

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4317940号
(P4317940)

(45) 発行日 平成21年8月19日 (2009. 8. 19)

(24) 登録日 平成21年6月5日 (2009. 6. 5)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 P 3/10 (2006. 01)

A 6 1 P 3/10

A 6 1 P 31/12 (2006. 01)

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/18 (2006. 01)

A 6 1 P 31/18

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 47 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-525033 (P2003-525033)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月30日 (2002. 8. 30)
 (65) 公表番号 特表2005-514006 (P2005-514006A)
 (43) 公表日 平成17年5月19日 (2005. 5. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/003986
 (87) 国際公開番号 W02003/020763
 (87) 国際公開日 平成15年3月13日 (2003. 3. 13)
 審査請求日 平成17年6月21日 (2005. 6. 21)
 (31) 優先権主張番号 0121187. 9
 (32) 優先日 平成13年8月31日 (2001. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0219146. 8
 (32) 優先日 平成14年8月16日 (2002. 8. 16)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 509123806
 イミュノコア・リミテッド
 Immunocore Limited
 イギリス国、オーエックス4 2エイチエヌ、
 オックスフォード、オックスフォード・
 ビジネス・パーク、ガーシントン・ロー
 ド 9400
 9400 Garsington Road, Oxford Business Park, Oxford, OX4 2HN, UK
 (74) 代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 膜貫通ドメインを除く TCR α 鎖の全部または一部と、(i i) 膜貫通ドメインを除く TCR β 鎖の全部または一部とを備えた可溶性 T 細胞受容体 (sTCR) であって、(i) および (i i) が、それぞれ、TCR 鎖の機能的可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを備え、また (i) および (i i) が、下記を置換しているシステイン残基間のジスルフィド結合によって連結されていることを特徴とする、可溶性 T 細胞受容体：

・ TRAC*01 のエキソン 1 における Thr 48、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Ser 57；

・ TRAC*01 のエキソン 1 における Thr 45、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Ser 77；

・ TRAC*01 のエキソン 1 における Tyr 10、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Ser 17；

・ TRAC*01 のエキソン 1 における Thr 45、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Asp 59；または

・ TRAC*01 のエキソン 1 における Ser 15、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Glu 15。

【請求項 2】

(i) および (i i) の一方または双方が、TCR 鎖の細胞外定常 I g ドメインの全部を備える、請求項 1 に記載の sTCR。

【請求項 3】

(i) および (i i) の一方または双方が、TCR鎖の細胞外ドメインの全部を備える、請求項 1 または 2 に記載の sTCR。

【請求項 4】

可溶性 $\alpha \beta$ 型 T 細胞受容体 (sTCR) であって、共有ジスルフィド結合が、下記を置換しているシステイン残基間を連結する、可溶性 $\alpha \beta$ 型 T 細胞受容体：

- ・ TRAC*01 のエキソン 1 における Thr 48、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Ser 57；
- ・ TRAC*01 のエキソン 1 における Thr 45、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Ser 77；
- ・ TRAC*01 のエキソン 1 における Tyr 10、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Ser 17；
- ・ TRAC*01 のエキソン 1 における Thr 45、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Asp 59；または
- ・ TRAC*01 のエキソン 1 における Ser 15、および TRBC1*01 または TRBC2*01 のエキソン 1 における Glu 15。

10

【請求項 5】

天然の TCR 中の鎖間ジスルフィド結合が存在しない、請求項 1 乃至 4 の何れか 1 項に記載の sTCR。

【請求項 6】

20

天然の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が除外されるように、天然の α および β TCR 鎖の C 末端が切断されている、請求項 5 に記載の sTCR。

【請求項 7】

天然の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が別の残基に置換されている、請求項 5 に記載の sTCR。

【請求項 8】

天然の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基がセリンまたはアラニンに置換されている、請求項 7 に記載の sTCR。

【請求項 9】

天然の TCR β 鎖中に存在する対を成していないシステイン残基が存在しない、請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載の sTCR。

30

【請求項 10】

請求項 1、2 および 5 乃至 9 の何れか 1 項に記載の sTCR であって、(i) および (i i) が、それぞれ、第二の TCR の定常ドメインの全部または一部に融合された第一の TCR の機能的可変ドメインを備え、前記第一および第二の TCR が同一の種から得られたものである、sTCR。

【請求項 11】

前記第二の TCR の定常ドメインが、前記天然に存在しない鎖間ジスルフィド結合を形成する残基の N 末端側において切断されている、請求項 10 に記載の sTCR。

【請求項 12】

40

前記鎖の一方または双方が、その C 末端または N 末端において、

・ リンカー分子

・ 膜構造体

・ ビーズ

・ 検出可能な標識、ならびに

・ 腫瘍抗原特異的抗腫瘍分子、放射線核種、細胞毒性物質、プロドラッグ、抗体、サイトカインを含む免疫刺激物質および酵素を含む治療剤

からなる群より選択される成分で誘導体化されまたは該成分に融合されている、請求項 1 乃至 11 の何れか 1 項に記載の sTCR。

【請求項 13】

50

前記鎖の一方または双方が、システイン残基をC末端および/またはN末端に有する、請求項1乃至11の何れか1項に記載のsTCR。

【請求項14】

検出可能な標識をさらに備える、請求項1乃至12の何れか1項に記載のsTCR。

【請求項15】

治療剤と会合された、請求項1乃至13の何れか1項に記載のsTCR。

【請求項16】

請求項1乃至14の何れか1項に記載のsTCRを複数備えた、多価T細胞受容体(TCR)複合体。

【請求項17】

sTCR多量体を備えた、請求項16に記載の複合体。

【請求項18】

好ましくはリンカー分子を介して互いに会合した2または3または4以上のT細胞受容体分子を備えた、請求項17に記載の複合体。

【請求項19】

前記sTCRまたはsTCR多量体が脂質二重層中に存在するかまたは粒子に付着されている、請求項16、17、または18に記載の複合体。

【請求項20】

MHC-ペプチド複合体を検出する方法であって、

(i) 請求項1乃至15の何れか1項に記載された可溶性TCRまたは請求項16乃至19の何れか1項に記載された多価T細胞受容体複合体を準備することと、

(ii) 前記可溶性TCRまたは多価TCR複合体をMHC-ペプチド複合体と接触させることと、

(iii) 前記MHC-ペプチド複合体への前記可溶性TCRまたは多価TCR複合体の結合を検出することと、
を備えた方法。

【請求項21】

薬学的に許容される担体とともに、治療剤と結合させた請求項1乃至15の何れか1項に記載のsTCR、および/または請求項16乃至19の何れか1項に記載の多価TCR複合体を含有する薬学的製剤。

【請求項22】

請求項1乃至15の何れか1項に記載のsTCRの(i)若しくは(ii)をコードする配列またはこれに相補的な配列を備えた核酸分子。

【請求項23】

請求項22に記載の核酸分子を備えたベクター。

【請求項24】

請求項23に記載のベクターを備えた宿主細胞。

【請求項25】

請求項1乃至15の何れか1項に記載された(i)または(ii)を得る方法であって、前記ペプチドを発現せしめる条件下で、請求項24に記載の宿主細胞をインキュベートし、次いで前記ポリペプチドを精製することを備えた方法。

【請求項26】

適切なリフォールディング条件下で、(i)と(ii)を混合することをさらに備えた、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

可溶性T細胞受容体(sTCR)を得る方法であって：

膜貫通ドメインを除くTCR α 鎖の全部または一部(i)をコードする核酸分子を備えたベクターを含む宿主細胞、および膜貫通ドメインを除くTCR β 鎖の全部または一部(ii)をコードする核酸分子を備えたベクターを含む宿主細胞を、前記(i)および(ii)を発現させる条件の下でインキュベートし、前記(i)および(ii)が、それぞれTCR

10

20

30

40

50

鎖の機能的可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを備えることと；

(i) および (i i) を精製することと；

(i) および (i i) が、その定常ドメイン残基の間で、天然のTCR中には存在しない下記を置換しているシステイン残基間のジスルフィド結合によって連結されるように、再折り畳み条件下で混合することと

を含んでなる方法：

- ・ TRAC*01のエキソン 1 におけるThr 48、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン 1 におけるSer 57；

- ・ TRAC*01のエキソン 1 におけるThr 45、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン1におけるSer 77；

- ・ TRAC*01のエキソン1におけるTyr 10、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン1におけるSer 17；

- ・ TRAC*01のエキソン1におけるThr 45、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン1におけるAsp 59；または

- ・ TRAC*01のエキソン1におけるSer 15、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン1における Glu 15。

【請求項 2 8】

(i) および (i i) の一方または両方が、TCR鎖の細胞外定常Igドメインの全部を備える、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

(i) および (i i) の一方または双方が、TCR鎖の細胞外ドメインの全部を備える、請求項 2 7 または 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

可溶性 $\alpha \beta$ 型 T 細胞受容体 (sTCR) を得る方法であって：

TCR α 鎖をコードする核酸分子を備えたベクターを含む宿主細胞、およびTCR β 鎖をコードする核酸分子を備えたベクターを含む宿主細胞を、夫々のTCR鎖を発現させる条件の下でインキュベートすることと；

(i) および (i i) を精製することと；

前記 α 鎖の定常ドメインにおける免疫グロブリン領域の残基が、下記を置換しているシステイン残基間の共有ジスルフィド結合によって β 鎖の定常ドメインにおける免疫グロブリン領域の残渣に連結されるように、前記それぞれのTCR鎖を再折り畳み条件下で混合することと

を含んでなる方法：

- ・ TRAC*01のエキソン 1 におけるThr 48、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン 1 におけるSer 57；

- ・ TRAC*01のエキソン 1 におけるThr 45、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン1におけるSer 77；

- ・ TRAC*01のエキソン1におけるTyr 10、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン1におけるSer 17；

- ・ TRAC*01のエキソン1におけるThr 45、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン1におけるAsp 59；または

- ・ TRAC*01のエキソン1におけるSer 15、およびTRBC1*01またはTRBC2*01のエキソン1における Glu 15。

【請求項 3 1】

天然のTCR中の鎖間ジスルフィド結合は存在しない、請求項 2 7 乃至 3 0 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

天然の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が除外されるように、天然の α および β TCR鎖の C 末端が切断されている、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

10

20

30

40

50

天然の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が別の残基に置換されている、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

天然の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基がセリンまたはアラニンに置換されている、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

天然のTCR β 鎖中に存在する対を成していないシステイン残基が存在しない、請求項 2 8 乃至 3 4 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 2 7、2 8、および 3 1 乃至 3 5 の何れか 1 項に記載の方法であって、(i) および (i i) が、それぞれ、第二のTCRの定常ドメインの全部または一部に融合された第一のTCRの機能的可変ドメインを備え、前記第一および第二のTCRが同一の種から得られたものである方法。

【請求項 3 7】

前記第二のTCRの定常ドメインが、前記天然に存在しない鎖間ジスルフィド結合を形成する残基の N 末端側において切断されている、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記鎖の一方または双方の C 末端または N 末端が、

・リンカー分子

・膜構造体

・ビーズ

・検出可能な標識、ならびに

・腫瘍抗原特異的抗腫瘍分子、放射線核種、細胞毒性物質、プロドラッグ、抗体、サイトカインを含む免疫刺激物質および酵素を含む治療剤

からなる群より選択される成分で誘導体化されまたは該成分に融合されている、請求項 2 7 乃至 3 7 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記鎖の一方または双方が、システイン残基を C 末端および / または N 末端に有する、請求項 2 7 乃至 3 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記sTCRは検出可能な標識をさらに備える、請求項 2 7 乃至 3 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記sTCRは治療剤と会合されている、請求項 2 7 乃至 4 0 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

複数の前記sTCRを組合わせて多価 T 細胞受容体 (TCR) 複合体を形成することを更に備えた、請求項 2 7 乃至 4 1 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記sTCRが、sTCR多量体を形成するように組み合わされる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

2 または 3 または 4 以上の T 細胞受容体分子が、好ましくはリンカー分子を介して互いに会合される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記sTCRまたはsTCR多量体が脂質二重層の中に組み込まれるか、または粒子に付着される、請求項 4 2、4 3、または 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

MHC - ペプチド複合体を検出する方法であって、

(i) 請求項 2 7 乃至 4 1 の何れか 1 項に記載の方法により製造された可溶性TCRまたは請求項 4 2 乃至 4 5 の何れか 1 項に記載の方法により製造された多価 T 細胞受容体複合体を準備することと、

10

20

30

40

50

(i i) 前記可溶性TCRまたは多価TCR複合体をMHC - ペプチド複合体と接触させることと、

(i i i) 前記MHC - ペプチド複合体への前記可溶性TCRまたは多価TCR複合体の結合を検出することと、
を備えた方法。

【請求項47】

薬学的に許容される担体とともに、治療剤と結合させた請求項27乃至41の何れか1項に記載の方法により製造されたsTCR、および/または請求項42乃至45の何れか1項に記載の方法により製造された多価TCR複合体を含有する薬学的製剤。

【発明の詳細な説明】

10

【発明の背景】

【0001】

本発明は、可溶性T細胞受容体(TCR)に関する。

【0002】

WO99/60120号に記載されているように、TCRは、T細胞による特異的主要組織適合複合体(MHC) - ペプチド複合体の認識を媒介し、このため、免疫系の細胞性免疫が機能する上で不可欠である。

【0003】

抗体とTCRという2種類の分子のみが抗原を特異的に認識するので、TCRは、MHCに提示されたペプチド抗原に対する唯一の受容体であって、外来ペプチドは細胞内の異常を示す唯一の兆候となることが多い。T細胞の認識は、T細胞と抗原提示細胞(APC)が物理的に直接接触したときに起こり、抗原特異的TCRとpMHC複合体の連結によって開始される。

20

【0004】

TCRは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するヘテロ二量体の細胞表面タンパク質であり、シグナル伝達の媒介に関与するCD3複合体のインバリアントタンパク質と会合している。TCRは $\alpha\beta$ 及び $\gamma\delta$ 型として存在しており、これらは構造的に類似しているが、それらを発現しているT細胞は極めて異なる解剖学的分布を有し、おそらく機能も異なっていると思われる。TCRの細胞外部分は、2つの膜近位定常ドメインと2つの膜遠位可変ドメインとからなっており、可変ドメインは、抗体の相補性決定領域(CDR)と同様の多型ループを有している。TCR分子の結合部位を形成して、ペプチドの特異性を決定するのはこれらのループである。MHCクラスI及びクラスIIリガンドも、免疫グロブリンスーパーファミリーのタンパク質であるが、抗原提示に特化しており、APC細胞表面に多様な短いペプチド断片を提示することを可能とする多型ペプチド結合部位を有している。

30

【0005】

可溶性TCRは、特異的なTCR - pMHC相互作用の研究のために有用であるのみならず、感染又は自己免疫疾患マーカーを検出する診断ツールとしても有用であろう。可溶性TCRは、染色にも使用される(例えば、MHCの中に提示されたペプチド抗原の存在を調べるために細胞を染色する)。同様に、可溶性TCRは、特定の抗原を提示している細胞に、治療剤(例えば、細胞毒性化合物又は細胞刺激化合物)を送達するために使用することができる。可溶性TCRは、T細胞(例えば、自己免疫ペプチド抗原に反応するT細胞)を阻害するために使用することもできる。

40

【0006】

多くの場合、タンパク質は膜貫通領域によって安定化されているので、2以上のポリペプチドサブユニットから構成され且つ膜貫通ドメインを有するタンパク質を可溶型として作製することは困難なことがある。このことはTCRについても当てはまり、細胞外ドメインのみ又は細胞外ドメインと細胞質ドメインの何れかを含有する末端切断型のTCRであって、TCR特異的抗体によって認識することができるが(抗体によって認識される組換えTCRの一部が正しくフォールディングされていることを示している)、高い収率で製造するこ

50

とができず、低濃度では不安定であり及び／又はMHC - ペプチド複合体を認識することができないことが科学文献にも記載されていることは、その反映である。この文献は、WO 99/60120号で概説されている。

【 0 0 0 7 】

各サブユニットを接続する天然のジスルフィド架橋を含んだTCRヘテロ二量体の作製を、数多くの文献が記載している(Garboczi, et al., (1996), Nature 384 (6605) : 134-41; Garboczi, et al., (1996), J Immunol 157(12) : 5403-10; Chang et al., (1994), PNAS USA 91 : 11408-11412; Davodeau et al., (1993) J.Biol. Chem. 268(21) : 15455-15460; Golden et al., (1997), J. Imm. Meth. 206 : 163-169; 米国特許第6080840号)。しかし、かかるTCRはTCR特異的抗体によって認識され得るが、何れも比較的高濃度でなければ天然リガンドを認識せず及び／又は安定でないことが示された。

10

【 0 0 0 8 】

WO99/60120号には、その天然リガンドを認識することができるように正しくフォールディングされ、長時間にわたって安定であり、相当な量を作製することができる可溶性TCRが記載されている。このTCRは、C末端の二量体化ペプチド対(ロイシンジッパーなど)によって、それぞれ、TCR β鎖又はδ鎖細胞外ドメインと二量体を形成したTCR α鎖又はγ鎖細胞外ドメインを備えている。このTCR作製法は、概ね全てのTCRに適用することが可能である。

【 0 0 0 9 】

Reiterら、Immunity、1995、2 : 281-287は、ジスルフィドで安定化されたTCR α及びβ可変ドメインを備え、そのうちの1つが末端切断型のPseudomonas exotoxin(PE38)に連結された可溶性分子の構築について詳述している。この分子を作製した理由の1つとして記載されているのは、一本鎖TCRに固有の不安定性を克服することであった。TCR可変ドメイン中の新規ジスルフィド結合の位置は、以前にこれらを導入した抗体の可変ドメインとの相同性を通じて確定された(例えば、Brinkmann, et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 7538-7542、及び Reiter, et al. (1994) Biochemistry 33 : 5451-5459)。しかし、抗体とTCR定常ドメイン間にはこのような相同性は存在しないので、TCR定常ドメインの間に新しい鎖間ジスルフィド結合を導入するのに適した部位を同定するために、このような技術を用いることはできなかった。

20

【 0 0 1 0 】

可溶性TCRの重要性に鑑みれば、このような分子を作製するための代替的な方法を提供することが望ましいであろう。

30

【 発明の開示 】

【 0 0 1 1 】

第一の側面によれば、本発明は、(i)膜貫通ドメインを除くTCR α鎖の全部又は一部と、(ii)膜貫通ドメインを除くTCR β鎖の全部又は一部とを備えた可溶性T細胞受容体(sTCR)であって、(i)及び(ii)が、それぞれ、TCR鎖の機能的可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを備え、天然のTCR中には存在しないジスルフィド結合によって、(i)及び(ii)の定常ドメインの残基が連結されている、可溶性T細胞受容体を提供する。

40

【 0 0 1 2 】

別の側面では、本発明は、可溶性αβ型T細胞受容体(sTCR)であって、共有ジスルフィド結合が、α鎖の定常ドメインの免疫グロブリン領域の残基を、β鎖の定常ドメインの免疫グロブリン領域の残基に連結する、可溶性αβ型T細胞受容体を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明のsTCRには、免疫原性を示すか、あるいは体外から速やかにsTCRが排出されてしまう可能性がある異種ポリペプチドを含有していないという利点がある。さらに、本発明のTCRは、元になった天然のTCRと極めて類似した三次元構造を有しており、この構造的類似性の故に、本発明のTCRは免疫原性を示さないものと思われる。本発明のsTCRは、クラスI MHC - ペプチド複合体又はクラスII MHC - ペプチド複合体を認識するため

50

に用いることができる。

【0014】

本発明のTCRは可溶性である。本出願において、可溶性(solubility)とは、単分散ヘテロ二量体として、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(KCL 2.7mM、KH₂PO₄ 1.5mM、NaCl 137 mM、及びNa₂PO₄ 8mM、pH 7.1-7.5. Life Technologies, Gibco BRL)中に、1 mg/mLの濃度でTCRを精製することが可能であり、且つ25℃で1時間インキュベートした後においても、前記TCRの90%超がなお単分散ヘテロ二量体であることをいう。TCRの溶解性を評価するためには、まず、実験例2に記載されているようにTCRを精製する。この精製を行った後に、分析用サイズ排除クロマトグラフィー(例えば、PBSで平衡化したPharmaciaのSuperdex 75 HRカラムを用いて)100 µgのTCRを分析する。25℃で1時間、さらに100 gのTCRをインキュベートした後、前述のとおり、サイズ排除クロマトグラフィーによって分析する。次いで、サイズ排除のトレースを積算により分析し、単分散ヘテロ二量体に対応するピーク下領域面積を比較する。当該ピークは、分子量既知のタンパク質標準の溶出位置と比較することによって同定することができる。単分散ヘテロ二量体可溶性TCRは、約50 kDaの分子量を有する。上述したように、本発明のTCRは可溶性である。しかし、以下でさらに詳述されているように、得られた複合体が不溶性となるように、又はTCRが不溶性固相支持体の表面上に提示され得るように、ある成分(moiety)にTCRをカップルさせることができる。

【0015】

本明細書で用いられているTCRアミノ酸の番号は、「The T Cell Receptor Factsbook, 2001, LeFranc & LeFranc, Academic Press」に記載されているIMGTシステムに従っている。このシステムでは、α鎖定常ドメインは、TRAC*01という表記を有している(ここで、「TR」はT細胞受容体遺伝子を表し、「A」はα鎖遺伝子を表し、「C」は定常領域を表し、「*01」は対立遺伝子1を表す)。β鎖定常ドメインは、TRBC*01という表記を有している。この例では、2つの定常領域遺伝子「C1」及び「C2」が存在し得る。各対立遺伝子によってコードされる翻訳されたドメインは、複数のエキソンの遺伝コードから構成されることもあるので、これらも特定される。アミノ酸は、それらが存在するドメインのエキソンに従って番号が付される。

【0016】

天然のTCRの細胞外部分は、各々が膜近位定常ドメインと膜遠位可変ドメインを有する2つのポリペプチド(αβ又はγδ)からなる(図1参照)。前記定常ドメインと可変ドメインのそれぞれには、鎖内ジスルフィド結合が含まれる。可変ドメインは、抗体の相補性決定領域(CDR)に類似した多型性が高いループを含有する。TCRのCDR3は、MHCによって提示されるペプチドと相互作用し、CDR1とCDR2はペプチド及びMHCと相互作用する。TCR配列の多様性は、連結される可変(V)、多様(D)、連結(J)、及び定常遺伝子の体細胞での再構成を通じて生成される。機能的なα鎖ポリペプチドは、再構成されたV-J-C領域によって形成されるのに対して、β鎖はV-D-J-C領域からなる。細胞外定常ドメインは、膜近位領域と免疫グロブリン領域を有している。膜近位領域は、膜貫通ドメインと膜近位システイン残基の間に位置するアミノ酸からなる。定常免疫グロブリンドメインは、残りの定常ドメインアミノ酸残基からなり、膜近位システインから連結領域(joining region)の先頭にまで及び、免疫グロブリン型の折り畳み(fold)の存在を特徴とする。Cα1又はTRAC*01として知られる単一のα鎖定常ドメインと、Cβ1又はTRBC*01及びCβ2又はTRBC2*01として知られる2つの異なるβ定常ドメインとが存在する。これらの異なるβ定常ドメイン間の差は、エキソン1のアミノ酸残基4、5、及び37に存する。このため、TRBC1*01は、そのエキソン1の中に4N、5K、及び37Fを有し、TRBC2*01は、そのエキソン1の中に4K、5N、及び37Yを有する。各TCR細胞外ドメインの範囲は、若干変化し得る。

【0017】

本発明では、各鎖の定常ドメイン(又はその一部)中に位置する残基の間にジスルフィド結合が導入される。TCRの各鎖は、pMHC複合体と相互作用できるのに十分な、それ

10

20

30

40

50

らの可変ドメインを備える。このような相互作用は、それぞれ、本明細書の実験例 3 又は WO99/6120号に記載されているように、BIAcore 3 0 0 0^{T M} 又はBIAcore 2 0 0 0^{T M} 装置を用いて測定することができる。

【 0 0 1 8 】

ある実施態様では、本発明のsTCRの各鎖は、その鎖内ジスルフィド結合も備える。本発明のTCRは、各TCR鎖の細胞外定常 I g 領域を全て、好ましくは各鎖の細胞外ドメインを全て（すなわち、膜近位領域を含む）備えてもよい。天然のTCRには、各鎖の保存された膜近位領域を連結するジスルフィド結合が存在する。本発明の一実施形態では、このジスルフィド結合が存在しない。これは、適切なシステイン残基（それぞれ、アミノ酸 4、TRAC^{*} 0 1 遺伝子のエキソン 2、並びにTRBC 1^{*} 0 1 及びTRBC 2^{*} 0 1 のアミノ酸 2）を別のアミノ酸に変異させることによって、又はシステイン残基が含まれないように各鎖を末端切断することによって行うことができる。本発明の好ましい可溶性TCRは、天然の鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が除外されるようにC末端が切断された（すなわち、前記システイン残基のN末端側残基 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10の箇所で切断された）天然の α 及び β TCR鎖を備える。しかし、天然の鎖間ジスルフィド結合が本発明のTCR中に存在してもよく、一部の実施形態では、TCR鎖のうち1つのみが、天然の鎖間ジスルフィド結合を形成する天然のシステイン残基を有することに留意しなければならない。このシステインは、成分をTCRに付着させるために使用することができる。

【 0 0 1 9 】

しかし、各TCR鎖は、さらに短くしてもよい。定常ドメインは、ペプチド - M H C リガンドとの接触に直接関与していないので、実質的に機能性を失わずに、C末端切断点を変化させることもできる。

【 0 0 2 0 】

あるいは、本発明で好まれるものより大きな定常ドメインの断片が存在してもよい（すなわち、定常ドメインは、必ずしも、鎖間ジスルフィド結合を形成するシステインの直前で切断する必要はない）。例えば、膜貫通ドメインを除く定常ドメイン全体（すなわち、細胞外ドメインと細胞質ドメイン）を含めることもできるであろう。この場合には、細胞のTCR中で鎖間ジスルフィド結合を形成している1以上のシステイン残基を変異させて、ジスルフィド結合の形成に関与しない別のアミノ酸残基にするか、これらの残基を1以上欠失させるのが有利となり得る。

【 0 0 2 1 】

シグナルペプチドは、成熟TCR中では、そのリガンド結合能力に関して何の意味もなく、環境によっては、機能的な可溶性TCRの形成を妨げることもあるので、可溶性TCRを原核細胞、例えば、E.Coli 中で発現させるのであれば、シグナルペプチドは省略してもよい。多くの場合には、シグナルペプチドが成熟TCR鎖から除去される切断部位は予測され、実験的に決定されるわけではない。そのN末端が数アミノ酸（すなわち、例えば、最大約10アミノ酸）長い又は短いように、発現されるTCR鎖を設計すると、可溶性TCRの機能性（すなわち、p M H C を認識する能力）に影響がないであろう。元のタンパク質配列中に存在しない付加を加えることもできる。例えば、TCRの抗原結合部位の正しい構造とフォールディングを妨害しないのであれば、TCR鎖の精製を容易にし得る短いタグ配列を付加してもよい。

【 0 0 2 2 】

E.Coli 中で発現させるためには、翻訳の開始を可能とするために、予想される成熟タンパク質配列のN末端開始点上にメチオニン残基を工作してもよい。

【 0 0 2 3 】

TCR鎖の可変ドメイン中に存在する全ての残基が、抗原特異性と機能性に不可欠というわけではない。このため、抗原特異性と機能性に影響を与えずに、このドメイン中に多数の変異を導入することができる。TCR鎖の定常ドメイン中に存在する全ての残基が、抗原特異性と機能性に不可欠というわけではない。このため、抗原特異性に影響を与えず

に、このドメイン中に多数の変異を導入することができる。

【 0 0 2 4 】

TCRのβ鎖は、細胞のTCR又は天然のTCR中に、対を形成していないシステイン残基を含有している。不適切な鎖内又は鎖間対形成を避けるために、このシステイン残基は除去するか、あるいは別の残基に変異させることが好ましい。このシステイン残基を別の残基（例えば、セリン又はアラニン）に置換することによって、インビトロでのリフォールディング効率に著しく好ましい効果がもたらされ得る。

【 0 0 2 5 】

各鎖上に存在する非システイン残基をシステインに変異させ、変異された残基間に結合を形成させることによって、ジスルフィド結合は形成させることができる。天然の残基の代わりに導入されたシステイン残基の間に、ジスルフィド結合が形成され得るように、天然のTCR中で、それぞれのβ炭素の距離が約6（0.6nm）以下であり、好ましくは3.5（0.35nm）乃至5.9（0.59nm）離れている残基が好ましい。ジスルフィド結合は膜近位領域の残基間にあってもよいが、定常免疫グロブリン領域中の残基の間にあることが好ましい。ジスルフィド結合を形成させるためにシステインを導入することができる好ましい部位は、TCRのα鎖に関してはTRAC*01のエキソン1、TCRのβ鎖に関してはTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン1に存在する以下の残基である。

【表1】

TCR α 鎖	TCR β 鎖	天然の β 炭素の距離 (nm)
Thr 48	Ser 57	0.473
Thr 45	Ser 77	0.533
Tyr 10	Ser 17	0.359
Thr 45	Asp 59	0.560
Ser 15	Glu 15	0.59

本発明のsTCRのうち1つは、A6 Tax TCRに由来する(Garboczi et al, Nature, 1996,384 (6605): 134-141)。ある実施形態では、前記sTCRは、TRAC*01のエキソン2、残基4のN末端にあるTCRのα鎖全体（Garbocziらが用いた番号によると、α鎖のアミノ酸残基1-182）と、TRBC1*01及びTRBC2*01の両方のエキソン2、残基2のN末端にあるTCRのβ鎖全体（Garbocziらが用いた番号によると、β鎖のアミノ酸残基1-210）とを備える。ジスルフィド結合を形成させるためには、TRAC*01中のエキソン1のトレオニン48（Garbocziらが用いた番号によると、α鎖のトレオニン158）とTRBC1*01及びTRBC2*01中に存在するエキソン1のセリン57（Garbocziらが用いた番号によると、β鎖のセリン172）を、それぞれシステインに変異させ得る。これらのアミノ酸は、それぞれ、α及びβ TCR鎖の定常ドメインのβストランドDの中に位置する。

【 0 0 2 6 】

図3aと3bでは、残基1（Garbocziらの用いた番号による）は、それぞれKとNであることに留意しなければならない。天然のA6 Tax TCR中には、N末端のメチオニン残基は存在せず、上述したように、細菌の発現系の中で、各鎖が作製される場合には存在することができる。

【 0 0 2 7 】

新しい鎖間ジスルフィド結合を形成させるために、システイン残基に変異させることができるヒトTCR中の残基は特定されているので、当業者であれば、同じように、任意のTCRを変異させて、新しい鎖間ジスルフィド結合を有する可溶型のTCRを作製することができるであろう。ヒトの場合、当業者は、各TCR鎖中に以下のモチーフを探して、変異させるべき残基を同定する必要があるにすぎない（影が付されている残基は、システインに変異される残基である）。

【 0 0 2 8 】

α鎖 Thr 48 : D S D V Y I T D K T V L D M R S M D F K (TRAC * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸39 - 58)

α鎖 Thr 45 : Q S K D S D V Y I T D K T V L D M R S M (TRAC * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸36 - 55)

α鎖 Tyr 10 : D I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K (TRAC * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸1 - 20)

α鎖 Ser 15 : D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F (TRAC * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸6 - 25)

β鎖 Ser 57 : N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P (TRBC 1 * 0 1 遺伝子とTRBC 2 * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸48 - 67)

β鎖 Ser 77 : A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W (TRBC 1 * 0 1 及びTRBC 2 * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸68 - 87)

β鎖 Ser 17 : P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A (TRBC 1 * 0 1 及びTRBC 2 * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸8 - 27)

β鎖 Asp 59 : K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L (TRBC 1 * 0 1 及びTRBC 2 * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸50 - 69)

β鎖 Glu 15 : V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q (TRBC 1 * 0 1 及びTRBC 2 * 0 1 遺伝子のエキソン1のアミノ酸6 - 25)

