(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-501364
(P2004-501364A)
(43)公表日　平成16年1月15日(2004.1.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/50	G01N 33/50	Z	2G045
A61K 45/00	G01N 33/50	K	4C084
A61P 37/04	A61K 45/00		
A61P 37/06	A61P 37/04		
G01N 33/15	A61P 37/06		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 323 頁）　最終頁に続く

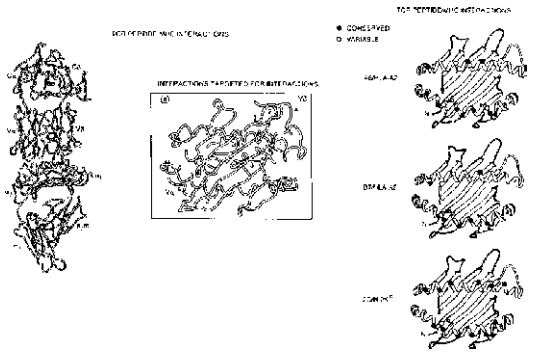
(21)出願番号　特願2001-586462(P2001-586462)
(86)(22)出願日　平成13年5月16日(2001.5.16)
(85)翻訳文提出日　平成14年11月22日(2002.11.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/015699
(87)国際公開番号　WO2001/090747
(87)国際公開日　平成13年11月29日(2001.11.29)
(31)優先権主張番号　60/206,920
(32)優先日　平成12年5月25日(2000.5.25)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500206386
スノル・モレキュラー・コーポレーション
アメリカ合衆国　フロリダ州　３３０２５　ミラマー　ノース・コマース・パークウェイ　２８１０号
(74)代理人　100102668
弁理士　佐伯　憲生
(72)発明者　ピーター　ロード
アメリカ合衆国　フロリダ州　３３１８５　マイアミ　エス・ダブリュー　４２・レーン　１４８５７
(72)発明者　ボーガン　ウィットマン
アメリカ合衆国　フロリダ州　３３３３２　ウェストン　ウエストブルック　２９６７

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｔ－細胞レセプター相互作用のモジュレーション

(57)【要約】
Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）と主要組織適合複合体（ＭＨＣ）抗原とを含む免疫複合体を調節する化合物の同定方法が開示されている。本発明は免疫応答を調節する成分を検出するための高速大量処理スクリーニングアッセイ法の提供など、多くの有用な応用性を有する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｔ－細胞レセプター（ＴＣＲ）と主要組織適合複合体（ＭＨＣ）抗原とを含有してなる免疫複合体を調節する化合物の同定方法であって、
ａ）少なくとも１種の試験化合物の存在下または非存在下に、第一のＴＣＲ分子とＭＨＣ抗原分子とを、ＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子が特異的に免疫複合体として結合するのに十分な条件下で接触させること；
ｂ）該試験化合物の存在下および非存在下に免疫複合体の存在を検出すること；
ｃ）ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子との間の特異的な結合を変化させる試験化合物を選択すること；および
ｄ）免疫複合体を調節するものとして当該選択化合物を同定すること；
を含んでなることを特徴とする方法。
【請求項２】
該ＭＨＣ抗原が、ＭＨＣ／ペプチド複合体、ＭＨＣ／スーパー抗原複合体、ＭＨＣ／脂質（または糖脂質）複合体、または異質反応性もしくは異種反応性ＭＨＣ分子を含有してなるＭＨＣに基づく分子である請求項１記載の方法。
【請求項３】
ＴＣＲまたはＭＨＣ成分の少なくとも一方がヘテロ二量体である請求項１および２記載の方法。
【請求項４】
該ヘテロ二量体が天然産または組換え体である請求項３記載の方法。
【請求項５】
該ＴＣＲ分子が組換え一本鎖（ｓｃ－）分子である請求項１ないし４に記載の方法。
【請求項６】
該ＴＣＲ分子が完全可溶性である請求項１ないし５に記載の方法。
【請求項７】
該ＴＣＲ分子が表面分子として細胞により発現されるものである請求項１ないし５に記載の方法。
【請求項８】
該ＴＲＣ分子が膜貫通型ドメインを含有してなる請求項７記載の方法。
【請求項９】
該ＴＣＲ分子が多価性である請求項１ないし８に記載の方法。
【請求項１０】
該ＴＣＲ分子が少なくとも哺乳動物の免疫グロブリン分子の一部を含有してなる請求項１ないし９に記載の方法。
【請求項１１】
該融合免疫グロブリン分子が定常ドメインまたはその機能的フラグメントを含有してなる請求項１０記載の方法。
【請求項１２】
該定常ドメインが少なくともκまたはλ軽鎖の定常ドメイン（C_L）の一部を含有してなる請求項１１記載の方法。
【請求項１３】
該定常ドメインが重鎖定常ドメインである請求項１１記載の方法。
【請求項１４】
該免疫グロブリン分子がＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡまたはキメライソタイプを有する請求項１０ないし１３に記載の方法。
【請求項１５】
該哺乳動物重鎖がＩｇＧイソタイプを有し、少なくともＣＨ２－ＣＨ３ドメインを含有してなる請求項１４記載の方法。
【請求項１６】

該哺乳動物のＩｇＧ重鎖がC_H１－C_H２－C_H３ドメインを含有してなる請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
該哺乳動物重鎖がＩｇＭイソタイプを有し、ＣＨ２－ＣＨ３－ＣＨ４ドメインを含有してなる請求項１４記載の方法。
【請求項１８】
該哺乳動物の免疫グロブリン分子がマウスまたはヒトの配列を含有してなるか、または該配列からなるものである請求項１０記載の方法。
【請求項１９】
該ＴＣＲ分子がさらに２個以上のＴＣＲ分子を結合させるための少なくとも１個のタグ標識を含有してなる請求項９ないし１８に記載の方法。
【請求項２０】
該ＴＣＲ分子が二量体、三量体、四量体またはより高次の複合体を形成し得るものである請求項１９記載の方法。
【請求項２１】
該ＴＣＲ分子が少なくとも融合した哺乳動物のＣＤ３ζ配列の一部を含有してなる請求項１ないし２０に記載の方法。
【請求項２２】
該融合した哺乳動物のＣＤ３ζ配列が膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインまたはその機能的フラグメントを含有してなる請求項２１記載の方法。
【請求項２３】
該ＭＨＣ抗原のＭＨＣ成分がクラスＩ、クラスＩＩ、またはその組み合わせである請求項１ないし２２に記載の方法。
【請求項２４】
該ＭＨＣ抗原のＭＨＣ成分がヘテロ二量体であるか、または組換え一本鎖分子である請求項２３記載の方法。
【請求項２５】
該ＭＨＣ抗原分子がＭＨＣ／ペプチド複合体であり、各ＭＨＣ抗原分子が融合した提示ペプチドを含有してなる請求項２４記載の方法。
【請求項２６】
該ＭＨＣ抗原分子がＭＨＣ／ペプチド複合体であり、該方法がさらに該ＭＨＣ成分に適切な提示ペプチドを負荷することを含んでなるものである請求項２４記載の方法。
【請求項２７】
該提示ペプチドの負荷を接触工程に先立ち、またはその間に実施する請求項２６記載の方法。
【請求項２８】
該ＭＨＣ抗原分子が完全可溶性である請求項１ないし２７に記載の方法。
【請求項２９】
該ＭＨＣ抗原分子が表面分子として細胞により発現されるものである請求項１ないし２８に記載の方法。
【請求項３０】
該ＭＨＣ抗原分子が少なくとも膜貫通ドメインの一部を含有してなる請求項２９記載の方法。
【請求項３１】
該ＭＨＣ抗原分子が多価性である請求項１ないし３０に記載の方法。
【請求項３２】
該ＭＨＣ抗原分子が少なくとも融合した哺乳動物の免疫グロブリン分子の一部を含有してなる請求項１ないし３１に記載の方法。
【請求項３３】
該ＭＨＣ抗原分子の融合した免疫グロブリン分子が定常ドメインまたはその機能的フラグ

メントを含有してなる請求項３２記載の方法。
【請求項３４】
該定常ドメインが少なくともκまたはλ軽鎖定常ドメイン（C_L）の一部を含有してなる請求項３３記載の方法。
【請求項３５】
該定常ドメインが重鎖定常ドメインである請求項３３記載の方法。
【請求項３６】
該免疫グロブリン分子がＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡまたはキメライソタイプを有するものである請求項３２ないし３５に記載の方法。
【請求項３７】
該哺乳動物の重鎖がＩｇＧイソタイプを有し、少なくともＣＨ２－ＣＨ３ドメインを含有してなる請求項３２ないし３６に記載の方法。
【請求項３８】
該哺乳動物のＩｇＧ重鎖が$C_H1-C_H2-C_H3$ドメインを含有してなる請求項３７記載の方法。
【請求項３９】
該哺乳動物の重鎖がＩｇＭイソタイプを有し、$C_H2-C_H3-C_H4$ドメインを含有してなる請求項３２ないし３６に記載の方法。
【請求項４０】
該哺乳動物の免疫グロブリン分子がマウスまたはヒトの配列を含有してなるか、または該配列からなるものである請求項３２記載の方法。
【請求項４１】
該ＭＨＣ抗原分子がさらに２個以上のＭＨＣ抗原分子を結合させるための少なくとも１個のタグ標識を含有してなる請求項３１ないし４０に記載の方法。
【請求項４２】
該ＭＨＣ抗原分子が二量体、三量体、四量体またはより高次の複合体を形成し得るものである請求項４１記載の方法。
【請求項４３】
該ＭＨＣ抗原分子が少なくとも融合した哺乳動物のＣＤ３ζ配列の一部を含有してなる請求項１ないし４２に記載の方法。
【請求項４４】
該融合した哺乳動物のＣＤ３ζ配列が膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインまたはその機能的フラグメントを含有してなる請求項４３記載の方法。
【請求項４５】
該ＴＣＲ分子が少なくとも１個の膜貫通ドメインまたはその機能的フラグメントを含有してなる表面分子として細胞により発現されるものである請求項１ないし５、および７ないし４４に記載の方法。
【請求項４６】
該同族体ＭＨＣ抗原分子が固形支持体に結合している請求項４５記載の方法。
【請求項４７】
該ＭＨＣ抗原分子が少なくとも１個の膜貫通ドメインを含有してなる表面分子として細胞により発現されるものである請求項１ないし２７、および２９ないし４６に記載の方法。
【請求項４８】
該ＴＣＲ分子が固形支持体に結合している請求項４７記載の方法。
【請求項４９】
該結合したＭＨＣ抗原またはＴＣＲ分子の少なくとも一方が少なくとも１個のデンドリマー、合成または半合成ポリマーに結合している請求項４６または４８記載の方法。
【請求項５０】
該固形支持体が組織培養ウエルもしくはプレート、テストストリップ、クロマトグラフィーマトリックス、電気泳動マトリックス、またはビーズである請求項４９記載の方法。

【請求項５１】
該ビーズが磁性である請求項５０記載の方法。
【請求項５２】
該検出工程がさらにＴＣＲ分子を発現する細胞、ＭＨＣ抗原分子を発現する細胞、またはその両方からの少なくとも１つの応答を検出することを含んでなり、該応答が免疫複合体の安定な形成から生じるものである請求項４５および４７記載の方法。
【請求項５３】
当該方法により検出される細胞応答が、細胞接着、膜電位、細胞内もしくは細胞外イオン濃度、細胞内キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、細胞内タンパク質輸送、内在性もしくは異種遺伝子発現、少なくとも１種のサイトカイン産生を含むタンパク質産生もしくは分泌、細胞増殖、アポトーシス、ＲＮＡ合成、またはＤＮＡ合成の内の少なくとも１つである請求項５２記載の方法。
【請求項５４】
該方法がさらにＴＣＲ分子を発現する細胞による少なくとも１種のサイトカインの産生を測定することを含んでなる請求項５３記載の方法。
【請求項５５】
該発現細胞により産生されるサイトカインがインターロイキン－２（ＩＬ－２）である請求項５４記載の方法。
【請求項５６】
サイトカインと、該サイトカインに特異的に結合し得る第一抗体とを接触させ、該第一抗体とサイトカインとを含有してなる複合体を形成させることにより当該産生を測定することからなる請求項５４ないし５５に記載の方法。
【請求項５７】
該第一抗体が固形支持体に結合している請求項５６記載の方法。
【請求項５８】
該複合体と、サイトカインに特異的に結合し得る検出可能に標識した第二抗体とを接触させることにより、該サイトカインの産生をさらに測定することからなる請求項５６ないし５７に記載の方法。
【請求項５９】
検出可能に標識した第二抗体の存在が、試験化合物の存在および非存在下に形成される免疫複合体の指標である請求項５８記載の方法。
【請求項６０】
検出された細胞応答がＴ細胞の活性化または増殖である請求項５３記載の方法。
【請求項６１】
該Ｔ細胞の活性化を標準的Ｔ細胞活性化アッセイにより測定する請求項６０記載の方法。
【請求項６２】
該ＴＣＲ発現細胞が少なくとも１種の他のタイプの細胞表面ＴＣＲ分子を発現するものである請求項４５記載の方法。
【請求項６３】
当該他のタイプの細胞表面ＴＣＲ分子が、第一ＴＣＲ分子とは異なるＭＨＣ抗原結合特異性を有する第二ＴＣＲ分子を含有してなるか、または該第二ＴＣＲ分子からなるものである請求項６２記載の方法。
【請求項６４】
該第二細胞表面ＴＣＲ分子を該方法においてコントロールとして使用する請求項６３記載の方法。
【請求項６５】
該第二ＴＣＲ分子が発現細胞内在性の天然産ＴＣＲレセプターである請求項６２ないし６４に記載の方法。
【請求項６６】
該第二ＴＣＲ分子が組換えヘテロ二量体または一本鎖（ｓｃ－）分子である請求項６２な

いし６４に記載の方法。
【請求項６７】
該試験化合物の、第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原を含有してなるコントロール免疫複合体の形成を調節する能力が無視し得るものである請求項６２ないし６６に記載の方法。
【請求項６８】
該試験化合物の、第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原を含有してなるコントロール免疫複合体の安定性を調節する能力が無視し得るものである請求項６２ないし６７に記載の方法。
【請求項６９】
該方法がさらにＴＣＲ分子（類）と少なくとも１種の分化クラスター（ＣＤ）分子とを同時に発現することを含んでなる請求項４５ないし６８に記載の方法。
【請求項７０】
該ＣＤ分子が少なくとも１種の細胞応答を増強し得るものである請求項６９記載の方法。
【請求項７１】
該ＣＤ分子が組換え体である請求項７０記載の方法。
【請求項７２】
該細胞により同時発現される組換えＣＤ分子がＣＤ４である請求項７１記載の方法。
【請求項７３】
該Ｔ細胞がＴ細胞ハイブリドーマである請求項１ないし７２記載の方法。
【請求項７４】
該Ｔ細胞ハイブリドーマが少なくとも１種のサイトカインを産生し得るものである請求項７３記載の方法。
【請求項７５】
該サイトカインがインターロイキン－２（ＩＬ－２）である請求項７４記載の方法。
【請求項７６】
該タグ標識が少なくとも１個のビオチンリガーゼ標的配列を含有してなるアミノ酸配列を含有してなる請求項１９ないし２０および４１ないし４２に記載の方法。
【請求項７７】
該ビオチンリガーゼ標的配列が少なくともＢｉｒＡ配列を含有してなる請求項７６記載の方法。
【請求項７８】
該ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子の少なくとも一方が検出可能に標識されたものである請求項１ないし７７記載の方法。
【請求項７９】
該標識が直接的または間接的に検出可能なものである請求項１ないし７８記載の方法。
【請求項８０】
該標識が直接的に検出可能であり、蛍光、りん光、発光、色素原もしくは化学発光標識またはその前駆体である請求項７９記載の方法。
【請求項８１】
該標識が放射性核種である請求項７９記載の方法。
【請求項８２】
該標識が間接的に検出可能であり、タグ標識または酵素の少なくとも一方である請求項７９記載の方法。
【請求項８３】
該タグ標識が抗体、細胞レセプター、プロテインＡ、プロテインＧ、アビジン、ストレプトアビジンまたはその機能的フラグメントに特異的に結合するか、またはタンパク質分解酵素、プロテインキナーゼ、ビオチンリガーゼまたはその機能的フラグメントによる特異的改変の標的である請求項８２記載の方法。
【請求項８４】

該酵素が西洋わさびペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、ベーターガラクトシダーゼ（ｂ－ｇａｌ）、またはアルカリホスファターゼ（ＡＰ）である請求項８２記載の方法。
【請求項８５】
該検出がＥＬＩＳＡ検出フォーマットを用いることにより実施するものである請求項７８ないし８４記載の方法。
【請求項８６】
該選択工程がさらに試験化合物についてコントロール免疫複合体の形成を調節する能力を殆ど無視し得ると確認することを含んでなる請求項１ないし８５に記載の方法。
【請求項８７】
該選択工程がさらに試験化合物についてコントロール免疫複合体の安定性を調節する能力を殆ど無視し得ると確認することを含んでなる請求項１ないし８６に記載の方法。
【請求項８８】
該コントロール免疫複合体が、第一ＴＣＲと該第一ＴＣＲに特異的に結合し得る抗体を含有してなる請求項８６または８７に記載の方法。
【請求項８９】
該コントロール免疫複合体が、ＣＤ３分子とＣＤ３タンパク質に特異的に結合し得る抗体を含有してなる請求項８６または８７に記載の方法。
【請求項９０】
該コントロール免疫複合体が、第二ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原分子を含有してなる請求項８６または８７に記載の方法。
【請求項９１】
該第二ＴＣＲ分子が第一ＴＣＲ分子とは異なるＭＨＣ抗原結合特異性を有するものである請求項９０記載の方法。
【請求項９２】
該第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原分子が天然産であるか、または組換え分子である請求項９０および９１に記載の方法。
【請求項９３】
該コントロール免疫複合体の形成または安定性が、ＴＣＲ分子またはＣＤ３分子を発現する細胞により少なくとも１種のサイトカインの産生を測定することにより検出するものである請求項８６ないし９２に記載の方法。
【請求項９４】
該ＭＨＣ抗原分子のＭＨＣ成分がｓｃ－ＭＨＣもしくはＨＬＡ分子またはＭＨＣもしくはＨＬＡヘテロ二量体である請求項１ないし９３に記載の方法。
【請求項９５】
該ＭＨＣ抗原が、Ｍ１ｓ抗原、ＳＥＡ、ＳＥＢ、ＳＥＣ１、ＳＥＣ２、ＳＥＣ３、ＳＥＤ、ＳＥＥ、ＳＰＥ－Ａ、ＳＰＥＣ、ＥｘＦＴまたはＴＳＳＴスーパー抗原を含有してなるスーパー抗原－ＭＨＣ複合体である請求項１ないし９４に記載の方法。
【請求項９６】
Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）と主要組織適合複合体（ＭＨＣ）抗原とを含有してなる免疫複合体を調節する化合物の同定方法であって、
ａ）試験化合物の存在下または非存在下に、第一のＴＣＲ分子を発現する細胞と、固形支持体に結合したＭＨＣ抗原分子とを、ＴＣＲおよび結合したＭＨＣ抗原分子が特異的に免疫複合体として結合するのに十分な条件下で接触させること；
ｂ）該試験化合物の存在下または非存在下に、少なくとも１つの該細胞からの応答を測定することにより免疫複合体の存在を検出すること；
ｃ）第一ＴＣＲと、結合したＭＨＣ抗原分子との間の特異的な結合を変化させる試験化合物を選択すること；および
ｄ）免疫複合体を調節するものとして当該選択化合物を同定すること；
を含んでなることを特徴とする方法。
【請求項９７】

検出工程において測定される細胞応答がサイトカインの産生またはＴ細胞増殖である請求項９６記載の方法。
【請求項９８】
測定された細胞応答がサイトカイン・インターロイキン－２（ＩＬ－２）の産生である請求項９７記載の方法。
【請求項９９】
該方法がさらにＩＬ－２に特異的に結合し、かつ抗体複合体を形成し得る第一抗体またはその機能的フラグメントを固形支持体に結合することを含んでなる請求項９８記載の方法。
【請求項１００】
該方法がさらに該抗体複合体と、ＩＬ－２に特異的に結合し得る検出可能に標識した抗体またはその機能的フラグメントとを接触させることを含んでなる請求項９５記載の方法。
【請求項１０１】
該方法がさらに検出可能な標識を直接または間接に定量することを含んでなる請求項１００記載の方法。
【請求項１０２】
該方法がＥＬＩＳＡ検出フォーマットを含んでなる請求項１０１記載の方法。
【請求項１０３】
該ＴＣＲ分子の発現細胞がさらに第二（コントロール）ＴＣＲ分子またはＣＤタンパク質の少なくとも一方を発現する請求項９６ないし１０２に記載の方法。
【請求項１０４】
該ＣＤタンパク質がＣＤ４である請求項１０３記載の方法。
【請求項１０５】
該選択工程がさらに試験化合物について、第一ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の免疫複合体形成を低減または除去し得るものと同定することを含んでなる請求項９６ないし１０４に記載の方法。
【請求項１０６】
該選択工程がさらに試験化合物について、第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原とを含有してなるコントロール免疫複合体の形成を調節する能力を殆ど無視し得るものと確認することを含んでなる請求項９６ないし１０５に記載の方法。
【請求項１０７】
該Ｔ細胞が多発性硬化症（ＭＳ）ＴＣＲ分子を発現し、該同族体ＭＨＣ抗原分子がミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）ペプチドを含有してなるＭＨＣ／ペプチド複合体である請求項９６ないし１０６に記載の方法。
【請求項１０８】
該ＭＳ ＴＣＲ分子がＭＢＰ－制限ＭＳ Ｔ細胞株からのＴＣＲアルファ鎖およびベータ鎖を含有してなる請求項１０７記載の方法。
【請求項１０９】
該ＭＳ ＴＣＲがヘテロ二量体または組換え一本鎖分子である請求項１０８記載の方法。
【請求項１１０】
該ＭＳ Ｔ細胞株がＥ１１である請求項１０８ないし１０９に記載の方法。
【請求項１１１】
該ＭＳ Ｔ細胞分子が共有結合したＣＤ３ζ配列またはその機能的フラグメントを含有してなる請求項９６ないし１１０記載の方法。
【請求項１１２】
該同族体ＭＨＣ抗原分子が一本鎖（ｓｃ－）ＤＲ２／ＭＢＰタンパク質またはその機能的フラグメントである請求項９６ないし１１１記載の方法。
【請求項１１３】
該ＭＨＣ抗原分子のＭＨＣ成分がエンプティＭＨＣクラスＩＩ ＨＬＡ－ＤＲ２（ＤＲＢ１＊１５０１）またはその機能的フラグメントである請求項９６ないし１１２記載の方法

。
【請求項１１４】
該方法がさらにＭＨＣ成分とＭＢＰ（アミノ酸８３～１０２）ペプチドとを接触させ、ＭＨＣ成分にＭＢＰペプチドを負荷し、ＭＨＣ抗原分子を形成させることを含んでなる請求項１１３記載の方法。
【請求項１１５】
該負荷工程を、固形支持体への結合前、後、またはそれと同時に実施するものである請求項１１４記載の方法。
【請求項１１６】
該ＭＨＣ抗原分子が融合ＭＢＰ（アミノ酸８３～１０２）ペプチドを含有してなるＭＨＣクラスＩＩ ＨＬＡ－ＤＲ２（ＤＲＢ１＊１５０１）複合体である請求項９６ないし１１３に記載の方法。
【請求項１１７】
該ＤＲ２／ＭＢＰタンパク質がさらに共有結合したＩｇＧ重鎖定常ドメインまたはその機能的フラグメントを含有してなる請求項１１２ないし１１６に記載の方法。
【請求項１１８】
該ＤＲ２／ＭＢＰ分子のＭＨＣ成分がヘテロ二量体または組換え一本鎖である請求項１１３ないし１１６に記載の方法。
【請求項１１９】
ＴＣＲとＭＨＣ分子が特異的に結合するのに十分な条件が、適切な増殖培地中、３７℃で約８時間、約１０％の二酸化炭素雰囲気下でインキュベーションすることである請求項９６ないし１１８に記載の方法。
【請求項１２０】
該試験化合物を適切な溶媒に溶解する請求項１ないし１１９に記載の方法。
【請求項１２１】
該溶媒が、水、生理塩溶液、組織培養培地、約２．５％のジメチルスルホキシド、または生理的に許容し得る緩衝液または担体の少なくとも１種である請求項１２０記載の方法。
【請求項１２２】
該ＴＣＲまたはＭＨＣ分子が多価性であり、かつ融合免疫グロブリンドメインを含有してなる請求項１ないし１２１に記載の方法。
【請求項１２３】
該融合ＣＤ３ζ鎖がマウスまたはヒトの配列を含有してなる請求項２１、２２、４３、４４および１１１に記載の方法。
【請求項１２４】
該第一ＴＣＲ分子が完全可溶性であり、ＭＨＣ抗原分子がＭＨＣ／ペプチド複合体である請求項１記載の方法。
【請求項１２５】
第一ＴＣＲ分子が組換え一本鎖（ｓｃ－）ＴＣＲ分子であり、ＭＨＣ抗原がクラスＩ重鎖およびベーター２ミクログロブリンを含有してなる組換えクラスＩ／ペプチド複合体である請求項１２４記載の方法。
【請求項１２６】
該第一ＴＣＲ分子が固形支持体に結合している請求項１２４ないし１２５に記載の方法。
【請求項１２７】
該ＭＨＣ抗原分子が固形支持体に結合している請求項１２４ないし１２６に記載の方法。
【請求項１２８】
該第一ＴＣＲ分子とＭＨＣ抗原分子が固形支持体に結合している請求項１２４ないし１２７に記載の方法。
【請求項１２９】
ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子の少なくとも一方を固形支持体に結合する前に、またはその間に、またはその後に、または同時に該固形支持体を試験化合物と接触させる請求項４６

ないし１２８に記載の方法。
【請求項１３０】
ＴＣＲまたはＭＨＣ分子の少なくとも一方を検出可能に標識する請求項１２４ないし１２９に記載の方法。
【請求項１３１】
検出可能な標識がビオチンである請求項１３０記載の方法。
【請求項１３２】
該方法がさらに該固形支持体と、ビオチンに特異的に結合し、ビオチンを含有してなる複合体を形成し得るストレプトアビジンまたはアビジンとを接触させることを含んでなる請求項１３１記載の方法。
【請求項１３３】
該複合体の形成について、該複合体と特異的に結合し得る検出可能に標識した抗体と該複合体とを接触させることにより検出する請求項１３２記載の方法。
【請求項１３４】
当該検出をＥＬＩＳＡフォーマットの使用により実施する請求項１３０ないし１３３に記載の方法。
【請求項１３５】
当該検出を均一系アッセイフォーマットの使用により実施する請求項１ないし１３４に記載の方法。
【請求項１３６】
当該検出を光学、蛍光、または発光測定手段により実施する請求項１ないし１３５に記載の方法。
【請求項１３７】
該試験化合物の、ＴＣＲ分子および以下のａ）またはｂ）と特異的に結合し得る抗体を含有してなるコントロール免疫複合体の形成を調節する能力が無視し得るものである請求項１ないし１３６に記載の方法：
ａ）ＴＣＲ分子上のエピトープであって、ＭＨＣ抗原分子に特異的に結合しないエピトープ（抗－ＴＣＲ抗体）；または
ｂ）細胞膜においてＴＣＲ分子と会合したクラスター分化（ＣＤ）タンパク質。
【請求項１３８】
該ＣＤタンパク質がＣＤ３であり、抗体がＴＣＲ分子と会合したＣＤ３と特異的に結合し得るものである（抗－ＣＤ３抗体）請求項１３７記載の方法。
【請求項１３９】
第一ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子とを接触させる前に、またはその間に、またはその後に、または同時に第一ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子の少なくとも一方を試験化合物と接触させる請求項１ないし１３８に記載の方法。
【請求項１４０】
請求項１ないし１３９に記載の方法のいずれか一つにより同定される試験化合物。
【請求項１４１】
該試験化合物がＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原分子間の免疫複合体形成を調節し得るものである請求項１４０記載の試験化合物。
【請求項１４２】
該試験化合物がＴＣＲ分子とＭＨＣ抗原分子間の免疫複合体形成速度を減速または加速し得るものである請求項１４０ないし１４１に記載の試験化合物。
【請求項１４３】
該試験化合物がＴＣＲ分子とＭＨＣ抗原分子間の会合率を減少または増加させ得るものである請求項１４０ないし１４１に記載の試験化合物。
【請求項１４４】
該試験化合物がＴＣＲ分子とＭＨＣ抗原分子間の免疫複合体の結合活性を低下または増大させ得るものである請求項１４０ないし１４３に記載の試験化合物。

【請求項１４５】
該試験化合物がＴＣＲ分子とＭＨＣ抗原分子間の免疫複合体の多量体化を減少または増大させ得るものである請求項１４０ないし１４４に記載の試験化合物。
【請求項１４６】
該試験化合物が適切なコントロールに対して少なくとも１種の細胞応答を約１．５倍ないし約１００倍低下または上昇させるものである請求項１４０ないし１４５に記載の試験化合物。
【請求項１４７】
該細胞応答がサイトカインの産生である請求項１４０記載の試験化合物。
【請求項１４８】
産生されるサイトカインがインターロイキン－２（ＩＬ－２）である請求項１４７記載の試験化合物。
【請求項１４９】
適切なコントロールが、抗－ＴＣＲまたは抗－ＣＤ３抗体の存在下に産生されるサイトカインである請求項１４６ないし１４８に記載の試験化合物。
【請求項１５０】
請求項１４０ないし１４９に記載の化合物の少なくとも１種を含有してなる医薬組成物。
【請求項１５１】
哺乳動物における免疫応答を阻害する方法であって、請求項１５０に記載の医薬化合物の治療有効量を投与することを特徴とする方法。
【請求項１５２】
哺乳動物における免疫応答を促進する方法であって、請求項１５０に記載の医薬化合物の治療有効量を投与することを特徴とする方法。
【請求項１５３】
請求項１ないし１３９、１５１および１５２に記載の方法の少なくとも一つを実施するためのキット。
【請求項１５４】
哺乳動物のＣＤ３ζ配列またはその機能的フラグメントを含有してなる組換えＴＣＲ分子。
【請求項１５５】
該ＣＤ３ζ配列またはその機能的フラグメントがマウスまたはヒトの配列を含有してなる請求項１５４に記載の組換えＴＣＲ分子。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本願は２０００年５月２５日出願の米国仮特許出願番号第０６／２０６、９２０の一部継続出願であり、当該出願の開示内容は参照により本件の開示に含まれる。
【０００２】
（技術分野）
本発明はＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）と主要組織適合複合体（ＭＨＣ）抗原との間の相互作用を調節する化合物に関する。一側面において、本発明は試験化合物を同定する方法を特徴とする。他の側面において、本発明は当該方法により検出同定される試験化合物、該化合物を含有する医薬製剤、並びにこれらの化合物を治療に使用する方法を提供する。本発明は多くの重要な適用に、例えば、有害な免疫応答を減少または除去し得る化合物、または有益な免疫応答を増強または開始させ得る化合物選択のための高速大量処理スクリーニングフォーマットに使用し得る。
【０００３】
（背景技術）
抗原特異Ｔ細胞は主要組織適合複合体（ＭＨＣ、例えば、ＨＬＡとして既知のヒトＭＨＣ）の結合溝または間隙に結合する特異ペプチドを認識し、それに応答する。ＭＨＣ分子によるペプチドの提示および抗原特異Ｔ細胞による認識は外来性抗原を同定し、それに応答

する重要な免疫監視システムの代表である。抗原ペプチドは、ＭＨＣタンパク質の結合溝の多形残基により構成される特定の「結合ポケット」に非共有結合により結合する。ＭＨＣ結合抗原ペプチドはＴ細胞表面のＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）と相互作用し、免疫応答を調節する。全般的参照文献：Ｆｏｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（基礎免疫学）３ｒｄ Ｅｄ．，Ｗ．Ｐａｕｌ Ｅｄ．Ｒｓｅｎ Ｐｒｅｓｓ ＬＴＤ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）。
ローデ（Ｒｈｏｄｅ，Ｐ．）ら、米国特許５，８６９，２７０（スノル・モレキュラー・コーポレーション（Ｓｕｎｏｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ））も参照。

【０００４】

ＭＨＣ分子はα鎖とβ鎖をもつ膜結合ヘテロ二量体糖タンパク質である。クラスＩＩ ＭＨＣ分子では、α１とβ１ドメインが会合してペプチド結合溝を形成する。抗原性ペプチドは、ペプチド上のアンカーアミノ酸と、α１とβ１ドメインが形成する結合ポケット間の相互作用を介してＭＨＣ分子に結合する。インフルエンザウイルスのペプチドと複合体形成したヒトのクラスＩＩ ＨＬＡ－ＤＲ１のＸ線結晶構造は、該ペプチドとＭＨＣ分子間の相互作用を原子単位で詳細に示す。参照文献：Ｂｒｏｗｎ，Ｊ．Ｈ．ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ ３６４：３３－３９；Ｓｔｅｒｎ，Ｌ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｎａｔｕｒｅ ３６８：２１５－２２１；ａｎｄ Ｇａｒｂｏｃｚｉ，Ｄ．Ｎ．ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １０：１－７。

【０００５】

ＭＨＣクラスＩ分子はＭＨＣクラスＩＩ分子とは異なるドメイン機構をもつ。クラスＩ ＭＨＣ分子においては、α１およびα２ドメインが会合してペプチド結合溝を形成する。しかし、ＭＨＣ分子は両クラスとも全体としては類似の構造を有し、膜ドメインに対し遠位置にペプチド結合部位または溝をもつ。参照文献：Ｒｕｄｅｎｓｋｙ，Ａ．Ｙ．ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５３：６２２－６２６。ＭＨＣ分子の考察については米国特許５，２８４，９３５；５，２６０，４２２；５，１９４，４２５；５，１３０，２９７；およびＷＯ９２／１８１５０；ＷＯ９３／１０２２０も参照。

【０００６】

Ｔ－細胞応答は抗原がＴ－細胞レセプター（ＴＣＲ）に結合することにより調節する。ＴＣＲの一つの型はα鎖およびβ鎖からなる膜に結合したヘテロ二量体である。このＴＣＲは免疫グロブリンの可変（Ｖ）領域および定常（Ｃ）領域に類似すると考えられる。ＴＣＲα鎖は共有結合したＶ－αおよびＣ－α鎖を含有しており、一方β鎖はＣ－β鎖に共有結合したＶ－β鎖を含む。Ｖ－αおよびＶ－β鎖はＭＨＣ分子との関連でスーパー抗原またはペプチド抗原に、または異質反応性ＭＨＣ分子に結合し得るポケットまたは間隙を形成する。一般的な参照文献：上記の Ｐａｕｌ，Ｗ．参照。

【０００７】

報告によると、もしＴＣＲαおよびβ鎖が、特定のクラスター分化（ＣＤ）タンパク質を包含する複合体、すなわち、γ、δ、ε、およびζ鎖を含んでなるＣＤ３複合体に組み込まれなければ、ＴＣＲは分解される。参照文献例：Ｓｈｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：１９０１。

【０００８】

抗原性ペプチドと複合体形成したＭＨＣ分子は幾つかの異なるメカニズムで選択的な免疫抑制を誘発し得るという認識がある。参照文献例：Ｇｕｅｒｙ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｃｒｉｔｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １３（３／４）：１９５－２０６。

【０００９】

より具体的な報告によると、抗原提示細胞（ＡＰＣ）表面上のペプチド－ＭＨＣ複合体は、もし抗原提示細胞が同時刺激シグナルをも送達するなら、ＭＨＣ結合ペプチドに特異的なＴ細胞株のクローン増殖を誘発するのみである。提案された一方法は、Ｔ細胞活性化のこの要件を利用するものであり、同時刺激シグナルがない状態でＭＨＣ分子に結合した抗

