

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-501781

(P2008-501781A)

(43) 公表日 平成20年1月24日(2008.1.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28 ZNA	4B024
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B063
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	4C085
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4H045
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395 E	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-526695 (P2007-526695)	(71) 出願人	504127647
(86) (22) 出願日	平成17年6月9日 (2005.6.9)		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
(85) 翻訳文提出日	平成19年2月9日 (2007.2.9)		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
(86) 国際出願番号	PCT/IL2005/000616	(74) 代理人	100103816
(87) 国際公開番号	W02005/120166		弁理士 風早 信昭
(87) 国際公開日	平成17年12月22日 (2005.12.22)	(74) 代理人	100120927
(31) 優先権主張番号	60/577,920		弁理士 浅野 典子
(32) 優先日	平成16年6月9日 (2004.6.9)	(72) 発明者	レイテル, ヨラム
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イスラエル, 34790 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】 細胞の選択的アポトーシスのための抗体

## (57) 【要約】

ナノモル範囲の親和性でMHC - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつアポトーシスをガン細胞または病原体感染細胞において誘導することができる組換え型の単離された抗体及びこれを含む医薬組成物が提供される。また、本発明の組換え型の単離された抗体を使用して対象においてガン又は病原体感染を処置又は診断する方法も提供される。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アポトーシスをガン細胞または病原体感染細胞において誘導する方法であって、細胞上に特異的に発現された M H C - ペプチド複合体と特異的に結合することができる組換え型の単離された抗体を細胞内で発現または接触させ、それによりアポトーシスをガン細胞または病原体感染細胞において誘導することを含む方法。

## 【請求項 2】

ガンまたは病原体感染を処置する方法であって、M H C - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、前記 M H C - ペプチド複合体を特異的に発現するガン細胞または病原体感染細胞のアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体の治療有効量をその必要性のある対象の細胞に投与するか、または、そのような組換え型の単離された抗体の治療有効量をその必要性のある対象の細胞内で発現させ、それにより対象におけるガンまたは病原体感染を処置することを含む方法。

10

## 【請求項 3】

M H C - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、前記 M H C - ペプチド複合体を特異的に発現するガン細胞または病原体感染細胞のアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体の、医薬品としての使用。

## 【請求項 4】

M H C - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、前記 M H C - ペプチド複合体を特異的に発現するガン細胞または病原体感染細胞のアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体の、ガンまたは病原体感染の処置のために特定された医薬品を製造するための使用。

20

## 【請求項 5】

M H C - ペプチド複合体を特異的に発現するガン細胞または病原体感染細胞において前記 M H C - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、前記ガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体を有効成分として含み、かつ、医薬的に許容され得るキャリアを含む、ガンまたは病原体感染を処置するための医薬組成物。

## 【請求項 6】

前記ガン細胞または病原体感染細胞におけるアポトーシスを前記投与後または前記発現後に検出することをさらに含む請求項 2 に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

前記アポトーシスを検出することが、ヨウ化プロピジウム F A C S 分析、アネキシン V F A C S 分析、エチジウムホモダイマー - 1 染色、生 / 死の生存性 / 細胞毒性アッセイ、および T u n n e l アッセイからなる群から選択される方法によって行われる請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記組換え型の単離された抗体が、F a b フラグメントおよび s c F v からなる群から選択される請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法、使用または医薬組成物。

## 【請求項 9】

前記組換え抗体は少なくとも二価である請求項 8 に記載の方法、使用または医薬組成物。

40

## 【請求項 10】

前記 s c F v は、9 H ( 配列番号 1 )、G 1 ( 配列番号 2 ) または C L A 1 2 ( 配列番号 1 7 ) である請求項 9 に記載の方法、使用または医薬組成物。

## 【請求項 11】

前記ペプチドは、M U C 1、g p 1 0 0、H T E R T、T A X および M A R T 1 からなる群から選択されるポリペプチドに由来する請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法、使用または医薬組成物。

## 【請求項 12】

50

前記組換え抗体は、配列番号 5 ~ 16 および配列番号 19 ~ 24 からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R を含む請求項 8 に記載の方法、使用または医薬組成物。

【請求項 13】

前記組換え抗体は I g G サブタイプである請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法、使用または医薬組成物。

【請求項 14】

前記ガンはメラノーマまたは乳ガンである請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法、使用または医薬組成物。

【請求項 15】

対象においてガンまたは病原体感染を診断する方法であって：

10

( a ) 対象の生物学的サンプルを、M H C - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、標的のガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体と、免疫複合体形成のために好適な条件のもとで接触させること；および

( b ) 前記免疫複合体形成を検出し、それにより対象においてガンまたは病原体感染を診断することを含む方法。

【請求項 16】

対象においてガンまたは病原体感染を診断する方法であって：

( a ) 対象の生物学的サンプルを、M H C - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、標的のガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体と、免疫複合体形成のために好適な条件のもとで接触させること；および

20

( b ) 前記生物学的サンプルの細胞におけるアポトーシスのレベルを検出し、それにより対象においてガンまたは病原体感染を診断することを含む方法。

【請求項 17】

対象においてガンまたは病原体感染を診断するためのキットであって、包装材、および、M H C - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、ガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体と、前記 M H C - ペプチド複合体との間での免疫複合体形成のために好適であるとして前記包装材によって特定される少なくとも 1 つの薬剤を含むキット。

30

【請求項 18】

前記ガン細胞または病原体感染細胞におけるアポトーシスのレベルを検出するために好適であるとして前記包装材によって特定される少なくとも 1 つの薬剤をさらに含む請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

前記組換え型の単離された抗体が、F a b フラグメントまたは s c F v である請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載の方法またはキット。

【請求項 20】

40

前記 s c F v は、9 H ( 配列番号 1 )、G 1 ( 配列番号 2 ) または C L A 1 2 ( 配列番号 17 ) である請求項 19 に記載の方法またはキット。

【請求項 21】

前記抗体は I g G サブタイプである請求項 15 ~ 17 のいずれかに記載の方法またはキット。

【請求項 22】

前記ガンはメラノーマまたは乳ガンである請求項 14 ~ 16 のいずれかに記載の方法またはキット。

【請求項 23】

ガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え抗

50

体。

【請求項 24】

ガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え抗体と、医薬的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物。

【請求項 25】

前記組換え抗体が、F a b フラグメントおよび s c F v フラグメントからなる群から選択される請求項 23 または 24 の組換え抗体または医薬組成物。

【請求項 26】

前記 s c F v は、配列番号 1 によって示されるような 9 H、配列番号 2 によって示されるような G 1 または配列番号 17 によって示されるような C L A 1 2 である請求項 25 に記載の組換え抗体または医薬組成物。

10

【請求項 27】

前記組換え抗体は、配列番号 5 ~ 16 および 19 ~ 24 からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R を含む請求項 23 または 24 のいずれかに記載の組換え抗体または医薬組成物。

【請求項 28】

配列番号 1 によって示されるような組換え 9 H s c F v。

【請求項 29】

配列番号 17 によって示されるような組換え C L A 1 2 s c F v。

【請求項 30】

配列番号 5 ~ 16 および配列番号 19 ~ 24 からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R を含む組換え抗体。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、M H C - ペプチド複合体を特異的に認識し、かつ、ペプチド特異的な M H C 拘束様式でアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体に関し、より具体的には、そのような組換え型の単離された T C R 様抗体を使用してガンまたは病原体感染を処置および診断する方法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

いくつかの表面受容体の連結がアポトーシスを誘導することが知られている。活性化された B 細胞では、F a s の連結により、アポトーシスが、数多くの特定の Caspase を活性化することによって誘導される。加えて、B 細胞受容体の架橋は、異なったアポトーシス経路を B 細胞発達の特定の段階で開始させる。

【0003】

主要組織適合性複合体クラス I (M H C - I) は、C D 8 1 T 細胞に対するペプチド提示のための枠組みとして作用することによってヒトの免疫系において中心的な役割を果たしている (Boon T. van der B. P., 1996)。近年では、様々な M H C - I 分子が、免疫応答の調節および微調整に關与する重要なシグナル変換分子として認められた。例えば、M H C - I の 3 ドメインの架橋により、アポトーシスが休止 B 細胞において誘導された一方で、抗 M H C - I 抗体 (A b) の B A L - 1 はアポトーシスを活性化 B 細胞において誘導した。T 細胞の M H C - I 連結により誘導されるアポトーシス経路は F a s のアポトーシス経路とは明らかに異なる一方で、B 細胞における M H C - I 架橋により誘導されるアポトーシス経路は完全には理解されていない。M H C - I 架橋に続く事象の 1 つが、細胞内カルシウムの可動化である。従って、抗 2 ミクログロブリン抗体 (A b) を使用した M H C - I 分子の架橋では、p 5 3 / 5 6 1 y n プロテインチロシンキナーゼおよび p 7 2 s y k プロテインチロシンキナーゼのタンパク質チロシンのリン酸化が生じ、これにより、細胞内カルシウムの増大がもたらされた (Nagy Z A 他、2002; Nagy Z A 他、2003; Longo, D. L., 2002; Vid 50

ovic D, Toral JI, 1998; Pedersen AE他、1999; Ruhwald M他、1999; Mori M他、1999; Genestier L他、1997; Genestier L他、1997; Skov S他、1997)。

#### 【0004】

腫瘍細胞に対する細胞性免疫応答を引き起こす機構を理解することにおける著しい進歩が、MHCにより呈示された腫瘍関連抗原の特徴づけ、および、免疫認識をモニターするために開発された適切な方法論の出現によって達成された[Altman他、1996; Boon、1996; Lee他、1999; Rosenbergs、2001; Renkvist他、2001]。細胞傷害性Tリンパ球は、抗原を、MHC-I分子に結合した短いペプチドとして認識する[KleinおよびSato、2000]。ほとんどのMHC-I提示ペプチドはプロテオソームによる細胞内タンパク質の分解に由来する[Niedermann、2002]。切断されたペプチドが、おそらくは、シャペロン熱ショックタンパク質によってERに入る前の完全な分解から保護されて、プロセシング分子(TAP)と会合した輸送体によって小胞体(ER)の内腔に輸送される。切り取られたペプチドがER内の組み立てられたMHC-I分子の溝に結合し、その後、この複合体が細胞表面に輸送される[Yewdell、2001; YewdellおよびBennink、2001]。ペプチドの選択および細胞表面でのペプチド提示は様々な要因(例えば、細胞内区画における内因性または外因性のタンパク質の存在、細胞内区画におけるそのようなタンパク質の適切な分解、特定のHLA分子の溝に結合する分解されたペプチドの能力、および、細胞表面へのそのような分子の成功した輸送など)に依存する。

10

20

#### 【0005】

いくつかの研究では、患者の免疫系が効果的な免疫応答を腫瘍に対して誘発できないことは、多くの場合、抗原提示が良好でないためであることが明らかにされた[Restifo他、1993; Seliger他、2000]。

#### 【0006】

マクロファージ、樹状細胞、腫瘍細胞またはウイルス感染細胞の表面におけるMHC-ペプチド提示を研究するために、組換え型の可溶性T細胞受容体(TCR)が大腸菌で産生された。しかしながら、そのようなTCRは、不安定性、および、リガンドに対する固着的に低い親和性を示した[WulfingおよびPluckthun、1994]。従って、TCRと同じ特異性を伴って腫瘍関連のMHC-ペプチド複合体を認識する抗体は、腫瘍細胞による抗原提示を研究するための有益な試薬、細胞上のMHC-ペプチド複合体を可視化するための有益な試薬、および、究極的には、免疫治療期間中の特定の複合体の発現をモニターするための有益な試薬であることが認められた。加えて、そのような抗体は、組換え免疫毒素、サイトカイン分子との融合体を構築する際における標的化試薬のための良好な候補として、または、二重特異的抗体治療のための良好な候補として役立つ。

30

#### 【0007】

クラスIのペプチド-MHC複合体を特異的に認識する様々な抗体がマウス系で調製された[Murphy他、1989; Aharoni他、1991; Andersen他、1996; Reiter他、1997; Porgador他、1997; Day他、1997; Dadaglio他、1997; Zhong他、1997a; Zhong他、1997b; Krogsgaard他、2000; Polakova他、2000]。しかしながら、そのような絶妙なT細胞受容体様特異性を有する抗体は、ファージディスプレイライブラリーからのインピット選択との組合せでさえ、従来のハイブリドーマ技術または免疫化法を使用して作製することが困難であることが判明している。非常に大きい非免疫ファージ抗体ライブラリーからのそのような抗体の直接的な選択が最近になって明らかにされたにすぎない[Chames他、2000; Proc. Natl. Acad. Sci. USA、97(14):7969~74]。この経路を使用して、メラノーマ抗原MAGE-A1をヒトHLA-A1 MHC分子との複合体で認識するファージディスプレイ由来のFabが単離された(すなわち、ファージ結合型)。しかしながら、そのような抗

40

50

体 ( G 8 ) は 2 5 0 n M の 範 囲 で M H C 複 合 体 に 対 す る 低 い 親 和 性 を 示 し た ( C h a m e s P . 他、 2 0 0 2、 J . I m m u n o l .、 1 6 9 : 1 1 1 0 ~ 8 ) 。 親 和 性 が 低 い こと の 制 約 を 克 服 す る た め に、 C h a m e s P . 他 ( 2 0 0 2 ; J . I m m u n o l .、 1 6 9 : 1 1 1 0 ~ 8 ) は、 イ ン ビ ト ロ 操 作 し た G 8 抗 体 を 発 現 す る T 細 胞 を 移 植 し、 細 胞 特 異 的 な 抗 体 を 調 製 し た。 し か し な が ら、 そ の よ う な 抗 体 は、 患 者 個 々 に 基 づ く 遺 伝 子 治 療 操 作 を 必 要 と す る た め、 ガ ン ま た は 病 原 体 感 染 を 処 置 す る た め に 実 際 的 で は な い。

#### 【 0 0 0 8 】

本 発 明 者 ら は、 T C R 様 抗 体 を、 メ ラ ノ マ 分 化 A g の g p 1 0 0 に 由 来 す る ペ プ チ ド と 複 合 体 形 成 し た 安 定 な 単 鎖 H L A - A 2 - 2 分 子 に よ り 免 疫 化 さ れ た H L A - A 2 ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク マ ウ ス か ら 構 築 さ れ た マ ウ ス s c F v フ ザ ー ジ デ ィ ス プ レ ー ラ イ ブ ラ リ ー か ら 以 前 に 単 離 し て い る ( D e n k b e r g G . 他、 T h e J o u r n a l o f I m m u n o l o g y、 2 0 0 3 ; 1 7 1 ( 5 ) : 2 1 9 7 ~ 2 0 7 ) 。 先 行 技 術 の 試 み と は 対 照 的 に、 こ の 可 溶 性 の 分 泌 型 s c F v 組 換 え 抗 体 ( G 1 ) は、 T C R の 特 異 性 と 同 様 な ペ プ チ ド 特 異 的 な M H C 拘 束 様 式 で H L A - A 2 - G 9 - 2 0 9 複 合 体 に 対 す る 高 い 親 和 性 ( ナ ノ モ ル 濃 度 の 範 囲 内、 例 え ば、 5 n M ) を 示 し た ( D e n k b e r g G .、 2 0 0 3、 上 掲 ) 。

10

#### 【 0 0 0 9 】

本 発 明 を 実 施 に 移 し て い る と き、 本 発 明 者 ら は、 M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 を 特 異 的 に 認 識 す る 単 離 さ れ た 組 換 え 抗 体 は 強 力 な ア ポ ト ー シ ス 誘 導 剤 と し て 使 用 す る こ と が で き、 従 っ て、 ガ ン ま た は 病 原 体 感 染 を 処 置 す る こ と が で き る こ と を 発 見 し て い る。

20

#### 【 発 明 の 開 示 】

#### 【 0 0 1 0 】

本 発 明 の 1 つ の 態 様 に よ れ ば、 ア ポ ト ー シ ス を ガ ン 細 胞 ま た は 病 原 体 感 染 細 胞 に お い て 誘 導 す る 方 法 が 提 供 さ れ、 こ の 場 合、 こ の 方 法 は、 細 胞 上 に 特 異 的 に 発 現 さ れ た M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 と 特 異 的 に 結 合 す る こ と が で き る 組 換 え 型 の 単 離 さ れ た 抗 体 を 細 胞 内 で 発 現 ま た は 接 触 さ せ、 そ れ に よ り、 ア ポ ト ー シ ス を ガ ン 細 胞 ま た は 病 原 体 感 染 細 胞 に お い て 誘 導 す る こ と を 含 む。

#### 【 0 0 1 1 】

本 発 明 の 別 の 態 様 に よ れ ば、 ガ ン ま た は 病 原 体 感 染 を 処 置 す る 方 法 が 提 供 さ れ、 こ の 場 合、 こ の 方 法 は、 M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 と 特 異 的 に 結 合 す る こ と が で き、 か つ、 そ の M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 を 特 異 的 に 発 現 す る ガ ン 細 胞 ま た は 病 原 体 感 染 細 胞 の ア ポ ト ー シ ス を 誘 導 す る こ と が で き る 組 換 え 型 の 単 離 さ れ た 抗 体 の 治 療 有 効 量 を そ の 必 要 性 の あ る 対 象 の 細 胞 に 投 与 す る か、 ま た は、 そ の よ う な 組 換 え 型 の 単 離 さ れ た 抗 体 の 治 療 有 効 量 を そ の 必 要 性 の あ る 対 象 の 細 胞 内 で 発 現 さ せ、 そ れ に よ り、 対 象 に お け る ガ ン ま た は 病 原 体 感 染 を 処 置 す る こ と を 含 む。

30

#### 【 0 0 1 2 】

本 発 明 の さ ら に 別 の 態 様 に よ れ ば、 M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 と 特 異 的 に 結 合 す る こ と が で き、 か つ、 そ の M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 を 特 異 的 に 発 現 す る ガ ン 細 胞 ま た は 病 原 体 感 染 細 胞 の ア ポ ト ー シ ス を 誘 導 す る こ と が で き る 組 換 え 型 の 単 離 さ れ た 抗 体 の、 医 薬 品 と し て の 使 用 が 提 供 さ れ る。

40

#### 【 0 0 1 3 】

本 発 明 の な お さ ら に 別 の 態 様 に よ れ ば、 M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 と 特 異 的 に 結 合 す る こ と が で き、 か つ、 そ の M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 を 特 異 的 に 発 現 す る ガ ン 細 胞 ま た は 病 原 体 感 染 細 胞 の ア ポ ト ー シ ス を 誘 導 す る こ と が で き る 組 換 え 型 の 単 離 さ れ た 抗 体 の、 ガ ン ま た は 病 原 体 感 染 の 処 置 の た め に 特 定 さ れ た 医 薬 品 を 製 造 す る た め の 使 用 が 提 供 さ れ る。

#### 【 0 0 1 4 】

本 発 明 の な お さ ら に 別 の 態 様 に よ れ ば、 M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 を 特 異 的 に 発 現 す る ガ ン 細 胞 ま た は 病 原 体 感 染 細 胞 に お い て そ の M H C - ペ プ チ ド 複 合 体 と 特 異 的 に 結 合 す る こ と が で き、 か つ、 そ の ガ ン 細 胞 ま た は 病 原 体 感 染 細 胞 に お い て ア ポ ト ー シ ス を 誘 導 す る こ と が で き る 組 換 え 型 の 単 離 さ れ た 抗 体 を 有 効 成 分 と し て 含 み、 か つ、 医 薬 的 に 許 容 さ れ 得

50

るキャリアを含む、ガンまたは病原体感染を処置するための医薬組成物が提供される。

【0015】

本発明のさらなる態様によれば、対象においてガンまたは病原体感染を診断する方法が提供され、この場合、この方法は、(a)対象の生物学的サンプルを、MHC-ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、標的のガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体と、免疫複合体形成のために好適な条件のもとで接触させること；および(b)免疫複合体形成を検出し、それにより、対象においてガンまたは病原体感染を診断することを含む。

【0016】

さらに本発明のさらなる態様によれば、対象においてガンまたは病原体感染を診断する方法が提供され、この場合、この方法は、(a)対象の生物学的サンプルを、MHC-ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、標的のガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体と、免疫複合体形成のために好適な条件のもとで接触させること；および(b)生物学的サンプルの細胞におけるアポトーシスのレベルを検出し、それにより、対象においてガンまたは病原体感染を診断することを含む。

【0017】

なおさらに本発明のさらなる態様によれば、対象においてガンまたは病原体感染を診断するためのキットが提供され、この場合、このキットは、包装材料、および、MHC-ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、ガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体と、該MHC-ペプチド複合体との間での免疫複合体形成のために好適であるとして該包装材料によって特定される少なくとも1つの薬剤を含む。

【0018】

本発明のさらなる態様によれば、ガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え抗体が提供される。

【0019】

さらに本発明のさらなる態様によれば、ガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え抗体と、医薬的に許容され得るキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【0020】

なおさらに本発明のさらなる態様によれば、配列番号1によって示されるような組換え9H<sub>1</sub>scFvが提供される。

【0021】

なおさらに本発明のさらなる態様によれば、配列番号17によって示されるような組換えCLA12<sub>1</sub>scFvが提供される。

【0022】

なおさらに本発明のさらなる態様によれば、配列番号5~16および配列番号19~24からなる群から選択される少なくとも1つのCDRを含む組換え抗体が提供される。

【0023】

下記に記載される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、本発明の方法はさらに、ガン細胞または病原体感染細胞におけるアポトーシスを接触後または発現後に検出することを含む。

【0024】

さらに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、アポトーシスを検出することが、ヨウ化プロピジウムFACS分析、アネキシンV FACS分析、エチジウムホモダイマー-1染色、生/死の生存性/細胞毒性アッセイ、および、Tunnelアッセイからなる群から選択される方法によって行われる。

【0025】

なおさらに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、組換え型の単離

された抗体が、F a bフラグメントおよびs c F vからなる群から選択される。

【0026】

なおさらに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、組換え抗体は少なくとも二価である。

【0027】

なおさらに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、s c F vは、9 H (配列番号1)、G 1 (配列番号2)またはC L A 1 2 (配列番号17)である。

【0028】

なおさらに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、ペプチドは、M U C 1、g p 1 0 0、H T E R T、T A XおよびM A R T 1からなる群から選択されるポリペプチドに由来する。 10