その他の種では、TCR鎖は、上記モチーフと100%の同一性を有する領域を有していないことがある。しかしながら、当業者であれば、TCRのα鎖又はβ鎖の等価な部分を同定して、システインに変異させるべき残基を同定するために上記モチーフを用いることが可能であろう。この点では、アラインメント技法を用いることができる。例えば、TCR配列の変異に適した部分の位置を決定するために、European Bioinformatics Institute website(<http://www.ebi.ac.uk/index.html>)から入手できるClustal Wを用いて、上記モチーフを、特定のTCR鎖配列と比較することができる。

【0029】

ヒトのジスルフィド連結αβ TCRのみならず、他の哺乳動物(マウス、ラット、ブタ、ヤギ、及びヒツジが含まれるが、これらに限定されない)のジスルフィド連結αβ TCRも、本発明の範囲に属する。上述したように、当業者であれば、システイン残基を導入して鎖間ジスルフィド結合を形成させることができる、上記ヒトの部位と等価な部位を決定することができるであろう。例えば、TCR鎖間ジスルフィド結合を形成させるためにシステインに変異させることができる、上記ヒトの残基と等価なマウスの残基を示すモチーフとともに、マウスCα及びCβ可溶性ドメインのアミノ酸配列が、以下に示されている(当該残基に影が付されている)。

【0030】

マウスのCα可溶性ドメイン：

PYIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVP

マウスのCβ可溶性ドメイン：

EDLRNVTTPPKVSLFEPKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWVWNGREVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSA TFVHNPRNHFRQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTONISAEAWGRAD

ヒトα鎖Thr 48のマウスにおける等価物：ESGTFITDKTVLDMKAMDSK

ヒトα鎖Thr 45のマウスにおける等価物：KTMESGTFITDKTVLDMKAM

ヒトα鎖Tyr 10のマウスにおける等価物：YIQNPEPAVYQLKDPRSQDS

ヒトα鎖Ser 15のマウスにおける等価物：AVYQLKDPRSQDSTLCLFTD

ヒトβ鎖Ser 57のマウスにおける等価物：NGREVHSGVSTDPQAYKESN

ヒトβ鎖Ser 77のマウスにおける等価物：KESNYSYCLSSRLRVSA TFW

ヒトβ鎖Ser 17のマウスにおける等価物：PPKVSLFEPKAEIANKQKA

ヒトβ鎖Asp 59のマウスにおける等価物：REVHSGVSTDPQAYKESNYS

ヒトβ鎖Glu 15のマウスにおける等価物：VTPPKVSLFEPKAEIANKQ。

【 0 0 3 1 】

本発明の好ましい実施形態では、前記TCRの (i) 及び (i i) の各々が、第二のTCRの定常ドメインの全部又は一部に融合された第一のTCRの機能的可変ドメインを備え、前記第一及び第二のTCRは同一の種から得られたものであり、天然のTCRには存在しない前記各定常ドメインの全部又は一部中の残基の間に鎖間ジスルフィド結合が存在する。ある実施形態では、前記第一及び第二のTCRはヒトのものである。換言すれば、ジスルフィド結合によって連結された定常ドメインは、その上に可変ドメインを融合させることができるフレームワークとして機能する。得られたTCRは、第一のTCRの元となった天然のTCRと実質的に同一であろう。このような系によって、安定な定常ドメインフレームワーク上にあらゆる機能的可変ドメインを容易に発現することが可能となる。

10

【 0 0 3 2 】

その上に異種の可変ドメインを融合することができるフレームワークとして、上記 A 6 T a x sTCRの定常ドメイン、あるいは、実際には、上述した新しい鎖間ジスルフィド結合を有する任意の変異 $\alpha \beta$ TCRの定常ドメインを用いることができる。融合タンパク質は、異種可変ドメインのコンフォメーションをできる限り保持していることが好ましい。従って、導入されるシステイン残基と定常ドメインのN末端との間にある何れかの部位で、異種の可変ドメインが定常ドメインに連結されていることが好ましい。A 6 T a x TCRの場合、 α 及び β 鎖上の導入されたシステイン残基は、それぞれ、TRAC * 0 1 中のエキソン 1 のトレオニン 4 8 (Garboczi らが用いた番号によると、 α 鎖のトレオニン 1 5 8)、及び TRBC 1 * 0 1 と TRBC 2 * 0 1 中のエキソン 1 のセリン 5 7 (Garboczi らが用いた番号によると、 β 鎖のセリン 1 7 2) に位置することが好ましい。従って、異種の α 及び β 鎖可変ドメイン付着点は、それぞれ、残基 4 8 (Garboczi らが用いた番号によると 1 5 9) 又は残基 5 8 (Garboczi らが用いた番号によると 1 7 3) と α 又は β 定常ドメインのN末端との間に存在することが好ましい。

20

【 0 0 3 3 】

A 6 T a x TCR中の前記付着点に対応する異種 α 及び β 鎖の定常ドメイン中の残基は、配列の相同性によって同定することができる。融合タンパク質は、好ましくは、付着点のN末端の異種配列を全て包含するように構築することが好ましい。

【 0 0 3 4 】

以下でさらに詳細に論述されているように、本発明のsTCRは、そのC末端又はN末端を成分(moiety)で誘導体化し、又は成分に融合させてもよい。結合ドメインから遠位にあるので、C末端が好ましい。ある実施形態では、TCR鎖の一方又は双方が、このような成分を融合させることができるシステイン残基を、そのC末端及び/又はN末端に有する。

30

【 0 0 3 5 】

本発明の可溶性TCR (好ましくは、ヒトのもの) は、実質的に純粋な形態で、又は精製された若しくは単離された調製物として提供することができる。例えば、本発明の可溶性TCRは、他のタンパク質が実質的に存在しない形態で提供することができる。

【 0 0 3 6 】

本発明の複数の可溶性TCRを、多価複合体中に与えてもよい。このように、本発明は、ある側面において、本明細書に記載されている可溶性T細胞受容体を複数備えた、多価T細胞受容体 (TCR) 複合体を提供する。前記複数の可溶性TCRは各々、同一であることが好ましい。

40

【 0 0 3 7 】

別の側面では、本発明は、M H C - ペプチド複合体を検出する方法であって、

(i) 本明細書に記載された可溶性T細胞受容体又は多価T細胞受容体複合体を準備することと、

(i i) 前記可溶性T細胞受容体又は多価TCR複合体を前記M H C - ペプチド複合体と接触させることと、

(i i i) 前記M H C - ペプチド複合体への前記可溶性T細胞受容体又は多価TCR複合体の結合を検出することと、

50

を備えた方法を提供する。

【0038】

本発明の多価複合体において、前記TCRは多量体の形態をとるか、及び/又は、脂質二重層（例えば、リポソーム）上に存在し若しくは脂質二重層（例えば、リポソーム）と会合してもよい。

最も単純な形態では、本発明の多価TCR複合体は、好ましくはリンカー分子を介して、（例えば、共有結合で、又はその他の結合で）互いに会合(associate)した2又は3又は4以上のT細胞受容体分子の多量体を備える。適切なリンカー分子には、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン、及びエキストラビジン（これらは、それぞれ、ビオチンの結合部位を4つ有している）等の多価接着分子(attachment molecule)が含まれるがこれらに限定されるものではない。このように、複数のTCR結合部位を有するT細胞受容体の多量体中に、ビオチン化されたTCR分子を形成することができる。多量体中に存在するTCR分子の数は、多量体を作るために用いられるリンカー分子の量に対するTCRの量に依存するとともに、他のあらゆるビオチン化された分子の有無にも依存するであろう。好ましい多量体は、二量体、三量体、又は四量体のTCR複合体である。

【0039】

特定のMHC - ペプチド複合体を発現している細胞を追跡し又は誘導する際には、TCR四量体より大きな構造体を用いてもよい。前記構造体は、直径10nm乃至10μmの範囲にあることが好ましい。該構造体上に存在する2以上のTCR分子が細胞上の2以上のMHC - ペプチド複合体に同時に結合して、多量体の結合成分の細胞に対する結合親和性が増大し得るように十分な距離を置いて、各構造体に、複数のTCR分子をディスプレイしてもよい。

【0040】

本発明で使用するのに適した構造体には、リポソーム等の膜構造体、及び固体構造体(solid structures)（ピース、例えば、ラテックスビーズなどの粒子であることが好ましい）が含まれる。T細胞受容体分子で外部を被覆することができる他の構造体も適切である。前記構造体は、各個のT細胞受容体分子で被覆するよりも、T細胞受容体多量体で被覆することが好ましい。

【0041】

リポソームの場合には、T細胞受容体分子又はその多量体を膜に付着(attach)させるか、あるいは、膜と会合させてもよい。このための技術は、当業者に周知である。

【0042】

標識又はそれ以外の成分（毒性成分又は治療成分など）を、本発明の多価TCR複合体中に包含させてもよい。例えば、混合分子多量体の中に、標識その他の成分を包含させることができる。このような多量体分子の例は、3つのTCR分子と1つのペルオキシダーゼ分子を含有するテトラマーである。これは、TCRと酵素を3：1のモル比で混合して四量体複合体を生成させ、分子を正しい比率で含有していない全ての複合体から、所望の複合体を単離することによって達成することができるであろう。立体的な障害が生じないか、又は分子の所望の機能が著しく損なわれなければ、これらの混合分子は、あらゆる組合せの分子を含有することができる。ストレプトアビジン分子上の結合部位の位置関係は、立体的な障害が起こりにくいので、混合型四量体に適している。

【0043】

TCRをビオチン化する他の手段も可能であろう。例えば、化学的なビオチン化を使用することができる。ビオチンタグ配列中の一定のアミノ酸は不可欠であるが(Schatz、(1993).Biotechnology NY11(10)：1138-43)、別のビオチン化タグを用いてもよい。ビオチン化に用いる混合物を変化させることもできる。前記酵素は、Mg - ATPと低いイオン強度を必要とするが、これらの条件は何れも変化させることができる（例えば、さらに高いイオン強度とさらに長い反応時間を使用することも可能であろう）。TCRの多量体を形成させるために、アビジン又はストレプトアビジン以外の分子を使用することも可能であろう。ビオチンを多価で結合するあらゆる分子が適しているであろう。あるいは、全く異なる連

結（キレートされたニッケルイオンへのポリヒスチジンタグなど(QuiaGen Product Guide 1999, Chapter 3 “Protein Expression, Purification, Detection and Assay” p.35-37))を考案することもできるであろう。ペプチド-MHC複合体との相互作用における構造的な障害の程度を最少に抑えるために、前記タグは、タンパク質のC末端方向に位置することが好ましい。

【0044】

前記TCR鎖の一方又は双方を、検出可能な標識（例えば、診断用途に適した標識）で標識することもできる。このように、本発明は、MHC-ペプチド複合体を検出する方法であって、MHC-ペプチド複合体を、該MHC-ペプチド複合体に特異的である本発明のTCR又は多量体TCR複合体と接触させることと、前記TCR又は多量体TCR複合体の前記MHC-ペプチド複合体への結合を検出することと、を備えた方法を提供する。ビオチン化されたヘテロ二量体を用いて形成された四量体TCRでは、検出可能な標識を与えるために、蛍光ストレプトアビジン（市販されている）を使用することができる。例えば、TCRが特異性を示すペプチドを担持する抗原提示細胞を検出するために、蛍光標識されたテトラマーは、FACS分析で使用するのに適している。

10

【0045】

本発明の可溶性TCRを検出することができる別の方法は、TCR特異的な抗体、特にモノクローナル抗体を使用することである。それぞれ、 α 鎖と β 鎖の定常領域を認識する α F1や β F1等の市販の抗TCR抗体が数多く存在する。

【0046】

20

これに代えて又はこれに加えて、本発明のTCR（又はその多価複合体）に、例えば、細胞を死滅させるのに使用する毒性成分又はインターロイキン若しくはサイトカイン等の免疫刺激因子であり得る治療剤を（例えば、共有結合その他の結合で）結合させてもよい。本発明の多価TCR複合体は、多量体でないT細胞受容体ヘテロ二量体と比べて、pMHCに対する結合能が増強されている場合がある。このように、本発明の多価TCR複合体は、インビトロ又はインビボで、特定の抗原を提示する細胞を追跡し又は標的とするのに特に有用であり、このような用途を有する多価TCR複合体をさらに作製するための中間体としても有用である。従って、前記TCR又は多価TCR複合体は、インビボで使用するための薬学的に許容される製剤に加えることができる。

【0047】

30

本発明は、標的細胞に治療剤を送達する方法であって、TCR又は多価TCR複合体を前記標的細胞に付着させることが可能な条件下で、本発明のTCR又は多価TCR複合体を標的細胞となり得る細胞に接触させることを備え、前記TCR又は多価TCR複合体がMHC-ペプチド複合体に対して特異的であり、且つTCR又は多価TCR複合体に前記治療剤が結合されている、方法も提供する。

【0048】

特に、前記可溶性TCR又は多価TCR複合体を用いて、ある抗原を提示する細胞が存在する場所に治療剤を送達することができる。これは、多くの状況において、とりわけ、癌を攻撃する上で有用であろう。治療剤は、その効果が局所的であるが、当該治療剤が結合する細胞のみに効果が限定されないように、送達することもできるであろう。このように、ある方法では、T細胞受容体又は多価TCR複合体に連結された腫瘍抗原特異的抗腫瘍分子を想定している。

40

【0049】

多くの治療剤、例えば、放射性化合物、酵素（例えば、パーフォリン）、又は化学療法剤（例えば、シスプラチン）をこの用途に利用することができるであろう。所望の場所で確実に毒性効果が発揮されるようにするために、化合物がゆっくり放出されるように、ストレプトアビジンにトキシンを連結して、リポソームの内側に入れることもできるであろう。これによって、体内での輸送中に効果が損なわれることが防止され、TCRが所定の抗原提示細胞に結合した後に、トキシンが最大の効果を有することが確保されるであろう。

【0050】

50

他の適切な治療剤には、

・小分子細胞毒性物質（すなわち、700ダルトン未満の分子量を有し、哺乳類細胞を死滅させることができる化合物）。このような化合物は、細胞毒性効果を有することができる有毒金属も含有し得るであろう。さらに、これらの小分子細胞毒性物質には、プロドラッグ（すなわち、生理的条件下で崩壊し、又は変換を受けて、細胞毒性物質を放出する化合物）も含まれることを理解しなければならない。このような物質の例として、シスプラチン、メイタイシン誘導体、レイチエルマイシン(rachelmycin)、カリチエアマイシン、ドセタキセル、エトポシド、ゲムシタピン、イフォスファミド、イリノテカン、メルファラン、ミトキサントロン、ソルファイマー(sorfiner)、ナトリウムフォトリニンII、テモゾルミド(temozolamide)、トボテカン、トリメトレエートグルクロネート(trimetrate glucuronate)、アウリスタチンE(auristatin E)、ピンクリスチン、及びドキソルピシンが挙げられる；

10

・ペプチドサイトトキシン（すなわち、哺乳類細胞を死滅させることができるタンパク質又はその断片）。例として、リシン、ジフテリアトキシン、シュードモナスバクテリアトキシンA、DNAアーゼ及びRNAアーゼが含まれる；

・放射線核種（すなわち、 α 若しくは β 粒子又は γ 線のうち1以上を放出しながら崩壊する、元素の非安定同位体）。例として、ヨウ素131、レニウム186、インジウム111、イットリウム90、ビスマス210及び213、アクチニウム225、並びにアスタチン213などが含まれる；

・抗体に誘導される酵素プロドラッグ(antibody directed enzyme pro-drug)などのプロドラッグ；

20

・免疫刺激物質(immuno-stimulant)（すなわち、免疫反応を刺激する成分）。例として、IL-2などのサイトカイン、IL-8、血小板因子4、メラノーマ増殖刺激タンパク質などのケモカイン、抗体又はその断片、補体活性化因子、異種タンパク質ドメイン、同種タンパク質ドメイン、ウイルス/細菌タンパク質ドメイン、並びにウイルス/細菌ペプチドが含まれる。

【0051】

本発明の可溶性TCR又は多価TCR複合体は、プロドラッグを薬物に転換することができる酵素に連結させてもよい。これにより、プロドラッグは、必要とされている部位に限定して、薬物に転換することが可能となる（すなわち、TCRによって誘導される）。

30

【0052】

本発明のTCRに対する適切なMHC-ペプチド標的の例には、HTLV-1エピトープ（例えば、HLA-A2に拘束されるTaxペプチド、HTLV-1は白血病に関連している。）、HIVエピトープ、EBVエピトープ、CMVエピトープなどのウイルスエピトープ、メラノーマエピトープ（例えば、MAGE-1 HLA-A1拘束エピトープ）、及び他の癌特異的エピトープ（例えば、HLA-A2によって拘束される腎細胞癌腫随伴抗原G250）、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患に関連するエピトープが含まれるが、これらに限定されない。疾病に関連するpMHCであって本発明での使用に適したpMHC標的が、さらに、「HLA Factbook(Barclay(Ed) Academic Press)」に列記されており、他にも多くのものが同定されつつある。可溶性TCRの特異性によって薬物を局在化させることによって、複数の疾病の治療を強化させ得る可能性もある。

40

【0053】

薬物が存在するウイルス疾患（例えば、HIV、SIV、EBV、CMV）では、感染細胞の近傍で放出又は活性化される薬物が有益であろう。癌の場合、腫瘍又は転移の近傍に局在化させることによって、トキシン又は免疫刺激物質の効果が増強するであろう。自己免疫疾患では、患者の全体的な免疫能への影響を最小限に抑えつつ、免疫抑制剤をゆっくり放出させ、長期間にわたって、より局所的な効果を与えることができるであろう。移植片の拒絶を抑制する場合には、免疫抑制剤の効果を同様に最適化することができるであろう。ワクチンを送達する場合、抗原提示細胞の近傍にワクチン抗原を局在化させることにより、抗原の効力を増強させることができるであろう。本方法は、画像診断にも適用す

50

ることができる。

【 0 0 5 4 】

本発明の可溶性TCRは、特異的な p M H C を結合させて T 細胞の活性化をモジュレートすることにより、T 細胞の活性化を阻害するために使用することもできる。T 細胞を介した炎症及び / 又は組織傷害を伴う自己免疫疾患、例えば、I 型糖尿病は、このアプローチに適しているであろう。この用途では、当該 p M H C によって提示される特異的なペプチドエピトープを知ることが必要である。

【 0 0 5 5 】

本発明の医薬は、無菌の薬学的組成物（薬学的に許容される担体を含むのが通常である）の一部として供給されるのが通常であろう。この薬学的組成物は、（患者に投与する所望の方法に応じて）任意の適切な形態であり得る。前記薬学的組成物は、単位投薬形態として提供することができ、密封された容器中に入れるのが一般的であり、キットの一部として提供してもよい。このようなキットには、（必ずというわけではないが）通常、使用説明書が添付されているであろう。キットには、複数の単位投薬形態が含まれていてもよい。

10

【 0 0 5 6 】

前記薬学的組成物は、任意の適切な経路、例えば、経口（口腔粘膜(buccal)又は舌下を含む）、直腸、経鼻、局所（口腔粘膜、舌下、又は経皮を含む）、腔又は非経口（皮下、筋肉内、静脈内、又は皮内を含む）経路による投与に適合させ得る。このような組成物は、薬学の分野で公知のあらゆる方法によって、例えば、滅菌条件下で、活性成分を担体又は賦形剤と混合することによって、調製することができる。

20

【 0 0 5 7 】

経口投与向けの薬学的組成物は、カプセル又は錠剤などの分離したユニットとして、粉末又は顆粒として、溶液、シロップ、又は懸濁液として（水性又は非水性液中に、又は食べられるフォーム(foam)又はホイップとして、又はエマルジョンとして）与えることができる。錠剤又はハードゼラチンカプセルに適した賦形剤には、ラクトース、トウモロコシのデンプン又はその誘導体、ステアリン酸又はその塩が含まれる。ソフトゼラチンカプセルとともに使用するのに適した賦形剤には、例えば、植物油、蠟(wax)、脂肪、半固体又は液体のポリオールなどが含まれる。

【 0 0 5 8 】

30

溶液及びシロップを調製する場合には、使用し得る賦形剤には、例えば、水、ポリオール、及び糖が含まれる。懸濁油（例えば、植物油）の調製には、水中油又は油中水懸濁液を与えるために使用することができる。経皮投与向けの薬学的組成物は、長期間にわたって、受療者の表皮と密接した状態を保つための分離したパッチ(discrete patch)として与えることができる。例えば、活性成分は、「Pharmaceutical Research 3(6) : 318(1986)」に概説されているイオントフォレーシスにより、パッチから送達することができる。局所投与向けの薬学的組成物は、軟膏、クリーム、懸濁液、ローション、パウダー、溶液、ペースト、ゲル、スプレー、エアロゾル、又はオイルとして調合することができる。目又はその他の外部組織（例えば、口や皮膚）の感染症には、前記組成物を局所軟膏又はクリームとして与えることが好ましい。軟膏中に調合する場合には、パラフィン又は水混和性軟膏基剤とともに、前記活性成分を用いることができる。あるいは、前記活性成分は、水中油クリーム基剤又は油中水基剤とともに、クリーム中に調合してもよい。

40

【 0 0 5 9 】

目への局所投与向けの薬学的組成物には、適切な担体（特に、水性溶媒）中に前記活性成分を溶解又は懸濁させた点眼薬が含まれる。口腔中への局所投与向けの薬学的組成物には、トローチ剤、芳香錠剤、及びうがい薬が含まれる。

【 0 0 6 0 】

直腸投与向けの薬学的組成物は、座剤又は浣腸として与えることができる。経鼻投与向けの薬学的組成物であって、担体が固体である組成物には、例えば、20乃至500ミクロンの範囲の粒子サイズを有し、鼻から吸い込む様式で（すなわち、鼻に近付けた粉末の

50

容器から鼻を通じて素早く吸引することによって）投与される粗い粉末が含まれる。点鼻スプレー又は点鼻薬として適した、担体が液体である組成物には、活性成分の水溶液又は油溶液が含まれる。吸引による投与向けの薬学的組成物には、様々なタイプの定量加圧エアロゾル、噴霧器、又は吸入器によって生成することができる微粒子ダスト又はミストが含まれる。経腔投与向けの薬学的組成物は、ベッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム、又はスプレー調合物として与えることができる。非経口投与向けの薬学的組成物には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び前記製剤を対象となる受療者の血液とほぼ等張にする溶質を含有し得る水性及び非水性滅菌注射溶液と、懸濁剤及び濃縮剤を含み得る水性及び非水性滅菌懸濁液とが含まれる。注射溶液に使用できる賦形剤には、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセリン、及び植物油が含まれる。前記組成物は、単一投薬又は複数投薬容器、例えば、密閉されたアンプルやバイアル中に入れ、使用直前に、滅菌された液体担体(carried)（例えば、注射水）を加えるだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時調合注射溶液及び懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、及び錠剤から調製することができる。

10

【0061】

前記薬学的組成物は、防腐剤、可溶化剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、甘味剤、着色剤、着臭剤、塩（本発明の物質自体を、薬学的に許容される塩の形態で与えてもよい）、緩衝液、被覆剤、又は抗酸化剤を含有してもよい。前記薬学的組成物は、本発明の物質に加えて、治療的に活性な物質を含有してもよい。

【0062】

20

本発明の物質の投薬量は、治療すべき疾病又は疾患、治療すべき個体の年齢と症状などに応じて、幅広く変動させることができ、終局的には、使用すべき適切な投薬量を医師が決定することになる。適切な頻度で複数回投薬を行ってもよい副作用が生じた場合には、一般的な治療の方法に従って、投薬の量及び／又は頻度を減少させることができる。

【0063】

本発明のTCRを好ましくは実質的に純粋な形態で提供するために、遺伝子クローニング技術を用いることができる。これらの技術は、例えば、「J.Sambrook et al Molecular Cloning 2nd Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)」に開示されている。このため、さらなる側面において、本発明は、本発明の可溶性TCRの鎖をコードする配列又はこれと相補的な配列を備えた核酸分子を提供する。このような核酸配列は、TCRをコードする核酸をT細胞クローンから単離し、（挿入、欠失、又は置換によって）適切な変異を作製することによって得ることができる。

30

【0064】

前記核酸分子は、単離された形態又は組換え形態とすることができる。前記核酸分子をベクター中に取り込ませ、そのベクターを宿主細胞中に取り込ませてもよい。このようなベクター及び適切な宿主も、本発明のさらなる側面を構成する。

【0065】

本発明は、TCR鎖を得る方法であって、TCR鎖の発現が引き起こされる条件下で、このような宿主細胞をインキュベートすることと、次いで、前記ポリペプチドを精製することとを備えた方法も提供する。

40

【0066】

本発明の可溶性TCRは、封入体としてE.Coliなどの細菌中で発現させた後、インビトロでリフォールディングさせることによって得ることができる。

【0067】

TCR鎖のリフォールディングは、適切なリフォールディング条件の下、インビトロで行うことができる。ある実施形態では、正しいコンフォメーションを有するTCRは、可溶化剤（例えば、尿素）を含むリフォールディング緩衝液中で可溶化されたTCR鎖をリフォールディングすることによって取得される。有利には、前記尿素は、少なくとも0.1 M又は少なくとも1 M又は少なくとも2.5 M又は約5 Mの濃度で存在し得る。使用可能な別の可溶化剤は、0.1 Mと8 Mの間、好ましくは、少なくとも1 M又は少なくとも2.5

50

Mの濃度のグアニジンである。リフォールディングの前に、システイン残基を完全に還元させるために、還元剤を用いることが好ましい。必要であれば、D T Tやグアニジンなどの変性剤をさらに使用してもよい。リフォールディング工程の前に、異なる変性剤と還元剤を用いてもよい(例えば、尿素、 β -メルカプトエタノール)。リフォールディングの間に、シスタミン/システアミン酸化還元対、D T T又は β -メルカプトエタノール/大気の酸素、及び還元型と酸化型のシステインなどの別の酸化還元対を用いてもよい。

【0068】

フォールディング効率は、他のタンパク質成分、例えば、シャペロンタンパク質をリフォールディング混合物に加えることによって増加させることもできる。リフォールディングは、ミニ-シャペロンが固定化されたカラムにタンパク質を通過させることによって、改善される(Altamirano et al. (1999). Nature Biotechnology 17:187-191; Altamirano, et al. (1997). Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3576-8)。

10

【0069】

あるいは、昆虫細胞などの真核細胞系の中に発現させることによって、本発明の可溶性TCRを取得してもよい。

【0070】

TCRの精製は、多くの様々な手段によって行うことができる。他の様式のイオン交換を利用してよいし、ゲル濾過クロマトグラフィー又はアフィニティークロマトグラフィーなどのそれ以外の様式のタンパク質精製を使用してもよい。

【0071】

20

本発明の可溶性TCR及び多価TCR複合体は、TCRがp M H C複合体に結合するのを阻害できる物質(小さな化学的化合物など)をスクリーニングする際にも使用できる。従って、さらなる側面において、本発明は、T細胞受容体のペプチド-M H C複合体への結合を阻害する物質をスクリーニングする方法であって、物質の存在下で、本発明の可溶性T細胞受容体のペプチド-M H C複合体との結合をモニタリングすることと、このような結合を阻害する物質を選択することとを備えた方法を提供する。

【0072】

このようなスクリーニング法に適した技術には、W001/22084号に記載されている表面プラズモン共鳴に基づく方法が含まれる。このスクリーニング法の基礎を成し得る他の周知の技術は、シンチレーション近接分析(S P A)や増幅ルミネッセント近接アッセイである。

30

【0073】

本発明のクリーニング法によって選択された物質は、薬物として使用することができ、あるいは、創薬プログラムの基礎として、医薬として投与するのにさらに適する特徴を有するように修飾し又はその他の改良を施すことができる。このような医薬は、望ましくないT細胞反応成分を有する症状を治療するために使用することができる。このような症状には、癌(例えば、腎臓、卵巣、腸、頭部及び頸部)、精巣、肺、胃、子宮頸(cervical)、膀胱、前立腺、又はメラノーマ)、自己免疫疾患、移植片の拒絶、移植片対宿主病が含まれる。

【0074】

40

本発明の各側面の好ましい特徴は、相互に、他の側面の好ましい特徴となる。本明細書に記載されている従来技術の文献は、法が許容する最大限度まで、本明細書に組み込まれる。

【実験の詳細】

【0075】

本発明をさらに以下の実験例で説明するが、これらの例は決して本発明を限定するものではない。

【0076】

以下の添付の図面を参照されたい。

【0077】

50

以下の実験例のすべてにおいて、別段の記載がない限り、産生された可溶性TCR鎖は、天然鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基のC末端直近で切断される。

【0078】

実験例1： A6 Tax TCRα鎖及びβ鎖のプライマー設計及び突然変異誘発
TRAC*01中のエキソン1のA6 Taxトレオニン48をシステインに突然変異させるために、以下のプライマーを設計した（突然変異を小文字で示す）。

【0079】

5' -C ACA GAC AAA tgT GTG CTA GAC AT

5' -AT GTC TAG CAC Aca TTT GTC TGT G

TRBC1*01及びTRBC2*01の両方におけるエキソン1のA6 Taxセリン57をシステインに突然変異させるために、以下のプライマーを設計した（突然変異を小文字で示す）。

【0080】

5' -C AGT GGG GTC tGC ACA GAC GC

5' -GG GTC TGT GCa GAC CCC ACT G

PCR突然変異誘発：

A6 Tax TCRα鎖又はβ鎖の各遺伝子を含む発現プラスミドを、それぞれα鎖プライマー又はβ鎖プライマーを用いて、以下のように突然変異させた。プラスミド100 ngを10 mM dNTP 5 μL、10×Pfu緩衝剤(Stratagene) 25 μL、Pfuポリメラーゼ(Stratagene) 10単位と混合し、最終体積をH₂Oで240 μLに調節した。この混合物48 μLに、最終反応体積50 μL中最終濃度が0.2 μMになるように希釈したプライマーを補充した。95 30秒の初期変性ステップの後、Hybaid PCR発現PCR装置を用いて、反応混合物を15ラウンドの変性(95、30秒)、アニーリング(55、60秒)及び伸長(73、8分)に供した。次いで、この生成物を、DpnI制限酵素(New England Biolabs) 10単位を用いて37で5時間消化した。消化された反応物10 μLをコンピテントXL1-Blue細菌に形質転換して、37で18時間増殖させた。単一コロニーを選択し、TYP+アンピシリン(16 g/Lバクトトリプトン、16 g/L酵母抽出物、5 g/L NaCl、2.5 g/L K₂HPO₄、100 mg/Lアンピシリン) 5 mL中で終夜増殖させた。QIAGENミニプレップカラムを用いて製造者の指示に従ってプラスミドDNAを精製し、オックスフォード大学生化学科の配列決定施設における自動配列決定によってその配列を確認した。α鎖の突然変異核酸配列及びアミノ酸配列のそれぞれを図2a及び3aに、β鎖の突然変異核酸配列及びアミノ酸配列のそれぞれを図2b及び3bに示す。

【0081】

実験例2： 可溶性TCRの発現、リフォールディング及び精製

突然変異α鎖及びβ鎖を含む各発現プラスミドをそれぞれE.Coli菌株BL21 pLys Sに別個に形質転換し、単一のアンピシリン耐性コロニーをTYP(アンピシリン100 μg/mL)培地中37でOD₆₀₀が0.4になるまで増殖させてから0.5 mM IPTGによってタンパク質発現を誘導した。誘導から3時間後にBeckman J-6Bを用いて4000 rpmで30分間遠心分離して細胞を回収した。細胞のペレットを、50 mM トリス-HCl、25% (w/v) スクロース、1 mM NaEDTA、0.1% (w/v) アジ化ナトリウム、10 mM DTT、pH 8.0を含有する緩衝液に再懸濁した。終夜の凍結融解ステップ後、再懸濁した細胞を、Misonix XL2020超音波処理器中で直径12 mmの標準プローブを用いて1分のバーストで合計約10分間超音波処理した。封入体のペレットをBeckman J2-21遠心分離器を用いて13000 rpmで30分間遠心分離して回収した。次いで、洗浄剤による洗浄を3回実施して細胞片及びメンブレン成分を除去した。毎回、トリトン緩衝液(50 mM トリス-HCl、0.5% トリトンX100、200 mM NaCl、10 mM NaEDTA、0.1% (w/v) アジ化ナトリウム、2 mM DTT、pH 8.0)で封入体ペレットをホモジナイズした後に、Beckman J2-21を用いて13000 rpmで15分間遠心分

