質	AAL33917	AF435432
$\beta$ ガラクトシダーゼ	NM_125776	NM_125776
フルオレセインイソチオシアネート	AAF22695	AF098239
ストレプトアビジン	S11540	S11540

10

## 【 0 1 0 4 】

治療部分：いくつかの態様では、本発明は、抗体と治療部分との抱合体を使用する。この目的を達成するために、1つの例では、免疫毒素をコードさせるために抗体および治療部分をそれぞれコードする第1および第2のポリヌクレオチドをインフレームでライゲーションする。以下の表は、治療部分の配列の例を提供する。

20

## 【 0 1 0 5 】

治療部分	アミノ酸配列 (Genebank アクセッション番号)	核酸配列 (Genebank アクセッション番号)
シュードモナス毒素	AAB25018	S53109
ジフテリア毒素	E00489	E00489
インターロイキン2	CAA00227	A02159
CD3	P07766	X03884
CD16	AAK54251	AF372455
インターロイキン4	P20096	ICRT4
HLA-A2	P01892	K02883
インターロイキン10	P22301	M57627
リシンA 毒素	225988	A23903

30

## 【 0 1 0 6 】

化学的抱合体：ペプチドを含む異なる分子型を抱合または融合（結合）するための多数の方法が当該分野で公知である。本発明にしたがってこれらの方法を使用して、治療部分または同定可能部分などの抗体の別の部分を結合させることにより、免疫毒素または免疫標識を得ることができる。

40

## 【 0 1 0 7 】

2つの単離ペプチドを、当業者に公知の任意の抱合方法を使用して抱合または融合することができる。3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (N - スクシンイミジル 3 - (ピリジルジチオ)プロピオネート (「SPDP」) (Sigma、カタログ番号 P - 3415) とも呼ばれる)、グルタルアルデヒド抱合手順、またはカルボジイミド抱合手順を使用して、ペプチドを目的の抗体に抱合することができる。

## 【 0 1 0 8 】

SPDP 抱合：当業者に公知の任意の SPDP 抱合を使用することができる。例えば、1つの例示的实施形態では、下記の Cumber et al. の修飾 (1985、Me

50

ethods of Enzymology 112:207-224)を使用する。

#### 【0109】

同定可能部分または治療部分などのペプチド(1.7mg/ml)を、10倍過剰のSPDP(50mMのエタノール溶液)と混合し、抗体を25倍過剰のSPDPの20mMリン酸ナトリウム溶液(0.10M NaClを含む、pH7.2)と混合し、各反応物を例えば、室温で3時間インキュベートした。次いで、反応物を、PBSに対して透析する。

#### 【0110】

ペプチドを、例えば、50mM DTTにて室温で1時間還元する。還元ペプチドを、50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH6.5)を使用したG-25カラム(5%までのサンプル/カラム体積)での平衡化によって脱塩する。還元ペプチドを、1:10の抗体:ペプチドのモル比でSPDP-抗体と合わせ、4で一晩インキュベートしてペプチド-抗体抱合体を形成させる。

#### 【0111】

グルタルアルデヒド抱合体:グルタルアルデヒドを使用した当業者に公知の方法によって、ペプチド(例えば、同定可能部分または治療部分)を抗体と抱合することができる。例えば、1つの例示的实施形態では、下記のG.T.Hermansonによる抱合方法(1996、“Antibody Modification and Conjugation, in Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego”)を使用する。

#### 【0112】

抗体およびペプチド(1.1mg/ml)を10倍過剰の0.05%グルタルアルデヒドの0.1Mリン酸塩溶液(0.15M NaClを含む、pH6.8)と混合し、室温で2時間反応させた。0.01Mのリジンを添加して、過剰部位をブロックすることができる。反応後、PBS(10%v/vサンプル/カラム体積)で平衡化したG-25カラムを使用して、過剰なグルタルアルデヒドを除去した。

#### 【0113】

カルボジイミド抱合体:カルボジイミドなどの脱水剤を使用した当業者に公知の方法によってペプチドを抗体と抱合することができる。4-ジメチルアミノピリジンの存在下でカルボジイミドを使用することが最も好ましい。当業者に周知のように、カルボジイミド抱合を使用して、ペプチドのカルボキシル基と抗体の水酸基(エステル結合が形成される)、抗体のアミノ基(アミド結合が形成される)、または抗体のスルフヒドリル基(チオエステル結合が形成される)との間に共有結合を形成することができる。

#### 【0114】

同様に、カルボジイミド結合を使用して、抗体の炭素基とペプチドの水酸基、アミノ基、またはスルフヒドリル基との間に類似の共有結合を形成することができる。一般に、J. March, Advanced Organic Chemistry: Reaction's, Mechanism, and Structure, pp. 349-50 & 372-74 (3rd ed.), 1985を参照のこと。例示として、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどのカルボジイミドを使用した共有結合を介してペプチドを抗体に抱合するが、これに制限されない。一般に、B. Neises et al. (1978, Angew Chem., Int. Ed. Engl. 17:522); A. Hassner et al. (1978, Tetrahedron Lett. 4475); E. P. Boden et al. (1986, J. Org. Chem. 50:2394)、およびL. J. Mathias (1979, Synthesis 561)による抱合方法を参照のこと。

#### 【0115】

本発明のさらなる目的、利点、および新規の特徴は、制限を意図しない以下の実施例の実験によって当業者に自明である。さらに、上記の本発明および以下の特許請求の範囲に記載の各々の種々の実施形態および態様は、以下の実施例の実験により支持される。

## 【 0 1 1 6 】

## 実施例

ここでは、上記説明と共に以下の実施例を参照して、非限定的様式で本発明を例示する。

## 【 0 1 1 7 】

一般に、本明細書中で使用した用語および本発明で使用した実験手順には、分子、生化学、微生物学、および組換えDNAの技術が含まれる。このような技術は、文献で完全に説明されている。例えば、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”、Sambrookら、1989; “Current Protocols in Molecular Biology”、第I~III巻、Ausubel, R. M. 編1994; Ausubelら、“Current Protocols in Molecular Biology”、John Wiley and Sons、Baltimore、Maryland、1989; Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”、John Wiley & Sons、New York、1988; Watsonら、“Recombinant DNA”、Scientific American Books、New York; Birrenら編、“Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”、第1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、1998; 米国特許第4666828号、同第4683202号、同第4801531号、同第5129659号、および同第5272057号に記載の方法; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”、第I~III巻、Cellis, J. E. 編、1994; “Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique”、Freshney、Wiley-Liss、N. Y.、1994; 第3版, “Current Protocols in Immunology”、第I~III巻、Coligan J. E. 編、1994; Stitesら編、“Basic and Clinical Immunology”、第8版、Appleton & Lange、Norwalk, CT、1994; Mishell and Shiigi編、“Selected Methods in Cellular Immunology”、W. H. Freeman and Co.、New York、1980を参照のこと; 利用可能な免疫アッセイは、特許および化学論文に広く記載されており、例えば、米国特許第3791932号、同第3839153号、同第3850752号、同第3850578号、同第3853987号、同第3867517号、同第3879262号、同第3901654号、同第3935074号、同第3984533号、同第3996345号、同第4034074号、同第4098876号、同第4879219号、同第5011771号、および同第5281521号; “Oligonucleotide Synthesis”、Gait, M. J. 編、1984; “Nucleic Acid Hybridization”、Hames, B. D. and Higgins S. J. 編、1985; “Transcription and Translation”、Hames, B. D. and Higgins S. J. 編、1984; “Animal Cell Culture”、Freshney, R. I. 編、1986; “Immobilized Cells and Enzymes”、IRL Press、1986; “A Practical Guide to Molecular Cloning”、Perbal, B.、1984および“Methods in Enzymology”、第1~137巻、Academic Press、“PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”、Academic Press、San Diego, CA、1990; Marshakら、“Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual”、CSHL Press、1996 (その全

10

20

30

40

50

てが本明細書中に完全に記載されているかのように参照として援用される)を参照のこと。他の一般的引例を、本明細書中に記載する。引例中の手順は当該分野で周知であると考えられ、読者の都合のために記載する。引例中に含まれる全ての情報は、本明細書中で参考として援用される。

#### 【0118】

(材料と実験方法) ビオチン化 s c M H C / ペプチド複合体の産生：以前に記載のように(23、24、米国特許出願09/534966号およびP C T / I L 0 1 / 0 0 2 6 0号(W O 0 1 / 7 2 7 6 8として公開))、E . c o l i 中に産生した封入体の i n v i t r o での再折りたたみによって単鎖M H C / ペプチド複合体を産生した。以前に記載のように(25)、B i r A 酵素(A v i d i t y , D e n v e r , C O ) を使用して