【0029】

なおさらに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、組換え抗体は、配列番号5 ~ 16および配列番号19 ~ 24からなる群から選択される少なくとも1つのC D Rを含む。

【0030】

なおさらに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、組換え抗体はI g Gサブタイプである。

【0031】

なおさらに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、ガンはメラノーマまたは乳ガンである。 20

【0032】

なおさらに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、キットはさらに、ガン細胞または病原体感染細胞におけるアポトーシスのレベルを検出するために好適であるとして包装材料によって特定される少なくとも1つの薬剤を含む。

【0033】

本発明者らは、アポトーシスをガン細胞または病原体感染細胞において誘導する方法を提供することによって、現在知られている形態の欠点に対処することに成功している。

【0034】

別途定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術的用語および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法および材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。 30

【0035】

#### 図面の説明

本明細書では本発明を単に例示し図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の好ましい実施態様を例示考察することだけを目的としており、本発明の原理や概念の側面の最も有用でかつ容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために提示していることを強調するものである。この点について、本発明を基本的に理解するのに必要である以上に詳細に本発明の構造の詳細は示さないが、図面について行う説明によって本発明のいくつもの形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。 40

図1は抗原提示細胞に対するT C R様抗体の結合を示す(図1 a ~ 図1 f)。図1 a ~ 1 c : R M A S - H H D細胞に、G 9 - 2 0 9 (図1 a)、G 9 - 2 8 0 (図1 b)およびG 9 - 1 5 4 (図1 c)のメラノーマ分化抗原g p 1 0 0由来のH L A - A 2拘束ペプチド、または、コントロールのH L A - A 2ペプチド(図1 a ~ 図1 c)を負荷した。ペプチド負荷細胞を下記の特異的な可溶性の精製s c F v抗体とインキュベーションした：s c F v 1 A 7 (G 9 - 2 0 9に対して特異的；図1 a)、s c F v 2 F 1 (G 9 - 50

280に対して特異的)およびFab G2D12(G9-154に対して特異的)。抗体結合を、FITC標識の抗ヒトFabフラグメントを使用して検出した。図1d~図1f: Fab M3A1四量体を使用する細胞表面でのHLA-A2/MUC1-D6(MUC=ムチン)複合体。JY細胞(図1d)、MDA-MB-231乳ガン細胞(図1e)またはHLA-A2<sup>+</sup>成熟樹状細胞(DC;図1f)をムチン由来のMUC1-D6 HLA-A2拘束ペプチドでパルス処理した。その後、ペプチドパルス処理細胞をHLA-A2/MUC1-D6に特異的なシュードモナス菌体外毒素(PE)標識のM3A1四量体抗体または単量体抗体とインキュベーションした。Fab単量体の結合をPE標識の抗ヒトFabにより検出した。コントロール=非負荷細胞(M3A1四量体により染色)

10

図2は天然に存在する活性な細胞内プロセシングの後におけるTCR様抗体による特異的なHLA-A2/ペプチド複合体の検出を示す(図2a~図2i)。JY HLA-A2<sup>+</sup>のAPC(図2a)またはAPD HLA-A2<sup>-</sup>のAPC(図2b)を、pCDNAコントロールベクターで、または、無傷の全長HTLV-1由来Tax遺伝子を含むpCDNA(pCTAX)でトランスフェクションした。このウイルス転写因子遺伝子のプロセシングは、HLA-A2拘束ペプチドエピトープTax<sub>11-19</sub>の生成をもたらすことが示された。トランスフェクション後12時間~24時間で、細胞を、HLA-A2/Tax<sub>11-19</sub>特異的Fab T3F2、または、メラノーマ分化抗原gp100のエピトープG9-154に特異的なコントロールのG2D12 TCR様Fabを使用するフローサイトメトリーによって染色した。JY細胞またはAPD細胞へのTax遺伝子の形質導入の効率を、GFP遺伝子を有するpCDNAのトランスフェクションによってモニターした(データは示されず)。図2c: HLA-A2<sup>+</sup> RSCD4細胞およびHLA-A2<sup>-</sup> HUT102細胞(これらは、HTLV-1が感染したヒトCD4<sup>+</sup>

20

T細胞の系統である)を、示されたようにPE標識のFab四量体T3F2およびコントロールG2D12で染色した。図2d~図2i: 活性な細胞内プロセシングの後におけるHLA-A2/Tax複合体の免疫組織化学的染色。JY HLA-A2<sup>+</sup>のAPCまたはHLA-A2<sup>-</sup>のAPD APCを、Tax遺伝子を含むpCDNA発現ベクター(図2d、図2e、図2g、図2h)、または、発現ベクター単独(図2f、図2i)でトランスフェクションした。トランスフェクション後12時間~24時間で、細胞をポリ-L-リシン被覆ガラス製スリップに吸着させ、HLA-A2/Tax特異的Fab T3F2(図2d、図2e、図2f、図2h、図2i)、または、メラノーマgp100のHLA-A2/G9-154エピトープに特異的なTCR様Fab G2D12(図2g)で染色した。図2eは、図2dに示された像(x40)の拡大(x60)である。

30

図3はフローサイトメトリーによって測定されたときの、ペプチドパルス処理されたJY APC(図3a~図3c)、メラノーマFM3D細胞(図3d~図3f)またはkb3-1細胞(図3g~図3h)に対するg1scFvの結合を示す。細胞を、示されるようなG9-280ペプチド、G9-209ペプチド、G9-209Mペプチド、または、Tax HLA-A2拘束ペプチドにより37°Cで3時間パルス処理した。黒色=非負荷細胞。図3a~図3c: 細胞にG9-209MペプチドおよびG9-280ペプチドを負荷し、細胞を可溶性の精製G1 scFv抗体(図3c)、抗HLA抗体W6/32(図3a)または抗HLA-A2抗体BB7.2(図3b)とインキュベーションした。結合した抗体を、FITC標識の抗Myc抗体を使用して検出した。W6/32抗体およびBB7.2抗体はともに細胞表面のHLA-ペプチド複合体を検出した一方で(図3aおよび図3b)、G1抗体は、HLA-G9-280複合体ではなく、HLA-G9-209M複合体を特異的に検出したこと(図3c)に留意すること。図3d~図3f: メラノーマFM3D細胞を、G9-209M(図3e)、G9-209(図3f)またはコントロールG9-280(図3d、図3eおよび図3f)のgp100由来ペプチドでパルス処理し、続いて、BB7.2抗HLA-A2抗体(図3d)またはG1 scFv抗体(図3e、図3f)で染色した。BB7.2抗体は、G9-280コントロールペプチドでパルス処理された細胞を検出した一方で(図3d)、G1抗体は、G9-209(図3f)

40

50

またはG9-209M(図3e)でパルス処理された細胞を特異的に検出したことに留意すること。変異型G9-209Mペプチドが負荷されたG1陽性細胞の割合が、G9-209ペプチドが負荷された細胞の割合よりも著しく大きかったことにもまた留意すること。図3g~図3h、HLA-A2陰性KB3-1細胞をG9-209MまたはG9-280のgp100由来ペプチドでパルス処理し、BB7.2抗体(図3g)またはG1scFv抗体(図3h)で染色した。内因性HLA-A2分子を有しない細胞における染色細胞の非存在に留意すること。

図4はG1scFv抗体によるメラノーマ細胞の染色を示す免疫組織化学分析である(図4a~図4g)。HLA-A2陽性のgp100発現メラノーマ細胞(FM-3-29、M-ww、M-PAT、M-141、FM3-D;図4a~図4dおよび図4f)またはHLA-A2陰性のgp100発現メラノーマ細胞(G-43;図4e)、あるいは、コントロール乳ガン細胞(MDA-MB-231;図4g)をG1scFv抗体で染色した。細胞(5x10<sup>6</sup>個)を、10%ウシ胎児血清(FCS)を含有するRPMI培養培地において20μg~30μgのG1scFvと氷上で1時間インキュベーションし、その後、HRP-抗Myc抗体と氷上で45分間インキュベーションした。細胞懸濁物を、記載されたように(HarlowおよびLane、1988)、0.1%のポリ-L-リシン(Sigma)で被覆されたガラス製スライドガラスに載せた。その後、細胞を室温で1時間インキュベーションし、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)により3回洗浄し、DAB+溶液(Dako)と1分間インキュベーションし、その後、過剰な染色試薬をPBSにより洗い流した。細胞の核をヘマトキシリン(Sigma)により染色した。FM3-D、FM-3-29、M-ww、M-PAT、M-141およびG-43はメラノーマ患者由来のメラノーマ細胞株である;MDA-MB-231は乳ガン患者由来の細胞株である。

図5はペプチドパルス処理されたAPCに対するG1scFvの細胞毒性を示すFACS分析である(図5a~図5d)。RMAS-HHD(示されず)およびJYのAPCにG9-209またはコントロールのTaxペプチドを負荷した。ペプチド負荷細胞を続いて、25μg~50μgのG1scFvとインキュベーションし(図5cおよび図5d)、または、未処理のままにした(図5aおよび図5b)。細胞を抗アネキシンV(初期アポトーシスについてのマーカー)およびヨウ化プロピジウム(PI)で染色し、フローサイトメトリーに供した。G9-209ペプチドが負荷された細胞においてG1scFv抗体の存在下でのアネキシンV標識細胞(図5c)が、コントロールのTaxペプチドが負荷された細胞(図5d)と比較して著しく増大していることに留意すること。G1scFv抗体の非存在下では、アネキシンCの標識化における差が、G9-209が負荷された細胞(図5)と、コントロールのTaxペプチドが負荷された細胞との間で観測されないことにもまた留意すること。

図6はメラノーマ細胞に対する、G1scFv抗体を用いた細胞毒性アッセイを示すグラフである。様々なメラノーマ細胞株[HLA-A2+/gp100+の細胞(526、501、624)、HLA-A2-/gp100+の細胞(G-43)およびHLA-A2+/gp100-の細胞(1938)]を、増大する濃度のG1scFv抗体とインキュベーションし、タンパク質合成の阻害を、細胞タンパク質内への<sup>3</sup>H-ロイシンの取り込みを測定することによって求めた。IC<sub>50</sub>を、タンパク質合成を50%阻害するために要求されるG1scFvの濃度として求めた。IC<sub>50</sub>が、526、624および501Aのメラノーマ細胞株については60μg/mLであることが見出された。これらの結果は、TCR様抗体がメラノーマ標的細胞においてアポトーシスを誘導することができることを明らかにしている。

図7はペプチドパルス処理されたAPCに対するG1scFv-PE38の細胞傷害活性を示すグラフである(図7a~図7c)。TCR様抗体G1をシュードモナス菌体外毒素(PE)Aの短縮化型PE38に融合した。RMAS-HHD細胞(図7a)またはJY細胞(図7b)に、gp100に由来するG9-209MおよびG9-280VのHLA-A2拘束ペプチド、T865ペプチド(テロメラーゼ触媒サブユニットに由来する

10

20

30

40

50

)、TAXペプチド(HTLV-1のTaxタンパク質に由来する)、または、B3(Fv)-PE38(Lewis Y抗原に対するコントロールの非特異的免疫毒素)を負荷した。ペプチド負荷細胞を、増大する濃度のG1 scFv-PE38とインキュベーションした。タンパク質合成を細胞タンパク質内への<sup>3</sup>H-ロイシンの取り込みによって求めた。特異的な毒性が、特異的なHLA-G9-209複合体の存在下でG9-209Mペプチドが負荷された細胞において観測されたことに留意すること。図7c:過剰な(0.15mg/mL~0.25mg/mL)の示されたscHLA-A2-ペプチド複合体がG1 scFv-PE38(25ng/mL~50ng/mL)の添加前にウェルに加えらる。コントロールではMHC-ペプチド複合体を添加しなかった。scHLA-A2-G9-209複合体を発現する細胞におけるタンパク質合成の完全な阻害に留意すること。 10

図8はTCR様抗体の内在化(図8a~図8c)およびメラノーマ細胞の殺傷(図8d~図8e)を示す免疫染色(図8a~図8c)およびグラフ(図8d~図8e)である。図8a~図8c:gp100の280エピトープを標的化するTCR様抗体2F1 scFvをシュードモナス菌体外毒素(PE)Aの短縮化型PE38に融合し、FITCで標識した。蛍光を、37において、時間0(図8a)、15分(図8b)および360分(図8c)で共焦点顕微鏡によって追った。キャッピングが15分後および360分後に観測され、効率的な内在化を示す著しい蛍光が細胞質において観測された。図8d~図8e:様々な患者に由来するメラノーマ細胞株の(細胞タンパク質内への<sup>3</sup>H-ロイシンの取り込みを測定することによって追跡された)タンパク質合成に対する、gp100に向けられた2F1(図8d)、または、MART1由来のHLA-A2/ペプチド複合体に向けられたCLA12 scFv(図8e)の影響を示すグラフ。タンパク質合成の阻害を、抗体処理を受けなかった細胞の百分率として計算した。すべてのHLA-A2+/gp100+のメラノーマ細胞(526、501A、624.38)が2F1の細胞毒性に対して感受性であった一方で、HLA-A2-/gp100+のメラノーマ細胞株(G-43)またはHLA-A2+/gp100-のメラノーマ細胞株(1938)は抗体処理に対して抵抗性であったこと(図8d)に留意すること。比較のために、G-43細胞の細胞合成の阻害ではなく、624-38細胞および526細胞の細胞合成の阻害に対するCLA12抗体(配列番号17)の影響(図8e)に留意すること。 20

図9はネイクド(毒素非含有)TCR様抗体scFvフラグメントにより誘導されたメラノーマ細胞の細胞死を示すFACS分析である(図9a~図9j)。図9a~図9h:HLA-A2+/抗原性ペプチド+の細胞(図9e~図9h)、HLA-A2-/抗原性ペプチド+の細胞(図9c~図9d)、または、HLA-A2+/抗原性ペプチド-の細胞(図9a~図9b)を、gp100由来ペプチドに向けられたネイクドTCR様抗体フラグメントの2F1(図9aおよび図9c)、9H(図9bおよび図9g)およびG1(図9f)、MART1由来ペプチドに向けられたCLA12ネイクドTCR様抗体(図9dおよび図9e)、または、1A7コントロール抗体(これはHLA-A2-G9-209Mに対して特異的であるが、HLA-A2-G9-209複合体を認識しない)で処理した。細胞死の測定をヨウ化プロピジウム(PI)フローサイトメトリー染色によって行い、PI陽性細胞の割合を示す。図9i~図9j:gp100+/HLA-A2+のメラノーマ細胞(624)をG1抗体(これはHLA-A2-G9-209複合体に対して特異的である)(図9j)またはコントロール抗体1A7(図9i)とインキュベーションした。細胞死の測定をヨウ化プロピジウム(PI)およびアネキシンVのフローサイトメトリー染色によって行い、陽性細胞の割合を示す。 30

図10は完全なIgG分子へのTCR様抗体scFvフラグメントの転換、メラノーマ細胞における細胞死の誘導を示すフロ-サイトメトリー分析である(図10a~図10d)。gp100のHLA-A2/G9-209ペプチドを標的化するTCR様抗体9Hを完全なIgG分子に転換し、ペプチドパルス処理されたJY細胞に対するその反応性を調べた(図10a~図10d)。4つの異なるトランスフェクションされたクローンが示される:1-40(図10a)、1-35(図10b)、1-12(図10c)および1- 40

65 (図10d)。赤色：G9-209、緑色：EBV、青色：Muc1、紫色：Tax、黒色：CMV。コントロールは様々なHLA-A2拘束ペプチド(Tax、EBV、Muc1、CMV)である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

本発明は、MHC-ペプチド複合体を発現する細胞におけるアポトーシスをペプチド特異的なMHC拘束様式で誘導する方法に関する。具体的には、本発明は、MHC-ペプチド複合体とナノモル濃度の範囲での親和性を伴って特異的に結合することができるネイクド型の毒素非含有かつ非常に強力な抗体を使用してガンまたは病原体感染を診断および処置するために使用することができる。

10

【0037】

本発明に従ってガンまたは病原体感染を診断および処置する方法の原理および操作は、図面および付随する説明を参照してより良く理解される。

【0038】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳しく説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明において示される細部、または、実施例によって例示される細部に限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、または、様々な方法で実施することができ、または、様々な方法で実施される。また、本明細書中で用いられる表現法および用語法は記述のためであって、限定であると見なしてはならないことを理解しなければならない。

20

【0039】

主要組織適合性複合体クラスI(MHC-I)は、CD8<sup>+</sup>T細胞に対するペプチド提示のための枠組みとして作用することによってヒトの免疫系において中心的な役割を果たしている(Boon T. van der B. P., 1996)。MHC複合体(HLA-A2-2ミクログロブリン)によって提示されるペプチドは、プロテアソームを介して得られる、様々な内因的に発現したタンパク質、外因性タンパク質(例えば、病原体(例えば、ウイルスまたは細菌など)に由来するタンパク質)および/またはガン関連タンパク質(例えば、gp100メラノーマ分化タンパク質)の分解産物である。MHC-ペプチド複合体は、その後、細胞傷害性Tリンパ球によって抗原として認識される[KleinおよびSato, 2000]。

30

【0040】

マクロファージ、樹状細胞、腫瘍細胞またはウイルス感染細胞の表面におけるMHC-ペプチド提示を研究するために、可溶性のT細胞受容体(TCR)が大腸菌で産生された。しかしながら、そのようなTCRは不安定であり、そのリガンドに対する低い親和性を示した[WulfingおよびPluckthun, 1994]。いくつかの研究では、TCR様抗体をマウス系で調製することが試みられた[Murphy他, 1989; Aharoni他, 1991; Andersen他, 1996; Reiter他, 1997; Porgador他, 1997; Day他, 1997; Dadaglio他, 1997; Zhong他, 1997a; Zhong他, 1997b; Krogsgaard他, 2000; Polakova他, 2000]。しかしながら、絶妙なT細胞受容体様特異性を有する抗体は、ファージディスプレイライブラリーからのインビトロ選択との組合せでさえ、従来のハイブリドーマ技術または免疫化法を使用して作製することが困難であることが判明している。非常に大きい非免疫ファージ抗体ライブラリーからのそのような抗体の直接的な選択が最近になって明らかにされたにすぎない[Chames P.他, 2000, 上掲]。この経路を使用して、メラノーマ抗原MAGE-A1をヒトHLA-A1 MHC分子との複合体で認識するファージクローン(G8)が単離された。しかしながら、MHC-ペプチド複合体に対するこのG8ファージの親和性は比較的低かった(250nM)。親和性が低いことの制約を克服するために、Chames P.他(2002; J. Immunol., 169:1110-8)は、インビトロ操作したG8抗体をT細胞に埋め込み、細胞特異的な抗体を調製した。しかしながら、そのような抗体は、患者個々に基

40

50

づく遺伝子治療操作を必要とするため、ガンまたは病原体感染を処置するために実際的ではない。

#### 【0041】

本発明者らは、G1 TCR様抗体を、G9-209メラノーマ特異的ペプチドと複合体形成した安定な単鎖HLA-A2-2分子により免疫化されたHLA-A2トランスジェニックマウスから構築されたマウスscFvファージディスプレイライブラリーから以前に単離している(Denkberg G.他、The Journal of Immunology、2003;171(5):2197~207)。先行技術の試みとは対照的に、単離され、かつ、可溶性である(すなわち、ファージクローンとしてでない)このscFv組換え抗体(G1)は、TCRの特異性と同様なペプチド特異的なMHC拘束様式でHLA-A2-G9-209複合体に対する高い親和性(ナノモル濃度の範囲内、例えば、5nM)を示した(Denkberg G.、2003、上掲)。

10

#### 【0042】

先行技術と際立って対照的に、本発明者らは、MHC-ペプチド複合体とナノモル濃度の範囲(例えば、5nM)での親和性を伴って特異的に結合するTCR様組換え型の単離された抗体(すなわち、無細胞)が、そのような複合体を発現する細胞においてアポトーシスを誘導することができることを発見している。加えて、本発明者らは新しい組換え型の単離されたscFv抗体[クローン9H(配列番号1)およびCLA12(配列番号17)]を大きなヒト合成単鎖Fv抗体ライブラリーから発見している[Azriel-Rosenfeld R、Valensi M、Benhar I、インビボ形成されたCDRを一般的なフレームワーク領域に入れ替えることに基づく配置可能な単鎖抗体のヒト合成コンビナトリアルライブラリー、J Mol Biol、2004(1月2日);335(1):177-92]。これらの抗体は、HLA-A2-G9-209複合体(scFv 9H)またはHLA-A2-MART1複合体(scFv CLA12)と、0.5nM(scFv 9Hについて)または10nM(scFv CLA12について)の親和性を伴って特異的に結合することができる。

20

#### 【0043】

従って、図3a~図3h、図5a~図5d、図6および図9a~図9j、ならびに、下記の実施例の節において示されるように、以前に単離されたG1抗体(Denkberg他、2003、上掲)、9H抗体(配列番号1)およびCLA12抗体(配列番号17)を、特定のMHC-ペプチド複合体を発現する細胞(例えば、ガン細胞)のアポトーシスをペプチド特異的なHLA拘束様式で選択的に誘導するためのネイクド型の毒素非含有かつ強力な薬剤として使用することができる。

30

#### 【0044】

従って、本発明の1つの態様によれば、アポトーシスをガン細胞または病原体感染細胞において誘導する方法が提供される。この方法は、細胞上に特異的に発現されたMHC-ペプチド複合体と特異的に結合することができる組換え型の単離された抗体を細胞内で接触または発現させることによって行われる。

#### 【0045】

本明細書中で使用される用語「アポトーシス」は、細胞が「細胞自殺」プログラムを実行するプログラム化された細胞死を示す。アポトーシスは、胚発生、免疫系の調節および恒常性を含む数多くの生理学的現象において重要な役割を果たしている。従って、アポトーシスは、多様なシグナルに対する応答(例えば、四肢および神経の発達、神経変性疾患、放射線療法および化学療法など)において行われるものであり得る。アポトーシスの過程は通常、ミトコンドリアの酸化の非共役、ニコチンアデニンジヌクレオチドリン酸[NAD(P)H]のレベルの低下、チトクロームcの放出、カスパーゼの活性化、DNA断片化、および、原形質膜の外側小葉へのホスファチジルセリンの外在化(膜のリン脂質は通常、脂質二重層の内側小葉に拘束される)によって特徴づけられる。