離してペレット化した。次いで、以下の緩衝液、すなわち、50 mM トリス - HCl、1 mM NaEDTA、0.1% (w/v) アジ化ナトリウム、2 mM DTT、pH 8.0 中で同様に洗浄して、洗浄剤及び塩を除去した。最後に、封入体を30 mgの一定分量に分割して、-70℃で凍結させた。6 M グアニジン - HCl で可溶化し、Bradford 色素結合アッセイ (PerBio) で測定することによって、封入体タンパク質収率を定量した。

【0082】

可溶化した各封入体鎖約30 mg (すなわち、1 μmol) を凍結貯蔵物から融解し、次いで試料を混合し、その混合物をグアニジン溶液 (6 M グアニジン - 塩酸塩、10 mM 酢酸ナトリウム、10 mM EDTA) 15 mL に希釈して、鎖が完全に変性されたことを確認した。次いで、十分に還元され変性されたTCR鎖を含有するグアニジン溶液を、1 リットルの以下のリフォールディング緩衝液、すなわち、100 mM トリス pH 8.5、400 mM L-アルギニン、2 mM EDTA、5 mM 還元グルタチオン、0.5 mM 酸化グルタチオン、5 M 尿素、0.2 mM PMSF 中に注入した。この溶液を24時間静置した。次いで、リフォールディング体を2回、すなわち、最初に10 リットルの100 mM 尿素で、次に10 リットルの100 mM 尿素、10 mM トリス pH 8.0 で透析した。リフォールディングと透析の両方のステップを6~8回で実施した。

【0083】

透析したリフォールディング体をPOROS 50HQ陰イオン交換カラムに充填し、Akta精製装置 (Pharmacia) を用いて50カラム体積にわたる0~500 mM のNaCl勾配で、結合したタンパク質を図4のように溶出させることによって、分解生成物及び不純物からsTCRを分離させた。ピーク画分を4回で貯蔵し、クーマシー染色SDS-PAGE (図5) によって分析した後、プールし濃縮した。最後に、HBS-Ep緩衝液 (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3.5 mM EDTA、0.05% ノニデット p40) 中で予め平衡化させたSuperdex 200 HRゲルろ過カラム (図6) を用いてsTCRを精製しその特徴を調べた。約50 kDaの相対分子量で溶出したピークをプールし濃縮した後、BIAcore表面プラズモン共鳴分析によってその特徴を調べた。

【0084】

実験例3： 特定のpMHCに結合するsTCRのBIAcore表面プラズモン共鳴キャラクタリゼーション

表面プラズモン共鳴バイオセンサー (BIAcore 3000 (商標)) を用いて、ペプチド-MHCリガンドに対するsTCRの結合性を分析した。この分析は、ストレプトアビジンで被覆された結合表面に半配向して固定された (以下に記載する) 単一のpMHC複合体を作製することによって容易になり、(別個のフローセル上に固定された) 最高4種類の異なるpMHCに対する可溶性T細胞受容体の結合性を同時に効率的に試験することが可能になる。HLA複合体を手動で注入することによって、固定クラスI分子の正確な濃度を容易に操作できるようになる。

【0085】

このような固定複合体は、可溶相にいずれも注入することができるT細胞受容体及び補助受容体CD8ααの両方に結合することができる。TCRの特異的結合は低濃度 (少なくとも40 μg/mL) でも得られ、このことはTCRが比較的安定であることを意味する。sTCRは、可溶相で使用しても固定相で使用しても、そのpMHC結合諸特性が定性的及び定量的に類似していることが認められている。これは、可溶性種の活性を部分的に制御するのに重要であり、ビオチン化pMHC複合体が非ビオチン化複合体と生物学的に同等の活性を有することも示唆している。

【0086】

構成要素のサブユニットタンパク質及び合成ペプチドを含有し細菌によって発現される封入体から、ビオチン化クラスI HLA-A2-ペプチド複合体をインビトロでリフォールディングさせ、次いで精製し、インビトロで酵素によってビオチン化した(O'Callaghan等(1999) Anal. Biochem. 266: 9~15)。HLA重鎖は、適切な構築物においてタンパク

10

20

30

40

50

質の膜貫通領域及び細胞質領域を置換するC末端ビオチン化タグと共に発現された。約75 mg / リットル細菌培養物の封入体発現レベルが得られた。HLA軽鎖又は $\beta 2$ -ミクログロブリンも、E.Coliにおいて適切な構築物から約500 mg / リットル細菌培養物の濃度で封入体として発現された。

【0087】

E.Coli細胞を溶解し封入体を純度約80%に精製した。封入体からのタンパク質を6 M グアニジン - HCl、50 mM トリス pH 8.1、100 mM NaCl、10 mM DTT、10 mM EDTA中で変性し、単一パルスの変性タンパク質を5 未満のリフォールディング緩衝液に添加することによって、30 mg / リットル重鎖、30 mg / リットル $\beta 2$ mの濃度で、0.4 M L-アルギニン - HCl、100 mM トリス pH 8.1、3.7 mM シスタミン、mM システアミン、4 mg / mL ペプチド（例えば、tax 11-19）中にリフォールディングした。リフォールディングは、4 において、1時間以上で完結させることができた。

【0088】

10倍容量の10 mM トリス pH 8.1中で透析して緩衝液を交換した。溶液のイオン強度を十分低下させるには2回緩衝液を変える必要があった。次いで、タンパク質溶液を、1.5 μ m酢酸セルロースフィルターを通してろ過し、POROS 50HQ陰イオン交換カラムに充填した（総容積8 mL）。タンパク質を線状0 ~ 500 mM NaCl勾配で溶出させた。HLA-A2-ペプチド複合体は約250 mM NaClで溶出し、ピーク画分を収集し、プロテアーゼ阻害剤のカクテル(Calbiochem)を添加し、その画分を氷上で冷却した。

【0089】

ビオチン化タグ付きHLA複体の緩衝液を、同じ緩衝液で平衡化させたPharmaciaの急速脱塩カラムを用いて、10 mM トリス pH 8.1、5 mM NaClと交換した。タンパク質含有画分を、溶出後速やかに氷冷し、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Calbiochem)を添加した。次いで、ビオチン化試薬を添加した：1 mM ビオチン、5 mM ATP (pH 8に緩衝)、7.5 mM MgCl₂、及び5 μ g / mL BirA酵素(O'Callaghan等(1999)Anal.Biochem.266:9~15に従って精製した)。次いで、この混合物を室温で終夜インキュベートした。

【0090】

ゲルろ過クロマトグラフィを用いてビオチン化HLA複合体を精製した。ろ過したPBSを用いてPharmacia Superdex 75 HR 10/30カラムを予め平衡化し、1 mLのビオチン化反応混合物を充填し、PBSを用いて0.5 mL / minで展開した。ビオチン化HLA複合体は、約15 mLで単一ピークとして溶出した。タンパク質を含有する画分をプールし、氷冷し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを添加した。クーマシー結合アッセイ(PerBio)によってタンパク質濃度を決定し、一定量のビオチン化HLA複合体を-20で凍結保存した。ストレプトアビジンを標準アミンカップリング法によって固定した。

【0091】

新規鎖間結合を含むA6 Tax sTCRと、そのリガンド/MHC複合体又はその生成について上述した無関係なHLA-ペプチド化合物との相互作用を、BIAcore 3000（商標）表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサーを用いて分析した。受容体リガンド相互作用を検出し、それらの親和性及び動力学パラメータを解析するのに用いることができる原理である、小さなフローセル内のセンサー表面近くの応答単位(RU)で表される屈折率変化が、SPRによって測定される。 $\beta 2$ m上に架橋結合されたビオチンと、フローセルの活性化された表面に化学的に架橋結合されたストレプトアビジンとを結合させて、個々のHLA-ペプチド複合体を別個のフローセル中に固定することによって、フローブフローセルを調製した。次いで、異なるフローセルの表面を一定流量でsTCRを通過させ、そのSPR応答を測定することによってアッセイを実施した。まず、2つの異なる表面、すなわち、約5000 RUの特異的ペプチド-HLA複合体で被覆された表面と約5000 RUの非特異的ペプチド-HLA複合体で被覆されたもう1つの表面にわたって5

10

20

30

40

50

$\mu\text{L}/\text{min}$ の一定流量でsTCRを通過させることによって相互作用の特異性を確認した(図7挿入グラフ)。可溶性sTCRを、一定流量かつ様々な濃度でペプチド-HLA複合体に注入してバックグラウンド共鳴を確定した。図7に示すように、これらの対照測定値を特異的ペプチド-HLA複合体によって得られる値から差し引き、その値を用いて解離定数 K_d として表される結合親和性を計算した(Price&Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists(2nd Edition)1979, Clarendon Press, Oxford)。

【0092】

得られた K_d 値($1.8\mu\text{M}$)は、新規ジスルフィド結合のないA6 Tax sTCRとpMHCの相互作用に対する報告値($0.91\mu\text{M}$ -Ding等、1999、Immunity 11: 45~56)に近い。

10

【0093】

実験例4: 新規ジスルフィド結合を含む可溶性JM22 TCRの生成

実験例1において調製した可溶性A6 TCRの β 鎖は、連結部位として使用するのに適したBg1II制限酵素切断部位(AAGCTT)を天然配列中に含む。

【0094】

PCR突然変異誘発を以下のように実施してBamH1制限酵素切断部位(GGATC)を可溶性A6 TCRの α 鎖、新規システインコドンの5'に導入した。図2aに記載した配列をこの突然変異誘発用テンプレートとして用いた。以下のプライマーを使用した。

【化1】

20

|BamHI|

5'-ATATCCAGAACCCgGATCCTGCCGTGTA-3'

5'-TACACGGCAGGAaTCcGGGTTCCTGGATAT-3'

【0095】

プラスミド100ngを10mM dNTP 5 μL 、10xPfu緩衝液(Stratagene) 25 μL 、Pfuポリメラーゼ(Stratagene) 10単位と混合し、 H_2O を用いて最終体積を240 μL に調整した。この混合物48 μL に、最終反応体積50 μL 中最終濃度が0.2 μM になるように希釈したプライマーを補充した。95 30秒の初期変性ステップの後、Hybaid PCR発現PCR装置を用いて、反応混合物を15ラウンドの変性(95、30秒)、アニーリング(55、60秒)及び伸長(73、8分)に供した。次いで、この生成物を、DpnI制限酵素(New England Biolabs) 10単位を用いて37で5時間消化した。消化された反応物10 μL をコンピテントXL1-B1ue細菌に形質転換して、37で18時間増殖させた。単一コロニーを選択し、TYP+アンピシリン(16g/Lバクトトリブトン、16g/L酵母抽出物、5g/LNaCl、2.5g/L K_2HPO_4 、100mg/Lアンピシリン) 5mL中で終夜増殖させた。QIAGENミニプレップカラムを用いて製造者の指示に従ってプラスミドDNAを精製し、オックスフォード大学生化学科の配列決定施設における自動配列決定によってその配列を確認した。 α 鎖に導入された突然変異は「サイレント」であり、したがってこの鎖のアミノ酸配列は、図3Aに詳述されたものと同じである。突然変異 α 鎖のDNA配列を図8Aに示す。

30

40

【0096】

新規ジスルフィド結合が組み込まれた可溶性JM22 TCRを生成させるために、 α 鎖BamH1及び β 鎖Bg1II制限酵素切断部位を含むA6 TCRプラスミドをテンプレートとして使用した。以下のプライマーを使用した。

【化 2】

| NdeI |
 5'-GGAGATATACATATGCAACTACTAGAACAA-3'
 5'-TACACGGCAGGATCCGGGTTCTGGATATT-3'
 | BamHI |

10

| NdeI |
 5'-GGAGATATACATATGGTGGATGGTGGGAATC-3'
 5'-CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGC-3'
 | BglII |

【 0 0 9 7 】

J M 2 2 TCR α 鎖及び β 鎖構築物を以下のように P C R クローニングによって得た。上述のプライマー及び J M 2 2 TCR 鎖を含むテンプレートを用いて P C R 反応を実施した。P C R 産物を該当する制限酵素で消化し、p G M T 7 にクローン化して発現プラスミドを得た。プラスミド挿入断片の配列を、自動 D N A 配列決定によって確認した。図 8 b 及び 8 c に、J M 2 2 TCR の突然変異 α 鎖及び β 鎖それぞれの D N A 配列を示す。図 9 a 及び 9 b に、得られたアミノ酸配列を示す。

20

【 0 0 9 8 】

実験例 1 及び 2 に記載したように、それぞれの TCR 鎖が発現され、共にリフォールディングされ、精製された。図 1 0 に、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ カラムから溶出した可溶性ジスルフィド連結 J M 2 2 TCR タンパク質の溶出を示す。図 1 1 に、図 1 0 に示したカラム分析画分の還元 S D S - P A G E (クーマシー染色) 及び非還元 S D S - P A G E (クーマシー染色) の両方のゲルの結果を示す。ピーク 1 が鎖間ジスルフィド連結された TCR ヘテロダイマーを含むことは明らかである。図 1 2 に、図 1 0 のピーク 1 からプールされた画分のサイズ排除カラムからのタンパク質溶出を示す。

30

【 0 0 9 9 】

p M H C に対する J M 2 2 TCR の結合の B I A c o r e 分析を、実験例 3 に記載したように実施した。図 1 3 a に、H L A - F 1 u 複合体に対するジスルフィド連結 J M 2 2 可溶性 TCR の特異的結合の B I A c o r e 分析結果を示す。図 1 3 b に、ジスルフィド連結 J M 2 2 可溶性 TCR の単回投与の対照と比較した結合応答を示す。H L A - F L U 複合体に対するこのジスルフィド連結 TCR の K_d は $7.9 \pm 0.51 \mu M$ と決定された。

【 0 1 0 0 】

実験例 5 : 新規ジスルフィド結合を含む可溶性 NY-ESO TCR の生成

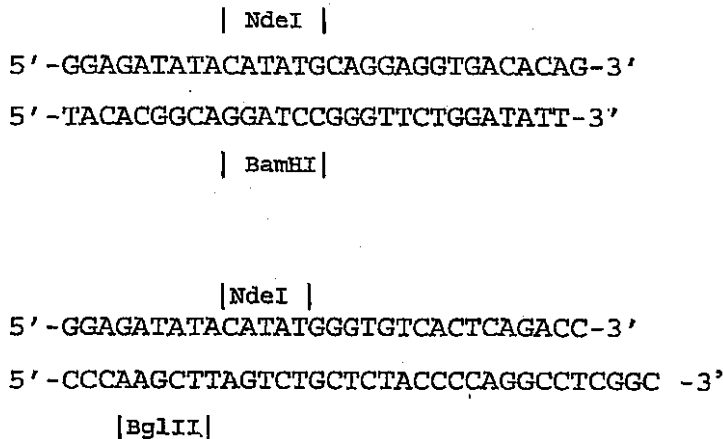
40

NY-ESO TCR をコードする c D N A を、Enzo Cerundolo (Institute of Molecular Medicine, University of Oxford) によって提供された T 細胞から既知の技術に従って単離した。NY-ESO TCR をコードする c D N A を、m R N A を逆転写酵素で処理することによって生成させた。

【 0 1 0 1 】

新規ジスルフィド結合が組み込まれた可溶性 NY-ESO TCR を生成させるために、 α 鎖 B a m H I 及び β 鎖 B g l I I 制限酵素切断部位を含む A6 TCR プラスミドを実験例 4 に記載したようにテンプレートとして使用した。以下のプライマーを使用した。

【化 3】



10

【 0 1 0 2 】

NY-ESO TCR α 鎖及び β 鎖構築物を以下のように P C R クローニングによって得た。上述のプライマー及びNY-ESO TCR鎖を含むテンプレートを用いて P C R 反応を実施した。P C R 産物を該当する制限酵素で消化し、p G M T 7 にクローン化して発現プラスミドを得た。プラスミド挿入断片の配列を、自動 D N A 配列決定によって確認した。図 1 4 a 及び 1 4 b に、NY-ESO TCR の突然変異 α 鎖及び β 鎖それぞれの D N A 配列を示す。図 1 5 a 及び 1 5 b に、得られたアミノ酸配列を示す。

20

【 0 1 0 3 】

プロトコルにおける以下の変更点を除いて実験例 1 及び 2 に記載したように、それぞれの TCR 鎖が発現され、共にリフォールディングされ、精製された。

【 0 1 0 4 】

可溶性 TCR の変性；可溶化された TCR β 鎖封入体 3 0 m g 及び可溶化された TCR α 鎖封入体 6 0 m g を凍結貯蔵物から融解した。封入体を 6 M グアニジン溶液中 5 m g / m L の最終濃度に希釈し、D T T (2 M 貯蔵物) を添加して最終濃度 1 0 m M にした。この混合物を 3 7 °C で 3 0 分間インキュベートした。

30

【 0 1 0 5 】

可溶性 TCR のリフォールディング：リフォールディング緩衝液 1 L を 5 °C ± 3 °C で激しく攪拌した。酸化還元対 (2 - メルカプトエチルアミン及びシスタミン (それぞれ最終濃度 6 . 6 m M 及び 3 . 7 m M)) を添加し、その約 5 分後に変性 TCR 鎖を添加した。次いで、このタンパク質を、5 °C ± 3 °C で約 5 時間 ± 1 5 分攪拌しながらリフォールディングさせた。

【 0 1 0 6 】

リフォールディングされた可溶性 TCR の透析：リフォールディングされた TCR を、Spectrapor 1 メンブレン (Spectrum ; 製品番号 132670) を用いて、1 0 L の 1 0 m M トリス p H 8 . 1 に対して 5 °C ± 3 °C で 1 8 ~ 2 0 時間透析した。この時間が経過した後、透析緩衝液を新しい 1 0 m M トリス p H 8 . 1 (1 0 L) に変え、5 °C ± 3 °C でさらに 2 0 ~ 2 2 時間透析を続けた。

40

【 0 1 0 7 】

図 1 6 に、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ カラムから溶出した可溶性 N Y - E S O ジスルフィド連結 TCR タンパク質の溶出を示す。図 1 7 に、図 1 6 に示したカラム分析画分の還元 S D S - P A G E (クーマシー染色) 及び非還元 S D S - P A G E (クーマシー染色) の両方のゲルの結果を示す。ピーク 1 及び 2 が鎖間ジスルフィド連結された TCR ヘテロダイマーを含むことは明らかである。図 1 8 に、図 1 7 のピーク 1 (A) 及びピーク 2 (B) からプールされた画分のサイズ排除クロマトグラフ

50

ィを示す。タンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

【 0 1 0 8 】

p M H C に対するジスルフィド連結NY-ESO TCRの結合のBIAcore分析を、実験例 3 に記載したように実施した。図 1 9 に、H L A - NYESO複合体に対するジスルフィド連結 N Y - E S O 可溶性TCRの特異的結合のBIAcore分析結果を示す。A . ピーク 1、B . ピーク 2。

【 0 1 0 9 】

HLA-NY-ESO複合体に対するこのジスルフィド連結TCRの K_d は、 $9.4 \pm 0.84 \mu M$ と決定された。

【 0 1 1 0 】

実験例 6 : 新規ジスルフィド鎖間結合、及び天然ジスルフィド鎖間結合を形成するのに必要な 2 つのシステインのうち少なくとも 1 つを含む可溶性NY-ESO TCRの生成

新規ジスルフィド結合、及び天然ジスルフィド鎖間結合に関与するシステイン残基の少なくとも 1 つが組み込まれた可溶性NY-ESO TCRを生成させるために、実験例 4 に記載したように、 α 鎖 B a m H I 及び β 鎖 B g l I I 制限酵素切断部位を含むプラスミドをフレームワークとして使用した。以下のプライマーを使用した。

【 化 4 】

| NdeI |

5'-GGAGATATACATATGCAGGAGGTGACACAG-3'

5'-CCCAAGCTTAACAGGAAC'TTTCTGGGCTGGGGAAGAA-3'

| HindIII |

| NdeI |

5'-GGAGATATACATATGGGTGTCACTCAGACC-3'

5'-CCCAAGCTTAACAGTCTGCTCTACCCAGGCCTCGGC -3'

| BglII |

【 0 1 1 1 】

NY-ESO TCR α 鎖及び β 鎖構築物を以下のように P C R クローニングによって得た。上述のプライマー及びNY-ESO TCR鎖を含むテンプレートを用いて P C R 反応を実施した。P C R 産物を該当する制限酵素で消化し、p G M T 7 にクローン化して発現プラスミドを得た。プラスミド挿入断片の配列を、自動 D N A 配列決定によって確認した。図 2 0 a 及び 2 0 b に、NY-ESO TCRの突然変異 α 鎖及び β 鎖それぞれの D N A 配列を示す。図 2 1 a 及び 2 1 b に、得られたアミノ酸配列を示す。

【 0 1 1 2 】

非天然ジスルフィド鎖間結合及び天然ジスルフィド鎖間結合の両方を含む可溶性NY-ESO TCRを生成させるために、上記プライマーの両方を用いて単離された D N A を使用した。非天然ジスルフィド鎖間結合、及び天然ジスルフィド鎖間結合に関与するシステイン残基の 1 つのみを含む可溶性NY-ESO TCRを生成させるために、上記プライマーの 1 つと実験例 5 からの適切なプライマーとを用いて単離された D N A を使用した。

【 0 1 1 3 】

実験例 5 に記載したように、それぞれのTCR鎖が発現され、共にリフォールディングされ、精製された。

【 0 1 1 4 】

図 2 2 ~ 2 4 に、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いたPOROS 50HQ陰イオン交換カラムから溶出した可溶性NY-ESO TCR α^{Cys} β^{Cys} (すなわち、両方の鎖の非天然及び天然システインを含む)、TCR α^{Cys} (両方の鎖の非天然システインを含む

10

20

30

40

50

が α 鎖のみの天然システインしか含まない)、及びTCR β^{CYS} (両方の鎖の非天然システインを含むが β 鎖のみの天然システインしか含まない)タンパク質の溶出を示す。図25及び26に、図22~24に示したNY-ESO TCR α^{CYS} β^{CYS} 、TCR α^{CYS} 及びTCR β^{CYS} カラム分析画分の還元SDS-PAGE(クーマシー染色)ゲル及び非還元SDS-PAGE(クーマシー染色)ゲルそれぞれの結果を示す。これらは、鎖間ジスルフィドによって連結されたTCRヘテロダイマーが形成されたことを明瞭に示している。図27~29に、それぞれ図22~24に示したNY-ESO TCR α^{CYS} β^{CYS} 、TCR α^{CYS} 及びTCR β^{CYS} 陰イオン交換カラム分析からプールされた画分のゲルろ過クロマトグラフィーのタンパク質溶出プロファイルを示す。タンパク質は、TCRヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

10

【0115】

pMHCに対するsTCRの結合のBIAcore分析を、実験例3に記載したように実施した。図30~32に、HLA-NYESO複合体に対するNY-ESO TCR α^{CYS} β^{CYS} 、TCR α^{CYS} 及びTCR β^{CYS} それぞれの特異的結合のBIAcore分析結果を示す。

【0116】

TCR α^{CYS} β^{CYS} の K_d は $18.08 \pm 2.075 \mu\text{M}$ であり、TCR α^{CYS} の K_d は $19.24 \pm 2.01 \mu\text{M}$ であり、TCR β^{CYS} の K_d は $22.5 \pm 4.0692 \mu\text{M}$ であった。

【0117】

実験例7: 新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性AH-1.23 TCRの生成
AH-1.23 TCRをコードするcDNAを、Hill Gaston(Medical School, Addenbrooke's Hospital, Cambridge)によって提供されたT細胞から既知の技術に従って単離した。NY-ESO TCRをコードするcDNAを、mRNAを逆転写酵素で処理することによって生成させた。

20

【0118】

新規ジスルフィド結合が組み込まれた可溶性AH-1.23 TCRを生成させるために、 α 鎖BamHI及び β 鎖BglII各制限酵素切断部位を含む各TCRプラスミドを実験例4に記載したようにフレームワークとして使用した。以下のプライマーを使用した。

【化5】

30

| NdeI |
5'-GGGAAGCTTACATATGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGG-3'
5'-TACACGGCAGGATCCGGTTCTGGATATT-3'

| BamHI |

| NdeI |
5'-TTGGAATTCACATATGGGCGTCATGCAGAACCCAAGACAC-3'
5'-CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCAGGCCTCGGC-3'

| BglII |

40

【0119】

AH-1.23 TCR α 鎖及び β 鎖構築物を以下のようにPCRクローニングによって得た。上述のプライマー及びAH-1.23 TCR鎖を含むテンプレートを用いてPCR反応を実施した。PCR産物を該当する制限酵素で消化し、pGMT7にクローン化して発現プラスミドを得た。プラスミド挿入断片の配列を、自動DNA配列決定によって確認した。図33a及び33bに、AH-1.23 TCRの突然変異 α 鎖及び β 鎖それぞれのDNA配列を示す。図34a及び34bに、得られたアミノ酸配列を示す。

【0120】

実験例5に記載したように、それぞれのTCR鎖が発現され、共にリフォールディングさ

50

れ、精製された。

【 0 1 2 1 】

図 3 5 に、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いたPOROS 50HQ陰イオン交換カラムから溶出した可溶性 A H - 1 . 2 3 ジスルフィド連結TCRタンパク質の溶出を示す。図 3 6 及び 3 7 に、図 3 5 に示したカラム分析画分のそれぞれ還元 S D S - P A G E (クーマシー染色) ゲル及び非還元 S D S - P A G E (クーマシー染色) ゲルの結果を示す。これらのゲルは、鎖間ジスルフィド連結されたTCRヘテロダイマーの存在を明示している。図 3 8 は、図 3 5 に示した陰イオン交換カラム分析からプールされた画分のSuperdex 75 HRゲルろ過カラムの溶出プロファイルである。タンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

10

【 0 1 2 2 】

実験例 8 : 定常ドメインの免疫グロブリン領域内の別の位置における新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの生成

TRAC * 0 1 のエキソン 1 のトレオニン 4 8 とTRBC 1 * 0 1 / TRBC 2 * 0 1 両方のエキソン 1 のセリン 5 7 との間以外の位置にあるTCR免疫グロブリン領域において、新規ジスルフィド結合を含む機能的可溶性TCRを形成できるかどうかを検討するために以下の実験を実施した。

【 0 1 2 3 】

A6 TCR α 鎖を突然変異させるために、以下のプライマーを設計した (プライマー名称内の番号はTRAC * 0 1 のエキソン 1 中で突然変異するアミノ酸残基の位置を示し、突然変異した残基を小文字で示す) 。

20

【 0 1 2 4 】

T 4 8 → C 突然変異

5 ' -CACAGACAAAtgtGTGCTAGACAT-3 '

5 ' -ATGTCTAGCACAcATTTGTCTGTG-3 '

Y 1 0 → C 突然変異

5 ' -CCCTGCCGTGTgCCAGCTGAGAG-3 ' "

5 ' -CTCTCAGCTGGcACACGGCAGGG-3 '

L 1 2 → C 突然変異

5 ' -CCGTGTACCAGtgCAGAGACTCTAAATC-3 '

5 ' -GATTTAGAGTCTCTgcaCTGGTACACGG-3 '

S 1 5 → C 突然変異

5 ' -CAGCTGAGAGACTgTAAATCCAGTGAC-3 '

5 ' -GTCAGTGGATTTAcAGTCTCTCAGCTG-3 '

V 2 2 → C 突然変異

5 ' -CAGTGACAAGTCTtgCTGCCTATTAC-3 '

5 ' -GTGAATAGGCAGcAAGACTTGTCAGT-3 '

Y 4 3 → C 突然変異

5 ' -GATTCTGATGTGTgTATCACAGACAAAT-3 '

5 ' -ATTTGTCTGTGATAcACACATCAGAATC-3 '

T 4 5 → C 突然変異

5 ' -CTGATGTGTATATCtgtGACAAAAGTGTGC-3 '

5 ' -GCACAGTTTTGTcAcGATATACACATCAG-3 '

L 5 0 → C 突然変異

5 ' -AGACAAAAGTGTgtGACATGAGGTCT-3 '

5 ' -AGACCTCATGTcAcACAGTTTTGTCT-3 '

M52 → C 突然変異

5 ' -ACTGTGCTAGACtgtAGGTCTATGGAC-3 '

5 ' -GTCCATAGACCTAcAGTCTAGCACAGT-3 '

S61 → C 突然変異

30

40

50

5' -CTTCAAGAGCAACtGTGCTGTGGCC-3'

5' -GGCCACAGCACaGTTGCTCTTGA G-3'

TCR A 6 β 鎖を突然変異させるために、以下のプライマーを設計した（プライマー名称内の番号はTRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 中で突然変異するアミノ酸残基の位置を示し、突然変異した残基を小文字で示す）。

【 0 1 2 5 】

S57 → C 突然変異

5' -CAGTGGGGTcTGCACAGACCC-3'

5' -GGGTCTGTGCaGACCCCACTG-3'

V13 → C 突然変異

5' -CCGAGGTCGCTtgtTTTGAGCCATCAG-3'

5' -CTGATGGCTCAAAacaAGCGACCTCGG-3'

F14 → C 突然変異

5' -GGTCGCTGTgtGAGCCATCAGA-3'

5' -TCTGATGGCTCacaCACAGCGACC-3'

S17 → C 突然変異

5' -GTGTTTGAGCCATgtGAAGCAGAGATC-3'

5' -GATCTCTGCTTCacATGGCTCAAACAC-3'

G55 → C 突然変異

5' -GAGGTGCACAGTtGtGTCAGCACAGAC-3'

5' -GTCTGTGCTGACaCaACTGTGCACCTC-3'

D59 → C 突然変異

5' -GGGTCAGCACAtgCCCGCAGCCC-3'

5' -GGGCTGCGGGcaTGTGCTGACCC-3'

L63 → C 突然変異

5' -CCCGCAGCCctgCAAGGAGCAGC-3'

5' -GCTGCTCCTTGCaGGGCTGCGGG-3'

S77 → C 突然変異

5' -AGATACGCTCTGtGCAGCCGCCT-3'

5' -AGGCGGCTGCaCAGAGCGTATCT-3'

R79 → C 突然変異

5' -CTCTGAGCAGctGCCTGAGGGTC-3'

5' -GACCCTCAGGCaGCTGCTCAGAG-3'

E15 → C 突然変異

5' -GCTGTGTTTTgtCCATCAGAA-3'

5' -TTCTGATGGacaAAACACAGC-3'

以下のアミノ酸対間に新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性TCRを生成させるために、PCR突然変異誘発、α及びβTCR構築物増幅、ライゲーション及びプラスミド精製を、上記プライマーの適切な組み合わせを用いて、実験例 1 に記載したように実施した。

10

20

30

【表 2】

TCR α 鎖	TCR β 鎖	使用した α プライマー	使用した β プライマー
Thr 48	Ser 57	T48→C	S57→C
Thr 45	Ser 77	T45→C	S77→C
Ser 61	Ser 57	S61→C	S57→C
Leu 50	Ser 57	L50→C	S57→C
Tyr 10	Ser 17	Y10→C	S17→C
Ser 15	Val 13	S15→C	V13→C
Thr 45	Asp 59	T45→C	D59→C
Leu 12	Ser 17	L12→C	S17→C
Ser 61	Arg 79	S61→C	R79→C
Leu 12	Phe 14	L12→C	F14→C
Val 22	Phe 14	V22→C	F14→C
Met 52	Gly 55	M52→C	G55→C
Tyr 43	Leu 63	Y43→C	L63→C
Ser 15	Glu 15	S15→C	E15→C

10

20

【 0 1 2 6 】

図 3 9 ~ 5 8 に、上記プライマーによって増幅された突然変異 A6 TCR 鎖の D N A 配列及びアミノ酸配列を示す。突然変異システインをコードするコドン強調して示す。