原ペプチドとの相互作用によりＴ細胞の発生を阻害する。参照文献：Ｎｉｃｏｌｌｅ，Ｍ．ｅｔａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．（１９９４）９３：１３６１－１３６９；ａｎｄ Ｓｈａｒｍａ，Ｓ．，ｅｔａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（１９９１）８８：１１４６５－１１４６９。

【００１０】

ＴＣＲとその適合性（同族体）ＭＨＣとの間に形成される免疫複合体を理解するために弛まぬ努力が重ねられている。その一手法が原子レベルで該複合体を研究するためのＸ線結晶学の利用である。参照文献：Ｇａｒｂｏｃｚｉ，Ｄ．Ｎ．，ｅｔａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ３８４：１３４－１４１；Ｇａｒｃｉａ，Ｋ．Ｃ．，ｅｔａｌ．（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７９：１１６６－１１７２；Ｄｉｎｇ，Ｙ．Ｈ．，ｅｔａｌ．（１９９８）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ８：４０３－４１１；ａｎｄ Ｒｅｉｎｈｅｒｚ，Ｅ．Ｌ．，ｅｔａｌ．（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ２８６：１９１３－１９２１。この手法を用い、異なるＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド免疫複合体は同様の結合相互作用を特徴付けると報告している。これらの報告は突然変異誘発の研究によって支持された。参照文献：Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚ Ｊ．Ｄ．ｅｔａｌ．（１９９６）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ５：１２５－１３５；Ｌｙｏｎｓ Ｄ．Ｓ．ｅｔａｌ．（１９９６）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ５：５３－６１；Ｂｒａｗｌｅｙ Ｊ．Ｖ．＆ Ｃｏｎｃａｎｎｏｎ Ｐ．（１９９９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６３：４９４６－４９５２；Ｈｏｒｎｅｌｌ Ｔ．Ｍ．Ｃ．ｅｔａｌ，（１９９９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６３：３２１７－３２２５。

【００１１】

これまでの努力により、さらに抗原性ペプチドまたはＭＨＣ分子のいずれかにおけるアミノ酸変化が僅かであれば、ＭＨＣ／ペプチド複合体を産生し得るが、それはＴ細胞応答を最適に刺激するものではないことがわかった。。例えば、かかる複合体はＴ細胞アンタゴニストであり、弱いアゴニストであることが報告されている。抗原性ペプチドの変化がＭＨＣ／ペプチド複合体の生成に至らしめ、それがＴ細胞スーパーアゴニストとして作用するというケースもある。

【００１２】

ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ／ペプチド間の相互作用およびＴ細胞応答を促進する免疫複合体の形成理解に向けての努力が重ねられている。例えば、ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド免疫複合体の安定性は最適なＴ細胞応答にとって重要である。多重ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド免疫複合体のオリゴマー形成もまた最適な応答に重要である。参照文献：Ｌｙｏｎｓ Ｄ．Ｓ．ｅｔａｌ．（１９９６）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ５：５３－６１；Ｃｏｃｈｒａｎ，Ｊ．Ｒ．ｅｔａｌ．（２０００）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ１２：２４１－２５０。

【００１３】

細胞に基づくプロトコールおよびタンパク質に基づくプロトコールを用いて、化合物の検出を行う効率的なスクリーニング方法の開発に向けてもも努力がなされている。例えば、これら幾つかの選抜法によって、タンパク質：タンパク質相互作用を阻害する化合物を同定したとの報告もある。参照文献：Ｔｉａｎ，Ｓ．Ｓ．ｅｔａｌ．（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２８１：２５７－２５９；Ｋｅｌｌｙ Ｔ．Ａ．ｅｔａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６３：５１７３－５１７７，Ｊｅｎｈ，Ｃ．Ｈ．ｅｔａｌ．（１９９８）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２５６：４７－５５。

【００１４】

ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ間の相互作用を調節する化合物が嘱望されている。さらに、広範な高速大量処理スクリーニングの模範となる、化合物の効率的検出方法も望まれている。

【００１５】

（発明の要旨）

本発明はＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）と主要組織適合複合体（ＭＨＣ；ヒトのＨＬＡを含む）抗原の相互作用を調節する化合物に関する。また、本発明はＴＣＲとその同族体ＭＨ

Ｃ抗原分子の相互作用を調節する化合物を同定する方法を提示する。

【００１６】

より詳しくは、本発明者らはＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を調節する化合物を、特にかかる分子間に形成される免疫複合体を増大または減少させることによって検出する方法を開発した。本発明方法に関する用語「調節する／変調させる（ｍｏｄｕｌａｔｅ）」は、検出された化合物が免疫複合体のアゴニストまたはアンタゴニストとして好適に作用すること、より包括的にはＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体それ自体のモジュレーターとして作用することを意味する。

【００１７】

「ＭＨＣ抗原」または「ＭＨＣ抗原分子」という用語は、ＴＣＲに特異的に結合するＭＨＣベースの分子に関して用いる。ＭＨＣ抗原のＭＨＣ成分は古典的なまたは非古典的なＭＨＣクラスＩａ、クラスＩｂまたはクラスＩＩ分子、またはＭＨＣ相同体から成るが、これらに限定されるものではない（参照：Ｍａｅｎａｋａ，Ｋ．＆Ｊｏｎｅｓ，Ｅ．Ｙ．１９９９．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．９：７４５－７５３）。該ＭＨＣ抗原はＭＨＣ／ペプチド複合体、ＭＨＣ／スーパー抗原複合体、ＭＨＣ／脂質（または糖脂質）複合体または異質反応性（異種反応性）ＭＨＣ分子から成るが、これらに限定されるものではない。

【００１８】

本発明方法は、（上記定義の通り）広義に於いて、好ましくは、少なくとも一つ以上の試験化合物の存在下または非存在下に、少なくとも一つ以上のＴＣＲ分子と少なくとも一つ以上の同族体ＭＨＣ抗原とを接触させることからなる。「同族体（ｃｏｇｎａｔｅ）」という用語は、特定のＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子を参照するために用い、もう一方の分子に対して特異結合パートナーとして作用する分子を意味する。多くの態様において、該方法では約１個のＴＣＲ分子と約１個の同族体ＭＨＣ抗原分子を包含する。典型的な分子間の接触は、通常、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の特異結合を促進する予め定められた条件下に実施する。このような特異的結合は一般的に免疫複合体の形成を助長し、その複合体の安定化を助けになり得る。検出された試験化合物は、少なくとも一つのコントロールに関してその特異結合を著しく増大または減少させるが、該コントロールは試験化合物を検出する際に、同時に実施してもよく、また異なる時点で実施してもよい。所望の活性または１つ以上のかかる活性を有する化合物は、免疫複合体の形成を調節する該方法により同定される。このように同定された化合物はさらに本発明に従って選択することができる。かかる同定・選択された化合物は、インビボおよびインビトロで広範な免疫応答を調節する（増大または低下させる）薬剤として使用する等、多くの重要な適用がある。かかる免疫応答の具体例として、免疫監視、自己免疫疾患、感染症、癌などの増殖性疾患、移植片受容などが挙げられる。

【００１９】

本発明の実施は従来のスクリーニング試行を考慮した場合、特に多くの利点を提供する。例えば、本発明方法は広範なＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子に完全に適合する。本発明のこの特徴は、試験化合物を検出するためのプローブフォーマットのレパートリーを広げる意味で重要である。一例として、本発明方法は完全可溶性のＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子並びに細胞表面に発現された分子など、可溶性の低い分子にも適応させることができる。従って、本発明は非常に融通性があり、多種多様な試験フォーマット、例えば、完全可溶性タンパク質、細胞発現膜タンパク質、またはその組み合わせ、例えば、分子の１個が完全可溶性であり、他が所望の細胞により発現される分子のスクリーニング計画などの試験フォーマットに使用することができる。顕著な差異は、従来のスクリーニング試行では一種または二三種の分子型にしか使用出来ない、より制限されたスクリーニングフォーマットが採用されてきたことである。

【００２０】

他の利点も本発明により提供される。本発明の実施に際して、例えば少なくとも１つのクラスＩまたはクラスＩＩ ＭＨＣ抗原分子を使用する特定の方法を用いる態様において、

予め密結合ペプチドを負荷したＭＨＣ分子を抗原提示細胞（ＡＰＣ）から精製する必要がなくなった。従来のスクリーニング試行では、困難で時間のかかる精製工程により調製したＭＨＣ分子の使用が報告されているが、本発明方法では調製および使用が遥かに容易な幅広いクラスＩまたはクラスＩＩのＭＨＣ抗原分子を使用することができる。参照文献例：米国特許５，８６９，２７０（ローデ（Ｒｈｏｄｅ，　Ｐ．）ら）；本開示は本明細書中に参考として援用される。

【００２１】

さらに本方法の多くの態様が従来のスクリーニング試行で報告されているよりもより高い敏感度を与える。例えば、ＭＨＣ抗原複合体の多価配列は、ある種のＴＣＲ発現細胞を刺激するために必要であることが開示されている。すなわち、一価のＭＨＣ抗原複合体は多くのスクリーニング試行において良好なプローブとして作用しないことが報告された。顕著な差異は、本発明方法では、試験化合物検出に一価および多価分子を含む一連のクラスＩまたはクラスＩＩのＭＨＣ抗原分子を用いることができることである。かかる分子の調製および使用に関する開示は下記考察参照；参照文献：米国特許５，８６９，２７０。

【００２２】

さらに、従来のスクリーニング試行では、しばしば細胞の発現したＴＣＲヘテロ二量体がプローブとして注目を集めていた。このフォーマットは必要以上に制限的であり、場合によってはスクリーニングの結果に強く否定的な影響を与える可能性が有るとされている。それと対照的に本発明方法は、特定のＴＣＲ分子または試験フォーマットに限定されることなく広い範囲のＴＣＲ分子、例えば、これらに限定されるものではないが、天然産ＴＣＲ類、組換え一本鎖構築物を含む完全可溶性ＴＣＲ分子、並びに細胞固着一本鎖およびヘテロ二量体ＴＣＲ分子などに完全に適合する。

【００２３】

本発明のさらなる適応性は、広い範囲のＭＨＣ抗原分子、例えば、天然産ＭＨＣ分子、一本鎖構築物（これらに限定されるものではないが）を含む完全可溶ＭＨＣ分子、並びに細胞表面分子として細胞が発現する構築物などを用いても良いことからわかる。さらに、「エンプティ」ＭＨＣ分子として本明細書中に言及されているものも、使用することができる。

【００２４】

従って、本発明の実施は試験可能なＴＣＲおよびＭＨＣ抗原プローブ分子のプールを実質的に増大させることができる。この相当なプールサイズも試験可能な免疫複合体数を増加させ、それによって本発明により検出、同定および選択し得る試験化合物の範囲が拡張される。それと対照的に、従来のスクリーニング試行では１種または僅かに２～３種のプローブ型、通常ＴＣＲとＭＨＣヘテロ二量体に限られていた。こうした欠陥は多くのアッセイの設定において、検出される化合物の可能数を実質的に減じるものである。

【００２５】

なおさらに、従来のスクリーニング試行では、一つまたは２～３の制限された方法を使用するためにＴＣＲ：ＭＨＣ－ペプチド相互作用を検出するには限界があった。典型的なかかる方法では細胞顆粒化の測定の感度が低く、不正確であることが多かった。顕著な差異は、本発明に於いて試験化合物の存在および非存在下に免疫複合体をモニターすることにより、これらの相互作用を検出するための多様な方法が提供されることである。より特異的な検出法は、より感度の高い、また信頼性の高いＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用の指標を提供するもので、直接または間接技法を用いて実施することができる。

【００２６】

とりわけ、多様な免疫複合体検出方法を適応させることができる本発明の受容能力は顕著な利点を提供する。その一つの利点はかかる方法が本発明をさらに適応性のあるもとし、広範で多様なスクリーニングに適合させ得ることである。

【００２７】

例えば、免疫複合体の高感度検出が望まれる態様において、本発明は間接的な検出方法、例えば、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用に典型的な微弱なまたは間欠性のシグナルを増幅す

るために使用することができる。逆に、免疫複合体の存在がはっきり認識される態様においては、本発明は免疫複合体、そのＴＣＲおよび／またはＭＨＣ抗原成分、または試験化合物の直接検出を伴う方法に於いて用いることができる。かかる態様は試験化合物の迅速スクリーニングが必要とされる設定において非常に実用的である。対照的に、報告されているＴＣＲ：ＭＨＣ－ペプチド相互作用を検出する従来のスクリーニング法は、今まで非常に限定的かつ一般に感度が低く、多くの有用な試験化合物の検出機会を低下させたか、または失わせた。

【００２８】

さらなる利点が本発明により提供される。

例えば、本発明の幾つかの態様において、対象の免疫複合体を調節する１種以上の試験化合物の受容能力は様々なコントロールと比較することが可能である。模範となるコントロールは試験化合物非在下での免疫複合体の検出である。しかし、免疫複合体に非特異的に影響する試験化合物に対しては、場合によってより純化されたコントロールを選択することが望ましい。殊に本発明は、主題のＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を特異的に調節する能力をもつ試験化合物検出の一助となる様々な所謂「内部コントロール」なるものを提供する。

【００２９】

一態様において、かかる内部コントロールは主題の（第一）ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子と少なくとも一つのＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子に特異的に結合する抗体、通常モノクローナル抗体、を包含する。関心の特定の抗体は一般に免疫複合体の特異結合と形成に関与する領域外でＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子に結合する。他の特定の抗体は、通常特異的に、ＴＣＲ分子が細胞発現する態様において典型的に、ＴＣＲ分子に密接に関与するＣＤタンパク質に適切に結合する。

【００３０】

本発明の前記例示において、抗体とＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子で形成される複合体は、本明細書において「コントロール免疫複合体」または同様の語句にて言及する。本発明に適うコントロール免疫複合体の形成は、細胞応答（これに限定されるものではないが）等に於ける検出可能な応答を円滑にする。かかる応答は（実験的）免疫複合体、すなわち、対象となる主題（第一）のＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子間の相互作用により形成される複合体とは別に、あるいはそれと一緒に、直接または間接に測定し得る。特定の試験化合物は、望ましくは、実験免疫複合体の形成を調節するが、コントロール免疫複合体に与える影響はほんの僅かであるか、好ましくは全くない。

【００３１】

他の一態様において、コントロール免疫複合体は第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原分子を含み、好ましくはその場合の第二ＴＣＲ分子は第一ＴＣＲ分子とは異なる結合特異性を有する。本発明のこの例では、対象となる特定の試験化合物は主題の（第一）ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原分子間で形成される免疫複合体を調節する。しかし、該試験化合物は第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原分子とのコントロール免疫複合体には僅かしか、好ましくは全く影響を与えないものである。

【００３２】

考察したように、開示した特定のコントロール免疫複合体を含む免疫複合体の存在は、多様な検出フォーマット、例えば、直接または間接技法に基づくフォーマットを用いて検出することができる。１種以上の内部コントロールの実施は試験化合物のスクリーニングの前、その間、またはその後に実施することができる。

【００３３】

１種以上の前記コントロールを使用することが好ましい本発明の態様において、実質的な便益性を実現することができる。例えば、かかるコントロールを用いる方法は、遥かに良好な敏感度、選択性および／または信頼性を提供することができる。すなわち、考察した内部コントロールなどの少なくとも１種のコントロールを使用する態様において、コントロールの存在は、例えば、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を非特異的に阻害する化合物を同

定することにより、試験化合物の検出と選択を容易にする一助となる。本発明のこの特徴は、しばしば対象となる免疫複合体を特異的に調節する試験化合物の選抜を改善することができる。それと対照的に、従来のスクリーニング試行は常に良好なコントロールを提供するものではないので、かかる試行が敏感度が高く信頼性のある結果を出せるか否か定かではない。

【００３４】

従って、本発明は非常に適応性に富み、多様な試験化合物の選抜に適合する。本発明に好適な試験化合物は、主題のＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を調節する能力を含む１種以上の所望の活性を提示する。

【００３５】

例えば、本方法がアンタゴニストの検出に適合する態様において、適切な試験化合物は少なくとも１種の適切なコントロールに対して、該免疫複合体の存在下に、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし約１００％の低下を示す。考察したように、この免疫複合体は主題のＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原分子との間に形成される。さらに考察したように、該免疫複合体の存在は種々の直接または間接技法を用いて容易に検出することができる。実例となるコントロールは試験化合物非存在下でのアッセイ実施に関与する。あるいは、またはさらに、該コントロールは一つ以上の前述の内部コントロールであってもよいし、以下に考察する内部コントロールであってもよい。

【００３６】

しかし、本発明をアゴニストの検出に使用する態様において、用いる該アッセイ法は、好ましくは該免疫複合体の存在下に、少なくとも１種の適切なコントロールに対して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし約１００％、ないしは約５００％ないし約１０００％までの増加を示す。

【００３７】

指摘したように、本発明は広範なフォーマットで使用することができる。例えば、本発明は「高速大量処理」または「超高速大量処理」型スクリーニング法として知られる方法に採用することができる。この態様において、本発明は該免疫複合体を調節する能力をもつ特定化合物について、試験化合物の大型プール、例えば、同様のライブラリーのスクリーニングに特に有用である。

【００３８】

さらに、本発明方法は１種以上のインビボ・スクリーニング処方と組み合わせて使用し、主題のＴＣＲ：ＭＨＣ－ペプチド相互作用を調節する検出された試験化合物の受容能力をより正確に決定することができる。例えば、一態様において、本発明は、免疫監視、自己免疫疾患、感染症、癌などの増殖性疾患、および／または移植片受容に影響を与える化合物の同定に使用される動物モデルに認知されている哺乳動物で用いるに当たって、適切な試験化合物を予め選抜（または同時選抜）するために使用することができる。該動物でのモニター機能は既存の、例えば、遺伝的性向であってもよく、または例えば、化学的または外科的に誘発してもよい。

【００３９】

注目すべきは、本発明が多重検出フォーマット（例えば、インビトロおよびインビボアッセイの組み合わせ）として、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を調節する非常に有用な試験化合物の検出、特に所望の免疫複合体の存在の検出を容易にし得ると期待されることである。本発明のこの特徴は本発明の適用範囲を大きく広げ、有用な試験化合物のより特異的な選択と同定とを可能とする。

【００４０】

かかる多様なインビトロおよび／またはインビボによる試験法は、さらなる便益性を提供する。このように、例えば、本方法の多くが多重分析の実施に使用可能であり、それによって主題の免疫複合体を特異的に調節し、実質的な治療能力を示す試験化合物を同定する

効率と確率とを上昇させることができる。本発明のこの特徴は、高速大量処理または超高速大量処理方法が使用される、大量の化合物を試験する必要のある場合にとりわけ有用である。例えば、試験化合物のライブラリーは標準的な合成方法、例えば、コンビナトリアル型の化学操作により作製可能であり、次いで本発明により試験することができる。あるいは、本発明方法はすでに入手可能な試験化合物、例えば、市販品として入手し得る化学ライブラリー中に存在する化合物を含め、小型分子、大型分子などについて使用することができる。

【００４１】

従って、一側面において、本発明はＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を調節する化合物の同定方法を特徴とする。一態様において、本方法は少なくとも以下の工程の１工程、好ましくは全ての工程を含む：

ａ）少なくとも１種の試験化合物の存在下または非存在下に、第一のＴＣＲ分子とクラスＩまたはクラスＩＩのＭＨＣ抗原分子とを、ＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子が特異的に免疫複合体として結合するのに十分な条件下で接触させること；

ｂ）該試験化合物の存在下および非存在下に免疫複合体の存在を検出すること；および

ｃ）ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子との間の特異的な結合を変化させる試験化合物を選択すること。好ましくは、本方法はさらに、免疫複合体を調節するものとして当該選択化合物を同定することを包含する。

【００４２】

本方法の特定の態様において、本発明はＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原を含む免疫複合体を調節する試験化合物の同定選抜法を提供する。より具体的な態様において、本方法は少なくとも以下の工程の１工程、好ましくは全ての工程を含む：

ａ）試験化合物の存在下または非存在下に、Ｔ細胞ハイブリドーマなどの第一ＴＣＲ分子を発現する細胞と、固形支持体に結合したクラスＩまたはクラスＩＩのＭＨＣ抗原分子とを、ＴＣＲおよび結合したＭＨＣ抗原分子が特異的に免疫複合体として結合するのに十分な条件下で接触させること；

ｂ）該試験化合物の存在下または非存在下に、該細胞からの細胞応答を測定することにより免疫複合体の存在を検出すること；および

ｃ）第一ＴＣＲと、結合したＭＨＣ抗原分子との間の特異的な結合を変化させる試験化合物を選択すること。好ましくは、本方法はさらに、免疫複合体を調節するものとして当該選択化合物を同定することを包含する。

【００４３】

考察したように、本発明方法は一つの方策またはその組み合わせを用いて、所望の試験化合物の選抜に使用することができる。さらに考察したように、コントロールとして、試験化合物の非存在下に免疫複合体を検出する１工程以上の工程を含めることが多くの場合非常に有用である。しかし、免疫複合体の存在が特定のアッセイフォーマットにおいてすでに理解されている態様においては、必要であればかかる工程を省略することができる。

【００４４】

他の態様において、該コントロールは、試験化合物なしで免疫複合体を検出する代わりに、またはそれに加えて、少なくとも１種の適切な内部コントロールを含んでいてもよい。少なくとも１種の内部コントロールの使用が望ましい態様において、該方法は試験化合物の存在および非存在下にコントロール免疫複合体の存在を検出するための工程を一般に包含する。前記コントロールを含めるかどうかの選択は、使用されるＴＣＲとＭＨＣ抗原分子、選択されたアッセイフォーマット、および必要な敏感度などが判明しているパラメータに基づいて進める。

【００４５】

他のもう一つの側面において、本発明は本方法により検出され、同定される化合物の少なくとも１種を好適に含有する医薬組成物を提供する。かかる組成物は単独の治療剤として該化合物を含有するか、または１種以上の他の認知された薬剤、例えば、免疫系機能に対する作用の認められた医薬と組み合わせてもよい。

【００４６】
本発明はまた哺乳動物の免疫応答を阻害する方法を提供する。一態様において、該方法はここで提供される少なくとも１種の治療有効量の医薬化合物を投与することからなる。該方法とは少なくとも１種の医薬化合物を単独活性剤として投与することであるが、これに限定されるものではない。他のもう一つの態様において、該方法は少なくとも１種の該医薬化合物を、少なくとも１種の他の認知された薬剤、例えば、免疫系に対する作用の認められた医薬などと組み合わせて投与することを可能とする。
【００４７】
もう一つの他の側面において、本発明は本明細書に開示した方法を実施するためのキット、特に診断用キットまたは研究用キットを提供する。本発明の特定のキットは、好ましくはパッケージの組み合わせとして、少なくとも１種のＴＣＲ分子またはその機能的フラグメントを収容する第一容器および少なくとも１種のＭＨＣ抗原分子またはその機能的フラグメントを収容する第二容器からなる。選択肢として、該キットはさらに本方法を遂行するための１種以上の緩衝液、並びに該キット使用のための説明書を包含していてもよい。さらに選択肢として、該キットは本明細書に記載の１種以上のコントロールを包含していてもよい。一態様において、当該コントロールは同定されたＴＣＲ分子および同定されたＭＨＣ抗原分子またはその機能的フラグメント間の特異的結合を調節すると判断された受容能力をもつ少なくとも１種の天然産、合成または半合成化合物である。好ましくは、該化合物は特異結合を低下させる。
【００４８】
本発明によりさらに提供されるのは、哺乳動物のＣＤ３ζ（ゼータ）配列またはその機能的フラグメントを含有する組換えＴＣＲ分子である。かかる分子は、一態様において、細胞膜に機能的に位置することの可能な一本鎖構築物である。
【００４９】
（発明を実施するための最良の形態）
上記考察の通り、本発明はＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原分子間の相互作用を調節する化合物の検出方法を特徴とする。特に、本発明は該化合物を検出・同定する極めて有用なスクリーニング方法を提供する。さらに提供されるのは、当該方法により同定・選択される化合物、選択した試験化合物の少なくとも１種を含む医薬化合物または製剤、並びにヒト患者における免疫疾患を治療するためのこれら製剤の使用方法である。
【００５０】
さらに考察したように、本発明は「高速大量処理」または「超高速大量処理」スクリーニングの代表例と言われるスクリーニングに広く適用し得る。本発明のこの態様はＴＣＲとＭＨＣ抗原との相互作用を調節する良好な受容能力をもつ化合物について、大量の試験化合物のプールを処理、試験するのに殊に有用である。本発明方法により同定されたより特定の化合物は、不所望のＴＣＲとＭＨＣ抗原の相互作用が引き金となる有害な免疫応答を低下させるか、または除去することができる。あるいは、かかる医薬化合物は患者の免疫疾患の重篤度を除去し、緩和し、またはその発症を遅延させる一助として予防的に使用することができる。特定の患者は、免疫疾患、例えば、かかる疾患の予め判定された遺伝的性向をもつ患者など、該疾患を発症する「危険のある」患者をも含め、該疾患に罹患しているか、またはその疑いがある。
【００５１】
ＭＨＣ分子またはその抗原性（提示）ペプチド内での僅かなアミノ酸変化が、それが同類アミノ酸の変化であっても、Ｔ細胞応答刺激に関して、不活性であるか、またはアンタゴニスト、弱いアンタゴニスト、またはスーパーアゴニストとして作用するＭＨＣ／ペプチド複合体を提供し得る。ＴＣＲにおける同様の僅かなアミノ酸変化もペプチドとＭＨＣに対するＴ細胞特異性を変化させることが示されている。参照例：Ｒａｂｉｎｏｗｉｔｚ Ｊ．Ｄ．ｅｔａｌ．（１９９６）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ５：１２５－１３５；Ｂｒａｗｌｅｙ Ｊ．Ｖ．＆Ｃｏｎｃａｎｎｏｎ Ｐ．（１９９９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６３：４９４６－４９５２；Ｈｏｒｎｅｌｌ Ｔ．Ｍ．Ｃ．ｅｔａｌ．（１９９

）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６３：３２１７－３２２５。ＭＨＣ抗原複合体と相互作用し得る化学化合物またはＴＣＲは同族体レセプターとの相互作用を変化させ、Ｔ細胞アンタゴニストまたはアゴニストとして同様に作用し得る。

【００５２】

さらに、利用可能なＸ線結晶学の検討では、ＴＣＲとＭＨＣ上の同類または多形性側鎖間に顕著なアミノ酸相互作用の存在することを示唆している。さらにこれらの研究はＴＣＲと該ペプチドの側鎖、およびＭＨＣとペプチド両者のペプチド主鎖間に相互作用の存在することを示唆している。理論に拘束されることは意図しないが、本発明はこれらの相互作用に影響を与え、相互作用を遮断、または上昇させることができる化合物の検出に非常に適していると思われる。より好ましくは、かかる化合物はインビトロおよびインビボでＴＣＲとＭＨＣ抗原間で形成される免疫複合体の特異的アンタゴニストまたはアゴニストとして作用し得る。

【００５３】

説明のためであって制限するものではないが、図１Ａ～Ｂはある重要なＴＣＲ－ペプチド／ＭＨＣ相互作用を示す。これら相互作用の多くはＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の比較的低親和性結合の例証となる。とりわけ、図１Ａは１個の全ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド複合体の全体にわたるペプチド主鎖構造（右パネル）、およびＴＣＲのＣＤＲ（番号付与）とのペプチド／ＭＨＣ結合部位をＭＨＣ／ペプチド構造に重ねて見た様子（左パネル）を示す（参照文献：Ｇａｒｂｏｃｚｉ，Ｄ．Ｎ．，ｅｔａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ３８４：１３４－１４１；Ｇａｒｃｉａ，Ｋ．Ｃ．，ｅｔａｌ．（１９９８）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７９：１１６６－１１７２）。図１Ｂは異なる同族体ＴＣＲが接触した保存および可変ＭＨＣ残基を示す（参照文献：Ｇａｒｂｏｃｚｉ，Ｄ．Ｎ．＆Ｂｉｄｄｉｓｏｎ，Ｗ．Ｅ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ１０：１－７）。理論に拘束されることは意図しないが、本発明では、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間のこれらの、また他の低親和性相互作用を調節する受容能力をもつ試験化合物を検出する際に、これらの相互作用が有利となる。

【００５４】

図１Ａ～Ｂが提供する情報はＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体内の多重標的についての理解を容易にした。この理解はこれらの標的を調節する試験化合物の検出・同定のための本発明実行の一助となった。本方法により検出される化合物の多くは極めて特異的に作用し得るが、例えば、ペプチド特異的、ＭＨＣアルレ特異的、ＭＨＣファミリー特異的、またはＭＨＣクラス特異的様式で作用する。

【００５５】

さらに、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体と相互作用する化合物は、該複合体の安定性または多量体化する複合体の能力を変化させることが可能である。これらの化合物はＴ細胞アンタゴニストまたはアゴニストとして作用し得る。

【００５６】

すでに述べたように、一態様において、本発明では、例えば、特異的ＭＨＣアルレまたはＭＨＣファミリーによるＴ細胞活性化に拮抗する化合物を検出することができる。本発明のこの特徴は広範な治療対策の開発と実行のために道を開くなどの重要な便益を与えることができる。かかる手法は、例えば、自己免疫疾患と認知されたような免疫疾患の治療を最適化する方法を包含する。重要なことは、多くの自己免疫疾患が特異的ＭＨＣアルレおよび／またはＭＨＣファミリーと強い遺伝的関連性をもつことが認知されていることである。このように本発明のもうひとつの目的は、特定の患者または患者群に適合させ得る方法を提供し、ＭＨＣアルレおよび／またはＭＨＣファミリーに特異的な様式でＴＣＲとＭＨＣ相互作用を調節（例えば、緩和または遮断）する試験化合物を検出することである。

【００５７】

上述のごとく、免疫複合体の形成はＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の低親和性であるが特異的な相互作用の複合体配列により例示される。これらのファクターおよび他のファクターは高親和性レセプター－リガンド相互作用の検討、およびＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体形成の

評価を行う方法の使用を制限することができる。これらの制限は感度の欠如、相互作用の特異性決定の難しさ、および高いアッセイ変動などである。本発明の多くの特徴はこれらの制限を処理するものである。以下により詳細に記載するように、本発明では適切なタンパク質および細胞に基づく試薬を採用し、免疫複合体の形成を検出するためのアッセイの感度を上昇させ、変動を低下させる。特定の態様において、本発明はまた適切な内部コントロールの使用を包含する。下記および実施例に示すように、非同族体ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原を使用する内部コントロールは特に同族体ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用の特異性を評価するのに有用である。本発明の他の内部コントロールの使用は、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の相互作用を特異的に調節する試験化合物の検出に有利である。

【００５８】

以下により詳細に説明するように、本方法は多様なＴＣＲとＭＨＣ抗原分子に適応させ得る。一般に言われるように、適切な分子は天然産または組換え体であり、一連の完全可溶性または細胞固着（膜結合）分子を有効に包含する。強調すべきことは、本発明の特徴が、例えば、多くの異なる有用なスクリーニングフォーマットの設計と実施のための骨組みを提供するものとして非常に重要であるということである。この特徴は重要な治療活性をもつ試験化合物の検出機会を広げる一助となる。かかるフォーマットの例示としては、すでに述べたアッセイ並びに以下に記載するアッセイ等、タンパク質に基づくか、または細胞に基づくスクリーニングアッセイである。

【００５９】

「ＴＣＲ分子」という用語または関連語句は、その用語の複数形を含め、本発明のスクリーニング方法に使用される分子を記述するために使用されるものであり、天然産または組換え分子を意味し、少なくともＴＣＲ Ｖ－αおよびＶ－β鎖、またはＴＣＲ Ｖ－γおよびＶ－δ鎖の一部を含む分子、および各鎖の全長、またはそれを含む分子である。好適な鎖長は、ＭＨＣ分子に関連するスーパー抗原またはより好適には抗原に特異的に結合し得るか、または異質反応性ＭＨＣ分子に結合し得るポケットまたは溝を形成するのに十分な長さである。殆どの場合、ＴＣＲ分子は複数の非共有結合を介してＭＨＣ抗原分子に結合する。適切なＴＣＲ分子は特定のアッセイフォーマットに必要とされる一価または多価である。かかるＴＣＲ分子を同定する方法は既知であり、以下に記載のような標準的ＴＣＲ結合試験を包含する。

【００６０】

本発明にて使用し得るＴＣＲ分子の例は以下に開示されている。米国特許出願番号０８／９４３，００６（発明の名称：Ｓｏｌｕｂｌｅ Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｈａｉｎ Ｔ ｃｅｌｌ Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ （可溶性一本鎖Ｔ細胞レセプター）；１９９７年１０月２日出願）；および出願番号０８／８１３，７３１（発明の名称：Ｆｕｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ Ｂａｃｔｅｒｉｏｐｈａｇｅ Ｃｏａｔ Ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ ａ Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｈａｉｎ Ｔ ｃｅｌｌ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ （バクテリオファージコートタンパク質と一本鎖Ｔ細胞レセプターからなる融合タンパク質）；１９９７年３月７日出願）；これらの開示は本明細書中に参考として援用される。

【００６１】

Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の各出願は、本方法での使用に適した多様なＴＣＲ分子およびその機能的フラグメントを記載している。例えば、適切なｓｃ－ＴＣＲ分子は適切なペプチドリンカー配列を介して共有結合したＶ－αおよびＶ－β鎖を含んでいる。特に、Ｖ－α鎖はＶ－α鎖のＣ－末端とＶ－β鎖のＮ－末端に融合した適切なペプチドリンカー配列を介してＶ－β鎖に共有結合することができる。ｓｃ－ＴＣＲ融合タンパク質のＶ－αとＶ－β鎖は一般に約２００～４００のアミノ酸長、好ましくは約３００～３５０のアミノ酸長があり、天然産のＴＣＲのＶ－αおよびＶ－β鎖に少なくとも９０％、好ましくは１００％一致している。「一致」という用語はＶ－αまたはＶ－β鎖のアミノ酸が、対応する天然産のＴＣＲ Ｖ－αまたはＶ－β鎖に１００％相同であることを意味する。

【００６２】

Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の出願に開示されているように、ｓｃ－ＴＣＲ分子のＶ－β鎖は、所望により、さらにＶ－β鎖のＣ－末端に融合したＣ－β鎖またはそのフラグメントを含むことができる。さらに、Ｖ－α鎖はＶ－α鎖のＣ－末端とペプチドリンカー配列のＮ－末端に融合したＣ－α鎖またはそのフラグメントを含むことができる。一般に、Ｃ－β鎖フラグメントを含むこれら融合タンパク質では、該フラグメントが約５０ないし１２６個のアミノ酸長を有し、通常、１２７位置に最末端システイン残基を含まない。Ｃ－α鎖からなるこれらの融合タンパク質では、その長さが約１～９０個のアミノ酸の間で変わり得る（すなわち、Ｃ－α鎖は末端システインまでであるが、それは含まない）。例えば、一態様において、融合タンパク質は１ないし７２のアミノ酸から始まる約１ないし７２のアミノ酸間にＣ－α鎖フラグメントを含む。もう一つの他の態様において、Ｃ－α鎖フラグメントは、最初のアミノ酸から２２番目（ロイシン）に始まる約１ないし２２のアミノ酸の間にある。Ｃ－α鎖フラグメントは一般にシステイン残基を含まないが、例外的に$C_{\infty 90}$変異体は２個のシステイン残基を含む。

【００６３】

Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の出願に記載されているように、完全可溶性の機能性タンパク質の発現を容易にするには、Ｉｇ－C_L鎖または適当なＩｇ－C_Lフラグメントをｓｃ－ＴＣＲ分子に、例えば、Ｖ－β鎖またはＣ－βフラグメントのＣ－末端に共有結合させる。一般に好ましくはないが、Ｉｇ－C_LまたはそのフラグメントをＶ－α鎖のＮ－末端に共有結合させることは可能である。殆どの場合に、Ｃα鎖とＣβ鎖の長さの選定は数種のパラメータ、例えば、選択した特定のＶ鎖、および可溶性融合分子の意図する用途により進める。