10

#### 【0119】

マウスの免疫化：以前に記載のように(17)、組換えH L A - A 2 . 1 / D <sup>b</sup> - 2 ミクログロブリン短鎖にトランスジェニックなD <sup>b</sup> - / - X 2 ミクログロブリン( 2 m ) ヌルマウス(H H D マウス)(26)を、H L A - A 2 / G 9 - 2 0 9 複合体に共有結合したツベルクリン(P P D )の精製タンパク質由来ペプチドを含む乳濁液で免疫化した。簡単に述べれば、マウスを、20~30 μ g / マウスの抗原性混合物を含むフロイント不完全アジュバントで最初に皮下に免疫化し、その後3~5ヶ月間2週間間隔で皮下に免疫化した。最後の免疫化から2週間後に脾臓を採取した。

#### 【0120】

20

ビオチン化複合体に対するファージ-抗体のライブラリー構築および選択：記載のように(27)免疫化マウスから全RNAを単離し、抗体s c F vライブラリーを室温のP C R によってm R N A から構築した。S f i I - N o t I フラグメントとしてs c F v レパートリーをp C A N T A B 5 E またはp C C - C B D ファージミドベクターにクローン化した(28)。両ライブラリーの複雑度は、 $1 \times 10^8$  独立クローンであった。パニングのために、ビオチン化s c H L A - A 2 / G 9 - 2 0 9 M 複合体(20 μ g ) をストレプトアビジン被覆磁性ビーズ( $2 \times 10^8$ )とインキュベートし、洗浄し、 $10^{11}$  c f u のライブラリーとインキュベートした(室温で1時間)。第2ラウンドから開始し、過剰量(5 μ g )のs c H L A - A 2 / G 9 - 2 8 0 V 複合体の存在下でパニングを行った。2% M P B S + 0.1% T W E E N 2 0 で10~12回ビーズを十分に洗浄した。室温で5分間の1 m l のトリエチルアミン(100 m M , p H 1 2 ) の使用によって結合したファージを溶出し、その後0.1 m l の1 M T r i s - H C l ( p H 7 . 4 ) で中和した。記載のように(28)、溶出ファージを、E . c o l i T G 1 細胞の指数関数的成長において拡大し、その後M 1 3 K O 7 ヘルパーファージで重感染させた。

30

#### 【0121】

可溶性組換えs c F v およびs c F v - P 3 8 融合タンパク質の発現および精製：P C R によってG 1 s c F v 遺伝子をファージクローンからレスキューし、S f i I - N o t I クローニング部位の使用によってファージミドベクターp C A N T A B 6 にサブクローン化した。M y c およびヘキサヒスチジンタグをs c F v 遺伝子のC 末端に融合した。以前に記載のように(29)s c F v 抗体をB L 2 1 D E 3 細胞で発現させ、金属イオンアフィニティークロマトグラフィによってペリプラズム画分から精製した。G 1 s c F v - P E 3 8 融合タンパク質の発現のために、s c F v 遺伝子をN c o I - N o t I フラグメントとしてP E の転座およびA D P - リボシル化ドメイン(P E 3 8 ) をコードするプラスミドp I B - N N にサブクローン化した。封入体から再折りたたみされたB L 2 1 D E 3 細胞の発現およびG 1 s c F v - P E 3 8 の精製を以前に記載のように行った(30)。

40

#### 【0122】

ファージクローンおよび精製s v F v またはs c F v - P E 3 8 を使用したE L I S A : ビオチン化s c M H C - ペプチド複合体を使用したE L I S A によって結合特異性研究を行った。簡単に述べれば、E L I S A プレート(F a l c o n ) に、B S A - ビオチン

50



( $1 \mu\text{g}$  / ウェル) を一晚コートし、洗浄し、ストレプトアビジン ( $1 \mu\text{g}$  / ウェル) とインキュベートし (室温で 1 時間)、再度十分に洗浄し、さらに  $0.5 \mu\text{g}$  の MHC / ペプチド複合体とインキュベートした (室温で 1 時間)。プレートを PBS / 2 % ミルクでブロックし (室温で 30 分間)、ファージクローン (約  $10^9$  ファージ / ウェル、室温で 1 時間) または  $0.5 \sim 1 \mu\text{g}$  の可溶性 scFv または scFv - PE38 とインキュベートし、その後 1000 倍希釈の HRP 抱合 / 抗 M13、抗 myc 抗体、または抗 PE 抗体でそれぞれ洗浄した。特異性研究のために使用した HLA - A2 拘束性ペプチドは、gp100 (154) : KTWGQYWQV (配列番号 1) ; gp100 (209) : IMDQVPFSV (配列番号 2) ; gp100 (280) : YLEPGPVTV (配列番号 3) ; MUC1 : LLLTVLTVL (配列番号 4) ; HTLV - 1 (TAX) : LLFGYPVYV (配列番号 5) ; hTERT (540) : ILAKFLHWL (配列番号 6) ; hTERT (865) : RLVD DFLLV (配列番号 7) である。

#### 【0123】

フローサイトメトリー：単鎖 2M - HLA - A2 遺伝子 (26) でトランスフェクトした B 細胞株 RAMS - HHd または EBV 形質転換 B リンパ芽球 JY 細胞 ( $10^6$  細胞) を、無血清 RPMI で 2 回洗浄し、 $100 \mu\text{M}$  のペプチドを含む培地中で 26 または 37 でそれぞれ一晚インキュベートした。その後、APC を 37 で 2 ~ 3 時間インキュベートして MHC - ペプチド複合体の細胞表面発現を安定化し、その後  $100 \mu\text{l}$  の組換え scFv ( $10 \sim 50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、60 ~ 90 分間、4 ) とインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、FITC 標識抗 Myc 抗体とインキュベートし (4 で 30 ~ 45 分間)、最後に洗浄し、FACSstar フローサイトメーター (Becton Dickinson) で分析した。

#### 【0124】

競合結合アッセイ：可撓性 ELISA プレートに BSA - ビオチンをコートし、scMHC - ペプチド複合体 ( $100 \mu\text{l}$  中  $10 \mu\text{g}$ ) をそれに固定した。組換え G1scFv - PE38 を、Bolton - Humter 試薬を使用して [ $^{125}\text{I}$ ] で標識した。標識タンパク質を、競合物質として漸増濃度の冷 G1scFv - PE38 の存在下でトレーサーとしてウェルに添加し ( $3 \sim 5 \times 10^5$  CPM / ウェル)、PBS 中にて室温で 1 時間インキュベートした。プレートを PBS で完全に洗浄し、結合放射能を カウンターで決定した。G1scFv - PE38 の見かけ上の親和性を、固定 scMHC - ペプチド複合体への [ $^{125}\text{I}$ ] 標識 G1scFv - PE38 結合の 50 % 阻害の達成に必要な競合物質濃度の推定によって決定した。非特異的結合を、20 ~ 40 倍過剰の非標識 Fab の添加によって決定した。

#### 【0125】

細胞傷害性アッセイ：前に記載のように、PMAS - HHd または JY APC を、G9 - 209 ペプチドおよびコントロールペプチドと共に負荷した。次いで、以前に記載のように (30)、ペプチド負荷細胞を漸増濃度の G1scFv - PE38 とインキュベートし、細胞タンパク質への  $^3\text{H}$  - ロイシンの取り込みの測定によってタンパク質合成阻害を決定した。タンパク質合成を 50 % 阻害するために必要な G1scFv - PE38 の濃度として  $\text{IC}_{50}$  を決定した。競合アッセイでは、過剰量の特異的および非特異的 HLA - A2 - ペプチド複合体 ( $35 \sim 50 \mu\text{g} / \text{ウェル}$ ) をウェルに 15 分間添加し、その後 G1scFv - PE38 を添加した。

#### 【0126】

(実験結果) 黒色腫 gp100 由来のペプチド G9 - 209 M との組換え単鎖 MHC - ペプチド複合体の作製：gp100 は、ほとんどの黒色腫細胞で発現する 661 個のアミノ酸からなるメラノサイト系統特異的膜糖タンパク質である (19 - 22)。このタンパク質は、黒色腫患者から単離された多数の HLA - A2 拘束性黒色腫反応性腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) によって認識される (19 - 22)。gp100 においていくつかの T 細胞 HLA - A2 拘束性エピトープが同定されている；これらは T 細胞の特異性を変化させることなく免疫原性を増大させるために MHC アンカーの位置が改良されている (31)