40

#### 【0046】

本明細書中で使用される表現のMHC-ペプチド複合体は、任意のMHC分子(または

50

複合体)とペプチドとの間で形成されるタンパク質複合体を示す。MHCの用語は、数クラスのMHC複合体(例えば、MHCクラスI、MHCクラスII、MHCクラスIIIなど)を包含する。本発明の1つの好ましい実施形態によれば、MHCの用語はMHCクラスIを示す。様々なMHCクラスI分子がほとんどの細胞の表面で発現し、CD8陽性の細胞傷害性T細胞によって認識される。MHCクラスI分子は、サブユニットおよびサブユニットから構成されるヘテロ二量体である。サブユニットは3つの構造的ドメイン(1、2、3)を含み、MHC遺伝子クラスター(例えば、HLA-A1遺伝子またはHLA-A2遺伝子)によってコードされる。1および2の構造的ドメインは会合して、分子のペプチド結合ポケットおよび膜遠位領域を形成する。サブユニットの第3の構造的ドメイン(3)はサブユニットの2ミクログロブリン(2m)と非共有結合的に会合し、分子の膜近位領域を形成する。2mはMHC遺伝子クラスターによってコードされない。

10

## 【0047】

MHC分子に結合するペプチドは、タンパク質のプロテアソーム分解によって得られる任意のペプチドであることが可能である。そのようなタンパク質は、病原体[細菌、ウイルス、菌類など]に由来する病原性タンパク質、ならびに、通常、正常な細胞では発現されず、むしろ、ガン性細胞または前ガン性細胞において特有に発現するタンパク質(例えば、腫瘍促進因子タンパク質、腫瘍分化タンパク質など)であり得る。MHC-ペプチド複合体の限定されない例には、HLA-A2-G9-209、HLA-A2-G9-280およびHLA-A2-MART1が含まれる。さらなる例が下記の実施例の節において示される。

20

## 【0048】

好ましくは、MHC-ペプチド複合体のペプチドは、MUC1(Cohen他、2002を参照のこと)、gp100(GenBankアクセション番号AAB31176)、HTERT(GenBankアクセション番号AAD30037)、TAX(Cohen他、2003を参照のこと)およびMART1(GenBankアクセション番号Q16655)などのタンパク質に由来する。

## 【0049】

本発明の方法によれば、組換え型の単離された抗体は、細胞上に特異的に発現されたMHC-ペプチド複合体と特異的に結合することができる。例えば、図3a~図3hに示されるように、抗原性ペプチドでパルス処理された細胞が、特定のHLA-A2対立遺伝子を発現したときにだけ、G1抗体により特異的に標識された。加えて、図4a~図4gに示されるように、G1のTCR様抗体は、gp100由来のG9-209ペプチドを発現する天然の非パルス処理メラノーマ細胞を特異的に認識した。

30

## 【0050】

本明細書中で使用される用語「組換え抗体」には、無傷の分子ならびにその機能的フラグメント、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、または、組換えDNA技術によって少なくとも部分的に作製される抗原のエピトープに対する単ドメイン分子(例えば、VHおよびVLなど)などが含まれる。これらの機能的な抗体フラグメントは下記のように定義される：(1)Fab、これは、抗体分子の一価の抗原結合性フラグメントを含有し、無傷の軽鎖と、1つの重鎖の一部とを生じさせるために完全な抗体を酵素パピインで消化することによって作製することができるフラグメントである；(2)Fab'、これは、無傷の軽鎖と、重鎖の一部とを生じさせるために完全な抗体をペプシンで処理し、その後、還元することによって得ることができる抗体分子のフラグメントであり、2つのFab'フラグメントが1個の抗体分子について得られる；(3)(Fab')<sub>2</sub>、これは、完全な抗体を酵素ペプシンで処理し、その後の還元を行わないことによって得ることができる抗体のフラグメントであり、F(ab')<sub>2</sub>は、2つのジスルフィド結合によって一緒になっている2つのFab'フラグメントの二量体である；(4)Fv、これは、2つの鎖として発現された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメントとして定義される；(5)単鎖抗体(「SCA」)、これは、遺伝子融合さ

40

50

れた単鎖分子 ( s c F v ) として、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を好適なポリペプチドリンカーによって連結されて含有する遺伝子操作された分子である；および ( 6 ) 単ドメイン抗体は、抗原に対する十分な親和性を示す V H ドメインまたは V L ドメインの 1 個だけから構成される。

#### 【 0 0 5 1 】

本明細書中で使用される用語「抗体」は、免疫化および組換えファージディスプレイ技術によって作製された抗体を含むだけでなく、本発明の M H C - ペプチド複合体に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの相補性決定領域 ( C D R ) を含むように作製される任意のポリペプチドを含む ( 例えば、A z r i e l - R o s e n f e l d R 他、2 0 0 4、J M o l B i o l .、3 3 5 ( 1 ) : 1 7 7 ~ 9 2 を参照のこと)。従って、本発明の抗体は、抗体の少なくとも 1 つの C D R のコード配列を含むポリヌクレオチド配列から ( 本明細書中下記においてさらに記載されるように ) 発現させることができる。

10

#### 【 0 0 5 2 】

M H C - ペプチド複合体に対する抗体のアビディティを増大させるために、本発明の抗体は好ましくは少なくとも二価である。そのような抗体は、この分野で知られている方法を使用して、I g G サブタイプ ( これは二価である ) もしくは I g M ( これは五価である ) にクローン化することができ、または、そのようなサブタイプから選択することができる。あるいは、抗体を、架橋基または配列タグ ( 例えば、B i r A、下記の実施例の節の実施例 1 を参照のこと ) を使用することなどによって化学的にコンジュゲート化することができる。

20

#### 【 0 0 5 3 】

ポリクロナールおよびモノクロナール抗体並びにそ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、H a r l o w a n d L a n e , A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , N e w Y o r k , 1 9 9 8 ( 本明細書中で参考として援用される ) を参照のこと ) 。

#### 【 0 0 5 4 】

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 D N A の E . c o l i 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。従来の方法による全抗体のペプシンまたはパイン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 ( a b ' ) <sub>2</sub> と呼ばれる 5 S 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 . 5 S F a b ' 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 F a b ' フラグメントおよび F c フラグメントが直接得られる。これらの方法は、例えば、G o l d e n b e r g に付与された米国特許第 4 0 3 6 9 4 5 号および同第 4 3 3 1 6 4 7 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。P o r t e r , R . R . [ B i o c h e m . J . , 7 3 : 1 1 9 - 1 2 6 ( 1 9 5 9 ) ] 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

40

#### 【 0 0 5 5 】

F v フラグメントは、V H 鎖と V L 鎖との結合を含む。I n b a r e t a l . [ P r o c . N a t ' l . A c a d . S c i . U S A 6 9 : 2 6 5 9 - 6 2 ( 1 9 7 2 ) ] 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、F v 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 H 鎖お

50

よびV L鎖を含む。これらの単鎖抗原結合タンパク質(s c F v)を、オリゴヌクレオチドによって連結したV HおよびV L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。s c F v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); Packet et al., Bio/Technology 11: 1271 - 77 (1993); および米国特許第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。

10

## 【0056】

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。例えば、このようなペプチドは、配列番号5~10(それらは9H s c F vから誘導される)、配列番号11~16(それらはG1 s c F vから誘導される)または配列番号19~24(それらはCLA12 s c F vから誘導される)によって示されるペプチドの群からの少なくとも一つのペプチドであることができる。

20

## 【0057】

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ユニットなど)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フレームワーク領域(FR)はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である。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. Opin. Struct. Biol., 2: 593 - 596 (1992)]。

30

## 【0058】

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

40

50

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。

【0059】

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); Chames P., et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA. 97(14):7969-74; Azriel-Rosenfeld R, et al., 2004, J. Mol. Biol. 335(1)177-92; Denkberg G., et al., 2001, J. Immunol., 167:270-276; Denkberg J. Immunol, Benhar, I., and Reiter, Y., 2002, Phage display of single-chain antibody (scFv) constructs. Current Protocols in Immunology. 48:10.4 pp 59-87; Brekke OH, Loset GA. New technologies in therapeutic antibody development. Curr Opin Pharmacol. 2003, 3(5):544-50; Benhar I, Biotechnological applications of phage and cell display. Biotechnol Adv. 2001, 19(1):1-33)。同様に、トランスジェニック動物（例えば、内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抗体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); および Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995) に記載されている。

【0060】

1つの好ましい実施形態によれば、本発明の抗体は、本質的には Cohen 他、2002; Lev 他、2002; Denkberg 他、2002a; Cohen 他、2003 (これらは全体が参考として本明細書中に組み込まれる) に記載されるように非免疫ファージライブラリーから単離される。

【0061】

本発明の好ましい実施形態によれば、組換え型の単離された抗体は、配列番号5～配列番号10、配列番号11～配列番号16 および/または配列番号19～配列番号24によって示されるような少なくとも1つのCDR配列を含む組換えポリペプチドである。例には、scFvフラグメントの9H (配列番号1)、G1 (配列番号2) またはCLA12 (配列番号17)、および/あるいは、少なくとも1つのCDRまたはscFv配列を含む任意のIgGクローンが含まれるが、これらに限定されない。そのような組換えポリペ

ブチドは、本明細書中下記においてさらに記載されるように、DNA構築物から、そのような少なくとも1つのCDRまたはscFvをコードするポリヌクレオチドから発現させることができる。

#### 【0062】

IgG抗体が（この分野で知られ、また、本明細書中下記においてさらに記載されるような組換えDNA技術を使用して）産生される場合、そのようなIgG抗体は、完全なIgG抗体よりも短く、かつ、従って、完全なIgG抗体よりも可溶性であるFabフラグメントを製造するためにさらに消化され得ることが理解される。

#### 【0063】

加えて、図7a～図7c、図8d～図8eに示され、また、下記の実施例の節において記載されるように、G1、2F1またはCLA12のscFvのコード配列がシュードモナス菌体外毒素（PE38）のコード配列に融合されたとき、タンパク質合成のより強力な阻害で、それにもかかわらず、非常に特異的な阻害が観測された。従って、そのような免疫毒素を使用して、メラノーマ細胞におけるタンパク質合成の50%阻害が、わずかに10ng/mLのG1 scFv PE38免疫毒素（図7a）、15ng/mLの2F1 scFv PE38免疫毒素（図8d）および10ng/mL～100ng/mLのCLA12 scFv PE38免疫毒素（図8e）の存在下で達成された。さらに、図7a、図8dおよび図8eにおいてさらに示されるように、タンパク質合成のほぼ完全な阻害が100ng/mLのこれらの特定の免疫毒素の存在下で達成された。これらの結果から、ガン細胞または病原体感染細胞の処置のための、毒素に融合された抗体の使用が示唆される。

#### 【0064】

従って、本発明の1つの好ましい実施形態によれば、本発明の組換え型の単離された抗体は細胞傷害性剤に融合またはコンジュゲート化され、それにより、特異的な免疫毒素を形成する。そのような毒素剤は、例えば、シュードモナス菌体外毒素（PE35、PE38、PE40）、緑膿菌外毒素A（ETA'）およびジフテリア毒素（DT390）などが可能である。加えて、または、代替として、本発明の組換え型の単離された抗体は、化学療法剤（例えば、メクロレタミン、フルオロウラシル、ダカルバジン、ドセタキセル、カルムスチンおよびビンデシンなど）、抗生物剤または抗ウイルス剤に融合またはコンジュゲート化することができる。そのような免疫毒素および/または化学療法剤は、（例えば、通常的には組換え抗体のコード配列の下流側において、薬剤分子のコード配列を組換え抗体のコード配列に連結することによって）組換えDNA技術を使用して作製することができ、あるいは、この分野で知られている方法を使用して、毒素または化学療法剤を組換え型の単離された抗体ポリペプチド配列（例えば、配列番号1、配列番号2または配列番号17によって示されるポリペプチド）に共有結合的にコンジュゲート化することによって作製することができることが理解される。例えば、様々な二官能性のタンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、アジポイミド酸ジメチルHCLなど）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒドなど）、ビスアジド化合物（例えば、ビス-(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミンなど）、ジイソシアナート（例えば、トルエン-2,6-ジイソシアナートなど）およびビス-活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど）などを使用することによって作製することができる。例えば、5-FUのペプチドコンジュゲートを、Semko (1996)、Peptides Abst.、24<sup>th</sup> Symp. Eur. Pept. Soc.、P26に記載されるように作製することができる。リシン-ペプチドコンジュゲートを、Vitetta他、Science、238:1098 (1987)に記載されるように調製することができる。1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸（MX-DTPA）は、放射性ヌクレオチドをペプチドに

コンジュゲート化するための例示的なキレート化剤である（国際特許出願公開W O 9 4 / 1 1 0 2 6を参照のこと）。

【0065】

アポトーシスが誘導されるガン細胞は、充実性腫瘍（例えば、乳ガン、結腸ガン、肺ガン、メラノーマ）および非充実性腫瘍（例えば、白血病およびリンパ腫）を含めて、任意の種類腫瘍に由来し得る。好ましくは、本発明のガン細胞は乳ガン細胞またはメラノーマ細胞である。加えて、そのような細胞は、この分野で知られている方法を使用する正常な細胞の変異誘発またはガン遺伝子によるトランスフェクションによって生じさせることができる。

【0066】

アポトーシスが誘導される病原体感染細胞は、病原体（すなわち、この分野で知られている任意のウイルス、細菌および/または菌類）が感染する任意の真核生物細胞（好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはヒト細胞）であり得る。そのような細胞は、例えば、造血系細胞、リンパ系細胞、樹状細胞、マクロファージ、皮膚細胞、ニューロン、繊維芽細胞、内皮細胞、平滑筋細胞および上皮細胞であり得る。ウイルスは、本発明の細胞に感染することができる任意のウイルスであり得る。例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）およびラウス肉腫ウイルス（RSV）である。細菌は、細胞内性である細菌（例えば、リステリア菌（*Listeria monocytogenes*）、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）および結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）など）であり得る（Soloski MJ他、Proc Soc Exp Biol Med、2000、224：231～9）。

【0067】

本発明の方法によれば、組換え型の単離された抗体は本発明のガン細胞または病原体感染細胞と接触させられるか、あるいは、本発明のガン細胞または病原体感染細胞において発現させられる。抗体をこれらの細胞に投与する様々な方法がこの分野では知られており、これらには、例えば、抗体を細胞環境（例えば、血液、血漿、緩衝液および組織培養培地など）に加えることが含まれる。例えば、図8a～図8cにおいて示されるように、gp100の280エピトープを標的化する2F1抗体が細胞の培養培地に加えられ、360分以内に細胞の内部で見出された。

【0068】

あるいは、本発明の組換え型の単離された抗体は、例えば、本発明の組換え型の単離された抗体のFabフラグメント、scFv、完全なIgG抗体、または、CDRのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含有する核酸構築物の一部として細胞（例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、植物細胞、酵母細胞）において発現させることができる。

【0069】

本発明の組換え型の単離された抗体を哺乳動物細胞において発現させるために、配列番号5～配列番号16および配列番号19～配列番号24によって示されるような少なくとも1つのCDR配列をコードするポリヌクレオチド配列が、好ましくは、哺乳動物細胞発現のために好適な核酸構築物に連結される。そのようなポリヌクレオチドは、例えば、配列番号3（9H scFvについて）、配列番号4（G1 scFvについて）、配列番号18（CLA12 scFvについて）によって示されるポリヌクレオチドであり得る。核酸構築物は、構成的様式または誘導可能な様式で細胞におけるポリヌクレオチド配列の転写を行わせるためのプロモーター配列を含む。

【0070】

本発明とともに使用される好適な構成的プロモーターは、ほとんどの環境条件およびほとんどのタイプの細胞のもとで活性であるプロモーター配列である（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）およびラウス肉腫ウイルス（RSV）など）。本発明とともに使用される好適な誘導可能なプロモーターには、例えば、テトラサイクリン誘導可能なプロモ

10

20

30

40

50

ーター (Zabalá M他、Cancer Res.、2004、64(8):2799~804) が含まれる。

【0071】

本発明の核酸構築物 (これはまた本明細書中では「発現ベクター」として示される) は、このベクターを、原核生物における複製および組み込み、または、真核生物における複製および組み込み、または、好ましくは両者における複製および組み込み (例えば、シャトルベクター) のために好適にするさらなる配列を含む。加えて、典型的なクローニングベクターはまた、転写開始配列および翻訳開始配列、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター、ならびに、ポリアデニル化シグナルを含有することができる。例として、そのような構築物は、典型的には、5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、一本鎖DNA合成の起点、および、3'LTRまたはその一部を含む。

10

【0072】

本発明の核酸構築物は、典型的には、ペプチドが置かれる宿主細胞からのペプチドの分泌のためのシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物のシグナル配列、または、本発明のポリペプチド変化体のシグナル配列である。

【0073】

真核生物プロモーターは、典型的には、2つのタイプの認識配列 (TATAボックスおよび上流側プロモーターエレメント) を含有する。TATAボックスは転写開始部位から25塩基対~30塩基対上流側に位置し、RNA合成を開始することをRNAポリメラーゼに命令することに関与していると考えられる。もう一方の上流側のプロモーターエレメントは、転写が開始される速度を決定する。

20

【0074】

好ましくは、本発明の核酸構築物によって利用されるプロモーターは、形質転換された特定の細胞集団において活性である。細胞タイプ特異的プロモーターおよび/または組織特異的プロモーターの例には、肝臓特異的であるアルブミン [Pinker t他 (1987)、Genes Dev.、1:268~277]、リンパ系特異的プロモーター [Calame他 (1988)、Adv. Immunol.、43:235-275] (具体的には、T細胞受容体のプロモーター [Winoto他 (1989)、EMBO J.、8:729~733]、免疫グロブリンのプロモーター [Banerji他 (1983)、Cell.、33:729~740])、ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメントプロモーター [Byrne他 (1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、86:5473~5477] など)、膵臓特異的プロモーター [Edlunch他 (1985)、Science.、230:912~916] または乳腺特異的プロモーター (例えば、乳清プロモーター (米国特許第4873316号および欧州特許出願公開第264166号) など) などのプロモーターが含まれる。

30

【0075】

エンハンサーエレメントは、連結された同族プロモーターまたは異種プロモーターからの転写を1000倍まで刺激することができる。エンハンサーは、転写開始部位の下流または上流に置かれたときに活性である。ウイルスに由来する多くのエンハンサーエレメントは広い宿主範囲を有し、様々な組織において活性である。例えば、SV40の初期遺伝子エンハンサーは多くの細胞タイプに対して好適である。本発明のために好適である他のエンハンサー/プロモーター組合せには、ポリオーマウイルス、ヒトまたはマウスのサイトメガロウイルス (CMV)、様々なレトロウイルス (例えば、マウス白血病ウイルス、マウス肉腫ウイルスまたはラウス肉腫ウイルスおよびHIVなど) から得られる長末端反復に由来するエンハンサー/プロモーター組合せが含まれる。Enhancers and Eukaryotic Expression (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1983) を参照のこと (これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

40

【0076】

発現ベクターの構築において、プロモーターは、好ましくは、プロモーターがその天然

50

の環境において転写開始部位から配置されるのとほぼ同じ距離で異種の転写開始部位から配置される。しかしながら、この分野では知られているように、この距離におけるある程度の変化が、プロモーター機能の喪失を伴うことなく受け入れられ得る。

**【0077】**

ポリアデニル化シグナルもまた、組換え型の単離された抗体のmRNAの翻訳効率を増大させるために発現ベクターに加えることができる。2つの異なった配列エレメントが正確かつ効率的なポリアデニル化のために要求される(ポリアデニル化部位の下流側に位置するGUリッチ配列またはUリッチ配列、および、11ヌクレオチド~30ヌクレオチド上流側に位置する6ヌクレオチドの高度に保存された配列(AAUAUA))。本発明のために好適である終結シグナルおよびポリアデニル化シグナルには、SV40由来のシグナルが含まれる。

10

**【0078】**

既に記載されたエレメントに加えて、本発明の発現ベクターは典型的には、クローン化された核酸の発現レベルを増大させるために、または、組換えDNAを有する細胞の同定を容易にするために意図される他の特殊化したエレメントを含有することができる。例えば、数多くの動物ウイルスは、許容性細胞タイプにおけるウイルスゲノムの染色体外での複製を促進させるDNA配列を含有する。これらのウイルスレプリコンを有するプラスミドは、適切な因子が、プラスミドで運ばれる遺伝子、または、宿主細胞のゲノムとともに運ばれる遺伝子のいずれかによって提供される限り、エピソーム的に複製する。

**【0079】**

ベクターは真核生物レプリコンを含んでもよく、または、真核生物レプリコンを含まなくてもよい。真核生物レプリコンが存在するならば、ベクターは、適切な選択マーカースを使用して真核生物において増幅可能である。ベクターが真核生物レプリコンを含まないならば、エピソーム増幅は不可能である。その代わりに、組換えDNAは、操作された細胞のゲノムに一体化し、操作された細胞のゲノムにおいて、プロモーターが所望の核酸の発現を行わせる。

20

**【0080】**

本発明の発現ベクターはさらに、例えば、1個のmRNAからの数個のタンパク質の翻訳を可能にするさらなるポリヌクレオチド配列(例えば、内部リボソーム進入部位(IRES))、および、プロモーターキメラなポリペプチドのゲノム組み込みのための配列など

30

**【0081】**

哺乳動物発現ベクターの例には、pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHB B、pNMT1、pNMT41、pNMT81(これらはInvitrogenから入手可能である)、pCI(これはPromegaから入手可能である)、pMbac、pPbac、pBK-RSVおよびpBK-CMV(これらはStratageneから入手可能である)、pTRES(これはClontechから入手可能である)、ならびに、それらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

40

**【0082】**

真核生物ウイルス(例えば、レトロウイルスなど)に由来する調節エレメントを含有する発現ベクターもまた使用することができる。SV40ベクターには、pSVT7およびpMT2が含まれる。ウシ乳頭腫ウイルスに由来するベクターには、pBV-1MTHAが含まれ、エプスタイン・パールウイルスに由来するベクターには、pHEBOおよびp205が含まれる。他の例示的なベクターには、pMSG、pAV009/A<sup>+</sup>、pMT010/A<sup>+</sup>、pMAMneo-5、パキユロウイルスpDSVE、および、SV-40初期プロモーター、SV-40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腫瘍ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または、真核生物細胞における発現のために効果的であることが示されている他