【００６４】

本発明のさらなるｓｃ－ＴＣＲタンパク質は、これらに限定されるものではないが、２つのペプチドリンカー配列を有するものであって、その第一ペプチドリンカー配列がＶ－α鎖のＣ－末端とＶ－β鎖のＮ－末端との間に融合したものである。Ｖ－β鎖のＣ－末端はＣ－β鎖フラグメントのＮ－末端に融合することができる。第二ペプチドリンカーは次いでＶ－β鎖またはＣ－β鎖フラグメントのＣ－末端、および、例えば、Ｉｇ－C_L鎖またはＩｇ－C_L鎖フラグメントのＮ－末端、またはエフェクターまたはタグ標識分子に融合する。

【００６５】

他の例示態様において、ｓｃ－ＴＣＲタンパク質はＶ－β鎖を適切なペプチドリンカーを介してＶ－α鎖に融合することにより調製し得るが、その際、Ｖ－β鎖またはそのＣ－β鎖フラグメントのＣ－末端およびＶ－α鎖のＮ－末端が共有結合する。Ｉｇ－C_L鎖またはフラグメントは所望する分子のＣ－またはＮ－末端に共有結合させることができるが、一般にはＣ－末端での結合が好ましい。

【００６６】

ｓｃ－ＴＣＲタンパク質のペプチドリンカー配列は一般にｓｃ－ＴＣＲ分子が天然産のＴＣＲ Ｖ－αおよびＶ－β鎖に類似する結合部位を形成するように選択する。Ｖ－αおよびＶ－β鎖は未誘発Ｔ－細胞から誘導し得るが、殆どの場合、Ｖ鎖は病状、例えば、免疫障害または疾患と関連したものである。

具体的に好適なリンカー配列はＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の出願全般に開示されている。

【００６７】

一つの例示としては、Ｖα，β鎖を隔てるペプチドリンカー配列は、所望するＭＨＣ抗原などのリガンドに特異的に結合し得るポケットにＶ－鎖を柔軟に位置づける。例えば、ｓｃ－ＴＣＲ融合タンパク質に結合するリガンドは、上記参照のＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の出願に記載されたアッセイにより測定されたＴ－細胞活性を調節するのに使用することができる。Ｉｇ－C_L鎖またはＩｇ－C_L鎖フラグメントとｓｃ－ＴＣＲ分子との融合はある設定において、例えば、ｓｃ－ＴＣＲの可

溶性発現を容易にし、細胞媒体などの水溶液にｓｃ－ＴＣＲの整合性を維持することにより、アッセイの性能を上昇させることができる。

【００６８】

上記およびＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の出願で考察したように、本発明のｓｃ－ＴＣＲ融合タンパク質は、所望により、例えば、ｓｃ－ＴＣＲ分子のＣ－末端に共有結合したＩｇ－C_L鎖または適切なＩｇ－C_L鎖フラグメントを含有し得る。一態様において、ｓｃ－ＴＣＲ融合タンパク質は、融合した哺乳動物Ｉｇ－C_L鎖、好ましくは完全長のマウスまたはヒトのＩｇ－C_L鎖、例えば、Ｃκ鎖を含む。数種のＩｇ－C_L鎖の核酸およびタンパク質配列は文献開示されている。参照例：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（基礎免疫学）（１９９３）３ｒｄ Ｅｄ．，Ｗ．Ｐａｕｌ Ｅｄ．Ｒｓｅｎ Ｐｒｅｓｓ Ｌｔｄ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ａｎｄ Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（免疫学の対象となるタンパク質の配列）（５ｔｈ Ｅｄ．）Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ。

【００６９】

Ｉｇ－C_L鎖という用語は免疫グロブリンの軽鎖定常領域を含み、該領域は開示された完全長配列から１個以上のアミノ酸の置換または付加により変化する。例えば、１個のアミノ酸は開示されたＩｇ－C_L鎖配列に、その鎖の一端または両端で、例えば、常套の組換え法により付加することができる。さらに、組換え法は鎖の所定のアミノ酸を置換することにも使用し得る。一般にアミノ酸の付加は約１～３０個の中性または親水性アミノ酸、好ましくは約１～１０個のそのようなアミノ酸で行う。Ｉｇ－C_L鎖で別のアミノ酸と置換されるアミノ酸は同類または非同類アミノ酸置換である。従って、Ｉｇ－C_L鎖配列のチロシンアミノ酸がフェニルアラニンと置換されたのは同類アミノ酸置換の例であり、一方、アラニンと置換されたアルギニンは非同類アミノ酸置換の代表例であろう。Ｉｇ－C_L鎖フラグメントについて以下に指摘するように、融合Ｉｇ－C_L鎖からなるｓｃ－ＴＣＲ融合タンパク質は完全溶解性であり、機能的である。

【００７０】

本方法の一部態様においては、Ｉｇ－C_L鎖フラグメント、例えば、マウスまたはヒトのＣκ鎖フラグメントを使用することが有用である。例えば、適切なＩｇ－C_L鎖フラグメントは、融合タンパク質の分子量を最小化することが望ましい場合、ｓｃ－ＴＣＲ分子に融合することができる。「適切なＩｇ－C_L鎖フラグメント」という語句または関連用語は、所望のｓｃ－ＴＣＲ分子に融合したときに、下記定義の完全可溶性の機能的ｓｃ－ＴＣＲ融合タンパク質を形成するＩｇ－C_Lフラグメントを意味する。所望のＩｇ－C_L鎖フラグメント（ＣκおよびＣλ型の両者）は標準的な組換え方法に従い、例えば、マウスまたはヒトのＣκまたはＣλ鎖フラグメントのＰＣＲ増幅と、引き続きＰＣＲ産物を所望のｓｃ－ＴＣＲ分子をエンコードするＤＮＡセグメントまたはベクターへ連結することにより調製することができる。以下に示すように、ＰＣＲ産物はクローニングを容易にするために、制限酵素の切断部位を含むように操作することができる。一般に、適切なマウスまたはヒトのＣκ鎖フラグメントは、そのアミノ酸の長さが、約７０～１５０、好ましくは約９０～１２０、より好ましくは約１００～１１０個である。適切なマウスまたはヒトのＣκ鎖ＤＮＡ配列を下記に開示する。下記実施例５、６および７参照。

【００７１】

Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の出願に開示された好適なｓｃ－ＴＣＲタンパク質は完全に機能的、かつ可溶性である。「完全に機能的」という用語は、融合タンパク質がリガンド、特にＭＨＣ抗原に特異的に結合することを意味する。かかる特異的結合を検出するアッセイが本明細書に開示されており、ウエスタン・ブロッティングなどの標準的免疫ブロット技法を包含する。

【００７２】

「特異的に結合」または同様の用語は、本明細書では、抗体と抗原間の結合を記載するた

めに使用する。抗体（好ましくはモノクローナル抗体）は抗原に結合して特異な結合対を形成する。一般に、該抗体はウエスタン・ブロッティング、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ゲル移動度変異分析、酵素免疫アッセイ、競合アッセイ、飽和分析法または他の適切なタンパク質結合アッセイにより測定した場合、他の分子は認識せず、結合しない。

【００７３】

「特異免疫複合体」という用語または同様の用語は、本明細書では、特異的ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原分子とを含む結合対に言及するのに使用する。特異的免疫複合体は一つの型の抗原または一つ以上の型のものを含み得るが、ただし各抗原分子は特異結合対の形成を容易にする（すなわち、ＴＣＲ：抗原：ＭＨＣ分子）。

【００７４】

特異免疫複合体の検出法は既知であり、本発明の意図した用途に応じて変化する。例えば、スクリーニングを実質的に無細胞フォーマットにて実施する態様において（すなわち、タンパク質－タンパク質に基づき）、好適な方法はウエスタン・ブロッティング、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ゲル移動度変異分析、酵素免疫アッセイ、競合アッセイ、飽和分析法または他の適切なタンパク質結合アッセイである。１種以上の細胞応答を候補化合物の同定に使用する選抜法など、本発明の細胞に基づく態様において、これら応答の検出は特異的免疫複合体の形成を指標として実施する。適切な細胞応答の例は以下に示すが、サイトカインの産生、特にＴ細胞からの産生を含む。

【００７５】

Ｕ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の出願に開示されたｓｃ－ＴＣＲ融合タンパク質はＶα，β鎖からなり、この鎖については実質的に完全長のコーディング配列が容易に入手し得る。細胞起源からの完全長ＴＣＲ Ｖ鎖配列の取得方法は既知である。別法として、Ｖα，β鎖領域は公的に入手可能なＶα，β鎖のＰＣＲ増幅により取得し得るが、該鎖については少なくとも配列の一部が既知である。典型的なＶβ遺伝子配列は、Ｖβ８．１、Ｖβ６．１、Ｖβ５．１、Ｖβ５．２、Ｖβ５．３、Ｖβ２．１、およびＶβ２．３遺伝子配列を含む。参照文献：Ａｂｅ ｅｔ ａｌ．（１９９２）ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）８９：４０６６；Ｗａｎｇ，ｅｔ ａｌ．（１９９３）；ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）９０：１８８；Ｌａｈｅｓｍａ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：４１２５；Ｋｏｔｚｉｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９９１）ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）８８：９１６１；Ｕｅｍａｔｓｕ，ｅｔ ａｌ．（１９９１）ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）８８：８５３４。追加のＴＣＲ Ｖ鎖配列については Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．ｓｕｐｒａ ａｎｄ Ｃｈｏｔｉａ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．，（１９８８）ＥＭＢＯ Ｊ．７：３７４５ も参照。

【００７６】

特に、ＵＳＳＮ０８／９４３，０６６出願の実施例３および図７と８は種々のＶ－α鎖およびＶ－β鎖を増幅するＰＣＲ用のオリゴヌクレオチドプライマーを提供している。

【００７７】

ＵＳＳＮ０８／９４３，０６６出願に特定して開示されているように、典型的なｓｃＴＣＲ融合タンパク質は一般に共有結合により配列に組み込まれたＤＮＡセグメントによりエンコードされる：プロモーター／リーダー配列／Ｖ－α鎖／一本鎖リンカー配列／Ｖ－β鎖／Ｃκ鎖；プロモーター／リーダー配列／Ｖ－α鎖／一本鎖リンカー配列／Ｖ－β鎖、Ｃ－β鎖フラグメント／Ｃκ鎖；プロモーター／リーダー配列／Ｖ－α鎖、Ｃ－α鎖／一本鎖リンカー配列／Ｖ－β鎖／Ｃκ鎖；またはプロモーター／リーダー配列／Ｖ－α鎖、Ｃ－α鎖フラグメント／一本鎖リンカー配列／Ｖ－β鎖、Ｃ－β鎖フラグメント／Ｃκ鎖。典型的なｓｃ－ＴＣＲ分子は上記のとおりであるが、例外としてＣκ鎖はＤＮＡセグメントによりエンコードされない。ｓｃ－ＴＣＲタンパク質をエンコードするＤＮＡベクターは融合タンパク質の可溶性発現のために所望の細胞、例えば、本明細書に開示の特異的発現系に導入される。

【００７８】

ｓｃＴＣＲ分子を調製し、それを使用するためのより具体的なベクターについてはＵ．Ｓ

．Ｓ．Ｎ．０８／９４３，００６および０８／８１３，７３１の出願全般に教示されている。

【００７９】

本発明方法はヘテロ二量体フォーマットにおいてこれらを含む他のＴＣＲ分子の使用にも適合する。かかる分子の例は免疫グロブリン定常領域に共有結合したＴＣＲ Ｖ鎖である。参照例：Ｇｒｅｇｏｉｒｅ，Ｃ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）ＰＮＡＳ，８８，８０７７（カッパ軽鎖（Ｃκ）のＣ領域に結合したＣα、Ｖα配列を含むヘテロ二量体αβＴＣＲ鎖の調製法および使用法についての報告）。本文献はＶβＣβＣκ配列も開示した。参照文献：Ｗｅｂｅｒ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｎａｔｕｒｅ，３５６：７９３。

【００８０】

本発明で使用する他のｓｃＴＣＲ分子の調製法および使用法についての例は以下の文献参照：Ｎｏｖｏｔｎｙ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）８８，８６４６（１９９１）；Ｓｏｏ Ｈｏｏ，Ｗ．Ｆ．ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）８９，４７５９（１９９２）；Ｗｕｌｆｉｎｇ，Ｃ．ａｎｄ Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４２，６５５（１９９４）；Ｋｕｒｕｃｚ，Ｉ．ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）９０，３８３０（１９９３）；ＰＣＴ ＷＯ９６／１３５９３；Ｗａｒｄ，Ｅ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２４，８８５，（１９９２）；Ｓｃｈｌｕｅｔｅｒ，Ｃ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２５６，８５９（１９９６）；Ｍａｒｉｕｚｚａ，Ｒ．Ａ．ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ，Ｇ．，（１９８９）２６４：７３１０；Ｇａｓｃｏｉｇｎｅ，Ｎ．Ｒ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）（１９８７），８４：２９３６。

【００８１】

本発明に従い使用し得る好適なＴＣＲ分子はＴＣＲとＭＨＣ抗原との特異的結合を可能とする十分なサイズのものである。ＭＨＣ抗原がペプチド－ＭＨＣ分子である場合の態様において、ＴＣＲ分子はＭＨＣ－ペプチド結合ポケットを形成するＣＤＲ結合ループを少なくとも含んでいる。ＭＨＣ－ペプチド結合ポケットを含む有用なα／βＴＣＲ分子は、好ましくは、少なくともα鎖可変ドメイン（α鎖ＣＤＲの長さに応じてアミノ酸１近辺からアミノ酸１１０ないし約１３０近辺）とβ鎖可変ドメイン（β鎖ＣＤＲの長さに応じてアミノ酸１近辺からアミノ酸１１０ないし約１３０近辺）からなる。

【００８２】

本発明に従い使用し得るより好適なＴＣＲ分子は、標準的なＴＣＲ結合試験において、有意な結合活性を示す。好ましくは、ＴＣＲ分子はその同族体ＭＨＣ抗原分子に、少なくとも約５０％、好ましくは少なくとも約８０％、より好ましくは適切なコントロールと同程度の少なくとも約９０％ないし９９％のレベルで特異的に結合する。適切なコントロールの例は天然に存在するＴＣＲ分子（すなわち、野生型ヘテロ二量体として）または組換えＴＣＲとして存在する。殆どの場合に、該コントロールは完全溶解組換えＴＣＲ、好ましくは可溶性一本鎖ＴＣＲである。

【００８３】

かかるアッセイにおいて、固相化ＭＨＣ抗原とＴＣＲの相互作用はＢＩＡコア２０００システム（ＢＩＡコア・インク）による表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によりモニターする。一般に、約５００～５０００共鳴単位（ＲＵ）のＭＨＣ抗原が、標準的ＮＨＳ／ＥＤＣカップリング化学によりＢＩＡコアＣＭ５チップに結合する。主題のＴＣＲとコントロールＴＣＲ（ＰＢＳ中）は別個に１０～５０μｌ／分の流速でＭＨＣ抗原表面に注入する。多重注入は各ＴＣＲ濃度を２μＭないし２０μＭの範囲として実施する。ＳＰＲの結合曲線に基づき、ＢＩＡエバリュエーション２．１ソフトウエア（ＢＩＡコア・インク）を用いて速度定数分析を実施する。会合・解離速度定数、親和定数、およびコントロールＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用の半減期の計算値を１００％とする。

【００８４】

「ＭＨＣ抗原」という用語または関連語句は本発明のスクリーニング方法に使用される複

数の形状を含み、ＴＣＲに特異的に結合するＭＨＣに基づく分子に関連して使用する。ＭＨＣ抗原は、これらに限定されるものではないが、ＭＨＣ／ペプチド複合体、ＭＨＣ／スーパー抗原複合体、ＭＨＣ／脂質（または糖脂質）複合体または異質反応性（異種反応性）ＭＨＣ分子からなり得る。ＭＨＣ抗原のＭＨＣ成分は、これらに限定されるものではないが、古典的または非古典的ＭＨＣクラスＩａ、クラスＩｂまたはクラスＩＩ分子、またはＭＨＣ相同体からなり得る（ヒトＨＬＡ分子を含む）（参照文献：Ｍａｅｎａｋａ，Ｋ＆Ｊｏｎｅｓ，Ｅ．Ｙ．１９９９．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．９：７４５－７５３）。本発明のスクリーニング法に使用されるＭＨＣ成分は天然産または組換え分子を意味し、少なくとも各鎖の全長までの、そしてそれを含むＭＨＣ鎖の一部を含む。一態様において、これらの鎖は提示ペプチド（または脂質）に特異的に結合し得るペプチド（または脂質）結合溝または間隙を形成するのに十分なものである。本発明によると、提示ペプチドは「エンプティ」ＭＨＣ成分のペプチド結合溝に安定な水素結合を介して非共有結合し得る。かかる複合体はしばしば「負荷される」という。また、本発明によると、ＭＨＣ抗原分子は米国特許５，８６９，２７０に開示されたクラスＩおよびクラスＩＩ分子などの共有結合（すなわち、融合）した提示ペプチドを包含する；該米国特許の開示は本明細書中に参考として援用される。本発明にて使用し得る適切なＭＨＣ抗原分子は以下に記載するように、一価ないし多価であってもよい。該ＭＨＣ抗原分子が天然産または組換えのクラスＩ分子である態様において、ＭＨＣ抗原分子はさらに天然産または組換えのβ２－ミクログロブリン分子を含んでもよい。

【００８５】

もう一つの態様において、ＭＨＣ抗原分子は少なくとも各鎖の全長までの、そしてそれを含むＭＨＣ鎖の一部およびスーパー抗原鎖を含む天然産または組換え分子からなり得る。これらの鎖はＭＨＣ／スーパー抗原複合体を形成するのに充分なものである。スーパー抗原はＴＣＲの他の部分の性質に関係なく、特定のＶ遺伝子セグメントを利用してＴＣＲに結合し得るタンパク質である。参照文献：Ｋｏｔｚｉｎ，Ｂ．Ｌ．ｅｔａｌ（１９９３）Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５４：９９－１６６。本発明の好適なスーパー抗原はＭｌｓ抗原、ＳＥＡ、ＳＥＢ、ＳＥＣ１、ＳＥＣ２、ＳＥＣ３、ＳＥＤ、ＳＥＥ、ＳＰＥ－Ａ、ＳＰＥ－Ｂ、ＳＰＥＣ、ＥｘＦＴおよびＴＳＳＴである。

【００８６】

もう一つの態様において、ＭＨＣ抗原分子は少なくとも各鎖の全長までの、そしてそれを含む異質反応性（異種反応性）ＭＨＣ鎖の一部を含む天然産または組換え分子からなり得る。これらの鎖は異質反応性ＭＨＣ複合体を形成するために充分なものである。異質反応性ＭＨＣ分子は（自己）Ｔ細胞により外来分子と認識される非自己ＭＨＣ分子である。ＴＣＲの異質反応性ＭＨＣ分子への結合は、ＭＨＣ分子に結合する特定のペプチド抗原に依存していても、していなくともよい。参照文献：Ｏｂｓｔ，Ｒ．ｅｔａｌ．（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９１：８０５－８１２。

【００８７】

クラスＩ分子は内在性膜タンパク質であり、３つの細胞外ドメイン（すなわち、α１、α２およびα３）を有する糖タンパク質重鎖、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含んでなる。該重鎖は非共有結合により可溶性サブユニットβ２－ミクログロブリンと会合している。重鎖のα１およびα２ドメインは折りたたまれてペプチド結合溝を形成する。重鎖とβ２－ミクログロブリン間の会合はペプチド結合溝を安定化する働きをする。ＭＨＣ成分がクラスＩ分子である態様において、該ＭＨＣ成分は天然産または組換えクラスＩ重鎖（またはそのフラグメント）および天然産または組換えβ２－ミクログロブリン分子（またはそのフラグメント）の組み合わせから成り立ち得る。他の態様において、ＭＨＣ成分はクラスＩ重鎖の一本鎖構築物（またはそのフラグメント）およびβ２－ミクログロブリン分子（またはそのフラグメント）から成り立ち得る。本発明のＭＨＣ成分はクラスＩ重鎖のいずれかのフラグメント（いずれかの分子配列において）および／またはβ２－ミクログロブリンからなり、機能的ＭＨＣ抗原の形成を可能とするために充分なものである（すなわち、ＴＣＲとの特異的相互作用を可能とするＭＨＣ抗原）。本発明のＭＨＣ成分

はまたクラスＩＩ鎖のいずれかのフラグメント（いずれかの分子配列において）、クラスＩ重鎖および／またはβ２－ミクログロブリンのキメラ分子からなり、機能的ＭＨＣ抗原の形成を可能とするために充分なものである。

【００８８】

本発明での使用に適したさらなるＭＨＣ抗原分子は、米国特許出願番号０８／７７６，０８４（発明の名称：ＭＨＣ Ｃｏｍｐｌｅｘｅｓ ａｎｄ Ｕｓｅｓ Ｔｈｅｒｅｏｆ （ＭＨＣ複合体およびその用途）；１９９７年１月１７日出願；この出願はＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ９５／０９８１６に基づくものであり、１９９５年２月１日に出願された米国特許出願番号０８／３８２，４５４の継続出願であり、後者の出願は１９９４年７月２９日に出願された米国特許出願番号０８／２８３，３０２の継続出願である；本出願の開示は本明細書中に参考として援用される。

【００８９】

特に、当該０８／７７６，０８４、ＰＣＴ／ＵＳ９５／０９８１６、０８／３８２，４５４、および０８／２８３，３０２の特許出願に開示されたものは、本発明での使用に適した多様なヘテロ二量体ＭＨＣ分子（クラスＩおよびクラスＩＩ）である。参照文献：ＭｃＣｌｕｓｋｅｙ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４１：１４５１；ＰＣＴ／ＵＳ９２／１００３０；および米国特許５，８２０，８６６（ｔｏ Ｋａｐｐｌｅｒ ａｎｄ Ｍａｒｒａｃｋ）（さらなるクラスＩおよびクラスＩＩ ＭＨＣ分子を開示）；これらの開示は本明細書中に参考として援用される。

【００９０】

さらに適切なＭＨＣ抗原分子は米国特許出願番号０８／９６０，１９０（発明の名称：Ｓｏｌｕｂｌｅ ＭＨＣ Ｃｏｍｐｌｅｘｅｓ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｕｓｅ Ｔｈｅｒｅｏｆ （可溶性ＭＨＣ複合体およびその使用方法）；１９９７年１０月２９日出願）；ＰＣＴ：ＷＯ９６／０４３１４；およびＰＣＴ９７／２８１９１；これらの開示は本明細書中に参考として援用される。

【００９１】

簡単に説明すると、該出願は本発明での使用に適した極めて有用な一本鎖（「ｓｃ－」）ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩ複合体を開示している。特定して開示されているのは、ｓｃ－ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩ複合体であって、組換えにより融合した提示ペプチド（ｓｃ－ＭＨＣペプチド融合分子という）、エンプティｓｃ－ＭＨＣ分子（組換えにより融合した提示ペプチドを有しないという）、および負荷されたｓｃ－ＭＨＣ複合体（非共有結合により付加した提示ペプチドと含むという）などを有するものである。

【００９２】

より詳しくは、修飾クラスＩＩβ２鎖および／または融合Ｉｇ－C_L鎖もしくは規定どおりの適当なＩｇ－C_L鎖フラグメントをもつ様々なｓｃ－ＭＨＣ分子の調製法および使用法が０８／９６０，１９０；ＰＣＴ：ＷＯ９６／０４３１４；およびＰＣＴ９７／２８１９１の出願に開示されている。また、修飾クラスＩＩβ２鎖および／または融合Ｉｇ－C_L鎖もしくはＩｇ－C_L鎖フラグメントを有するか、または有しない「多特異性」ＭＨＣ複合体と言われる複合体も報告されている。

【００９３】

参照：米国特許５，８６９，２７０（Ｒｈｏｄｅ，Ｐ．ｅｔ ａｌ．に付与）（本発明にて使用し得るさらに好適なｓｃ－ＭＨＣ分子を開示）；この開示はすでに本明細書中に参考として援用されている。

【００９４】

本発明より使用し得る特定のＭＨＣ抗原分子は、ＭＨＣ抗原がＴＣＲに特異的に結合することの可能な十分なサイズのＭＨＣ成分を含む。ＭＨＣ抗原がペプチド－ＭＨＣ分子である態様において、ＭＨＣ成分は少なくともペプチドが結合する溝を有している。ペプチド結合溝を有する有用なクラスＩＩ ＭＨＣ成分は、少なくともクラスＩＩα１ドメイン（α鎖のアミノ酸１の近辺からアミノ酸８４の近辺）およびβ１ドメイン（β鎖のアミノ酸１の近辺からアミノ酸９５の近辺）からなる。ペプチド結合溝を有する有用なクラスＩ

ＭＨＣ成分は、少なくともクラスＩα１およびα２ドメイン（重鎖のアミノ酸１の近辺からアミノ酸１８２の近辺）からなる。ＭＨＣ抗原が異質反応性ＭＨＣ分子である態様において、ＭＨＣ成分は少なくとも異質反応性ＭＨＣ決定基を含み、異質反応性がペプチドに依存する場合には、ペプチド結合溝を有する。異質反応性ＭＨＣ決定基の性質とペプチドへの依存性はＴＣＲの特異性により変わり、実験的に決定することができる。参照：Ｏｂｓｔ，Ｒ．ｅｔａｌ．（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９１：８０５－８１２。ＭＨＣ抗原がスーパー抗原－ＭＨＣ複合体である態様において、ＭＨＣ成分は少なくともスーパー抗原結合部位を有している。ＭＨＣ成分上のスーパー抗原結合部位はペプチド－結合溝の外側にあり、スーパー抗原成分によって変化する。参照文献：Ｋｏｔｚｉｎ，Ｂ．Ｌ．ｅｔａｌ（１９９３）Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５４：９９－１６６。適切なＭＨＣ抗原分子を同定する方法は下記の標準的なＭＨＣ抗原結合試験である。

【００９５】

本発明に従い使用し得るより好適なＭＨＣ抗原分子は、標準的なＭＨＣ抗原結合試験と言われる方法において、有意な結合活性を示す。好ましくは、ＭＨＣ抗原分子はその同族体ＴＣＲ分子に対して、少なくとも約７０％、好ましくは少なくとも約８０％、より好ましくは適切なコントロールと同程度の少なくとも約９０％ないし９９％のレベルで特異的に結合する。適切なコントロールの例は天然に存在するＭＨＣ分子（すなわち、野生型ヘテロ二量体として）または組換えＭＨＣ抗原分子として存在する。殆どの場合に、該コントロールは完全溶解組換えＭＨＣ抗原分子、好ましくは可溶性一本鎖ＭＨＣ抗原分子である。かかる分子の調製法および使用法については米国特許５，８６９，２７０を含む上記文献に詳細に記載されている。

【００９６】

かかるアッセイにおいて、固相化ＴＣＲとＭＨＣ抗原との相互作用はＢＩＡコア２０００システム（ＢＩＡコア・インク）による表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によりモニターする。一般に、約５００～５０００共鳴単位（ＲＵ）のＴＣＲが、標準的ＮＨＳ／ＥＤＣカップリング化学によりＢＩＡコアＣＭ５チップに結合する。主題のＭＨＣ抗原とコントロールＭＨＣ抗原（ＰＢＳ中）は別個に１０～５０μｌ／分の流速でＴＣＲ表面に注入する。多重注入は各ＭＨＣ抗原濃度を２μＭないし２０μＭの範囲として実施する。ＳＰＲの結合曲線に基づき、ＢＩＡエバリュエーション２．１ソフトウエア（ＢＩＡコア・インク）を用いて速度定数分析を実施する。会合・解離速度定数、親和定数、およびコントロールＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用の半減期の計算値を１００％とする。

【００９７】

考察したように、一定の発明の態様においては、脂質、糖脂質、異質反応性、異種反応性および／またはスーパー抗原成分を含むＭＨＣ分子を使用することが有用である。

【００９８】

ＭＨＣ／脂質および糖脂質分子が対象となる態様においては、本発明で使用し得るＭＨＣクラスＩ－様ファミリーの分子が存在する。当該ファミリーの好適なメンバーはＣＤ１ファミリーとして知られる。この特異的なファミリーは細菌性脂質抗原をＴ細胞に提示することができると判明している。これら複合体の具体例はＣＤ１ｃ／ヘキソシル－１－ホスホイソプレノイド、ＣＤ１ｃ／マンノシル－ベータ１－ホスホドリコール、ＣＤ１ｂ／リポアラビノマンナン、ＣＤ１ｂ／ミコール酸脂質などである。参照一般文献：Ｍｏｏｄｙ　ＤＢ，ｅｔａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．１７２：２８５－９６並びにそこに開示された文献。

【００９９】

本発明により使用し得る特定の異質反応性ＭＨＣ分子は、臓器または組織移植片中に存在する殆どのヒトＭＨＣ分子を包含し得る。好ましくは、当該分子は宿主が共有しない（宿主－対－移植片Ｔ細胞応答に導く）か、または移植片が共有しない宿主に存在するどのＭＨＣ分子も共有しない（移植片－対－宿主Ｔ細胞応答に導く）。一般に、移植片の生存はＭＨＣクラスＩＩ抗原に対する異質反応応答の低下にもっとも依存する。より特異的な異質反応性ＭＨＣ分子は白人種集団に優位に存在する分子であり、例えば、ＨＬＡ－Ａ１、

ＨＬＡ－Ａ２、ＨＬＡ－Ｂ７、ＨＬＡ－Ｂ３５、ＨＬＡ－Ｂ４４、ＨＬＡ－ＤＲ１、ＨＬＡ－ＤＲ２、ＨＬＡ－ＤＲ３、ＨＬＡ－ＤＲ４、ＨＬＡ－ＤＲ５、ＨＬＡ－ＤＲ６、ＨＬＡ－ＤＲ７、ＨＬＡ－ＤＱ６、ＨＬＡ－ＤＱ７およびＨＬＡ－ＤＱ８を包含する。参照一般文献：Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ３ｒｄ Ｅｄ．Ａｂｂａｓ，Ｌｉｃｈｔｍａｎ，Ｐｏｂｅｒ，Ａｂｂａｓ ａｎｄ Ｓｃｈｍｉｔｔ，Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，１９９７。

【０１００】

さらに、異種移植片ＭＨＣ分子などの多くの異種反応性ＭＨＣ分子を本発明で使用することが可能である。より具体的な例はブタの異種移植片臓器移植におけるブタのＭＨＣ分子、異種移植片Ｔ細胞に反応性のヒトＭＨＣ分子などである。好適なヒトＭＨＣ分子は上記掲載のものである。好適なブタＭＨＣ分子はＳＬＡ－１ないし６、ＳＬＡ－ＤＲ、およびＳＬＡ－ＤＱ分子である。参照一般文献：Ｃｈａｒｄｏｎ Ｐ，ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｒｅｖ．１６７：１７９－９２ およびそこに開示の文献。

【０１０１】

本発明にて使用し得るさらに有用なＴＣＲ分子およびＭＨＣ抗原分子は下記実施例の項に開示する。

【０１０２】

もう一つの側面において、本発明は本明細書に開示した方法により検出・同定される適切な試験化合物を提供する。

【０１０３】

考察したように、本発明の実施により、タンパク質：タンパク質、タンパク質：細胞、または細胞：細胞のアッセイフォーマットにおいて、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の相互作用を調節する試験化合物の検出が可能となる。さらに考察したように、関連のＴＣＲとＭＨＣ抗原相互作用は、一般には得られる免疫複合体を介して検出されるが、必要に応じて直接または間接に測定することができる。

【０１０４】

本発明の特定の方法はＴＣＲ分子と相互作用する（例えば、結合する）試験化合物を検出・同定するように設計する。用語「相互作用する」はＴＣＲ分子の細胞外ドメイン（ＥＣＤ－ＴＣＲ）または細胞質ドメイン（ＣＤ－ＴＣＲ）を包含することを意味するが、これのみに限定されるものではない。好適な相互作用は同族体ＭＨＣ抗原分子に対する特異的結合を受け容れる結合部位、ポケットまたは溝において、またはその近傍で起こる。このように特別に興味のある試験化合物は、適切なＭＨＣ分子の環境にあるスーパー抗原またはペプチド抗原に、または異質反応性ＭＨＣ分子に結合し得るＴＣＲポケットまたは溝と相互作用する。

【０１０５】

さらなる方法はＭＨＣ抗原分子と相互作用する（例えば、結合する）化合物を同定するために設計する。このように、ＭＨＣ抗原分子の環境において「相互作用する」という用語は、これらに限定されるものではないが、ＭＨＣ分子の細胞外ドメイン（ＥＣＤ－ＭＨＣ）または細胞質ドメイン（ＣＤ－ＭＨＣ）、ペプチド抗原またはスーパー抗原を包含する。好適な相互作用はＴＣＲ分子との特異的結合に影響するＭＨＣペプチド（または脂質）結合溝および他の部位において、またはその近傍で起こる。より特殊の化合物はＭＨＣペプチド結合溝と、またはその溝の近傍でしばしば相互作用する。

【０１０６】

さらなる方法はＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体と相互作用する（例えば、結合する）化合物を同定するために設計する。このように、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体の環境において「相互作用する」という用語は、これらに限定されるものではないが、ＥＣＤ－ＴＣＲ、ＣＤ－ＴＣＲ、ＥＣＤ－ＭＨＣ、ＣＤ－ＭＨＣ、ペプチド抗原またはスーパー抗原を包含する。好適な相互作用は該複合体の安定性に影響を与える部位、またはその近傍で、または多量体を形成する複合体の能力に影響する部位、またはその近傍で起こる。

【０１０７】

本発明のスクリーニング方法に従って使用し得る適切な試験化合物は、これらに限定されるものではないが、ペプチド、ポリペプチド、抗体およびそのフラグメント、およびＴＣＲ分子、ＭＨＣ抗原分子およびその双方に結合する他の有機化合物（例えば、ペプチド模倣体および非ペプチド模倣体）を包含する；またＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の特異結合が引き金となる活性を模倣するか（すなわち、アゴニスト化合物）、あるいは引き金となる活性を阻害する（すなわち、アンタゴニスト化合物）；同様に、ペプチド、抗体またはそのフラグメント、および他の有機もしくは無機化合物であって、所望のＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原分子間の特異的結合を上昇または低下させ得る化合物である。

【０１０８】

かかる化合物は特に、これらに限定されるものではないが、ペプチド、例えば、可溶性ペプチドとして、これらに限定されるものではないが、ランダム・ペプチド・ライブラリー（参照例：Ｌａｍ，Ｋ．Ｓ．ｅｔａｌ．，１９９１，Ｎａｔｕｒｅ３５４：８２－８４；Ｈｏｕｇｈｔｅｎ，Ｒ．ｅｔａｌ．，１９９１，Ｎａｔｕｒｅ３５４；８４－８６）、およびコンビナトリアル化学誘導分子ライブラリーであって、Ｄ－および／またはＬ－配置アミノ酸、ホスホペプチド（これらに限定されるものではないが、ランダムまたは部分的に変性した定方向ホスホペプチド・ライブラリー；参照例：Ｓｏｎｇｙａｎｇ，Ｚ．ｅｔａｌ．，１９９３，Ｃｅｌｌ７２：７６７－７７８）により調製されたものである。また期待されるのは、抗体、並びに小型、中型および大型の有機または無機分子を含むか、またはそれらから構成される化合物である（該抗体は、これらに限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗イディオタイプ、キメラまたは一本鎖抗体、およびＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$およびＦａｂ発現ライブラリーフラグメント、およびそのエピトープ結合フラグメントを包含する）。参照例：米国特許５，９８０，８９２。