。G9 - 209M (IMDQVPFSV (配列番号2)) ペプチドは、3つの主要な免疫原性エピトープの1つである (19 - 22)。以前に記載されている (23、24、米国特許出願第09 / 534966号およびPCT / IL01 / 00260号 (WO01 / 72768号として公開)) E . coli で発現する単鎖MHC (scMHC) 構築物の使用によって、G9 - 209Mペプチドを与える組換えMHC - ペプチド複合体を作製した。G9 - 209Mまたは他のHLA - A2拘束性ペプチドの存在下での封入体のin vitroでの再折りたたみおよびその後のイオン交換クロマトグラフィを使用した精製プロトコールによってscMHC - ペプチド複合体を産生した。SDS - PAGEおよびゲル濾過クロマトグラフィでの分析によって決定したところ、再折りたたみgp100由来のおよびコントロールscHLA - A2 - ペプチド複合体は、非常に純度が高く且つ均一な単量体であった。G9 - 209M含有scHLA - A2複合体は、特異的CTL株およびクローンを刺激し、四量体形態のG9 - 209M特異的T細胞を染色する能力によって機能的であることが以前に示されている (23、24)。

#### 【0127】

抗体scFvファージライブラリーの構築およびTCR様特異性を有するHLA - A2 / G9 - 209M複合体に結合するファージの選択：免疫化のためにPPDを精製複合体に結合させ、組換えHLA - A2 . 1 / D<sup>b</sup> - 2ミクログロブリン短鎖にトランスジェニックなD<sup>b</sup> - 2ミクログロブリン (2m)ヌルマウス (HHDマウス) (26) を、これで免疫化した。これらのマウスは、古典的HLA遺伝子導入にマウスクラスI H - 2を選択的破壊が組み合わされている。したがって、古典的HLAトランスジェニックと異なり、これらのマウスはインタクトなウイルスなどの多エピトープタンパク質とのHLA - A2 . 1拘束性応答しか示さなかった。さらに、これらのマウスはB細胞免疫原としてHLA - A2に広範な耐性を示すはずであり、それによりHLA - A2 (特異的腫瘍関連ペプチド) と複合体形成した場合にMHC拘束性エピトープに指向する抗体応答の発生を優先することができるので、HLA - A2 - ペプチド複合体での免疫化のための有用なツールであると推測される。反応性の高いT細胞免疫原であるので、PPDを抱合に使用した (17)。

#### 【0128】

免疫化マウスから総脾臓mRNAを単離し、cDNAに逆転写した。縮重プライマーの特定の組を使用して、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖可変ドメインに対応するcDNAセグメントをPCR増幅した (27)。VHおよびVLのPCRプールの、PCR重複伸長反応によってscFvレパートリーに構築し、その後インフレームでのセルロース結合ドメイン (CBD) との融合タンパク質としてscFvを発現するpCANTAB5EファージミドベクターまたはファージミドベクターpCC - Gal6 (Fv) にクローン化した (28)。得られたライブラリーを、エレクトロポレーションによってE . coli TG1細胞に形質導入し、ヘルパーファージでのレスキュー後に小ファージ被覆タンパク質pIIIとの融合物として発現させた。両ベクター型を使用したライブラリーの複雑度は、 $1 \times 10^8$  独立クローンからなった。

#### 【0129】

ライブラリーを3 ~ 4回サイクルのパニングに供し、結合ファージを溶離し、E . coli で再増幅させた。選択効率を増大させるために、ビオチン化scMHC - ペプチド複合体を使用した。以前に記載のように (25)、部位特異的ビオチン化のためのBirA配列タグを、HLA - A2遺伝子のC末端で操作した。いくつかの選択ストラテジーを使用し、第2ラウンドのパニングから開始する負の欠失工程を使用したパニングプロトコールからなる最も首尾のよいストラテジーによって、特異的結合物質が単離された。特異的HLA - A2 / G9 - 209Mビオチン化複合体を、ストレプトアビジン被覆磁性ビーズ上に固定し、ライブラリーを異なるgp100由来エピトープ (G9 - 280Vペプチド) をディスプレイする大過剰のHLA - A2複合体の存在下で固定化複合体とインキュベートした。このストラテジーを使用した場合、G9 - 209M特異的ファージは磁力によって捕捉されたストレプトアビジン - ビオチン固定化複合体に結合し、複合体中のG9 -

209Mペプチドに特異的ではないpan-MHC結合物質は溶液中の非特異的複合体に結合し、それにより特異的ファージから分離および除去することができる。以下の表1に示すように、3～4ラウンドのパニング後に固定化複合体に結合するファージの連続的且つ顕著な富化が認められ、そのうちの2つを負の枯渇ストラテジーを使用して行った。

【0130】

【表1】

表1: *scHLA-A2/G9-209M* 複合体に対するファージ選択

ライブラリー	サイクル	入力	出力	富化
scFv	1	$1 \times 10^{12}$	$1 \times 10^4$	-
	2	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^5$	10
	3	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^9$	10,000
scFv-CBD	1	$5 \times 10^9$	$1 \times 10^4$	-
	2	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^5$	10
	3	$5 \times 10^{11}$	$1 \times 10^8$	1,000

10

A 4ラウンドの選択により、ラウンド3で見出されたものと類似の富化を示した

20

【0131】

B S A - ビオチン - ストレプトアビジン被覆免疫プレートに固定したビオチン化組換え s c M H C - ペプチド複合体に対するファージ特異性を決定するために、ポリクローナルファージ E L I S A を行った。B S A - ビオチン - ストレプトアビジンスペーサーは、プラスチックへの直接結合によって歪曲され得る複合体の提示を修正することができる。パニングの第2ラウンド後にファージは既に分析されるが、より劇的には、第3ラウンド後、特異的 G 9 - 209 M 含有 H L A - A 2 複合体にのみ指向する固有の特性パターンを示した (図 1 A ~ B )。g p 100 由来のエピトープ、G 9 - 280 V、またはテロメラーゼ由来エピトープ 654 をディスプレイするコントロール H L A - A 2 複合体を使用した場合、結合は認められなかった。

30

【0132】

各モノクローナルファージクローンを、最終ラウンドのパニング由来のファージ集団から単離し (第4ラウンド後にさらなる富化は認められなかった)、ファージ E L I S A によって特異性を再スクリーニングした (図 2 A ~ B )。試験した 93 クローンのうち、85 個 (91%) のクローンが、H L A - A 2 / G 9 - 209 M 複合体と反応した (図 2 A )。85 個の反応性クローンうちの 77 個 (90%) が特異的 H L A - A 2 / G 9 - 209 M 複合体と特異的に反応したが、コントロール G 9 - 280 V 含有複合体とは反応しなかった (図 2 B )。ほんの少しのクローン (5 / 93、5%) のみがペプチド特異性を示さなかった (図 2 B )。したがって、パニング手順により、H L A - A 2 / G 9 - 209 M 複合体に対して T C R 様特異性を有するファージ抗体を首尾よく富化することができた。多切断制限酵素消化によるフィンガープリント分析により、50 個の陽性 H L A - A 2 / G 9 - 209 M 特異的クローンが類似の消化パターンを有し、全てが類似することを示すことが明らかとなった (データ示さず)。2つのライブラリーを使用して、類似の結果が得られた。これらを同一の遺伝物質 (m R N A の同一プール) から構築したので、p C A N T A B 5 E s c F v ライブラリー由来のファージクローンのみをさらに特徴付けた。

40

【0133】

10 クローン由来の V H および V L 可変ドメインの D N A 配列決定により、全てが同一であることが明らかとなり (データ示さず)、これらのクローンは全て1つの産生抗体 V

50

H/V/L 組み合わせ事象に由来することが示唆された。

【0134】

T C R 様特性を有する可溶性組換え s c F v 抗体の特徴づけ：D N A 配列決定により、抗体 V H 配列がマウス重鎖サブグループ I I I ( D ) に属し、V L 配列がマウス 軽鎖群 I V に属する ( K a b b a t による ) ことが明らかとなった。ヌクレオチド配列 ( 配列番号 8 ) および推定アミノ酸配列 ( 配列番号 9 ) を図 3 A に示す。選択された s c F v 抗体 ( G 1 と呼ばれる ) の結合特異性および生物学的特性をさらに特徴付けるために、以下の 2 つの発現系を使用した；第 1 に、s c F v を m y c およびヘキサヒスチジンタグを s c F v 遺伝子の C 末端に融合したファージミドベクター p C A N T A B 6 にサブクローン化した。第 2 に、P s e u d o m o n a s 外毒素 A の切断形態 ( P E 3 8 ) に s c F v 遺伝子を融合して s c F v - 免疫毒素を作製する T 7 プロモーター駆動発現系であった ( 1 2 )。P E のこの切断形態は、全 P E の転座および A D P リボシル化ドメインを含むが、切断毒素の N 末端に融合した s c F v フラグメントと置換した細胞結合ドメインを欠く。分泌によって E . c o l i B L 2 1 ( D E 3 ) 細胞中に G 1 s c F v を産生させ、C 末端に融合したヘキサヒスチジンタグを使用した金属アフィニティクロマトグラフィによってペリプラズム画分から精製した ( 図 3 B )。B L 2 1 細胞中に G 1 s c F v - P E 3 8 を発現させ、I P T G での誘導時に細胞内封入体として大量の組換えタンパク質が蓄積された。S D S - P A G E により、G 1 s c F v - P E 3 8 を発現する培養物由来の封入体が 9 0 % を越える組換えタンパク質を含むことが示された。確立された再生プロトコルを使用して、酸化還元シャフリング再折りたたみ緩衝液中の可溶化封入体から G 1 s c F v - P E 3 8 の再折りたたみを行い、その後 Q - S e p h a r o s e および M o n o Q カラムでのイオン交換クロマトグラフィおよびその後のサイズ排除クロマトグラフィによって精製した。非還元条件下での S D S - P A G E によって分析したところ、推定サイズ 6 3 k D a の高度に精製された G 1 s c F v - P E 3 8 融合タンパク質を得た ( 図 3 C )。G 1 s c F v および G 1 s c F v - 免疫毒素の分子プロフィールを、サイズ排除クロマトグラフィによって分析し、推定分子量がそれぞれ 2 6 k D a および 6 3 k D a の単量体形態の単一のタンパク質ピークを示した ( データ示さず )。再折りたたみ G 1 s c F v - 免疫毒素の収率は約 2 % であるので、8 0 ~ 9 0 % の組換えタンパク質を含む封入体由来の 1 0 0 m g のタンパク質の再折りたたみから 2 m g の高純度のタンパク質を日常的に得ることができる。この収率は、類似の発現系および再折りたたみ系を使用して十分に発現および産生された以前に報告された s c F v - 免疫毒素と類似する ( 3 0 )。1 リットルの細菌培養物からの G 1 s c F v の収率は 3 m g であった。