【 0 1 2 7 】

30

実験例 5 に記載したように、それぞれの TCR 鎖が発現され、共にリフォールディングされ、精製された。POROS 50HQ 陰イオン交換カラムで精製した後、正確にリフォールディングされた可溶性 TCR が形成されたかどうかを評価するために、得られたタンパク質を S D S - P a g e ゲルにかけた。精製材料における正確な分子量のジスルフィド連結タンパク質の有無を確認するためにこれらのゲルも評価した。以下の新規ジスルフィド鎖間結合を含む研究対象の TCR は、この細菌発現システムでは正確な分子量のジスルフィド連結タンパク質が生成せず、これらをさらに評価することはしなかった。しかし、別の原核生物又は真核生物発現システムが利用可能である。

【表 3】

TCR α 鎖	TCR β 鎖
Ser 61	Ser 57
Leu 50	Ser 57
Ser 15	Val 13
Leu 12	Ser 17
Ser 61	Arg 79
Leu 12	Phe 14
Val 22	Phe 14
Tyr 43	Leu 63

10

【0128】

図59～64に、点線で示した0～500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 200HQ陰イオン交換カラムからの以下の残基間、すなわち、Thr 48-Ser 57、Thr 45-Ser 77、Tyr 10-SER 17、Thr 45-Asp 59、Met 52-Gly 55及びSer 15-Glu 15間それぞれの新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性TCRの溶出を示す。図65～70に、図59～64に示したカラム分析画分の還元SDS-PAGE（クーマシー染色）ゲル及び非還元SDS-PAGE（クーマシー染色）ゲルそれぞれの結果を示す。これらのゲルは、鎖間ジスルフィド連結されたTCRヘテロダイマーの存在を明示している。

20

【0129】

図71～76は、図59～64に示した陰イオン交換カラム分析からプールされた画分のSuperdex 200 HRゲルろ過カラムからの溶出プロファイルである。

【0130】

pMHCに対するTCRの結合のBIAcore分析を、実験例3に記載したように実施した。図77～82は、HLA-A2 tax pMHC複合体に対する精製可溶性TCRの結合能力を示すBIAcoreトレースである。

30

【0131】

Thr 48-Ser 57のKdは7.8 μ Mであり、Thr 45-Ser 77のKdは12.7 μ Mであり、Tyr 10-Ser 17のKdは34 μ Mであり、Thr 45-Asp 59のKdは14.9 μ Mであり、Ser 15-Glu 15のKdは6.3 μ Mであった。Met 52-Gly 55は、その天然の「標的」であるHLA-A2 tax複合体に結合可能であるが、「無関係な」標的であるHLA-A2-NY-ESO複合体にも同様に結合した（図81参照）。

【0132】

実験例9： NY-ESO-HLA-A2複合体に特異的なジスルフィド連結NY-ESO T細胞受容体のX線結晶学

40

NY-ESO dsTCRを実験例5に記載したようにクローン化し以下のように発現させた。

【0133】

突然変異 α 鎖及び β 鎖を含む各発現プラスミドをそれぞれE.Coli菌株BL21 pLys Sに別個に形質転換し、単一のアンピシリン耐性コロニーをTYP（アンピシリン100 μ g/mL）培地中37℃でOD₆₀₀が0.7になるまで増殖させてから0.5mM IPTGによってタンパク質発現を誘導した。誘導後18時間してBeckman J-6Bを用いて4000rpmで30分間遠心分離して細胞を回収した。細胞のペレットを、10mMトリス-HCl pH8.1、10mM MgCl₂、150mM NaCl

50

、2 mM DTT、10%グリセリンを含有する溶解緩衝液に再懸濁した。細菌培養物1 Lごとに、リゾチーム(20 mg/mL) 100 μ L及びDnase I(20 μ g/mL) 100 μ Lを添加した。細菌懸濁液を、氷上で30分間インキュベーションした後、直径12 mmの標準プローブの付いたMisonix XL2020超音波処理器を用いて1分のバーストで合計10分間超音波処理した。Beckman J2-21遠心分離器(4)を用いて13000 rpmで30分間遠心分離して封入体のペレットを回収した。次いで、トリトン洗浄緩衝液(50 mMトリス-HCl、pH 8.1、0.5%トリトンX100、100 mM NaCl、10 mM NaEDTA、0.1%(w/v)、2 mM DTT)による洗浄を3回実施して、細胞片及びメンブレン成分を除去した。毎回、封入体ペレットをトリトン洗浄緩衝液にホモジナイズした後、Beckman J2-21を用いて13000 rpmで15分間遠心分離してペレット化した。次いで、再懸濁緩衝液(50 mMトリス-HCl pH 8.1、100 mM NaCl、10 mM NaEDTA、0.1%(w/v)アジ化ナトリウム、2 mM DTT)中で同様に洗浄して、洗浄剤及び塩を除去した。最後に、封入体を、6 Mグアニジン緩衝液(6 Mグアニジン-塩酸塩、50 mMトリス pH 8.1、100 mM NaCl、10 mM EDTA、10 mM DTT)に可溶化し、120 mgの一定分量に分割し、-70 で凍結させた。6 Mグアニジン-HClで可溶化しBradford色素結合アッセイ(PerBio)で測定することによって封入体を定量した。

【0134】

凍結可溶化されたアルファ鎖約60 mg(すなわち、2.4 μ モル)を凍結可溶化されたベータ鎖30 mg(すなわち、1.2 μ モル)と混合した。このTCR混合物を6 Mグアニジン緩衝液で最終体積18 mLに希釈し、37 に30分間加熱して鎖変性を確実に終了させた。次いで、完全に還元され変性されたTCR鎖を含有するグアニジン溶液をリフォールディング緩衝液(100 mMトリス pH 8.1、400 mM L-アルギニン-HCl、2 mM EDTA、6.6 mM 2-メルカプトエチルアミン、3.7 mMシスタミン、5 M尿素)1リットルに攪拌しながら混合した。この溶液を5時間低温室(5 $\pm$ 3)に静置してリフォールディングさせた。次いで、リフォールディング体を水12リットルで18~20時間透析し、その後12リットルの10 mMトリス pH 8.1で18~20時間(5 $\pm$ 3)透析した。分子量カットオフが6~8000 kDaであるSpectrapor 1(Spectrum Laboratories 製品番号132670)透析メンブレンをこの透析プロセスに使用した。透析したタンパク質を、Nalgeneろ過ユニットに装着した細孔サイズ0.45 μ mのフィルター(Schleicher and Schuell、参照番号10 404012)を通してろ過した。

【0135】

透析したリフォールディング体をPOROS 50HQ(Applied Bio Systems)陰イオン交換カラムに充填しAKTA精製装置(Amersham Biotech)を用いて、リフォールディングされたNY-ESO TCRを分解生成物及び不純物から分離させた。POROS 50 HQカラムを10カラム体積の緩衝液A(10 mMトリス pH 8.1)で予め平衡化した後、それにタンパク質を充填した。7カラム体積にわたる0~500 mMのNaCl勾配によって、結合したタンパク質を溶出させた。還元及び非還元試料緩衝液を用いた変性SDS-PAGEでピーク画分(1 mL)を分析した。25 mM MES pH 6.5で予め平衡化したSuperdex 75 HRゲルろ過カラムを用いて、アルファ-ベータヘテロダイマー複合体を含有するピーク画分をさらに精製した。相対分子量約50 kDaで溶出したタンパク質ピークをプールし、Ultrafree遠心濃縮装置(Millipore、部品番号UFV2BG C40)で42 mg/mLに濃縮し、-80 で保存した。

【0136】

当量の結晶化緩衝液と混合した、5 mM Mes pH 6.5に希釈したタンパク質溶液(8.4 mg/mL) 1 μ Lを用いて、ハンギングドロップ法によって18 でNY-ESO TCRの結晶化を実施した。Crystal Screen緩衝液(Hampton Research)を用いたいくつかの異なる条件下で結晶が出現した。単一の立方晶(<100 μ m)が30%PEG 4000

、0.1 M クエン酸ナトリウム pH 5.6、0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液中で成長し、構造決定に使用された。

【0137】

NY-ESO TCRの結晶を急速冷凍し、DaresburyシンクロトロンのX線回折試験に供した。この結晶は0.25 nm (2.5)の分解能で回折した。1組のデータを収集し処理して、約0.27 nm (2.7)が妥当であるが0.25 nm (2.5)まで使用可能である98.6%完全な振幅セットが得られた。組み合わせR因子(merging R-factor)、すなわち結晶学的に等価な反射を複数回測定した一致度は、すべてのデータに対して10.8%であった。これは、最高分解能シェルでは限界である。空間群は、細胞サイズA = 4.25 nm (42.5)、b = 5.95 nm (59.5)、c = 8.17 nm (81.7)、 $\beta = 91.5^\circ$ のP2₁であった。細胞サイズ及び対称性から、細胞中には2つのコピーが存在することが示された。検討を要する非対称単位a u又は最小体積は一方の分子のみであり、細胞中の他方の分子は2₁対称操作によって作製される。a uにおける分子の位置決めはy方向で任意である。x-z面内で正確な位置にある限り、y方向に自由に移動させることができる。これは、この「極性」空間群ではフリーパラメータと呼ばれる。

10

【0138】

PDBデータベースには、A/BヘテロダイマーTCRを含有するエントリーは、1BD2の1つしかない。このエントリーは、TCRを含む複合体におけるHLA同族ペプチド(cognate peptide)の座標も有する。TCR鎖BはNY-ESOで同じであったが、鎖AはCDメインで僅かな差がありNドメインでかなりの差があった。1BD2 A/Bモデルを分子置換MRに使用すると、対称等価な分子との広範な重複によって示されるように、不正確な解が得られた。B鎖のみを使用すると、近隣分子とさほど衝突しないより良い解が得られた。相関係数は49%であり、結晶学的R因子は50%であり、最短近接(重心~重心)は0.49 nm (49)であった。鎖Bの出発モデルをMR等価物に変換するために必要な回転及び並進操作を鎖Aに適用した。このようにして生成されたハイブリッドMR解は、細胞内にうまく充填され、衝突は最小に抑えられた。

20

【0139】

電子密度地図はこのモデルとほぼ一致し、NY-ESO TCRの配列に合致するように調節された。しかし、出発モデルには多数の相違があり、特に、このモデルの不規則に配列した部分に特徴的である側鎖の欠損があった。鎖間のヘアピンループの多くは極めて低い密度を有し、モデル化が困難であった。このモデルの結晶学的R因子は30%である。R因子は、残差、すなわち、振幅の計算値と測定値の差である。

30

【0140】

図83a及び83bに示すように、1BD2からの入力配列は、密度とあまり一致しない。モデルの鎖Aの164位及び鎖Bの174位をCysに変更し、その後さらに改良すると、この配列指定が密度と極めて良く適合することが明らかになった。しかし、側鎖のサイズの差は極めてわずかで、このモデルに乱れはほとんどなかった。この領域の電子密度はほとんど変化しなかった。

【0141】

この研究の最も重要な側面は、新しいTCRが、発表されたモデル(1BD2)に構造的に極めて類似していることである。この比較には、TCRのすべて、定常ドメイン、又は突然変異点近くの小部分を含めることができる。

40

【0142】

r.m.s 偏差値を下表に列記する。構造の比較を図84に示す。

【表 4】

	鎖A 完全	鎖B 完全	鎖A 定常	鎖B 定常	ショート ストレッチ
r.m.s変位	2.831	1.285	1.658	1.098	0.613
平均変位	2.178	1.001	1.235	0.833	0.546
最大変位	9.885	6.209	6.830	4.490	1.330

(単位はすべてÅである。)

10

【0143】

ショートストレッチとは、目下ジスルフィド架橋によって連結されている鎖Aからの一本鎖（A157～A169）及び鎖Bからの一本鎖（B170～B183）を指す。主鎖の原子に対してのみ偏差を計算した。

【0144】

これらの結果から、ジスルフィド結合を導入しても、その周囲のTCRの局所構造がほとんど影響を受けないことがわかる。A6 TCRの発表された構造（1BD2）とTCRを比較すると、いくつかのより大きな効果が認められるが、RMS変移の増加はループコンホメーションの違いによるところが大きい（図84参照）。これらのループは、特徴的なIgフォールド(Ig fold)を形成する一連のβシートによって形成されるTCRのコア構造の一部を形成しない。α鎖全体に対するRMS偏差は、A6 TCR（1BD2）とNY-ESO TCRとの可変ドメイン配列の違いのために特に大きい。しかし、A6 TCR及びNY-ESO TCRは同じ可変βドメインを有し、β鎖全体のRMS偏差から、新しいジスルフィド結合を含むTCRにおいてもこの可変ドメインの構造が維持されることがわかる。したがって、これらのデータは、新しいジスルフィド結合を含むTCRの結晶構造においても、TCRのコア構造が維持されることを示している。

20

【0145】

実験例10： 新規ジスルフィド鎖間結合及びC末端β鎖タギング部位を含む可溶性NY-ESO TCRの生成

30

新規ジスルフィド結合が組み込まれた可溶性NY-ESO TCRを生成させるために、実験例4に記載したように、α鎖BamHI及びβ鎖BgIII制限酵素切断部位を含むA6 TCRプラスミドをフレームワークとして使用した。

【0146】

NY-ESO TCRβ鎖構築物を、以下のようにPCRクローニングによって得た。以下に示すプライマー、及びNY-ESO TCR鎖を含むテンプレートを用いてPCR反応を実施した。

【化6】

40

| NdeI |

Fwd5' -GGAGATATACATATGGGTGTCACCTCAGAAC-3'

Rev5' -CCACCGGATCCGTCTGCTCTACCCCAGGC-3'

| BamHI |

【0147】

PCR産物を該当する制限酵素で消化し、ビオチン認識配列を含むpGMT7にクローン化して発現プラスミドを得た。プラスミド挿入断片の配列を、自動DNA配列決定によって確認した。図85aに、ビオチン認識部位が組み込まれたNY-ESO TCRのβ鎖のDNA

50

配列を示す。図 8 5 b に得られたアミノ酸配列を示す。

【 0 1 4 8 】

α 鎖構築物を実験例 5 に記載したように生成させた。実験例 5 に記載したように、それぞれの TCR 鎖が発現され、共にリフォールディングされ、精製された。

【 0 1 4 9 】

非天然ジスルフィド鎖間結合と β 鎖 C 末端のヘキサ - ヒスチジントグとを含む可溶性 NY-ESO TCR を生成させるために、同じプライマー及び NY - E S O テンプレートを上述のように使用した。PCR 産物を該当する制限酵素で消化し、ヘキサ - ヒスチジン配列を含む p G M T 7 にクローン化して発現プラスミドを得た。図 8 6 a に、ヘキサ - ヒスチジントグが組み込まれた NY-ESO TCR の β 鎖の D N A 配列を示す。図 8 6 b に得られたアミノ酸配列を示す。

10

【 0 1 5 0 】

図 8 7 に、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ 陰イオン交換カラムからの、新規ジスルフィド結合及びビオチン認識配列を含む可溶性 NY-ESO TCR の溶出を示す。図 8 8 に、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ 陰イオン交換カラムからの、新規ジスルフィド結合及びヘキサ - ヒスチジントグを含む可溶性 NY-ESO TCR の溶出を示す。

【 0 1 5 1 】

図 8 9 及び 9 0 は、図 8 7 及び 8 8 によって示されたそれぞれ NY - E S O - ビオチン及び NY - E S O - ヘキサ - ヒスチジントグ付き陰イオン交換カラム分析からプールされた画分のゲルろ過クロマトグラフィからのタンパク質溶出プロファイルである。タンパク質は、TCR ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

20

【 0 1 5 2 】

p M H C に対する sTCR の結合の BIAcore 分析を、実験例 3 に記載したように実施した。NY - E S O - ビオチン TCR の K d は 7 . 5 μ M であった。NY - E S O - ヘキサ - ヒスチジントグ付き TCR の K d は 9 . 6 μ M であった。

【 0 1 5 3 】

実験例 1 1 : 新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性 NY-ESO TCR の蛍光標識四量体を用いた細胞染色

TCR 四量体の調製

30

実験例 1 0 のように調製した、新規ジスルフィド結合及びビオチン認識配列を含む NY - E S O 可溶性 TCR を利用して、細胞染色に必要な可溶性 TCR 四量体を形成させた。精製可溶性 TCR 溶液 (約 0 . 2 m g / m L) 2 . 5 m L の緩衝液を、P D - 1 0 カラム (Pharmacia) を用いてビオチン化反応緩衝液 (5 0 m M トリス p H 8 . 0 、 1 0 m M M g C l ₂) に置換した。分子量カットオフが 1 0 k D a である centricon 濃縮装置 (Amicon) を用いて溶出液 (3 . 5 m L) を 1 m L に濃縮した。これに、貯蔵物 (p H 7 . 0 に調整された 0 . 1 g / m L) から A T P を添加して 1 0 m M にした。次いで、多量のプロテアーゼ阻害剤のカクテル (プロテアーゼ阻害剤カクテル S e t 1 、Calbiochem Biochemicals) を、供給された貯蔵溶液の 1 / 1 0 0 の最終プロテアーゼカクテル濃度にするのに十分な量添加し、その後 (0 . 2 M 貯蔵物から添加された) 1 m M ビオチン及び (0 . 5 m g / m L の貯蔵物からの) 2 0 μ g / m L 酵素を添加した。次いで、この混合物を終夜室温でインキュベートした。S 7 5 H R カラムのサイズ排除クロマトグラフィによって、この溶液から過剰のビオチンを除去した。NY-ESO TCR のビオチン化レベルを、以下のように、サイズ排除 H P L C ベースの方法によって決定した。5 0 μ L 一定量のビオチン化 NY-ESO TCR (2 m g / m L) を、ストレプトアビジンで被覆したアガロースビーズ (Sigma) 5 0 μ L と共に 1 時間インキュベートした。次いで、このビーズを遠心沈殿させ、未結合試料 5 0 μ L を、T S K 2 0 0 0 S W カラム (Tosoohaas) に流量 0 . 5 m L / m i n (2 0 0 m M リン酸緩衝液 p H 7 . 0) で 3 0 分間かけた。ビオチン化 NY-ESO TCR の存在を、UV 分光計によって 2 1 4 n m 及び 2 8 0 n m で検出した。ビオチン化 NY - E S O を非ビオチン化 NY-ESO TCR 対照と対比して測定した。非ビオチン化タンパク質のピーク

40

50

面積からビオチン化タンパク質のピーク面積を減算してビオチン化の割合を計算した。

【0154】

ビオチン化可溶性TCRの四量体化を、neutravidin - フィコエリトリン複合体 (Cambridge Biosciences, UK) を用いて行った。ビオチン化可溶性TCRの濃度をクーマシータンパク質アッセイ (Pierce) によって測定し、可溶性TCR 0.8 mg / mg neutravidin - フィコエリトリン複合体の比を、ビオチン化TCRによるneutravidin - PEの飽和を1 : 4の比で達成するように計算した。リン酸緩衝食塩水 (PBS) で希釈した6.15 mg / mL ビオチン化NY - ESO可溶性TCR溶液19.5 μ Lを、氷上の1 mg / mL可溶性neutravidin-PE 150 μ Lに静かに攪拌しながら徐々に添加した。次いで、PBS 100.5 μ Lをこの溶液に添加して最終NY-ESO TCR四量体濃度を1 mg / mLにした。

10

【0155】

染色手順

PBS 0.5 mLで希釈した 0.3×10^6 HLA - A2 陽性EBV形質転換B細胞系 (PP LCL) の4つのアリコート、HLA - A2 NYESOペプチド (SLLMWITQC) の濃度を変えて(0、 10^{-4} 、 10^{-5} 及び 10^{-6} M) 37 で2時間インキュベートした。次いで、これらのPP LCL細胞を、ハンス緩衝食塩水溶液 (HBSS) (Gibco, UK) で2回洗浄した。

【0156】

4つのアリコートの各々を等分し、neutravidin - フィコエリトリンを用いて新たに四量体化したビオチン化NY - ESOジスルフィド連結TCRで染色した。5又は10 μ g フィコエリトリン標識dsTCR複合四量体と共に細胞を氷上で30分間インキュベートし、HBSSで洗浄した。細胞を再度洗浄し、HBSSに再懸濁させ、FACSVantageで分析した。25,000回測定し、WinMIDIソフトウェアを用いてデータを解析した。

20

【0157】

結果

図91a~hに、上述したように調製した試料の各々に対して得られたFACSVantageデータをヒストグラムとして示す。以下の表に、各々の試料に対して観察された陽性染色細胞の割合を列記する。

【表5】

30

試料	陽性染色細胞(%)
0 NY-ESO ペプチド, 5 μ g TCR	0.75
10^{-4} M NY-ESO ペプチド, 5 μ g TCR	84.39
10^{-5} M NY-ESO ペプチド, 5 μ g TCR	35.29
10^{-6} M NY-ESO ペプチド, 5 μ g TCR	7.98
0 NY-ESO ペプチド, 10 μ g TCR	0.94
10^{-4} M NY-ESO ペプチド, 10 μ g TCR	88.51
10^{-5} M NY-ESO ペプチド, 10 μ g TCR	8.25
10^{-6} M NY-ESO ペプチド, 10 μ g TCR	3.45

40

【0158】

これらのデータは、NY-ESO TCR四量体によって標識された細胞の比率が、インキュベートしたペプチド (SLLMWITQC) 濃度に相関して増加することを明示している。したがって、これらのNY-ESO TCR四量体は、HLA - A2 NY - ESO複合体の発現に基づく特異的細胞標識に適した成分である。

50

【 0 1 5 9 】

本実験例では、蛍光性の複合化されたNY-ESO TCR四量体を使用した。しかし、適切な治療成分(therapeutic moiety)でこの標識を置換しても、同様なレベルの細胞結合が期待される。

【 0 1 6 0 】

実験例 1 2 : C β 1 定常領域が組み込まれた、新規ジスルフィド結合を含む可溶性A6 TCRの生成

上記実験例はすべて、C β 2 定常領域が組み込まれた、新規ジスルフィド結合を含む可溶性TCRの生成について説明している。本実験例では、C β 1 定常領域が組み込まれた、可溶性TCRを首尾よく生成可能であることを示す。

10

【 0 1 6 1 】

A6 TCR β 鎖 V - ドメインを C β 1 に P C R ステッチングするためのプライマーの設計

A6 TCR β 鎖 V - ドメインの P C R 構築用に以下のプライマーを設計した。

【 0 1 6 2 】

5' -GGAGATATACATATGAACGCTGGTGTCACT-3'

5' -CCTTGTTTCAGGTCCTCTGTGACCGTGAG-3'

C β 1 の P C R 構築用に以下のプライマーを設計した。

【 0 1 6 3 】

5' -CTCACGGTCACAGAGGACCTGAACAAGG-3'

5' -CCCAAGCTTAGTCTGCTCTACCCCAGGCCTCGGC-3'

20

ベータ V TCR構築物及び C β 1 構築物を標準 P C R 法によって別々に増幅した。これらを、ステッチング P C R によって連結させた。Q I A g e n ミニプレップカラムを用いて製造者の指示に従ってプラスミド D N A を精製し、オックスフォード大学生化学科の配列決定施設における自動配列決定によってその配列を確認した。A 6 + C β 1 の配列を図 9 2 に示す。

【 0 1 6 4 】

その結果、A 6 + C β 1 鎖は、両方の鎖の C ドメインにシステインが導入され、鎖間ジスルフィド結合によって A 6 アルファ TCR と一対になった。

【 0 1 6 5 】

実験例 2 に記載したように、可溶性 TCR が発現され、リフォールディングされた。

30

【 0 1 6 6 】

リフォールディングされた可溶性 TCR の精製 :

透析したリフォールディング体を POROS 50HQ 陰イオン交換カラムに充填し、A k t a 精製装置 (Pharmacia) を用いて 5 0 カラム体積にわたる 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配で、結合したタンパク質を図 9 3 のように溶出させることによって、分解生成物及び不純物から sTCR を分離させた。ピーク画分を 4 で貯蔵し、クーマシー染色 S D S - P A G E (図 9 4) によって分析した後、プールし濃縮した。最後に、H B S - E P 緩衝液 (1 0 m M H E P E S p H 7 . 4、1 5 0 m M N a C l、3 . 5 m M E D T A、0 . 0 5 % ノニデット p 4 0) 中で予め平衡化させた Superdex 2 0 0 H R ゲルろ過カラム (図 9 5) を用いて sTCR を精製しその特徴を調べた。約 5 0 k D a の分子量で溶出したピークをプールし濃縮した後、BIAcore 表面プラズモン共鳴分析によってその特徴を調べた。

40

【 0 1 6 7 】

p M H C に対するジスルフィド連結 A6 TCR の結合の BIAcore 分析を、実験例 3 に記載したように実施した。図 9 6 に、その同族 p M H C に対するジスルフィド連結 A 6 可溶性 TCR の特異的結合の BIAcore 分析結果を示す。

【 0 1 6 8 】

C β 1 定常領域が組み込まれた、新規ジスルフィド結合を含む可溶性 A6 TCR は、その同族 p M H C に対して $2 . 4 2 \pm 0 . 5 5 \mu M$ の K_d を有した。この値は、C β 2 定常領域が組み込まれた、新規ジスルフィド結合を含む可溶性 A6 TCR に対して実験例 3 で決定された K_d の $1 . 8 \mu M$ に極めて近い。

50

【 0 1 6 9 】

実験例 1 3 : β 鎖に「遊離の」システインが組み込まれた、新規ジスルフィド結合を含む可溶性A6 TCRの生成

TCRの β 鎖定常領域には、鎖間又は鎖内ジスルフィド結合形成に関与しないシステイン残基 (TRBC 1 * 0 1 及びTRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 における残基 7 5) が含まれる。上記実験例はすべて、機能性TCRの収率低下をもたらし得る「不適切な」ジスルフィド結合が形成される可能性を回避するために、この「遊離の」システインがアラニンに突然変異した、新規ジスルフィド結合を有する可溶性TCRの生成について述べている。本実験例では、この「遊離の」システインが組み込まれた可溶性TCRを生成させ得ることを示す。

【 0 1 7 0 】

TCR β 鎖のプライマー設計及び突然変異誘発

TCR β 鎖アラニン (TRBC 1 * 0 1 及びTRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 7 5) をシステインに突然変異させるために、以下のプライマーを設計した (突然変異を小文字で示す)。

【 0 1 7 1 】

5' -T GAC TCC AGA TAC tgT CTG AGC AGC CG

5' -CG GCT GCT CAG Aca GTA TCT GGA GTC A

可溶性TCRのPCR突然変異誘発、発現及びリフォールディングを、実験例 2 に記載したように実施した。

【 0 1 7 2 】

リフォールディングされた可溶性TCRの精製：

透析したリフォールディング体をPOROS 50HQ陰イオン交換カラムに充填し、Akt a 精製装置(Pharmacia)を用いて50カラム体積にわたる0 ~ 500 mMのNaCl勾配で、結合したタンパク質を図98のように溶出させることによって、分解生成物及び不純物からsTCRを分離させた。ピーク画分を4 で貯蔵し、クーマシー染色SDS - PAGE (図99)によって分析した後、プールし濃縮した。最後に、HBS - EP緩衝液 (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3.5 mM EDTA、0.05 % ノニデットp 40) 中で予め平衡化させたSuperdex 200 HRゲルろ過カラム (図100) を用いてsTCRを精製しその特徴を調べた。約50 kDaの相対分子量で溶出したピークをプールし濃縮した後、BIAcore表面プラズモン共鳴分析によってその特徴を調べた。

【 0 1 7 3 】

pMHCに対するジスルフィド連結A6 TCRの結合のBIAcore分析を、実験例 3 に記載したように実施した。図101に、その同族pMHCに対するジスルフィド連結A6可溶性TCRの特異的結合のBIAcore分析結果を示す。

【 0 1 7 4 】

β 鎖に「遊離の」システインが組み込まれた新規ジスルフィド結合を含む可溶性A6 TCRは、その同族pMHCに対して $21.39 \pm 3.55 \mu\text{M}$ の K_d を有した。

【 0 1 7 5 】

実験例 1 4 : β 鎖の「遊離の」システインがセリンに突然変異した、新規ジスルフィド結合を含む可溶性A6 TCRの生成

本実験例では、 β 鎖の「遊離の」システイン (TRBC 1 * 0 1 及びTRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 7 5) がセリンに突然変異した、新規ジスルフィド結合を含む可溶性TCRが首尾よく生成可能であることを示す。

【 0 1 7 6 】

TCR β 鎖のプライマー設計及び突然変異誘発

天然システイン (TRBC 1 * 0 1 及びTRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 7 5) を予め置換したTCR β 鎖アラニンをセリンに突然変異させるために、以下のプライマーを設計した (突然変異を小文字で示す)。

【 0 1 7 7 】

5' -T GAC TCC AGA TAC tCT CTG AGC AGC CG

10

20

30

40

50

5' -CG GCT GCT CAG AGA GTA TCT GGA GTC A

可溶性TCRの(図102に示す突然変異ベータ鎖をもたらす)PCR突然変異誘発、発現及びリフォールディングを、実験例2に記載したように実施した。

【0178】

リフォールディングされた可溶性TCRの精製:

透析したリフォールディング体をPOROS 50HQ陰イオン交換カラムに充填し、Akta精製装置(Pharmacia)を用いて50カラム体積にわたる0~500mMのNaCl勾配で、結合したタンパク質を図103に示すように溶出させることによって、分解生成物及び不純物からsTCRを分離させた。ピーク画分を4で貯蔵し、クーマシー染色SDS-PAGE(図104)によって分析した後、プールし濃縮した。最後に、HBS-Ep緩衝液(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、3.5mM EDTA、0.05%ノニデットp40)中で予め平衡化させたSuperdex 200HRゲルろ過カラム(図105)を用いてsTCRを精製しその特徴を調べた。約50kDaの相対分子量で溶出したピークをプールし濃縮した後、BIAcore表面プラズモン共鳴分析によってその特徴を調べた。

10

【0179】

pMHCに対するジスルフィド連結A6 TCRの結合のBIAcore分析を、実験例3に記載したように実施した。図106に、その同族pMHCに対するジスルフィド連結A6可溶性TCRの特異的結合のBIAcore分析結果を示す。

【0180】

20

β鎖の「遊離の」システインがセリンに突然変異した、新規ジスルフィド結合を含む可溶性A6 TCRは、その同族pMHCに対して $2.98 \pm 0.27 \mu\text{M}$ の K_d を有した。この値は、β鎖の「遊離の」システインがアラニンに突然変異した、新規ジスルフィド結合を含む可溶性A6 TCRに対して実験例3で決定された K_d の $1.8 \mu\text{M}$ に極めて近い。

【0181】

実験例15: 新規ジスルフィド結合を含むNY-ENO TCRα鎖及びβ鎖の酵母発現ベクターへのクローニング

NY-ESO TCRα鎖及びβ鎖を、*Saccharomyces cerevisiae*由来のプレプロα接合因子配列のC末端に融合させ、それぞれ酵母発現ベクターpYX122及びpYX112にクローン化した(図107及び108参照)。

30

【0182】

*S.cerevisiae*菌株SEY6210(Robinson等(1991)、Mol Cell Biol.11(12):5813~24)由来のプレプロα接合因子配列をPCR増幅してTCRα鎖に融合させるために、以下のプライマーを設計した。

【0183】

5' -TCT GAA TTC ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT AC-3'

5' -TCA CCT CCT GGG CTT CAG CCT CTC TTT TAT C-3'

*S.cerevisiae*菌株SEY6210由来のプレプロα接合因子配列をPCR増幅してTCRβ鎖に融合させるために、以下のプライマーを設計した。

【0184】

40

5' -TCT GAA TTC ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT AC-3'

5' -GTG TCT CGA GTT AGT CTG CTC TAC CCC AGG C-3'

*S.cerevisiae*菌株SEY6210のコロニーを0.25%SDS水溶液30μLに再懸濁し、90で3分間加熱して、酵母DNAを調製した。TCRα鎖及びβ鎖に融合させるためのプレプロα接合因子配列を、それぞれ上述のプライマー対を用いて以下のPCR条件で酵母DNA0.25μLをPCR増幅することによって生成させた。各プライマー12.5pモルを、200μM dNTP、10xPfu緩衝液5μL及びPfuポリメラーゼ(Stratagene)1.25単位と最終体積50μL中で混合した。9230秒の初期変性ステップの後、反応混合物をHybaid PCR発現PCR装置によって30ラウンドの変性(92、30秒)、アニーリング(46.9、60秒)及び伸長(72、