【０１０９】

本発明の使用に適する種々の分子ライブラリーの調製および使用に関係するより具体的な開示については、米国特許６，００１，５７９（タグ標識エンコード・コンビナトリアルライブラリー）、５，５７３，９０５（エンコード・コンビナトリアルライブラリー）、５，６３９，６０３（多様な分子ライブラリー）、および５，８８０，９７２（コンビナトリアル化学ライブラリーを調製する方法および装置）を参照；これらの開示は本明細書中に参考として援用される。追加参照文献：Ｎｉｅｌｓｅｎ，Ｊ．ｅｔａｌ．（１９９３）Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１５：９８１２；Ｂｒｅｎｎｅｒ，Ｓ．ａｎｄＲ．Ｌｅｒｎｅｒ（１９９２）ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）８９：５３８１－５３８３；ａｎｄＰｉｎｅｌｌａ，Ｃ．ｅｔａｌ．（１９９２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１３：９０１。ＥＰＯ公開番号０４３２６９１Ａ１（ＭＨＣ分子に結合するある種のペプチドを開示）も参照。

【０１１０】

別法として、またはさらに、多くの有用な化学ライブラリーは市場供給メーカー、例えば、ケムブリッジ（Ｃｈｅｍｂｒｉｄｇｅ）、アルクレ（ＡｒＱｕｌｅ）、コンビケム（ＣｏｍｂｉＣｈｅｍ）、ファーマコピア（Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａ）、トレガバイオファーマシューティカル（Ｔｒｅｇａ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、およびトリポス（Ｔｒｉｐｏｓ）などから入手し得る。

【０１１１】

しかし、ある幾つかの例では、試験化合物についてより焦点を絞った選抜が望ましい。これら事例の多くで、標準的コンピューターおよび検索技術が候補化合物の予備同定並びに以前に同定された化合物の取り扱いを可能にする。かかる化合物はこのように所定のＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子間の相互作用を調節する受容能力について「予備スクリーニング」することができる。かかる候補化合物の「予備スクリーニング」は以下の一般的工程を実施することにより遂行することができる：

【０１１２】

１．例えば、かかるＴＣＲとＭＨＣ抗原分子が特異的に相互作用して免疫複合体を形成す

ることを見出すことで、その活性部位または領域を同定する。かかる活性部位は一般にリガンド結合部位、例えば、ＴＣＲ分子、ＭＨＣ抗原分子、またはその両方の分子の相互作用ドメインであり得る。活性部位は標準的な方法、例えば、ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原ポリペプチド鎖のアミノ酸配列の確認から、またはＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原との複合体の研究から同定することができる。前者の場合、他のＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子上の既知活性部位と配列相同性を比較することにより、その活性部位を見出すことができる。後者の場合には、突然変異性、化学的またはＸ－線結晶学的方法を用いて、ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原上、何処に同族体リガンドが見出せるかを見出し、それを見出すことにより活性部位を見出すことができる。

【０１１３】

２．次に、活性部位の３次元幾何学的構造を決定する。この決定は既知方法、例えば、Ｘ－線結晶学により実施可能であり、原子レベルでのほぼ完全な分子構造を決定することができる。他方、固相または液相ＮＭＲを用い、一定の分子内距離を決定することができる。他の実験的構造決定方法を使用して、部分的または完全な幾何学的構造を得ることもできる。幾何学的構造は複合体化した天然または人工的リガンドについて測定し得るが、それによって決定した活性部位構造の精度を上昇させることができる。

【０１１４】

もし決定された構造の正確さが不完全または不十分であるならば、コンピューターに基づく数値モデル化の方法を用いて、構造を完全なものとするか、またはその精度を向上させることができる。モデル化方法の殆ど、例えば、タンパク質または核酸などの特定の生体高分子に特異的なパラメータ化モデル、コンピューターによる分子運動に基づく分子の動的モデル、熱集団に基づく統計力学モデル、または組み合わせモデルなどが使用し得る。殆どの型のモデルにおいて、構成する原子および基間の力を表す標準的分子力の場がしばしば必要であり、物理化学において既知の力の場から選択することができる。不完全なまたは精度の低い実験構造は、これらのモデル化方法によりコンピューター解析された完全なより精度の高い構造に対し、制約として働き得る。

【０１１５】

３．最後に、実験的に、モデル化することにより、またはその組み合わせにより活性部位の構造を決定したことにより、候補調節化合物は、化合物についてそれらの分子構造に関する情報を一緒に含むデータベースを検索し、同定することができる。かかる検索は決定された活性部位構造に適合し、かつ活性部位を規定する基と相互作用する構造の化合物を探索する。かかる検索は手作業でもよいが、好ましくはコンピューターの助けを借りる。この検索から見出された化合物は、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を調節する能力をもつ化合物と見なすことができる。

【０１１６】

あるいは、これらの方法は既知の調節化合物から改良した調節化合物を同定するために使用することができる。既知化合物の組成は改変することが可能であり、改変の構造に与える影響は、新しい組成に適用される上記の実験的およびコンピューター改変方法を使用して決定することができる。変更された構造は次いで該化合物の活性部位構造に比較し、改善されたものが適切であるか、または相互作用が生じるか判断することができる。このような方法で、組成中の系統的な変更、例えば、側基（例えば、メチル、ヒドロキシル、カルボニル、カルボキシル、水素など）を変えることによるなどの変更を迅速に評価し、改変された調節化合物または特異性もしくは活性の改善されたリガンドを得ることができる。

【０１１７】

分子モデル化システムの例は、チャーム（ＣＨＡＲＭＭ）およびクァンタ（ＱＵＡＮＴＡ）プログラム（ポリジェン・コーポレーション（Ｐｏｌｙｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）；ウオルサム（Ｗａｌｔｈａｍ）、マサチューセッツ）であるが、これらに限定されるものではない。チャームはエネルギーの最小化および分子力学関数を遂行する。クァンタは分子構造の構築、グラフモデル化、および分析を遂行する。クァンタは相互作用の構

築、改変、可視化、および分子同士の行動様式の分析を可能にする。特異タンパク質と相互作用する薬物などの化合物のコンピューターモデル化に関する全般的な開示については以下の文献を参照：Ｒｏｔｉｖｉｎｅｎ，ｅｔａｌ．，１９８８，Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｆｅｎｎｉｃａ ９７：１５９－１６６；Ｒｉｐｋａ，Ｎｅｗ Ｓｃｉｅｎｔｉｓｔ ５４－５７（Ｊｕｎ．１６，１９８８）；ＭｃＫｉｎａｌｙ ａｎｄ Ｒｏｓｓｍａｎｎ，１９８９，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｉｏｌ．２９：１１１－１２２；Ｐｅｒｒｙ ａｎｄ Ｄａｖｉｅｓ，ＯＳＡＲ：Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－Ａｃｔｉｖｉｔｙ Ｒｅｌａｔｉｏｎｓｈｉｐｓ ｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ（薬物設計における定量的構造－活性相関）ｐｐ．１８９－１９３（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．１９８９）；ａｎｄ Ｌｅｗｉｓ ａｎｄ Ｄｅａｎ，１９８９ Ｐｒｏｃ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｌｏｎｄ．２３６：１２５－１４０ ａｎｄ １４１－１６２。

【０１１８】

化学物質を選抜し、図式化して描く他のコンピュータープログラムは、バイオデザイン・インク（ＢｉｏＤｅｓｉｇｎ，Ｉｎｃ．）（パサデナ、カリフォルニア）、アレリックス・インク（Ａｌｌｅｌｉｘ，Ｉｎｃ．）（ミシソーガ（Ｍｉｓｓｉｓｓａｕｇａ）、オンタリオ、カナダ）、およびハイパーキューブ・インク（Ｈｙｐｅｒｃｕｂｅ，Ｉｎｃ．）（ケンブリッジ、オンタリオ）などの企業から入手し得る。これらは主として特定のタンパク質に特異的な薬物に適応するように設計されるが、それらは原理的にＴＣＲとＭＨＣ抗原の相互作用を調節する薬物の設計に適合させ得るはずである。かかる薬物は本発明の方法に従ってさらに選抜することができる。

【０１１９】

上記のコンピューター支援法は本発明の一部態様において、候補化合物を「予備スクリーニング」するために使用し得るが、候補化合物の既知ライブラリーについて本方法を使用するのが多くの場合より望ましい。あるいは、極めて有用な化学ライブラリーを確立された手法に従い調製し、使用することができる。かかるライブラリーは、制限なく、天然物または合成化学物質、および生物学的に活性な物質、例えば、アミノ酸（修飾アミノ酸を含む）、ペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質などである。かかるライブラリーはＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子間の相互作用のアンタゴニストまたはアゴニストとして作用する化合物を同定するために選択し得る豊富な候補化合物源として役立つ。一般参照文献：Ｄｒｅｗｓ Ｊ．（２０００）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７：１９６０－１９６４；Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ Ｓ．Ｌ．（２０００）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７：１９６４－１９６９。

【０１２０】

本発明の最適実施は許容し得るインビトロ検出フォーマットを使用することであるが、該フォーマットは、すでに考察したように、必要に応じて直接的または間接的であってもよい。好適な検出フォーマットは主題のＴＣＲ分子、ＭＨＣ抗原分子、またはその両方と相互作用する（例えば、結合する）化合物を検出するように設計する。かかる検出フォーマットは試験化合物の存在および非存在下に免疫複合体の存在を有益にモニターし、好適に定量する。

【０１２１】

既述のように、本発明は免疫複合体検出用フォーマットの一つまたは組み合わせと合致する。例えば、免疫複合体の存在（またはコントロール免疫複合体の一つでもよい）は確立された直接または間接検出原理に従って実現し得る。本発明分野の当業者は本明細書に提供した指針およびある場合には通常の実験の平均的レベルによって、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子の特定の組み合わせに対する操作可能な最適のアッセイ条件を決定することができるであろう。

【０１２２】

特定のフォーマットに関して、免疫複合体の存在を検出する一つの方法は、該複合体に特異的に結合し得る抗体を検出可能に標識することである。標識の一例は抗体を、通常はモ

ノクローナル抗体を酵素に結合し、検出可能に標識した抗体を酵素イムノアッセイ（ＥＩＡ）に使用することである。参照文献：Ｖｏｌｌｅｒ，Ａ.，“Ｔｈｅ Ｅｎｚｙｍｅ Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ（ＥＬＩＳＡ）”（酵素結合免疫吸着検定法）１９７８，Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｈｏｒｉｚｏｎｓ（診断への展望）２：１－７，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ Ｑｕａｒｔｅｒｌｙ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，Ｍｄ.；Ｖｏｌｌｅｒ，Ａ.ｅｔ ａｌ.，１９７８，Ｊ. Ｃｌｉｎ. Ｐａｔｈｏｌ. ３１：５０７－５２０；Ｂｕｔｌｅｒ，Ｊ.Ｅ.，１９８１，Ｍｅｔｈ. Ｅｎｚｙｍｏｌ. ７３：４８２－５２３；Ｍａｇｇｉｏ，Ｅ.（ｅｄ.），１９８０，Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌａ.，；Ｉｓｈｉｋａｗａ，Ｅ. ｅｔ ａｌ，（ｅｄｓ.），１９８１，Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ（酵素免疫測定法），Ｋｇａｋｕ Ｓｈｏｉｎ，Ｔｏｋｙｏ）。

【０１２３】

参照文献：Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（ｅｄｓ.）ｉｎ：Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（抗体：実験室マニュアル）１９８８，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；ａｎｄ Ｂｉｓｈｏｐ，Ｇ.Ａ. ｅｔ ａｌ.（１９９２）ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １２：３２６－３３０（細胞表面物質検出用細胞性ＥＬＩＳＡを開示）；ａｎｄ Ｋｅｌｌｙ，Ｔ.Ａ. ｅｔ ａｌ.（１９９９）Ｊ. ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌ. ５１７３－５１７７；これらの開示を本明細書中に参考として援用する。

【０１２４】

当該検出法のこの態様において、抗体に結合する酵素は、例えば、分光光度法、蛍光法により、または目視手段により検出し得る化学的部分を生じるような方式で適切な基質と、好ましくは色素原基質と反応する。抗体を検出可能に標識するのに使用し得る酵素は、これらに限定されるものではないが、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファグリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベーターガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼなどである。検出は酵素用色素原基質を使用する比色法により実施することができる。検出はまた基質の酵素反応の程度を、同様に調製した標準との比較により、目視比較することによっても実施し得る。

【０１２５】

良好な検出は他の様々なイムノアッセイ法を使用しても達成し得る。例えば、免疫複合体に特異的に結合し得る抗体または抗体フラグメントを放射活性標識することによって、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）の使用により、本発明方法でのＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を検出することが可能である（参照例：Ｗｅｉｎｔｒａｕｂ，Ｂ.，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ，Ｓｅｖｅｎｔｈ Ｔｒａｉｎｉｎｇ Ｃｏｕｒｓｅ ｏｎ Ｒａｄｉｏｌｉｇａｎｄ Ａｓｓａｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（ラジオイムノアッセイの原理；第７回放射リガンド検定技法訓練コース）、Ｔｈｅ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｅ Ｓｏｃｉｅｔｙ，Ｍａｒｃｈ，１９８６；本文献を本明細書中に参考として援用する）。放射活性同位体はガンマカウンターまたはシンチレーションカウンターなどの使用により、またはオートラジオグラフィーにより検出することができる。

【０１２６】

蛍光化合物により抗体またはそのフラグメントを標識することも可能である。蛍光体により標識された抗体またはそのフラグメントが適切な波長の光に露光すると、その存在を蛍光により検出し得る。もっとも共通に使用される蛍光標識化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フタルデヒド、およびフルオレスカミンである。

【０１２７】
さらに、該抗体またはそのフラグメントは^{152}Ｅｕなどの蛍光放出金属またはその他のランタニド系を使用して検出可能に標識することもできる。これらの金属はジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＤＴＰＡ）またはエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）などの金属キレート群を用いて抗体に結合することができる。
【０１２８】
例えば、パッカード・インストルーメント・カンパニー（Ｐａｃｋａｒｄ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ Ｃｏｍｐａｎｙ）が供給するユーロピウムを用いるアッセイの開発および高速大量処理スクリーニング用のＨＴＲＦ（均一系時間分解蛍光）抗体試薬参照。参照文献：米国特許４，５６８，６４９；ＥＰＯ０１５４７３４；および日本国特許出願番号８４－５２４５２；これらの開示を本明細書中に参考として援用する。
【０１２９】
抗体またはフラグメントを検出可能に標識する他の方法はこの分野での当業者に周知である。例えば、抗体は化学発光化合物に結合させることにより検出可能に標識することができる。化学発光タグ標識抗体の存在は、次いで化学反応の途上で生じる発光の存在を検出することにより判定することができる。とりわけ有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、サロマティック・アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、アダマンチルジオキセタマー、チオキセン誘導体、およびシュウ酸エステルなどである。さらに、抗体またはフラグメントは光増感剤化合物を用いて検出可能に標識することができる。参照文献例：米国特許５，８０７，６７５およびそこに開示された文献。
【０１３０】
さらに想定されるのは、一部または全体として、分子のビオチニル化に基づき、かつビオチニル化分子を可視化するストレプトアビジンまたはその接合体を用いる検出フォーマットである。このフォーマットのより具体的な例は以下の実施例で提供する。
【０１３１】
同様に、生物発光化合物を使用して、免疫複合体の存在を検出するために使用する抗体またはフラグメントを検出可能に標識することもできる。生物発光は生物系に見出される化学発光の一種であって、触媒のタンパク質が化学発光反応の効率を高める。生物発光タンパク質の存在は発光の存在を検出することにより測定される。標識目的のための重要な生物発光化合物はルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。
【０１３２】
抗体またはそのフラグメントは蛍光性を有するタンパク質で標識することもできる。かかるタンパク質の例は緑色蛍光タンパク質およびその誘導体である。
【０１３３】
さらに、バイオエフェクター・タグ標識を用いて、免疫複合体の存在を検出するために使用する抗体またはフラグメントを検出可能に標識することができる。バイオエフェクター・タグ標識は測定可能な生物応答、すなわち、インビトロで検出される細胞応答に影響し得る化合物である。有用なバイオエフェクター・タグ標識の例は、細胞性レセプターを標的とする天然または人工のリガンドまたは抗体（またはそのフラグメント）である。特に有用なバイオエフェクター・タグ標識はＩＬ－２などのサイトカイン類である。
【０１３４】
他の適切なタンパク質（および非タンパク質）タグ標識の例は、１９９７年３月７日出願の米国特許出願番号０８／８１３，７８１、並びに１９９９年１０月２１日出願の米国特許出願番号０９／４２２，３７５に開示されている；これら出願の開示を本明細書中に参考として援用する。かかるプローブの特定の例はＥＥ、ｍｙｃ、６Ｘｈｉｓである。さらに好適なのは、抗体、細胞レセプター、プロテインＡ、プロテインＧ、アビジン、ストレプトアビジン、またはその機能的フラグメントなどのタンパク質が特異的に結合するタグ標識である。さらに有用なタグ標識は、１種またはそれ以上のタンパク質分解酵素、プロテインキナーゼ、ビオチンリガーゼ、またはその機能的フラグメントにより直接または間

接に修飾し得る標識である。

【０１３５】

あるいは、免疫複合体を直接標識することは一部の態様において有用であり得る。これは種々の方法、例えば、ＴＣＲ分子、ＭＨＣ抗原分子、または試験化合物の少なくとも一つを適切に標識することによって達成し得る。標識すべき分子がタンパク質である場合、抗体の標識について本明細書に記載したいずれかの方法がＴＣＲおよび／またはＭＨＣ抗原分子を標識するために同様に使用し得る。ヨウ素、例えば、^{125}Ｉまたは^{131}Ｉなどの放射性核種（放射活性同位体）の使用も提案し得る。試験化合物を検出可能に標識する態様において、適切な放射性核種の選定は、試験化合物の化学的性質および必要とする感度の度合いに左右される。かかる放射性核種は^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐなどである。

【０１３６】

ＭＨＣペプチドを標識する特定の方法はＥＰＯ０４３２６９１Ａ１に開示されている。追加のペプチドも開示されている。参照文献：Ｈｅｍｍｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｊ．ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌ．３６３１－３６３６ および米国特許５，６１４，１９２（治療用Ｔ細胞レセプターペプチドを開示）。

【０１３７】

さらに特異的な検出フォーマットは本発明での使用によくマッチしている。

さらに特定の検出フォーマットは、例えば、少なくとも一つの細胞応答をモニターし、多くの場合定量することにより、免疫複合体の存在を検出することからなる。かかる細胞応答が免疫複合体の存在により影響を受けているかどうかを予め測定する。このように、本発明の多くの態様において、ある方法での細胞応答の検出を免疫複合体の存在の指標として採用する。適切な細胞応答の例は、細胞接着、膜電位、細胞内または細胞外イオン濃度、細胞内キナーゼ活性、ホスファターゼ活性、細胞内タンパク質輸送、内在性または異種遺伝子発現、少なくとも１種のサイトカインの産生を含むタンパク質の産生または分泌、細胞増殖、アポトーシス、ＲＮＡ合成、またはＤＮＡ合成の中の少なくとも一つを増大または減少させることである。一般参照文献：Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（細胞および分子免疫学）３rd Ｅｄ．Ａｂｂａｓ，Ｌｉｃｈｔｍａｎ，Ｐｏｂｅｒ Ａｂｂａｓ ａｎｄ Ｓｃｈｍｉｔｔ，Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，１９９７。

【０１３８】

勿論、タンパク質：タンパク質スクリーニング法を採用する本発明の態様においては、免疫複合体の形成をすでに考察した線に沿って直接または間接にモニターすることはより有益であり得る。

【０１３９】

しかし、ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子の少なくとも一方を細胞に基づくフォーマットにおいて操作する態様において、ある場合には、免疫複合体の指標であるとして細胞応答の少なくとも一つを検出することがより有用である。一態様において、ＴＣＲ分子を発現する細胞、例えば、Ｔ細胞、Ｔ細胞ハイブリドーマまたは組換えＴＣＲを発現する細胞は、細胞応答の少なくとも一つの発現についてモニターする。

【０１４０】

実例として、細胞がＴＣＲ分子を発現している態様において、検出される細胞応答の少なくとも一つは、少なくとも１種のサイトカイン、例えば、インターロイキン－２（ＩＬ－２）の細胞介在合成および分泌でもよい。本発明のこの例において、サイトカイン（または１種以上のサイトカイン）の産生は、１種以上の適切なコントロールと比較して、生産的ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用の指標、より具体的には免疫複合体の存在の指標として採用する。上に考察した方法を含む異なる対策の一つまたは組み合わせを用いて、特定のアッセイフォーマットにおいてサイトカインの存在を検出することができる。より特定した例では、サイトカインの検出は抗体「サンドイッチ」型アッセイで行うが、そこでは第一抗体（通常モノクローナル抗体）を固相支持体に被覆し、そこでそれが特異的にサイトカインに結合し、また第二抗体（通常これもモノクローナル抗体）が第一抗体とは異なる部

位で固定化されたサイトカインに結合する。多くの態様において、少なくとも第二抗体を検出可能に標識するのが一般に好適である。
サイトカインに関する考察についての参照文献：Ｓｃｈｗａｒｚ，Ｍ．Ｋ．ｅｔａｌ．（１９９９）ｉｎＣｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．ｉｎＣｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．３：４０７－４１７。

【０１４１】

さらなる態様において、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原免疫複合体の形成から生じる細胞応答は遺伝子発現の変化として検出し得る。遺伝子発現の変化は種々の方法、例えば、誘発性または抑制性遺伝子の転写活性またはメッセンジャーＲＮＡレベルの測定などによって、測定することができる。さらに、プロモーター活性の変化は内在性または外来性「レポーター」遺伝子を用い試験することができる。例えば、レポーター構築物は、ＩＬ－２プロモーターなどのＴＣＲ応答性プロモーター要素をホタル・ルシフェラーゼまたは緑色蛍光タンパク質などの検出可能なタンパク質のためのレポーター遺伝子に結合させ、生成させることができる。該構築物は次いで細胞表面にＴＣＲを発現する細胞株に安定的に導入することができる。これらの細胞において、レポーター遺伝子転写の誘発および生じるルシフェラーゼ活性の増加は、１種以上の適切なコントロールと比較して、生産的ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用の指標、より具体的には免疫複合体の存在の指標として採用する。ルシフェラーゼ活性はルシフェリン基質のルシフェラーゼ依存性酸化による生物発光を検出するための標準的方法により測定することができる。例えば、高速大量処理スクリーニングフォーマットにてルシフェラーゼ活性を測定するために特別に設計されたアッセイ試薬（ステディーグロＴＭ（Ｓｔｅａｄｙ－Ｇｌｏ^{TM}））は、プロメガ・コープ（ＰｒｏｍｅｇａＣｏｒｐ．）から入手し得る。

【０１４２】

なおさらなる態様において、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原免疫複合体の形成から生じる細胞応答は、細胞内イオン濃度の変化として検出し得る。例えば、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体の形成は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇とＴ細胞の酸性化に至らしめる。これら応答のレベルは、アゴニスト、部分的アゴニストおよびアンタゴニストとして作用するＭＨＣ抗原の能力と相関する（参照文献：Ｗｕｌｆｉｎｇ，Ｃ．ｅｔａｌ．１９９７，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８５：１８１５－１８２５）。本発明のこの例で、細胞内イオン濃度の変化は、１種以上の適切なコントロールと比較して、生産的ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用の指標、より具体的には免疫複合体の存在の指標として採用する。異なる対策の一つまたは組み合わせにより、特定のアッセイフォーマットにおいて細胞内イオン濃度の変化を検出することができる。より特定した例では、細胞内カルシウムイオンの動態化はフルオ－３ＡＭなどのフルオレセインに基づく試薬を用いて検出するが、これはその蛍光強度をCa^{2+}の結合により約１００倍に上昇させる。フルオ－３ＡＭ試薬と蛍光測定画像処理プレートリーダーを用いて細胞内カルシウム動態化を検出するための高速大量処理スクリーニング法（参照例：Ｊｕｒｅｗｉｃｚ，Ａ．ｅｔａｌ．（１９９９）Ｇｅｎｅｔ．Ｅｎｇ．Ｎｅｗｓ１９，４４）は、生産的ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体形成が介在するＴ細胞における細胞応答の研究に使用し得る。

【０１４３】

この特定分野の当業者にはすぐに明らかとなるように、特定の検出フォーマットの選定は、認知されたパラメータ、例えば、対象のＴＣＲとＭＨＣ分子、これら分子相互の親和性および／または親和性、および試験化合物の最適な検出に要求されるアッセイの特異性の度合いなどにより導かれる。

【０１４４】

特定の態様において、特定免疫複合体の特異的検出のために本発明を実施するには、適当な内部コントロールを含めることが一助となる。かかる内部コントロールはＴＣＲと非同族体ＭＨＣ抗原分子間、またはＭＨＣ抗原と非同族体ＴＣＲ間で形成されるコントロール複合体である。一般的に述べたように、適当な非同族体分子は天然産または組換え体であり、また有益には一連の完全溶解性または細胞固着（膜結合）分子である。形成されるコ

ントロール複合体の量は、ＴＣＲ（またはＭＨＣ抗原）とその非同族体対との間の非特異的会合の度合いを表すものであり、ＴＣＲと同族体ＭＨＣ抗原分子間の特異的相互作用を評価する場合のバックグランドコントロール値として使用することができる。

【０１４５】

「高速大量処理」または「超高速大量処理」スクリーニング法と言われている方法が望ましい態様においては、特定の検出フォーマットが極めて有用である。かかるフォーマットの例は、これらに限定されるものではないが、完全可溶性ＴＣＲとＭＨＣ分子を用いる本発明のこれらの態様などの無細胞系である。かかるフォーマットのより具体的な例は、これらに限定されるものではないが、光学的、蛍光もしくは発光強度に基づく無細胞アッセイ法、時間分解蛍光法、近接性に基づくエネルギー転移（蛍光共鳴エネルギー転移アッセイ、シンチレーション近接アッセイおよび発光近接アッセイを含む）、蛍光偏光分光測定法、および蛍光相関分光法などである。参照文献例：Ｓｉｌｖｅｒｍａｎ，Ｌ．ｅｔａｌ．（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．ｉｎＣｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２：３９７－４０３。

【０１４６】

様々な細胞に基づく検出フォーマットが本発明により使用し得るものとして開示されている。かかるフォーマットは、より具体的には、これらに限定されるものではないが、細胞に基づくアッセイ法として、例えば、光学的、蛍光もしくは発光強度に基づくアッセイ法、蛍光共鳴エネルギー転移、時間分解蛍光法、発光およびシンチレーション近接アッセイ、および２－ハイブリッドおよび３－ハイブリッド系として知られる方法などである。参照文献例：Ｆｅｒｎａｎｄｅｓ，Ｐ．Ｂ．（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．ｉｎＣｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．２：５９７－６０３；Ｇｏｎｚａｌｅｚ，Ｊ．Ｅ．ａｎｄＮｅｇｕｌｅｓｃｕ，Ｐ．Ａ．（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．ｉｎＣｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．９：６２４－６３１；Ｊｅｎｈ，Ｃ－Ｈ．（１９９８）ＡｎａｌｙｔｉｃａｌＢｉｏｃｈｅｍ．２５６：４７－５５；Ｗｕ，Ｐ．ｅｔａｌ．（１９９７）ＡｎａｌｙｔｉｃａｌＢｉｏｃｈｅｍ．２４９：２９－３６。

【０１４７】

細胞に基づくフォーマットを使用する態様において特にさらに適切な検出方法は、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）技法である。参照文献例：Ａｌｔｍａｎ，Ｊ．Ｄ．ｅｔａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ２７４：９４－９６。

【０１４８】

本方法により検出および同定される化合物は、例えば、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子を含む免疫複合体の形成を減少または増加させること；免疫複合体の安定性を低下または上昇させること；またはＴＣＲもしくはＭＨＣ抗原分子の他方に対する結合活性を低下または上昇させることなどに有用である。検出化合物の他の用途はインビボでのＴＣＲ類およびＭＨＣ抗原分子のモジュレーションに使用することなどである。より具体的なインビボ法、例えば、インビボでの免疫応答をモジュレーションする方法については以下に考察する。

【０１４９】

特定の検出フォーマット（またはフォーマット群）を一旦選択した場合、本発明方法を実施する際に考慮すべき重要なことは、少なくとも一つのＴＣＲ分子と少なくとも一つの対象ＭＨＣ抗原分子を含む少なくとも一つの反応混合物を適切に調製することである。一態様において、ＭＨＣ抗原分子は共有結合した（すなわち、融合した）提示ペプチドを有するＭＨＣ化合物から構成される。しかし、他の態様においては、認知された方法によりＭＨＣ分子に当該ペプチドを負荷することでペプチド－ＭＨＣ複合体を生成させることがより有用である。他の態様において、ＭＨＣ成分は共有結合したスーパー抗原を含み得る。あるいは、ＭＨＣ成分は認知された方法によりスーパー抗原鎖に複合体形成させてもよい。少なくとも一つの試験化合物をこの混合物に加え、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子が相互作用し得るのに十分な条件下で該混合物を処理する。好ましくは、またＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用に拮抗する試験化合物の非存在下に、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子は免疫複合体の形成を容易にする複数の特異的非共有結合を形成する。所望であれば、かかる免疫複合体は反

応混合物から取り出し、例えば、すでに考察した方法により分析することができる。所望であれば、この免疫複合体は沈降遠心分離、電気泳動、濾過、クロマトグラフィーまたは関連の分子サイズ決定技法を用いて検出することができる。

【０１５０】

本発明方法に採用される特定のＴＣＲとＭＨＣ抗原分子は、認知されたパラメータ、例えば、スクリーニング検定の目標とするもの、所望の感度、試験化合物プールの大きさ、および完全可溶性または細胞に基づくスクリーニングフォーマットのいずれを選択したかによって変化する。

【０１５１】

例えば、多くの態様において、後記実施例に提供した特異細胞を使用する細胞に基づく方法によってＴＣＲ分子を発現させることは有用である。本発明のこの例において、ＭＨＣ抗原分子は、適当なＡＰＣまたは必要とされる他の細胞により発現され得るものであるが、完全可溶性であり得る。ＴＣＲ分子および／またはＭＨＣ抗原分子が完全長またはほぼ完全長の鎖からなる態様において、該免疫複合体の検出は、ＴＣＲ分子、ＭＨＣ抗原分子、またはその両者を、例えば、すでに説明した直接または間接的検出フォーマットを用いて検出することにより容易になる。

【０１５２】

本発明のより特定の方法は、特異的な反応フォーマットの一つまたは組み合わせを用いて使用することができる。該方法の一態様において、適切なＭＨＣ抗原分子は固形支持体または固相に固定化する。固定化されたＭＨＣ抗原分子は次いで適切なＴＣＲ分子、通常その同族体と接触させるが、要すれば検出可能に標識することができる。少なくとも一つの試験化合物をＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子と次いで接触させるが、場合によってはＴＣＲ分子を添加する前に、例えば、ＭＨＣ抗原分子を固相に固定化する前に、試験化合物を添加することが有益であることもある。あるいは、試験化合物を免疫複合体の形成後に添加することができる。コントロールとして、ＴＣＲ分子は、ＭＨＣ抗原分子が同一のまたは同様の固形支持体に結合させるもう一つの反応チャンバーに加える。しかし、試験化合物を添加する代わりに、水、緩衝液などの適当なブランク溶液の分割量を実験反応に使用される量と同容量で通常添加する。次に、免疫複合体を実験反応におけると同様に検出する。本発明方法のこれらの態様において、免疫複合体の検出は必要に応じて直接または間接の検出フォーマットを用い達成することができる。例えば、ＴＣＲ分子、ＭＨＣ抗原分子、試験化合物、またはこれら３種の分子すべてを直接または間接的に標識して免疫複合体の良好な検出を容易にすることもできる。次いで、上で考察した基準に従い、例えば、免疫複合体の形成および／または安定性を上昇または低下させる受容能力により試験化合物を選択する。

【０１５３】

「固形支持体」または「固相」という語句は、ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子に結合し得る何らかの支持体を殆どの場合、意味する。周知の支持体または担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、斑レイ岩、磁鉄鉱、デンドリマー、およびシリコンウエーファなどである。担体の性質は本発明の目的にとってある程度可溶性でもよく、不溶性であってもよい。支持体材料は結合する分子が抗原または抗体に結合し得る限り、実質的に可能などのような構造的立体配置を有していてもよい。このように、支持体の立体配置はビーズなどの球体状、試験管の内面のような円筒状、または棒状の外面であってもよい。あるいは、該表面はシート、テストストリップのように平坦であってもよい。好適な支持体はポリスチレンビーズである。ビーズに基づく試薬は多様なフォーマットで市販品として入手可能であり、組換えタンパク質を結合／捕捉する高い受容能力、効率的な検出、および異なる分離と均一系アッセイ法の使用を可能とする。多くの高速大量処理スクリーニング法で、ビーズに基づく試薬が有利である。本発明分野の当業者はＴＣＲとＭＨＣ抗原分子に結合させる多くの他の適当な担体について知悉していようし、また日常の実験に使用することでそれを確認することもできよう。

【０１５４】
本発明の実例は図２に概略図で示してある。図２では、小型の分子インヒビターがＡＰＣのペプチド－ＭＨＣリガンドからなるＭＨＣ抗原と適切な細胞が発現するＴＣＲとの間の相互作用を実質的に遮断する。この態様において、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用はＣＤ分子などのもう一つのレセプターにより援助されている。小型の分子インヒビターが存在すると問題の免疫応答が遮断される。しかし、小型の分子インヒビターが存在しなければ、かかる免疫応答が発揮される。
【０１５５】
本発明のもう一つの態様を図３に示す。この例では、主題のＴＣＲ分子が検出可能に標識されており、試験分子は「高速大量処理」または「超高速大量処理」スクリーニングフォーマットとして反応に添加される。しかし、強調すべきことは、本発明を実施するためにかかる高容量スクリーニングは必要でないが、大量の試験化合物のプールの分析を助け得るということである。本発明のこの例では、複数の反応チャンバーをしばしば使用し、そこでは各反応チャンバーには検出可能に標識したＴＣＲ分子、固定化したＭＨＣ抗原分子、および反応チャンバー当たり少なくとも一つの、好ましくは約一つの試験分子を容れる。この態様に従って検出される試験化合物は、該試験化合物存在下に免疫複合体が存在すると、それに対応して減少するシグナルの有意な低下が容易に示される。一部の態様において、化合物のプールはプール内の各化合物の濃度がアッセイの検出限界を超える場合に使用することができる。
【０１５６】
別法として、図３に示した特定のスクリーニング法を適合させ、結果としてＭＨＣ抗原分子が検出可能に標識され、ＴＣＲ分子が固形支持体または固相に固定化されるようにすることができる。もう一つの態様において、ＴＣＲ分子および／またはＭＨＣ抗原分子の代わりに、またはそれに加えて試験化合物を検出可能に標識することができる。特定のスクリーニングの代表例を選択するには、スクリーニング検定の目標と必要とされる感度レベルなど、すでに考察したパラメータに従う。
【０１５７】
例えば、図３に説明した選抜は具体的な自己免疫疾患のアンタゴニストを検出するために容易に適合させることができた。この態様において、選抜に採用したＴＣＲとＭＨＣ抗原分子は、免疫疾患に関与していると認知されているもの、または関与している疑いのあるものから構成されるように予め選択される。かかるＴＣＲとＭＨＣ抗原分子の例は本明細書において、以下に示す実施例と考察にて提供する。
【０１５８】
強調すべきことは、ＴＣＲ分子、ＭＨＣ抗原分子、または試験化合物を本発明に従い取り扱う厳密な順序は、所望のスクリーニング結果を容易に満たす限りに、通常重要ではないということである。すなわち、免疫複合体の形成を調節する受容能力について化合物を試験することが望ましい場合、これらの化合物をＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子の添加前に、またはその間に添加することがしばしば極めて有用である。しかし、すでに形成された免疫複合体を調節する試験化合物を検出するようにスクリーニング方法を設計する態様において、試験化合物はＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子を要求どおりに組み合わせる前に、またはその間に、またはその後に添加することができる。このように、特定アッセイの設定における成分添加の順序は、実施するスクリーニングフォーマットの具体的目標など、認知されたパラメータにより導かれる。
【０１５９】
多くの場合に、本分野で「タイター」または「マイクロタイター」プレートと言われるものは、固相として簡便に利用し得る。
９６穴マイクロタイタープレートは多くの場合に好適ではあるが、より多くのウエルをもつプレートも広範囲のスクリーニング例にとって必要とされる。固着成分は一般に認められた手法に従って、非共有結合または共有結合により固定化し得る。例えば、非共有結合による付着は、単純に固形表面をＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子の溶液により、このものを