【0135】

プラスチックへの直接結合によって歪曲され得る複合体の正確な折りたたみを確実にするために、B S A - ビオチン - ストレプトアビジンによってウェルに固定したビオチン化 M H C - ペプチド複合体に対する E L I S A アッセイによって可溶性精製 G 1 s c F v 抗体および G 1 s c F v - P E 3 8 融合タンパク質の結合特異性を決定した。結合複合体の正確な折りたたみおよび結合アッセイ中のその安定性を、正確に折りたたまれた場合およびペプチドを含む場合のみに H L A 複合体に結合する高次構造の特異的モノクローナル抗体 w 6 / 3 2 とのその反応能力によって決定した ( データ示さず )。可溶性精製 G 1 s c F v または G 1 s c F v - P E 3 8 タンパク質を使用した場合、E L I S A アッセイにより、M H C 拘束性 T 細胞特異性の特質に相当する非常に特異的な認識パターンが明らかになった ( 図 4 )。G 9 - 2 0 9 M 含有 H L A - A 2 複合体に結合するように選択された G 1 s c F v は、特異的複合体のみと反応し、G 9 - 2 8 0 をディスプレイする複合体および G 9 - 1 5 4 g p 1 0 0 由来の M H C - ペプチド複合体や H L A - A 2 拘束性テロメラゼ由来エピトープ 5 4 0 および 8 6 5 を含む他のコントロール複合体 ( 3 2 )、M U C 1 由来のペプチド ( 3 3 )、または H T L V - 1 由来 T A X ペプチド ( 3 4 ) と反応しなかった ( 図 4 )。これらのアッセイでは、抗 P E 3 8 抗体を使用して結合を検出した。抗 M y c タグ抗体を使用して検出を行う非融合 G 1 s c F v 抗体を使用した場合に類似の結果が得られた ( データ示さず )。したがって、この抗原特異的 s c F v フラグメントは、

T C R様分子の結合特性および優れた特異性を示す。G 1 s c F vまたはG 1 s c F v - P E 3 8は、ペプチドのみや空のH L A - A 2分子を認識せず（ペプチドの非存在下では不安定であるので産生が困難である）、ストレプトアビジンや他のタンパク質抗原も認識しなかった（データ示さず）。

#### 【 0 1 3 6 】

次に、漸増量のG 1 s c F v - P E 3 8を添加したB S A - ビオチン - ストレプトアビジン被覆プレートにビオチン化複合体が結合する飽和E L I S Aアッセイを使用して、T C R様可溶性精製G 1 s c F v - P E 3 8の結合特性を決定した。特異的g p 1 0 0由来H L A - A 2 / G 2 0 9 M複合体へのG 1 s c F v - P E 3 8の結合は、用量依存性且つ飽和可能であった（図5 A）。5 0 %結合シグナルの予想により、この抗体が高親和性を有する（ナノモル範囲の結合親和性を有する）ことが明らかとなった。T C R様s c F vフラグメントのその同族M H C - ペプチド複合体への見かけ上の結合親和性を決定するために、<sup>1 2 5</sup>I標識G 1 s c F v - P E 3 8の結合を漸増濃度の非標識タンパク質と競合させる競合結合アッセイを行った。これらの結合アッセイにより、5 n Mの低ナノモル範囲での見かけ上の結合親和性が明らかとなった（図5 B）。重要には、これらの結果は、免疫化H L A - A 2トランスジェニックマウスのファージディスプレイされた抗体レパートリーからのT C R様特異性を有する高親和性s c F v抗体の単離における以前の成功を強調するものである。

#### 【 0 1 3 7 】

g p 1 0 0由来エピトープをディスプレイするA P CへのG 1 s c F vの結合：単離された溶解性G 1 s c F vが細胞表面上で発現するようにその組換え可溶性形態だけでなく天然の形態でも特異的M H C - ペプチド複合体に結合することができることを証明するために、2つのA P C系を使用した。1つは、単鎖形態（2 6）（H L A - A 2 . 1 / D b - 2 m単鎖）中のヒトH L A - A 2遺伝子でトランスフェクトしたマウスT A P 2欠損R M A - S細胞（R M A - S - H H D細胞）からなる。g p 1 0 0由来ペプチドおよびコントロールペプチドをR M A - S - H H D細胞に負荷し、選択されたG 1 s c F v抗体のペプチド負荷細胞に結合する能力をF A C Sによってモニターした（図6 A ~ C）。T A P 2変異R M A - S - H H D細胞のペプチド誘導M H C安定化を、高次構造抗H L A抗体w 6 / 3 2および高H L A - A 2 M A b B B 7 . 2のペプチド負荷および非負荷細胞との反応性の分析によって決定した（図6 AおよびB）。G 9 - 2 0 9 M含有H L A - A 2複合体を認識したG 1 s c F vは、G 9 - 2 0 9 Mペプチドを負荷したR M A - S - H H D細胞のみと反応し、G 9 - 2 8 0ペプチドを負荷した細胞（図6 C）やペプチドを負荷していないコントロール細胞と反応しなかった。G 1 s c F vは、特異性分析のために使用したT A X、M U C 1、またはテロメラゼ由来ペプチドなどの他のH L A - A 2拘束性コントロールペプチドで負荷した細胞に結合しなかった（図4を参照のこと）。

#### 【 0 1 3 8 】

A P Cの第2の型（すなわち、H L A - A 2を発現するE B V形質転換Bリンパ芽球J Y細胞）も使用した；これらの細胞を、g p 1 0 0由来ペプチドまたはコントロールペプチドとインキュベートした。これらはT A P +であり、その結果として、外因的に供給したペプチドのディスプレイはペプチド交換によって容易になる。このストラテジーを使用して、G 1 s c F v抗体との類似の結合特異性が認められた（データ示さず）。これらの結果は、s c F v抗体は細胞表面上でi n s i t uにてその対応する天然のH L A - A 2複合体を特異的に認識することができることを証明する。

#### 【 0 1 3 9 】

A P Cに対するG 1 s c F v - P E 3 8の細胞傷害活性：G 1 s c F v抗体が抗原提示細胞のT細胞様特異的排除のためのターゲティング部分として作用する能力を決定するために、P s u d o m o n a s外毒素Aの非常に強力な切断形態をs c F v遺伝子のC末端に融合したG 1 s c F v - P E 3 8分子を構築し、ペプチド負荷A P Cを死滅させるその能力を試験した。R M A S - H H DまたはJ Y細胞に、g p 1 0 0由来のエピトープG 9 - 2 0 9 MおよびG 9 - 2 8 0 Vならびに他のコントロールH L A - A 2拘束性ペプチド