50

のプロモーターの命令のもとでのタンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターが含まれる。

【0083】

上記で記載されたように、ウイルスは、多くの場合には宿主の防御機構から逃れるように進化してきた非常に特殊化された感染性媒介因子である。典型的には、ウイルスは特定の細胞タイプに感染し、増殖する。ウイルスベクターの標的化特異性では、その天然の特異性が、所定の細胞タイプを特異的に標的化し、それにより、組換え遺伝子を感染細胞に導入するために利用される。従って、本発明によって使用されるベクターのタイプは、形質転換された細胞タイプに依存する。形質転換された細胞タイプに従って好適なベクターを選択することができることは十分に当業者の能力の範囲内であり、そのため、選択の検討の一般的な記述は本明細書中には提供されない。例えば、骨髄細胞を、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)を使用して標的化することができ、または、腎臓細胞が、Liang CY他(2004)(Arch Virol., 149:51~60)に記載されるように、パキウウイルス(Autographa californica)のニュークレオポリヘドロウイルス(ACMNPV)に存在する異種プロモーターを使用して標的化される場合がある。

10

【0084】

組換えウイルスベクターは、様々な利点(例えば、潜伏感染および標的化特異性など)を提供するため、本発明の単離された抗体のインビボ発現のために有用である。潜伏感染は、例えば、レトロウイルスの生活環において固有のものであり、出芽し、周りの細胞に感染する多くの子孫ビリオンを1個の感染細胞が産生するプロセスである。その結果は、最初のウイルス粒子によってそのほとんどが最初に感染していなかった広い面積が素早く感染することである。このことは、感染性因子が娘子孫を介してのみ広がる垂直型の感染とは対照的である。横方向に広がることのできないウイルスベクターもまた作製することができる。この特徴は、所望する目的が、指定された遺伝子を局在化した多数の標的化された細胞のみに導入することであるならば、有用であり得る。

20

【0085】

様々な方法を、本発明の発現ベクターを細胞に導入するために使用することができる。そのような方法が、一般には、Sambrook他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York(1989, 1992); Ausubel他、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md.(1989); Chang他、Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich.(1995); Vega他、Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich.(1995); Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass.(1988); および、Gilboa他[Biotechniques 4(6):504~512, 1986]に記載され、そのような方法には、例えば、組換えウイルスベクターを用いた安定的トランスフェクション、一過性トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび感染が含まれる。加えて、陽性-陰性の選択法については米国特許第5464764号および同第5487992号を参照のこと。

30

40

【0086】

ウイルス感染による核酸の導入は、より大きいトランスフェクション効率をウイルスの感染性質のために得ることができるため、他の方法(例えば、リポフェクションおよびエレクトロポレーションなど)を上回るいくつかの利点を提供する。

【0087】

現在好ましいインビボ核酸移入技術(インビボ遺伝子治療)では、ウイルス構築物または非ウイルス構築物(例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスIウイルス

50

すまたはアデノ関連ウイルス(AAV)、および、脂質に基づく系など)によるトランスフェクションが含まれる。遺伝子の脂質媒介による移入のための有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPEおよびDC-Cholである[Tonkinson他、Cancer Investigation、14(1):54~65(1996)]。遺伝子治療において使用される最も好ましい構築物はウイルスであり、最も好ましくは、アデノウイルス、AAV、レンチウイルスまたはレトロウイルスである。ウイルス構築物(例えば、レトロウイルス構築物など)は、少なくとも1つの転写プロモーター/エンハンサーまたは遺伝子座規定エレメント、あるいは、他の手段(例えば、メッセンジャーの選択的スプライシング、核RNA輸出または翻訳後修飾など)によって遺伝子発現を制御する他のエレメントを含む。そのようなベクター構築物はまた、ウイルス構築物に既に存在していない限り、パッケージングシグナル、長末端反復(LTR)またはその一部、ならびに、使用されたウイルスに対して適切なプラス鎖プライマー結合部位およびマイナス鎖プライマー結合部位を含む。加えて、そのような構築物は典型的には、ペプチドが置かれる宿主細胞からのペプチドの分泌のためのシグナル配列を含む。好ましくは、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物のシグナル配列、または、本発明のポリペプチド変化体のシグナル配列である。場合により、構築物はまた、ポリアデニル化を行わせるシグナル、ならびに、1つまたは複数の制限部位および翻訳終結配列を含むことができる。例として、そのような構築物は、典型的には、5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第二鎖DNA合成の起点、および、3'LTRまたはその一部を含む。非ウイルス性である他のベクターを使用することができる(例えば、カチオン性脂質、ポリリシンおよびデンドリマーなど)。

#### 【0088】

挿入されたコード配列の転写および翻訳のための必要なエレメントを含有すること以外に、本発明の発現ベクターはまた、発現したペプチドの安定性、産生、精製、収率または毒性を高めるために操作された配列を含むことができる。例えば、本発明のMet変化体および異種のタンパク質を含む融合タンパク質または切断可能な融合タンパク質の発現を操作することができる。そのような融合タンパク質は、融合タンパク質が、アフィニティークロマトグラフィーによって、例えば、異種タンパク質について特異的なカラムでの固定化によって容易に単離することができよう設計することができる。切断部位がMet成分と異種タンパク質との間で操作される場合、Met成分を、切断部位を分断する適切な酵素または薬剤による処理によってクロマトグラフィーカラムから放出させることができる[Booth他(1988)、Immunol.Lett.、19:65~70;Gardella他(1990)、J.Biol.Chem.265:15854~15859を参照のこと]。

#### 【0089】

様々な原核生物細胞または真核生物細胞が、本発明の単離された組換え抗体(ポリペプチド)を発現させるための宿主発現システムとして使用され得ることが理解される。これらには、微生物(例えば、コード配列を含有する組換えられたバクテリオファージDNA発現ベクター、プラスミドDNA発現ベクターまたはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌など);コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターにより形質転換された酵母;コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワームザイクウイルス、CaMV;タバコモザイクウイルス、TMV)を感染させた植物細胞システム、または、コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミドなど)により形質転換された植物細胞システムが含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物発現システムもまた、本発明のポリペプチドを発現させるために使用することができる。

#### 【0090】

細菌構築物の例には、大腸菌発現ベクターのpETシリーズが含まれる[Studier他(1990)、Methods in Enzymol.、185:60~89]。

#### 【0091】

10

20

30

40

50

酵母では、米国特許第5932447号に開示されるような、構成的プロモーターまたは誘導可能なプロモーターを含有する数多くのベクターを使用することができる。あるいは、酵母染色体内への外来DNA配列の組み込みを促進するベクターを使用することができる。

#### 【0092】

植物発現ベクターが使用される場合、コード配列の発現が数多くのプロモーターによって駆動され得る。例えば、ウイルスプロモーター（例えば、CaMVの35S RNAプロモーターおよび19S RNAプロモーター[Brisson他(1984)、Nature、310:511~514]またはTMVのコートタンパク質プロモーター[Takamatsu他(1987)、EMBO J.、6:307~311]など)を使用することができる。あるいは、植物プロモーター、例えば、RUBISCOの小サブユニット[Coruzzi他(1984)、EMBO J.、3:1671~1680; Brogli他(1984)、Science、224:838~843]または熱ショックプロモーター（例えば、タイズのhsp17.5-Eまたはhsp17.3-B[Gurley他(1986)、Mol. Cell. Biol.、6:559~565]）などを使用することができる。これらの構築物を、当業者に広く知られているTiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接的なDNA形質転換、顕微注入、エレクトロポレーションおよび他の技術を使用して植物細胞に導入することができる。例えば、Weissbach & Weissbach、1988、Methods for Plant Molecular Biology (Academic Press、NY)、第VII章、421頁~463頁を参照のこと。

10

20

#### 【0093】

他の発現システム（例えば、昆虫宿主細胞システムおよび哺乳動物宿主細胞システムなど）がこの分野では広く知られており、これらもまた本発明によって使用することができる。

#### 【0094】

組換えポリペプチドの回収が培養での適切な時間の後で行われる。表現「組換えポリペプチドを回収する」は、ポリペプチドを含有する発酵培地全体を集めることを示し、分離または精製のさらなる工程を意味する必要はない。上記にかかわらず、本発明のポリペプチドは、様々な標準的なタンパク質精製技術を使用して、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ろ過、電気泳動、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、クロマトフォーカシングおよび示差的可溶化などを使用して精製することができる。

30

#### 【0095】

本発明の好ましい実施形態によれば、本発明のこの態様による方法はさらに、本発明の組換え型の単離された抗体の投与後または発現後においてガン細胞またはウイルス感染細胞におけるアポトーシスを検出する工程を含む。

#### 【0096】

本発明の組換え型の単離された抗体によって誘導されるアポトーシスは、この分野で知られている様々な方法を使用して検出することができる。

40

#### 【0097】

エチジウムホモ二量体-1染色。アポトーシスを、膜が損なわれた細胞（すなわち、死細胞）に特異的に結合する色素によって検出することができる。簡単に記載すると、固定処理されていない細胞、例えば、懸濁状態、組織培養および組織切片などにおける細胞などが蛍光性色素のエチジウムホモ二量体-1（励起、495nm；放射、635nm）で染色される。このアッセイでは、生細胞は緑色蛍光の細胞質を有するが、EthD-1のシグナルを有さず、これに対して、死細胞は緑色蛍光がなく、EthD-1により染色される。

#### 【0098】

Tunnelアッセイ(Roche、Basel、スイス)。これは、アポトーシスを

50

受けている細胞に特徴的なDNA分解物をフルオレセイン（励起、450nm～500nm；放射、515nm～565nm）により標識する。

【0099】

生/死の生存性/細胞毒性の二色蛍光アッセイ（Molecular Probes, Inc.、L-3224、Eugene、OR、米国）。このアッセイでは、細胞内エステラーゼ活性が、生細胞によって蛍光性誘導体（ポリアニオンのカルセイン、励起、495nm；放射、515nm）に変換され、その後、生細胞の無傷の原形質膜によって保持される細胞透過性基質（カルセイン-AM）を用いて測定される。

【0100】

FACS分析。アポトーシスを受けている細胞と特異的に結合することができる分子（例えば、ヨウ化プロピジウムおよびアネキシンVなど）を使用する（図面の説明および下記の実施例の節を参照のこと）。アネキシンVは、初期アポトーシスのときに原形質膜の外側への外在化を受けるホスファチジルセリンに対するカルシウム媒介による高親和性の結合によって特徴づけられるヒトタンパク質である。

10

【0101】

ゲル電気泳動によるDNA断片化。簡単に記載すると、DNAを固定処理されていない細胞から抽出し、ゲル電気泳動（例えば、1.5%～2%のアガロースゲル）に供し、DNA断片化の程度が、任意のDNA染色剤（例えば、臭化エチジウムおよびSyber Greenなど）を使用して評価される。

【0102】

図6においてさらに示され、また、下記の実施例の実施例3に記載されるように、ネイクドscFv G1抗体は、ペプチド特異的なMHC拘束様式で、526、624および501Aのメラノーマ細胞のタンパク質合成を阻害すること（従って、これらのメラノーマ細胞を「殺す」こと）ができた。加えて、タンパク質合成の阻害は用量依存的であり、IC<sub>50</sub>（すなわち、タンパク質合成の50%阻害を達成するために要求される抗体の濃度）がすべてのHLA-A2+/gp100+のメラノーマ細胞について60μg/mLであった。

20

【0103】

これらの結果から、ガンまたは病原体感染を処置することにおける、本発明のTCR様の組換え型の単離された抗体の使用が強く示唆される。

30

【0104】

従って、本発明の別の態様によれば、ガンまたは病原体感染を処置する方法が提供される。この方法は、その必要性のある対象において、MHC-ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、そのMHC-ペプチド複合体を特異的に発現するガン細胞または病原体感染細胞のアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体の治療有効量を接触または発現させ、それにより、対象におけるガンまたは病原体感染を処置することによって行われる。

【0105】

用語「処置する」は、疾患、障害または状態（例えば、ガンまたは病原体感染）の発症を阻害または停止すること、および/あるいは、疾患、障害または状態の軽減、寛解または退行を引き起こすことを示す。当業者は、様々な方法論およびアッセイを、疾患、障害または状態の発症を評価するために使用することができ、また、同様に、様々な方法論およびアッセイを、疾患、障害または状態の軽減、寛解または退行を評価するために使用することができることを理解する。

40

【0106】

本明細書中で使用される用語「対象」（または、本明細書中では交換可能に使用される「個体」）には、哺乳動物（好ましくは、疾患、障害または状態に罹患している任意の年齢のヒト）が含まれる。好ましくは、この用語は、疾患、障害または状態を発症する危険性がある個体を包含する。例えば、低レベルのガン分化タンパク質を前悪性状態で発現する個体、または、依然として潜伏期にある病原体に感染している個体が挙げられる。

50

## 【0107】

本明細書中で使用される表現「対象の細胞」には、対象に由来し、かつ、対象から取り出される任意の細胞（すなわち、エクスピボ遺伝子治療）、または、対象の一部である細胞（すなわち、本明細書中上記で記載されたようなインスピボ遺伝子治療）が含まれる。

## 【0108】

エクスピボ遺伝子治療については、対象（処置の必要性がある対象またはドナー対象のいずれか）に由来する細胞が、本質的には本明細書中上記で記載されたように、適切な組織培養培地の存在下で培養され、そして、本発明の組換え型の単離された抗体を発現および分泌するように設計されたポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを用いて標的細胞（例えば、対象のガン細胞またはウイルス感染細胞）にエクスピボでトランスフェクションされることが理解される。そのような細胞は、例えば、腎臓細胞、骨髄細胞、ケラチノサイト細胞およびリンパ球細胞であることが可能である。

10

## 【0109】

本発明の抗体発現細胞の投与は、任意の好適な経路（例えば、静脈内、腹腔内、腎臓内、胃腸管内、皮下、経皮、筋肉内、皮内、クモ膜下、硬膜外および直腸など）を使用して行うことができる。現在好ましい実施形態によれば、本発明の抗体発現細胞は、静脈内投与、腎臓内投与、胃腸管内投与および/または腹腔内投与を使用して個体に導入される。

## 【0110】

本発明の抗体発現細胞は、自家供給源（例えば、自己の骨髄細胞など）または同種供給源（例えば、非自家供給源に由来する骨髄細胞または他の細胞など）のいずれかに由来し得る。非自家細胞は、身体に投与されたとき、免疫反応を誘導する可能性があるため、いくつかの方法が、非自家細胞の拒絶の可能性を軽減するために開発されている。これらには、受容者の免疫系を抑制すること、または、免疫隔離する半透過性膜で非自家の細胞または組織を移植前にカプセル化することのいずれかが含まれる。

20

## 【0111】

カプセル化技術は一般には、小さい球状ビヒクルを伴うマイクロカプセル化として、また、より大きい平坦なシート膜および中空繊維膜を伴うマクロカプセル化として分類される（Uludag, H. 他、哺乳動物細胞カプセル化技術、Adv Drug Deliv Rev., 2000, 42: 29~64）。

## 【0112】

マイクロカプセルを調製する様々な方法がこの分野では知られており、これらには、例えば、Lu MZ 他（アルギン酸塩および - フェノキシシナミリデン - アセチル化ポリ（アリルアミン）を用いた細胞カプセル化、Biotechnol Bioeng., 2000, 70: 479~83）；Chang TM および Prakash S.（酵素、細胞および遺伝子操作微生物のマイクロカプセル化法、Mol Biotechnol., 2001, 17: 249~60）；Lu MZ 他（光感受性ポリ（アリルアミン - シアノシナミリデンアセター）を使用する新規な細胞カプセル化方法、J Microencapsul., 2000, 17: 245~51）によって開示される方法が含まれる。

30

## 【0113】

例えば、マイクロカプセルが、修飾コラーゲンを、メタクリル酸 2 - ヒドロキシエチル（HEMA）、メタクリル酸（MAA）およびメタクリル酸メチル（MMA）のターポリマー外皮と複合体化し、これにより、2 μm ~ 5 μm のカプセル厚さを生じさせることによって調製される。そのようなマイクロカプセルはさらに、負荷電の滑らかな表面を与えるために、また、血漿タンパク質の吸収を最小限に抑えるために、さらなる 2 μm ~ 5 μm のターポリマー外皮でカプセル化することができる（Chia, S. M. 他、細胞カプセル化のための多層マイクロカプセル、Biomaterials, 2002, 23: 849~56）。

40

## 【0114】

他のマイクロカプセルがアルギン酸塩（海洋多糖）（Sambanis, A., 糖尿病

50

処置におけるカプセル化小島、Diabetes Technol. Ther., 2003、5:665~8)またはその誘導体に基づく。例えば、マイクロカプセルを、ポリアニオンのアルギン酸ナトリウムおよび硫酸セルロースナトリウムと、ポリカチオンのポリ(メチレン-co-グアニジン)塩酸塩との、塩化カルシウムの存在下での多電解質複合体化によって調製することができる。

【0115】

より小さいカプセルが使用されるとき、細胞マイクロカプセル化が改善されることが理解される。従って、カプセルサイズが1mmから400μmに低下したとき、カプセル化細胞の品質管理、機械的安定性、拡散特性およびインビトロ活性が改善された(Canaple L. 他、サイズ制御による細胞カプセル化の改善、J Biomater Sci Polym Ed., 2002、13:783~96)。さらに、7nmもの小さい十分に制御された細孔サイズ、用途に合わせて調製された表面化学性、および、的確な微細構造を有するナノ多孔性のバイオカプセルは、細胞のための微小環境を免疫隔離することに成功したことが見出された(Williams D., 小さいことは美しい:医療デバイスにおけるマイクロ粒子技術およびナノ粒子技術、Med Device Technol., 1999、10:6~9; Desai, T. A., 臓器細胞カプセル化のための微細製造技術、Expert Opin Biol Ther., 2002、2:633~46)。

10

【0116】

本発明の組換え型の単離された抗体、本発明の組換え型の単離された抗体をコードする核酸構築物、または、本発明の組換え型の単離された抗体を発現する細胞は、それ自体で生物に投与することができ、あるいは、好適なキャリアまたは賦形剤と混合される医薬組成物で生物に投与することができる。

20

【0117】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される有効成分の1つまたは複数と、他の化学的成分(例えば、生理学的に好適なキャリアおよび賦形剤)との調製物を示す。医薬組成物の目的は、生物に対する化合物の投与を容易にすることである。

【0118】

本明細書中で使用される用語「活性成分(有効成分)」は、生物学的効果に關与できる、本発明の組換え型の単離された抗体またはポリヌクレオチドまたはこれらが発現する細胞に關する。

30

【0119】

以降、表現「生理学的に許容され得るキャリア」および表現「医薬的に許容され得るキャリア」は交換可能に使用することができ、生物に対する著しい刺激を生じさせず、かつ、投与された調合物の生物学的活性および生物学的性質を阻害しないキャリアまたは希釈剤を示す。アジュバントはこれらの表現下で包含される。

【0120】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびタイプのデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが含まれる。

40

【0121】

薬物の配合および投与のための様々な技術が“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版)(これは参考として本明細書中に組み込まれる)に見出され得る。

【0122】

好適な投与経路には、例えば、経口送達、直腸送達、経粘膜送達、特に経鼻送達、腸管送達または非経口送達(これには、筋肉内注射、皮下注射および髄内注射、ならびに、クモ膜下注射、直接的な脳室内注射、心臓内注射、静脈内注射、腹腔内注射、鼻内注射また

50

は眼内注射が含まれる)が含まれ得る。

【0123】

あるいは、例えば患者の組織領域中への医薬組成物の直接注射によって医薬組成物を全身的な方法によりむしろ局所的な方法で投与してもよい。

【0124】

本発明の医薬組成物は、この分野で十分に知られている様々なプロセスによって、例えば、混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、包括化または凍結乾燥の従来のプロセスによって製造することができる。

【0125】

本発明に従って使用するための医薬組成物は有効成分を医薬として使用可能な製剤にする加工を容易にする賦形剤及び補助剤を含む一つ以上の生理学的に許容され得るキャリアを使用して従来のように配合されてもよい。適切な配合は選択された投与経路に依存する。

10

【0126】

注射の場合、本発明の医薬組成物は、水溶液において、好ましくは生理学的に適合し得る緩衝液(例えば、ハックス溶液、リンゲル溶液、または生理学的な生理的食塩水緩衝液など)において配合することができる。経粘膜投与の場合、浸透されるべきバリアーとして適した浸透剤が配合において使用される。そのような浸透剤はこの分野では一般に知られている。

【0127】

経口投与の場合、医薬組成物は、活性な化合物を、この分野で十分に知られている薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせることによって容易に配合することができる。そのようなキャリアにより、医薬組成物は、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤、懸濁物などとして配合することが可能になる。経口使用される薬学的調製物は、錠剤または糖衣錠コアを得るために、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉碎し、そして所望する場合には好適な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して作製することができる。好適な賦形剤は、具体的には、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；および/またはポリビニルピロリドン(PVP)などの生理学的に受容可能なポリマーである。所望する場合には、架橋型ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩(アルギン酸ナトリウムなど)などの崩壊剤を加えることができる。

20

30

【0128】

糖衣錠コアには、好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有し得る。色素または顔料が、活性な化合物の量を明らかにするために、または活性な化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに添加され得る。

40

【0129】

経口使用され得る医薬組成物には、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、ならびにゼラチンおよび可塑剤(グリセロールまたはソルビトールなど)から作製された軟密閉カプセルが含まれる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤(ラクトースなど)、結合剤(デンプンなど)、滑剤(タルクまたはステアリン酸マグネシウムなど)および場合により安定化剤と混合された有効成分を含有し得る。軟カプセルでは、活性な成分を好適な液体(脂肪油、流動パラフィンまたは液状のポリエチレングリコールなど)に溶解または懸濁させることができる。さらに、安定化剤を加えることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路に好適な投薬形態でなければならない。

50

## 【0130】

口内投与の場合、組成物は、従来の様式で配合された錠剤またはトローチの形態を取ることができる。

## 【0131】

鼻腔吸入による投与の場合、本発明に従って使用される有効成分は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素）の使用により加圧パックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投薬量単位は、計量された量を送達するためのバルブを提供することによって決定され得る。吸入器または吹き入れ器で使用される、例えば、ゼラチン製のカプセルおよびカートリッジで、化合物と好適な粉末基剤（ラクトースまたはデンプンなど）との粉末混合物を含有するカプセルおよびカートリッジを配合することができる。