固相に結合させるのに必要な時間、コーティングすることにより実施し得る。あるいは、固定化すべきタンパク質に特異的な固定化した抗体、好ましくはモノクローナル抗体を用いて該タンパク質を固体表面に固着させることができる。表面は前もって調製し、要すれば保存する。

【０１６０】

より具体的には、本発明の実施は非固定化化合物を、固着成分（ＴＣＲ分子またはＭＨＣ抗原分子でもよい）含有の被覆表面に加えることからなる。反応終了後、形成された複合体が固形表面に固定したままで残るように未反応成分を（例えば、洗浄により）除去する。固形表面に固着した複合体の検出は、直接または間接の検出フォーマットを必要とする多くの方法により実施し得る。予め固定化していない成分を事前に標識化する場合、表面上に固定化した標識が検出されることは、ＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子間の免疫複合体が生産的であったことを物語る。予め固定化していない成分を事前に標識化しない場合、間接的標識を用いて、表面上に固着した複合体を検出することができる；例えば、予め固定化していない成分に特異的な標識化抗体を使用する（該抗体もまた直接標識するか、または標識した抗－Ｉｇ抗体で間接的に標識し得る）。

【０１６１】

本発明のもう一つの態様において、適切なＭＨＣ抗原分子は、９６穴マイクロタイタープレートなどの適当な固相上に固定化する。この例で、ＭＨＣ抗原分子は、共有結合により融合した提示ペプチドを担持するＭＨＣ成分からなる。あるいは、ＭＨＣ抗原分子は、提示ペプチドがさらなる操作を実施する前にＭＨＣ成分上に好適に負荷されている場合の複合体からなり得る。他の態様において、ＭＨＣ抗原は共有結合した、または結合していないスーパー抗原と複合体形成したＭＨＣ成分からなり得る。固定化を最大化するために約１２時間ないし約４８時間インキュベーションした後、ＭＨＣ抗原分子をプレートから除去し、そのウエルを適当な細胞培養培地、例えば、ＤＭＥＭ、ＩＭＤＭなどで満たす。次に、同族体ＴＣＲ分子を発現する細胞の添加前にまたは添加の際に、各ウエルに試験化合物を添加する。次いで、結合したＭＨＣ抗原分子に応答するのに十分な時間、一般には約２～３時間から約３日以上までの間、細胞をインキュベートする。免疫複合体の存在を検出するための好適な細胞応答はサイトカインの産生であり、好ましくはＩＬ－２の産生である。

【０１６２】

例えば、図４はすでに説明したマルチウエルプレートなどの固形支持体上に固定化した所望のＭＨＣ抗原分子を示す。この態様において、ＭＨＣ抗原分子は共有結合した提示ペプチドであるＭＨＣ成分からなる。しかし、すでに述べたように、エンプティＭＨＣ分子はこの方法において、提示ペプチドでの負荷が好ましい態様において使用し得る。他の態様において、ＭＨＣ抗原は共有結合したまたは未結合のスーパー抗原と複合体形成したＭＨＣ成分からなり得る。本発明のこの例において、所望のＴＣＲ分子を発現する適切な細胞、例えば、天然産Ｔ細胞または組換えＴ細胞ハイブリドーマなどは、固定化したＭＨＣ抗原分子に接触させる。少なくとも１種以上の試験化合物が所望のフォーマットに従って、好ましくはすでに考察した「高速大量処理」または「超高速大量処理」の一つにより選抜され得る。試験化合物はアッセイのほぼいずれの時点でも、例えば、細胞をウエルに添加すること、またはこれらウエルにＭＨＣ抗原分子を固定化することの前、その間、またはその後に添加することができる。本発明のこの例示において、モニターする細胞応答はＩＬ－２の産生である。図４にも見られるように、適切な試験化合物の存在しない場合、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の特異的結合は生産的であり、免疫複合体の形成に至らしめる。かかる免疫複合体はＴ細胞の活性化とＩＬ－２サイトカインの産生の引き金を引く。しかし、免疫複合体形成のアンタゴニストなどの適切な試験化合物の結合は、細胞応答とＴ細胞から得られるＩＬ－２産生を低下させる。試験化合物を次いで検出し、サイトカイン産生の減少を観察することにより他の化合物から選択する。

【０１６３】

さらに特定の態様において、細胞が産生し、培地中に分泌したサイトカインは、サイトカ

インに特異的な抗体を被覆したウエルに培地を移すことで検出する。サイトカインが固定化した抗体に結合するのに適当な培養時間（すなわち、２５℃で２時間）の後、各ウエル中の培地を除き（ＰＢＳでの洗浄により）、サイトカイン分子に好適に結合する検出可能に標識した抗体をウエルに添加する。標識した抗体は、例えば、約２～３時間ないし１日程度インキュベートした後、サイトカイン分子に結合した標識抗体を可視化するために適した異なる試薬の１種または組み合わせによりウエルを処理する。条件に合致する多くの可視化フォーマットはすでに言及したように、例えば、色素原の生成に関与するものなどである。すでに言及したように、一つのサイトカインはインターロイキン－２（ＩＬ－２）であるが、本発明のスクリーニング法は他の検出可能な分子の検出にも互換性があり、該分子は他のサイトカインを含む細胞応答の指標となる。

【０１６４】

本発明のもう一つの態様は、「原理の証明」の一例であることを意図する。これは図５Ａに概略図として示す。この例では、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞レセプターを発現するＴ細胞ハイブリドーマが使用される。ＭＨＣ抗原分子は、例えば、マルチウエルプレートのウエルに結合するが、この例ではＤＯ１１．１０ＴＣＲと特異的に相互作用する（ｓｃ－）ＩＡ^{d}／ＯＶＡタンパク質である。適切な試験化合物は、例えば、「高速大量処理」または「超高速大量処理」フォーマットで提供され、組換えＴ細胞の添加前、その間、またはその後に添加される。この例示でモニターする細胞応答はＩＬ－２の産生である。

【０１６５】

図５Ａにも見られるように、適切な試験化合物の存在下、ＤＯ１１．１０ＴＣＲとｓｃ－ＩＡ^{d}／ＯＶＡＭＨＣ抗原分子との間の特異的結合が遮断され、それによって免疫複合体の形成が防止される。充分な免疫複合体が存在しない場合、Ｔ細胞の活性化およびＩＬ－２サイトカインの産生は減少するか起こらない。ＩＬ－２サイトカイン量の減少は種々の直接または間接フォーマットを使用して容易に検出することが可能である。

【０１６６】

図５Ａに示したスクリーニング法のもう一つの態様は図５Ｂに概略図として示す。本発明のこの例は時に「二重」アッセイフォーマットと言われ、１個または２～３個のウエルでＴ細胞の刺激を実施し、Ｔ細胞応答を測定する方法の受容能力を表す。例えば、さらに特定の態様において、精製したｓｃ－ＩＡ^{d}／ＯＶＡなどの適切なＭＨＣ抗原分子は、適当量の抗－ＩＬ－２モノクローナル抗体（すなわち、捕捉抗体）とともにマルチウエル培養プレートに固定化する。プレートの各ウエルは少なくとも１種の試験化合物および一般的にはかかる化合物の約一つを収容している。次いで、ＤＯ１１．１０ＴＣＲを発現するＴ細胞を各ウエルに加え、充分なインキュベーション時間を取った後に、洗い流す。次に、各ウエルにおけるＩＬ－２の産生を、捕捉抗体により固定化したＩＬ－２に特異的に結合し得る検出可能に標識した抗体の適当量を添加することにより測定する。一般に、ＥＬＩＳＡ検出フォーマットが好適であるが、特別の試験フォーマットを必要とする場合には、他の免疫学的検出フォーマットを使用してもよい。図５Ｂから分かるように、アンタゴニストとして作用する阻害化合物は光吸収測定により容易に同定される。

【０１６７】

前記選抜のさらに具体的な例については下記実施例１０にて考察する。本発明のこの例示では、約２０００種の小型分子が市販品として入手可能な化学ライブラリーから選抜された。注目すべきことは、実施例１０では３０種の化合物が検出され、それらが非常に低いＩＬ－２の吸光度読み値を示したこと、すなわち、これらの化合物がＤＯ１１．１０ＴＣＲとｓｃ－ＩＡｄ／ＯＶＡタンパク質の間で形成される免疫複合体の形成および／または安定性を低下させたことである。

【０１６８】

もう一つの態様において、所望のＭＨＣ抗原分子は細胞膜と会合する。この態様において、ＭＨＣ抗原分子は提示ペプチドに共有結合したＭＨＣ成分から成り立ち得る。しかし、ＭＨＣ分子はこの方法では、提示ペプチドによる負荷が好適である態様において使用することができる。他の態様において、ＭＨＣ抗原は共有結合した、または未結合のスーパー

抗原と複合体形成したＭＨＣ成分から成り立ち得る。例えば、ＭＨＣ抗原は特定のペプチドでパルスしたＡＰＣ上に存在するＭＨＣ／ペプチド複合体から成り立ち得る。適当なペプチドを調製し、それをパルスする方法はこの分野では既知である。参照文献例：Ｓｅｔｔｅ，Ａ．ｅｔａｌ．（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ３２８：３９５－３９９ａｎｄＭａｒｔｉｎ，Ｒ．ｅｔａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４５：５４０－５４８。本発明のこの例では、天然のＴ細胞または組換えＴ細胞ハイブリドーマなどの所望のＴＣＲ分子を発現する適切な細胞は、ＭＨＣ抗原分子に接触させる。少なくとも一つの試験化合物を所望のフォーマットに従い選抜することができる。試験化合物は細胞をウエルに加える前、その間、またはその後と、アッセイのほとんどいずれの時点でも加えることができる。本発明のこの例示では、モニターする細胞応答はＩＬ－２の産生である。適切な試験化合物が存在しなければ、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子との間の特異結合が生産的となり、免疫複合体の形成に至る。かかる免疫複合体はＴ細胞の活性化とＩＬ－２サイトカインの産生の引き金となる。しかし、免疫複合体形成のアンタゴニストなどの適切な試験化合物の結合は、細胞応答を低下させ、その結果としてＴ細胞から得られるＩＬ－２産生を減少させる。試験化合物を次いで検出し、サイトカイン産生の減少を観察することにより他の化合物から選択する。

【０１６９】

下記実施例１０は、本発明のこの態様におけるより具体的な例示である。この実施例では、Ａ２０ＡＰＣ，ＯＶＡペプチドおよびＤＯ１１．１０Ｔ細胞を混合して、Ａ２０細胞上にＯＶＡペプチドとＩＡ^{d}分子間の複合体を形成させ、ＩＡ^{d}／ＯＶＡ複合体によってＤＯ１１．１０Ｔ細胞を刺激させる。この例では、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞の刺激を以下に記載するようにＩＬ－２サイトカインの産生により測定する。試験化合物はＯＶＡパルスＡ２０：ＤＯ１１．１０Ｔ細胞混合物に添加し、免疫複合体の形成とサイトカイン産生に影響する試験化合物の能力を評価した。注目すべきことは、実施例１０では４種の化合物が検出され、それらが非常に低いＩＬ－２の吸光度読み値を示したこと、すなわち、これらの化合物がＤＯ１１．１０ＴＣＲとＩＡ^{d}／ＯＶＡ複合体の間で形成される免疫複合体の形成および／または安定性を低下させたことである。

【０１７０】

すでに考察したように、本発明の目的は多数の試験化合物の検出を容易にし得る高効率のスクリーニング法を提供することにある。好ましくは、試験された試験化合物は同族体ＴＣＲとＭＨＣ抗原対との間に形成される免疫複合体を特異的に調節する。

【０１７１】

この目標に従って、本発明は、例えば、細胞からのＩＬ－２産生に影響を与えることによって非特異的に細胞を変調させ得る試験化合物に対し、選択するための対策を提供する。この態様において、前記のいずれかの方法を繰り返し、検出化合物の非特異的Ｔ細胞刺激に対する影響をアッセイすることができる。

【０１７２】

例えば、非特異的Ｔ細胞刺激についての一つのアッセイ方法は、ＣＤ３などの分化クラスター（ＣＤ）タンパク質に結合し得る方法において抗体を使用することによる。すでに考察したように、ＣＤ３タンパク質は多くのＴＣＲと密接に会合すると報告されている。本発明のこの例では、該抗体はＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子の添加前、添加途上、または添加後にウエルに固定化することができる。固定化された抗体が存在すると、一般にＴ細胞を活性化し、刺激してＩＬ－２などのサイトカインを産生させる。このように、Ｔ細胞の抗体介在活性化を阻害する試験化合物は、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子との間に形成される免疫複合体を特異的に変調しないものとして設計する。このような試験化合物は場合によって興味の対象となり得るが、本発明のより好適な試験化合物は、免疫複合体の存在または非存在下に検出されるように、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を特異的に調節する。

【０１７３】

再度、図５Ｂに戻ると、この特定の選抜の一態様は抗－ＣＤ３抗体をコントロールとして使用する場合を示している。すでに考察したように、ある場合には、このコントロールは

、「コントロール免疫複合体」、「内部コントロール」または類似の成句で言及される。

【０１７４】

本発明の重要な目標は、要すれば、Ｔ細胞のＭＨＣ抗原依存性刺激を特異的に調節するが、ＴＣＲ／ＣＤ３などのＴＣＲ／ＣＤ複合体を介しての刺激に応答するこれら細胞の能力には全く影響しないか、または影響のすくない試験化合物を検出するために、それに適合し得る方法を提供することである。コントロール免疫複合体のより具体的な例示は下記実施例１０にて考察する。ここで、対象となる特異的試験化合物は、ＴＣＲ細胞のＭＨＣ抗原介在刺激を調節し、抗－ＣＤ３抗体が介在するＩＬ－２産生について些細な、極僅かな阻害を示す。

【０１７５】

所望により、本方法はすでに言及したＴＣＲ／ＣＤ３複合体などのコントロール免疫複合体の一つとともに、または組み合わせて使用することができる。すでに考察したように、試験化合物の存在下または非存在下でのかかるコントロール免疫複合体の分析は特定の選抜を精緻なものとする一助となり（改善が必要であるとして）、免疫複合体を特異的に調節する化合物の検出を容易にする。例えば、本発明での使用に旨く適合するもう一つのコントロール免疫複合体は、抗－ＴＣＲ抗体、通常抗－ＴＣＲモノクローナル抗体を含んでなる。この態様において、抗－ＴＣＲ抗体は、好ましくは、レセプター結合部位外のＴＣＲエピトープに特異的に結合する；すなわち、常套のタンパク質：タンパク質結合実験で測定した場合、ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原分子との間の結合を妨げない。かかるモノクローナル抗体の例はこの分野で既知である。参照文献例：Ｈａｓｋｉｎｓ，Ｋ．ｅｔａｌ．（１９８３）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１５７：１１４９－１１６９；Ｋｕｂｏ，Ｒ．Ｔ．ｅｔａｌ．（１９８９）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４２：２７３６－２７４２；ａｎｄ Ｂｒｅｎｎｅｒ，Ｍ．Ｂ．ｅｔａｌ．（１９８４）Ｊ Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６０：５４１－５５１。コントロール免疫複合体としての抗－ＴＣＲ抗体の好適な使用は下記実施例１１にて考察する。

【０１７６】

所望の試験化合物が所定のアッセイ設定において特定のＴＣＲとＭＨＣ抗原相互作用を僅かにしか変調させないようなような場合は、かかるアッセイの感度を増幅することが極めて有用である。かかる増強は常套の方法を用いて免疫応答の直接または間接の検出を上昇させることなど、異なる対策の一つ、または組み合わせにより達成することができる。あるいは、かかる感度の増強は、多価複合体としてこれらの分子を提供することによるなど、ＴＣＲおよび／またはＭＨＣ抗原分子を操作することにより達成することができる。実施例１５はこの技法の特定の例を示す。

【０１７７】

一態様において、アッセイ感度は免疫複合体からの刺激に応答する細胞の能力を増すことにより上昇させることができる。とりわけ、この分野では、Ｔ細胞表面上の特定のＣＤ分子など共刺激性レセプターとその同族体リガンド間の相互作用が、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用の介在する分子内シグナルの開始と増幅を促進し得るという認識がある。かくして、本発明のさらなる目的は、所望のＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子を発現する天然産または組換え細胞を提供することであり、当該細胞はさらに少なくとも一つの適当な共刺激性レセプター、例えば、ＣＤ２８またはＬＦＡを発現する。本発明のこの態様において、共刺激性レセプターとＴＣＲおよび／またはＭＨＣ抗原分子との同時発現は、好適なアッセイ条件下で、免疫複合体に対する細胞性応答を上昇させることができ、それによってアッセイの感度と信頼性を増幅させることができる。好適なアッセイ条件は、これらに限定されるものではないが、共刺激性レセプターに結合し得る同族体リガンドまたは抗体（またはそのフラグメント）を添加することであり、その場合、同族体リガンドまたは抗体は可溶性、固定化または細胞会合分子として添加する。

【０１７８】

アッセイ感度を増幅するもう一つの方法は免疫複合体の良好な存在を提供することである。とりわけ、この分野では、特定のＣＤタンパク質がＭＨＣ抗原分子との相互作用を容易

にし得るという認識がある。かくして、本発明のさらなる目的は、所望のＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子を発現する天然産または組換え細胞を提供することであり、当該細胞は少なくとも一種の適切なＣＤタンパク質、例えば、ＣＤ４またはＣＤ８をさらに発現する。本発明のこの態様において、ＣＤタンパク質とＴＣＲおよび／またはＭＨＣ抗原分子との同時発現は免疫複合体の形成を容易にし、それによってアッセイ感度と信頼性を増幅することができる。

【０１７９】

本方法の特定の態様において、細胞は所望のＴＣＲ分子、例えば、ｓｃ－ＴＣＲ融合分子、および細胞表面上のＣＤ４タンパク質またはそのフラグメントを発現するように設計調製する。もう一つの態様において、所望のＴＣＲ分子はｓｃ－ＴＣＲ融合分子として提供するが、当該分子は融合タンパク質の一部として、少なくともＣＤ３ζまたはその機能的フラグメントなど他のＣＤ分子の一部を包含するように設計調製する。さらにもう一つの態様において、ｓｃ－ＴＣＲ－ＣＤ３ζ構築物はＣＤ分子と、通常はＣＤ４またはＣＤ８と同時発現される。多くの場合、ＴＣＲ分子とＣＤタンパク質（類）との同時発現は、ＭＨＣ抗原分子による刺激に対しより敏感であることを可能とする。この例では、ＭＨＣ抗原分子は必要に応じて完全可溶性タンパク質として、または細胞に基づくフォーマットで提供し得る。

【０１８０】

下記実施例１２は本発明のこの態様のより具体的な例示である。ここで、ＤＯ１１．１０ＴＣＲは、組換えＣＤ４タンパク質をも細胞表面上に発現する細胞により発現されるｓｃ－ＣＤ３ζ融合タンパク質として存在する。同族体ＭＨＣ抗原分子、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡは適切なマルチウエルプレート上に適切な抗－ＩＬ－２抗体、通常はモノクローナル抗体とともに、一般に約１２～４８時間固定化する。当該抗体はＭＨＣ抗原分子の固定化の前に、その間に、またはそれとともに添加し得る。次いで、一本鎖ＴＣＲとＣＤ４タンパク質を同時発現する組換え細胞をウエルに加え、数時間ないし２～３日以上培養する。該細胞によるＩＬ－２産生はすでに記載した線に沿って測定する。

【０１８１】

本方法の態様において、ＭＨＣ抗原構築物はＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＡなどの免疫グロブリンフラグメント、並びにその機能的フラグメントに共有結合させ得る。要すれば、コントロールのウエルを調製し、そこでの細胞刺激を異なるＭＨＣ抗原にて測定する。この場合にも要すれば、さらなるコントロールを、実施例に具体的に記載したものも含め、上記の内部コントロールの少なくとも一つを用い実施する。本発明のこの態様において、組換え細胞の刺激を調節する試験化合物の受容能力は、該細胞が産生するサイトカイン量の対応する増減として測定する。ＭＨＣ抗原によるＴ細胞の刺激を阻害するが、抗－ＴＣＲ抗体による刺激は阻害しない試験化合物は、先導化合物として追求することができる。

【０１８２】

この方法の具体例を図６Ａに概略図として示す。ここで、採用されるＴＣＲとＭＨＣ抗原プローブは多発性硬化症（ＭＳ）に関係している；ＭＳは共通のヒト自己免疫疾患であり、重篤な軸策脱髄に至る。図６ＡはＭＳ　ＴＣＲおよびＭＨＣ抗原プローブとの相互作用を調節する化合物について、試験化合物を選抜する方法の一態様を示す。Ｔ細胞は、好ましくは、ヒトＭＳ患者から得られるＴ細胞から誘導する。示したように、代わりとなる細胞（すなわち、組換えＭＳ　ＴＣＲ細胞）は、本明細書に示したものなど、ＴＣＲクローニングおよび発現工程により調製する。組換えＭＳ　ＴＣＲ細胞は、次いで、前記の線に沿って、マルチウエルプレート（ＭＨＣ抗原分子が結合している）に加える。この例示では、少なくとも１種の試験化合物、通常は約一種類の試験化合物を、組換えＭＳ　ＴＣＲ細胞の添加前、その間、またはその後にウエルに添加する。好ましくは、この方法は高速大量処理スクリーニングフォーマットで実施する。本発明のこの例では試験化合物を、少なくとも一種の適切なコントロールとみなされるＭＳ　ＴＣＲ細胞によって産生されたＩＬ－２量、例えば、試験化合物の非存在下で細胞から産生されるＩＬ－２量を、削減または除去により検出する。

【０１８３】
図６Ｂに示したように、精製したｓｃ－ＤＲ２／ＭＢＰ（ペプチドを提示する融合ＭＢＰを有する一本鎖クラスＩＩ ＭＨＣ）をマルチウエル細胞培養プレートに固定化する。適切には、該プレートは化学ライブラリーを収容するが、それぞれのウエルは、好ましくは少なくとも一種の、通常は約一種の試験化合物を収容する。次に、関連ＴＣＲを発現するＴ細胞を、ＭＳに罹患している、またはその疑いのある、または罹患する恐れのある患者から常套の手段で入手する。しかし、殆どの場合、患者は認知されたパラメータで診断した場合、ＭＳに罹患している。代わりのものとして、関連ＴＣＲを発現する組換え細胞を生成させ得る。Ｔ細胞の適量を次いで各ウエルに加え、上述の線に沿って選抜を行う。この態様において、細胞応答は化学ライブラリーからの試験化合物の存在および非存在下に測定する；この応答は既述のようにサイトカイン産生である。

【０１８４】
勿論、ＭＳ免疫複合体を調節する試験化合物の前記特異的検出方法は、対象とする他のＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子の選抜に容易に適合させることができる。

【０１８５】
前記スクリーニング方法のより具体的な例は、下記実施例１３に示す。本発明のこの例においては、適当なＴ細胞Ｖ－αおよびＶ－β鎖がミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）について制限された特異ヒトＭＳ Ｔ細胞株から得られる。当該鎖をエンコードする核酸は、要すればヒトＣＤ３ζ配列またはその配列の機能的フラグメントに融合することができる。得られる構築物はその結果適当な細胞および特に不死化Ｔ細胞中で発現される。このような形質導入細胞は次いですでに考察した線に沿って操作する。すなわち、不死化Ｔ細胞をマルチウエルプレートに加えるが、各ウエルは固定化または細胞発現同族体ＭＨＣ抗原、例えば、ＭＢＰペプチド－負荷ＤＲ２$^{+}$ ＡＰＣを収容している。別法として、ＭＨＣ抗原分子は、本明細書および米国特許５，８６９，２７０に開示されているように、提示ペプチドをＭＨＣに共有結合させて生成させてもよい。このように、本発明の態様における検出フォーマットは、すべて細胞に基づくものである。

【０１８６】
より詳しくは、実施例１３では、ＭＳ制限ＴＣＲが細胞に基づくものであり、同族体ＭＨＣ抗原分子（ｓｃ－ＤＲ２$^{+}$／ＭＢＰ）がウエルに固定化されている検出フォーマットを提供する。本発明のこの例では、ＭＨＣ抗原タンパク質をＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＡなどの受容可能な免疫グロブリン分子またはそのフラグメントに融合させることができる。ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ分子を２～３時間ないし１日程掛けてウエルに固定化した後、組換えＴ細胞を培地中ウエルに加え、２～３時間ないし２～３日培養する。各ウエルには少なくとも一種の、また多くの場合一種の試験化合物を適当な溶媒に溶かして容れる。該試験化合物はアッセイのいずれの時点で加えてもよい；例えば、Ｔ細胞の添加またはＭＨＣ抗原分子の固定化の前、その間、またはその後のいずれでもよい。しかし、試験化合物はＴ細胞とともに添加することが本発明のこの例では一般に好適である。ＭＨＣ抗原とＴＣＲ分子間の相互作用を調節する化合物の受容能力は、すでに記載したように直接または間接にモニターすることができる。また、この例では、ＩＬ－２の産生をすでに考察した線に沿って測定する。所望により、この特定方法には、試験化合物なしでの組換え細胞培養など、一つ以上のコントロールを含めることができる。さらに採用し得るコントロールは、初めに記載したこれらコントロール免疫複合体である。本方法により検出される特定の試験化合物は、有意にＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の相互作用を調節するが、上記の抗－ＴＣＲまたは抗－ＣＤ３抗体による刺激を調節するものではない。このアッセイ法において好適なのは、実質的なアンタゴニスト作用を示す試験化合物である。

【０１８７】
もう一つの態様において、本発明は細胞に基づくスクリーニング法を提供するが、この方法では少なくとも２種の異なる抗原特異ＴＣＲが細胞表面上で発現されるように細胞を設計する。本発明ではこの特定の例が有利となる。例えば、多くの場合、この方法は異なるＴＣＲに向け明確な作用を示す試験化合物に対し、より高感度となる。この例示における

ように、試験化合物はＴＣＲ分子の一つを変調させるが、他のものについては余り、または全く変調させないという受容能力を発揮する。

【０１８８】

本態様の例示として、不死化Ｔ細胞などの適切な細胞は、本明細書で「コントロール」または「第二」ＴＣＲ分子と称する分子とともに、所望の（第一）ＴＣＲ分子を発現するように設計調製する。かかる細胞は従ってすでに考察した線に沿って、例えば、対象のＭＨＣ抗原分子を発現するＡＰＣとともに、または固定化したＭＨＣ抗原分子とともに使用することが可能であった。ＭＨＣ抗原と第一ＴＣＲ分子との間の相互作用を調節する化合物の受容能力は、すでに記載したように直接または間接にモニターすることができる。かかる相互作用は次いで第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原との間の特異的相互作用を調節する化合物の受容能力と比較することができる。多くの場合、すでに概説した方法に従い、細胞によるＩＬ－２の分泌など、サイトカイン産生を測定することが望ましい。対象となる特定の化合物は第一ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原との間の相互作用を調節するが、第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原との間の調節は殆どないか、または全くないであろう。

【０１８９】

従って、本発明の目的は、必要に応じて少なくとも一つの適切な内部コントロールを含む方法を提供することにある。かくして、前記方法の一つは少なくとも以下の工程の一つを含むことができる：

１）主題のＴＣＲ分子、例えば、第一ＴＣＲ分子と、好ましくはＭＨＣ抗原分子が結合した部位以外の一つ以上のエピトープにてＴＣＲと特異的に結合し得る少なくとも一つの抗体、好ましくはモノクローナル抗体とを接触させる工程であって、該接触を試験化合物の存在下または非存在下に、またＴＣＲとコントロール免疫複合体としての抗体とが結合するのに十分な条件下で実施すること；

２）該試験化合物の存在下および非存在下にコントロール免疫複合体の存在を検出すること；および

３）ＴＣＲと抗体との間の特異的な結合を検出可能に変化（増加または減少）させない試験化合物を選択すること。

【０１９０】

もう一つの態様において、該方法は必要に応じて少なくとも以下の工程の一つを含むことができる：

１）第二ＴＣＲ分子とその同族体ＭＨＣ抗原分子とを接触させる工程であって、該接触を該試験化合物の存在下または非存在下に、また第二ＴＣＲとコントロール免疫複合体としてのＭＨＣ抗原とが結合するのに十分な条件下で実施すること；

２）該試験化合物の存在下および非存在下にコントロール免疫複合体の存在を検出すること；および

３）第二ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子との間の特異的な結合を検出可能に変化（増加または減少）させない試験化合物を選択すること。好ましくは、当該第二ＴＣＲは、上に示した主題の（第一）ＴＣＲ分子とは異なるＭＨＣ抗原結合特異性を有する。

【０１９１】

考察したように、一つ以上の内部コントロールを含めるか否かの選択は一般に認知されたパラメータ、例えば、選抜すべき試験化合物および必要な敏感度と選択性の程度などによって導かれる。

【０１９２】

下記実施例１４は、特に内部コントロールを含めることに関して、本発明のもう一つの具体例を提供する。この実施例では、第一ＴＣＲ分子が一本鎖Ｄ０１１．１０ＴＣＲ分子であり、第二ＴＣＲ分子が内在性ＴＣＲである。この細胞の第一および第二ＴＣＲ分子を介しての刺激に対する応答性を評価するために、適当なコントロールＭＨＣ抗原分子を容れた適切なマルチウエルプレート中で細胞を培養する。例えば、適当なコントロールＭＨＣ抗原は、特定のペプチドによりパルスした適切なＡＰＣ上に存在するＭＨＣ／ペプチド複

合体から成り立ち得る。適当なペプチドを調製し、パルスする方法はこの分野で既知である。参照文献例：Ｓｅｔｔｅ，Ａ．ｅｔａｌ．（１９８７）Ｎａｔｕｒｅ３２８：３９５－３９９；Ｍａｒｔｉｎ，Ｒ．ｅｔａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４５：５４０－５４８。好ましくは、かかるペプチドは、ＡＰＣとの関連で提示された場合、第一ＴＣＲではなく第二ＴＣＲを優先的に刺激する。第一ＴＣＲに対する同族体ＭＨＣ抗原分子は、すでに概説したように、通常ウエルに固定化する。ＭＨＣ抗原分子は融合提示ペプチドを担持するか、または所望のペプチドを負荷したＭＨＣ成分から成り立ち得る。かかるペプチドは、好ましくは、第一ＴＣＲ分子に特異的であるが、第二ＴＣＲ分子には特異的でない。他の態様において、ＭＨＣ抗原は共有結合しているか、または未結合のスーパー抗原と複合体形成したＭＨＣ成分から成り立ち得る。かかるスーパー抗原は、好ましくは、第一ＴＣＲ分子に特異的であるが、第二ＴＣＲ分子には特異的でない。

【０１９３】

本発明のこの例では、少なくとも一つの試験化合物は、すでに考察した線に沿って、ＡＰＣの添加またはＭＨＣ抗原分子の固定化の前、その間、またはその後にウエルに添加することができる。例示のように、試験化合物はＭＨＣ抗原分子の固定化後、かつＴＣＲ分子を発現する細胞の添加前に添加することができる。好適な細胞応答はサイトカイン産生、とりわけＩＬ－２産生であるが、ある場合には本明細書で言及した他の細胞応答をモニターすることも有益である。この態様において、対象となる特定試験化合物は第一ＴＣＲとそのＭＨＣ抗原間の相互作用を調節するが、一方、第二ＴＣＲとそのＭＨＣ抗原間の相互作用はあまり変調節させないか、または全く変調させない。対象となる、より特定の試験化合物は第一ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原間の相互作用を良好に阻害するが、第二ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原間の相互作用に関しては同様の阻害作用を示さない。

【０１９４】

より具体的な態様において、本発明は、好ましくは、異なるＭＨＣ抗原により制限された少なくとも２種類のＴＣＲ分子により再構築された細胞株を利用するスクリーニング方法を包含する。本発明のこの特徴はアッセイの多様性を最小化するなど、多くの利点を提供する。

【０１９５】

下記の多くの例は、とりわけさらなる内部コントロールを包含することに関して、本発明のもう一つの具体例を提供する。例えば、内部コントロールはＴＣＲと非同族体ＭＨＣ抗原分子間、またはＭＨＣ抗原と非同族体ＴＣＲ間に形成されるコントロール複合体を含み得る。記載したように、これらのコントロール複合体はＴＣＲ（またはＭＨＣ抗原）とその非同族体対間の非特異的会合を代表し、ＴＣＲと同族体ＭＨＣ抗原分子間の特異的相互作用のレベルを評価するための陰性コントロールとして有用であり得る。例えば、実施例３、５、１１、１２、１４、１５および１６に説明した特定の態様は、ＴＣＲと非同族体ＭＨＣ抗原分子間の非特異的会合を確立するために、適当なＭＨＣ抗原分子を利用する。これら実施例の各々で、非同族体ＭＨＣ抗原はＴＣＲにより特異的に認識される同族体ペプチドとは異なるペプチドを担持するペプチド－ＭＨＣ複合体である。実施例１１、１４および１５に説明した他の態様では、ＭＨＣ抗原分子と非同族体ＴＣＲ間の非特異的会合を確立するために適当なＴＣＲを利用する。

【０１９６】

本発明の実施は、とりわけ従来の細胞に基づくスクリーニング試行に照らして特に多くの利点を提供する（参照：すなわち、ＷＯ９６／３６８８１）。例えば、本発明の方法は広範囲のＴＣＲとＭＨＣ抗原分子と完全に互換性がある。本発明のこの特徴は試験化合物を検出するための細胞およびタンパク質に基づくアッセイフォーマットのレパートリーが拡大するにつれて重要となる。従来のスクリーニング試行と対照的に、本発明方法は細胞応答を非特異的に調節する試験化合物に対して選択する数多くの内部コントロールをも提供する。すでに記載したように、一般に細胞に基づくスクリーニングアッセイでの主な制限の一つは、非特異的または間接的に測定された細胞性応答を調節する「擬陽性」化合物の

検出であった。本発明を好適に使用することで、擬陽性または判断を誤らせる試験結果が実質的に減少し、ある場合には除去される。

【０１９７】

すでに考察したように、本発明の感度を増幅または上昇させる一つの方法は、多価複合体として主題のＴＣＲ分子および／またはＭＨＣ抗原分子を提供することである。この態様において、本発明は顕著な利点を提供し得る。例えば、この分野で認知されていることは、多価ＭＨＣ抗原分子がＴ細胞の応答を、単量体ＭＨＣ抗原分子よりもより大きな度合いまで、ある場合には遥かに大きな度合いまで刺激することができることである。参照例：Ａｂａｓｔａｄｏ，Ｊ．（１９９５）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８２：４３９－４４７ａｎｄＨａｍａｄ，Ａ．Ｒ．ｅｔａｌ．（１９９８）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８８：１６３３－１６４０。