を負荷した。抗HLA-A2抗体を使用したFACS分析により、G9-209M、G9-280V、および他のコントロールペプチドを負荷した細胞を有するHLA-A2分子の類似の発現パターンが明らかとなった(図6B)。図7Aに示すように、G9-209ペプチドを負荷したRMA5-HHD細胞のみでIC<sub>50</sub>が10~20ng/mlのG1s c F v - P 3 8による細胞傷害性が認められた。gp100由来G9-280Vエピトープまたは他のコントロールHLA-A2拘束性ペプチドを負荷したRMA5-HHD細胞やペプチド負荷していない細胞で細胞傷害活性は認められなかった。抗ヒトリスYs c F v抗体をPE38に融合させた無関係の免疫毒素(B3(Fv)-PE38)を使用してもG9-209M負荷RMA5-HHD細胞は死滅しなかった(図7A)。正常なTAPを発現するEBV形質転換JY細胞では、外因的に供給したペプチドのディスプレイは、ペプチド交換によって容易になる。この戦略を使用して、G1s c F v - P E 3 8がG9-209Mペプチドを負荷した細胞のみを死滅させる類似の特異的活性が認められた(図7B)。G1s c F v - P E 3 8によって結合を競合して細胞傷害性を阻害させるために、過剰な特異的およびコントロールの可溶性s c H L A - A 2 - ペプチド複合体が溶液中に存在する競合実験において特異性についてのさらなる証拠を証明した。過剰な可溶性G9-209M含有HLA-A2ではG9-209M負荷JY細胞に対してG1s c F v - P E 3 8と競合して細胞傷害活性を阻害するが、G9-280V/HLA-A2複合体では認められないこのアッセイ型の例を図7Cに示す。これらの結果は、G1s c F v抗体の優れた固有の特異性およびヒト腫瘍T細胞エピトープに指向するT細胞の抗原(ペプチド)特異的MHC拘束性特異性を有する細胞傷害性エフェクター細胞を送達するターゲティング部分として作用するその能力をさらに証明する。

#### 【0140】

(結果の考察)この実施例では、マウスs c F vフラグメントの免疫レパートリーから癌抗原(黒色腫関連抗原gp100)由来のヒトT細胞エピトープに指向する高親和性抗体(本明細書中ではG1s c F vという)を選択する能力を証明した。

#### 【0141】

G1s c F vは、非常に特異的且つ特別な結合パターンを示す;これは、ペプチド特異的様式でHLA-A2複合体に結合することができる。したがって、これは、T細胞抗原受容体様特異性を有する組換え抗体である。本来の低親和性TCRと対照的に、この分子は抗体の高親和性結合特性を示しながらTCR特異性を保持する。

#### 【0142】

この実施例は、ファージディスプレイアプローチ能力および異なる抗体の巨大レパートリー由来の特に優れた特異性を選択するその能力を顕著に証明する。

#### 【0143】

このようなペプチド特異的結合物質が稀であり、それにより単離が困難であると考えられるという事実にもかかわらず、高親和性TCR様抗体を選択する能力は、以下の検討材料に起因し得る。

#### 【0144】

1つは、ファージディスプレイで使用される種々の選択戦略の能力と組み合わせたトランスジェニック動物の免疫化を含む免疫化および選択様式である。新規の外来ペプチドが複合体上に存在しない限り、HLA複合体に通常耐性を示すので、HLA-A2トランスジェニックマウスなどのHLAトランスジェニックマウスの使用は有利であると考えられる。TCR様抗体分子を単離する能力は、HLA-A2に耐性を示すリンパ球が本明細書中に示す実施例ではHLA-A2上に提示された黒色腫gp100由来ペプチドによって寄与される新規のエピトープにそのとき曝露される状況を示し得る。過剰な非特異的複合体を含む溶液を組み合わせたパニング手順は、選択プロセスに有意に寄与し、稀な抗体クローン(10<sup>8</sup>個のうちの1個)が単離される。

#### 【0145】

別の重要な問題は、選択プロセスで使用した抗原の状態に関する。抗原の高次構造は、特に組換え形態で産生される場合、できるだけ「天然」でなければならない。引例23お

10

20

30

40

50

よび24ならびに米国特許出願09/534966号およびPCT/IL01/00260号(WO01/72768号として公開)に記載のように、種々のペプチドと複合体形成した単鎖MHC分子のE. coliで産生された封入体からのin vitro再折りたたみにより大量の正確に折りたたまれた機能的タンパク質が得られることが見出された。約 $10^8$ クローンの比較的小さなライブラリーから例示的抗体G1scFvが単離され、さらにナノモル範囲での親和性で非常に特異的であるという事実は、免疫化に使用したHLA-A2トランスジェニックマウスにより実際にHLA-A2/G9-209複合体に対する高親和性抗体が開発されることを強く示す。たった1つの抗HLA-A2/G9-209抗体が単離されたという所見は、たった1つのこのような特異性を示すか、このような応答をHLA-A2トランスジェニックマウスは容易に作製および寛容することができないので、免疫応答時に他の特異性が得られないことを反映し得る。ファージディスプレイを使用して、インフルエンザ血球凝集素ペプチドHa<sub>255-262</sub>との複合体形成においてクラスIマウスH-2K<sup>k</sup>分子に指向する組換えTCR様抗体が単離されたマウスMHC-ペプチド系について類似の結果が過去に報告されたという事実は非常に驚くべき事実である(17)。本明細書中に示した結果と同様に、試験した50個のクローンのうち、7個のクローンがH-2K<sup>k</sup>/Ha<sub>255-262</sub>複合体のみと特異的に反応するが、他のH-2K<sup>k</sup>/ペプチド複合体とは反応しなかった。興味深いことに、これらの特異的クローンのDNA配列を決定したところ、同一であることが見出された(17)。しかし、これらの抗H-2K<sup>k</sup>/Ha<sub>255-262</sub>複合体抗体を使用して抗原提示をモニターすることやヒト起源の抗原提示細胞を死滅させることはできない。

#### 【0146】

T細胞抗原受容体様特異性を有する抗体が稀であるという事実にもかかわらず、癌、ウイルス感染、および自己免疫疾患などの種々の病状に関連する種々のMHC-ペプチド複合体に対してTCR様特異性を有する組換え抗体を単離するためにファージディスプレイアプローチを適用することができる。

#### 【0147】

TCR様特異性を有する組換え抗体は、腫瘍免疫学の2つの主要な領域におけるさらなる研究のための新規の有益なツールを示す。第1に、現在これらの抗体を使用して、フローサイトメトリーおよび免疫組織化学の標準的な方法によって特異的T細胞エピトープまたはMHC-ペプチド複合体の存在を検出して直接視覚化することができる。これらは、腫瘍細胞、転移、抗原提示細胞、およびリンパ系細胞の表面上の特異的腫瘍関連MHC-ペプチド複合体の発現の決定による癌における抗原提示の研究および分析に非常に有用なはずである。さらに、このような抗体を使用して、腫瘍細胞抽出物を負荷したペプチドまたはAPCを使用したワクチン接種プロトコルまたは樹状細胞-腫瘍細胞ハイブリッドワクチン接種前、接種中、および接種後の抗原提示細胞上のMHC-ペプチド複合体発現の変化の決定によって免疫療法ベースのアプローチを分析することができる(7~11)。したがって、抗原提示の間にどこでどのようにして一定の事象が起こるのかということに関する問題に初めて直接取り組むことができ、抗原提示細胞上のT細胞エピトープの発現を視覚化および定量することができる。

#### 【0148】

第2に、非常に特異的且つ固有のヒト腫瘍抗原に指向するこのような極めて優れた特異性を有する抗体は、種々の抗体ベースの免疫療法アプローチのためのターゲティング部分として使用するための新規の機会を提供する。これには、組換え免疫毒素を構築するため(12)、サイトカイン分子との融合(37)、または二重特異性抗体療法(38)のためのこのような抗体の使用が含まれる。これらの適用に関する未解決の問題は、標的細胞の表面上の低密度の特異的エピトープに関する。マウスH-2K<sup>k</sup>/インフルエンザ血球凝集素ペプチド複合体および類似の抗原提示系を使用して、TCR様免疫毒素分子を使用して有効に死滅させるために、一定密度の数千個の特定のMHC-ペプチド複合体がAPCの選択的消滅に必要であることが以前に証明されている(39)。本明細書中に記載の結果は、T細胞様免疫毒素の類似の細胞傷害能力を達成するこれらの所見を支持する。こ

これらのTCR様抗体分子のターゲティング能力を改良するために、以下の2つの抗体操作アプローチを使用することができる：(i)そのTCR様の優れた特異性を変化させることのない親和性変異戦略による親抗体の親和性の増加(40)および(ii)2価にすることによるこれらの1価の組換え分子の抗原結合力の増加(38)。これらの戦略の組み合わせにより第2世代(免疫療法アプローチのために有益なツールであり、腫瘍細胞およびヒト免疫系の相互作用の研究のための革新的な研究ツールとして役立つ改良分子)が得られる。

【0149】

明確にするために個別の実施形態の文脈に記載の本発明の一定の特徴を1つの実施形態と組み合わせることにより得ることもできることが認識される。逆に、簡潔にするために1つの実施形態の文脈に記載の本発明の種々の特徴を個別または任意の適切なサブコンビネーションで得ることもできる。