50

2分)に供した。

【0185】

上述のブレプロα接合因子配列に融合させるTCRα鎖をPCR増幅するために、以下のプライマーを設計した。

【0186】

5'-GGC TGA AGC CCA GGA GGT GAC ACA GAT TCC-3'

5'-CTC CTC TCG AGT TAG GAA CTT TCT GGG CTG GG-3'

上述のブレプロα接合因子配列に融合させるTCRβ鎖をPCR増幅するために、以下のプライマーを設計した。

【0187】

5'-GGC TGA AGC CGG CGT CAC TCA GAC CCC AAA AT-3'

5'-GTG TCT CGA GTT AGT CTG CTC TAC CCC AGG C-3'

TCRα鎖及びβ鎖を増幅するためのPCR条件は、以下の変更点以外上述したのと同じであった。すなわち、TCRα鎖及びβ鎖を増幅するために使用したDNAテンプレートは、それぞれ(実験例5において調製した)NY-ESO TCRα鎖及びβ鎖であり、使用したアニーリング温度は60.1であった。

【0188】

次いで、初期PCR産物に導入した相補的重複配列を利用したPCRステッチング反応にPCR産物を用いて、完全長キメラ遺伝子を作製した。得られたPCR産物を制限酵素EcoRI及びXhoIで消化し、同じ酵素で消化したpYX122又はpYX112にクローン化した。得られたプラスミドをQiagen(商標)ミニプレップカラムを用いて製造者の指示に従って精製し、その配列を、Genetics Ltd、Queensway、New Milton、Hampshire、United Kingdomの配列決定施設における自動配列決定によって確認した。図109及び110に、クローン化されたキメラ産物のDNA配列及びタンパク質配列を示す。

【0189】

実験例16：新規ジスルフィド結合を含む可溶性NY-ESO TCRの酵母中での発現

それぞれ実験例15に記載したように生成されたTCRα鎖及びβ鎖を含む酵母発現プラスミドを、Agatep等(1998)(Technical Tips Online(<http://tto.trends.com>)1:51:P01525)によるプロトコルを用いて、S.cerevisiae菌株SEY6210に同時形質転換した。ヒスチジン及びウラシルを含有する合成ドロップアウト(SD、synthetic dropout)寒天(Qbiogene、Illkirch、France)上で増殖させた単一のコロニーを、ヒスチジン及びウラシルを含有するSD培地10mL中30で終夜培養した。その終夜培養したものを、ヒスチジン及びウラシルを含有する新鮮なSD培地10mL中1:10で継代培養し、30で4時間増殖させた。その培養物を、Heraeus Megafuge 2.0R(Kendro Laboratory Products Ltd、Bishop's Stortford、Hertfordshire、UK)を用いて3800rpmで5分間遠心分離し、上清を回収した。StratClean Resin(Stratagene)5μLを上清と混合し、ブラッドホイール中4で終夜回転させた。StratClean ResinをHeraeus Megafuge 2.0Rを用いて3800rpmで遠心沈殿させ、培地を廃棄した。還元試料緩衝液(2M DTT 50μLを含有するLaemmli試料緩衝液(Biorad)950μL)25μLを樹脂に添加し、その試料を95で5分間加熱し、次いで、氷冷した後、混合物20μLをSDS-PAGEゲルに0.8mA一定/cm²ゲル表面で1時間かけた。ゲル中のタンパク質を、以下の変更点以外下記実験例17に記載したように、Immuno-Blot PVDFメンブレン(Bio-Rad)に移し、TCR抗α鎖抗体でプローブした。1次抗体(TCR抗α鎖)及び2次抗体をそれぞれ1/200及び1/1000に希釈して用いた。図111に、展開したメンブレンの写真を示す。その結果、酵母培養によって培地中に低レベルのTCRが分泌されることが判明した。

【0190】

実験例17：バキュロウイルスにおけるジスルフィドA6 Tax TCRα鎖及びβ鎖発現

クローニング戦略

ジスルフィド A6 Tax TCRの α 鎖及び β 鎖を、pGMT7からpEX172と称するpBlueScript KS2ベースのベクターにクローン化した。このベクターは、DRB1*0101のリーダー配列、様々なペプチドコード配列を挿入するためのAgeI部位、リンカー領域、次いでJunロイシンジッパー配列の前のDR β 鎖をクローン化するMluI及びSalI部位を用いて、昆虫細胞を発現させるための様々なMHCクラスII β 鎖をクローニングするように設計された。pBlueScript IISKS-のKpnI部位とEcoRI部位の間に位置し、pEX172がpBlueScript IISKS-と異なる配列を図112に示す。昆虫細胞においてTCR鎖をクローニングするために、このpEX172がAgeI及びSalIと共に切断されてリンカー領域及びMluI部位が除去され、ペプチド配列が始まる箇所にTCR鎖が入る。TCR配列は、5'末端にBspEI部位(これはAgeI適合付着末端を含んでいた)及び3'末端にSalI部位を含むpGMT7からクローン化された。DR β リーダー配列の除去用切断部位を用意するために、DR β 鎖の最初の3つの残基(GDT)を保存した。Junロイシンジッパー配列が転写されるのを防止するために、SalI部位の前に終止コドン挿入する必要がある。この構築物の概略については、図113を参照されたい。TCR鎖がこのプラスミドに入った後、BamHI断片を切り出し、バキュロウイルスに対して相同組換え部位を有するpACAB3ベクターにサブクローニングした。pACAB3ベクターは、2つの異なるプロモーターを有し、1つはBamHI部位を含み、1つはBg1IIクローニング部位を含む。A6 TCR β 鎖にはBg1II部位があるので、A6 TCR α 鎖がBg1II部位に挿入され、次いで β 鎖がBamHI部位にサブクローニングされる。

【0191】

上記クローニング戦略に従い、以下のプライマーを設計した(ベクターに相同な部分を太文字で示す)。

【0192】

A6 α : F: 5' -gtagtccggagacaccggaCAGAAGGAAGTGGAGCAGAAC

R: 5' -gtaggtcgacTAGGAACCTTCTGGGCTGGG

A6 β : F: 5' -gtagtccggagacaccggaAACGCTGGTGTCACTCAGA

R: 5' -gtaggtcgacTAGTCTGCTCTACCCAGG

PCR、クローニング及びサブクローニング:

ジスルフィド A6 Tax TCR α 鎖又は β 鎖の遺伝子を含む発現プラスミドを、以下のPCR反応においてテンプレートとして使用した。プラスミド100ngを10mM dNTP 1 μ L、10xPfu緩衝液(Stratagene) 5 μ L、Pfuポリメラーゼ(Stratagene) 1.25単位、上記A6 α プライマー50pモルと混合し、最終体積をH₂Oで50 μ Lに調節した。同様の反応混合物を、 β プラスミド及び β プライマー対を用いて β 鎖用に準備した。これらの反応混合物を、Hybaid PCR発現PCR装置を用いて35ラウンドの変性(95℃、60秒)、アニーリング(50℃、60秒)及び伸長(72℃、8分)に供した。次いで、生成物を、BspEI制限酵素10単位を用いて37℃で2時間消化し、SalI(New England Biolabs)10単位でさらに2時間消化した。これらの消化された反応物を、AgeI及びSalIで消化したpEX172に連結し、これらをコンピテントなXL1-Blue細菌に形質転換し、37℃で18時間増殖させた。単一のコロニーを α 及び β 調製物の各々から選択し、TYP+アンピシリン(16g/Lバクトトリプトン、16g/L酵母抽出物、5g/LNaCl、2.5g/LK₂HPO₄、100mg/Lアンピシリン)5mL中で終夜増殖させた。QIAGENミニプレップカラムを用いて製造者の指示に従ってプラスミドDNAを精製し、Genetixの配列決定施設における自動配列決定によってその配列を確認した。 α 鎖及び β 鎖それぞれについて、BamHI挿入断片のアミノ酸配列を図114及び115に示す。

【0193】

pEX172におけるこれら α 及び β ジスルフィド A6 Tax TCR鎖構築物を、BamHI制限酵素(New England Biolabs)を用いて37℃で2時間消化して除去した。

α 鎖のBamHI挿入断片を、BglII酵素で消化したpAcAB3ベクター(Pharminngen-BD Biosciences:21216P)に連結した。これをコンピテントなXL1-Blue細菌に形質転換し、37℃で18時間増殖させた。このプレートから単一のコロニーを選択し、TYP+アンピシリン5mL中で終夜増殖させ、プラスミドDNAを先と同様に精製した。次いで、このプラスミドをBamHIで消化し、 β 鎖BamHI挿入断片を連結し、コンピテントなXL1-Blue細菌に形質転換し、終夜増殖させ、TYP-アンピシリンで選択し、増殖させた後、QIAGENミニプレップカラムを用いて先と同様にミニプレップを行った。 α 鎖及び β 鎖両方の正確な配向を、以下の配列決定プライマーを用いて配列を決定することによって確認した。

【0194】

pAcAB3 α 順方向:5'-gaaattatgcatttgaggatg

pAcAB3 β 順方向:5'-attaggcctctagagatccg

昆虫細胞内におけるトランスフェクション、感染、発現及びA6 TCRの分析

BaculoGold形質移入キット(Pharminngen-BD Biosciences:21100K)を用いて製造者の指示に従って、無血清培地(Pharminngen-BD Biosciences:551411)で増殖させたsf9細胞(Pharminngen-BD Biosciences:21300C)に、 α 鎖及び β 鎖を含む発現プラスミドを形質移入した。27℃で5日後、これらの形質移入細胞を増殖させた培地200 μ Lを、無血清培地中の 1×10^6 細胞/mLのHigh Five細胞100mLに添加した。27℃でさらに6日後、この培地1mLを取り出し、Hereus microfugeを用いて13,000RPMで5分間遠心して細胞片をペレット化した。

【0195】

この昆虫A6ジスルフィド連結TCR上清10 μ Lを、正の対照の細菌A6ジスルフィド連結TCR5 μ g及び10 μ gと一緒にプレキャスト4~20%トリス/グリシンゲル(Invitrogen:EC60252)上に流した。還元試料緩衝液(950 μ LのLaemmli試料緩衝液(Bio-Rad:161-0737)50 μ Lの2M DTT)10 μ Lを添加し、95℃で5分間加熱し、室温で10分間冷却し、次いで20 μ Lを充填することによって還元試料を調製した。Laemmli試料緩衝液10 μ Lを添加し、20 μ Lを充填することによって非還元試料を調製した。

【0196】

Novex-Xcellゲルタンク中で1時間このゲルに150ボルトをかけ、その後ゲルを静かに攪拌しながらクーマシーゲル染料50mLで1時間染色した(メタノール500mL中でクーマシー粉1.1gを1時間攪拌し、酢酸100mLを添加し、H₂Oで1リットルとし、1時間攪拌し、次いで0.45 μ mフィルターでろ過する)。脱染剤(destain)(クーマシー粉を除いたクーマシーゲル染料)50mL中でゲルを静かに攪拌しながら30分間3回脱染した。

【0197】

先と同様にSDS-PAGEゲルを操作してウェスタンブロットを実施した。但し、クーマシーでゲルを染色するのではなく、タンパク質をImmuno-Blot PVDFメンブレン(Bio-Rad:162-0174)に移した。6枚のろ紙をゲルのサイズに合わせて切り、転写緩衝液(グリシン2.39g、トリス塩基5.81g、DTT0.77gをH₂O500mLに溶解し、メタノール200mLを添加し、次いでH₂Oで1000mLにした)に浸漬した。PVDFメンブレンを、メタノールに1分間、次いで転写緩衝液に2分間浸漬して調製した。Immuno-Blot装置(Pharmacia-Novablot)のアノード表面に3枚のろ紙を置き、次いでその上にメンブレンを置き、その上にゲルを置き、最後に別の3枚のろ紙をカソード側に置いた。0.8mA一定/cm²ゲル表面で1時間Immuno-blotを用いて分析した。

【0198】

ブロッキング後、ブロッキング緩衝液(トリス緩衝食塩錠剤(Sigma:T5030)4個、脱脂粉乳(Sigma:M7409)3g、Tween 20 30 μ LをH₂Oで30mLに調整)7.5mL中で60分間静かに攪拌しながらメンブレンをブロックした。TBS洗浄緩衝液(TBS

10

20

30

40

50

錠剤 20 個、Tween 20 150 μ L を H_2O で 300 mL に調整) でメンブレンを 3 回 5 分間洗浄した。次いで、ブロッキング緩衝液 7.5 mL で希釈した抗 TCR α 鎖クローン 3A8 (Serotec:MCA987) 又は抗 TCR β 鎖クローン 8A3 (Serotec:MCA988) で 1/50 に希釈した 1 次抗体中で 1 時間静かに攪拌しながらメンブレンをインキュベートした。先と同様にしてメンブレンを TBS 洗浄緩衝液で洗浄した。次に、ブロッキング緩衝液 7.5 mL で 1/1000 に希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス抗体 (Santa Cruz Biotech: Sc-2005) の 2 次抗体インキュベーションを、静かに攪拌しながら 30 分間実施した。先と同様にしてメンブレンを洗浄し、次いで TBS 錠剤 2 個を含む H_2O 30 mL で洗浄した。
【0199】

Opti-4CN 色度検出 (Biorad: 170-8235) (Opt-4CN 希釈剤 1.4 mL、 H_2O 12.6 mL、Opti-4CN 基質 0.28 mL) によって抗体結合を検出した。メンブレンを 30 分間着色し、次いで H_2O で 15 分間洗浄した。メンブレンを室温で乾燥し、走査イメージをクーマシー染色ゲルのイメージと並べた (図 116)。

【0200】

結果

図 116 から、両方のジスルフィド TCR が、SDS ゲル中で安定なヘテロダイマーとして形成されることがわかる。これらは両方とも、還元すると α 鎖と β 鎖に分解する。昆虫ジスルフィド TCR ヘテロダイマーは、おそらく昆虫細胞によるグリコシレーションのために、細菌によって産生されたものよりもやや大きな分子量を有する。この場合、昆虫細胞は α 鎖を過剰に産生し、遊離の α 鎖が抗 α ウェスタンブロットの非還元レーンに見られることが判明した。

【0201】

これらのデータから、上述のパキユロウイルス発現システムが、新規ジスルフィド結合を含む可溶性 TCR の原核生物発現に対して、実行可能な代替システムとなることが明確に示された。

【図面の簡単な説明】

【0202】

【図 1】図 1 は、本発明によって導入された鎖間ジスルフィド結合を有する可溶性 TCR の概略図である。

【図 2】図 2 a 及び 2 b は、システインコドンを導入するように突然変異した可溶性 A6 TCR のそれぞれ α 鎖及び β 鎖の核酸配列である。陰影付きの部分は、導入したシステインコドンである。

【図 3】図 3 a は、新規ジスルフィド鎖間結合を生成させるために使用した $T_{48} \rightarrow C$ 突然変異 (下線部) を含めた A6 TCR α 鎖細胞外アミノ酸配列である。図 3 b は、新規ジスルフィド鎖間結合を生成させるために使用した $S_{57} \rightarrow C$ 突然変異 (下線部) を含めた A6 TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列である。

【図 4】図 4 は、点線で示した 0 ~ 500 mM の NaCl 勾配を用いた POROS 50HQ カラムからのタンパク質溶出を示す、可溶性 A6 TCR の陰イオン交換クロマトグラフィによって得られたトレースである。

【図 5】図 5 - A . 図 4 に示したカラム分析画分の還元 SDS - PAGE (クーマシー染色) を示す図である。B . 図 4 に示したカラム分析画分の非還元 SDS - PAGE (クーマシー染色) を示す図である。ピーク 1 はジスルフィドによって連結されていない β 鎖を主として含んでいることが明らかであり、ピーク 2 は鎖間ジスルフィドによって連結された TCR ヘテロダイマーを含み、ショルダーは鎖間ジスルフィド連結 sTCR に混入した E . coli 汚染物質によるものであり、この複製では見え難い。

【図 6】図 6 は、図 5 のピーク 1 からプールされた画分のサイズ排除クロマトグラフィによって得られたトレースである。このタンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

【図 7】図 7 は、HLA - A2 - tax 複合体に対するジスルフィド連結 A6 可溶性 TCR の特異的結合の BIAcore 応答曲線である。挿入グラフは、ジスルフィド連結 A6 可溶性 TCR

10

20

30

40

50

の単回投与の対照と比較した結合応答である。

【図 8】図 8 a は、突然変異して B a m H I 制限酵素切断部位が組み込まれた新規システイン残基を含む A6 TCR α 鎖配列である。陰影付きの部分は、導入されて B a m H I 制限酵素切断部位を形成した突然変異を示す。図 8 b 及び 8 c は、突然変異して追加のシステイン残基を含み非天然(non-native)ジスルフィド結合を形成する J M 2 2 TCR の α 鎖及び β 鎖の D N A 配列である。

【図 9】図 9 a 及び 9 b は、それぞれ図 8 a 及び 8 b の D N A 配列から産生される J M 2 2 TCR α 鎖及び β 鎖の細胞外アミノ酸配列である。

【図 10】図 10 は、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ カラムからのタンパク質溶出を示す、可溶性ジスルフィド連結 J M 2 2 TCR の陰イオン交換クロマトグラフィによって得られたトレースである。

10

【図 11】図 11 a は、図 10 に示すカラム分析画分の還元 S D S - P A G E (クーマシー染色)を示す図である。図 11 b は、図 10 に示すカラム分析画分の非還元 S D S - P A G E (クーマシー染色)を示す図である。ピーク 1 が鎖間ジスルフィド連結された TCR ヘテロダイマーを含んでいるのは明らかである。

【図 12】図 12 は、図 10 のピーク 1 からプールされた画分のサイズ排除クロマトグラフィによって得られたトレースである。このタンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。収率は 8 0 % である。

【図 13】図 13 - A . H L A - F l u 複合物に対するジスルフィド連結 J M 2 2 可溶性 TCR の特異的結合の B I A c o r e 応答曲線である。B . ジスルフィド連結 J M 2 2 可溶性 TCR の単回投与の対照と比較した結合応答である。

20

【図 14】図 14 a 及び 14 b は、突然変異して追加のシステイン残基を含み非天然ジスルフィド結合を形成した N Y - E S O の α 鎖及び β 鎖の D N A 配列である。

【図 15】図 15 a 及び 15 b は、それぞれ図 14 a 及び 14 b の D N A 配列から産生された N Y - E S O TCR α 鎖及び β 鎖の細胞外アミノ酸配列である。

【図 16】図 16 は、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ カラムからのタンパク質溶出を示す、可溶性 N Y - E S O ジスルフィド連結 TCR の陰イオン交換クロマトグラフィによって得られたトレースである。

【図 17】図 17 - A . 図 16 に示したカラム分析画分の還元 S D S - P A G E (クーマシー染色)を示す図である。B . 図 16 に示したカラム分析画分の非還元 S D S - P A G E (クーマシー染色)を示す図である。ピーク 1 及び 2 が、鎖間ジスルフィドによって連結された TCR ヘテロダイマーを含んでいることは明らかである。

30

【図 18】図 18 図 17 のピーク 1 (A) 及びピーク 2 (B) からプールされた画分のサイズ排除クロマトグラフィを示すグラフである。このタンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

【図 19】図 19 は、H L A - N Y E S O 複合体に対するジスルフィド連結 N Y - E S O 可溶性 TCR の特異的結合の B I A c o r e 応答曲線である。A . ピーク 1、B . ピーク 2。

【図 20】図 20 a 及び 20 b は、(陰影付きで示された)新規システインコドンを導入するように突然変異した可溶性 N Y - E S O TCR のそれぞれ α 鎖及び β 鎖の D N A 配列である。これらの配列は、(太字のコドンで示された)天然ジスルフィド鎖間結合に関与するシステインを含む。

40

【図 21】図 21 a 及び 21 b は、それぞれ図 20 a 及び 21 b の D N A 配列から産生される N Y - E S O TCR α 鎖及び β 鎖の細胞外アミノ酸配列である。

【図 22】図 22 は、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ カラムからのタンパク質溶出を示す、可溶性 N Y - E S O TCR $\alpha^{C Y S} \beta^{C Y S}$ の陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

【図 23】図 23 は、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ カラムからのタンパク質溶出を示す、可溶性 N Y - E S O TCR $\alpha^{C Y S}$ の陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

【図 24】図 24 は、点線で示した 0 ~ 5 0 0 m M の N a C l 勾配を用いた POROS 50HQ カ

50

ラムからのタンパク質溶出を示す、可溶性NY-ESO TCR $\beta^c y^s$ の陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

【図25】図25は、図22～24の陰イオン交換カラム分析からのそれぞれNY-ESO TCR $\alpha^c y^s$ $\beta^c y^s$ 、TCR $\alpha^c y^s$ 、TCR $\beta^c y^s$ 各画分の還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。レーン1及び7はMWマーカーであり、レーン2はNYES0dsTCRIg4 α -cys β ピーク（EB/084/033）であり、レーン3はNYES0dsTCRIg4 α -cys β 小ピーク（EB/084/033）であり、レーン4はNYES0dsTCRIg4 α β -cys（EB/084/034）であり、レーン5はNYES0dsTCRIg4 α -cys β -cys小ピーク（EB/084/035）であり、レーン6はNYES0dsTCRIg4 α -cys β -cysピーク（EB/084/035）である。

【図26】図26は、図22～24それぞれの陰イオン交換カラム分析からのNY-ESO TCR $\alpha^c y^s$ $\beta^c y^s$ 、TCR $\alpha^c y^s$ 、及びTCR $\beta^c y^s$ 各画分の非還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。レーン1及び7はMWマーカーであり、レーン2はNYES0dsTCRIg4 α -cys β ピーク（EB/084/033）であり、レーン3はNYES0dsTCRIg4 α -cys β 小ピーク（EB/084/033）であり、レーン4はNYES0dsTCRIg4 α β -cys（EB/084/034）であり、レーン5はNYES0dsTCRIg4 α -cys β -cys小ピーク（EB/084/035）であり、レーン6はNYES0dsTCRIg4 α -cys β -cysピーク（EB/084/035）である。

【図27】図27は、図22からプールされた画分のタンパク質溶出を示す、可溶性NY-ESO TCR $\alpha^c y^s$ $\beta^c y^s$ のサイズ排除交換クロマトグラフィから得られたトレースである。このタンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

【図28】図28は、図22からプールされた画分のタンパク質溶出を示す、可溶性NY-ESO TCR $\alpha^c y^s$ のサイズ排除交換クロマトグラフィから得られたトレースである。このタンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

【図29】図29は、図22からプールされた画分のタンパク質溶出を示す、可溶性NY-ESO TCR $\beta^c y^s$ のサイズ排除交換クロマトグラフィから得られたトレースである。このタンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

【図30】図30は、HLA-NY-ESO複合体に対するNY-ESO TCR $\alpha^c y^s$ $\beta^c y^s$ の特異的結合のBIAcore応答曲線である。

【図31】図31は、HLA-NY-ESO複合体に対するNY-ESO TCR $\alpha^c y^s$ の特異的結合のBIAcore応答曲線である。

【図32】図32は、HLA-NY-ESO複合体に対するNY-ESO TCR $\beta^c y^s$ の特異的結合のBIAcore応答曲線である。

【図33】図33a及び33bは、（陰影付きで示された）新規システインコドンを導入するように突然変異した可溶性AH-1.23 TCRのそれぞれ α 鎖及び β 鎖のDNA配列である。これらの配列は、（太字のコドンによって示される）天然ジスルフィド鎖間結合に關与するシステインを含む。

【図34】図34a及び34bは、図33a及び33bの各DNA配列から産生されるAH-1.23 TCR α 鎖及び β 鎖の細胞外アミノ酸配列である。

【図35】図35は、点線で示した0～500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50HQカラムからのタンパク質溶出を示す、可溶性AH-1.23 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

【図36】図36は、図35における陰イオン交換カラム分析のAH-1.23 TCR画分の還元SDS-PAGE（10%Bis-Trisゲル、クーマシー染色）を示す図である。試験したタンパク質は、リフォールディング体3からのTCR 1.23 S-Sの陰イオン交換画分である。レーン1はMWマーカーであり、レーン2はB4であり、レーン3はC2であり、レーン4はC3であり、レーン5はC4であり、レーン6はC5であり、レーン7はC6であり、レーン8はC7であり、レーン9はC8であり、レーン10はC9である。

【図37】図37は、図35における陰イオン交換カラム分析のAH-1.23 TCR画分の非還元SDS-PAGE（10%Bis-Trisゲル、クーマシー染色）を示す図である。試験したタンパク質は、リフォールディング体3からのTCR 1.23 S-S

10

20

30

40

50

の陰イオン交換画分である。レーン 1 は MW マーカーであり、レーン 2 は B 4 であり、レーン 3 は C 2 であり、レーン 4 は C 3 であり、レーン 5 は C 4 であり、レーン 6 は C 5 であり、レーン 7 は C 6 であり、レーン 8 は C 7 であり、レーン 9 は C 8 であり、レーン 10 は C 9 である。

【図 3 8】図 3 8 は、図 3 5 からプールされた画分のタンパク質溶出を示す、可溶性 A H - 1 . 2 3 TCR のサイズ排除交換クロマトグラフィから得られたトレースである。このタンパク質は、ヘテロダイマーに対応する単一の主ピークとして溶出する。

【図 3 9】図 3 9 a 及び 3 9 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 中の残基 4 8 に新規システインを導入するように突然変異した可溶性 A6 TCR の α 鎖のそれぞれ D N A 配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線の

10

アミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図 4 1】図 4 1 a 及び 4 1 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 中の残基 6 1 に新規システインを導入するように突然変異した可溶性 A6 TCR の α 鎖のそれぞれ D N A 配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線の

アミノ酸は導入されたシステインを示す。

20

【図 4 2】図 4 2 a 及び 4 2 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 中の残基 5 0 に新規システインを導入するように突然変異した可溶性 A6 TCR の α 鎖のそれぞれ D N A 配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線の

アミノ酸は導入されたシステインを示す。

30

【図 4 3】図 4 3 a 及び 4 3 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 中の残基 1 0 に新規システインを導入するように突然変異した可溶性 A6 TCR の α 鎖のそれぞれ D N A 配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線の

アミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図 4 4】図 4 4 a 及び 4 4 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 中の残基 1 5 に新規システインを導入するように突然変異した可溶性 A6 TCR の α 鎖のそれぞれ D N A 配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、陰影付きのアミノ酸は導入されたシステインを示す。

40

【図 4 5】図 4 5 a 及び 4 5 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 中の残基 2 2 に新規システインを導入するように突然変異した可溶性 A6 TCR の α 鎖のそれぞれ D N A 配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線の

アミノ酸は導入されたシステインを示す。

50

アミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図50】図50a及び50bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基77に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図51】図51a及び51bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基17に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図52】図52a及び52bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基13に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

10

【図53】図53a及び53bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基59に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図54】図54a及び54bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基79に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

20

【図55】図55a及び55bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基14に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図56】図56a及び56bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基55に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図57】図57a及び57bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基63に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

30

【図58】図58a及び58bは、TRBC2*01のエキソン1中の残基15に新規システインを導入するように突然変異した可溶性A6 TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。陰影付きのヌクレオチドは導入された新規システインコドンを示し、下線のアミノ酸は導入されたシステインを示す。

【図59】図59は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50カラムからのタンパク質溶出を示す、それぞれTRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*01のエキソン1の残基17との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基59との間、TRAC*01のエキソン1の残基52とTRBC2*01のエキソン1の残基55との間、TRAC*01のエキソン1の残基15とTRBC2*01のエキソン1の残基15との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

40

【図60】図60は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50カラムからのタンパク質溶出を示す、それぞれTRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*

50

01のエキソン1の残基17との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基59との間、TRAC*01のエキソン1の残基52とTRBC2*01のエキソン1の残基55との間、TRAC*01のエキソン1の残基15とTRBC2*01のエキソン1の残基15との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

【図61】図61は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50カラムからのタンパク質溶出を示す、それぞれTRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*01のエキソン1の残基17との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基59との間、TRAC*01のエキソン1の残基52とTRBC2*01のエキソン1の残基55との間、TRAC*01のエキソン1の残基15とTRBC2*01のエキソン1の残基15との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

10

【図62】図62は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50カラムからのタンパク質溶出を示す、それぞれTRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*01のエキソン1の残基17との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基59との間、TRAC*01のエキソン1の残基52とTRBC2*01のエキソン1の残基55との間、TRAC*01のエキソン1の残基15とTRBC2*01のエキソン1の残基15との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

20

【図63】図63は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50カラムからのタンパク質溶出を示す、それぞれTRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*01のエキソン1の残基17との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基59との間、TRAC*01のエキソン1の残基52とTRBC2*01のエキソン1の残基55との間、TRAC*01のエキソン1の残基15とTRBC2*01のエキソン1の残基15との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

30

【図64】図64は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50カラムからのタンパク質溶出を示す、それぞれTRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*01のエキソン1の残基17との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基59との間、TRAC*01のエキソン1の残基52とTRBC2*01のエキソン1の残基55との間、TRAC*01のエキソン1の残基15とTRBC2*01のエキソン1の残基15との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィから得られたトレースである。

40

【図65】図65a及び65bは、TRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのそれぞれ還元及び非還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。画分を図59の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図66】図66a及び66bは、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのそれぞれ還元及び非還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。画分を図60の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図67】図67a及び67bは、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*01の

50

エキソン 1 の残基 1 7 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのそれぞれ還元及び非還元 SDS - PAGE (クーマシー染色) を示す図である。画分を図 6 1 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図 6 8】図 6 8 a 及び 6 8 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 9 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのそれぞれ還元及び非還元 SDS - PAGE (クーマシー染色) を示す図である。画分を図 6 2 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図 6 9】図 6 9 a 及び 6 9 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 2 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 5 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのそれぞれ還元及び非還元 SDS - PAGE (クーマシー染色) を示す図である。画分を図 6 3 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

10

【図 7 0】図 7 0 a 及び 7 0 b は、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 5 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのそれぞれ還元及び非還元 SDS - PAGE (クーマシー染色) を示す図である。画分を図 6 4 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図 7 1】図 7 1 は、Superdex 200 HL ゲルろ過カラムからのタンパク質溶出を示す、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 8 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 7 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのサイズ排除クロマトグラフィから得られたトレースである。画分を図 5 9 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図 7 2】図 7 2 は、Superdex 200 HL ゲルろ過カラムからのタンパク質溶出を示す、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 7 7 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのサイズ排除クロマトグラフィから得られたトレースである。画分を図 6 0 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

20

【図 7 3】図 7 3 は、Superdex 200 HL ゲルろ過カラムからのタンパク質溶出を示す、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 0 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 7 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのサイズ排除クロマトグラフィから得られたトレースである。画分を図 6 1 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図 7 4】図 7 4 は、Superdex 200 HL ゲルろ過カラムからのタンパク質溶出を示す、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 9 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのサイズ排除クロマトグラフィから得られたトレースである。画分を図 6 2 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

30

【図 7 5】図 7 5 は、Superdex 200 HL ゲルろ過カラムからのタンパク質溶出を示す、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 2 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 5 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのサイズ排除クロマトグラフィから得られたトレースである。画分を図 6 3 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図 7 6】図 7 6 は、Superdex 200 HL ゲルろ過カラムからのタンパク質溶出を示す、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 5 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRのサイズ排除クロマトグラフィから得られたトレースである。画分を図 6 4 の陰イオン交換カラム分析から収集した。

【図 7 7】図 7 7 は、HLA - A 2 - tax p MHC に対する、それぞれ TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 8 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 7 との間、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 7 7 との間、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 0 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 7 との間、及び TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 9 との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの結合を示すBIAcore応答曲線である。

40

【図 7 8】図 7 8 は、HLA - A 2 - tax p MHC に対する、それぞれ TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 8 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 7 との間、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 7 7 との間、TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 0 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 1 7 との間、及び TRAC * 0 1 のエキソン 1 の残基 4 5 と TRBC 2 * 0 1 のエキソン 1 の残基 5 9 との間の新規ジスルフィド鎖間結合

50

を含む可溶性A6 TCRの結合を示すBIAcore応答曲線である。

【図79】図79は、HLA-A2-tax pMHCに対する、それぞれTRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*01のエキソン1の残基17との間、及びTRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基59との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの結合を示すBIAcore応答曲線である。