【０１９８】

例えば、多価ＴＣＲおよび／またはＭＨＣ抗原分子による方法の実施では、相互作用の弱いＴＣＲ：ＭＨＣ抗原分子の結合活性を望みどおりに上昇させることができる。この結果を達成する一つの方法は、少なくとも１個の「アダプター」または「タグ標識」分子を、ＴＣＲ分子、ＭＨＣ抗原分子、または両分子に共有結合させること、あるいは融合させることである。これらのアダプターまたはタグ標識は直接または間接に多価複合体の形成を促進するように働く。例示としてのアダプターまたはタグ標識は、ビオチン、ストレプトアビジン、および免疫グロブリン可変および／または定常ドメイン、例えば、ＩｇＧおよびＩｇＭ重鎖、κおよびλ鎖などの免疫グロブリン分子、またはその機能的フラグメントなどである。対象となる特定のアダプターは、もう一つの分子、例えば、プロテインＡ、プロテインＧ、ビオチン、ストレプトアビジン、またはモノクローナル抗体などの抗体が特異的に結合し得るものである。該抗体は必要に応じて検出可能に標識してもよいし、しなくてもよい。対象となる他のアダプターはロイシンジッパードメインなど、会合して多量体複合体を形成し得るタンパク質ドメインである。ＭＨＣ抗原とＴＣＲ分子の多価形状は、当該分子を直接または間接的に、化学的に架橋結合させることにより生成させることもできる。本発明におけるＭＨＣ抗原分子の多価形状についてのさらなる記載は米国特許出願０８／９６０，１９０に見出し得る。

【０１９９】

本発明ＴＣＲの多価形状についてのさらなる記載は米国特許出願０９／４２２，３７５（発明の名称：Ｐｏｌｙｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ａｎｄ Ｕｓｅｓ Ｔｈｅｒｅｏｆ（多重特異的結合分子とその用途；１９９９年１０月２１日出願）に見出し得る；本出願の開示は参照としてすでに本明細書中に援用されている。

【０２００】

他のＭＨＣ抗原分子とＴＣＲ分子に関して、かかる分子の多価形状など、本発明での使用について開示する参照文献：米国特許出願０９／４２２，３７５に見出し得る。

【０２０１】

例えば、一態様において、主題のＭＨＣ抗原分子は標準的な方法により、適切なアダプターまたはタグ標識分子、例えば、ＩｇＧまたはその機能的フラグメントなどの免疫グロブリン定常ドメインに融合することができる。特定の例において、ＭＨＣ抗原分子は融合した提示ペプチドとアダプターとを含む一本鎖ＭＨＣ構築物として構成される。通常、アダプターまたはタグ標識は一本鎖構築物のＣ－末端に融合させるが、Ｎ－末端に融合させるなど、他の配列も、ある適用では示し得る。特定の多価複合体は一般に約２～約１０単位、好ましくは約２～５単位を有するが、多くの適用に有用なのは約４単位（すなわち、四量体）である。

【０２０２】

下記実施例３および５は、免疫複合体の形成を検出するアッセイの感度を上昇させるために多価複合体を使用する本発明のより具体的な方法を記載する。これらの実施例においては、多価ＭＨＣ抗原を生成させ、固形支持体、すなわち、すでに記載したマルチウエルプレートに固定化する。この態様において、ＭＨＣ抗原分子は提示ペプチドに共有結合する

ＭＨＣ成分である。しかし、エンプティＭＨＣ分子は、この方法においては提示ペプチドでの負荷が好ましい態様において使用し得る。他の態様において、ＭＨＣ抗原は、共有結合した、または未結合のスーパー抗原と複合体形成したＭＨＣ成分から成立し得る。記載したごとき多価複合体を生成させるには、異なる方法を使用することができる。実施例３では、ＭＨＣ抗原分子、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡをＩｇＧ重鎖とκ鎖の免疫グロブリン定常ドメインに融合させた。実施例４では、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ分子をＩｇＭ重鎖の免疫グロブリン定常ドメインに融合させた。両方の実施例においてｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ分子の多量体化は免疫グロブリン骨格を仲介とした。本発明のこの態様においては、ＤＯ１１．１０ＴＣＲを発現する細胞をウエルに加え、数時間ないし２～３日以上培養する。細胞によるＩＬ－２産生は、前記記載の線に沿って測定する。下記実施例３および５に記載したように、アッセイ感度の有意な上昇（２ないし１０倍）が多価複合体の使用により達成される。

【０２０３】

多価ＭＨＣ抗原分子を使用する他の態様において、同族体ＴＣＲ分子を発現する細胞は、少なくとも１種の完全可溶性多価ＭＨＣ抗原分子と、一般的には一夜のインキュベーションで接触させる。試験化合物はすでに考察した線に沿って、細胞または多価ＭＨＣ抗原分子の添加前、その間、またはその後にウエルに添加することができる。引き続いて、細胞を洗浄し、多価ＭＨＣ抗原分子（今は細胞に結合）に特異的に結合し得る検出可能に標識化した抗体と接触させる。次いで、検出可能な標識が存在するか、存在しないかについて細胞を分析する。検出可能な標識の存在をＴＣＲ：ＭＨＣ抗原複合体形成の指標とする。対象となる特定試験化合物は、本明細書にて言及した１種以上のコントロールと比較して、免疫複合体の形成を調節する能力を示す化合物である。

【０２０４】

本方法のより具体的な例は下記実施例１５に記載のプレートに基づくアッセイフォーマットである。本発明のこの例示において、ＭＨＣ抗原分子はｓｃ－ＩＡ^{d}／ＧＤ－Ｉｇ融合タンパク質であり、細胞はＤＯ１１．１０またはＧＤ１２ＴＣＲを発現するＴ細胞ハイブリドーマである。多価ＭＨＣ抗原分子は、本方法においてビオチンで検出可能に標識した抗－Ｉｇモノクローナル抗体とのインキュベーションにより調製する。かかるビオチンはそれ自体シトクロムに結合したストレプトアビジンとさらにインキュベーションすることによりタグ標識する。本発明の特定の例において実施されるコントロールは、多価ＭＨＣ抗原とＤＯ１１．１０Ｔ細胞発現細胞との同時インキュベーションである。実施例１５で説明するように、染色した細胞のフローサイトメトリー（すなわち、ＦＡＣＳ）では、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－Ｉｇ分子がＧＤ１２Ｔ細胞ハイブリドーマを染色するが、ＤＯ１１．１０細胞発現細胞は染色し得ないことを示した。

【０２０５】

実施例１５に例示した発明の態様は、上記の高速大量処理アッセイまたは超高速大量処理アッセイなどの様々なスクリーニングフォーマットにおいて、また下記実施例において試験化合物を選抜するために適合させることができる。一般に、試験化合物はＧＤ１２Ｔ細胞ハイブリドーマとその同族体多価ＭＨＣ抗原分子との間の相互作用を特異的に調節する受容能力について同定し、選択する。対象となる特定の試験化合物は、細胞シグナルにおける容易に検出し得る変化（増減）を明らかに示す。この特異的アッセイ法は他のＴＣＲ：ＭＨＣ抗原対の選抜にさらに適合し、要すれば、ＤＯ１１．１０細胞はＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を非特異的に調節する試験化合物について有用なコントロールとして採用することができる。

【０２０６】

もう一つの態様において、本発明は完全可溶性ＴＣＲおよびＭＨＣ抗原分子などの可溶性分子を利用する方法を提供する。一態様において、本発明はとりわけＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を調節する試験化合物を検出するタンパク質に基づくスクリーニング方法を提供する。本発明のこの特徴は、一部の事例において細胞応答に対する非特異作用から生じる「擬陽性」シグナルを減少させるか、または除去するなどの重要な利点を提供し得る。一般的に、ＥＬＩＳＡ、蛍光に基づく均一アッセイフォーマットなどの方法が好適であるが

、他の直接または間接的検出フォーマットも特定のスクリーニング例ではより有用であり得る。

【０２０７】

本発明のＥＬＩＳＡに基づくフォーマットの特定例において、当該選抜には３つの有用な成分を要する：１：同族体ＭＨＣ抗原分子を認識する可溶性ＴＣＲ；２：可溶性同族体ＭＨＣ抗原分子；および３：ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子との間の特異的相互作用を遮断する阻害化合物。本アッセイではこの例のために形式を整え、ＴＣＲ（１）がマイクロタイタープレートに固定化し、次いでＭＨＣ抗原分子（２）と阻害化合物（３）を加えてＴＣＲ（１）に結合させ、次いでＭＨＣ抗原を認識して化学反応（標識＝西洋わさびペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）またはアルカリホスファターゼ（ＡＰ））によるか、または直接の測定（標識＝放射活性同位体または蛍光化合物）による読み取り値を与える標識抗体または他の試薬を添加することにより結合の度合いが明らかとなるようにする。

【０２０８】

例えば、一つの方法において、組換え細胞は、例えば、組換え一本鎖フォーマットにおいて可溶性の主題ＴＣＲを発現するように調製する。ｓｃ－ＴＣＲの適量を精製し、次いでマルチウエルプレートなどの固形支持体または固相に、通常２～３時間ないし約２４時間までの時間あるいはそれ以上、固定化する。一般に、プレートの各ウエルには固定化ＴＣＲ分子を容れる。引き続き、適量の検出可能に標識したＭＨＣ抗原分子を各ウエルに加える。一態様において、検出可能な標識はＭＨＣ抗原分子の多量体化に備えて選択するが、他の態様においての標識は多量体化に備える必要はない。必要に応じて、ＭＨＣ抗原分子は融合した提示ペプチドを担持するＭＨＣ成分から成り立ち得る。あるいは、ＭＨＣ分子はエンプティであってもよく、その場合、該分子は確立された手法に従って提示ペプチドを負荷することができる。他の態様においては、ＭＨＣ抗原は共有結合した、または未結合のスーパー抗原と複合体形成したＭＨＣ成分から成り立ち得る。しかし、多量体ＭＨＣ抗原分子を使用する場合には、相互作用の弱い複合体の結合活性を増幅することが多くの場合可能である。このように、本発明のこの態様は、主題の免疫複合体について相互作用の弱いことが分かっているか、またはその疑いのある場合に好適である。

【０２０９】

この例において、試験化合物はすでに考察した線に沿って、ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子の添加前、その間、またはその後にウエルに添加することができる。対象となる特定の試験化合物は所望どおりにＴＣＲ分子と多量体化または単量体化ＭＨＣ抗原分子間の特異結合を調節する。

【０２１０】

この態様の特定例は、下記実施例１６に提供する。この態様において、スクリーニング方法は２６４ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原、ｐ５３ヒト腫瘍サプレッサータンパク質のペプチド２６４～２７２フラグメントを負荷したＨＬＡ－Ａ２クラスＩ分子との間に形成される免疫複合体を変調し得る試験化合物を検出するように設計する。

【０２１１】

この態様のもう一つの特定例は、下記実施例１７に提供する。この態様において、スクリーニング法はＭＳ患者から誘導される一本鎖ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原、ＭＢＰペプチドに共有結合した一本鎖ＨＬＡ－ＤＲ２分子との間で形成される自己免疫の免疫複合体を調節する試験化合物を検出するように設計する。

【０２１２】

このアッセイのフォーマットは多様である。例えば、ＭＨＣ抗原はプレート上に固定し、可溶性の一価または多価のＴＣＲでプローブする。あるいは、該反応は溶液中で実施するようにフォーマット化するが、そのために該試薬の一方または他方をビーズまたはデンドリマーに固定し、溶液の化学、捕捉または検出が容易となるようにする。

【０２１３】

より具体的な例示において、選抜は以下のようにフォーマット化する：ＭＨＣ抗原をプレートに付着させ、そのプレートを洗浄し、ブロックし、可溶性ＴＣＲを加えて室温で１時

間インキュベートするようにする。プレートを洗浄し、酵素またはビオチン結合抗体を加え、ＴＣＲ複合体と３０分ないし１時間相互作用させる。このプレートを洗浄し、（要すれば）酵素結合アビジンで再プローブし、洗浄する。色素原酵素基質を加え、酵素が基質を発色団産物に変換させるようにする。反応を止め、プレートリーダー上、発色団産物に適した波長で吸光度を測定し、結果を集める。ＭＨＣ抗原がペプチド－ＭＨＣ複合体からなる場合、ＭＨＣ抗原に対するＴＣＲの全体としての結合活性は、ペプチドを持たないか、または無関係のペプチドをもつＭＨＣに対するＴＣＲの親和性の総計（Ｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ ３８７：６１７－６２０；測定されたこの相互作用のK_dは２Ｂ４ＴＣＲおよびエンプティＩＥ^{k}に対し＞２ｍＭである）、適切なペプチドを負荷したＭＨＣに対するＴＣＲの親和性（Ｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．ｉｂｉｄ．－K_d ｏｆ ２Ｂ４ ｆｏｒ ＩＥ^k／ＭＣＣ ｐｅｐｔｉｄｅ ＝ ５０－９０ｍＭ；Ｓｅｉｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８５：１９１９－１９２７－K_d ｏｆ ＤＯ１１ ｆｏｒ ＩＡ^d／ＯＶＡ ｐｅｐｔｉｄｅ ＝ ３１ｍＭ）、およびオリゴマー形成により提供されるさらなる安定性（Ｒｅｉｃｈ ｅｔ ａｌ．）である。使用されるＴＣＲの原子価は全体のアッセイ条件に影響し（Ｏ’Ｈｅｒｒｉｎ Ｓ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８６：１３３３－１３４５：二価対一価のＴＣＲを使用した場合の約５０倍高い親和性を示した）、改善を必要とする変数の一つである。

【０２１４】

もう一つの態様において、アッセイは均一系アッセイとしてフォーマット化し、サンプルの移動と洗浄工程関連の問題を回避するのがよい。均一系アッセイは高速大量処理および超高速大量処理スクリーニングにとって好適である。特に好ましい均一系アッセイは免疫複合体形成について蛍光または発光プローブに依存するアッセイ法である。かかるフォーマットのより具体的な例は、これらに限定されるものではないが、光学的、蛍光もしくは発光強度に基づくアッセイ法、時間分解蛍光法、近接性に基づくエネルギー転移（蛍光共鳴エネルギー転移アッセイ、シンチレーション近接アッセイおよび発光近接アッセイを含む）、蛍光偏光分光測定法、および蛍光相関分光法などである。

【０２１５】

下記実施例１８はこの態様の特定例を提供する。この実施例において、スクリーニング法はＭＳ患者から誘導される一本鎖ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ抗原、ＭＢＰペプチドに共有結合した一本鎖ＨＬＡ－ＤＲ２分子との間で形成される自己免疫の免疫複合体を変調させうる試験化合物を検出するように設計する。精製したＭＳｓｃ－ＴＣＲおよびｓｃ－ＤＲ２／ＭＢＰタンパク質は、供与および受容ビーズにそれぞれ固定化する。受容ビーズは固定化ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の相互作用により接近したときに、化学発光シグナルを放出するように設計する。ＴＣＲ－およびＭＨＣ抗原－被覆ビーズはマイクロタイターのウエルに添加し、免疫複合体の生産的形成から生じる発光シグナルを時間分解モードで測定する。試験化合物は以前に考察した線に沿って、ＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子の添加前、その間、またはその後にウエルに添加することができる。対象となる特定の試験化合物は、所望どおりにＴＣＲ分子とＭＨＣ抗原分子間の特異結合を調節する。

【０２１６】

以前のスクリーニング方法は、Ｔ細胞応答を阻害または刺激する化合物を検出するのに使用していた。一つの方法では、エンプティＭＨＣ分子のペプチド結合溝に結合したときに、他のペプチド抗原を提示するＭＨＣ分子の能力を遮断し得るペプチドまたはペプチド模倣体について選抜していた（参照文献：Ｌａｍｏｎｔ Ａ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４４：２４９３－２４９８；Ｆａｌｃｉｏｎｉ Ｆ．ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：５６２－５６７）。すでに開示したように、この方法では機能的なＭＨＣ抗原分子の形成を遮断する化合物（すなわち、ＭＨＣアンタゴニスト）を同定した。もう一つの方法ではエンプティＭＨＣ分子のペプチド結合溝に結合したときに、ＴＣＲアンタゴニストまたはアゴニストとして作用し得るＭＨＣ－ペプチド複合体の形成に至らしめるペプチドについて選抜していた（参照

文献：De Magistris M. T. et al. (1992) Cell 68: 625－634; Sette A. et al. (1994) Annu. Rev. Immunol. 12: 413－413; Wilson D. B. et al. (1999) J. Immunol. 163: 6424－6434; Hiemstra, H. S. et al. (2000) Curr. Opin. Immunol. 12: 80－84; Abrams S. I. et al. (2000) Curr. Opin. Immunol. 12: 85－91)。すでに報告されているように、この方法では、ペプチド抗原および抗原模倣体（アゴニスト）またはいわゆる変更したペプチドリガンド（アンタゴニスト）としてMHCとの関連で作用する化合物を同定していた。

【0217】

本発明は前項に記載した特定の選抜法などの上記の方法とは異なるスクリーニング法を特徴とする。例示のように、本発明は（予め形成された）同族体ペプチド－MHC複合体など、TCRとその同族体MHC抗原間の相互作用を調節する化合物を検出・同定する方法を特徴とする。本発明の方法はエンプティMHC分子のペプチド結合溝に結合する化合物を同定することに拘束されるものではない。かくして、本発明の方法はTCRとMHC抗原分子間の相互作用を調節する広く多様な（または広範な）化合物を検出する上での便益性を提供する。さらに、本発明はTCRおよび／またはMHC抗原分子と相互作用する化合物を検出する上での特別の利点を提供する。すでに教示したように、本発明方法により同定される化合物は上記の方法で同定された化合物とは異なる性質（すなわち、結合特異性、成分、薬理作用）を有すると期待される。

【0218】

強調されることは、上で考察した具体例にもかかわらず、本発明は完全可溶性分子、細胞に基づくフォーマット、およびその組み合わせの使用（例えば、一つの完全可溶性分子および一つの細胞発現分子）などの異なるスクリーニングフォーマットの一つまたは組み合わせの使用に対して、またTCR：MHC抗原相互作用が役割を演じる何らかの疾患に対して極めて柔軟であり、かつ適応性に富むことである。

【0219】

本発明の多くの適用にとって、特異的選抜の成分は、可溶性一本鎖TCR、遺伝的に結合したペプチドまたはスーパー抗原をもつかまたはもたない可溶性一本鎖MHC、小型分子または他の潜在的に可能なアゴニストまたはアンタゴニスト作用因子のライブラリー、および検出可能なシグナルを生成するのに必要な他の化合物などである。アンタゴニスト化合物はTCRとMHC抗原との相互作用を特異的に遮断する化合物を同定するために選抜する。MHC抗原がペプチド－MHC複合体である場合、スクリーニング法ではMHC分子が提示するペプチドとのTCR相互作用を遮断するアンタゴニスト化合物、並びにMHC成分または特異的MHCファミリーとの相互作用を一般的に阻害する化合物を同定する。MHC抗原がスーパー抗原－MHC複合体である場合、スクリーニング法ではMHC分子が結合したスーパー抗原とのTCR相互作用を遮断するアンタゴニスト化合物、並びにMHC成分との相互作用を一般的に阻害する化合物を同定する。MHC抗原が異質反応性（異種反応性）MHC分子である場合、スクリーニング法では異質反応性（異種反応性）MHC成分とのTCR相互作用を遮断するアンタゴニスト化合物を同定する。

【0220】

この態様において、本方法はさらに利点を提供し得る。すでに考察したように、該選抜はTCRとユニークペプチドを担持するMHC分子との相互作用を特異的に阻害する試験化合物または特定MHCファミリーとの相互作用を阻害する試験化合物を効率的に選抜し得る。この化合物は従って抗原提示細胞（MHCと会合するペプチドを担持）とT細胞（TCR担持）との相互作用が引き金となる自己免疫疾患またはアレルギー症状を抑制するために使用し得る。これらの阻害化合物は、該疾患に対し特異的な反応を阻害するが、他の免疫応答は損なうことがなく、全体としての免疫応答を抑制する治療法をしのぐ有意な利点を提供する。

【0221】

もう一つの態様において、該選抜法はＴＣＲとスーパー抗原を担持するＭＨＣ分子との相互作用を特異的に阻害する試験化合物を効率的に選択し得る。この化合物は従ってＴ細胞（ＴＣＲ担持）と抗原提示細胞（ＭＨＣと会合したスーパー抗原担持）との相互作用が引き金となる疾病または疾患の症状を抑制するために使用することができる。再度、これらの阻害化合物は、疾患に特異的な反応を阻害するが、他の免疫応答は損なうことがなく、全体としての免疫応答を抑制する治療法をしのぐ有意な利点を提供する。

【０２２２】

さらにもう一つの態様において、該選抜法はＴＣＲと異質反応性（異種反応性）ＭＨＣ分子との相互作用を特異的に阻害する試験化合物を効率的に選抜することができる。この化合物は従ってＴ細胞（ＴＣＲ担持）と抗原提示細胞（異質反応性または異種反応性ＭＨＣ担持）との相互作用が引き金となる組織移植と関連する免疫応答を抑制するために使用することができる。再度、これらの阻害化合物は、疾患に特異的な反応を阻害するが、他の免疫応答は損なうことがなく、全体としての免疫応答を抑制する治療法をしのぐ有意な利点を提供する。

【０２２３】

他の態様において、アゴニスト化合物はＴＣＲとＭＨＣ抗原との相互作用を特異的に増大する化合物を同定するために選抜する。ＭＨＣ抗原がペプチド－ＭＨＣ複合体である場合、スクリーニングはＭＨＣ分子が提示するペプチドとのＴＣＲ相互作用を増大するアゴニスト化合物、並びにＭＨＣ成分または特異的ＭＨＣファミリーとの相互作用を一般的に増大する化合物を同定する。ＭＨＣ抗原がスーパー抗原－ＭＨＣ複合体である場合、スクリーニングはＭＨＣ分子が結合するスーパー抗原とのＴＣＲ相互作用を増大するアゴニスト化合物、並びにＭＨＣ成分との相互作用を一般的に増大する化合物を同定する。ＭＨＣ抗原が異質反応性ＭＨＣ分子である場合、スクリーニングは異質反応性ＭＨＣ成分とＴＣＲとの相互作用を増大するアゴニスト化合物を同定する。

【０２２４】

この態様において、本方法はさらなる利点を提供し得る。考察したように、該選抜はＴＣＲとユニークペプチドを担持するＭＨＣ分子との相互作用を特異的に増大する試験化合物または特定ＭＨＣファミリーとの相互作用を増大する試験化合物を効率的に選抜し得る。この化合物は従って抗原提示細胞（ＭＨＣと会合するペプチドを担持）とＴ細胞（ＴＣＲ担持）との相互作用が引き金となる免疫応答を刺激するために使用し得る。かかる化合物は感染性作用因子および癌の治療に有用である。これらのアゴニスト化合物は該疾患に特異的な免疫反応を刺激するユニークな方法を提供することにより、有意な利点を提供する。これらの化合物はワクチンなど伝統的な免疫刺激療法と関連して有用である。

【０２２５】

他の態様において、該アゴニスト化合物は自己免疫疾患およびアレルギーなどの免疫異常の治療に有用である。かかる化合物の使用は有害な免疫応答をダウンレギュレーションまたは抑制し得る免疫応答の免疫変更または誘導に導き得る。

【０２２６】

すでに考察したように、ＴＣＲは、例えば、アッセイの条件に左右される可溶性分子の幾つかの形状の一つであり得る。前掲の考察と以下の例示は、これら可溶性ＴＣＲ分子の多くを提供する。例えば、当該分子は３つのドメインをもつ一本鎖形状（ｓｃＴＣＲ）として発現される；すなわち、アルファ可変ドメイン（Ｖα）はベータ可変ドメイン（Ｖβ）とベータ定常ドメイン（Ｖβ）とに、２０個のアミノ酸グリシン－セリン・リンカー（$[G_4S]_4$）を介して融合している。その単量体形状において、ＴＣＲは可溶性一本鎖として、またはカッパ定常領域に融合して発現され得る。ＴＣＲの多量体複合体は多くの方法により、例えば、Ｉｇ定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３）に遺伝的に融合させ二量体を産生すること、細胞においてｓｃＴＣＲ－ＩｇＧカッパ鎖とｓｃＴＣＲ－ＩｇＧ重鎖を同時発現して四量体複合体を産生すること、並びに本明細書に記載の他の方法などにより調製し得る。

【０２２７】

該スクリーニング法は他のＴＣＲ分子にも適合し得る。例えば、高次多量体はＩｇＧをＩｇＡまたはＩｇＭに変換することにより調製し得る。機能的多量体もまたｓｃＴＣＲを化学的に架橋し、デンドリマーなどの可溶性固形支持体の形状とすることができる。多量体ＴＣＲ分子の形状と他の用途に関する記載は別に特許出願の予定である。米国特許出願０９／４２２，３７５も参照。ＴＣＲ分子の別の形状はコレセプターＣＤ４またはＣＤ８のＭＨＣ結合領域を含むようにも産生し得る。

【０２２８】

当該選抜に採用されるＭＨＣ抗原分子は遺伝的に繋いだ（提示）ペプチドを含んでいてもよく、アッセイの条件次第で可溶性分子の幾つかの形状の一つであってもよい。この特定のＭＨＣ抗原分子の可溶性形状についての記載は、例えば、米国特許出願０８／５９６，３８７および米国特許出願０８／９６０，１９０に見出し得る。ＭＨＣ抗原の多量体形状は、ＴＣＲについて記載したのと同様、要すればアッセイのために産生させてもよい。

【０２２９】

考察したように、本スクリーニング方法は、例えば、主題のＴＣＲ／ＭＨＣ抗原分子および所望の結果により、異なる試験化合物を検出し、同定、選択するように調整することができる。

【０２３０】

例えば、特定の免疫複合体のアンタゴニストとして挙動する試験化合物を検出することが多くの場合好ましい。この態様において、採用される特定の試験方法では、ここで提供される適当なコントロールの少なくとも一つに比較して、主題の免疫複合体の形成および／または安定性が少なくとも約１０％低下して示される。

【０２３１】

さらに好適な試験化合物は、もし該試験方法において、ここで提供される適当なコントロールの少なくとも一つに比較して、免疫複合体の形成および／または安定性が少なくとも約１０％上昇して示されるならば、該免疫複合体のアゴニストであり得るとみなす。

【０２３２】

より具体的に好適な試験化合物は、主題の免疫複合体の形成を阻害または除去し得る。さらに好適な試験化合物は免疫複合体の親和性定数［K_A］を増加または低下させ得る。

【０２３３】

親和性定数を測定する方法はこの分野で既知であり、通常の熱力学的測定値である。参照文献例：Ａｌａｍ，ＳＭ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ １０：２２７－２３７。より具体的には、仮に［ＴＣＲ］を未結合ＴＣＲ分子のモル濃度とし、［ＭＨＣ抗原］を未結合ＭＨＣ抗原分子のモル濃度とし、かつ［ＴＣＲ／ＭＨＣ抗原］を免疫複合体のモル濃度するなら、K_Aはほぼ平衡状態での免疫複合体量を測定することにより容易に決定することができる。アンタゴニストとしての試験化合物の検出を示す態様において、かかる化合物は、好ましくは、試験化合物の存在しない場合のK_Aなど、ここで準備した適当なコントロールの少なくとも一つに比較して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし１００％の親和性定数の低下を示す。

【０２３４】

しかし、主題の免疫複合体のアゴニストについて選抜するために検出方法を最適化する他の態様においては、好適な試験化合物はコントロールに比較して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし１００％から５００％ないし約１０００％までの親和性定数K_Aの上昇を示す。

【０２３５】

さらに好適な試験化合物は免疫複合体の形成速度を加速または減速させると思われる化合物である。

【０２３６】

免疫複合体の形成速度は通常の熱力学的方法により確認することができる。参照文献例：

Ａｌａｍ，ＳＭｅｔａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ１０：２２７－２３７。とりわけ、免疫複合体の形成速度［k_1］および解離速度［k_{-1}］はかかる方法と関連の技法を用いて容易に確認することができる。一般に、形成速度と解離速度を決めるためには、特定のＴＣＲとＭＨＣ抗原分子との間の主題の免疫複合体の形成を、試験化合物の存在および非存在下に、経時的（例えば、２～３秒ないし数分以上まで）にモニターする。当該試験化合物がアンタゴニストであると思われる態様において、かかる化合物は、好ましくは、ここで考察した適当なコントロールの少なくとも一つ、例えば、試験化合物が存在しない場合の免疫複合体の形成速度に比較して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし１００％の免疫複合体形成速度［k_1］の低下を示す。

【０２３７】

あるいは、試験化合物が免疫複合体を不安定化し、かつ解離速度を上昇させると思われる態様において、かかる化合物は、好ましくは、コントロールに比較して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし１００％から５００％ないし約１０００％までの解離速度［k_{-1}］の上昇を示す。

【０２３８】

試験化合物が免疫複合体の解離速度を上昇させるこれらの態様において、試験化合物は場合によりＴＣＲ／ＭＨＣ抗原の相互作用を不安定化するか、および／または免疫複合体を不安定化するとここで言及することができる。

【０２３９】

さらに好適な試験化合物は免疫複合体の結合活性を調節する受容能力を示す化合物である。結合活性は要すれば以下に記載する方法など、免疫学的技法の一つまたは組み合わせにより観察し、定量化することができる。特定の試験化合物がＴＣＲとＭＨＣ抗原分子の結合活性を低下させる態様において、かかる化合物は、好ましくは、ここで提供した適当なコントロールの少なくとも一つ、例えば、試験化合物が存在しない場合の結合活性などと比較して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし１００％の結合活性の低下を示す。しかし、試験化合物がアゴニストであると思われるもう一つの態様において、かかる化合物は、好ましくは、コントロールに比較して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし１００％から５００％ないし１０００％までの結合活性の増大を示す。

【０２４０】

さらに好ましい試験化合物は免疫複合体の多量体化を調節する受容能力を示す化合物である。多量体化は技法の一つまたは組み合わせにより観察し、定量化することができる。参照文献例：Ａｌａｍｅｔａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｉｔｙ１０：２２７－２３７；Ｒｅｉｃｈｅｔａｌ．（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ３８７：６１７－６２０。特定の試験化合物はＴＣＲとＭＨＣ抗原分子の多量体化を減ずる態様においては、かかる化合物は、好ましくは、ここで提供した適当なコントロールの少なくとも一つ、例えば、試験化合物が存在しない場合のかかる多量体化と比較して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし１００％の結合活性の低下を示す。しかし、試験化合物がアゴニストであると思われるもう一つの態様において、かかる化合物は、好ましくは、コントロールに比較して、少なくとも約１０％、好ましくは少なくとも約２０％、より好ましくは少なくとも約５０％、さらにより好ましくは少なくとも約７５％ないし１００％から５００％ないし約１０００％までの多量体化の増大を示す。

【０２４１】

さらに好ましい試験化合物は、少なくとも一つの細胞応答、典型的にはＴ細胞またはＴ細胞ハイブリドーマの応答を調節する化合物、すなわち、適当なコントロールに比較して約

１．５ないし約１００倍増減させる化合物である。ここに開示した方法の特定態様において、好適な応答はサイトカインの産生、特にＩＬ－２サイトカインの産生である。

【０２４２】

本発明のさらに適当な試験化合物は、好ましくは、コントロール免疫複合体の形成を調節する能力が無視しうるものである。一態様において、かかるコントロール免疫複合体はＴＣＲ分子およびＴＣＲ分子上のエピトープに特異的に結合する抗体であって、ペプチド結合ＭＨＣ分子などの特定のＭＨＣ抗原分子が特異的に結合していないもの（抗－ＴＣＲ抗体）である。あるいは、コントロールの免疫複合体は、例えば、細胞膜中でＴＣＲと会合した少なくとも一種の分化クラスター（ＣＤ）タンパク質である。好ましくは、ＣＤタンパク質はＣＤ３であり、抗体はＴＣＲ分子と会合したＣＤ３に特異的に結合し得るものである（抗－ＣＤ３抗体）。

【０２４３】

考察したように、本発明の目的は本方法により検出される試験化合物の少なくとも一つを含む有用な医薬組成物を提供することである。かかる組成物は数種のいずれかの方法で被験者に投与することができる。例えば、所定の試験化合物または組み合わせた試験化合物は、標的とする免疫症状の発症を予防するか、またはその重篤度を緩和するために予防薬として投与することができる。あるいは、かかる試験化合物または医薬組成物は、標的とする症状の進行前、その間、またはその後に投与することができる。

【０２４４】

本発明の医薬化合物は場合により治療化合物とも呼称するが、被験者に対し、単独で、または１種以上の治療薬との組み合わせで、通常の添加剤、すなわち、医薬的に許容し得る有機または無機の担体物質であって、活性化合物と有害な反応をせず、またその受容者に有害とならない、非経口、経腸または鼻腔内投与に適したものと混合した医薬組成物として投与することができる。適当な医薬的に許容し得る担体とは、これらに限定されるものではないが、水、塩溶液、アルコール、植物油、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、芳香油、脂肪酸モノグリセリドおよびジグリセリド、石油エーテル脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどである。医薬製剤は無菌化可能であり、要すれば、補助薬、例えば、滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、懸濁剤、浸透圧に影響する塩、緩衝剤、着色剤、風味剤および／または芳香物質など、活性化合物と有害に反応しないものと混合することができる。

【０２４５】

かかる組成物は、非経口投与用には、特に液状の溶液または懸濁液の形状で、経口投与用には、特に錠剤またはカプセル剤の形状で、鼻腔内用には、特に粉末、鼻腔滴剤、またはエアゾールの形状で、膣用、局所用には、例えば、クリームの形状で、直腸用には、例えば、座剤などとして調製することができる。

【０２４６】

医薬製剤は単位投与量の形状で簡便に投与することが可能であり、製剤技術上周知の方法で調製し得る；記載文献例：Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（レミントンの薬学）（Ｍａｃｋ Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，１９８０）。非経口用の製剤は一般的な添加剤、例えば、無菌水または生理塩溶液、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物起源の油、水素化ナフタレンなどを含んでもよい。とりわけ、生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド／グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマーなどが本発明の方法により同定された特定試験化合物の放出制御のために有用な添加剤である。

【０２４７】

他の潜在的に有用な非経口送達システムはエチレン－ビニル酢酸コポリマー粒子、浸透圧ポンプ、移植可能注入システム、およびリポソームなどである。吸入投与用製剤は添加剤として、例えば、ラクトースを含んでいてもよく、または例えば、ポリオキシエチレン－

９－ラウリルエーテル、グリコール酸塩およびデオキシコール酸塩を含む水溶液であっても、あるいは鼻腔滴剤の形状で投与するための油溶液であってもよいし、または鼻腔内に適用するゲル剤としてもよい。非経口用製剤は口腔内投与用のグリコール酸塩、直腸投与用のメトキシサリチル酸塩、または膣投与用クエン酸であってもよい。他の送達システムでは身体の対象部位に直接治療剤を投与する。

【０２４８】

本発明の医薬組成物は現在の治療方法に唯一の活性医薬製剤として採用することが可能であり、あるいは免疫調整作用の認められた既知薬剤を含む他の活性成分と組み合わせて使用することもできる。かかる薬剤の例は、これらに限定されるものではないが、サイクロスポリン、ある種の細胞毒性薬剤、リンパ球免疫グロブリン、副腎皮質ステロイド、スルファサラジン、ＦＫ－５０６、メトキサレン、ラパマイシン、およびサリドマイドなどである。これらの薬剤および他の有用な薬剤に関係する開示についての参照文献例：Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（８ｔｈ ｅｄ．）Ｇｉｌｍａｎ，Ａ．ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．）ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｈｅａｌｔｈ Ｐｒｏｆｅｓｓｉｏｎａｌｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，ｐｐ．１２６４－１２７６（１９９３）。

【０２４９】

治療用組成物における一種以上の治療化合物の濃度は、多くの因子、例えば、投与すべき特定製剤の投与用量、採用する組成物の化学的特性（例えば、疎水性）、および意図する投与様式と経路などにより変化する。一般的に言って、一種以上の検出された試験化合物は、約０．１ないし１０％ｗ／ｖの非経口投与用化合物を含む水性生理的緩衝液として提供し得る。

【０２５０】

所定の治療法にて使用される活性化合物の実際の好適な量が、例えば、利用される具体的な化合物、製剤化される特定の組成物、投与様式および被験者の特徴、例えば、被験者の人種、性別、体重、全身の健康状態、年齢などによって変わるということは認識しなければならない。所定の投与プロトコールについての最適投与率は、当業者が前記のガイドラインに照らして実施する通常の投与用量決定試験に従い、容易に確認することができる。適当な用量範囲は体重１ｋｇ当たり１日量、約１μｇないし約１００ｍｇである。