10

【0150】

本発明を特定の実施形態と共に記載しているが、多数の変形態態、修正形態、および変形態態が当業者に明らかであることが明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および範囲に含まれるこのような全ての変形態態、修正形態、および変形態態が含まれることが意図される。全ての刊行物、特許、特許出願、および本明細書中に記載したGenebankアクセッション番号によって識別される配列は、その全体が、それぞれの刊行物、特許、特許出願、および配列があたかも特別または個別に本明細書中で参考として援用されるように示されるような範囲に本明細書中で参考として援用される。さらに、本出願における任意の引例の引用または識別により、このような引例が先行技術として本発明で利用可能であることを承認すべきではない。

20

【0151】



## 参考文献

(追加の文献は本文中に引用されている)

1. Boon, T., & van der Bruggen, P. (1996) *J Exp Med* 183,725-9.
2. Rosenberg, S.A. (2001) *Nature* 411,380-4.
3. Renkvist, N.,Castelli, C., Robbins, PF, & Parmiani, G. (2001) *Cancer Immunol Immunother* 50, 3-15.
4. Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, Herlyn M,Parmiani G.. (1993) *J. Exp. Med.* 177, 989-998. 10
5. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J,Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, et al. (1994) *J. Exp. Med.* 180, 35-42.
6. Rivoltini L, Loftus DJ, Squarcina P, Castelli C, Rini F, Arienti F, Belli F, Marincola FM, Geisler C, Borsatti A, Appella E, Parmiani G. (1998) *Crit Rev Immunol* 18, 55-63. 20
7. Offringa, R., van der Burg, S.H., Ossendorp, F. Toes, R.E., & Melief, C.J. (2000) *Curr Opin Immunol* 12, 576-82
8. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. (1993) *J. Exp. Med.* 177, 265-272.
9. Seliger, B., Maeurer, M.J., & Ferrone, S (2000) *Immunol. Today* 21, 455-464.
10. Esche, C., Shurin, M.R., Lotze, M.T., (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1,72-81. 30
11. Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobywalski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. *Nat. Med.* 6, 332-336 (2000).
12. Pastan, I. (1997) *Biochim Biophys Acta.* 1333,C1-6.
13. Porgador, A., Yewdell, J.W., Deng, Y., Bennink, J.R., Germain, R.N., (1997) *Immunity* 6, 715-26
14. Dadaglio, G, Nelson, CA, Deck, MB, Petzold, SJ, Unanue, ER. (1997) *Immunity* 6,727-38. 40

15. Aharoni, R, Teitelbaum, D, Arnon, R, Puri, J. (1991) *Nature*.351,147-50.
16. Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Canella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, Ditzel H, Raine C, Engberg J, Fugger L. (2000) *J Exp Med*. 191,1395-412.
17. Andersen PS, Stryhn A, Hansen BE, Fugger L, Engberg J, Buus S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1820-1824. 10
18. Chames,P., Hufton,S.E., Coulie,P.G., Uchanska-Ziegler,B. & Hoogenboom,H.R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 7969-7974.
19. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR, Adema GJ, Miki T, Rosenberg SA. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 6458-6462.
20. Bakker AB, Schreurs MW, de Boer AJ, Kawakami Y, Rosenberg SA, Adema GJ, Figdor CG. (1994) *J. Exp. Med*. 179, 1005-1009. 20
21. Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Sakaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Appella E, Rosenberg SA. (1995) *J Immunol*. 154, 3961-3968.
22. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL Jr. (1994) *Science* 264, 716-719.
23. Denkberg,G., Cohen,C.J., Segal,D., Kirkin,A.F. & Reiter,Y. (2000) *Eur. J Immunol*. 30, 3522-3532. 30
24. Denkberg, G., Cohen, C.J., & Reiter, Y. (2001) *J Immunol* 167,270-6.
25. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. [published erratum appears in *Science* 1998 Jun 19;280(5371):1821]. (1996) *Science* 274, 94-96. 40
26. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. (1997) *J Exp Med*. 185,2043-51.

27. Benhar, I, and Reiter, Y. *Curr. Protocols in Immunology* in press (2001)
28. Berdichevsky Y, Ben-Zeev E, Lamed R, Benhar I. (1999) *J Immunol Methods*. 228:151-62.
29. de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, de Bruine AP, Arends JW, Hoogenboom HR. (1999) *J Biol Chem*. 274,18218-30.
30. Brinkmann U, Pai LH, FitzGerald DJ, Willingham M, and Pastan I. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:8616-20.
31. Parkhurst MR, Salgaller ML, Southwood S, Robbins PF, Sette A, Rosenberg SA, Kawakami Y. (1996) *J Immunol*. 157:2539-48.
32. Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L. & Nadler, L.M. (1999) *Immunity*. 10, 673-679.
33. Carmon L, El-Shami KM, Paz A, Pascolo S, Tzehoval E, Tirosh B, Koren R, Feldman M, Fridkin M, Lemonnier FA, Eisenbach L. (2000) *Int J Cancer*. 85,391-7.
34. Bieganski K, Hollsberg P, Buckle GJ, Lim DG, Gretchen TF, Schneck J, Altman JD, Jacobson S, Ledis SL, Hanchard B, Chin J, Morgan O, Roth PA, Hafler DA. (1999) *J Immunol*. 162, 1765-1771.
35. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM. (1999) *Nat. Med*. 5, 677-685.
36. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ. (1998) *Science* 279, 2103-2106.
37. Lode, H.N., & Reisfeld, R.A. (2000) *Immunol Res*. 21,279-88.
38. Withoff, S., Helfrich, W., de Leij, LF., Molema, G. (2001) *Curr Opin Mol Ther*. 3,;53-62.
39. Reiter, Y., Di Carlo, A., Fugger, L., Engberg, J. & Pastan, I. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4631-4636.

10

20

30

40

40. Chowdhury, P.S., & Pastan, I. (1999) *Nat Biotechnol.* 17, 568-72.
41. Garboczi, D. N., D. T. Hung, and D. C. Wiley. 1992. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3429.
42. Mottez, E., P. Langlade-Demoyen, H. Gournier, F. Martinon, J. Maryanski, P. Kourilsky, and J. P. Abastado. 1995. Cells expressing a major histocompatibility complex class I molecule with a single covalently bound peptide are highly immunogenic. *J. Exp. Med.* 181:493. 10
43. Lone, Y-C., Motta, I., Mottez, E., Guilloux, Y., Lim, A., Demay, F., Levraud, J., Kourilsky, P., and Abastado, J., 1998. In vitro induction of specific cytotoxic T lymphocytes using recombinant single-chain class I/peptide complexes. *J. Immunother.* 21:283.
44. Mage MG, Lee L, Ribaud RK, Corr M, Kozlowski S, McHugh L, and Margulies DH 1992. A recombinant, soluble, single-chain class I major histocompatibility complex molecule with biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10658. 20
45. Lee L, McHugh L, Ribaud RK, Kozlowski S, Margulies DH, and Mage MG. 1994. Functional cell surface expression by a recombinant single-chain class I major histocompatibility complex molecule with a cis-active beta 2-microglobulin domain. *Eur. J. Immunol.* 24: 2633. 30
46. Matsumura, M., Y. Saito, M. R. Jackson, E. S. Song, and P. A. Peterson. 1992. In vitro peptide binding to soluble empty class I major histocompatibility complex molecules isolated from transfected *Drosophila melanogaster* cells. *J. Biol. Chem.* 267:23589.
47. Stern, L. J., and D. C. Wiley. 1992. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* 68:465. 40
48. Altman, J. D., P. A. Reay, and M. M. Davis. 1993. Formation of functional Peptide complexes of class II major histocompatibility complex

proteins from subunits produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10330.

49. Kozono, H., J. White, J. Clements, P. Marrack, and J. Kappler. 1994. Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature* 369:151.

50. White, J., Crawford, F., Fremont, D., Marrack, P., and Kappler, J. 1999. Soluble class I MHC with b-2 microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T-cell hybridoma. *J. Immunol.* 162: 2671

10

51. Ignatowicz, L., G. Winslow, J. Bill, J. Kappler, and P. Marrack. 1995. Cell Surface expression of class II MHC proteins bound by a single peptide. *J. Immunol.* 154:3852.

52. Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack. 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 84:521.

53. Uger, R. A., and B. H. Barber. 1998. Creating CTL targets with epitope-linked 2-microglobulin constructs. *J. Immunol.* 160:1598.