10

## 【0132】

本明細書で記述される医薬組成物は非経口投与、例えばボラス注射または連続点滴のために配合されることができる。注射のための配合は、単位用量形態（例えばアンプルまたは多用量コンテナ）で提供されることができ、これらには所望により保存剤が添加されている。組成物は懸濁物、溶液または油性もしくは水性ビヒクル中のエマルジョンであることができ、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤の如き配合剤を含むことができる。

## 【0133】

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態における活性な調製物の水溶液が含まれる。さらに、活性な成分の懸濁物を、適切なオイル状のまたは水ベースの注射用懸濁物として調製することができる。好適な親油性の溶媒またはビヒクルには、脂肪油（ゴマ油など）、または合成脂肪酸エステル（オレイン酸エチルなど）、トリグリセリドまたはリポソームが含まれる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランなどを含有し得る。場合により、懸濁物はまた、高濃度の溶液の調製を可能にするために化合物の溶解性を増大させる好適な安定化剤または薬剤を含有し得る。

20

## 【0134】

あるいは、有効成分は、使用前に好適なビヒクル（例えば、滅菌されたパイロジェン非含有水ベースの溶液）を用いて構成される粉末形態にする。

30

## 【0135】

本発明の医薬組成物はまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの従来の座薬基剤を使用して、座薬または停留浣腸剤などの直腸用組成物に配合することができる。

## 【0136】

本発明に関連した使用のために好適な医薬組成物には、有効成分が、意図された目的を達成するために効果的な量で含有される組成物が含まれる。より具体的には、治療効果がある量（治療有効量）は、処置されている対象の障害（例えば、がんまたはウイルス感染）の症状を防止、軽減または改善するために、あるいは、処置されている対象の生存を延ばすために効果的な有効成分（本発明の組換え型の単離された抗体またはポリヌクレオチドまたはこれらを発現する細胞）の量を意味する。

40

## 【0137】

治療効果がある量の決定は、特に本明細書に与えられた詳細な開示に照らして、十分に当業者の範囲内である。

## 【0138】

本発明の方法に使用される調製物に対して、治療的に有効な量又は用量は最初にインビトロおよび細胞培養分析から分析されることができる。例えば、用量は所望の濃度または滴定量を達成するために動物モデルで配合されることができる。かかる情報は人間に有用な用量をより正確に決定するために使用されることができる。

## 【0139】

本明細書中に記載される有効成分の毒性および治療効力は、インビトロ、細胞培養また

50

は実験動物における標準的な薬学的手法によって明らかにすることができる。これらのインビトロアッセイおよび細胞培養アッセイならびに動物研究から得られたデータは、ヒトへの使用のための投薬量範囲を定める際に使用することができる。投薬量は、用いられる投薬形態物および利用される投与経路に依存して変化し得る。正確な配合、投与経路および投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選ぶことができる（例えば、Fingler 他、1975、“The Pharmacological Basis of Therapeutics”（第1章、1頁）を参照のこと）。

#### 【0140】

例えば、図6および下記の実施例の節において示されるように、G1 s c F v 抗体は、60  $\mu$ g / mL の濃度でメラノーマ細胞におけるタンパク質合成の50%阻害を引き起こし、120  $\mu$ g / mL の濃度で80%の阻害を引き起こした。加えて、下記の実施例の節の表2に示されるように、2F1 s c F v 抗体はメラノーマ細胞におけるタンパク質合成について130  $\mu$ g / mL のIC<sub>50</sub>を示した一方で、そのようなFabフラグメントに由来する完全なIgGクローンは4  $\mu$ g / mL の著しくより低いIC<sub>50</sub>を示した。

10

#### 【0141】

加えて、図7a~図7c、図8d~図8eに示され、また、下記の実施例において記載されるように、免疫毒素が利用されたとき、メラノーマ細胞の阻害が、10 ng / mL のG1 s c F v P E 3 8 のIC<sub>50</sub>濃度（図7a）、15 ng / mL の2F1 s c F v P E 3 8 のIC<sub>50</sub>濃度（図8d）、および、10 ng / mL ~ 100 ng / mL のC L A 1 2 s c F v P E 3 8 のIC<sub>50</sub>濃度（図8e）を伴って達成された。

20

#### 【0142】

投与量および間隔は、アポトーシスを誘導するのに十分な活性成分のレベル（最小有効濃度（MEC））をがん細胞またはウイルス細胞に与えるために個々に調整されてもよい。MECは、各調製物に対して変動しうるが、インビトロデータから推定されることができる。MECを達成するために必要な投与は、個々の特性および投与ルートに依存するだろう。検出アッセイは、血漿濃度を決定するために使用されることができる。

#### 【0143】

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、投薬は単回投与または多回投与が可能であり、処置の経過が、数日から数週間まで、あるいは、治癒が達成されるまで、または、疾患状態の縮小が達成されるまで続く。

30

#### 【0144】

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている対象、苦痛の重篤度、投与様式、主治医の判断などに依存する。

#### 【0145】

本発明の組成物は、所望される場合には、活性成分を含有する一つ以上の単位投薬形態物を含有し得る、FDA承認キットなどのパックまたはディスペンサーデバイスで提供され得る。パックは、例えば、金属箔またはプラスチック箔を含むことができ、例えば、ブリスターパックなどである。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が添付され得る。パックまたはディスペンサーにはまた、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府当局により定められた形式で容器に付けられた通知が伴い得る。この場合、そのような通知は、ヒトもしくは動物への組成物の形態の当局による承認を反映する。そのような通知は、例えば、処方薬物についての米国食品医薬品局により承認されたラベル書きであり得るか、または承認された製品添付文書であり得る。適合し得る医薬用キャリアに配合された本発明の調製物を含む医薬組成物はまた、上でさらに詳述したように、適応状態の処置のために調製し、適切な容器に入れ、表示することができる。

40

#### 【0146】

本発明の方法はまた、低下したレベルのアポトーシスに関連する様々な他の病理を処置するために使用され得ることが理解される。これらには、例えば、乾癬（Victor FCおよびGottlieb AB、2002、J. Drugs Dermatol.、1:264~75）、魚鱗癬（Melino G他、2000、Methods Enz

50

y m o l . , 3 2 2 : 4 3 3 ~ 7 2 )、尋常性疣贅、角化棘細胞腫 ( T s u j i T、1997、J . C u t a n . P a t h o l .、24 : 4 0 9 ~ 1 5 )、脂漏性角化症 ( S a t c h e l l A C 他、2004、B r . J . D e r m a t o l .、151 : 4 2 ~ 9 )、脂漏症、扁平上皮ガン ( S C C ; S e t a C 他、2000、J . O r a l P a t h o l . M e d .、29 : 2 7 1 ~ 8 )、基底細胞ガン ( B C C ; L i C 他、2004、O n c o g e n e、2004、23 : 1 6 0 8 ~ 1 7 )、非メラノーマ皮膚ガン ( N M S C ) および多数のヒト腫瘍が含まれる。

【0147】

本発明を実施にさらに移しているとき、本発明者らは、本発明の組換え型の単離された抗体は、ガンまたは病原体感染を診断するために使用することができることを発見している。図4a~図4fに示され、また、下記の実施例の節の実施例2において記載されるように、G1 s c F v 抗体は、HLA-A2陰性 / g p 1 0 0 発現のG-43自然メラノーマ細胞ではなく、HLA-A2陽性 / g p 1 0 0 発現のFM-3-29、M-ww、M-PAT、M-141およびFM3-Dの自然メラノーマ細胞を特異的に免疫染色することができた。

10

【0148】

従って、本発明のさらなる態様によれば、対象においてガンまたはウイルス感染を診断する方法が提供される。この方法は、(a)対象の生物学的サンプルを、MHC-ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、標的のガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体と、免疫複合体形成のために好適な条件のもとで接触させること；および(b)免疫複合体の形成を検出すること、それにより、対象におけるガンまたは病原体感染を診断することによって行われる。

20

【0149】

本明細書中で使用される表現「診断する」は、疾患(ガンまたは病原体感染)または症状を分類すること、疾患の重篤度を決定すること、疾患の進行をモニターすること、疾患の結果および/または回復の見込みを予測することを示す。

【0150】

本明細書中で使用される「生物学的サンプル」は、対象から単離された組織または流体のサンプルを示し、これには、例えば、血液細胞、骨髄細胞および特にマクロファージ、リンパ液、様々な腫瘍、ニューロン細胞、樹状細胞、臓器、ならびに、同様に、インビボ細胞培養構成物のサンプルが含まれるが、これらに限定されない。「対象の生物学的サンプル」はまた、場合により、対象から物理的に取り出されていないサンプルを含む場合があることに留意しなければならない。

30

【0151】

本発明の1つの好ましい実施形態によれば、本発明のこの態様による方法を使用して診断されるガンは充実性腫瘍(例えば、乳ガンおよびメラノーマなど)である。好ましくは、対象から得られる生物学的サンプルは組織標本であり、例えば、好ましくは切片(例えば、パラフィン切片または凍結切片)に切断される組織生検物などである。

【0152】

本発明によるガンまたは病原体感染の診断は、対象の生物学的サンプルを、本発明の組換え型の単離された抗体と、免疫複合体形成のために好適な条件のもとで接触させることによって行うことができる。

40

【0153】

本明細書中で使用される用語「免疫複合体」は、抗体(例えば、本明細書中上記で記載されたような本発明の組換え型の単離された抗体)とその特異的な抗原との間で形成された複合体(例えば、特定のMHC-ペプチド複合体、例えば、HLA-A2-G9-209複合体、HLA-A2-G9-280複合体、HLA-A2-MART126-35複合体など)を示す。

【0154】

50

本発明の免疫複合体は、使用された抗体、および、抗原を提示する細胞に依存して変化し得る様々な温度、塩濃度およびpH値において形成することができ、当業者は、それぞれの免疫複合体の形成のために好適な条件を調節することができる。

【0155】

例えば、実施例2において、また、図4a~図4gの説明において記載されるように、G1-HLA-A2-G9-209免疫複合体の形成については、メラノーマ細胞（例えば、FM-3-29細胞、M-ww細胞、M-PAT細胞、M-141細胞）が、10%のウシ胎児血清（FCS）を含有するRPMI培養培地において20 $\mu$ g~30 $\mu$ gのG1scFvと氷上で1時間インキュベーションされた。

【0156】

本発明のこの態様の方法によれば、免疫複合体形成の検出により、疾患（例えば、ガンまたはウイルス感染）の診断が示される。様々な方法を、本発明の免疫複合体を検出するために使用することができ、当業者は、どの方法が、それぞれの免疫複合体について、かつ/または、診断のために使用された細胞のタイプについて好適であるかを決定することができる。

【0157】

例えば、免疫複合体を、免疫組織化学または免疫蛍光、FACS、ELISA、ウエスタンブロットおよびRIAの各分析によって、あるいは、分子量に基づく方法によって検出することができる。

【0158】

免疫組織化学分析または免疫蛍光分析。この方法は、抗原（例えば、MHC-ペプチド複合体）を抗原特異的な抗体（すなわち、本発明の組換え型の単離された抗体）によって固定処理細胞においてインサイチュで検出することを伴う。抗原特異的な抗体は酵素に結合することができるか、または、蛍光団に結合することができる。検出は顕微鏡および主観的評価または自動的評価によって行われる。酵素結合抗体が用いられるならば、比色反応が要求される場合がある。免疫組織化学は、多くの場合、その後、例えば、ヘマトキシリン染色またはギムザ染色を使用する細胞核の対比染色が行われることが理解される。

【0159】

蛍光活性化細胞分取（FACS）。この方法は、抗原を抗原特異的な抗体によって細胞においてインサイチュで検出することを伴う。抗原特異的な抗体が蛍光団に結合される。検出は、細胞が光ビームを通過するときのそれぞれの細胞から放射される光の波長を読み取る細胞分取装置によって行われる。この方法では2つ以上の抗体を同時に用いることができる。

【0160】

酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）。この方法は、抗原（例えば、MHC-ペプチド複合体）を含有するサンプル（例えば、固定処理細胞またはタンパク質性溶液）を表面（例えば、マイクロタイタープレートのウェルなど）に固定することを伴う。酵素にカップリングされた抗原特異的な抗体が加えられ、抗原に結合させられる。その後、抗体の存在が、抗体にカップリングされた酵素を用いる比色反応によって検出および定量される。この方法において一般に用いられる酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが含まれる。十分に校正され、かつ、応答の直線範囲にあるならば、サンプルに存在する基質の量は、生じた色の量に比例する。基質標準が、量的正確性を改善するために一般に用いられる。

【0161】

ウエスタンブロット。この方法は、基質をアクリルアミドゲルによって他のタンパク質から分離すること、その後、メンブラン（例えば、ナイロンまたはPVDf）への基質の転写を伴う。その後、基質の存在が、基質に対して特異的な抗体によって検出され、次いで、その抗体が抗体結合試薬によって検出される。抗体結合試薬は、例えば、プロテインAまたは他の抗体（例えば、ECLキット（Amersham Biosciences Inc.、Piscataway、NJ、米国）における抗体など）であり得る。抗体

10

20

30

40

50

結合試薬は放射能標識することができ、または、本明細書中上記で記載されたように酵素に結合することができる。検出を、オートラジオグラフィ、比色反応または化学発光によって行うことができる。この方法は、基質の量の定量と、電気泳動期間中のアクリルアミドゲルにおける移動距離を示すメンブラン上での相対的な位置によるその同一性の決定との両方を可能にする。MHC - ペプチド複合体の場合、非変性ゲル電気泳動が好ましくは用いられることが理解される。

**【0162】**

放射免疫アッセイ (RIA)。1つの型式において、この方法は、特異的抗体と、沈殿可能なキャリア (例えば、アガロースビーズなど) に固定化された放射能標識された抗体結合性タンパク質 (例えば、I<sup>125</sup> で標識されたプロテインA) とを用いて所望の抗原 (すなわち、MHC - ペプチド複合体) を沈殿させることを伴う。沈殿ペレットにおけるカウント数が抗原の量に比例する。

10

**【0163】**

RIAの1つの代わりの型式において、標識された抗原と、標識されていない抗体結合性タンパク質とが用いられる。未知量の抗原を含有するサンプルが様々な量で加えられる。標識された抗原からの沈殿したカウント数の減少が、添加されたサンプルにおける抗原の量に比例する。

**【0164】**

分子量に基づく方法。MHC - ペプチド複合体との間で形成された免疫複合体はその構成成分 (すなわち、組換え型の単離された抗体またはMHC - ペプチド複合体) よりも大きい分子量を示すことが理解される。従って、分子量におけるそのような変化を検出することができる方法もまた用いることができる。例えば、免疫複合体をゲル遅延アッセイによって検出することができる。簡単に記載すると、非変性アクリルアミドゲルに、組換え型の単離された抗体およびMHC - ペプチド複合体を含有する免疫複合体形成前および免疫複合体形成後のサンプルが負荷される。その構成成分と比較したときのタンパク質生成物のサイズ (分子量) における変化により、免疫複合体の存在が示される。高分子量側へのそのような変化を、非特異的なタンパク質染色 (例えば、銀染色またはクーマシーブルー染色など) を使用して可視化することができる。あるいは、MHCまたは組換え型の単離された抗体をゲル電気泳動前に (例えば、放射性標識で) 標識することができる。加えて、または、あるいは、MHC複合体を発現する細胞をタンパク質抽出前に放射能標識することができる。

20

30

**【0165】**

好ましくは、免疫複合体の形成を検出する方法は、充実性腫瘍の組織切片 (例えば、パラフィン切片または凍結切片) に対して行われる免疫組織化学 (免疫蛍光を含む) である。

**【0166】**

ガンまたは病原体感染の診断はまた、細胞を本発明の組換え型の単離された抗体と接触させた後、細胞におけるアポトーシスを (本明細書中上記で記載されたように) 検出することによって行われ得ることが理解される。

**【0167】**

従って、本発明のさらにさらなる態様によれば、対象においてガンまたは病原体感染を診断する方法が提供される。この方法は、(a) 対象の生物学的サンプルを、MHC - ペプチド複合体と特異的に結合することができ、かつ、標的のガン細胞または病原体感染細胞においてアポトーシスを誘導することができる組換え型の単離された抗体と、免疫複合体形成のために好適な条件のもとで接触させること; および (b) 生物学的サンプルの細胞におけるアポトーシスのレベルを検出すること、それにより、対象においてガンまたは病原体感染を診断することによって行われる。

40

**【0168】**

免疫複合体形成の検出のために本明細書中上記で記載された薬剤は、好ましくは、使用のための適切な説明書、ならびに、ガンまたはウイルス感染の重篤度を診断および/また

50

は評価することにおける使用のためのFDA承認を示すラベルと一緒に診断キット/製造物に含めることができる。

【0169】

そのようなキットは、例えば、上記で記載された診断剤の少なくとも1つ（例えば、G1抗体、9H抗体またはCLA12抗体）を含む少なくとも1つの容器と、別の容器に包装された画像化試薬（例えば、酵素、二次抗体、緩衝剤、発色性基質、蛍光性物質）とを含むことができる。キットはまた、キットの貯蔵寿命を改善するための適切な緩衝剤および保存剤を含むことができる。

【0170】

本発明の好ましい実施形態によれば、ガンまたはウイルス感染の診断はまた、組換え型の単離された抗体を細胞と接触させた後、細胞におけるアポトーシスのレベルを検出することによって行うことができる。そのような方法が本明細書中上記に記載される。

10

【0171】

本明細書中で使用される用語「約」は±10%を示す。

【0172】

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。

【実施例】

【0173】

20

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。

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”、Freshmeyer、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386751

30

40

50

7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、1990；“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 “The function of MHC molecules”, “Fundamental Immunology”, Paul WE 編、1999、第4版；Lippincott - Raven publishers (その全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。

【0174】

#### 実施例 1

##### TCR様抗体の調製

TCR様抗体の単離および特徴づけ。本研究で使用されたモデルシステムは、白人集団における最も高頻発のMHC対立遺伝子(約40%)であるヒトスーパーハプロタイプHLA-A2分子であった。腫瘍関連抗原およびウイルス抗原に由来するペプチドのペプチドT細胞エピトープを呈示する組換えMHC-ペプチド複合体を、単鎖MHC(scMHC)構築物を使用することによって作製した[Denkberg他、2000；Denkberg他、2001]。

【0175】

Lev他(2002)は、組換え操作された単鎖MHC-ペプチド複合体を利用して、TCR様特異性を有する抗体をファージ抗体ライブラリーの大きな非免疫レパートリーから単離した。スクリーニングされた標的HLA-A2/ペプチド複合体には、腫瘍関連抗原に由来する様々なエピトープ(例えば、多くの腫瘍細胞において広く発現されるテロメラーゼ触媒サブユニット(hTERT)、メラノーマ分化抗原gp100[Denkberg他、2002a]、乳ガンに関係づけられる上皮細胞関連ムチン(MUC1)[Cohen他、2002]、または、ヒトT細胞リンパ親和性ウイルスタイプI(HTLV-1)転写因子(TAX)に由来するウイルスエピトープ[Cohen他、2003]など)、あるいは、インフルエンザマトリックスタンパク質エピトープ、または、エプスタイン・バールウイルス(EBV)由来のエピトープが含まれた。

【0176】

ペプチド-MHC複合体に対する2回および3回の選択の後、様々なペプチドと複合体形成したヒトHLA-A2 MHC分子を認識する予想外かつ驚くほどの高頻度(6%~80%)の抗体が観測された。さらに、これらの抗体の著しく大きい割合(20%~80%)がT細胞のようなMHC拘束かつペプチド特異的な結合特性を示した。1つだけの珍しい抗体クローンがハイブリドーマまたはファージライブラリーから単離することができたマウス系における以前の報告とは異なり、今回は、スクリーニングされたそれぞれのM

H C - ペプチド複合体についての一群の異なる抗体が単離された [ C o h e n 他、 2 0 0 2 ; L e v 他、 2 0 0 2 ; D e n k b e r g 他、 2 0 0 2 a ; C o h e n 他、 2 0 0 3 ] 。これらの抗体は、T細胞の抗原特異的かつMHC拘束の特異性を有しており、それらの対応するMHC - ペプチド複合体にナノモル濃度の範囲での大きい親和性を伴って結合した。加えて、これらの抗体は、特定のペプチドが呈示されたときにだけ、MHC複合体に対して選択的であった。従って、これらの抗体は抗体の結合特性および結合速度論を示したが、T細胞の細かい特異性を模倣しており、従って、これらの抗体をTCR様抗体と名付けた。

#### 【 0 1 7 7 】

単離された抗体フラグメント ( s c F v ) が、細胞表面に発現されるような天然形態でのMHC - ペプチド複合体に特異的に結合することを明らかにするために、数通りの方法を用いた。これらの実験では、特定のs c F vが、適切な特定のペプチドを呈示する細胞に対してだけ結合したことが明らかにされた ( D e n k b e r g , G . 他、 2 0 0 2 a ; L e v , A . 他、 2 0 0 2 ; C o h e n , C J . 他、 2 0 0 2 ; L e v , A . 他、 2 0 0 2、MHC拘束のT細胞受容体様特異性を有するヒト組換え抗体：様々な腫瘍関連抗原に由来する異なったT細胞エピトープの認識、Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention, Monduzzi Editore press、163頁~167頁; Cohen, C J . 他、 2 0 0 3、J . Immunol、170: 4349~4361; Denkberg, G . 他、 2 0 0 3、J . Immunol、171: 2197~2207; Cohen 20 C . J . 他、 2 0 0 3、J . Mol . Recog .、16: 324~332; Yaman o , Y . 他、 2 0 0 4、J . Exp . Med .、199: 1367~1377; Held , G . 他、 2 0 0 4、Eur . J . Immunol、34: 2919~2929 )。例えば、1A7、2F1およびG2D12の各s c F vは、それらのそれぞれのgp100由来エピトープのG9 - 209、G9 - 280およびG9 - 154が負荷されたRMA - S - HHD細胞とのみ反応し、コントロールのペプチドが負荷された細胞とは反応しなかった ( 図 1 a ~ 図 1 c )。いくつかの他のAPCが、これらのFabのペプチド特異的な結合を明らかにするために使用された (例えば、TAP+のEBVにより形質転換されたBリンパ芽球HLA - A2+のJY細胞、または、成熟した樹状細胞 ( DC ) など)。これらの細胞では、ペプチド負荷が、内因的に由来するペプチドを、細胞を所望のペプチド 30 とインキュベーションすることによって外部から供給されるHLA - A2拘束ペプチドと交換することによって促進される。TCR様Fabフラグメントが、図1bに示されるように、他のコントロールHLA - A2拘束ペプチドを呈示するコントロール細胞とはではなく、TCR様Fabフラグメントが選択された特定のペプチドとインキュベーションされたJY細胞または成熟DCと反応した。