【０２５１】

本発明の治療用化合物は、プロトン化された水溶性形状で、例えば、医薬的に許容し得る塩、代表的には無機酸付加塩などの酸付加塩、例えば、塩酸塩、硫酸塩、またはリン酸塩、あるいは有機酸付加塩、例えば、酢酸塩、マレイン酸塩、フマール酸塩、酒石酸塩、またはクエン酸塩などの形状で適切に投与される。本発明の治療用化合物の医薬的に許容し得る塩は、金属塩、とりわけナトリウム塩またはカリウム塩などのアルカリ金属塩、マグネシウム塩またはカルシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩またはテトラメチルアンモニウム塩などのアンモニウム塩、またはリジン、グリシンまたはフェニルアラニン塩などのアミノ酸付加塩などでもよい。

【０２５２】

本発明の多くの適用にとって、特に完全可溶性分子を使用する態様においては、実質的に純粋なＴＣＲとＭＨＣ抗原分子を使用することが役に立つ。好ましくは、かかる分子は本来それを伴う細胞代替物から単離されており、結果として融合タンパク質は少なくとも９０～９５％の相同性（ｗ／ｗ）で存在する。少なくとも９８～９９％の相同性（ｗ／ｗ）を有する組換え融合タンパク質を含むＴＣＲとＭＨＣ抗原分子は、本発明の多くの適用、例えば、医薬、臨床および研究用途などに最も好適である。一旦、実質的に精製される限り、該分子はかかる適用のために実質的に汚染物質を含まないはずである。一旦、部分的にまたは実質的純度まで精製される限り、該分子は治療的に、または本明細書に開示したインビトロまたはインビボのアッセイを実施する際に使用することができる。実質的な純度は、クロマトグラフィーおよびゲル電気泳動などの様々な標準的技法により決定することができる。これら標準的方法の多くに関して考察する一般的文献：Ｓａｍｂｒｏｏｋ

ｅｔ ａｌ． ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（分子クローニング：実験室マニュアル）（２ｄ ｅｄ． １９８９）；ａｎｄ Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９８９），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（分子生物学における最新のプロトコール），Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；これらの開示を本明細書中に参考として援用する。

【０２５３】

すでに考察したように、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子は既知の技法を適切に組み合わせることにより分取・精製することができる。これらの方法は、例えば、塩沈殿および溶媒沈殿などの溶解性を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動などの分子量の差を利用する方法、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどの電荷の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、および等電点電気泳動、Ｎｉ－ＮＴＡなどの金属アフィニティカラムなどの等電点ｐＨの差を利用する方法などである。これらの方法に関する開示は、上記一般的文献：Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ． ａｎｄ Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．

【０２５４】

「完全可溶性」または同様の用語は、主題のＴＣＲまたはＭＨＣ抗原分子が低Ｇ力遠心分離（例えば、標準の遠心分離において約３０，０００回転／分未満）の下で、水性緩衝液、例えば、細胞培地から容易には沈降しないことを意味する。さらに、融合分子は約５～３７℃以上の温度で、かつアニオン性または非イオン性界面活性剤が低濃度で存在するか、存在しない条件下、ｐＨ中性又はその近辺で水溶液のままであるならば可溶性である。これらの条件下、可溶性タンパク質は多くの場合低沈降値を有し、例えば、約１０～５０スベドベリ単位未満である。

【０２５５】

本明細書にて使用される場合、ＴＣＲ分子に関連して使用される用語「フラグメント」または「機能的フラグメント」は、かかる分子の一部であって（ヘテロ二量体または本質的に完全長のＶ鎖を含んでなる一本鎖構築物）、対応する完全長の分子と比較した場合、特定ＭＨＣ抗原分子の少なくとも約７０％、好ましくは少なくとも約８０％、９０％、９５％から１００％以上までに特異的に結合し得る分子を意味する。例示のように、完全長ｓｃ－ＴＣＲとは完全長Ｖ－αおよびＶ－β鎖をもつ分子と定義される。同様に、完全長ＴＣＲヘテロ二量体は完全長α鎖およびβ鎖を有する分子、特に対応する膜貫通細胞質ドメインをもつ分子と定義される。

【０２５６】

本明細書に開示されるＭＨＣ抗原分子に関連して使用される場合、用語「フラグメント」または「機能的フラグメント」は、かかる分子の一部であって（ヘテロ二量体または本質的に完全長の鎖を含んでなる一本鎖構築物）、対応する完全長の分子と比較した場合、特定ＴＣＲ分子の少なくとも約７０％、好ましくは少なくとも約８０％、９０％、９５％から１００％以上までに特異的に結合し得る分子を意味する。例示のように、完全長ｓｃ－ＭＨＣとは完全長αおよびβ鎖をもつ分子と定義される。同様に、完全長ＭＨＣまたはＨＬＡヘテロ二量体は、完全長α鎖およびβ鎖を有する分子、特に対応する膜貫通細胞質ドメインをもつ分子と定義される。

【０２５７】

特定のＣＤ３ζ配列と関連して使用される場合、用語「フラグメント」または「機能的フラグメント」は、本発明の細胞性応答を誘発し得る完全長配列の一部を意味する。好適なフラグメントは、対応する完全長の分子と比較した場合、特定細胞性応答の少なくとも約７０％、好ましくは少なくとも約８０％、９０％、９５％から１００％以上までを結合し得るフラグメントである。

【０２５８】

開示したフラグメントまたは機能的フラグメントの特異的結合を検出するアッセイ法につ

いて本明細書にて考察するが、そのアッセイ法の具体例はフローサイトメトリーとＢＩＡコアアッセイである。

【０２５９】

実施例１：一価一本鎖ＭＨＣ／ペプチド複合体の生成

Ａ．特異提示ペプチドを有する可溶性一本鎖ＩＥ^{k} ＭＨＣクラスＩＩ分子を発現するベクターの構築

これらの研究の目標は、ＭＨＣ／ペプチド複合体などのＭＨＣ抗原分子とＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）間の相互作用のアゴニストおよびアンタゴニストを検出するスクリーニング法の開発にあった。以前に証明されているように、ＭＨＣクラスＩＩ／ペプチド複合体は、ＴＣＲとの相互作用能力を保持してＴ細胞応答を刺激する組換え一本鎖分子として生成させることができる（Ｒｈｏｄｅ ｅｔ ａｌ．１９９６．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：４８８５；ＷＯ９９／２１５７２；ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。一本鎖（ｓｃ）マウスＩＡ^{d}／ペプチドとヒトＨＬＡ－ＤＲ２／ペプチド複合体の生成はすでに記載されている（ＷＯ９９／２１５７２；ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。ｓｃ－クラスＩＩ分子はβ１－β２フラグメントとα１－α２フラグメントとの間の柔軟なペプチドリンカーを介する融合体から成り立つ。さらに、抗原性ペプチド配列はペプチドリンカーを介してβ１ドメインのアミノ末端に結合していた。例えば、ニワトリのオボアルブミン・ペプチドＯＶＡ３２３－３３９（ＩＳＱＡＶＨＡＡＨＡＥＩＮＥＡＧＲ）またはＨＳＶ－１糖タンパク質Ｄペプチド ＧＤ２４６－２６１（ＡＰＹＴＳＴＬＬＰＰＥＬＳＥＴＰ）をエンコードする配列を、ｓｃＩＡ^{d}遺伝子融合体のβ１遺伝子フラグメントに結合し、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡおよびｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ分子をそれぞれ創生した。抗原性ペプチドは適切に折りたたまれたα１とβ１ドメインにより形成されるペプチド結合溝に結合し得るように配置した。これらの分子はインビトロでＴ細胞応答を特異的に刺激し得ることを示した。例えば、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡタンパク質は、組織培養プレート上に固定化した場合、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞ハイブリドーマからのＩＬ－２放出を刺激し得たが、一方、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤタンパク質はＧＤ１２Ｔ細胞ハイブリドーマからのＩＬ－２放出を刺激した（Ｒｈｏｄｅ ｅｔ ａｌ．１９９６．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：４８８５）。下記例に記載したように、これらのＴ細胞アッセイはＴ細胞応答を刺激するｓｃ－ＭＨＣ／ペプチド分子の能力を阻害する化合物を同定するように改変した。これらインヒビターのＭＨＣ特異性のためのコントロールとして、異なるマウスｓｃ－クラスＩＩ／ペプチド複合体を用いる、特異的な刺激を関与させるＴ細胞アッセイ法を開発した。このマウスｓｃ－クラスＩＩ／ペプチド分子の生成はＰＣＣ８８－１０４に結合した一本鎖ＩＥ^{k}（ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣ）であり、以下のように記載する。

【０２６０】

ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣ構築物に使用するＭＨＣクラスＩＩ遺伝子は、適切なＡＰＣ、ＣＨ１２細胞から生成するｃＤＮＡのＰＣＲ増幅により単離した。ＩＥ^{k} αおよびβ鎖の遺伝子フラグメントの改変版は、鋳型ＤＮＡとしてクローン化遺伝子を用い、ＰＣＲ増幅により生成させた。これらのフラグメントは図面の説明の項の図７Ａ～Ｃに示したクローニング図式のように組み立て、一本鎖ＩＥ^{k}分子に結合した抗原ペプチドＰＣＣ８８－１０４をエンコードするキメラ遺伝子とする。

【０２６１】

個々のαおよびβ鎖フラグメントを含む種々の遺伝子構築物の開発について、以下の項に記載する。α１－α２遺伝子フラグメント第一鎖ｃＤＮＡは、プライマーＶＷ４８７（４７０）およびＶＷ４８９（４７７）を用いてＰＣＲ増幅のための鋳型として役立つ。クローニングに使用するオリゴヌクレオチドの配列を表１に示す。このフラグメントはＶＷ４８７（４７０）とＶＷ４８５（４７１）により再増幅することにより３′側にて伸張し、結果としてアミノ酸配列ＭＳＧＧＧＧＣが続くＩＡ^{d}膜貫通「ヒンジ」領域で終結するαフラグメントに至る。このフラグメントはｐＧＥＭ Ｔイージイ（Ｅａｓｙ）（クロンテック（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ）、パロアルト、カリフォルニア）にクローン化し、プラスミドｐＴＶＷ４０６とする。引き続き、このα鎖挿入物をプライマーＶＷ４８７（４７０）

およびＶＷ４９０により増幅し、３′側にインビトロ・ビオチニル化のための「ｂｉｒＡ」部位を含む、ＸｈｏＩおよびＥｃｏＲＩが両側を接するフラグメントを得た。このフラグメントはｐＧＥＭ Ｔ－イージイにクローン化し、プラスミドｐＴＶＷ４２０－８を得た。Ｃ－末端およびＢｉｒＡ末端フラグメントは共に５′側にＸｈｏＩ制限部位を、また３′側にＥｃｏＲＩ制限部位を含む。β１－β２遺伝子フラグメント第一鎖ｃＤＮＡはプライマーＶＷ４８６（４６９）およびＶＷ４８８（４７２）を用い、ＰＣＲ増幅用の鋳型として役立つ。このフラグメントは５′側でＶＷ４８４（４６８）およびＶＷ４８６（４６９）での再増幅により伸張させ、ＬＳＳＡＳで始まるβ－フラグメントに至るが、この場合、ＬＳに対するコドンはＡｆｌＩＩ制限部位を表し、ＡＳに対するコドンはＮｈｅＩ制限部位を表す。このフラグメントをｐＧＥＭ Ｔイージイ（Ｅａｓｙ）（クロンテック（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ）、パロアルト、カリフォルニア）にクローン化し、プラスミドｐＴＶＷ４０７－１および－３とする。得られた構築物は成熟β鎖の最初のアミノ酸に先行して１３個のアミノ酸を有していた（ＬＳ（ＡｆｌＩＩ）Ｓ ＡＳ（ＮｈｅＩ）ＧＧＧＧＳＧＧＧ）。ＰＣＣペプチド（ＫＡＥＲＡＤＬＩＡＹＬＫＱＡＴＡＫ）をエンコードし、ＡｆｌＩＩおよびＮｈｅＩによる消化により残された部分に適合する付着末端をぶら下げたオリゴヌクレオチドプライマーＶＷ４８２（４６６）およびＶＷ４８３（４６７）を、予めＡｆｌＩＩ＋ＮｈｅＩで消化したｐＴＶＷ４０７－３にアニールし、クローン化してプラスミドｐＴＶＷ４１０－３５とした。

【０２６２】

ｓｃＩＥ^{k}の構築に関する記載は以下のとおりである。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ融合遺伝子を含むｐＧＥＭ Ｔイージイベクターを構築し、ｓｃＩＥ^{k}遺伝子のクローニング鋳型として使用した。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ融合遺伝子を含むプラスミドＳＳＣ１（ＷＯ９９／２１５７２およびＵＳＳＮ０９／２０４，９７９参照）からのＮｃｏＩからＥｃｏＲＩのフラグメントを、同じ制限酵素で切断したｐＧＥＭ Ｔイージイに基づくベクター（ｐＴＶＷ４０６）に導入した。ここに得られるクローニング鋳型（ｐＴＶＷ４０８）は、β鎖リーダー配列、制限部位ＡｆｌＩＩ＋ＳｐｅＩにより隣接させた結合ペプチドを有するβ鎖、２０個のアミノ酸リンカー配列（$G_4S)_4$、および制限部位ＸｈｏＩおよびＥｃｏＲＩが隣接したα鎖を含む。ｐＶＷ４０６－２から誘導されるカルボキシル末端Ｃを有するアルファ鎖配列は、制限フラグメントとしてｐＴＶＷ４０８に導入し、ＸｈｏＩおよびＥｃｏＲＩにより結合し、ＩＡ^{d}β鎖およびＩＥ^{k}α鎖を含むベクター４０６＋４０８を得た。結合したＰＣＣペプチドまたは単一セリンを含むＩＥ^{k}β鎖フラグメント（ｐＴＶＷ４０７－３および４１０－３５からそれぞれ誘導）を、ＡｆｌＩＩおよびＳｐｅＩによる消化後のこのプラスミドの主鎖にクローン化し、それぞれプラスミドｐＴＶＷ４１７－６およびｐＴＶＷ４１６－６とした。これら構築物のβ鎖はアミノ酸３８がアスパラギン（Ｎ）からセリン（Ｓ）に換わった突然変異を含んでいた。これはｐＴＶＷ４１７－６とｐＴＶＷ４１６－６のＨｉｎｄＩＩＩからＳｐｅＩまでのフラグメントをｐＴＶＷ４０７－１（是正したβ鎖配列を含有）からの一つと置き換えることにより是正し、プラスミドｐＴＶＷ４２２－１（ＰＣＣペプチド含有）およびｐＴＶＷ４２３－２（セリン含有）とした。得られたｓｃＩＥ^{k}遺伝子融合物をＡｆｌＩＩ／ＥｃｏＲＩフラグメントとしてプラスミドＳＳＣ１にクローン化して戻し、プラスミドｐＴＶＷ４２４－１（ＰＣＣ）およびｐＴＶＷ４２５－２（Ｓ）とした。これは効率的な翻訳のために重要な配列を取り込ませるために実施した（すなわち、コザック配列）。ｂｉｒＡ部位をエンコードする配列は、ＸｈｏＩからＥｃｏＲＩのフラグメントをｐＴＶＷ４２０－８からｐＴＶＷ４２３－２へクローニングすることにより一本鎖構築物に付加し、プラスミドｐＴＶＷ４２７－３とした。

【０２６３】

ｓｃＩＥ^{k}遺伝子を含む昆虫細胞発現ベクターをプラスミドｐＢｌｕＢａｃ４．５（インビトロゲン（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ））に組み込み、βとα鎖の以下の組み合わせのそれぞれをエンコードさせた；αに結合し、カルボキシル末端システインをもつＰＣＣペプチドが先行するβ（ＰＣＣ／Ｃ）；αに結合し、カルボキシル末端システインをもつセリン

（「ブランク」形状）が先行するβ（Ｓ／Ｃ）；αに結合し、カルボキシル末端ｂｉｒＡ配列をもつＰＣＣペプチドが先行するβ（ＰＣＣ／ｂｉｒＡ）；およびαに結合し、カルボキシル末端ｂｉｒＡをもつセリン（「ブランク」形状）が先行するβ（Ｓ／ｂｉｒＡ）。該ベクターのＰＣＣ／ＣおよびＳ／Ｃ形状はＸｍａＩからＥｃｏＲＩのフラグメントをそれぞれｐＴＶＷ４２４－１およびｐＴＶＷ４２５－２から同じ酵素で切断したｐＢｌｕｅＢａｃ４．５にクローニングすることで構築し、それぞれプラスミドｐＴＶＷ４２９－２およびｐＴＶＷ４２８－１とした。これらベクターのｂｉｒＡ形状はＳｐｅＩからＥｃｏＲＩまでのフラグメントをｐＴＶＷ４２７－３からｐＴＶＷ４２９－２およびｐＴＶＷ４２８－１へとクローニングし、ｐＴＶＷ４３１－１（ＰＣＣ／ｂｉｒＡ）およびｐＴＶＷ４３０－１（Ｓ／ｂｉｒＡ）を得た。

【０２６４】

【表１】

表１：クローニングに使用するオリゴヌクレオチド

呼称	配列
VW482(466)	5′-tta agt aag gca gaa cga gca gat cta ata gct tat cta aaa caa gcc acc gcg aag g-3′
VW483(467)	5′-cta gcc ttc gcg gtg gct tgt ttt aga taa gct att aga tct gct cgt tct gcc tta c-3′
VW484(468)	5′-ctt aag tag cgc tag cgg agg ggg cgg aag cgg cgg agg ggc aag ctt cag acc atg g-3′
VW485(471)	5′-ccc gaa ttc tat tag cag cct cct cca cct gac att ggg agg agg gtt ttc tc-3′
VW486(469)	5′-cca cta gtc cac tcg acc gtg aca gg-3′
VW487(470)	5′-ggt tcc tcg agt atc aaa gag gaa cac acc atc-3′
VW488(472)	5′-gga ggg gca agc ttc aga cca tgg-3′
VW489(477)	5′-tga cat tgg gag gag ggt ttt ctc ttc-3′
VW490	5′-gta cga att cta tta ttc gtg cca ttc gat ttt ctg agc ttc gaa gat gtc gtt cag gcc tcc tcc acc tga cat-3′

【０２６５】

Ｂ．昆虫細胞における可溶性ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣ分子の産生

精製したプラスミドｐＴＶＷ４２９－２、ｐＴＶＷ４３０－１およびｐＴＶＷ４０１－１を用い、Ｂａｃ－Ｎ－ＢｌｕｅＤＮＡ（インビトロゲン）を同時形質導入し、組換えウイルスを単離して、インビトロゲンのＢａｃ－Ｎ－Ｂｌｕｅとランスフェクションキット・マニュアル（バージョンＦ）の記載どおりに濃厚化した。ＳＦ９細胞を全工程で使用した。

【０２６６】

プレートまたは生産フラスコからの上清サンプルについて、ＥＬＩＳＡにより組換え産物（ｓｃＩＥ^{k}）が存在するかどうか試験した。ＥＬＩＳＡはヌンク・マキシソープ（Ｎｕｎｃ Ｍａｘｉｓｏｒｐ）プレートのウエルに１００ｎｇの１４－４－４Ｓ（ファーミンゲン（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ））抗－ＩＥ^{k}抗体を１００μｌのＰＢＳ（リン酸緩衝塩溶液）中、４℃で一夜、被覆したもので行った。ブロッキングは２００μｌの１０％ＦＢＳ（ウシ胎児血清）ＰＢＳにより少なくとも１時間３７℃で行い、プレートは洗浄用バッファー（トリス緩衝塩溶液（ＴＢＳ）－０．１％トゥイーン２０）で３回洗浄した。サンプルを１００μｌ／ウエル加え、室温で１時間インキュベートした。プレートを次いで２００μｌの洗浄バッファーで４回洗い、５０ｎｇのビオチニル化抗体１７－７－３（ファーミンゲン）を１００μｌの１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ液として加え、室温で１時間インキュベーションした。プレートを洗浄バッファーで５回洗い、１００μｌの１００ｎｇ／ｍｌニュウトラアビジン（ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ）西洋わさびペルオキシダーゼ接合体（ピアース（Ｐｉｅｒｃｅ））を加えた。室温で１時間のインキュベーションの後、プレートを洗浄バッファーで５回洗浄し、３，３′，５，５′－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）

試薬（バイオＦＸラボラトリーズ）１００μｌをウエルごとに加えた。１００μｌの０．１８Ｍ－H_2SO_4を加えて反応を止め、４５０ｎｍでの吸光度を読み取った。

【０２６７】

同時形質導入混合物をインビトロゲンのマニュアル概説どおりに個々のプラークに塗布した。分離したブループラークを用い、ウイルス保存液として使用するために小規模プレート溶菌液を調製し、上記のＥＬＩＳＡによりＩＥ^{k}反応性について試験した。ｐＴＶＷ４３１－１（ＰＣＣ／ｂｉｒＡ）での同時形質導入から得られた５つのプラークからの上清についてのA_{450}値の例を表２に示す。シグナルの特異性はＳＦ９細胞により培養上清中に分泌されたｓｃＩＥ^k／ＰＣＣによるものである。

【０２６８】

【表２】

表２：同時形質導入からの昆虫細胞培養上清のＩＥ^{k}ＥＬＩＳＡ（A_{450}値）

	プラーク名称				
上清（μl）	A	B	C	D	E
１００	0.495	0.432	0.235	0.427	0.292
５０	0.276	0.243	0.146	0.280	0.177
２５	0.162	0.162	0.110	0.189	0.127
０	0.052	0.051	0.055	0.053	0.055

【０２６９】

高タイターウイルス保存液を小規模プレート溶菌液から調製し、それを用いて1×10^6細胞／ｍｌまで増殖したＳＦ９細胞培養液１リットルに感染させた。これら感染液からの上清を用いて下記のｓｃＩＥ^{k}を精製した。結合したＰＣＣペプチドをもつ精製ｓｃＩＥ^{k}は、下記２Ｂ４Ｔ細胞ハイブリドーマの活性化を調節する能力についてアッセイした。

【０２７０】

Ｃ．昆虫細胞において発現されたｓｃＩＥ^k／ＰＣＣ分子の精製

ｓｃＩＥ^k／ＰＣＣタンパク質を発現する組換えバキュロウイルスを感染させたＳＦ９細胞から、その上清を感染５日後に取得した。培地から９，５００×ｇ、４℃、１０分間の遠心分離により細胞を除去した。澄明となった上清のｐＨを８に調整すると濁った白色の沈殿を生じた。この沈殿を１２，０００×ｇ、４℃、３０分ないし２時間の遠心分離により除去した。この遠沈からの上清は、免疫アフィニティクロマトグラフィー調製品用の０．２μフィルターで濾過した。

【０２７１】

免疫アフィニティクロマトグラフィーは、ＡＴＣＣ（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション）細胞株ＨＢ２２５が産生する抗－ＩＡおよびＩＥ抗体、Ｎ２２を架橋したセファロース（Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ）４Ｂ（ファルマシア）のカラムに、上記のように調製したサンプルを加えることにより実施した。カラムを２０ｍＭトリスｐＨ８．０で平衡化し、A_{280nm}のベースラインに達するまでこのバッファーで洗浄した。次いで、抗体カラムを１Ｍ－ＮａＣｌ含有の同じバッファーで洗浄して非特異結合タンパク質を除去した。ＩＥ^{k}タンパク質はＰＢＳを適用し、次いで５０ｍＭグリシン－ＮａＯＨ（ｐＨ１１）を適用して溶出した。タンパク質は２本のピーク（A_{280}にてモニター）として、第一ピークはＰＢＳで、第二ピークはｐＨ１１で溶出された。ｐＨ１１で溶出されたピークは直ちにＨＣｌにてｐＨ７～８に調整した。次いで、各ピークからのサンプルを濃縮し、バッファーは限外濾過によりＰＢＳに換えた。ＩＥ^{k}サンプルの純度と機能性はドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびＴ細胞活性化アッセイ（下記参照）によりそれぞれ試験した。この調製物からの精製ｓｃＩＥ^k／ＰＣＣはクマシー染色ポリアクリルアミドゲル上にバンドの汚染はなく、吸光度で検定した総タンパク質濃度は０．３７ｍｇ／ｍｌであった。

【０２７２】

Ｄ．ｓｃＩＥ^k／ＰＣＣ複合体によるＴ細胞の活性化

Ｔ細胞ハイブリドーマ２Ｂ４はＩＬ－２を産生することによって、ＩＥ^{k}クラスＩＩ ＭＨＣ分子との関連でＰＣＣペプチドに応答する。ＩＬ－２の産生は、以下の項に記載するように実施した活性化アッセイにより検定した。ヌンク・マキシソープ（Ｎｕｎｃ Ｍａｘｉｓｏｒｐ）プレートの個々のウエルを、１００μｌのＰＢＳ中に懸濁したｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣと抗－マウスＩＬ－２抗体（ファーミンゲン（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）、１８１６１Ｄ）の混合物で被覆し、ｓｃＩＥ^{k}分子が４００～１２．５ｎｇ／ウエルの濃度で存在し、抗－ＩＬ－２抗体が１００ｎｇ／ウエルで存在するようにした。一夜４℃で被覆した後、溶液をプレートから除去し、１ウエル当たり１×１０^{5}個の２Ｂ４細胞となるよう１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ１００μｌを加えた。プレートを８時間３７℃で１０％CO_2中インキュベートし、次いで、洗浄バッファー（０．１％トゥイーン２０含有ＴＢＳ）で３回洗浄した。ビオチン標識抗－マウスＩＬ－２抗体（ファーミンゲン、１８１７２Ｄ）を１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ溶液として加え、４℃で一夜インキュベートした。次いで、プレートを洗浄バッファーで３回洗い、１００ｎｇ／ｍｌのニュウトラアビジン（ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ）西洋わさびペルオキシダーゼ接合体（ピアース）１００μｌを加え、室温で１５分ないし１時間インキュベートした。このインキュベーションに続き、洗浄バッファーで３回洗浄し、ＴＭＢ基質１００μｌを加えて発色させた。１００μｌの０．１８Ｍ－H_2SO_4を加えて反応を止め、４５０ｎｍでの吸光度を読み取った。ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣが２Ｂ４細胞を活性化することを示した１アッセイの結果を表３に示す。刺激のピークは、プレートに固定化したｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣ１００～２００ｎｇで生じ、吸光度値はより高濃度および低濃度で減少した。

【０２７３】

【表３】

表３：ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣタンパク質による２Ｂ４Ｔ細胞の活性化

ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣ（ｎｇ／ウエル）	吸光度（４５０ｎｍ）
４００	０．２１６
２００	０．４８５
１００	０．４１３
５０	０．２３４
２５	０．０８１
１２．５	０．０５４
０	０．０５６

【０２７４】

実施例２：多価一本鎖ＩＡ^{d}／ペプチド－ビオチン／アビジン複合体の生成

Ａ．ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＢｉｒＡ複合体発現用ベクターの構築

実施例１はＴ細胞応答を刺激するに際しての一価ｓｃ－クラスＩＩ／ペプチド分子の生成と使用について記載する。ＭＨＣ抗原－ＴＣＲ相互作用に対するプローブとしての一価複合体の限界の一つは、ＭＨＣ抗原分子とＴＣＲ間の固有の低い親和性である。この問題は多価ＭＨＣ抗原複合体の形成によって克服し得る。これらの多価複合体は、ＭＨＣ抗原－ＴＣＲ相互作用のインヒビターを検出するためのスクリーニング方法（下記実施例に記載）の開発に多くの用途をもつ。本実施例および実施例３～５に記載した方法は多価一本鎖ＭＨＣ抗原複合体を生成させる方法である。

【０２７５】

多価ＭＨＣ／ペプチド複合体などの多価ＭＨＣ抗原を生成させる一つの方法はＭＨＣ／ペプチド分子をビオチン化し、このビオチン化分子を４個まで１個のアビジン分子に結合させることである。ビオチンリガーゼ酵素に対し標的配列として働く特異的ペプチド配列は、ＭＨＣ／ペプチド分子に付加させることができる。これらの配列はＭＨＣ／ペプチド分子ごとに単一ビオチン部分の酵素付加を可能とする。このビオチン化ＭＨＣ／ペプチド分子は従ってビオチンとアビジンの高いアフィニティ相互作用を介して多価複合体（二量体ないし四量体）を形成することができる。

【０２７６】
例えば、ビオチンリガーゼＢｉｒＡ標的配列、ＧＧＧＳＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ、でタグ標識したＩＡ^{d} α１－α２フラグメントをエンコードするＤＮＡ配列は、ＸｈｏＩ－ＥｃｏＲＩフラグメントとしてのｐＴＶＷ４２１－４１からｐＴＶＷ４０８－１へ形質導入し、ｐＭＢＢｉｒ１を創生した。このベクターはＳａｌＩで切断し、突き出した制限部位を消化して平滑末端とした。このベクターを次いでＮｃｏＩで切断し、ＤＮＡ挿入フラグメントを精製した。ＢｌｕＢａｃＩＩＩベクター（インビトロゲン・パーツ番号１２０４１５）ＨｉｎｄＩＩＩで切断し、突き出した制限部位を消化して平滑末端とした。このベクターを次いでＮｃｏＩで切断し、ベクターの主鎖フラグメントを精製し、挿入フラグメントに連結した。得られるＢｌｕＢａｃＩＩＩベクター、ｐＭＢ０３３はｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ｂｉｒＡ挿入片を担持している。

【０２７７】
Ｂ．昆虫細胞における可溶性ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡ分子の産生
ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡを担持するＢｌｕＢａｃＩＩＩベクターを同時形質導入に使用し、野生型ＡｃＭＮＰｖからプラーク精製により組換えウイルスを濃厚化した（参照文献：Ｄ．Ｒ．Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ ｅｔ ａｌ．Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ．（バキュロウイルス発現ベクター；実験室マニュアル）Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９２）；およびインビトロゲンＢａｃ－Ｎ－Ｂｌｕｅ形質導入キットの操作マニュアル・バージョンＧカタログ＃Ｋ８５５－０１）。全工程でＳＦ９細胞を使用した。

【０２７８】
昆虫細胞はＴＮＭＦＨ昆虫細胞倍地（ＪＲＨバイオサイエンス・パーツ番号５１９４２－７９Ｐ）中、１０％ウシ胎児血清（ハイクローン（Ｈｙｃｌｏｎｅ）ＳＨ３００７１．０３）により高感染多重度（ｍｏｉ）で感染させ、組換えｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡタンパク質を産生させた。感染の約９６時間後に、感染上清のｐＨを１０Ｎ－ＮａＯＨで８．０に調整し、高速遠心分離（１０，０００×ｇ以上）して粒子状物質を除去し、０．２μｍで濾過した。処理した上清をすでに記載したようにＩＡ－特異ＥＬＩＳＡで試験した（Ｒｈｏｄｅ ｅｔ ａｌ．１９９６．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：４８８５）。

【０２７９】
Ｃ．ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡ分子の精製と多量体化
ｐＨ８．０で濾過した感染上清を、抗－ＩＡ^{d}モノクローナル抗体、Ｍ５を架橋したプロテインＡセファロースのカラムに負荷した。サンプルの負荷に続いて、この免疫アフィニティカラムを２０ｍＭトリスＨＣｌ（ｐＨ８．０）でA_{280nm}のベースラインに達するまで洗浄した。次いで抗体カラムを１Ｍ－ＮａＣｌ含有の同じバッファーで上記のように洗浄し、非特異的に結合したタンパク質を除去した。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡタンパク質は、次いで５０ｍＭグリシンＮａＯＨ（ｐＨ１１）にて溶出した。溶出したピークタンパク質（A_{280nm}にてモニター）を直ちに２Ｍグリシン（ｐＨ２．０）でｐＨ８．０に調整し、濃縮して、バッファーを限外濾過によりＰＢＳに変換した。精製サンプルは４～８℃にて保存した。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡサンプルの純度と機能性は、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）により試験した。

【０２８０】
ＢｉｒＡタグ標識のリジンのビオチン化は、大腸菌ビオチンリガーゼ酵素（アビディティＢＩＲＡ５００）およびビオミックスバッファーＡおよびＢ（アビディティ、ビオチンリガーゼとともに供給）を加えることにより達成した。ビオチン化したタンパク質はアビジンとインキュベートしてｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡの複合体を形成した。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡ：アビジンの比４：１で、約８０％のｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡ分子が、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで見られるように、単量体よりも大きい多量体複合体を形成した。

【０２８１】
Ｄ．多価ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡ複合体によるＴ細胞の活性化
これら多量体の活性を試験するために、多量体またな単量体（アビジンなし）のいずれかをヌンク・タイタープレートのウエルに被覆し、ＤＯ１１．１０細胞を加えて、２４時間後に上清を取得し、相対的ＩＬ－２レベルを前記のようにＥＬＩＳＡで定量した（Ｒｈｏｄｅ ｅｔ ａｌ．１９９６．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：４８８５）。代表的な実験での吸光度値を表４に示す。
【０２８２】
【表４】

表４：多価ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ-ＢｉｒＡ複合体によるＤＯ１１．１０Ｔ細胞の活性化（ＩＬ－２ＥＬＩＳＡ値；A_{450}）

ng複合体/ｳｴﾙ	多価scIA^{d}/OVA-BirA複合体による刺激	一価scIA^{d}/OVA-BirA複合体による刺激
1000	1.865	1.164
500	1.598	1.055
125	0.916	0.513
62	0.744	0.398
31	0.554	0.242

【０２８３】
ここで示されたことは、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡ分子をビオチン化し得たこと、１個のアビジン分子が１個以上のビオチン化ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＢｉｒＡに結合し得たこと、また多量体が単量体よりも遥かに強力なＩＬ－２の刺激剤であることである。
【０２８４】
実施例３：多価一本鎖ＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＧ複合体の生成
Ａ．ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＧ複合体を発現するベクターの構築
多価ＭＨＣ抗原複合体を創生する第二の対策は、免疫グロブリンの定常ドメインを分子骨格として使用することであった。この方法において、発現ベクターは、ＩｇＧ重鎖および軽鎖の定常ドメインに融合させたものとして一本鎖ＭＨＣ／ペプチド分子をエンコードするように構築した。免疫グロブリンＣκドメインに融合したペプチド－結合一本鎖ＭＨＣクラスＩＩ分子を発現するＤＮＡ構築物の生成は、すでに以前に記載がある（ＷＯ９９／２１５７２）。ｐＩＡＤＫベクターは、マウスＩｇＧＣκドメインに融合したｓｃＩＡ^{d}に結合してＯＶＡ３２３－３３９ペプチドをエンコードする発現カセットを含んでいる。ｐＤＲＨＫベクターは、ヒトＩｇＧＣκドメインに融合したｓｃＤＲ２（１５０１）に結合してヒトＭＢＰ８４－１０２ペプチドをエンコードする発現カセットを含んでいる。これらベクターの組み立てについてはすでに以前に詳細な記載がある（ＷＯ９９／２１５７２）。これらのベクターはブダペスト条約に従って、ＡＴＣＣに寄託されている。ＤＮＡベクターは１９９７年９月１７日に寄託され、寄託番号２０９２７４（ｐＤＲＨＫ）および２０９２７５（ｐＩＡＤＫ）を付されている。これらのベクターおよびその構築中間体は下記および実施例４に記載したベクターの構築用原材料として役立つ。
【０２８５】
さらに一つのベクターをｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－マウスＩｇＧＣκ融合物の哺乳動物での発現用に構築した。このベクターを構築するために、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ構築物を含む細菌シャトルベクターｐＪＡ（ＷＯ９９／２１５７１）をＥｃｏＲＶおよびＮｈｅＩで消化し、ＯＶＡペプチドをエンコードする配列を除去する。ｇＤ２４６－２６１ペプチドをエンコードするアニールしたオリゴヌクレオチド（ＯＰＲ２２５／ＯＰＲ２２６－オリゴヌクレオチドを表５に掲載する）を、消化したｐＪＡベクターにサブクローン化し、ｐＩＡＧＫシャトルベクターとした。ｐＩＡＧＫベクターは次いでＥｃｏＲＶおよびＢｓｔＢＩで消化した。ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ遺伝子を含むフラグメントを精製し、ＥｃｏＲＶ／ＢｓｔＢＩ