20

54. Cancer immunology immunotherapy 2001 50:3-15. A listing of human tumor antigens recognized by T cells.

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【 0 1 5 2 】

【図 1 a】組換え s c H L A - A 2 - ペプチド複合体に対するポリクローナルファージ E L I S A を示す棒グラフを示す。

【図 1 b】組換え s c H L A - A 2 - ペプチド複合体に対するポリクローナルファージ E L I S A を示す棒グラフを示す。

30

【図 2 a】s c H L A - A 2 / g p 1 0 0 複合体へのモノクローナルファージクローンの異なる結合を示す棒グラフを示す。

【図 2 b】s c H L A - A 2 / g p 1 0 0 複合体へのモノクローナルファージクローンの異なる結合を示す棒グラフを示す。

【図 3 a】抗体 G 1 s c F v の核酸配列（配列番号 8）およびアミノ酸配列（配列番号 9）を示す。

【図 3 a（Cont.）】抗体 G 1 s c F v の核酸配列（配列番号 8）およびアミノ酸配列（配列番号 9）を示す。

【図 3 b】精製 G 1 s c F v および G 1 s c F v - P E 3 8 の S D S - P A G E を示す。

40

【図 3 c】精製 G 1 s c F v および G 1 s c F v - P E 3 8 の S D S - P A G E を示す。

【図 4】G 1 s c F v - P E 3 8 の結合特異性を示す棒グラフである。

【図 5 a】T C R 様 G 1 s c F v の結合特性を証明するプロットを示す。

【図 5 b】T C R 様 G 1 s c F v の結合特性を証明するプロットを示す。

【図 6 a】G 1 s c F v の A P C への結合を証明するプロットを示す。

【図 6 b】G 1 s c F v の A P C への結合を証明するプロットを示す。

【図 6 c】G 1 s c F v の A P C への結合を証明するプロットを示す。

【図 7 a】ペプチド負荷 A P C に対する G 1 s c F v - P E 3 8 の細胞傷害活性を証明するプロットおよび棒グラフである。

【図 7 b】ペプチド負荷 A P C に対する G 1 s c F v - P E 3 8 の細胞傷害活性を証明

50

するプロットおよび棒グラフである。

【図7c】ペプチド負荷APCに対するG1 s c F v - P E 3 8の細胞傷害活性を証明するプロットおよび棒グラフである。

【配列表フリーテキスト】

【0153】

配列番号1はHLA-A2拘束性ペプチドgp100(154)の配列である。

配列番号2はHLA-A2拘束性ペプチドgp100(209)の配列である。

配列番号3はHLA-A2拘束性ペプチドgp100(280)の配列である。

配列番号4はHLA-A2拘束性ペプチドMUC1の配列である。

配列番号5はHLA-A2拘束性ペプチドHTLV-1(TAX)の配列である。

10

配列番号6はHLA-A2拘束性ペプチドhTE room temperature (540)の配列である。

配列番号7はHLA-A2拘束性ペプチドhTE room temperature (865)の配列である。

配列番号8はG1一本鎖Fv組換え抗体DNAの配列である。

配列番号9はG1一本鎖Fv組換え抗体タンパク質の配列である。

配列番号10はインフルエンザ由来のHLA拘束性ペプチドの配列である。

配列番号11はB型肝炎由来のHLA拘束性ペプチドの配列である。

【配列表】

20

## SEQUENCE LISTING

<110> Reiter , Yoram  
Denkberg, Galit

<120> ANTIBODY HAVING A T-CELL RECEPTOR-LIKE SPECIFICITY, YET HIGHER  
AFFINITY, AND THE USE OF SAME IN THE DETECTION AND TREATMENT OF CANCER, VIRAL  
INFECTION AND AUTOIMMUNE DISEASE

<130> 25595

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

10

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> HLA-A2-restricted peptide, gp100 (154)

<400> 1

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val  
1 5

20

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> HLA-A2-restricted peptide, gp100 (209)

<400> 2

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val  
1 5

30

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HLA-A2-restricted peptide, gp100 (280)

&lt;400&gt; 3

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val  
 1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HLA-A2-restricted peptide, MUC1

&lt;400&gt; 4

Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Leu  
 1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

20

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HLA-A2-restricted peptide, HTLV-1 (TAX)

&lt;400&gt; 5

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val  
 1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

30

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HLA-A2-restricted peptide, hTEroom temperature (540)

&lt;400&gt; 6

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu



1

5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; HLA-A2-restricted peptide, hT room temperature (865)

10

&lt;400&gt; 7

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val  
 1 5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 711

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

20

&lt;223&gt; G1 Single chain Fv-recombinant antibody DNA sequence

&lt;400&gt; 8

cagggtgaaac tgcaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60  
 tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120  
 ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta cacctaactat 180  
 ccagacagtg tgaaggggog attcaaccatc tcagagagca atgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagaggtaac 300  
 tgggaaggat ggtacttoga tgtctgggga caagggaacca oggtcaccgt ctctcaggt 360  
 ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cgaacatoga gctcactcag 420  
 totccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagagggtca ccatgacctg cagtgcacgc 480  
 tcaagtatac gttacatata ttggtaccaa cagaagcctg gatcctcccc cagactcctg 540  
 atttatgaca catccaaact ggctcctgga gtcccttttc gcttcagtgg cagtgggtct 600  
 gggacctctt attctctcac aatcaaccga atggaggctg aggatgctgc caattattac 660  
 tgcaggaggt ggagtgggta tccgtacacg ttccggagggg ggacaaagtt g 711

30

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 237

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; G1 single chain Fv- recombinant antibody protein sequence

&lt;400&gt; 9

Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asn Trp Glu Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
 130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
 145 150 155 160

Ser Ser Ile Arg Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser  
 165 170 175

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Val Ala Pro Gly Val Pro  
 180 185 190

Phe Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 195 200 205

Asn Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu Trp  
 210 215 220

10

20

30

Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 225 230 235

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Influenza derived HLA-restricted peptide

<400> 10

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu  
 1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Hepatitis B derived HLA-restricted peptide

<400> 11

Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln

1 5

【図 1 a】

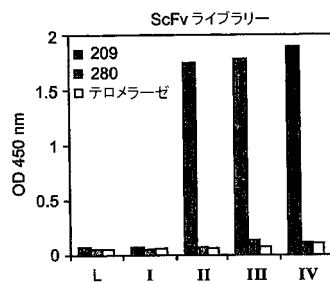


Fig. 1a

【図 1 b】

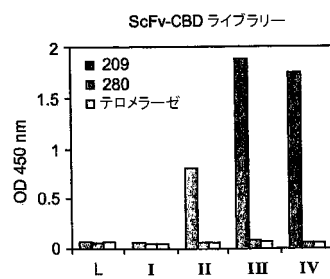


Fig. 1b

【図 2 a】

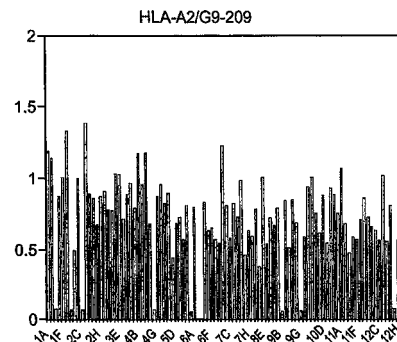


Fig. 2a

【図 2 b】

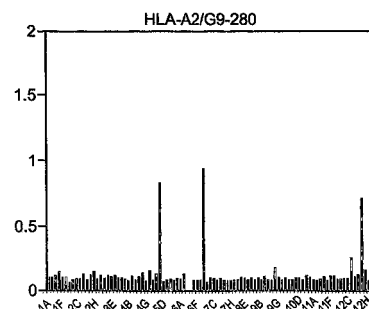


Fig. 2b

10

20

## 【図 3 a】

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14  
CAG GTG AAA CTG CAG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT SEQ ID NO:8  
gln val lys leu gln glu ser gly gly gly leu val lys pro SEQ ID NO:9

15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28  
GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACT  
gly gly ser leu lys leu ser cys ala ala ser gly phe thr

29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42  
TTC AGT ACC TAA GGC AAG TCT GGT GTT CCG CAG ACT CCA GAC  
phe ser ser tyr gly met ser trp val arg gln thr pro asp

43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56  
AAG AAG CTG GAG TGG GTC CCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT ACT  
lys arg leu glu trp val ala thr ile ser ser gly gly ser

57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70  
TAC ACC TAC TAA CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC  
tyr thr tyr tyr pro asp ser val lys gly arg phe thr ile

71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84  
TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AGC  
ser arg asp asn ala lys asn thr leu tyr leu gln met ser

85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98  
AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT GCA AGA  
ser leu lys ser glu asp thr ala met tyr tyr cys ala arg

99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112  
GGT AAG TGG GAA GGA TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG  
gly asn trp glu gly trp tyr phe asp val trp gly gln gly

113 114 115 116 117 118  
ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA  
thr thr val thr val ser ser gly gly gly gly ser gly gly

1 2 3 4 5 6  
GGT GGT TCT GGC GGT GGC GGA TCG AAC ATC GAG CTC ACT CAG  
gly gly ser gly gly gly gly ser asn ile leu leu thr gln

7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG CTC ACC  
ser pro ala ile met ser ala ser pro gly glu arg val thr

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34  
ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT ATA CCG TAC ATA TAT TGG  
met thr cys ser ala ser ser ser ile arg tyr ile tyr trp