【図80】図80は、HLA-A2-tax pMHCに対する、それぞれTRAC*01のエキソン1の残基48とTRBC2*01のエキソン1の残基57との間、TRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基77との間、TRAC*01のエキソン1の残基10とTRBC2*01のエキソン1の残基17との間、及びTRAC*01のエキソン1の残基45とTRBC2*01のエキソン1の残基59との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの結合を示すBIAcore応答曲線である。

【図81】図81は、HLA-A2-tax及びHLA-A2-NY-ESO pMHCに対する、TRAC*01のエキソン1の残基52とTRBC2*01のエキソン1の残基55との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの非特異的結合を示すBIAcoreトレースである。

【図82】図82は、HLA-A2-tax pMHCに対する、TRAC*01のエキソン1の残基15とTRBC2*01のエキソン1の残基15との間の新規ジスルフィド鎖間結合を含む可溶性A6 TCRの結合を示すBIAcore応答曲線である。

【図83】図83aは、1BD2配列を含むモデルの周囲の電子密度地図である（鎖A Thr164、鎖B Ser174）。地図には、1.0、2.0及び3.0σの等高線が記されている。図83bは、2つの位置A164及びB174においてCysで改良（refinement）した後の電子密度地図である。この地図も、図83aと同じσレベルで等高線が記されている。

【図84】図84は、1BD2 TCRの構造を本発明のNY-ESO TCRの構造と、リボン表示及びコイル表示で前記各構造を重ね合わせることによって比較した図である。

【図85】図85a及び85bは、ピオチン認識部位が導入されたNY-ESO TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。ピオチン認識部位を強調して示す。

【図86】図86a及び86bは、ヘキサ-ヒスチジントグを導入したNY-ESO TCRのβ鎖のそれぞれDNA配列及びアミノ酸配列である。ヘキサ-ヒスチジントグを強調して示す。

【図87】図87は、点線で示した0～500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50HQ陰イオン交換カラムからの新規ジスルフィド結合及びピオチン認識配列を含む可溶性NY-ESO TCRの溶出を示すグラフである。

【図88】図88は、点線で示した0～500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50HQ陰イオン交換カラムからの新規ジスルフィド結合及びヘキサ-ヒスチジントグを含む可溶性NY-ESO TCRの溶出を示すグラフである。

【図89】図89は、図87に示したNY-ESO-ピオチンタグ付き陰イオン交換カラム分析からプールされた画分のゲルろ過クロマトグラフィによるタンパク質溶出プロファイルである。

【図90】図90は、図88に示したNY-ESO-ヘキサ-ヒスチジントグ付き陰イオン交換カラム分析からプールされた画分のゲルろ過クロマトグラフィによるタンパク質溶出プロファイルである。

【図91-1】図91a～hは、それぞれ以下の濃度のNY-ESOペプチド及び蛍光NY-ESO TCR四量体と共にインキュベートしたHLA-A2陽性EBV形質転換B細胞系（PPLCL）を25,000回測定して得られた染色強度を示すFACSヒストグラムである。NYESO0 TCR 5μg、NYESO10⁻⁴M TCR 5μg、NYESO10⁻⁵M TCR 5μg、NYESO10⁻⁶M TCR 5μg、NYESO0 TCR 10μg、NYESO10⁻⁴M TCR 10μg、NYESO10⁻⁵M TCR 10μg、NYESO10⁻⁶M

TCR 10 μ g。

【図91-2】図91-1の説明に同じ。

【図91-3】図91-1の説明に同じ。

【図92】図92は、TRBC1*01定常領域が組み込まれたA6 TCRのベータ鎖のDNA配列である。

【図93】図93は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50HQカラムからのタンパク質溶出を示した、TRBC1*01定常領域が組み込まれた可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィのトレースである。

【図94】図94-A. 図93に示したカラム分析画分の還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。B. 図93に示したカラム分析画分の非還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。

10

【図95】図95は、図93のピーク2からプールされた画分のサイズ排除クロマトグラフィを示すグラフである。ピーク1は、鎖間ジスルフィド連結されたTCRヘテロダイマーを含む。

【図96】図96-A. HLA-Flu複合体に対するジスルフィド連結A6可溶性TCRの特異的結合のBIAcore分析結果を示すグラフである。B. ジスルフィド連結A6可溶性TCRの単回投与の対照と比較した結合応答を示すグラフである。

【図97】図97は、「フリーの」システインが組み込まれたA6 TCRの突然変異ベータ鎖の核酸配列である。

【図98】図98は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50HQカラムからのタンパク質溶出を示す、「フリーの」システインが組み込まれた可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィを示すグラフである。

20

【図99】図99-A. 図98に示したカラム分析画分の還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。B. 図98に示したカラム分析画分の非還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。

【図100】図100は、図98のピーク2からプールされた画分のサイズ排除クロマトグラフィを示す図である。ピーク1は、鎖間ジスルフィド連結されたTCRヘテロダイマーを含む。

【図101】図101-A. HLA-Flu複合体に「フリーの」システインが組み込まれたジスルフィド連結A6可溶性TCRの特異的結合のBIAcore分析結果を示すグラフである。B. ジスルフィド連結A6可溶性TCRの単回投与の対照と比較した結合応答を示すグラフである。

30

【図102】図102は、「フリーの」システインが突然変異したセリン残基が組み込まれたA6 TCRの突然変異ベータ鎖の核酸配列である。

【図103】図103は、点線で示した0~500mMのNaCl勾配を用いたPOROS 50HQカラムからのタンパク質溶出を示す、「フリーの」システインが突然変異したセリン残基が組み込まれた可溶性A6 TCRの陰イオン交換クロマトグラフィを示すグラフである。

【図104】図104-A. 図103に示したカラム分析画分の還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。B. 図103に示したカラム分析画分の非還元SDS-PAGE（クーマシー染色）を示す図である。ピーク2が、鎖間ジスルフィド連結されたTCRヘテロダイマーを含んでいることは明らかである。

40

【図105】図105は、図103のピーク2からプールされた画分のサイズ排除クロマトグラフィを示すグラフである。ピーク1は、鎖間ジスルフィド連結されたTCRヘテロダイマーを含む。

【図106】図106-A. 「フリーの」システインが突然変異したセリン残基が組み込まれたジスルフィド連結A6可溶性TCRのHLA-Flu複合体に対する特異的結合のBIAcore分析結果を示すグラフである。B. ジスルフィド連結A6可溶性TCRの単回投与の対照と比較した結合応答を示すグラフである。

【図107-1】図107は、pYX112のヌクレオチド配列である。

【図107-2】図107-1の説明に同じ。

50

【図108-1】図108は、pYX122のヌクレオチド配列である。

【図108-2】図107-1の説明に同じ。

【図109】図109は、TCR α 鎖に融合したプレプロ α 接合因子のDNA配列及びタンパク質配列である。

【図110】図110は、TCR β 鎖に融合したプレプロ α 接合因子のDNA配列及びタンパク質配列である。

【図111】図111は、*S. cerevisiae* 菌株SEY6210において発現される可溶性TCRのウェスタンブロットの写真である。レーンCは、対照として精製可溶性NY-ESO TCR 60 ngを含む。レーン1及び2は、2つの別個のTCR形質転換酵母培養物から収集したタンパク質を含む。

10

【図112】図112は、pEX172プラスミドのKpnI~EcoRI挿入断片の核酸配列である。プラスミドの残部は、pBlueScript II KS-である。

【図113】図113は、バキュロウイルスにクローニングするためのTCR鎖の概略図である。

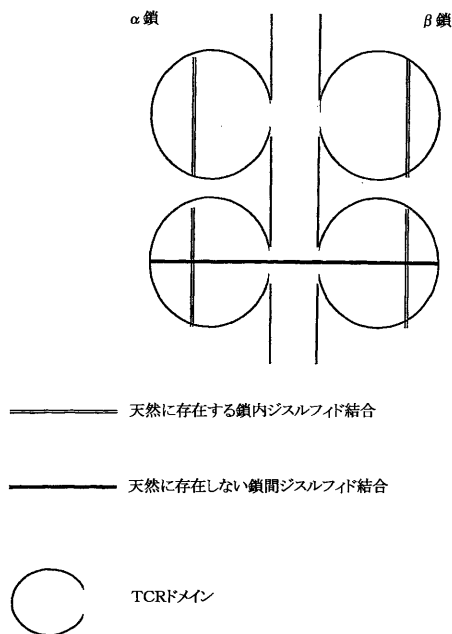
【図114】図114は、pACAB3発現プラスミドに挿入するためのBamHI挿入断片としてのジスルフィドA6 α TCR構築物の核酸配列である。

【図115】図115は、pACAB3発現プラスミドに挿入するためのBamHI挿入断片としてのジスルフィドA6 β TCR構築物を示す図である。

【図116】図116は、細菌によって産生されたジスルフィドA6 TCR及び昆虫ジスルフィドA6 TCRに対するクーマシー染色ゲル及びウェスタンブロットを示す写真である。

20

【図1】



【図2】

Figure 2a

```
atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagagggagccattg
cctctctcaactgcacttacagtgaccgaggttccagtccttctctggtacagaca
atattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggtgacaaagaa
gatggaaggtttacagcagcagctcaataaagccagccagtagtcttctctgctcatca
gagactccagccagtgattcagccacctacctctgtgctgtacaaotgacagctg
ggggaattgcagtttggagcaggaccaggttgggtcaccagatatacagaac
cctgacctgacctgtaccagctgagagactctaataccagtgacaagtctgtctgcc
tattcaccgattttgattctcaaaaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgtgta
tatcacagacaaaagtgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgct
gtggcctggagcaacaatactgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcatta
ttcagaagacaccttcttccagccagccagaagttoctaa
```

Figure 2b

```
atgaacgctgggtgtcactcagaccccaaatccaggtcctgaagacaggacagagca
tgacactgcagtggtccaggtatgaacctgaatacatgtcctgggtatcgacaaga
ccagggcatggggtgaggtgattcattactcagttgggtgtggtatcactgaccaa
ggagaagtcccaatgggtacaaatgtctccagatcaaccaagaggatttccgctca
ggctgctgtcggtgtcctccagacatctgtgtacttctgtgccagcaggccggg
actagcgggagggcagcagcagtagtcttggcggggcaccaggtcagcgtcaca
gaggacctgaaaaacgtgttccacccgaggtcgtgtgtttagccoatcagaagcag
agatctccacacccaaaaggccacactgtgtgctgctggccacaggttctacccga
ccactggagctgagctgggtggaatgggaaggagtgacacagtgagggtcagaca
gaccgcagccctcaaggagcagccgcctcaatgactccagatagctctgagca
gccgctgaggggtctcggccaccttctggcaggaccccgcaaccaattccgctgca
agtccagttctacgggctctcgagaatgacagtgaggaccaggtatgggccaaccc
gtcaccagatcgtcagcgcgaggtcgtgggtagagcagactaa
```

【図 3】

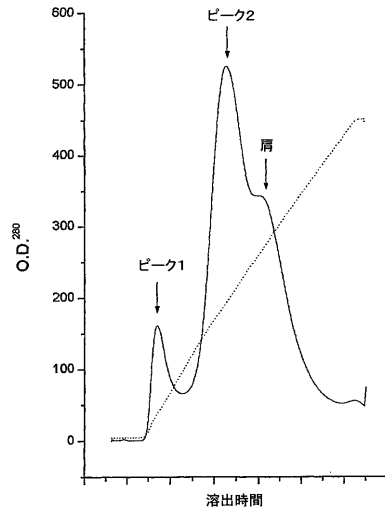
Figure 3a

MQ
K₁EVEQNSGFL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKAQY VSLILRDSQP SDSATYLCAV TTDWGLQF
GAGTQVVVTP DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVSKSDS
DVIITKCVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPDITFPES
PESS*

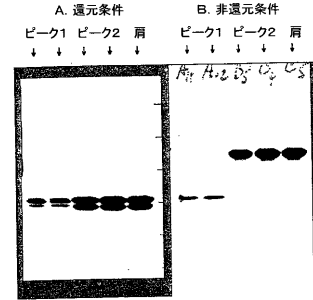
Figure 3b

M
N₁AGVTQTPKF QVLNTOQSMF LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHVS
GAGLTDQSHV PNYGVNRSST TEDFPLRLS AAPQTSVYF CASRGLAGG
RFBQYFGPCT RLIVTDLKN VFPPEVAVFE PSEARISHQ KATLVCLATG
FYFDHVELSW WYNGKEVHSG VCTDPQLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDPRNHR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK PVTQIVSARA WGRAD*

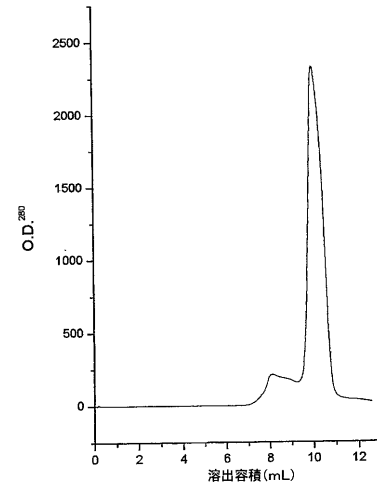
【図 4】



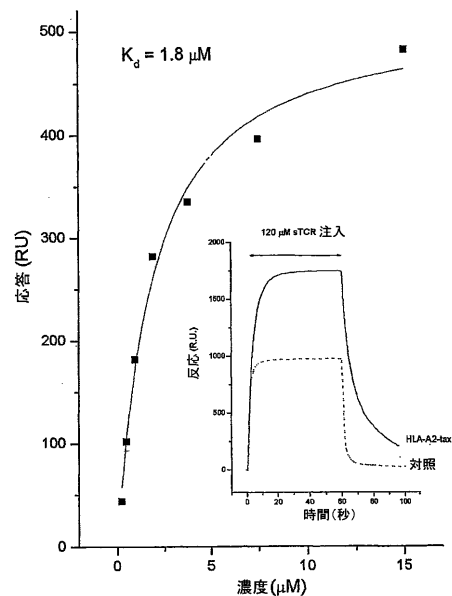
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

Figure 8a

atgcagaaggaagtggagcagaactctggacccctcagtggtccagaggagaccattg
cctctctcaactgcacttcacgtgacccaggttccagtcctctctctggtacagaca
atatctgggaaaagccctgagttgataatgcatataactccaatggtgacaaagaa
gatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtgattgtctctgctcatca
gagactccagccagtgattcagccactacctctgtgctgttacaactgacagctg
ggggaattgacgtttggagcaggggacccaggttgggtcacccagatccagaaac
caggaactgctgctgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgct
tattccagattttgattctcaaaacaaatgtgtcacaaagttaagattctgatgtgta
tatcacagacaaatgtgtgctagacatgaggtctatggactccaagagcaacagtgct
gtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgcttcaacaacagcatta
ttccagaagacacctcttcccagccagaaagtctctaa

Figure 8b

atgcaactactagaacaaagtctcagtttctaagcatccaagaggagaaaaatctca
ctgtgtactgcaactctcagtggtttttccagcttacaatggtacagacaggagcc
tggggaaggtcctgtcctcctggtgacagtgttacgggtgggagagtgaagaagctg
aagagactaacctttcagtttgggtgatgcaagaaggacagttctctccacatcactg
cggccagcctggtgatcacaggcctctacctctgtgcaggagcgggaagccaggaaa
tctcatctttggaaaaggcactaaactctctgttaaaccaaatccagaaacccggat
cctgcctgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgctattca
cagattttgattctcaaaacaaatgtgtcacaaagttaagattctgatgtgtatcac
agacaaatgtgtgctagacatgaggtctatggactccaagagcaacagtgctgtggcc
tggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgcttcaacaacagcattattccag
aagacacctcttcccagccagaaagtctctaa

Figure 8c

atgggtgagtggtggaatcactcagtcacccaaagtacctgttcagaaaggaaggacaga
atgtgacctgagttgtgaacagaatttgaaccagatgcatgtactggtaccgaca
ggaccagggaagggtgagattgatctactactcacagatagtaaatgacttcaag
aaaggagatatagctgaagggtacagcgtctctcgggagaagaaggaatcctttctc
tactgtgacatcggcccaaaagaaacccgacagcttctatctctgtgcccagtgctc
gaggagctcctacagagcactctcgggcccggcaccaggtccaggtcacagaggac
ctgaaaaacgtgttcccaccaggtcgctgtgttggacatcagaagcagagatct
ccacacccaaaggccacactggtgtgctcggccacaggtctctaccccgaccagct
ggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggtgtgacagaccog
cagccctcaaggagcagcccgctcaatgactccagatcacagcctgagcagccg
tgagggtctcggccacctctggcagaaaccccgcaacacactcgcgtgtcaagtcac
gtctacgggtctcgggaagtacagagtggaaccaggtataggccaaacctgtcacc
cagattgtcagcggcagggtgggtgagagacagataa

【図 9】

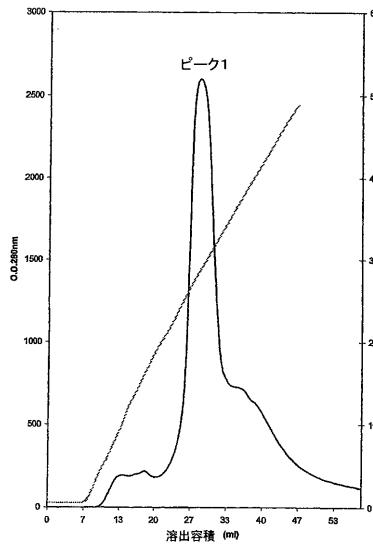
Figure 9a

MQLLEQSPQFLSIQEGENLTVYCNSSSVFSSIQWYRQEP
GGGPVLLVTVVTGGEVKKLRLTFQGDARKDSSLHIT
AAQPGDTGLYLCAAGSGQGNLIFGKGTLSVKPNQNP
DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVY
ITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSI
IPEDTFFSPSPSS 停止

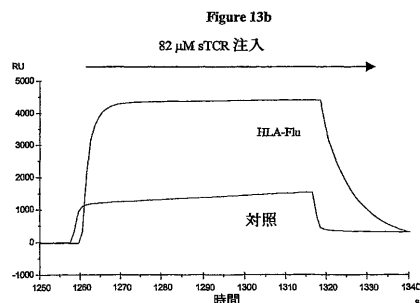
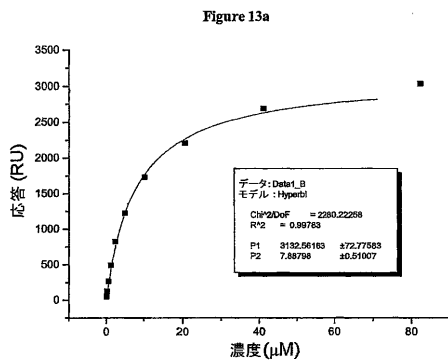
Figure 9b

MVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCQNLNHDAMYWY
RQDPGGGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESF
PLTVTSAQKNPTAFYLCASSSSSYEQYFGPGTRLTVTE
DLKNVFPFVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH
VELSWWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYLSL
RLRSATFWQNPFRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRK
PVTQIVSAEAWGRAD 停止

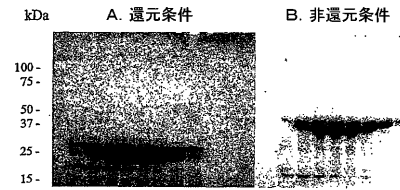
【図 10】



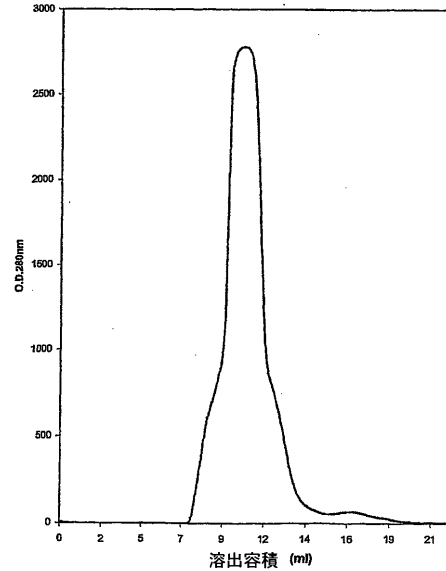
【図 13】



【図 11】



【図 12】



【図 14】

Figure 14a

atgcaggaggygacacagattcctgcagctctgagtggtcccagaaggagaaaacttgg
ttctcaactgcagtttcaactgatagcgtatttcaacccctccagtggtttaggcagga
ccctgggaagggtcacatctctgtgtcttattcagtcagtcagagagagcaaca
agtggagagacttaagtctcgtctgataaatcatcaggacgtagtactttatacattg
cagcttctcagcctgggtgaactcagccacccctcctgtgtgtgagggccacatcagg
aggaagctacatcatttgaagaggaacacagccttattgttcatccgtatctc
cagaacccctgacccctgcctgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagctc
ctgctctatccacgattttgtctcacaacaaatgtgtcacaagtaaggttctga
tgtgtatccacagacaaatgtgtgtcagacatgaggtctatggacttcaagagcaac
agtgctgtggcctggagcaacaaatctgacttgcattgtgcaaacgcttcaacaaca
gcattattccagaagacaccttcttccccagccagaaagtctctaa

Figure 14b

atgggtgtcactcagaccccaaaatccaggtcctgaagacaggacagagatgacac
tgcagtggtgccaggatgatgaacatgaatcagctcctggatcgacaagacccagg
catggggctgaggtgattcattactcagttggtgctggtatcactgaccaaggagaa
gtcccaatgggtacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgctcaggtctg
tgtcggctgctcctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagttacgtcgggaa
caccggggagctgtttttggagaaggctcaggtcagcgtactggaggacctgaaa
aacgtgttcccaccgaggtcgtgtgtttggacatcagaagcagagatctccaca
cccaaaaggccacactggtgtgctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagct
gagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggtggtctgcacagcccgagccc
ctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatcagctctgagcagcccgctgaggg
ctcggccacctctctggcaggaccccgcaacacttccgctgtcaggtccagttcta
cgggtctcggagaatgacagtggtggaacccagataggggcaaacccgctcaccagatc
gtcagcgcagggcctgggttagagcagactaa

【図 15】

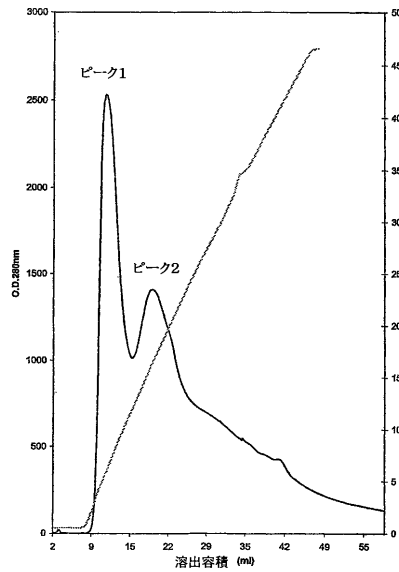
Figure 15a

MQEXTQIPAAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQ
DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSLTYI
AASQPGDSATYLCAVRPTSGGSYIPTFGRTSLIVHPYI
QNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDS
DVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFA CANAF
NNSIIPEDTFFSPSPSS 停止

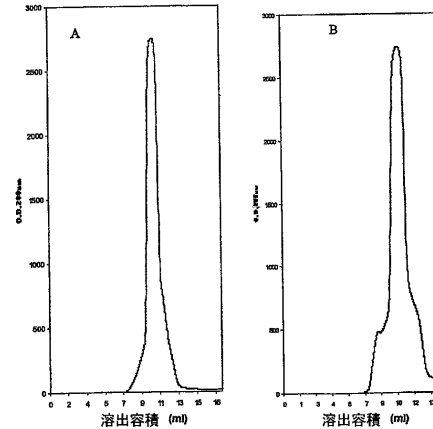
Figure 15b

MGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQ
DPGMetGLRLIHYSVGAGITDQGEVNPNGYNVSRSTTEDE
PLRLLSAAPSQTSVYFCASSYVNGTGELFFGEGSRLTVL
EDLKNVFPFVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD
HVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYAL
SSRLRSATFWQDPNFRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRA
KPVTVQIVSAEAWGRAD 停止

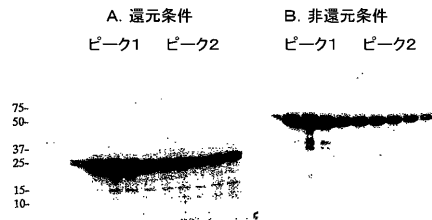
【図 16】



【図 18】



【図 17】



【図 19】

Figure 19a

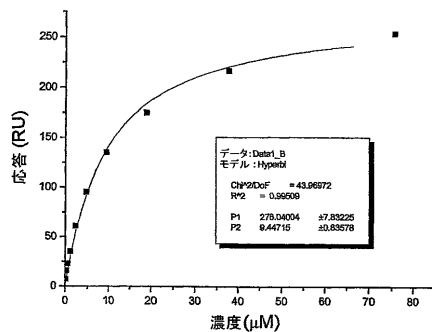
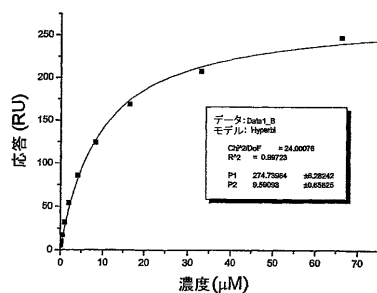


Figure 19b



【図 20】

Figure 20a

atgcaggaggygacacagattcctgcagctctgagtggtcccaagaaggagaaaacttgg
ttctcaactgcagtttctactgatagcgtattttacaacctccagtggtttaggcagga
ccctgggaagggtctcacatctctgttgcttattcagtcagtcagagagagcaaca
agtgggaagacttaatgcctcgctggataaatcatcaggacgtagtactttatcattg
cagcttctcagcctggtgactcagccacctacctctgtgctgtgagggccacatcagg
aggaagctacatacctacatttgggaagggaacacagccttattgttcatcgtatc
cagaacctgacacctgacctgtaccagctgagagactctaaatccagtgacaagtctg
tctgacctatcacgattttgattctcaacaaatgtgtcaaaagtgaagattctga
tgtgtatatacacagacaaaatgctgtgacatgaggtctatggacttcaagagcaac
agtgtgtgctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaa
gcattattccagaagacaccttcttcccgagccagaaaagttcctgttaa

Figure 20b

atgggtgtcactcagacccccaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgacac
tgacgtgtgcccaggatagaaacctgaatacatgtcctggtatcgacaagaccagg
catggggctgaggctgattcattactcagttggctggtatcactgaccaaggagaa
gtcccaatgggtacaaatgtctccagatcaacacagagagatttcccgctcaggtgc
tgtcggtgtctcctccagacatctgtgtacttctgtgcccagcagttacgtcgggaa
caccggggagctgtttttggagaaggctctaggtgacctgactgaggagacctgaaa
aacgtgttccacccgaggtgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctccaca
cccaaaaggccacactggtgtgctggtgcccacaggttctacccgacacgtggagct
gagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggtggtgctgacacagcccgagcc
ctcaaggagcagccgctcctaatgactccagatagcgtctgagcagccgctgagg
tctcgccacattctgagcagcccccgaacacctccgctgtcaagtcagttcta
cgggctctcgggaagtacagagtgagccaggatagggccaaacccgctcaccagatc
gtcagcgccgaggtcgtgggttagagcagactgttaa

【図 21】

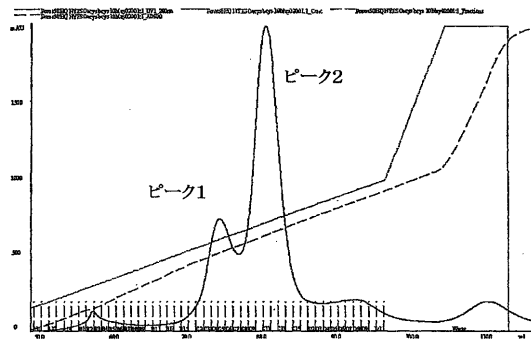
Figure 21a

MQEXTQIPAAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYNLQWFRQ
DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYI
AASQPGDSATYLCARPTSGGSYIPTFGRGTLIVHPYI
QNPDPFVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVQSCKDS
DVVITDKCCLDMRSMDFKSNSSAVAWSNKSDFAANAF
NNSIIPEDTFPSPSSC停止

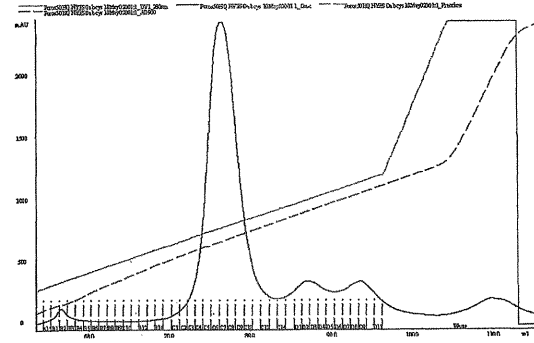
Figure 21b

MGVTQTPKFQVLKGTGQSMTLQCAQDMNHEYSWYRQ
DPGMGLRLIHYSVGAAGITDQGEVPNGYNVSRSTEDFP
LRLLSAAPSQTSVYFCASSYVONTGELFFGEGSRLTVLE
DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH
VBLSSWWVNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALNDSRYALSS
RLRVSATFWQDPKNHFRCCQVQFYGLSENDEWTQDRAK
PVTQVSAEAWGRADC停止