#### 【 0 1 7 8 】

予想されなかった高頻度のこれらの抗体、および、いずれかの複合体に向けられたいくつかの異なる抗体を単離することができたことは、免疫化ファージライブラリーまたは実験未使用のファージライブラリーの使用により、1個だけの抗体クローンがもたらされただけであった以前の報告 [ A n d e r s e n 他、 1 9 9 6 ; P o r g a d o r 他、 1 9 9 7 ; D a d a g l i o 他、 1 9 9 7 ; Z h o n g 他、 1 9 9 7 b ; K r o g s g a a r d 他、 2 0 0 0 ; P o l a k o v a 他、 2 0 0 0 ; C o h e n 他、 2 0 0 3 ] に照らしてさら 40

#### 【 0 1 7 9 】

TCR様抗体を使用する抗原提示の研究。TCR様抗体は、腫瘍細胞の場合と同様に、トランスフェクションされたモデルにおいて抗原提示を研究するための強力なツールである。例えば、生理学的な抗原プロセッシング条件のもとで産生されたHLA - A2 / Tax複合体を検出するTCR様Fab抗体の能力を調べるために、EBV形質転換されたB細胞のHLA - A2陽性の抗原提示JY細胞をHTLV - 1 Tax遺伝子によりトランスフェクションした。トランスフェクション後24時間で、コントロールを越える著しい染 50

色が、T a x 遺伝子によりトランスフェクションされたH L A - A 2 陰性のA P D 細胞に関してではなく、T a x 遺伝子によりトランスフェクションされたH L A - A 2 陽性のJ Y 細胞に関してのみ、T C R 様抗体を使用して明瞭に見ることができた(図2 d ~ 図2 i)。抗T A X / H L A - A 2 F a b による反応性のペプチド特異的かつM H C 拘束のパターンは、トランスフェクションされた細胞の割合が、G F P 構築物を利用するコントロール実験で明らかにされたように類似していたため、J Y 細胞およびA P D 細胞のトランスフェクション効率またはH L A 発現における違いのためではなかった。これらの結果は、T C R 様F a b 抗体は、活性かつ天然に存在する内因性の細胞内プロセッシングの後において特定のM H C - ペプチド複合体を検出することができることを示している。

#### 【0180】

腫瘍細胞上での特定のペプチド - H L A 複合体の密度は、ペプチドパルス処理されたA P C またはトランスフェクションされたA P C と比較して低いことが予想されるため、いくつかのs c F v のアビディティを、直接的にタグ化された蛍光性プローブを用いて、s c F v 四量体を作製することによって増大させた。s c F v 四量体を形成させるために、それぞれのs c F v フラグメントを、C L ドメインまたはC H 1 ドメインのC 末端での部位特異的なビオチン化のためのB i r A 配列タグを含むように操作し、ビオチン化後、それぞれのストレプトアビジン分子は4つのs c F v フラグメントと結合することができた。蛍光性四量体を使用することの別の利点は、1回だけの染色工程が要求されることであり、これに対して、単量体の非標識s c F v では、蛍光標識された二次抗体が要求される。これらの非常に高感度なs c F v 四量体を使用して、乳ガン細胞の表面における所望のペプチド / M H C 複合体の出現を特異的に検出することが可能であった。H L A - A 2 分子との複合体でムチンエピトープに向けられた四量体化s c F v は、M U C 1 陰性かつH L A - A 2 + のメラノーマF M 3 D 細胞またはH L A - A 2 かつM U C 1 陰性のG - 4 3 細胞においてではなく、M U C 1 を発現するH L A - A 2 + のM C F 7 細胞およびM D A - M B 2 3 1 細胞の表面においてM U C 1 - D 6 複合体を検出することができた。M 3 A 1 四量体は、M U C 1 陽性かつH L A - A 2 陰性のS K - B R 3 細胞に関して低いバックグラウンド染色を示した。そのような分子は、A P C および腫瘍細胞の表面に提示されるような特定のペプチド / M H C 複合体を定量するための新しい手段をも提供する。この方法は、腫瘍細胞の表面における腫瘍関連T C R リガンド(ペプチド - M H C 複合体)の数を、直接的な手段を使用して定量するための最初の試みである。

#### 【0181】

染色された細胞の蛍光強度を測定し、既知数の蛍光団を有する校正用ビーズの蛍光強度と比較した(Cohen, C J. 他、2002、Cancer Res.、62:5835~5844)。この方法は、蛍光団により染色された細胞をフローサイトメーターにより定量する容易かつ高感度な手段を提供する。抗ムチンT C R 様F a b を使用し、ペプチドパルス処理された細胞、ならびに、天然ではパルス処理されない腫瘍細胞において呈示されるM U C 1 - D 6 / H L A - A 2 複合体の数を初めて定量した：J Y A P C 細胞をペプチドでパルス処理することにより、細胞あたり $1.2 \times 10^5$ 個もの多くのD 6 - H L A - A 2 複合体を検出することができた。後者の結果は、マウスの特異的なT C R 様抗体を使用した細胞のインビトロでの組換えワクシニアウイルス感染の後におけるオボアルブミンペプチドS I I N F E K L に結合したマウスH - 2 k b の最近の定量と完全に一致している[Porgador 他、1997]。M U C 1 を発現する腫瘍細胞の表面におけるD 6 - M U C 1 由来複合体の数が細胞あたりわずかに数百個に達することが推定された(表1、下記)。

10

20

30

40

表 1  
腫瘍細胞表面の D6-HLA-A2 複合体数の定量

細胞	平均部位数/細胞
JY (パルス処理後、1mMペプチド)	120,959 ± 16,934
MCF7 (パルス処理後、1mMペプチド)	5,539 ± 1,828
MDA MB 231 (1mMペプチド)	10,022 ± 2,004
MCF7	284 ± 170
MDA MB 231	173 ± 112
バックグラウンド	26 ± 11

10

表 1 : それぞれの実験における染色細胞の蛍光強度を、ビーズあたり既知数のフィコエリトリン (PE) 分子を有する校正用ビーズ (Quant i B R I T E PEビーズ、B e c t o n - D i c k i n s o n) の蛍光強度と比較し、それぞれの実験についての部位数を求めた。非特異的な部位の数を、ペプチドまたは H L A - A 2 を発現しない細胞の染色強度によって求めた。その後、それぞれの実験についての特異的な部位の数をそれぞれの実験について計算した。平均部位数を 10 回の独立した実験 / 測定から計算した。部位数の偏差はそれぞれの個々の測定における検出感度および細胞の生理学的状態に依存する。バックグラウンド部位数を、S K - B R 3 細胞 (H L A - A 2 - / M U C 1 + )、F M 3 D 細胞 (H L A - A 2 + / M U C 1 - ) および G - 4 3 細胞 (H L A - A 2 - / M U C 1 - ) をコントロールとして使用して記載のように求めた。J Y 細胞は B 細胞である。ペプチドによるパルス処理は、細胞表面における潜在的な総 H L A - A 2 分子を定量するための手段として役立つ。

20

## 【 0 1 8 2 】

ウイルスモデルにおいて、H T L V - 1 感染細胞上の H L A - A 2 / T a x 複合体を検出することが可能であった。H T L V - 1 は、成人 T 細胞リンパ腫 / 白血病 (A T L L) および神経学的障害 (H A M / T S P) をはじめとする多くの病理に関与する。抗 T a x / H L A - A 2 F a b による著しい染色が、H U T 1 0 2 細胞 (H L A - A 2 - ) においてではなく、H T L V - 1 感染の R S C D 4 (H L A - A 2 + ) 細胞において観測された。このことは、T C R 様 F a b はウイルス感染細胞の表面の特定の H L A - A 2 / T a x 複合体を検出できることを示している。染色パターンにより、T C R 様 F a b との大きい反応性および低 ~ 中度の反応性を有する 2 つの亜集団が明らかにされた。このことは、R S C D 4 の H T L V - 1 感染細胞の亜集団内での特定の T a x エピトープの発現における変動性を示しているかもしれない。類似する変動性が、抗 T a x タンパク質抗体を用いた染色実験において観測された。この分析では、ウイルス感染の R S C D 4 細胞 (これもまた、大きい反応性および中度の反応性を有する 2 つの亜集団に分けることができた) がその表面に  $3 \times 10^4$  個の H L A - A 2 / T a x 複合体および数百個の部位をそれぞれ呈示することが明らかにされた。これらの結果は、集団内のそれぞれの細胞における特定のペプチド - M H C 複合体の発現に関する有用かつ容易に得られる直接的な量的データを提供するような T C R 様抗体の力を明瞭に明らかにしている。加えて、これらの結果は、無傷の完全な遺伝子によるトランスフェクションのときに産生されたタンパク質に由来する決定基を呈示するか、決定基を直接にウイルス感染細胞上に呈示する特定の M H C クラス I 分子の高レベルの発現を明らかにしている。

30

40

## 【 0 1 8 3 】

これらの結果は、腫瘍細胞の表面における M H C - ペプチド複合体の数が低く、細胞あたり数百個の複合体の範囲であると測定されたという事実 (表 1) に照らして驚くべきことである。

## 【 0 1 8 4 】

## 実施例 2

T C R 様抗体はメラノーマ細胞における特定の M H C - ペプチド複合体を認識することができる

50

腫瘍細胞に対するTCR様抗体の生物学的活性を調べるために、HLA-A2をgp100由来ペプチド209との複合体で認識する抗体G1を下記のようにインビトロで用いた。実施例2～実施例5において報告される実験で使用された手順（例えば、アポトーシス、細胞死、FACS、フローサイトメトリーおよび抗体結合）は、Denkberg, G. 他、2002、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、99:9421～9426; Lev, A. 他、2002、Cancer Res.、62:3184～3194; Denkberg, G. 他、2003、J. Immunol.、171:2197～2207に含まれる（これらはすべてがそれらの全体において参考として本明細書中にすべて組み込まれる）。

#### 【0185】

メラノーマ腫瘍細胞を、組換えFab抗体またはscFv抗体と、細胞表面に発現したHLA-A2/ペプチド複合体との反応性を明らかにするために使用した。約 $10^6$ 個の細胞を血清非含有RPMIにより2回洗浄し、 $100\mu\text{L}$ において組換えTCR様抗体（ $10\mu\text{g}/\text{mL} \sim 100\mu\text{g}/\text{mL}$ ）と4で60分間～90分間インキュベーションした。3回洗浄した後、細胞をFITC標識の抗ヒトFab（Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA、米国）とインキュベーションした。最後の洗浄の後、細胞を氷冷PBSに再懸濁した。接着性の腫瘍細胞をトリプシン処理によって集め、冷RPMIに再懸濁した。すべてのその後の洗浄およびインキュベーションを氷冷PBSにおいて行った。細胞の分析をFACSstarフローサイトメーター（Becton Dickinson and Co.、San Jose、CA、米国）によって行い、結果をWinMDIプログラム（Trotter J.、<http://facs.scripps.edu/>）により分析した。

#### 【0186】

安定なHLA-A2複合体がペプチド負荷細胞上に形成される。HLA-G9-209複合体と特異的に結合するG1抗体の能力を明らかにするために、HLA-G9-209複合体またはHLA-G9-280複合体を発現する細胞、あるいは、非負荷細胞を、W6/32抗体（HLAに対する抗体）、BB7.2抗体（HLA-A2に対する抗体）またはG1抗体とインキュベーションした。図3a～図3cに示されるように、細胞表面におけるHLA分子の発現および安定化はMHC-ペプチド複合体に依存している。加えて、G1抗体は、MHC-G9-209複合体を提示する細胞と特異的に相互作用することが見出された。G1 scFvが、腫瘍細胞の表面に呈示された特定のMHC-ペプチド複合体と結合できることを明らかにするために、HLA-A2+のメラノーマFM3D細胞を使用した。細胞を特定のgp100由来G9-209ペプチドまたはコントロールペプチドでパルス処理した（図3d）。JY APCと同様に、パルス処理中のメラノーマ細胞は、ペプチド交換によって促進される外部から供給されたペプチドの呈示を可能にする。この方法を使用して、細胞表面に呈示されるHLA-A2上に提示された外因的および内因的に由来するペプチドの混合物を得た。図3eに示されるように、G1 scFv抗体は、gp100由来のG9-280ペプチドでパルス処理されたFM3D細胞においてではなく、G9-209Mでパルス処理されたFM3D細胞におけるHLA-A2/G9-209M複合体を染色および検出することができた。G1 scFv抗体はまた、天然の非修飾G9-209ペプチドでパルス処理されたFM3D細胞を染色することができた（図3f）。しかしながら、G9-209MペプチドまたはG9-209ペプチドでパルス処理されたコントロールのHLA-A2陰性KB3-1細胞（図3g）はG1 scFv抗体によって認識されなかった（図3h）。

#### 【0187】

だが、これらの結果は、G1 scFv抗体は、特定のMHC-ペプチド複合体を、パルス処理されていない腫瘍メラノーマ細胞だけでなく、ペプチドでパルス処理された腫瘍メラノーマ細胞の表面において認識することができることを明らかにしている。

#### 【0188】

実施例3

10

20

30

40

50

### 9 H 組換え抗体および C L A 1 2 組換え抗体の同定

大きいヒト合成単鎖 F v 抗体ライブラリーを、M H C - ペプチド複合体と結合することができる抗体についてスクリーニングした。このライブラリーでは、インビボ形成された相補性決定領域 ( C D R ) を生殖系列由来のヒト可変領域フレームワークに組合せ論的に入れ替えた [ A z r i e l - R o s e n f e l d R、V a l e n s i M、B e n h a r I、インビボ形成された C D R を一般的なフレームワーク領域に入れ替えることに基づく配置可能な単鎖抗体のヒト合成コンビナトリアルライブラリー、J M o l B i o l、2004 ( 1月2日 ) ; 335 ( 1 ) : 177 - 92 ]。

#### 【 0 1 8 9 】

スクリーニングを、下記の抗原を使用して、本質的に他の所 ( D e n k b e r g , G . 10  
他、2002、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A .、99 : 9421 ~ 9426 ) で記載されるように行った：メラノーマ g p 100 タンパク質に由来する G 9 - 209 ペプチドとの単鎖 H L A - A 2 - 2 m 分子複合体、および、メラノーマ M A R T 1 タンパク質に由来する 26 - 35 ペプチドとの単鎖 H L A - A 2 - 2 m 分子複合体。

#### 【 0 1 9 0 】

2つの s c F v 抗体クローンを可溶性の抗体として単離した：

1 . 9 H s c F v 抗体 ( s c F v コード配列が配列番号 3 によって示され、s c F v ポリペプチド配列が配列番号 1 によって示され、9 H の C D R が配列番号 5 ~ 配列番号 10 で提供される )、これは、0 . 5 n M の結合親和性を伴って H L A - A 2 - G 9 - 209 複合体に対して特異的なヒト抗体である ( 示されず )。 20

2 . C L A 1 2 s c F v 抗体 ( s c F v コード配列が配列番号 18 によって示され、s c F v ポリペプチド配列が配列番号 17 によって示され、C L A 1 2 の C D R が配列番号 19 ~ 配列番号 24 で提供される )、これは、M A R T 1 メラノーマタンパク質に由来する H L A - A 2 - M A R T 2 6 - 3 5 ペプチドに対して特異的なヒト抗体である。

#### 【 0 1 9 1 】

#### 実施例 4

T C R 様抗体は腫瘍由来の M H C 複合体をインサイチュで検出することができる

T C R 様抗体についての別の大きな潜在的な使用は、免疫組織学的方法を使用する、非障害組織におけるリガンド保有細胞の直接的なインサイチュ可視化である。この可能性を評価するための第 1 歩として、リガンド保有細胞 ( H L A - A 2 / G 9 - 209 複合体 ) 30  
を直接的に可視化する G 1 s c F v の可能性をメラノーマ細胞に関して調べた。

#### 【 0 1 9 2 】

メラノーマ細胞はメラノーマ患者に由来し、国立ガン研究所 ( N I H ) から譲渡された。

#### 【 0 1 9 3 】

メラノーマ細胞上の H L A - A 2 / G 9 - 209 ペプチド - M H C 複合体のインサイチュ検出。細胞表面の g p 100 由来の G 9 - 209 エピトープを認識する G 1 抗体の能力をさらに特徴づけるために、パルス処理していないメラノーマ細胞を免疫組織化学分析において用いた ( 図 4 a ~ 図 4 g )。メラノーマ g p 100 を発現する H L A - A 2 陽性のメラノーマ細胞および H L A - A 2 陰性のメラノーマ細胞を、G 1 s c F v 抗体を用いた免疫組織化学染色、次いで、H R P 標識の抗 M y c 抗体を用いた二次染色工程に供した 40  
。図 4 a ~ 図 4 g に示されるように、これらの実験では、g p 100 を発現する H L A - A 2 陽性メラノーマ細胞株の F M - 3 - 29 ( 図 4 a )、M - w w ( 図 4 b )、M - P A T ( 図 4 c )、M - 141 ( 図 4 d ) および F M 3 - D ( 図 4 f ) の強い陽性染色が示され、しかし、g p 100 を発現する H L A - A 2 陰性メラノーマ G - 43 細胞 ( 図 4 e ) の陽性染色は示されず、また、H L A - A 2 陽性かつ g p - 100 陰性の M D A - M B - 231 乳ガン細胞 ( 図 4 g ) の陽性染色も示されなかった。G 1 s c F v は、調べられたさらに 6 つの非メラノーマ細胞株を染色しなかった ( データは示されず )。

#### 【 0 1 9 4 】

これらのデータは、G 1 s c F v T C R 様抗体は、天然に存在する活性な細胞内プ 50

ロセシングの後、細胞表面において、また、潜在的には組織切片において特定のペプチド-MHC複合体をインサイチュで検出することができることを示している。これは、TCR様scFv組換え抗体を使用する腫瘍由来のT細胞エピトープのインサイチュ検出を最初に明らかにするものである。

【0195】

#### 実施例5

TCR様抗体はペプチド特異的なMHC複合体拘束様式で細胞死を誘導することができる

細胞死を誘導し、かつ、抗原提示細胞を排除するTCR様抗体の能力を明らかにするために、ペプチド負荷APCをG1 scFv抗体による処理に供し、ヨウ化プロピジウム(P.I)染色またはアネキシンV染色を用いた。P.Iは接着性のアポトーシス細胞を染色し、アネキシンVは、損傷細胞における初期のアポトーシス事象を示すホスファチジルセリン(PS)に対する膜露出を検出する。

【0196】

#### 結果

G1 scFvは、HLA-A2ペプチドが負荷されたメラノーマ細胞において細胞死を誘導することができる。JY細胞に、gp100由来エピトープのG9-209MおよびG9-280V、ならびに、他のコントロールHLA-A2拘束ペプチドを負荷した。前述されるように、抗HLA-A2抗体を用いたFACS分析では、G9-209M負荷細胞、G9-280V負荷細胞および他のコントロールペプチド負荷細胞に関して、HLA-A2分子の類似する発現パターンが明らかにされた(図3a~図3h)。図5a~図5dに示されるように、アネキシンV染色では、G1 scFvにより、コントロールペプチドが負荷された細胞(図5d)の細胞死ではなく、特定のG9-209ペプチドが負荷された細胞(図5c)の細胞死が誘導され得ることが明らかにされた。細胞傷害活性が、gp100由来G9-280Vエピトープまたは他のコントロールHLA-A2拘束ペプチドが負荷されたRMA5-HHD細胞において、あるいは、ペプチドが負荷されなかった細胞において観測された(示されず)。EBVにより形質転換されたJY細胞(これは正常なTAPを発現する)では、外部から供給されたペプチドの呈示がペプチド交換によって促進される(すなわち、外部からのペプチドが、内部から来ているそのペプチドに取って代わりつつある)。

【0197】

これらの結果は、TCR様抗体がペプチド特異的なMHC拘束様式で細胞死を誘導し得ることを初めて明らかにしている。

【0198】

G1 scFvは非処理メラノーマ細胞において細胞死を誘導することができる。誘導された細胞死(「殺傷作用」)をさらに調べるために、G1 scFvの影響を、患者から樹立されたヒトメラノーマ細胞株について調べた。gp100およびHLA-A2が陽性であるメラノーマ株(526、624および501A)、gp100が陽性であるが、HLA-A2が陰性であるメラノーマ株(G43)、そして、gp100が陰性であり、HLA-A2が陽性であるメラノーマ株(1938)をG1抗体による処理に供し、タンパク質合成に対する抗体の影響を測定した。図6に示されるように、G1 scFv抗体は、HLA-A2タンパク質および腫瘍特異的なgp100タンパク質の両方について陽性のすべてのメラノーマ細胞の細胞死を用量依存的様式で誘導した。他方で、図6においてさらに示されるように、gp100抗原または正しいMHC対立遺伝子をそれぞれ発現しない1938メラノーマ細胞株またはG43メラノーマ細胞株のタンパク質合成は抗体によって影響を受けなかった。

【0199】

これらの結果は、TCR様抗体(例えば、G1など)が標的細胞の効率的な細胞死を誘導し得ることを初めて明らかにしている。これらの結果は、疾患特異的なMHC-ペプチド複合体を発現する疾患細胞(例えば、腫瘍細胞またはウイルス感染細胞など)の特定の

10

20

30

40

50

集団を抗原（ペプチド）およびMHCに拘束された様式で排除するための治療剤として使用することができる新しいファミリーの抗体型分子への道を開き得る。

#### 【0200】

メラノーマ分化抗原に由来するT細胞エピトープは最も特徴づけられているTAAであり、多くの免疫治療法（例えば、ペプチドおよび樹状細胞（DC）を用いた養子移入法およびワクチン接種など）が、これらの標的を使用して開発されていたため、本発明者らは、メラノーマ分化抗原（例えば、gp100、MART1およびチロシナーゼなど）および他の腫瘍関連MHC-ペプチド複合体、ならびに、ウイルス標的に向けられた一連のT細胞受容体様（TCRL）抗体を作製している（Denkberg, G. 他、2002、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、99:9421~9426; Denkberg, G. 他、2003、J. Immunol.、171:2197~2207; Lev, A. 他、2002、Cancer Res.、62:3184~3194; Cohen, CJ. 他、2002、Cancer Res.、62:5835~5844; Cohen, CL. 他、2003、J. Immunol.、170:4349~4361）。これらのTCRL抗体は、ペプチドでパルス処理されたAPCに結合することができ（図1~図3）、同様に、HLA-A2陽性であるメラノーマ患者由来のメラノーマ細胞株にも結合することができた（図4a~図4d）。従って、TCRL抗体は、細胞表面に発現されるような真正銘のMHC-ペプチド複合体と結合することができることを見出され、この反応性はHLA-A2および抗原の発現と相関し、かつ、HLA-A2および抗原の発現に依存していた。