35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48  
TAC CAA CAG AAG CCT GGA TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT  
tyr gln gln lys pro gly ser ser pro arg leu leu ile tyr

49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62  
GAC ACA TCC AAC GTG GCT CCT GGA CTC CCT TTT CGC TTC AGT  
asp thr ser asn val ala pro gly val pro phe arg phe ser

Fig. 3a

## 【図 3 a (Cont.)】

63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76  
GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC AAC CGA  
gly ser gly ser gly thr ser tyr ser leu thr ile asn arg

77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90  
ATG GAG GCT GAG GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG GAG TGG  
met glu ala glu asp ala ala thr tyr tyr cys gln glu trp

91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103  
AGT GGT TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACA AAG TTG  
ser gly tyr pro tyr thr phe gly gly gly thr lys leu

Fig. 3a ( 続き )

## 【図 3 b】

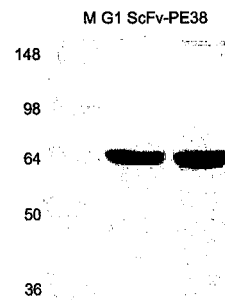


Fig. 3b

## 【図 3 c】

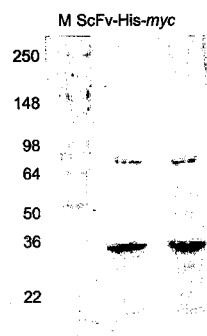


Fig. 3c

## 【図 5 a】

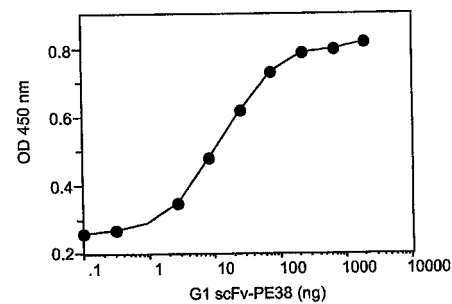


Fig. 5a

## 【図 5 b】

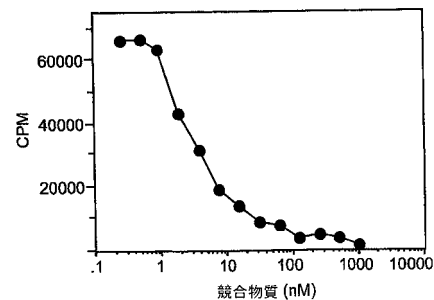


Fig. 5b

## 【図 4】

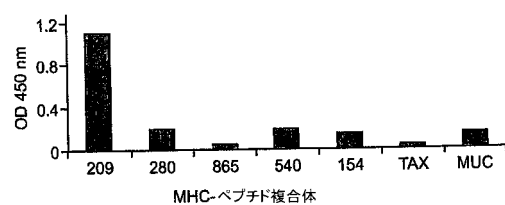
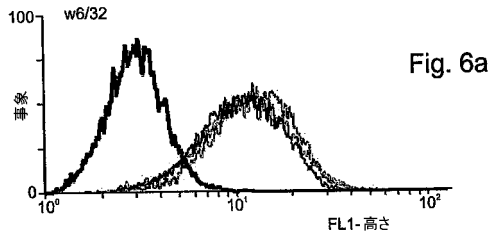
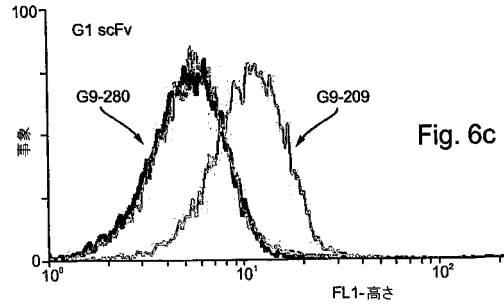


Fig. 4

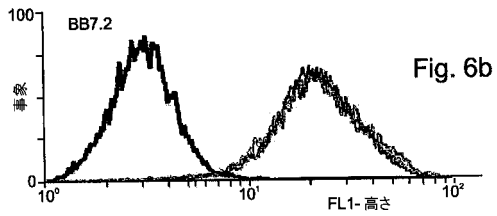
【図 6 a】



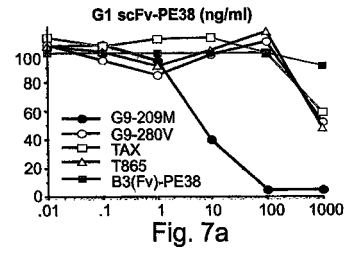
【図 6 c】



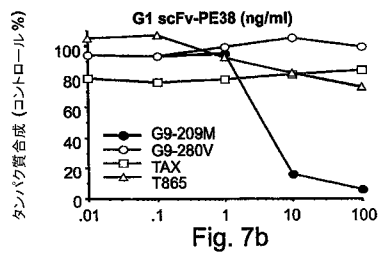
【図 6 b】



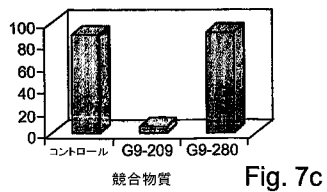
【図 7 a】



【図 7 b】



【図 7 c】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		A 6 1 P 35/00	
<b>G 0 1 N 33/569 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53	D
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/569	L
		G 0 1 N 33/574	A

(72)発明者 デンクベルグ, ガリト  
イスラエル, 36 001 ノフィット, ジルボア 63

審査官 高堀 栄二

(56)参考文献 特表平11-510375(JP,A)  
国際公開第01/072768(WO,A1)  
特表平04-505401(JP,A)  
国際公開第01/096401(WO,A1)  
特表2005-533486(JP,A)  
Eur.J.Immunol.,Vol.30,No.12(2000)p.3522-3532  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.94,No.9(1997)p.4631-4636  
J.Immunol.,Vol.169,No.8(2002.Oct.)p.4399-4407  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.99,No.14(2002.Jul.)p.9421-6  
Cancer Res.,Vol.62,No.20(2002.Oct.)p.5835-5844  
J.Immunol.,Vol.167,No.1(2001)p.270-276  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,Vol.97,No.14(2000)p.7969-7974  
Immunotechnology,Vol.4,No.3-4(1999)p.273-238

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
PubMed  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq

专利名称(译)	它具有T细胞受体样特异性和高亲和力抗体及其在癌症，病毒感染和自身免疫疾病的检测和治疗中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP4272535B2</a>	公开(公告)日	2009-06-03
申请号	JP2003567383	申请日	2003-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	技术研究及发展基金有限公司		
申请(专利权)人(译)	Technion工业研究与发展基金有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Technion工业研究与发展基金有限公司		
[标]发明人	レイテルヨラム デンクベルグガリト		
发明人	レイテル, ヨラム デンクベルグ, ガリト		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C12P21/08 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/574 A61K47/48 A61P31/12 A61P37/02 C07K7/06 C07K16/28 C12P21/02 C12Q1/02		
CPC分类号	C07K16/2833 A61K47/6849 A61K2039/505 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K16/18 C12P21/08 A61K39/395.L A61K39/395.T A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/569.L G01N33/574.A		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	10/073301 2002-02-13 US		
其他公开文献	JP2005521389A5 JP2005521389A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

# 摘要(译)

任选地含有能够特异性结合人类主要组织相容性复合物 (MHC) I类的抗体，其结合亲和力小于20纳摩尔，优选小于10纳摩尔，与HLA限制性抗原复合分离的分子，其进一步包含与抗体缀合的可识别的或治疗性的部分。

癌	TAA/ マーカー	HLA	引例
一過性細胞癌	ウロブラキン II	HLA-A2	WO 00/06723
一過性細胞癌	ウロブラキン Ia	HLA-A2	WO 00/06723
前立腺癌	前立腺特異的抗原	HLA-A2	WO 00/06723
前立腺癌	前立腺特異的膜抗原	HLA-A2	WO 00/06723
前立腺癌	前立腺酸ホスファターゼ	HLA-A2	WO 00/06723
乳癌	BA-46	HLA-A2	WO 00/06723
乳癌	Muc-1	HLA-A2	WO 00/06723
黒色腫	Gp100	HLA-A2	引例 54
黒色腫	MART1	HLA-A2	引例 54
全ての腫瘍	テロメラゼ	HLA-A2	引例 54
白血病	TAX	HLA-A2	引例 54
癌	NY-ESO	HLA-A2	引例 54
黒色腫	MAGE-A1	HLA-A2	引例 54
黒色腫	MAGE-A3	HLA-A24	引例 54
癌	HER2	HLA-A2	引例 54
黒色腫	β -カテニン	HLA-A24	引例 54
黒色腫	チロシナーゼ	HLA-DRB1	引例 54
白血病	Bcr-abl	HLA-A2	引例 54
頭頸部	カスパーゼ 8	HLA-B35	引例 54