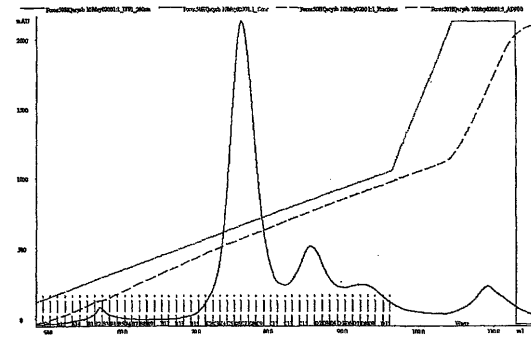
【図 22】



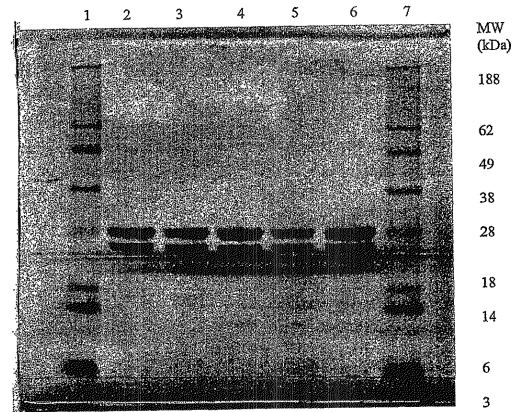
【図 24】



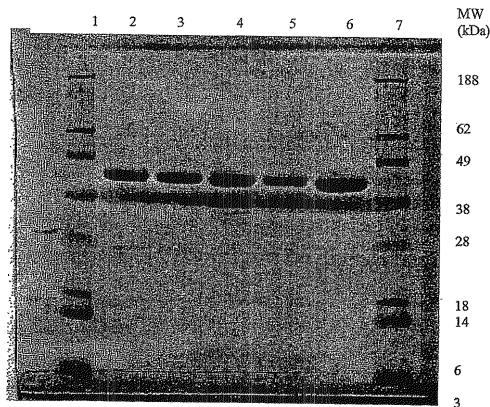
【図 23】



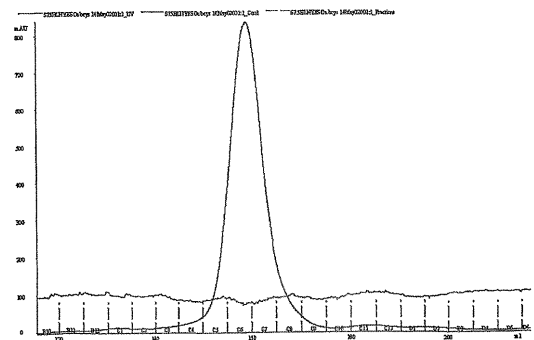
【図 25】



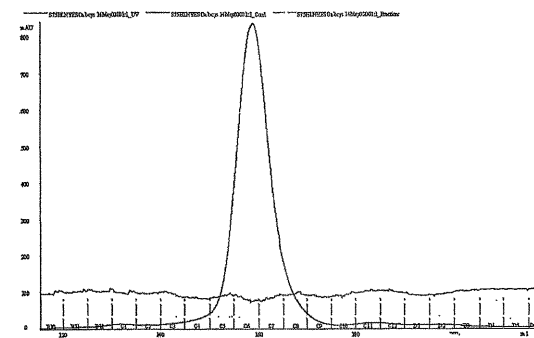
【図 26】



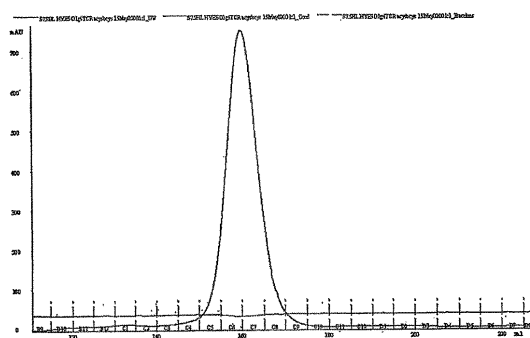
【図 28】



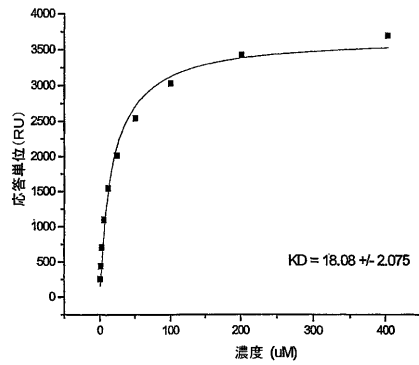
【図 29】



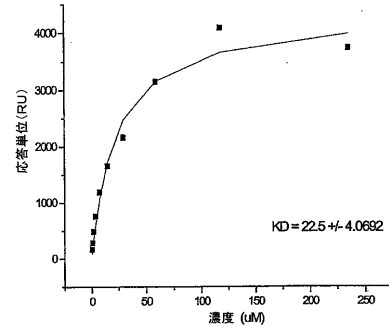
【図 27】



【図 30】



【図 32】



【図 31】

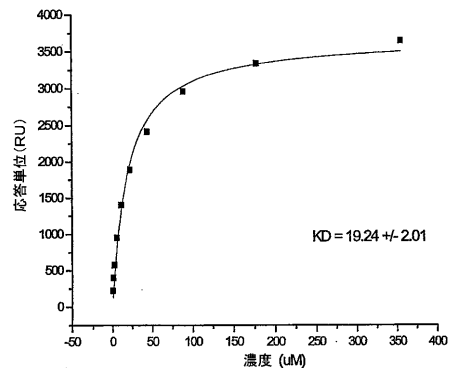


Figure 33a

atgaaggagggtggagcagaattctggacccctcagtggtccagaggggagccattg
cctctcactgacttacagtgacccaggttccagtcctctctctggtacag
acaattctgggaaagccctgagttgataatgttcatatactccaatggtgac
aaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatggtttctc
tgctccatcagaggtccagccaggtattcagccacactcctctgctggtgaa
ggggggtctggggttacagaaagttaaccttggaactggacaagctccaa
gctatcccaaatatccagaacccggatcctgctgttacagctggagagactcta
aatccagtgacaagctctgctgctattcacccgattttgattctcaacaaatgt
gtcacaagtaaggattctgatgtgtatcacagacaaggtgctgtagacatg
aggtctatggactcaagagcaacagtgctgtggtggagcaacaatctgact
ttgcatgtgcaaacgcttcaacaacagcattattccagaagacacctctctcc
cagccagaaagttcctaa

Figure 33b

atgggggtcatgcagacccaagacacctggtcaggagggggacaggaggcaa
gactgagatgcagcccaatgaaggacacagctcatgttactggtatcgccagct
ccagaggaaggtctgaattcatggtttatctccagaagaaatcatcatagat
gagtcaggaaatgccaaaggacgattttctgctgaatttccaaaggaggcccca
gcatcctgaggtccagcaggtatgctgagagattcggcagcttatttctgtgc
cagctcacccacagacagggggacagatagcagctattttggccaggccccgg
ctgacagtgctcgaggacctgaaacagctgttccaccccgaggtcgctgtgttg
agccatcagaagcagagatctccacacccaagggccacactggtgtgctgtgc
cacaggcttctaccccgacacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggag
gtgcacagtgaggtctgagcagcccgagccctcaaggagcagccctca
atgactccagatacgtctgagcagcccgctgaggtctcgccacactctgga
ggaccccgcaaacacttccgtgtcaggtccagttctacgggtctctggagaat
gacagtgagccaggaataggccaacccgtcacccagatcgtcagcggcagg
cctgggttagagcagactaa

【図 34】

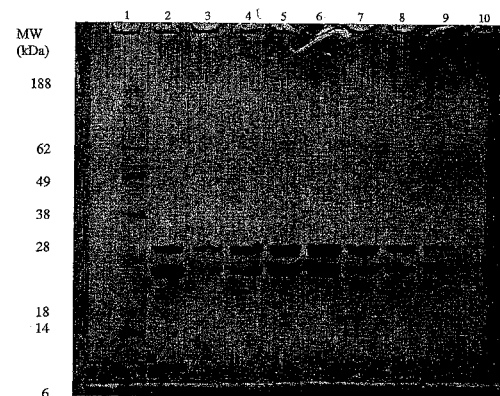
Figure 34a

MKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYS
GKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQP
SDSATYLCVAKGGSGGYQKVTFTGTGLQVIPNIQNPDPA
VYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKC
VLDMRSMDFKSN SAVAWSNDSDFACANAFNNIIPEDTFF
PSFESS 停止

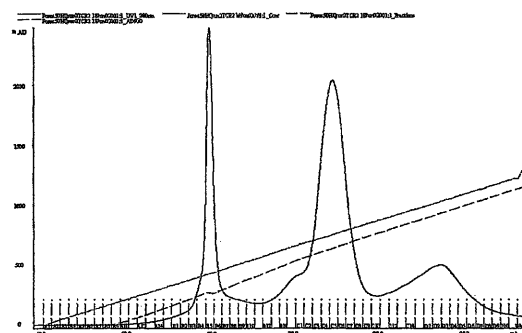
Figure 34b

MGVMQNPRHLVRRRGQEARLRCSMPMKGHSHVYWRQLP
EEGLKFMVYLQKENIIDESGMPKERFSAEPFKEGFSILRIQ
QVVRGDSAAAYFCASSPQTGGTDQYFPGTRTLTVLEDLKN
VFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW
WVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSAT
FWQDPRNHFRQCQVQPYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAE
AWGRAD 停止

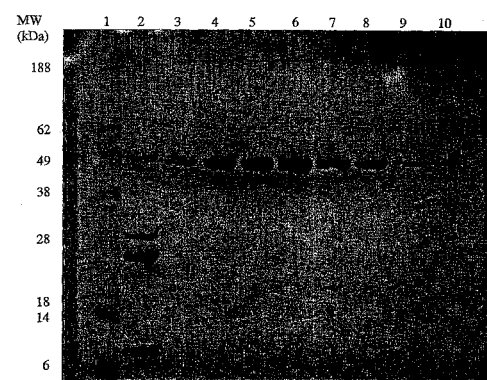
【図 36】



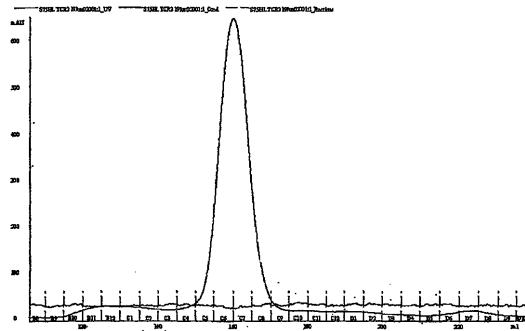
【図 35】



【図 37】



【図 38】



【図 39】

Figure 39a - T48→C α 鎖

atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagccca
ttgcctctctcaactgcaacttacagtgaccgaggttccagtcctctcttggtgta
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagtggagaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatggtt
ctctgctcatcagagactcccagccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagccaggttgggtc
acccagatatccagaacctgacccctgcccgtgtaccagctgagagactctaaat
ccagtgacaagtctgtctgctattcaccgattttgattctcaaaacaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaatgtgtgacatgagg
tctatggactccaagagcaacagctgtgtggcctggagcaacaaatctgactttg
catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacacctcttccccag
ccagaaagttcctaa

Figure 39b - T48→C α 鎖

MQ
K₁EVEQNSGPI SVPEGAIALSL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY SNGDKEDGRF
TAQLNKASQY VLLIIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF GAGTQVVVTF DIQNPDPAVY
QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD
FACANAFNNS IIPEDTFFPS PRESS*

【図 40】

Figure 40a - T45→C α 鎖DNA配列

Atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagccca
ttgcctctctcaactgcaacttacagtgaccgaggttccagtcctctcttggtgta
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagtggagaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatggtt
ctctgctcatcagagactcccagccagtgattcagccacctacctctgtgccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagccaggttgggtc
acccagatatccagaacctgacccctgcccgtgtaccagctgagagactctaaat
ccagtgacaagtctgtctgctattcaccgattttgattctcaaaacaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaatgtgtgacatgagg
tctatggactccaagagcaacagctgtgtggcctggagcaacaaatctgactttg
catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacacctcttccccag
ccagaaagttcctaa

Figure 40b - T45→C α 鎖アミノ酸配列

MQ
K₁EVEQNSGPI SVPEGAIALSL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY SNGDKEDGRF
TAQLNKASQY VLLIIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF GAGTQVVVTF DIQNPDPAVY
QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD
FACANAFNNS IIPEDTFFPS PRESS*

【図 41】

Figure 41a - S61→C α 鎖DNA配列

Atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagccca
ttgcctctctcaactgcaacttacagtgaccgaggttccagtcctctcttggtgta
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagtggagaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatggtt
ctctgctcatcagagactcccagccagtgattcagccacctacctctgtgcccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagccaggttgggtc
acccagatatccagaacctgacccctgcccgtgtaccagctgagagactctaaat
ccagtgacaagtctgtctgctattcaccgattttgattctcaaaacaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaatgtgtgacatgagg
tctatggactccaagagcaacagctgtgtggcctggagcaacaaatctgactttg
catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacacctcttccccag
ccagaaagttcctaa

Figure 41b - S61→C α 鎖アミノ酸配列

MQ
K₁EVEQNSGPI SVPEGAIALSL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF
GAGTQVVVTF DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS
DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PRESS*

【図 42】

Figure 42a - L50→C α 鎖DNA配列

Atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagccca
ttgcctctctcaactgcaacttacagtgaccgaggttccagtcctctcttggtgta
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagtggagaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatggtt
ctctgctcatcagagactcccagccagtgattcagccacctacctctgtgcccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagccaggttgggtc
acccagatatccagaacctgacccctgcccgtgtaccagctgagagactctaaat
ccagtgacaagtctgtctgctattcaccgattttgattctcaaaacaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaatgtgtgacatgagg
tctatggactccaagagcaacagctgtgtggcctggagcaacaaatctgactttg
catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacacctcttccccag
ccagaaagttcctaa

Figure 42b - L50→C α 鎖アミノ酸配列

MQ
K₁EVEQNSGPI SVPEGAIALSL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF
GAGTQVVVTF DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS
DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PRESS*

【図 44】

Figure 44a - S15→C α 鎖

atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagccca
ttgcctctctcaactgcaacttacagtgaccgaggttccagtcctctcttggtgta
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagtggagaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatggtt
ctctgctcatcagagactcccagccagtgattcagccacctacctctgtgcccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagccaggttgggtc
acccagatatccagaacctgacccctgcccgtgtaccagctgagagactctaaat
ccagtgacaagtctgtctgctattcaccgattttgattctcaaaacaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaatgtgtgacatgagg
tctatggactccaagagcaacagctgtgtggcctggagcaacaaatctgactttg
catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacacctcttccccag
ccagaaagttcctaa

Figure 44b - S15→C α 鎖

MQ
K₁EVEQNSGPI SVPEGAIALSL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF
GAGTQVVVTF DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS
DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PRESS*

【図 45】

Figure 45a - L12→C α 鎖

atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagccca
ttgcctctctcaactgcaacttacagtgaccgaggttccagtcctctcttggtgta
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagtggagaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatggtt
ctctgctcatcagagactcccagccagtgattcagccacctacctctgtgcccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagccaggttgggtc
acccagatatccagaacctgacccctgcccgtgtaccagctgagagactctaaat
ccagtgacaagtctgtctgctattcaccgattttgattctcaaaacaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaatgtgtgacatgagg
tctatggactccaagagcaacagctgtgtggcctggagcaacaaatctgactttg
catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacacctcttccccag
ccagaaagttcctaa

Figure 45b - L12→C α 鎖

MQ
K₁EVEQNSGPI SVPEGAIALSL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF
GAGTQVVVTF DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS
DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PRESS*

【図 43】

Figure 43a - Y10→C α 鎖

atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagccca
ttgcctctctcaactgcaacttacagtgaccgaggttccagtcctctcttggtgta
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagtggagaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatggtt
ctctgctcatcagagactcccagccagtgattcagccacctacctctgtgcccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagccaggttgggtc
acccagatatccagaacctgacccctgcccgtgtaccagctgagagactctaaat
ccagtgacaagtctgtctgctattcaccgattttgattctcaaaacaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaatgtgtgacatgagg
tctatggactccaagagcaacagctgtgtggcctggagcaacaaatctgactttg
catgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacacctcttccccag
ccagaaagttcctaa

Figure 43b - Y10→C α 鎖

MQ
K₁EVEQNSGPI SVPEGAIALSL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPELIMSIY
SNGDKEDGRF TAQLNKASQY VLLIIRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLOF
GAGTQVVVTF DIQNPDPAVY QLRDSKSSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS
DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFFPS PRESS*

【図 4 6】

Figure 46a - V22→C α 鎖

atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagagcca
ttgcctctctcaactgcacttacagtgacgaggttccagtcctctcttggtga
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagatggaaggtttacagcagcagctcaataaagccagcagatgttt
ctctgctcatcagagactccagcccgagtgattcagccacctaacctctgtccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagcccaaggttgtggtc
accocagatccagaaacccctgacccgtgacagctgagagactctaact
ccagtgacaagctctgagtcgcatattccagattttgattctcaaaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatcacagacaaaactgtgctagacatgagg
tctatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaactgactttg
catgtgcaaacgcttcaacaacagcattattccagaagacacctcttcccag
ccagaaagttcctaa

Figure 46b - V22→C α 鎖

MQ
K₁EVEQNSGFL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPRLIMSIY
SNGDKEDGRF TAQINKASQY VSLILRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLQF
GAGTQVVVTF DIQNPDPVAV QLRLSKSDK SCLFTDFDS QTNVQSQKDS
DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFPPS PSS*

【図 4 7】

Figure 47a - M52→C α 鎖

atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagagcca
ttgcctctctcaactgcacttacagtgacgaggttccagtcctctcttggtga
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagatggaaggtttacagcagcagctcaataaagccagcagatgttt
ctctgctcatcagagactccagcccgagtgattcagccacctaacctctgtccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagcccaaggttgtggtc
accocagatccagaaacccctgacccgtgacagctgagagactctaact
ccagtgacaagctctgtctgctattccacgattttgattctcaaaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgtatcacagacaaaactgtgctagacacagg
tctatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaactgactttg
catgtgcaaacgcttcaacaacagcattattccagaagacacctcttcccag
ccagaaagttcctaa

Figure 47b - M52→C α 鎖

MQ
K₁EVEQNSGFL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPRLIMSIY
SNGDKEDGRF TAQINKASQY VSLILRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLQF
GAGTQVVVTF DIQNPDPVAV QLRLSKSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS
DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFPPS PSS*

【図 5 0】

Figure 50a - Ser77→C β 鎖

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgccaggatagaacatgaatacatgtcctggtatcg
acaagacccaggcatggggctgaggtgattactactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtcaccaatggctacaatgtctccagatcaacacagagg
atttcccgctcaggtgctgtcggtgctgctccctccagacatctgtgtactctg
tgcacagcaggccgggactagcgggaggggcagacagagcagtaacttcgggcccgggc
accaggtctcaggtcagcagagacctgaaaaacgtgttccaccccgaggtcgctg
gttttgagccatcagaagcagagatctcccaacccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggctctaccoccgacacagtgagctgagctggtggatgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatcagctctcagcagccgctgaggtctcgccacactt
ctggcaggaccccccgaacacacttcgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgagccacaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 50b Ser77→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKIQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDFG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPQTSVYF CASRPLAGG
RPFQYFGPCT RLTVTEDLKN VFPFVAVFE PSERISHTQ KATLVCLATG
FYFDHVELSN WVNKGKVBHG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTDQRAK PVTQIVSARA WGRAD*

【図 5 1】

Figure 51a - Ser17→C β 鎖

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgccaggatagaacatgaatacatgtcctggtatcg
acaagacccaggcatggggctgaggtgattactactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtcaccaatggctacaatgtctccagatcaacacagagg
atttcccgctcaggtgctgtcggtgctcctccacagacatctgtgtactctg
tgcacagcaggccgggactagcgggaggggcagacagagcagtaacttcgggcccgggc
accaggtctcaggtcagcagagacctgaaaaacgtgttccaccccgaggtcgctg
gttttgagccatcagaagcagagatctcccaacccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggctctaccoccgacacagtgagctgagctggtggatgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatcagctctcagcagccgctgaggtctcgccacactt
ctggcaggaccccccgaacacacttcgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgagccacaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 51b Ser17→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKIQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDFG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPQTSVYF CASRPLAGG
RPFQYFGPCT RLTVTEDLKN VFPFVAVFE PSERISHTQ KATLVCLATG
FYFDHVELSN WVNKGKVBHG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTDQRAK PVTQIVSARA WGRAD*

【図 4 8】

Figure 48a - Y43→C α 鎖

atgcagaaggaagtggagcagaactctggaccctcagtggtccagaggagagcca
ttgcctctctcaactgcacttacagtgacgaggttccagtcctctcttggtga
cagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccatatactccaatggt
gacaaagaagatggaaggtttacagcagcagctcaataaagccagcagatgttt
ctctgctcatcagagactccagcccgagtgattcagccacctaacctctgtccgt
tacaactgacagctgggggaaattgcagtttggagcaggagcccgaggttgtggtc
accocagatccagaaacccctgacccgtgacagctgagagactctaact
ccagtgacaagctctgtctgctattccacgattttgattctcaaaaatgtgtc
acaaagtaaggattctgatgtgctcagacagacaaaactgtgctagacatgagg
tctatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaactgactttg
catgtgcaaacgcttcaacaacagcattattccagaagacacctcttcccag
ccagaaagttcctaa

Figure 48b - Y43→C α 鎖

MQ
K₁EVEQNSGFL SVPEGAIASL NCTYSDRGSQ SFFWYRQYSG KSPRLIMSIY
SNGDKEDGRF TAQINKASQY VSLILRDSQP SDSATYLCAV TTDSWGKLQF
GAGTQVVVTF DIQNPDPVAV QLRLSKSDK SVCLFTDFDS QTNVQSQKDS
DVYITDKTVL DMRSMDPKSN SAVAWSNKSD FACANAFNNS IIPEDTFPPS PSS*

【図 4 9】

Figure 49a - Ser57→C β 鎖

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgccaggatagaacatgaatacatgtcctggtatcg
acaagacccaggcatggggctgaggtgattactactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtcaccaatggctacaatgtctccagatcaacacagagg
atttcccgctcaggtgctgtcggtgctgctccctccagacatctgtgtactctg
tgcacagcaggccgggactagcgggaggggcagacagagcagtaacttcgggcccgggc
accaggtctcaggtcagcagagacctgaaaaacgtgttccaccccgaggtcgctg
gttttgagccatcagaagcagagatctcccaacccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggctctaccoccgacacagtgagctgagctggtgggtgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatcagctctcagcagccgctgaggtctcgccacactt
ctggcaggaccccccgaacacacttcgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgagccacaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 49b Ser57→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKIQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDFG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPQTSVYF CASRPLAGG
RPFQYFGPCT RLTVTEDLKN VFPFVAVFE PSERISHTQ KATLVCLATG
FYFDHVELSN WVNKGKVBHG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTDQRAK PVTQIVSARA WGRAD*

【図 5 2】

Figure 52a - Val 13→C β 鎖

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgccaggatagaacatgaatacatgtcctggtatcg
acaagacccaggcatggggctgaggtgattactactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtcaccaatggctacaatgtctccagatcaacacagagg
atttcccgctcaggtgctgtcggtgctgctccctccagacatctgtgtactctg
tgcacagcaggccgggactagcgggaggggcagacagagcagtaacttcgggcccgggc
accaggtctcaggtcagcagagacctgaaaaacgtgttccaccccgaggtcgctg
gttttgagccatcagaagcagagatctcccaacccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggctctaccoccgacacagtgagctgagctggtgggtgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatcagctctcagcagccgctgaggtctcgccacactt
ctggcaggaccccccgaacacacttcgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgagccacaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 52 Val 13→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKIQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDFG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPQTSVYF CASRPLAGG
RPFQYFGPCT RLTVTEDLKN VFPFVAVFE PSERISHTQ KATLVCLATG
FYFDHVELSN WVNKGKVBHG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTDQRAK PVTQIVSARA WGRAD*

【図 5 3】

Figure 53a - Asp 59→C β 鎖

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgccaggatagaacatgaatacatgtcctggtatcg
acaagacccaggcatggggctgaggtgattactactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtcaccaatggctacaatgtctccagatcaacacagagg
atttcccgctcaggtgctgtcggtgctgctccctccagacatctgtgtactctg
tgcacagcaggccgggactagcgggaggggcagacagagcagtaacttcgggcccgggc
accaggtctcaggtcagcagagacctgaaaaacgtgttccaccccgaggtcgctg
gttttgagccatcagaagcagagatctcccaacccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggctctaccoccgacacagtgagctgagctggtgggtgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatcagctctcagcagccgctgaggtctcgccacactt
ctggcaggaccccccgaacacacttcgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgagccacaggatagggccaaacccgtcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 53b Asp 59→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKIQSMT LQCAQDMNHE YMSWYRQDFG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPQTSVYF CASRPLAGG
RPFQYFGPCT RLTVTEDLKN VFPFVAVFE PSERISHTQ KATLVCLATG
FYFDHVELSN WVNKGKVBHG VSTDPOPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTDQRAK PVTQIVSARA WGRAD*

【 図 5 4 】

Figure 54a - Arg 79→C β 鎖

atgaacgctgggtgctcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgcccaggatgatgaacacatgaatcatgctcctggtatcg
acaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
atttcccgctcaggctgctgtcggctgctcctccagacatctgtgactctctg
tgccagcaggccgggactagcgggaggcgacacagagcagtagtctcgggcccggc
accaggctcagcgtcacagaggacgtgaaaaacgtgttccccccaggctcgctg
tggttgagccatcagaagcagagatctccacacccccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatagcgtctgagcagcctgagggtctcggccacctt
ctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgaggaccaggatagggccaaaaccgctcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 54b Arg 79→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKTSQSM LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPSTSVYF CASRPLGAG
RPFQYFGPGT RLTVTDLKN VFPPEVAVF PSEARISHTQ KATLVCLATG
FYPDHVELSW WVNKKEVHSG VSTDQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK FVTQIVSARA WGRAD*

【 図 5 5 】

Figure 55a - Phe 14→C β 鎖

atgaacgctgggtgctcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgcccaggatgatgaacacatgaatcatgctcctggtatcg
acaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
atttcccgctcaggctgctgtcggctgctcctccagacatctgtgactctctg
tgccagcaggccgggactagcgggaggcgacacagagcagtagtctcgggcccggc
accaggctcagcgtcacagaggacgtgaaaaacgtgttccccccaggctcgctg
tggttgagccatcagaagcagagatctccacacccccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatagcgtctgagcagcgcctgagggtctcggccacctt
ctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgaggaccaggatagggccaaaaccgctcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 55b Phe 14→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKTSQSM LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPSTSVYF CASRPLGAG
RPFQYFGPGT RLTVTDLKN VFPPEVAVF PSEARISHTQ KATLVCLATG
FYPDHVELSW WVNKKEVHSG VSTDQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK FVTQIVSARA WGRAD*

【 図 5 8 】

Figure 58a - Glu 15→C β 鎖

atgaacgctgggtgctcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgcccaggatgatgaacacatgaatcatgctcctggtatcg
acaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
atttcccgctcaggctgctgtcggctgctcctccagacatctgtgactctctg
tgccagcaggccgggactagcgggaggcgacacagagcagtagtctcgggcccggc
accaggctcagcgtcacagaggacgtgaaaaacgtgttccccccaggctcgctg
tggttgagccatcagaagcagagatctccacacccccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatagcgtctgagcagcgcctgagggtctcggccacctt
ctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgaggaccaggatagggccaaaaccgctcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 58b Glu 15→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKTSQSM LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPSTSVYF CASRPLGAG
RPFQYFGPGT RLTVTDLKN VFPPEVAVF PSEARISHTQ KATLVCLATG
FYPDHVELSW WVNKKEVHSG VSTDQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK FVTQIVSARA WGRAD*

【 図 5 6 】

Figure 56a - Gly 55→C β 鎖

atgaacgctgggtgctcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgcccaggatgatgaacacatgaatcatgctcctggtatcg
acaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
atttcccgctcaggctgctgtcggctgctcctccagacatctgtgactctctg
tgccagcaggccgggactagcgggaggcgacacagagcagtagtctcgggcccggc
accaggctcagcgtcacagaggacgtgaaaaacgtgttccccccaggctcgctg
tggttgagccatcagaagcagagatctccacacccccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatagcgtctgagcagcgcctgagggtctcggccacctt
ctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgaggaccaggatagggccaaaaccgctcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

Figure 56b Gly 55→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKTSQSM LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPSTSVYF CASRPLGAG
RPFQYFGPGT RLTVTDLKN VFPPEVAVF PSEARISHTQ KATLVCLATG
FYPDHVELSW WVNKKEVHSG VSTDQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK FVTQIVSARA WGRAD*

【 図 5 7 】

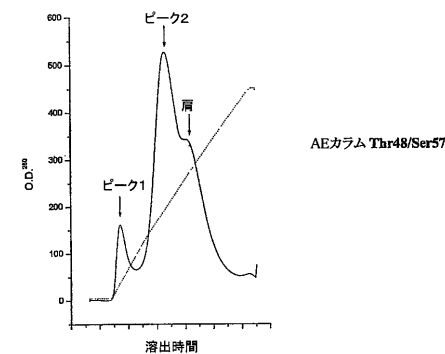
Figure 57a - Leu 63→C β 鎖

atgaacgctgggtgctcactcagacccccaaaattccaggctcctgaagacaggacaga
gcatgacactgcagtggtgcccaggatgatgaacacatgaatcatgctcctggtatcg
acaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatc
actgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagagg
atttcccgctcaggctgctgtcggctgctcctccagacatctgtgactctctg
tgccagcaggccgggactagcgggaggcgacacagagcagtagtctcgggcccggc
accaggctcagcgtcacagaggacgtgaaaaacgtgttccccccaggctcgctg
tggttgagccatcagaagcagagatctccacacccccaaaaggccacactggtgtg
cctggccacaggcttctaccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatggg
aaggaggtgcacagtggggtcagcagacagcccgagccctcaaggagcagcccg
ccctcaatgactccagatagcgtctgagcagcgcctgagggtctcggccacctt
ctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcg
gagaatgacagtgaggaccaggatagggccaaaaccgctcaccagatcgtcagcg
ccgaggcctggggtagagcagactaa

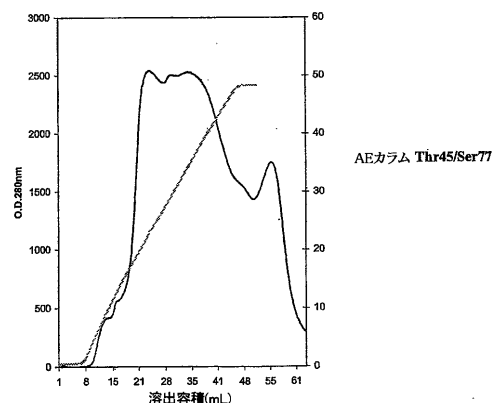
Figure 57b Leu 63→C β 鎖

M
N₁AGVTQTPKF QVLKTSQSM LQCAQDMNHE YMSWYRQDPG MGLRLIHYSV
GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDPFLRLLS AAPSTSVYF CASRPLGAG
RPFQYFGPGT RLTVTDLKN VFPPEVAVF PSEARISHTQ KATLVCLATG
FYPDHVELSW WVNKKEVHSG VSTDQPLKE QPALNDSRYA LSSRLRVSAT
FWQDFRNHFR CQVQFYGLSE NDEWTQDRAK FVTQIVSARA WGRAD*