10

20

#### 【0201】

TCRL-PE融合抗体は抗腫瘍活性を示す。TCRL抗体を、毒素の細胞結合ドメインが欠失され、移行ドメインおよびADP-リボシル化ドメインがTCRL抗体に融合される短縮化形態のシュードモナス菌体外毒素（PE38）に遺伝子融合した。タンパク質合成に対するそのような融合TCRL分子の影響を、様々なペプチドが負荷された細胞について調べた。図7a~図7cに示されるように、細胞が特定のgp100由来ペプチドにより負荷され、従って、HLA-ペプチド（例えば、G9-209）複合体を呈示したとき、特異的なタンパク質阻害活性が達成された。

#### 【0202】

図8a~図8dは、メラノーマ細胞内へのTCRLの内在化、および、HLA-A2-gp100+のメラノーマ細胞株（G-43）またはHLA-A2+/gp100-のメラノーマ細胞株（1938）に対してではなく、HLA-A2+/gp100+のメラノーマ細胞（例えば、526、501A、624.38）に対するTCRL（例えば、2F1抗体）の特異的な2F1細胞毒性作用を示す。加えて、図8dにおいてさらに示されるように、細胞死のそのような誘導が比較的低いTCRL濃度の存在下で達成され、有効IC<sub>50</sub>が15ng/mL~30ng/mLであった。

30

#### 【0203】

これらの結果から、特に腫瘍細胞上において薬物または毒素を標的化するためのTCRL抗体の潜在的な使用が強く示唆される。

#### 【0204】

ネイクトTCRL抗体はHLA-A2および抗原に特異的な様式でタンパク質合成の強力な阻害を示す。文献では、MHCクラスIおよびMHCクラスIIに対する抗体が標的細胞に対する様々な生物学的作用（特に、標的細胞のアポトーシスを引き起こすシグナル伝達事象を開始させるその能力）を有することが強く示されている（Nagy ZA 他、2002; Nagy ZA および Mooney NA.、2003; Longo, D. L.、2002; Vidovic D および Toral JI.、1998; Pedersen AE 他、1999; Ruhwald M 他、1999; Mori M 他、1999; Genestier L 他、1997; Genestier L 他、1997; Skov S 他、1997）。これらの研究は、MHCに対して特異的ではあるが、本発明のTCRL抗体のように、対立遺伝子およびペプチドに対して特異的ではない抗クラスI抗体

40

50

および抗クラス I I 抗体を用いて行われていた。ネイクド抗体として標的細胞に対する生物学的活性を発揮する本発明の T C R L 抗体の能力を調べるために、患者由来のメラノーマ細胞株を g p 1 0 0 特異的 T C R L 抗体および M A R T 1 特異的 T C R L 抗体とインキュベーションした。

#### 【 0 2 0 5 】

ネイクド T C R L 抗体は H L A - ペプチド特異的な様式でメラノーマ細胞においてアポトーシスを誘導した。メラノーマ細胞を、 g p 1 0 0 または M A R T 1 ( C L A 1 2 ) に向けられた、 2 F 1、 9 H および G 1 の各ネイクド T C R 様抗体フラグメントに供し、細胞のアポトーシスを、ヨウ化プロピジウム ( P I ) フローサイトメトリー染色を使用して測定した。図 9 a ~ 図 9 j はこれらの実験の結果を示す。 H L A - A 2 + / 抗原 + である細胞では、 P I 陽性細胞の割合が 4 4 % ~ 5 8 % の範囲であった ( 図 9 e ~ 図 9 g ) が、 H L A - A 2 ( + ) g p 1 0 0 ( - ) M A R T ( - ) の細胞または H L A - A 2 ( - ) g p 1 0 0 ( + ) M A R T ( + ) の細胞では、 P I 陽性細胞の割合が 7 % ~ 1 4 % の範囲であった ( 図 9 a ~ 図 9 d ) 。

10

#### 【 0 2 0 6 】

H L A - ペプチド複合体に対するネイクド T C R L 抗体の特異性を調べるために、 g p 1 0 0 + / H L A - A 2 + である 6 2 4 メラノーマ細胞を G 1 T C R L 抗体およびコントロール 1 A 7 T C R L 抗体 (これは、天然の G 9 - 2 0 9 ペプチドとの複合体においてではなく、変異型 G 9 - 2 0 9 M ペプチドとの複合体で H L A - A 2 に対して特異的である) で処理し、細胞を P I アネキシン V フローサイトメトリー分析に供した。図 9 i ~ 図 9 j に示されるように、 G 1 T C R L で処理された細胞では、 P I 陽性細胞およびアネキシン V 陽性細胞の割合がそれぞれ約 2 0 % および 5 3 % であったが、コントロールの 1 A 7 T C R L 抗体で処理された細胞では、 P I 陽性細胞およびアネキシン V 陽性細胞の割合がそれぞれ約 7 a % および 1 2 % であった。

20

#### 【 0 2 0 7 】

T C R L 抗体のクローニング。抗体がクラス I に結合することにより関与するシグナル伝達経路が二量体化を必要とするかどうかは文献から知られていない。本発明者らは、高濃度のメラノーマ特異的 T C R L s c F v が、高濃度では自発的な二量体形成が存在するという事実のためであることを仮定している。従って、 T C R L s c F v フラグメントを、 F d ドメインおよび C L F a b ドメインを I g G 1 骨格内にクローン化することによって完全な I g G 分子に転換し、完全な T C R L I g G 分子を H E K 2 9 3 細胞において形成させ、 T C R L I g G を培養上清から精製した。数個のクローンを、本質的には T h o m a s J o s t o c k a 他 ( F a b オンファージディスプレイライブラリーに由来する機能的なヒト I g G 抗体の迅速な作製、 J o u r n a l o f I m m u n o l o g i c a l M e t h o d s、第 2 8 9 巻、発行： 1 - 2、 2 0 0 4 年 6 月、 6 5 頁 ~ 8 0 頁) に記載されるように単離した。

30

#### 【 0 2 0 8 】

クローン化された T C R L I g G は H L A - ペプチド複合体に対する増大した特異性を示す。 g p 1 0 0 の H L A - A 2 / G 9 - 2 0 9 ペプチドを標的化する T C R 様抗体 9 H を完全な I g G 分子に転換し、ペプチドでパルス処理された J Y 細胞に対するその反応性を調べた。図 1 0 a ~ 図 1 0 d に示されるように、特定の g p 1 0 0 由来メラノーマペプチドでパルス処理された A P C に対する T C R L I g G 分子の反応性および特異性は維持され、また、そのアビディティの増大のために改善さえされた。同様に、 1 つの I g G クローンを、 H L A - A 2 - G 9 - 2 8 0 複合体に向けられている 2 F 1 s c F v から調製した。表 2 ( 下記 ) は、メラノーマ細胞株に対するネイクド T C R L I g G 分子の活性および s c F v 分子の活性の比較を示す。表 2 に示されるように、細胞死誘導活性が、クローン化された T C R L では維持されていた。さらに、 5 0 % 細胞死の著しいレベルを達成するために要求された T C R L I g G 分子の濃度が、 s c F v 抗体と比較して、著しく低下していた。

40

表 2

TCR様抗体による腫瘍細胞における細胞死の誘導：  
一価対二価の抗体アビディティの影響

特異的な細胞殺傷 (細胞死)の割合	<i>scFv</i> 抗体	<i>IgG</i> 完全抗体	変化倍数
20	37 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	74 倍
30	75 $\mu\text{g/ml}$	2.5 $\mu\text{g/ml}$	30 倍
50	130 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	33 倍

表 2 : g p 1 0 0 - G 9 - 2 8 0 メラノーマエピトープを標的化する T C R 様抗体を用いたメラノーマ細胞の特異的な細胞死を達成するために要求された 2 F 1 s c F v 抗体 (一価) および完全な 2 F 1 I g G (二価) の濃度

10

【 0 2 0 9 】

これらの結果は、特異的な M H C 拘束かつペプチド特異的なアポトーシスを標的細胞において誘導することができ、また、メラノーマおよび他の腫瘍タイプに対する治療的な免疫治療様式として前臨床的に開発され得る新しい実体として見なすことができる分子としてのその潜在的な適用を検討することだけでなく、メラノーマ細胞に対する標的化成分として役立たせるための T C R L 抗体の潜在的な使用を明らかにしている。

【 0 2 1 0 】

明確にするため別個の実施態様で説明されている本発明の特定の特徴は単一の実施態様に組み合わせて提供することもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施態様で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコンビネーションで提供することもできる。

20

【 0 2 1 1 】

本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更及び変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更及び変形すべてを包含するものである。本願で挙げた刊行物、特許及び特許願はすべて、個々の刊行物、特許及び特許願が各々あたたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用又は確認したことは本発明の先行技術として利用できる

30

【 0 2 1 2 】

## 参考文献

(追加の文献は本文中に引用されている)

1. Aharoni R., Teitelbaum D., Arnon R., Puri J. 1991. Immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis by antibodies to the antigen-Ia complex. *Nature*, 351: 147-150.
2. Altman J.D., Moss P.A.H., Goulder P.J.R., Barouch D.H., McHeyzer-Williams M.G., Bell J.I., McMichael A.J., Davis M.M. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [published erratum appears in *Science* 1998 Jun 19;280(5371):1821]. *Science*, 274: 94-96. 10
3. Andersen P.S., Stryhn A., Hansen B.E., Fugger L., Engberg J., Buus S. 1996. A recombinant antibody with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 1820-1824.
4. Boon T.van der B.P. 1996. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 183: 725-729. 20
5. Cloutier S.M., Couty S., Terskikh A., Marguerat L., Crivelli V., Pugnieres M., Mani J.C., Leisinger H.J., Mach J.P., Deperthes D. 2000. Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol. Immunol.*, 37: 1067-1077.
6. Cohen C.J., Hoffmann N., Farago M., Hoogenboom H.R., Eisenbach L., Reiter Y. 2002. Direct detection and quantitation of a distinct T-cell epitope derived from tumor-specific epithelial cell-associated mucin using human recombinant antibodies endowed with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells. *Cancer Res.*, 62: 5835-5844. 30
7. Cohen C.J., Sarig O., Yamano Y., Tomaru U., Jacobson S., Reiter Y. 2003. Direct Phenotypic Analysis of human MHC Class I Antigen Presentation: Visualization, Quantitation, and In Situ Detection of Human Viral Epitopes Using Peptide-Specific, MHC-restricted Human Recombinant Antibodies. *J.Immunol.* 170: 4349-4361, 2003. 40
8. Dadaglio G., Nelson C.A., Deck M.B., Petzold S.J., Unanue E.R. 1997. Characterization and quantitation of peptide-MHC complexes produced from hen egg lysozyme using a monoclonal antibody. *Immunity.*, 6: 727-738.

9. Day P.M., Yewdell J.W., Porgador A., Germain R.N., Bennink J.R. 1997. Direct delivery of exogenous MHC class I molecule-binding oligopeptides to the endoplasmic reticulum of viable cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94: 8064-8069.
10. Denkberg G., Cohen C.J., Segal D., Kirkin A.F., Reiter Y. 2000. Recombinant human single-chain MHC-peptide complexes made from *E. coli* by *in vitro* refolding: functional single-chain MHC-peptide complexes and tetramers with tumor associated antigens. *Eur. J Immunol.*, 30: 3522-3532. 10
11. Denkberg G., Cohen C.J., Reiter Y. 2001. Critical role for CD8 in binding of MHC tetramers to TCR: CD8 antibodies block specific binding of human tumor-specific MHC-peptide tetramers to TCR. *J Immunol.*, 167: 270-276.
12. Denkberg G., Cohen C.J., Lev A., Chames P., Hoogenboom H.R., Reiter Y. 2002a. Direct visualization of distinct T cell epitopes derived from a melanoma tumor-associated antigen by using human recombinant antibodies with MHC- restricted T cell receptor-like specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 9421-9426. 20
13. Denkberg G., Klechevsky E., Reiter Y. 2002b. Modification of a tumor-derived peptide at an HLA-A2 anchor residue can alter the conformation of the MHC-peptide complex: probing with TCR- like recombinant antibodies. *J. Immunol.*, 169: 4399-4407.
14. Krogsgaard M., Wucherpfennig K.W., Canella B., Hansen B.E., Svejgaard A., Pyrdol J., Ditzel H., Raine C., Engberg J., Fugger L. 2000. Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp. Med.*, 191: 1395-1412. 30
15. Lev A., Denkberg G., Cohen C.J., Tzukerman M., Skorecki K.L., Chames P., Hoogenboom H.R., Reiter Y. 2002. Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the widely expressed tumor T- cell epitopes of the telomerase catalytic subunit. *Cancer Res.*, 62: 3184-3194. 40
16. Polakova K., Plaksin D., Chung D.H., Belyakov I.M., Berzofsky J.A., Margulies D.H. 2000. Antibodies directed against the MHC-I molecule H-2D(d)

complexed with an antigenic peptide: similarities to a T cell receptor with the same specificity [In Process Citation]. *J Immunol.*, 165: 5703-5712.

17. Porgador A., Yewdell J.W., Deng Y., Bennink J.R., Germain R.N. 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity.*, 6: 715-726.

18. Reiter Y., Di Carlo A., Fugger L., Engberg J., Pastan I. 1997. Peptide-specific killing of antigen-presenting cells by a recombinant antibody-toxin fusion protein targeted to major histocompatibility complex/peptide class I complexes with T cell receptor-like specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94: 4631-4636. 10

19. Rognan D., Stryhn A., Fugger L., Lyngbaek S., Engberg J., Andersen P.S., Buus S. 2000. Modeling the interactions of a peptide-major histocompatibility class I ligand with its receptors. I. Recognition by two alpha beta T cell receptors. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 14: 53-69.

20. Stryhn A., Andersen P.S., Pedersen L.O., Svejgaard A., Holm A., Thorpe C.J., Fugger L., Buus S., Engberg J. 1996. Shared fine specificity between T-cell receptors and an antibody recognizing a peptide/major histocompatibility class I complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 10338-10342. 20

21. Wulfig C., Pluckthun A. 1994. Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli*. Influence of folding catalysts. *J. Mol. Biol.*, 242: 655-669.

22. Zhong G., Reis e Sousa, Germain R.N. 1997a. Antigen-unspecific B cells and lymphoid dendritic cells both show extensive surface expression of processed antigen-major histocompatibility complex class II complexes after soluble protein exposure in vivo or in vitro. *J. Exp. Med.*, 186: 673-682. 30

23. Zhong G., Reis e Sousa, Germain R.N. 1997b. Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94: 13856-13861.

24. Yamano Y, Cohen CJ, Takenouchi N, Yao K, Tomaru U, Li HC, Reiter Y, Jacobson S. Increased Expression of Human T Lymphocyte Virus Type I (HTLV-I) Tax11-19 Peptide-Human Histocompatibility Leukocyte Antigen A\*201 Complexes on CD4+ CD25+ T Cells Detected by Peptide-specific, Major 40

Histocompatibility Complex-restricted Antibodies in Patients with HTLV-I-associated Neurologic Disease. *J Exp Med.* 199: 1367-1377, 2004.

25. Zehn, D., Cohen, CJ., Reiter, ., and Walden, P. Extended presentation of specific MHC-peptide complexes by mature dendritic cells compared to other types of antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 34: 1551-1560, 2004.

26. Nagy ZA, Hubner B, Lohning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. 2002. Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med.* 8:801-7. 10

27. Nagy ZA, Mooney NA. 2003. A novel, alternative pathway of apoptosis triggered through class II major histocompatibility complex molecules. *J Mol Med.* 81:757-65 20

28. Longo, D.L., 2002. DR's orders: human antibody kills tumors by direct signaling. *Nature Med.* 8:781-3. 20

29. Vidovic D, Toral JJ. 1998. Selective apoptosis of neoplastic cells by the HLA-DR-specific monoclonal antibody. *Cancer Lett.* 128:127-35.

30. Pedersen AE, Bregenholt S, Johansen B, Skov S, Claesson MH. 1999. MHC-I-induced apoptosis in human B-lymphoma cells is dependent on protein tyrosine and serine/threonine kinases. *Exp Cell Res.* 251:128-34.

31. Ruhwald M, Pedersen AE, Claesson MH. 1999. MHC class I cross-talk with CD2 and CD28 induces specific intracellular signalling and leads to growth retardation and apoptosis via a p56(lck)-dependent mechanism. *Exp Clin Immunogenet.*;16:199-211 30

32. Mori M, Terui Y, Ikeda M, Tomizuka H, Uwai M, Kasahara T, Kubota N, Itoh T, Mishima Y, Douzono-Tanaka M, Yamada M, Shimamura S, Kikuchi J, Furukawa Y, Ishizaka Y, Ikeda K, Mano H, Ozawa K, Hatake K. 1999. Beta(2)-microglobulin identified as an apoptosis-inducing factor and its characterization. *Blood.* 94:2744-53. 40

33. Genestier L, Paillot R, Bonnefoy-Berard N, Meffre G, Flacher M, Fevre D, Liu YJ, Le Bouteiller P, Waldmann H, Engelhard VH, Banchereau J,

Revillard JP. 1997. Fas-independent apoptosis of activated T cells induced by antibodies to the HLA class I alpha1 domain. *Blood*. 90:3629-39.

34. Genestier L, Meffre G, Garrone P, Pin JJ, Liu YJ, Banchereau J, Revillard JP. 1997. Antibodies to HLA class I alpha1 domain trigger apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *Blood*. 90:726-35.

35. Skov S, Klausen P, Claesson MH. 1997. Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. *J Cell Biol*. 139:1523-31.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0213】

【図1a-c】抗原提示細胞に対するTCR様抗体の結合を示す。

【図1d-f】抗原提示細胞に対するTCR様抗体の結合を示す。

【図2a-c】天然に存在する活性化細胞内プロセッシングの後におけるTCR様抗体による特異的なHLA-A2/ペプチド複合体の検出を示す。

【図2d-i】天然に存在する活性化細胞内プロセッシングの後におけるTCR様抗体による特異的なHLA-A2/ペプチド複合体の検出を示す。

【図3a-d】フローサイトメトリーによって測定されたときの、ペプチドパルス処理されたJY APC (図3a~図3c) またはメラノーマFM3D細胞 (図3d) に対するg1scFvの結合を示す。

【図3e-h】フローサイトメトリーによって測定されたときの、メラノーマFM3D細胞 (図3e~図3f) またはkb3-1細胞 (図3g~図3h) に対するg1scFvの結合を示す。

【図4】G1scFv抗体によるメラノーマ細胞の染色を示す免疫組織化学分析である。

【図5】ペプチドパルス処理されたAPCに対するG1scFvの細胞毒性を示すFACS分析である。

【図6】メラノーマ細胞に対する、G1scFv抗体を用いた細胞毒性アッセイを示すグラフである。

【図7a-b】ペプチドパルス処理されたAPCに対するG1scFv-PE38の細胞傷害活性を示すグラフである。

【図7c】ペプチドパルス処理されたAPCに対するG1scFv-PE38の細胞傷害活性を示すグラフである。

【図8a-d】TCR様抗体の内在化 (図8a~図8c) およびメラノーマ細胞の殺傷 (図8d) を示す免疫染色 (図8a~図8c) およびグラフ (図8d) である。