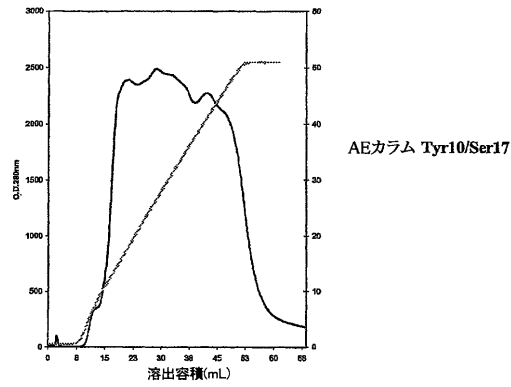
【 図 5 9 】



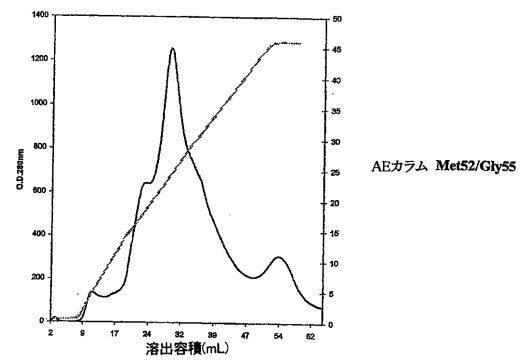
【 図 6 0 】



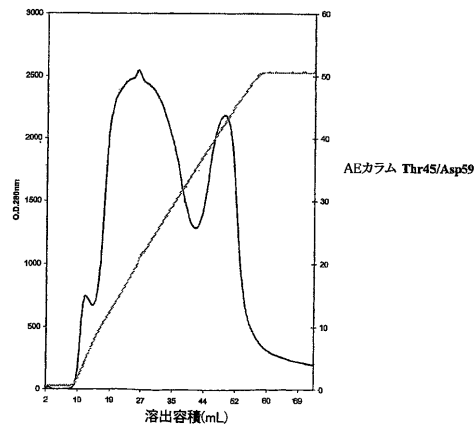
【図 6 1】



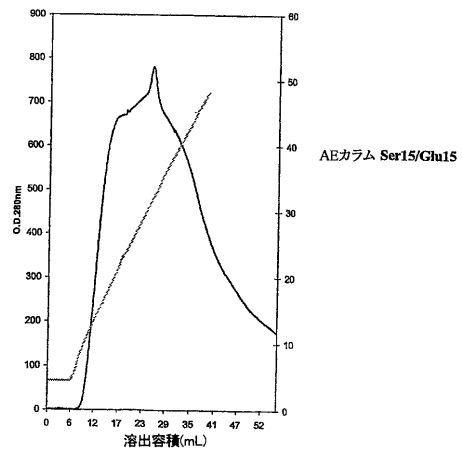
【図 6 3】



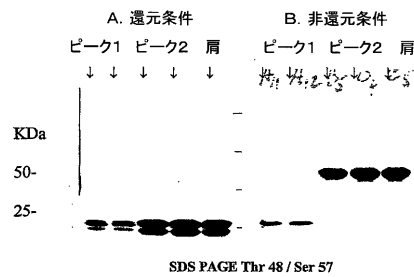
【図 6 2】



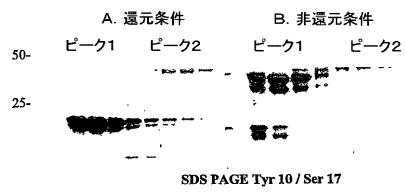
【図 6 4】



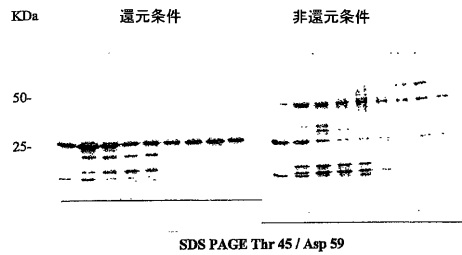
【図 6 5】



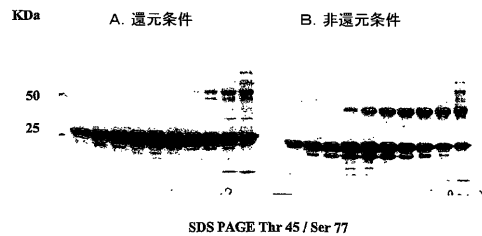
【図 6 7】



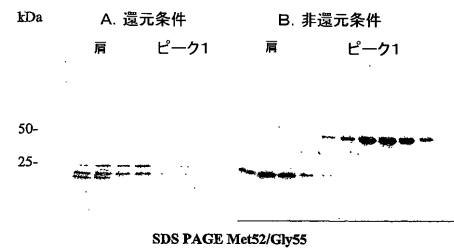
【図 6 8】



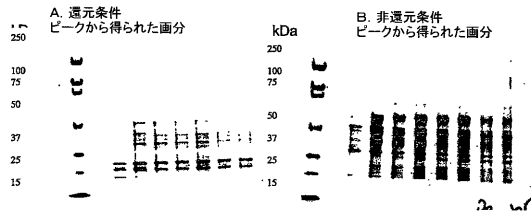
【図 6 6】



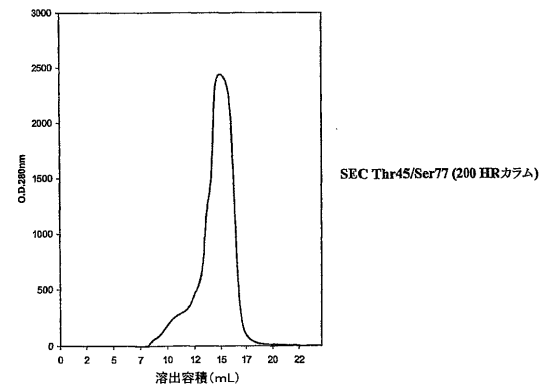
【図 6 9】



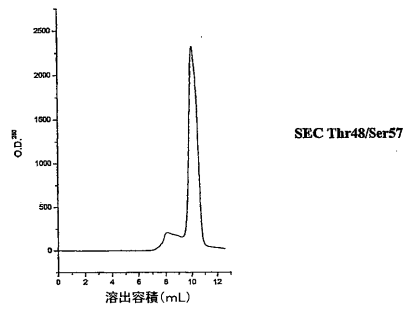
【図 70】



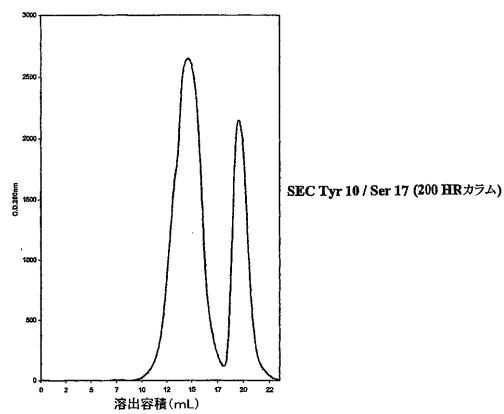
【図 72】



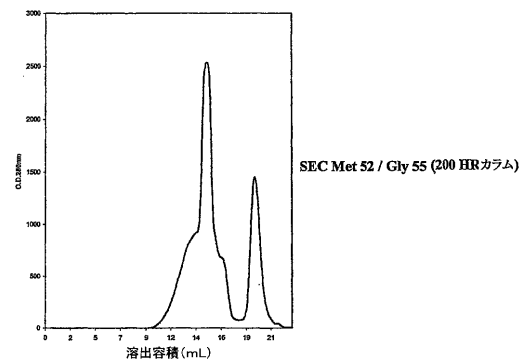
【図 71】



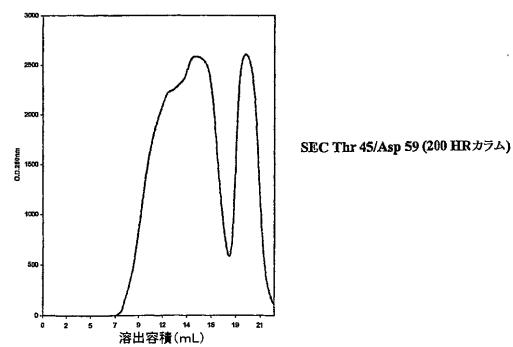
【図 73】



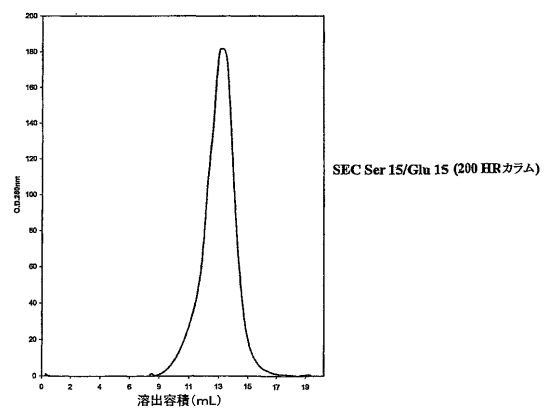
【図 75】



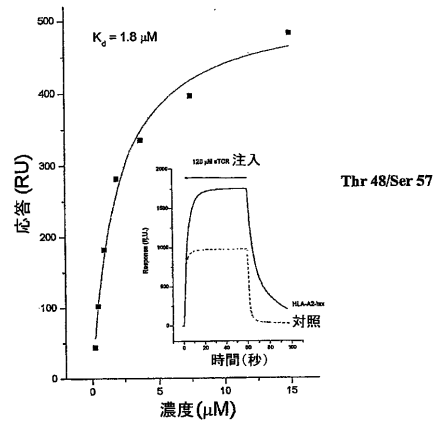
【図 74】



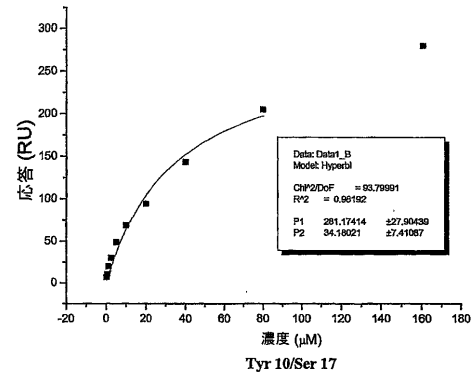
【図 76】



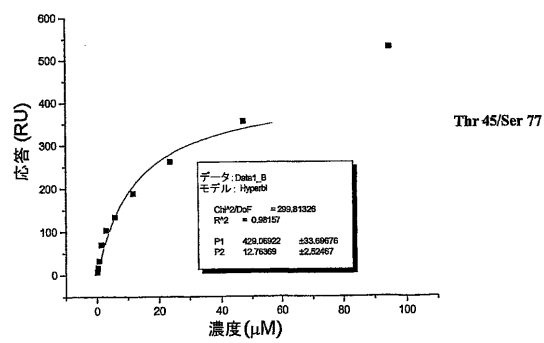
【図 77】



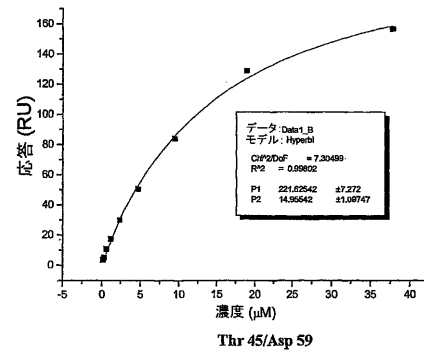
【図 79】



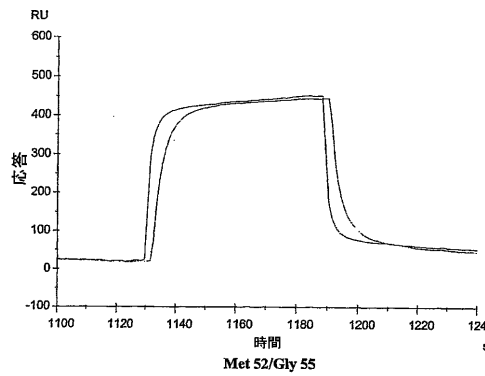
【図 78】



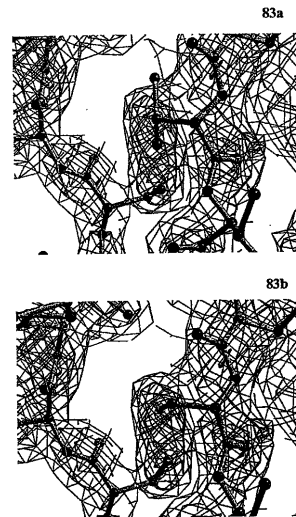
【図 80】



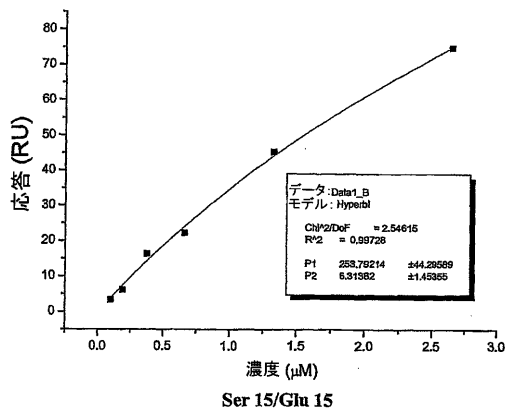
【図 81】



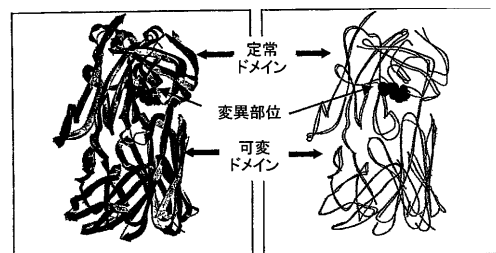
【図 83】



【図 82】



【図 84】



【 8 5 】

Figure 85a

atgggtgtcactcagaccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgaca
 ctgcagtggtgccaggatgatgaacatgaatacatgtcctggatcgacaagaccca
 ggcatggggctgaggctgatcattactcagttggtgctggtatcactgacacagga
 gaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccaagaggatttccogctcagg
 ctgctgtcggtgctcctcccagacatctgtgtacttctgtgacagcagttacgtc
 gggaacacggggagctgttttggagaaggcttaggtgacogtaactggaggac
 ctgaaaaacgtgttcccacccagagtcgtgtgtttagacatcagaagcagagatc
 tcccaccccaaaaggccacactggtgtgctggccacaggttctaccccgaccac
 gtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggagtgacagtggtggtctgcacagac
 cgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatacgtctgagcagc
 cgcctgagggtctcggccacttctggcaggaccccgcaacacttccogtctcaa
 gtccagttctacgggtctcggagaatgacgagtgagccaggtataggccaaaccc
 gtccccagatcgtcagcgcgaggcctgggttagagcagacggatccggtggtggt
 ctgaacgatattttgaagctcagaaaaatcgaatggcattaa

Figure 85b

M G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N H E Y M
 S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E V P N G
 Y N V S R S T E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S
 Y V G N T G E L F F G E G S R L T V L E D L K N V F P P E V A
 V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L
 S W W V N G K E V H S G V C T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y
 A L S S R L R V S A T F W Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E
 N D E W T Q D R A K F V T Q I V S A E A W G R A D G S G G G

【 8 6 】

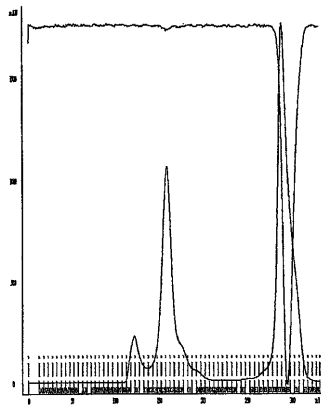
Figure 86a

atgggtgtcactcagaccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgaca
 ctgcagtggtgccaggatgatgaacatgaatacatgtcctggatcgacaagaccca
 ggcatggggctgaggctgatcattactcagttggtgctggtatcactgacacagga
 gaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccaagaggatttccogctcagg
 ctgctgtcggtgctcctcccagacatctgtgtacttctgtgacagcagttacgtc
 gggaacacggggagctgttttggagaaggcttaggtgacogtaactggaggac
 ctgaaaaacgtgttcccacccagagtcgtgtgtttagacatcagaagcagagatc
 tcccaccccaaaaggccacactggtgtgctggccacaggttctaccccgaccac
 gtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggagtgacagtggtggtctgcacagac
 cgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatacgtctgagcagc
 cgcctgagggtctcggccacttctggcaggaccccgcaacacttccogtctcaa
 gtccagttctacgggtctcggagaatgacgagtgagccaggtataggccaaaccc
 gtccccagatcgtcagcgcgaggcctgggttagagcagacggatccggtggtggt
 catcatcaccatcatcattaa

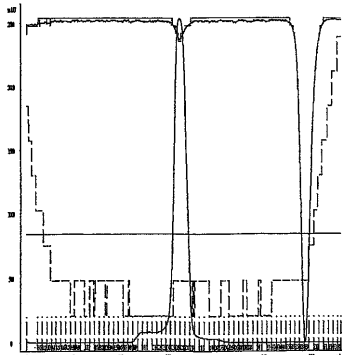
Figure 86b

M G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N H E Y M
 S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q G E V P N G
 Y N V S R S T E D F P L R L L S A A P S Q T S V Y F C A S S
 Y V G N T G E L F F G E G S R L T V L E D L K N V F P P E V A
 V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L
 S W W V N G K E V H S G V C T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y
 A L S S R L R V S A T F W Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E
 N D E W T Q D R A K F V T Q I V S A E A W G R A D G S G G G

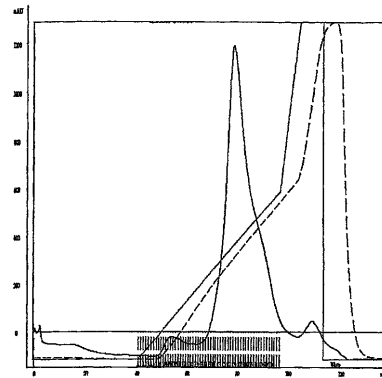
【 8 9 】



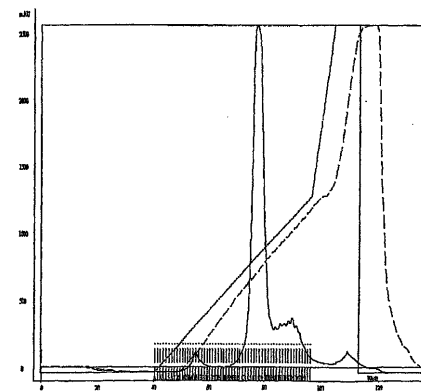
【 9 0 】



【 8 7 】



【 8 8 】



【 9 1 - 1 】

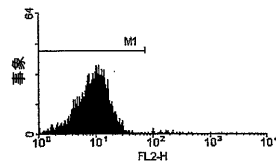
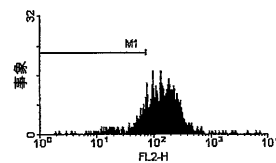
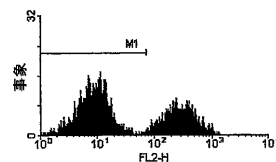
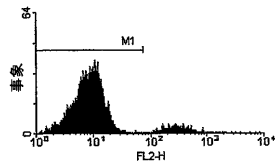
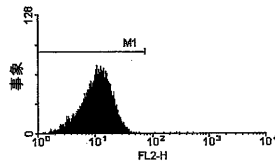
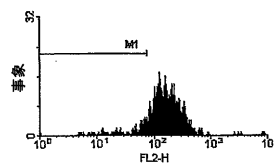


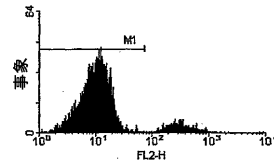
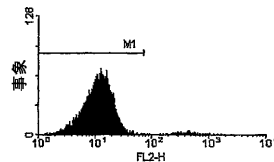
Figure 91a. PP LCL NYESO 0 TCR 5μg

Figure 91b. PP LCL NYESO 10⁻⁴M TCR 5μgFigure 91c. PP LCL NYESO 10⁻⁵M TCR 5μg

【図 9 1 - 2】

Figure 91d. PP LCL NYESO 10^{-6} M TCR $5\mu\text{g}$ Figure 91e. PP LCL NYESO 0 TCR $10\mu\text{g}$ Figure 91f. PP LCL NYESO 10^{-4} M TCR $10\mu\text{g}$

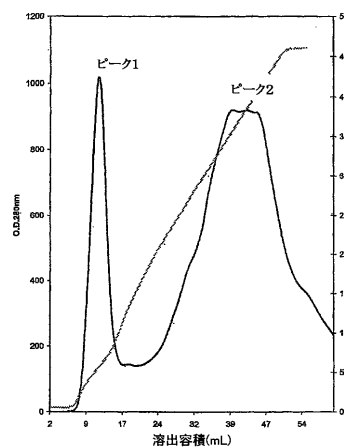
【図 9 1 - 3】

Figure 91g. PP LCL NYESO 10^{-5} M TCR $10\mu\text{g}$ 

【図 9 2】

atgaacgctgggtgtcaactcagaccccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagc
atgacactgcagtggtgccaggatgaaccatgaatacatgtcctggatcgacaa
gacccaggcatgggctgaggctgattcattactcagttgggtgctggatcactgac
caaggagaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttccg
ctcaggctgtgtcggtgtgtccctccagacatctgtgtacttctgtgccagcagg
ccgggactagcgggaggcgaccagagcagtaactcgggcccgggcccaggctcag
gtcacagaggacctgaacaagggttccaccccgaggtcgctgtgtttgagccatca
gaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtgtcctggccacaggcttc
tccccgacccagtgagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
gtctgcacagaccccgagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatac
tctctgagcagccgctgagggtctcggccactctctggcaggaccccgcaaccac
ttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaaccaggat
agggccaaaccogtcacccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagactaa

【図 9 3】

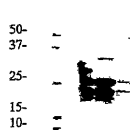


【図 9 4】

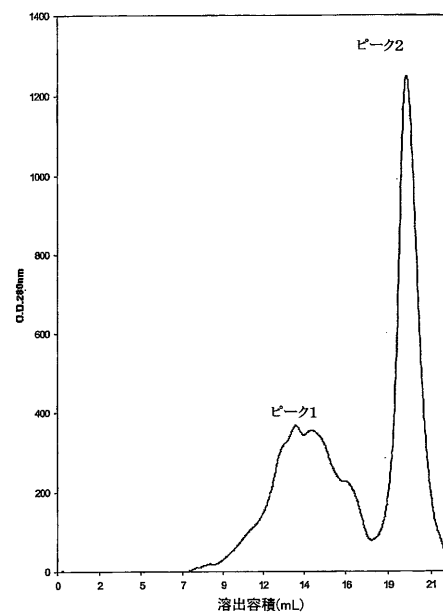
A. 還元条件
kDa ピーク1 ピーク2



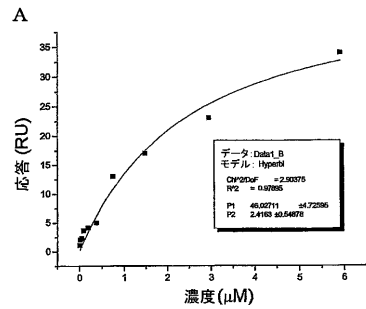
B. 非還元条件
kDa ピーク1 ピーク2



【図 9 5】



【図 96】



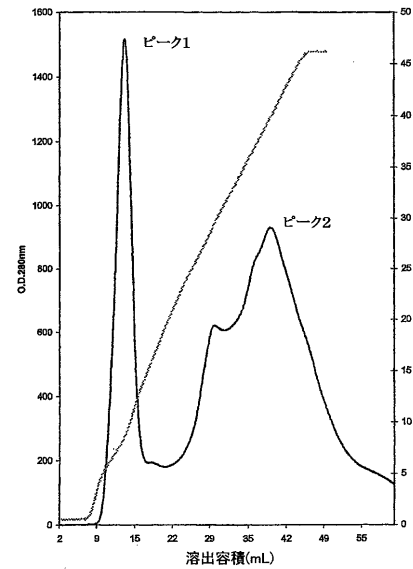
【図 97】

```

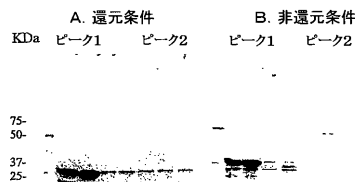
atgaacgctgggtgctcactcagaccccaaaattccaggctcctgaagacaggacagagc
atgacactgcagtggtgcccaggatgatgaacatgaatacatgtcctgggtatcgacaa
gaccaggcatggggtgaggctgattcattactcagttggtgctggtatcactgac
caaggagaagtcccaatgggtacaatgtctccagatcaaccacaggagatttcccg
ctcaggctgctgctgggtgctcctccagacatctgtgacttctgtgccagcagg
ccgggactagcgggagggtgacacagacagcacttcgggcgggcaccaggctcagc
gtcacagaggacctgaataacgtgttccacccagagtgctgtgtttgagccatca
gaagcagagatctccacacccaaaggccacactggtgtgctggccacaggcttc
taccocagaccagtgaggctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggg
gtctgcacagacccgagccctcaaggagcagccgcctcaatgactccagatcac
tgtctgagcagccgctgagggtctggccaccttctggcaggaccccgcaaccac
ttcctgtgtcaagtcagttctacgggctctcggaatatgagagtgaccaggat
agggcacaacccgtcaccagatcgtcagcggcagggtcgggtagagcagactaa

```

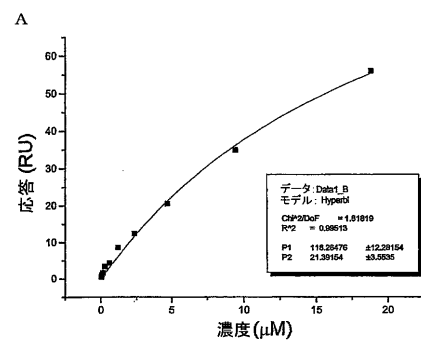
【図 98】



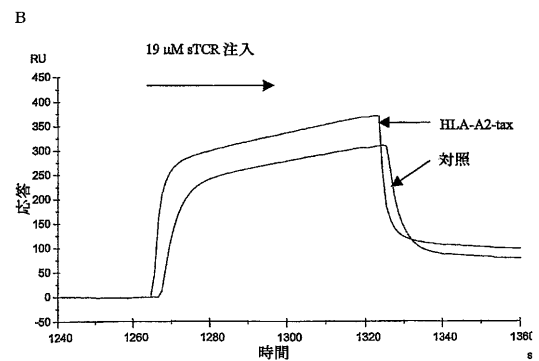
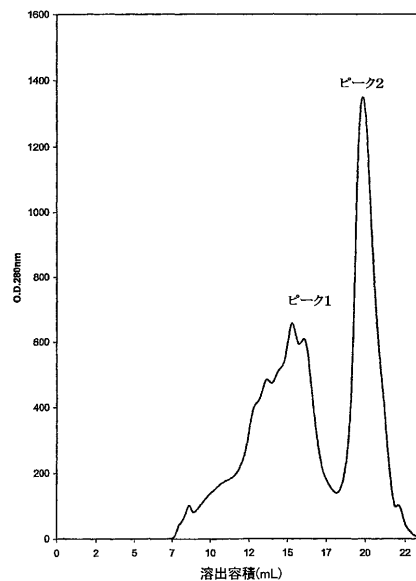
【図 99】



【図 101】



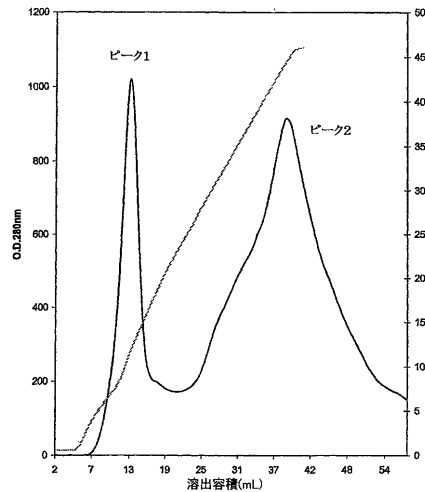
【図 100】



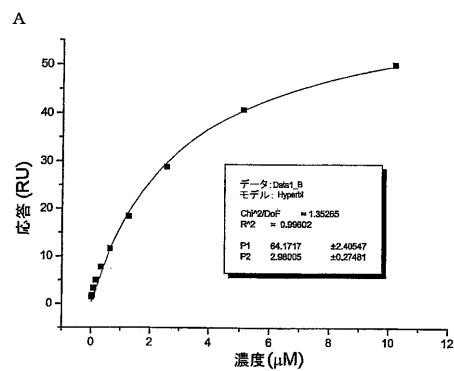
【 図 1 0 2 】

atgaacgctggtgtcactcagaccaccaaaattccaggctcctgaagacaggacagagc
atgacagctcgagtgtgccaggatgaaccaatgaatacattcctggatcgcagaa
gaccaggcactggggctgaggtcgtatctactcattcagttggctgggtatcactgac
caaggagaagtcccoaatggctctacaattgctccagatcaaacacagggagtctccgc
ctcaggctcgtctcggctcgtccctcccagacatctgtgtactctctgcgcagcagg
ccgggactagcgggagggcgacagcagcagctacttcgggcgggacacagggtcacg
ctcacagagagctgaaaaacgtgctcccaccagagttcgctgtgtttgagccatca
gaacagagagctcccaacacaaaaggagcactggtgtcctggccacagggtctc
taccccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacatggg
gtctcgagcagcccgagccctcaaggagcagccgcctcaatgactccagatatac
tctctgagcagcagctgagggctgcggccactctgcgcagcagccgacacacac
ttcctggtcgaagtcgaattctcgggctctcggagatgacgagtggtccacaggtat
agggccaaacccgtcaccagatcgtcagccgcaggcctgggtagacagcactaa

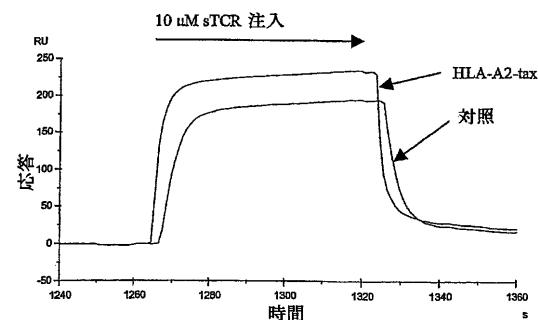
【 図 1 0 3 】



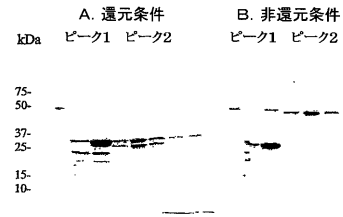
【 図 1 0 6 】



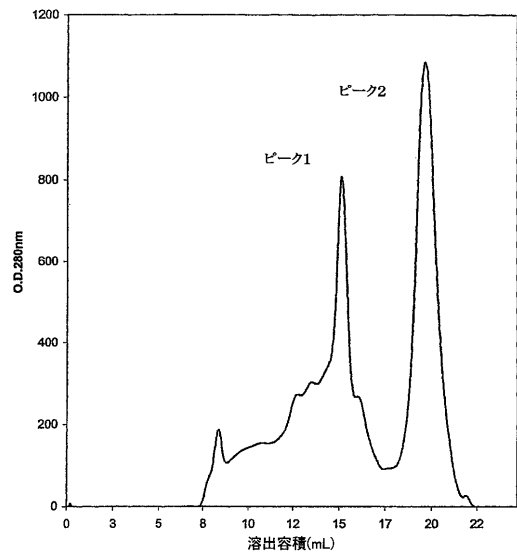
B



【 図 1 0 4 】



【 図 1 0 5 】



【 図 1 0 7 - 1 】

[illegible]

1
101
201
301
401
501
601
701
801
901
1001
1101
1201
1301
1401
1501
1601
1701
1801
1901
2001
2101
2201
2301
2401
2501
2601
2701
2801
2901
3001
3101
3201
3301
3401
3501
3601
3701

【 図 1 0 8 - 1 】

[illegible]

【 図 1 0 9 】

[illegible]

プレープロ接合因子 α 配列は強調表示されている。BamHI部位には、下線が付されている。

【配列表】

0004317940000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/725 (2006.01)		C 0 7 K 14/725	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/02 (2006.01)		C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/566	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)		A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)		A 6 1 K 47/48	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	

(31)優先権主張番号 60/404,182

(32)優先日 平成14年8月16日(2002.8.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

- (74)代理人 100091351
弁理士 河野 哲
- (74)代理人 100088683
弁理士 中村 誠
- (74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘
- (74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
- (74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100100952
弁理士 風間 鉄也
- (74)代理人 100101812
弁理士 勝村 紘
- (74)代理人 100070437
弁理士 河井 将次
- (74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志

- (74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290
弁理士 竹内 将訓
- (74)代理人 100127144
弁理士 市原 卓三
- (74)代理人 100141933
弁理士 山下 元
- (72)発明者 ジャコブセン、ベント・カーステン
イギリス国、オーエックス14・4アールエックス、オクソン、アビンドン、57シー・ミルトン
・パーク、アビデックス・リミテッド内
- (72)発明者 グリック、メイアー
アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 02072、ストウトン、ゴールデン・ロード 63

審査官 引地 進

- (56)参考文献 米国特許第06080840(US, A)
国際公開第99/060120(WO, A1)
J. Biochem., 1993年, Vol.113, pp.687-691
Immunity, 1995年, Vol.2, pp.281-287
J. Immunol., 1997年, Vol.159, pp.1718-1727

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 1/00-19/00
C12N 15/00-15/90
JSTPlus(JDreamII)
BIOSIS/WPI(DIALOG)

专利名称(译)	物质		
公开(公告)号	JP4317940B2	公开(公告)日	2009-08-19
申请号	JP2003525033	申请日	2002-08-30
[标]申请(专利权)人(译)	阿维指数有限公司		
申请(专利权)人(译)	Abidekkusu有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Imyunokoa有限公司		
[标]发明人	ジャコブセンベントカーステン グリックメイアー		
发明人	ジャコブセン、ベント・カーステン グリック、メイアー		
IPC分类号	C12N15/09 A61P3/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/725 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/566 A61K9/127 A61K47/48 A61K48/00 A61K38/00		
CPC分类号	C07K14/7051 A61K38/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P3/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/725 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/566 A61K9/127 A61K47/48 A61K48/00		
代理人(译)	河野 哲 中村诚 河野直树 冈田隆 山下 元		
审查员(译)	进Hikichi		
优先权	2001021187 2001-08-31 GB 2002019146 2002-08-16 GB 60/404182 2002-08-16 US		
其他公开文献	JP2005514006A5 JP2005514006A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

类型代码： 本发明提供了一种可溶性T细胞受体，其包含 (i) 除跨膜结构域之外的全部或部分TCR α 链和 (ii) 除跨膜结构域之外的全部或部分TCR β 链sTCR) 来提供。(I) 和 (ii) 分别与至少所述TCR链，由恒定域残基之间的二硫键连接的功能可变结构域和恒定结构域的一部分不存在于天然TCR那里。

TCR α 鎖	TCR β 鎖	天然の β 炭素の距離 (nm)
Thr 48	Ser 57	0.473
Thr 45	Ser 77	0.533
Tyr 10	Ser 17	0.359
Thr 45	Asp 59	0.560
Ser 15	Glu 15	0.59