【図8e】メラノーマ細胞の殺傷 (図8e) を示すグラフ (図8e) である。

【図9a-h】ネイクド (毒素非含有) TCR様抗体scFvフラグメントにより誘導されたメラノーマ細胞の細胞死を示すFACS分析である。

【図9i-j】ネイクド (毒素非含有) TCR様抗体scFvフラグメントにより誘導されたメラノーマ細胞の細胞死を示すFACS分析である。

【図10】完全なIgG分子へのTCR様抗体scFvフラグメントの転換、メラノーマ細胞における細胞死の誘導を示すフローサイトメトリー分析である。

【配列表フリーテキスト】

【0214】

配列番号1は単鎖Fv 9Hの配列である。

配列番号 2 は単鎖 F v G 1 の配列である。

配列番号 3 は単鎖 F v 9 H のコーディング配列である。

配列番号 4 は単鎖 F v G 1 のコーディング配列である。

配列番号 5 ~ 10 は s c F v 9 H C D R の配列である。

配列番号 11 ~ 16 は s c F v G 1 C D R の配列である。

配列番号 17 は単鎖 F v C L A 1 2 の配列である。

配列番号 18 は単鎖 F v C L A 1 2 のコーディング配列である。

配列番号 19 ~ 24 は s c F v C L A 1 2 C D R の配列である。

【図 1 a - c】

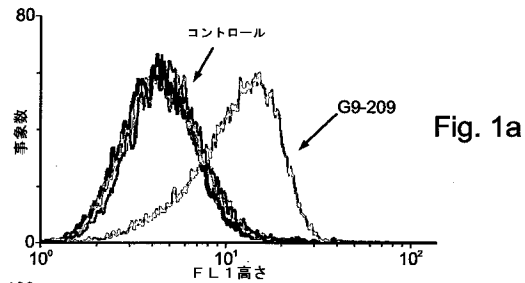


Fig. 1a

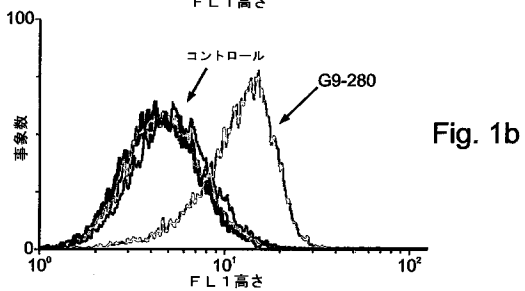


Fig. 1b

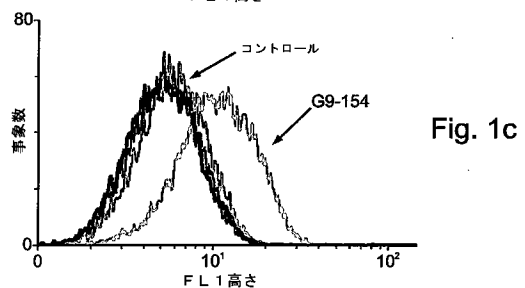


Fig. 1c

【図 1 d - f】

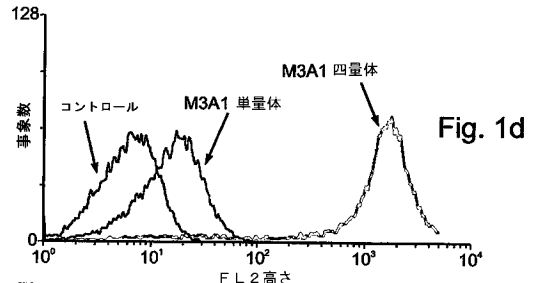


Fig. 1d

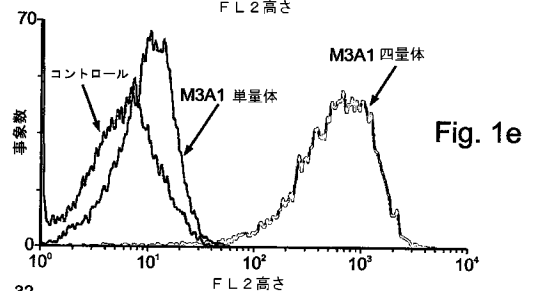


Fig. 1e

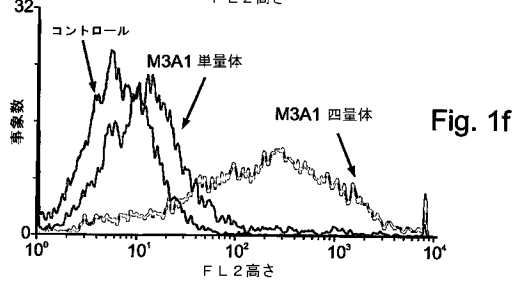
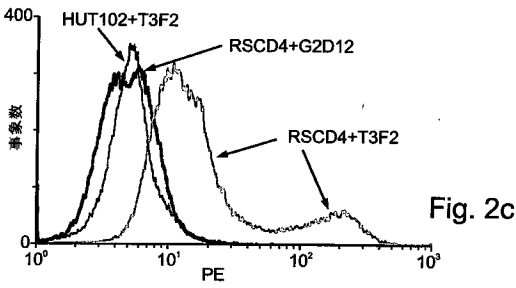
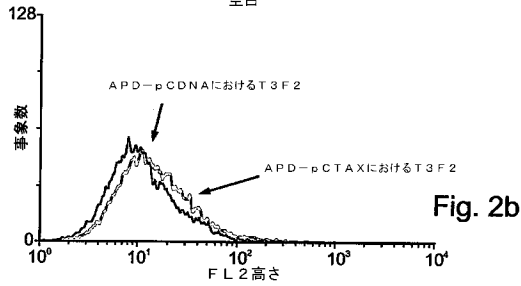
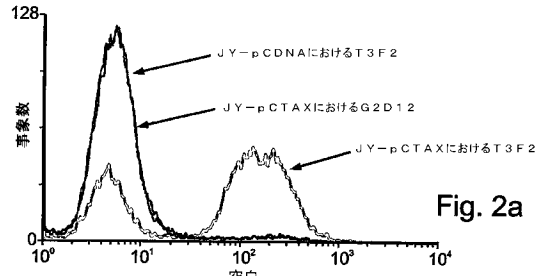


Fig. 1f

【 図 2 a - c 】



【 図 2 d - i 】

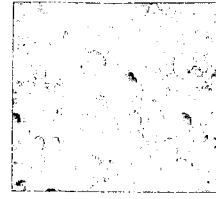


Fig. 2d

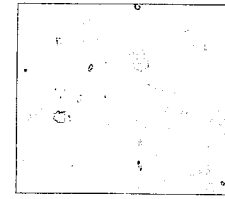


Fig. 2e

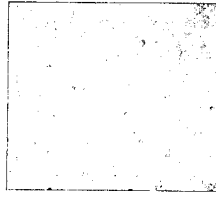


Fig. 2f

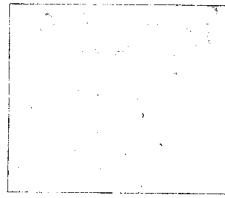


Fig. 2g

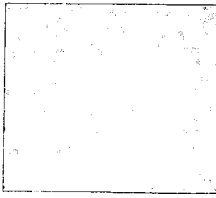


Fig. 2h

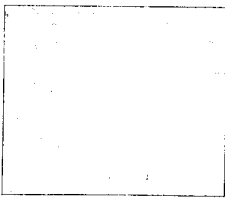


Fig. 2i

【 図 3 a - d 】

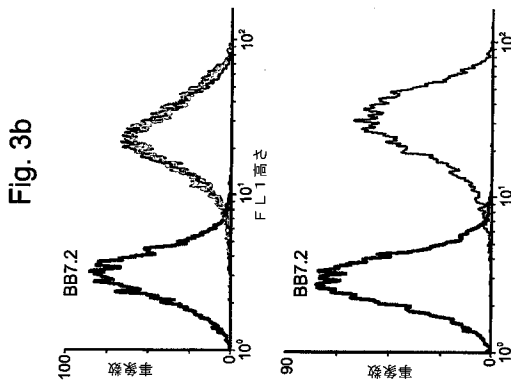
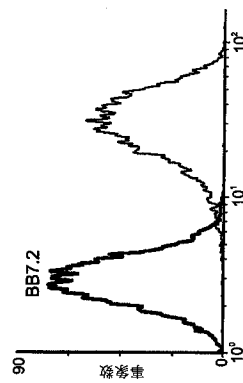


Fig. 3a

W6/32



BB7.2

G9-209M

Fig. 3a

W6/32

G1 scFv

G9-280

Fig. 3d

Fig. 3d

Fig. 3c

Fig. 3c

【 図 3 e - h 】

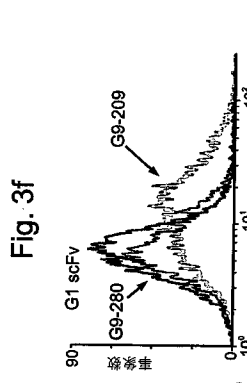


Fig. 3f

G1 scFv

G9-280

G9-209

Fig. 3e

G1 scFv

G9-280

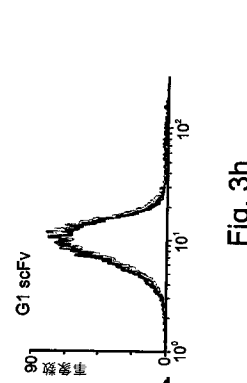
G9-209M

Fig. 3e

G1 scFv

G9-280

G9-209M



G1 scFv

BB7.2

G1 scFv

BB7.2

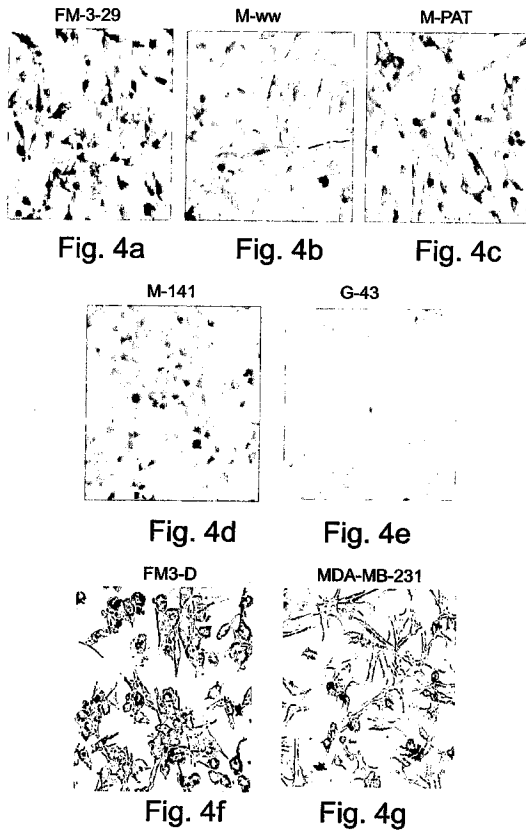
Fig. 3g

Fig. 3h

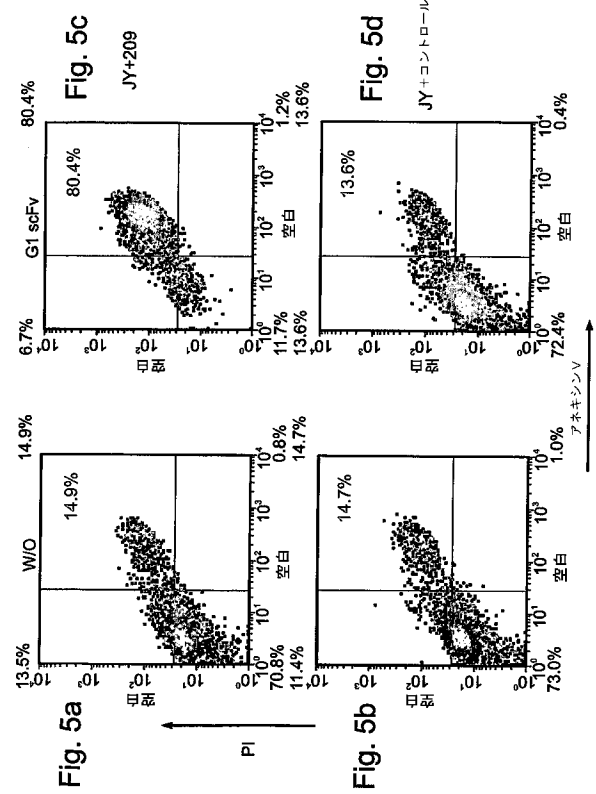
Fig. 3h

Fig. 3g

【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

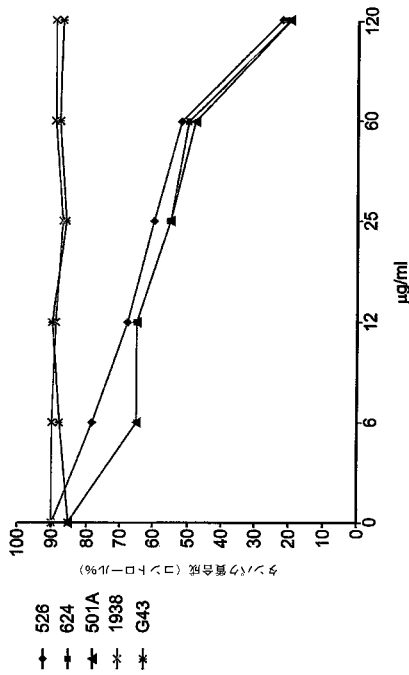


Fig. 6

【 図 7 a - b 】

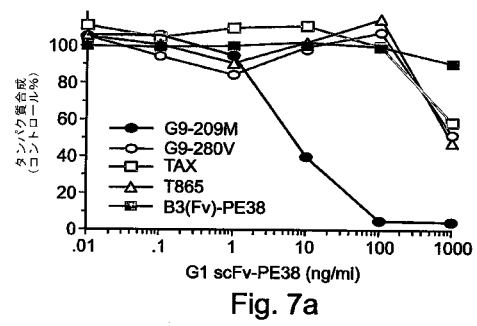


Fig. 7a

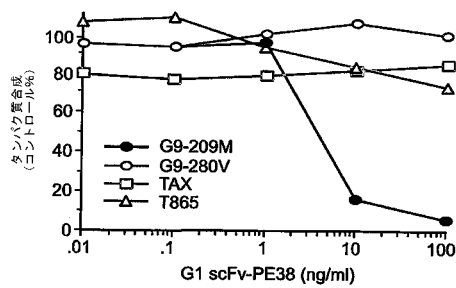


Fig. 7b

【 図 7 c 】

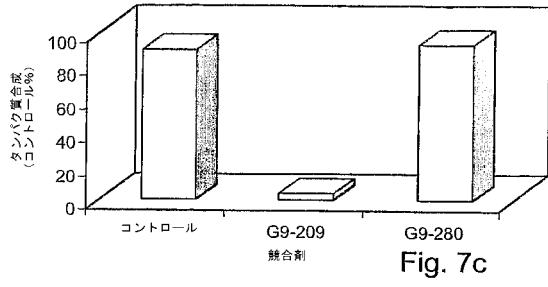


Fig. 7c

【 図 8 e 】

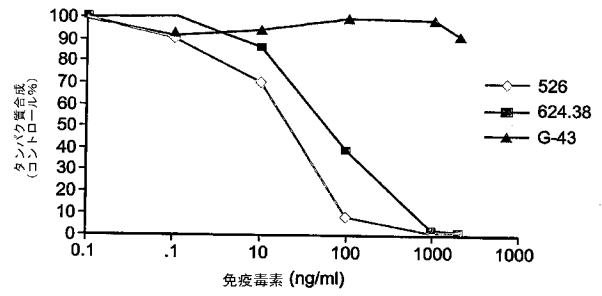


Fig. 8e

【 図 8 a - d 】

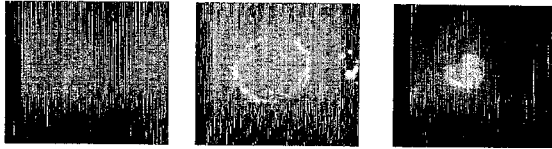


Fig. 8a

Fig. 8b

Fig. 8c

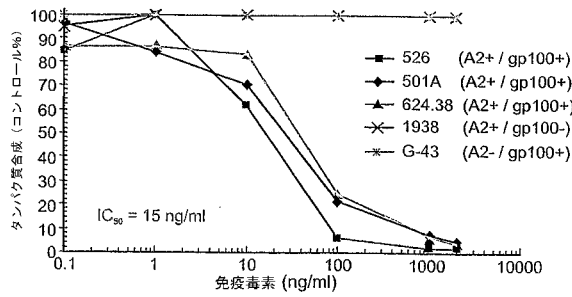


Fig. 8d

【 図 9 a - h 】

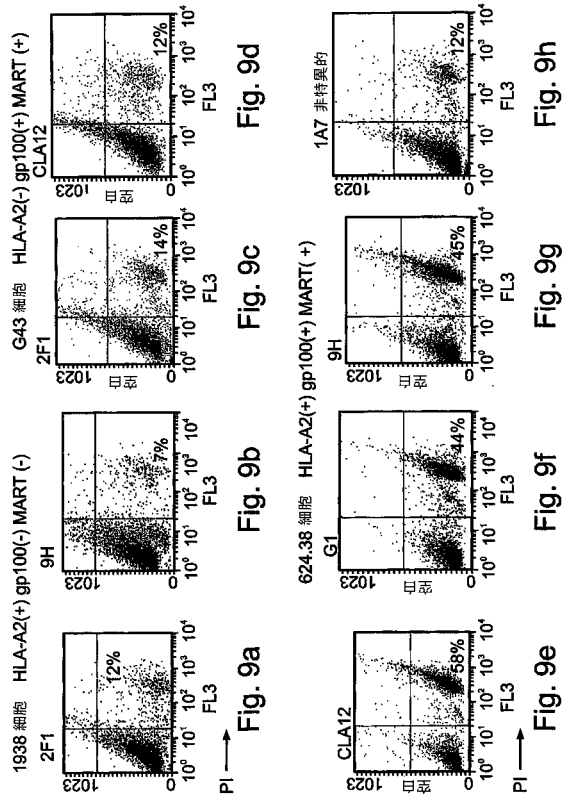


Fig. 9a

Fig. 9b

Fig. 9c

Fig. 9d

Fig. 9e

Fig. 9f

Fig. 9g

Fig. 9h

【 図 9 i - j 】

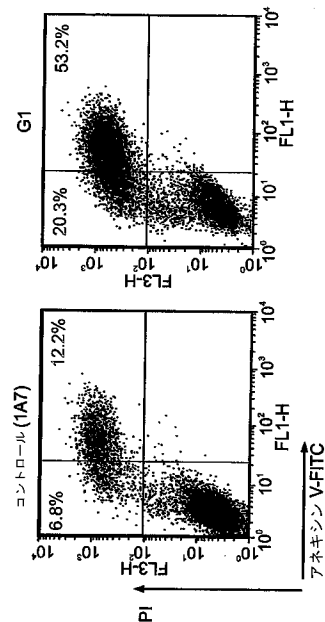
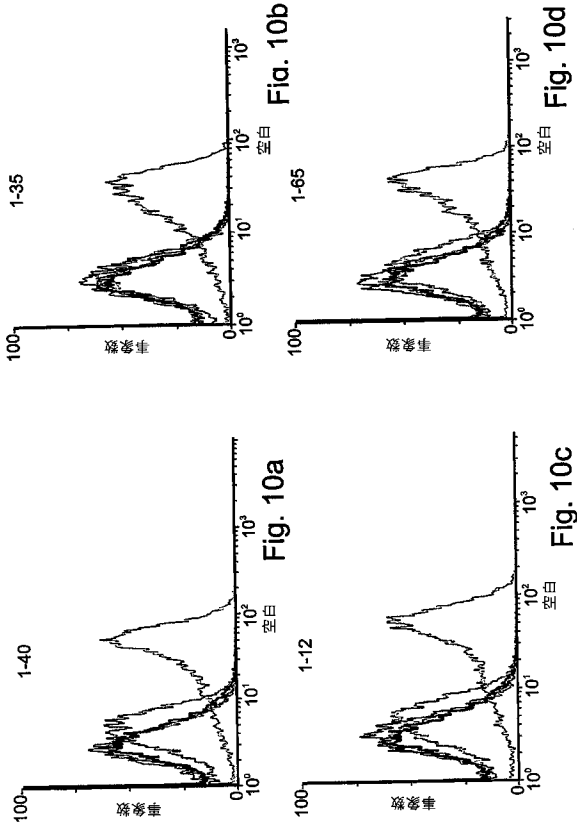


Fig. 9j

Fig. 9i

【 図 1 0 】



【 配 列 表 】

[2008501781000001.xml](#)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 international application No  
 PCT/IL2005/000616

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DENKBERG GALIT ET AL: "Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody with TCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 SEP 2003, vol. 171, no. 5, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 2197-2207, XP002383418 ISSN: 0022-1767 The whole document, especially Results page 2198, column 2, last paragraph - page 2203, column 2, last paragraph	3,8, 11-15, 17-27,30
A	AZRIEL-ROSENFELD R ET AL: "A Human Synthetic Combinatorial Library of Arrayable Single-chain Antibodies based on Shuffling in Vivo Formed CDRs into General Framework Regions" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 335, no. 1, 2 January 2004 (2004-01-02), pages 177-192, XP004476455 ISSN: 0022-2836 cited in the application the whole document	1-30
A	CHAMES PATRICK ET AL: "TCR-like human antibodies expressed on human CTLs mediate antibody affinity-dependent cytolytic activity." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 15 JUL 2002, vol. 169, no. 2, 15 July 2002 (2002-07-15), pages 1110-1118, XP002383419 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-30
A	SKOV S ET AL: "Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis." THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY. 15 DEC 1997, vol. 139, no. 6, 15 December 1997 (1997-12-15), pages 1523-1531, XP002383420 ISSN: 0021-9525 cited in the application the whole document	1-30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IL2005/000616

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	NOY ROY ET AL: "T-cell receptor-like antibodies: novel reagents for clinical cancer immunology and immunotherapy." EXPERT REVIEW OF ANTICANCER THERAPY. JUN 2005, vol. 5, no. 3, June 2005 (2005-06), pages 523-536, XP009067037 ISSN: 1473-7140 the whole document in particular page 534, key issues. -----	1-30

International application No.  
PCT/IL2005/000616

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

#### Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 1-3, 6-14, 22 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

#### Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
**PCT/IL2005/000616**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03068201 A	21-08-2003	AU 2003208582 A1	04-09-2003
		CA 2474782 A1	21-08-2003
		EP 1474120 A2	10-11-2004
		JP 2005521389 T	21-07-2005
		US 2005255101 A1	17-11-2005
		US 2005287141 A1	29-12-2005

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	T
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 17/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 0 5
<b>A 6 1 P 15/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 17/00	
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	A 6 1 P 15/00	
<b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/574	A

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

(72) 発明者 クレチェヴスキー, エイナヴ  
イスラエル, 3 4 8 1 7 ハイファ, カルメリア, ハンナ ストリート 2 7

(72) 発明者 デンクベルグ, ガリット  
イスラエル, 3 6 0 0 1 ノフィット, ギルボア ストリート 6 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA01 CA04 DA02 GA11 HA01 HA03 HA11  
4B063 QA07 QA18 QQ08 QR48 QR66 QR77 QS33 QS39 QX02  
4C085 AA13 AA14 AA19 BB31 BB41 BB44 CC22 CC23 DD62 GG01  
GG08 GG10  
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA28 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	用于选择性凋亡细胞的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008501781A</a>	公开(公告)日	2008-01-24
申请号	JP2007526695	申请日	2005-06-09
[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		
[标]发明人	レイテルヨラム クレチエヴスキーエイナヴ デンクベルグガリット		
发明人	レイテル, ヨラム クレチエヴスキー, エイナヴ デンクベルグ, ガリット		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C12Q1/02 C07K19/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P43/00 A61P17/00 A61P15/00 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P15/00 A61P17/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/2833 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/77 C07K2317/92		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12Q1/02 C07K19/00 A61K39/395.E A61K39/395.T A61P35/00 A61P43/00.105 A61P17/00 A61P15/00 G01N33/53.D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB44 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	60/577920 2004-06-09 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

以纳摩尔范围MHC-肽复合物的亲和和特异性可以结合，和一个药物，其包含癌细胞或重组可在病原体感染的细胞被诱导分离的抗体，该细胞凋亡提供了一种组合物。还提供了使用本发明的重组分离的抗体治疗或诊断受试者中的癌症或病原体感染的方法。【选择图】无

特異的な細胞殺傷 (細胞死)の割合	scFv 抗体	IgG 完全抗体	変化倍数
20	37 µg/ml	0.5 µg/ml	74 倍
30	75 µg/ml	2.5 µg/ml	30 倍
50	130 µg/ml	4 µg/ml	33 倍