消化したｐＩＡＤＫベクターにサブクローン化し、ｐＩＡＧＭＫ発現ベクターとした。このベクターは哺乳動物細胞においてｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－Ｃκ融合体を発現し得る。

【０２８６】

ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド分子とマウスＩｇＧ２ｂ重鎖のC_H1－C_H2－C_H3ドメイン間の融合体を発現し得るベクターはすでに構築されている。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ構築物に対して、ｐＩＡＤＫはオリゴヌクレオチドプライマーＯＰＲ２３７およびＯＰＲ２３９を使用するＰＣＲ増幅用鋳型ＤＮＡとして役立った。ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ構築物にとって、ｐＩＡＧＭＫはオリゴヌクレオチドプライマーＯＰＲ２３８およびＯＰＲ２３９を使用するＰＣＲ増幅用鋳型ＤＮＡとして役立った。得られるＰＣＲ産物は哺乳動物発現ベクターｐＳＵＮ７へのクローニングに必要な５′ＮｒｕＩ部位および３′ＥｃｏＲＩ部位を担持するｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡまたはｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ遺伝子融合物を担持する。このｐＣＤＮＡ３に基づくベクターは、免疫グロブリンリーダー配列とマウスＩｇＧ２ｂのC_H1－C_H2－C_H3ドメインをエンコードする発現カセットを担持する。このベクターにおいて、ＮｒｕＩおよびＥｃｏＲＩ制限部位はリーダー配列の３′末端およびC_H1ドメインの開始点（５′側）近傍にそれぞれ位置する。ＰＣＲ産物は、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ構築物用のｐＧＥＭ－ＧＤ７ベクターとｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ構築物用のｐＧＥＭ－ＯＶＡ３とを生成するｐＧＥＭ－Ｔイージイ（Ｅａｓｙ）にクローン化した。配列の確認に続き、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤおよびｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ遺伝子フラグメントを単離し、ＮｒｕＩおよびＥｃｏＲＩで消化した。精製したフラグメントをＮｒｕＩ／ＥｃｏＲＩ－切断したｐＳＵＮ７にサブクローン化し、それぞれｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＧ重鎖融合物およびｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＧ重鎖融合物用のｐＪＡ－ＩｇＧ２ｂ／ＧＤおよびｐＪＡ－ＩｇＧ２ｂ／ＯＶＡ発現ベクターとした。

【０２８７】

【表５】

表５：ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＧベクターの構築に使用されるオリゴヌクレオチド

OPR225	5′-ATC GCC CCC TAC ACC AGC ACC CTG CTG CCC CCC GAG CTG AGC GAG ACC CCC G-3′
OPR226	5′-CTA GCG GGG GCT TCG CTC AGC TCG GGG GGC AGC AGG GTG CTG GTG TAG GGG GCG AT-3′
OPR237	5′-CAC CGC GTC GCG ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC ATC TCT CAG GCT GTT CAC-3′
OPR238	5′-CAC CGC GTC GCG ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC GCC CCC TAC ACC AGC ACC CTG CTG CCC-3′
OPR239	5′-CAC CGC GAA TTC GCT CCC TGA CAT GGG GGC TGG AAT CTC AGG TTC-3′

【０２８８】

Ｂ．多量体ｓｃＩＡ^{d}／ペプチドＩｇＧ融合物の哺乳動物細胞での産生および精製

ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＧ分子を発現させるために、哺乳動物細胞に、ｐＩＡＧＭＫとｐＪＡ－ＩｇＧ２ｂ／ＧＤのベクター、およびピューロマイシン抵抗性付与遺伝子を含有するベクターｐＰＵＲ（クロンテック（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ））を形質導入した。簡単に説明すると、ＣＨＯ細胞を線状化プラスミドＤＮＡと混合し、製造業者の指示書（キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ））に従いスーパーフェクト（Ｓｕｐｅｒｆｅｃｔ）形質導入試薬を用いて形質導入した。形質導入した細胞を非選択的ＩＭＤＭ培地中で一夜増殖した。ピューロマイシン選択培地（ＩＭＤＭ培地、２０μｇ／ｍｌピューロマイシン）を次いで加え、細胞を９６穴平底組織培養プレートに移した。該ベクターを同時形質導入した細胞のコロニーが、１４～２１日後に明瞭となった。ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＣκとｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－Ｉｇ重鎖ベクターの両方を担持する形質導入体を拡げ、ＩｇＧ２ｂ重鎖／κ鎖多量体に特異的なＥＬＩＳＡにより可溶性ｓｃＩＡ^{d}－Ｉｇ融合分子の発現を選抜した。簡単に説明する

と、ＥＬＩＳＡは１００ｎｇのヤギ抗－マウスＩｇＧ２ｂ（サザン・バイオテクノロジー・アソシエーツ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ））をヌンク・マキシソープ（Ｎｕｎｃ Ｍａｘｉｓｏｒｐ）プレートのウエルに１００μｌのＰＢＳ（リン酸緩衝塩溶液）中４℃で一夜被覆することで行う。コーティング溶液を除去し、２００μｌの１０％ＦＢＳ（ウシ胎児血清）ＰＢＳを各ウエルに加え、室温で２～３時間ウエルをブロックした。ブロック溶液を除去し、サンプルを１００μｌ／ウエルあて加え、室温で１時間インキュベートした。プレートを２００μｌの洗浄バッファーと１００μｌのヤギ抗－マウスカッパ鎖－ＨＲＰ（サザン・バイオテクノロジー・アソシエーツ；サンプル希釈剤で１／１０００に希釈した保存液）で４回洗い、室温で２時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーで６回洗浄し、ＴＭＢ１００μｌを加えた。発色後に、１００μｌの０．１８Ｍ－H_2SO_4を加えて反応を止め、４５０ｎｍでの吸光度を読み取った。陽性のウエルを前記のＩＡ－特異ＥＬＩＳＡ（ＷＯ９９／２１５７２；ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）によりさらに選抜した。これらアッセイの結果に基づき、陽性形質導入体を選択し、前記の限界希釈クローニングによりクローン化した（ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。クローン化した形質導入体を広げ、複数のＴ１７５組織培養フラスコ中で２～３週間増殖させ、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＧ多重体を含む培地２～４Ｌを得た。同様の作業を実施して、ｐＩＡＤＫとｐＪＡ－ＩｇＧ２ｂ／ＯＶＡベクターを同時に形質導入したＣＨＯ細胞株を生成させた。これらの形質導入体をＴ１７５フラスコに広げ、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＧ多重体を含む培地２～４Ｌを産生させた。

【０２８９】

ｓｃ－クラスＩＩ－ＩｇＧ融合分子は、標準的な方法論によるプロテインＡ－セファロースを用いるアフィニティクロマトグラフィーにて精製した（ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。場合によっては、さらに抗－牛ＩｇＧＡｂカラムを用いるクロマトグラフィーの工程を加えて、残余のウシ血清免疫グロブリンを除去した。精製したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇおよびｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－Ｉｇ分子のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を図８に示す。

【０２９０】

Ｃ．多価ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＧ複合体によるＴ細胞の活性化

精製したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＧとｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＧとの複合体については、ＩＬ－２産生により測定した場合の、ペプチド特異的Ｔ細胞ハイブリドーマを活性化する能力を試験した。この方法はｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＧタンパク質およびラット抗－マウスＩＬ－２モノクローナル抗体（ファーミンゲン（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）パーツ番号１８１６１Ｄ）をマキシソープ（Ｍａｘｉｓｏｒｐ）ウエル（ヌンク（ＮＵＮＣ）パーツ番号４６９９４９）に、ＰＢＳ中、４℃一夜、被覆したもので行う。コーティング溶液を除き、１ウエルにつき1×10^{5}個のＴ細胞（ＤＯ１１．１０またはＧＤ１２）を１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ（メディアテック・セルグロ（ＭｅｄｉａＴｅｃｈ Ｃｅｌｌｇｒｏ）パーツ番号１５－０１６－ＣＶ）２００μｌに加えた。保湿インキュベーター中、１０％CO_2下、３７℃にて８時間インキュベーションした後、プレートを３回洗浄バッファーで洗い、ビオチンに接合した抗－ＩＬ－２抗体（ファーミゲンパーツ番号１８１７２Ｄ）を１００ｎｇ／ウエルあて１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄バッファーで３回洗い、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中の２５０ｎｇアビジンペルオキシダーゼ（シグマ（Ｓｉｇｍａ）パーツ番号Ａ３１５１）をウエルごとに加えた。３７℃にて３０分間インキュベーションした後、ウエルを洗浄バッファーにて５回洗い、１００μｌのＡＢＴＳ基質（カークガード・アンド・ペリー（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ａｎｄ Ｐｅｒｒｙ）パーツ番号５０６０－００）をウエルごとに加えた。４０５ｎｍでの吸光度を測定した。ＤＯ１１．１０細胞を用いる活性化アッセイの結果を表６に示し、ＧＤ１２細胞を用いての結果を表７に示す。ｓｃＩＡ^{d}－ＩｇＧ構築物の抗原性ペプチドをＯＶＡからＧＤに変換したことで、一本鎖分子がＤＯ１１．１０細胞によるＩＬ－２産生を刺激するその能力は除かれたが、一方、逆の特異性がＧＤ１２細胞について見られた。Ｔ細胞応答を活性化するｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＧタンパク質の能力については、Ｔ細胞活性化アッセイにより一価のｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ

分子と比較することによりさらに評価した。これらのアッセイでは、固定化したｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＧ分子のＴ細胞応答の刺激が、ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド単量体の２～８倍であった。

【０２９１】

【表６】

表６：ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ複合体によるＤＯ１１．１０Ｔ細胞の活性化

ＩＬ－２ＥＬＩＳＡ値（A_{405}）

ng 複合体/ウエル	scIA^{d}/OVA-IgG	scIA^{d}/GD-IgG	scIA^{d}/OVA	scIA^{d}/GD
１００	２．９０	０．１６６	３．０６	０．１５２
５０	２．１１	０．１５５	１．１９	
２５	０．７５８	０．１６６	０．２０９	
１２．５	０．１８４	０．１５９	０．１７６	

【０２９２】

【表７】

表７：ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ複合体によるＧＤ１２Ｔ細胞の活性化

ＩＬ－２ＥＬＩＳＡ値（A_{405}）

ng 複合体/ウエル	scIA^{d}/GD-IgG	scIA^{d}/OVA-IgG	scIA^{d}/GD	scIA^{d}/OVA
１００	３．１６	０．１１５	０．４８４	０．１２３
５０	１．７６	０．１２２	０．１３８	
２５	０．７５１	０．１１５	０．１２１	
１２．５	０．３４７	０．１２３	０．１３４	

【０２９３】

実施例４：多価一本鎖ＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧ複合体の生成

Ａ．多量体一本鎖ＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧ複合体を発現するベクターの構築

ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧ重鎖融合体を発現するベクターの構築は以下のように実施した。ｐＤＲＨＫベクターは、オリゴヌクレオチドプライマーＯＰＲ２５４およびＯＰＲ２５７を使用するＰＣＲ増幅のための鋳型ＤＮＡとしての役目を果たした（表８参照）。得られるＰＣＲ産物は、ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ遺伝子融合体および哺乳動物発現ベクターｐＪＲＳ３５５へのクローニングに必要な５′ＢｓｉＷＩ部位と３’ＥｃｏＲＩ部位とを担持している。このｐＣＤＮＡ３に基づくベクターは、免疫グロブリンリーダー配列とヒトＩｇＧ１C_{H}１－C_{H}２－C_{H}３ドメインをエンコードする発現カセットを担持している。このベクターにおいて、ＢｓｉＷＩおよびＥｃｏＲＩ制限部位は、それぞれ、リーダー配列の３′端近傍とC_{H}１ドメインの開始点（５’側）近傍に位置している。ＰＣＲ産物はＪＡ－ＤＲ２－３ベクターを生成するｐＧＥＭ－Ｔにクローン化した。配列の確認の後、ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ遺伝子フラグメントはＢｓｉＷＩおよびＥｃｏＲＩで消化した後に、ＪＡ－ＤＲ２－３から単離した。精製したフラグメントをＢｓｉＷＩ／ＥｃｏＲＩ切断したｐＪＲＳ３５５にサブクローン化し、ｐＤ２ＭＩｇＨ発現ベクターとした。

【０２９４】

【表８】

表８：ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧベクター構築に使用するオリゴヌクレオチド

OPR254　5′-CAC CGC GAA TTC GCT CCC TGG GAG AGG GCT TGG AGC ATC-3′

OPR257　5′-CAC CGC GCG TAC GTC TTG TCC TAC GAC GAG AAC CCC GTG-3′

【０２９５】

Ｂ．多量体ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧ融合体の哺乳動物細胞での産生と精製

多量体ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧ分子を発現する細胞株を生成させるために、以前にｐＤＲＫＨ発現ベクターを形質導入したＣＨＯ細胞株を使用した。これらの細胞については、ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９に詳細に記載されている。ｐＤＲＫＨ形質導入ＣＨＯ細胞を、線状化したｐＤ２ＭＩｇＨおよび超らせんｐＭＡＣＳプラスミドＤＮＡと混合し、ジーン・パルサー（Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ）（バイオラッド（Ｂｉｏｒａｄ））を用いてエレクトロポレーションした。ｐＭＡＣＳベクターは膜結合ＣＤ４タンパク質の一過性発現を可能とする。同時形質導入した細胞は、すでに記載されているように、細胞表面ＣＤ４発現のために選択された（ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。該細胞は９６穴平底組織培養プレートにて非選択的ＩＭＤＭ培地中で増殖した。該ベクターを形質動入した細胞のコロニーは１４～２１日後に明瞭となった。ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－ＣκとｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－Ｉｇの両重鎖ベクターを担持する形質導入体を広げ、重鎖－ＨＬＡ－ＤＲ融合体に特異的なＥＬＩＳＡにより可溶性ｓｃＤＲ２－Ｉｇ融合分子の発現について選抜した。簡単に説明すると、ＥＬＩＳＡはヌンク・マキシソープ（Ｎｕｎｃ Ｍａｘｉｓｏｒｐ）プレートのウエルにヒツジ抗－Ｆｄ抗血清（ザ・バインディング・サイト（Ｔｈｅ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｓｉｔｅ））１μｇを、ＰＢＳ（リン酸緩衝塩溶液）１００μｌで一夜４℃にて被覆することにより行う。コーティング液を除き、３００μｌの１０％ＦＢＳ（ウシ胎児血清）ＰＢＳを各ウエルに加えて、室温で２～３時間、ウエルをブロックした。ブロッキング液を除去し、サンプルを１００μｌ／ウエルの量で加え、室温で１時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄バッファー２００μｌと１００μｌの抗－ＨＬＡ－ＤＲモノクローナル抗体Ｌ２４３－ＨＲＰ（サンプル希釈剤で１／１０００に希釈した保存液）で４回洗浄し、室温で２時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーで６回洗い、１００μｌのＴＭＢを加えた。発色させた後、１００μｌの０．１８Ｍ－H_2SO_4を加えて反応を止め、４５０ｎｍでの吸光度を読み取った。陽性の形質導入体は、すでに記載されているＤＲ特異ＥＬＩＳＡにより選抜した（ＷＯ９９／２１５７２；ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。これらアッセイの結果に基づき、陽性の形質導入体は、すでに記載されている限界希釈クローニングによりクローン化した（ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。クローン化した形質導入体を広げて、複数のＴ１５７組織培養フラスコ中、２～３週間増殖させ、ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧ多量体含有培地２～４Ｌを製造した。

【０２９６】

実施例５：多価ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＭ分子の生成

Ａ．昆虫細胞における可溶性ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＭ融合分子を発現するベクターの構築

Ｉｇ骨格を用いて多価複合体を形成するもう一つの方法として、一本鎖ＭＨＣ／ペプチド分子をエンコードする発現ベクターをＩｇＭのC_H2－C_H3－C_H4ドメインへの融合体として構築した。ヒトＩｇＭ重鎖のC_H2－C_H3－C_H4部分は、ヒトＢリンパ腫細胞株ＲＬ（ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－２２６１）からＲＴ／ＰＣＲを用いて増幅した。全ＲＮＡはキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）全ＲＮＡキット（パーツ番号１４１６２）を用いて調製し、ｃＤＮＡはプライマーＭＢｉｍｒ（５’－ＧＧＧ ＧＧＧ ＣＣＡ ＴＧＧ ＣＴＣ ＧＡＧ ＴＣＡ ＧＴＡ ＧＣＡ ＧＧＴ ＧＣＣ ＡＧＣ ＴＧ－３’）を使用して産生させた。ｃＤＮＡはＭＢｉｍｒおよびＭＢｉｍｆ（５’－ＧＧＧＧ ＧＧＡ ＴＣＣ ＧＴＧ ＡＴＴ ＧＣＴ ＧＡＧ ＣＴＧ ＣＣＴ ＣＣ－３’）を使用してなされたＰＣＲ増幅用の鋳型としての役目を果たした。増幅した遺伝子フラグメントは配列確認のために、インビトロゲン（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ）ｐＧＥＭ Ｔ－イージイベクター（パーツ番号Ａ１３６０）に連結し、ＢａｍＨＩ／ＸｈｏＩフラグメントとしてＰＳＬ１１９０ベクター（ファルマシア）に移行させた。

【０２９７】

ｐＭＢＳＣ２．１（ＵＳＳＮ５，８６９，２７０）として記載されているｓｃＩＡ^{d}融合体に遺伝的に結合したＯＶＡ３２３－３３９またはＨＳＶ２４６－２６１抗原性ペプチドのいずれかを含有する遺伝子フラグメントは、プライマーＭＢ１０１（５’－ＧＧＧ ＣＣＡ ＴＧＧ ＣＴＣ ＴＧＣ ＡＧＡ ＴＣＣ ＣＣＡ ＧＣＣ－３’）およびＭＢ１００（

５’－ＧＧＧ ＧＧＡ ＴＣＣ ＡＣＴ ＡＧＣ ＣＣＧ ＧＧＡ ＣＣＡ ＧＴＧ－３’）を用い、ＰＣＲにより増幅した。ＰＣＲ産物をＮｃｏＩとＢａｍＨＩで消化し、ＮｃｏＩ／ＢａｍＨＩで切断したＩｇＭ－ＰＳＬ１１９０ベクターに移入し、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ構築物を担持するｐＭＢ０６２およびｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭ構築物を担持するｐＭＢ０６３とした。全遺伝子融合体はＮｃｏＩ／ＨｉｎｄＩＩＩフラグメントとしてインビトロゲンからのｐＢｌｕｂａｃＩＩＩベクター（パーツ番号１２０４１５）に移入し、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ構築物を担持するｐＭＢ０６０およびｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭ構築物を担持するｐＭＢ０６１とした。

【０２９８】

Ｂ．昆虫細胞における可溶性ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＭ融合分子の産生

挿入物を有するベクターｐＭＢ０６０およびｐＭＢ０６１をそれぞれ同時形質導入に使用し、組換えウイルスを野生型ＡｃＭＮＰｖからプラーク精製により濃厚化した（参照文献：Ｏ’Ｒｅｉｌｌｙ ｅｔ ａｌ．Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ（バキュロウイルス発現ベクター：実験室マニュアル）；Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９２）ａｎｄ ｔｈｅ ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ Ｂａｃ－Ｎ－Ｂｌｕｅ Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ Ｍａｎｕａｌ Ｖｅｒｓｉｏｎ Ｇ（インビトロゲンＢａｃ－Ｎ－Ｂｌｕｅ形質導入キット指示書版Ｇ）カタログ＃Ｋ８５５－０１）。全工程にわたりＳＦ９細胞を使用した。

【０２９９】

１０％ウシ胎児血清（ハイクローン（Ｈｙｃｌｏｎｅ）ＳＨ３００７１．０３）含有ＴＮＭＦＨ昆虫細胞培地（ＪＲＨバイオサイエンス・パーツ番号５１９４２－７９Ｐ）にて、昆虫細胞を高感染効率（ｍｏｉ）で感染させ、組換えｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭタンパク質を産生させた。感染の約９６時間後、感染上清のｐＨを１０Ｎ－ＮａＯＨで８．０に調整し、高速遠心（１０，０００×ｇ以上）して粒状物を除き、０．２μｍで濾過した。処理した上清をＥＬＩＳＡにより試験し、可溶性融合タンパク質を同定した。ＥＬＩＳＡは５０μｌのＰＢＳ中、９６穴マイクロタイタープレートのウエルに１００ｎｇのＭ５／１１４（ＡＴＣＣ ＴＩＢ１２０）抗－ＩＡ^{d}を被覆して実施した。１２５μｌの１０％ＦＢＳ－ＰＢＳにより高タンパク質洗浄処理を行い、未結合抗体を除去した。サンプルを１０％ＦＢＳ－ＰＢＳに希釈し、１００μｌ／ウエルとして添加した。３７℃、１時間後、洗浄バッファー（０．０５％トゥイーン２０含有ＰＢＳ）３７５μｌで３回洗った。ビオチン化ヤギ抗－ヒトＩｇＭ（シグマ・パーツ番号Ｂ－１２６５）を１００μｌの１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ １０％ＦＢＳ中に１：４０００希釈して加えた。３７℃で１時間後、プレートを洗浄バッファーにて３回洗浄した。アビジンペルオキシダーゼ（シグマ・パーツ番号Ａ３１５１）を１００μｌの１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ中、２５０ｎｇ／ウエルで添加し、３７℃で３０分間インキュベートした。次いで、プレートを３７５μｌの洗浄バッファーで５回洗浄し、１００μｌのＡＢＴＳ基質（カークガード・アンド・ペリー（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ａｎｄ Ｐｅｒｒｙ）パーツ番号５０６０－００）をウエルごとに加えた。４０５ｎｍでの吸光度を測定した。

【０３００】

感染処理は１個の精製プラークを、ＳＦ９細胞を高生存度で含有する増殖培地５０ｍｌに添加することにより実施した。７２時間後、５０ｍｌ感染物のうちの１０ｍｌをウイルス保存液として用い、４００ｍｌのＳＦ９細胞に感染させた。９６時間後、４００ｍｌ感染物からの上清について、上記のようにＥＬＩＳＡを実施した。二重測定したウエルの平均吸光度を下記表９に示す。観察されたシグナルの特異性は、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭがＳＦ９により感染物上清に分泌されたことを示している。

【０３０１】

【表９】

表９：昆虫細胞感染上清のｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ ＥＬＩＳＡ

サンプル希釈	吸光度（４０５ｎｍ）
未希釈	１．２７４
１：２	０．９６４
１：４	０．７３９
１：８	０．４８８
１：１６	０．３６１
１：３２	０．２７９

【０３０２】
サンプル希釈剤を含む陰性コントロール（A_{405}＝０．１７１）およびＩｇＭ尾部をもたないｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡを産生する昆虫細胞（A_{405}＝０．１７５）は、このアッセイでバックグランドレベルの結合を示した。
【０３０３】
ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭ発現カセットを担持するバキュロウイルスで感染した昆虫細胞からの上清は、このＥＬＩＳＡにより同様のｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭ分子の産生を示した。
【０３０４】
Ｃ．ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＭ融合分子の精製
ｐＨ８．０で濾過した感染物上清を、抗－ＩＡ^{d}モノクローナル抗体Ｍ５を架橋したプロテインＡセファロースのカラムに付加した。サンプルを付加した後の免疫アフィニティカラムを２０ｍＭトリスＨＣｌ（ｐＨ８．０）により、A_{280nm}のベースラインに達するまで洗浄した。次いで、抗体カラムを１Ｍ－ＮａＣｌを含有する上記と同じバッファーにて洗浄し、非特異的に結合したタンパク質を除去した。次いで、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭタンパク質を５０ｍＭグリシン－ＮａＯＨ（ｐＨ１１）にて溶出した。溶出したピークタンパク質（A_{280nm}にてモニター）を直ちに２Ｍグリシン（ｐＨ２．０）でｐＨ８．０に調整し、濃縮後、バッファーを限外濾過によりＰＢＳに取り替えた。精製サンプルは４～８℃に保存した。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭサンプルの純度と機能性は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥとＴ細胞活性化によりそれぞれ試験した。この調製物から精製したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭは、クマシー染色ポリアクリルアミドゲル上に汚染物のバンドを示さなかった。全タンパク質は、全タンパク質アッセイにより６０ｍｇ／ｍｌであった。鎖間ジスルフィド結合を還元せずに分析した場合、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭタンパク質は、高次（三量体以上）の多量体からなるものとして検出される。同様の精製方法を用いて、感染昆虫細胞培養上清からｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭタンパク質を生成させた。
【０３０５】
Ｄ．Ｔ細胞応答刺激におけるｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＭ複合体の活性
精製したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ複合体について、ＯＶＡ特異ＤＯ１１．１０Ｔ細胞ハイブリドーマを活性化するか否か、ＩＬ－２の産生測定により試験した。この方法では、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭタンパク質（またはコントロールとしてｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭタンパク質）およびラット抗－マウスＩＬ－２モノクローナル抗体（ファーミンゲン（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）パーツ番号１８１６１Ｄ）をマキシソープ（Ｍａｘｉｓｏｒｐ）ウエル（ヌンク（ＮＵＮＣ）パーツ番号４６９９４９）にＰＢＳ中、４℃で一夜被覆することで行った。コーティング溶液を除去し、１ウエル当たり1×10^{5}個のＤＯ１１．１０細胞を、１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ（メディアテック・セルグロ（ＭｅｄｉａＴｅｃｈ Ｃｅｌｌｇｒｏ）パーツ番号１５－０１６－ＣＶ）２００μｌに加えた。保湿インキュベーター中、１０％CO_2下、３７℃にて８時間インキュベーションした後、プレートを３回洗浄バッファーで洗い、ビオチンに接合した抗－ＩＬ－２抗体（ファーミンゲンパーツ番号１８１７２Ｄ）を１００ｎｇ／ウエルあて１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄バッファーで３回洗い、１

０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中の２５０ｎｇアビジンペルオキシダーゼ（シグマ（Ｓｉｇｍａ）パーツ番号Ａ３１５１）をウエルごとに加えた。３７℃にて３０分間インキュベーションした後、ウエルを洗浄バッファーにて５回洗い、１００μｌのＡＢＴＳ基質（カークガード・アンド・ペリー（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ａｎｄ Ｐｅｒｒｙ）パーツ番号５０６０－００）をウエルごとに加えた。４０５ｎｍでの吸光度を測定した。一つの活性化アッセイの結果を下記表１０に示す。ｓｃＩＡ^{d}－ＩｇＭ構築物の抗原性ペプチドをＯＶＡからＧＤに変換したことで、一本鎖分子がＤＯ１１．１０細胞によるＩＬ－２産生を刺激するその能力は除かれた。固定化した抗－ＩＬ－２抗体のみを有するＤＯ１１．１０細胞も、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭと抗－ＩＬ－２抗体を有するＤＯ１１．１０細胞も、ＩＬ－２の分泌には至らなかった。

【０３０６】

【表１０】

表１０：多価ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ複合体によるＤＯ１１．１０Ｔ細胞の活性化（ＩＬ－２ ＥＬＩＳＡ値（A_{405}））

ng 複合体/ウエル	scIA^{d}/OVA-IgMによる刺激	scIA^{d}/GD-IgMによる刺激
３００	０．８５３	０．２４８
１００	１．７００	０．２２１
３３	１．６３７	０．２０６
１１	１．６０１	０．１８８
４	０．２３０	０．１７９
１	０．１９５	０．１８４
０．３	０．１９２	０．１８９
抗-IL-2のみ	０．２１４	０．２００

【０３０７】

Ｔ細胞応答を活性化するｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＭタンパク質の能力をさらに評価するために、上記のＴ細胞活性化アッセイにより、多価ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＭ分子を一価ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド分子と直接比較した。ＤＯ１１．１０およびＧＤ１２Ｔ細胞を用いるアッセイ結果をそれぞれ表１１および１２に示す。これらのアッセイが示したことは、固定化したｓｃＩＡ^{d}／ペプチド－ＩｇＭ分子が、Ｔ細胞応答刺激において、ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド単量体の５～１０倍活性であったことである。応答のペプチド特異性は、単量体および多量体ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド分子の両方に観察された。

【０３０８】

【表１１】

表１１：ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ複合体によるＤＯ１１．１０Ｔ細胞の活性化

（ＩＬ－２ ＥＬＩＳＡ値（A_{405}））

ng 複合体/ウエル	scIA^{d}/OVA-IgM	scIA^{d}/GD-IgM	scIA^{d}/OVA	scIA^{d}/GD
２５０	１．４７５	０．１９３	０．６６５	０．１８０
１２５	１．６１０	０．１８０	１．０５９	０．１７９
６２	１．３３４	０．１５７	１．０３２	０．１６４
３１	１．４１７	０．１６５	０．６４６	０．２１３
１５	１．１７８	０．１４０	０．３９７	０．１５２
７	０．８３８	０．１４８	０．２３６	０．１６３
３	０．５２９	０．１４０		
１	０．２６８	０．１５３		

【０３０９】

【表１２】

表１２：ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ複合体によるＧＤ１２Ｔ細胞の活性化

（ＩＬ－２ ＥＬＩＳＡ値（A_{405}））

ng 複合体/ウエル	scIA^{d}/OVA-IgM	scIA^{d}/GD-IgM	scIA^{d}/OVA	scIA^{d}/GD
２５０	０．２３２	１．４０６	０．２３０	０．６８８
１２５	０．２３５	１．３２４	０．１８９	０．９１３
６２	０．２０１	１．０７６	０．１８３	０．８６３
３１	０．１９０	０．９８２	０．１８１	０．４５０
１５	０．１８５	０．８３３	０．１６０	０．１７４
７	０．１７０	０．７９９	０．１７８	０．１５６
３	０．１８８	０．６２３		
１	０．１５６	０．４０４		

【０３１０】

実施例２、３および５からの結果は、ｓｃＩＡ^{d}／ペプチド複合体の多価形状が、Ｔ細胞応答の刺激において一価の形状よりもより強力であることを明瞭に示している。これらの複合体は、ＭＨＣ／ペプチドに対するＴ細胞応答がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用の閾値の上昇を必要とする場合のスクリーニング方法に好適である。組換えｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合体を発現するＴ細胞を使用して実施するかかるスクリーニング方法について下記実施例１１～１４に記載する。多価ＭＨＣ／ペプチド複合体もまた、ＭＨＣ／ペプチド複合体および膜結合ＴＣＲ（実施例１５参照）または精製ＴＣＲ（実施例１６および１７）間の相互作用の検出に依存するスクリーニング方法において好ましい。

【０３１１】

実施例６：多価ＤＯ１１．１０一本鎖Ｔ細胞レセプター複合体の生成

Ａ．ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＩｇＧ２ｂ融合分子を発現するベクターの構築

上記のように、ＭＨＣ抗原分子とＴＣＲ間の相互作用を検出するスクリーニング方法の開発は、一価の、また好ましくは多価のＭＨＣ抗原複合体とＴＣＲ試薬が入手し得ることで非常に容易となり得る。一価および多価一本鎖ＴＣＲ（ｓｃＴＣＲ）分子を生成させる方法は、すでに記載がある（Ｗｅｉｄａｎｚ，ｅｔａｌ．１９９８．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２２１：５９；米国特許出願番号０８／８１３，７３１および０８／９４３，０８６）。この例は、実施例１６および１７に記載された方法などへの適用をスクリーニングするための多価ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ分子を創生するために、これらの方法の使用について記載する。

【０３１２】

ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲのクローニングについては、係属中の米国特許出願番号０８／８１３，７３１（「バクテリオファージコートタンパク質および一本鎖Ｔ細胞レセプターからなる融合タンパク質」）および０８／９４３，０８６（「一本鎖Ｔ細胞レセプターおよび免疫グロブリン軽鎖定常領域からなる融合タンパク質」）に記載されている。

【０３１３】

哺乳動物ＩｇＧ２ｂ発現ベクターｐＳＵＮ７については、最新のＴＣＲ特許出願に記載されている（「多特異結合分子およびその用途；文献番号４８，５３１－Ｐ）。

【０３１４】

ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＩｇＧ２ｂ融合分子の構築のために、ｐＳＵＮ７発現ベクターをＮｒｕＩおよびＥｃｏＲＩにより消化した（最初にベクターにクローン化したｓｃＦｖを脱落させる）。ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲは特異的プライマーＫＣ２６７（５′ＮｒｕＩ）およびＫＣ２６８（３′ＥｃｏＲＩ）を用いてｐＳＵＮ２３から再増幅した（表１３参照）。ＰＣＲ産物は配列決定のためにｐＧＥＭ－Ｔイージイベクターにクローン化した。正しいＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲフラグメントを制限消化／ゲル精製により単離し、次いで、ＮｒｕＩ／ＥｃｏＲＩ消化したｐＳＵＮ７発現ベクターに連結し、最終のＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＩｇＧ２ｂ発現ベクターを創生した。

【０３１５】
【表１３】

表１３：クローニングに使用したオリゴヌクレオチド

ＫＣ２６７	5′-GAG GTG TCG CGA GAG CAG GTG GAG CAG CTT CC-3′
ＫＣ２６８	5′-GTG GAG GAA TTC GTG TGC TCG GCC CCA G-3′
ＫＣ３０３	5′-GAG GTG GTT AAC GAT CCC AAA CTC TGC TAC-3′
ＫＣ３０４	5′-GAG GTG ATC GAT AAG TGT ACT TAC GTT TTT AGC GAG GGG GCA GGG C-3′
ＫＣ３１２	5′-GAG GTG GTT AAC GAT CCC AAA CTC TGC TAC TTG CTA GAT GGA ATC CTC-3′

【０３１６】
Ｂ．ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＩｇＧ２ｂ融合分子の哺乳動物での発現
ＣＨＯ細胞を冷ＤＰＢＳで洗浄し、形質導入用に準備した。大よそ10^7個の細胞をＤＰＢＳに再懸濁し、２０μｇのＰｖｕＩ－線状化ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＩｇＧ２ｂＤＮＡと混合した。氷上、５分後、細胞はジーン・パルサー（Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ）（バイオラッド（ＢｉｏＲａｄ））セットを用いて、１パルス２５０ボルト、０．２５μＦｄとして送達し、エレクトロポレーションを行った。パルス細胞を５分間氷上に放置した。細胞を１０ｍｌのＩＭＤＭ（１０％ＦＢＳ含有）に希釈し、Ｔ－２５ｃｍ^{2}フラスコ中で３７℃一夜、５％CO_2下で増殖した。

【０３１７】
形質導入した細胞を１：２００に希釈し、翌日、９６穴プレート中の選択培地（すなわち、０．７５ｍｇ／ｍｌのＧ－４１８硫酸塩含有１０％ＦＢＳ－ＩＭＤＭ）に塗布した。

【０３１８】
約２週間後、タンパク質の発現についてＥＬＩＳＡによりコロニーを試験した。９６穴プレート（ヌンク・マキシソープ）にＰＢＳ中、ＫＪ－１ｍＡｂ（本ｍＡｂは正しく折りたたまれたＤＯ１１．１０ＴＣＲを認識する）を４℃で一夜被覆した。１０％ＦＢＳ－ＰＢＳにより１時間ブロックした後、コロニー上清を加え、室温で３０分間インキュベートした。洗浄後、抗－マウスＩｇＧ２ｂ－ＨＲＰ接合ポリクローナル抗体（カルタグ（Ｃａｌｔａｇ））を加えて３０分間放置した。ＥＬＩＳＡはＴＭＢ基質により発色し、０．１Ｎ硫酸で反応停止した。４５０ｎｍで吸光度を読み取った。

【０３１９】
試験したコロニーの僅か１０％のみがＥＬＩＳＡ陽性であった。３つの候補化合物を展開し、限界希釈により一次クローニングするために選定した。

【０３２０】
約１０日後、一次クローンをＥＬＩＳＡにより試験し、タンパク質高生産性細胞株を選択した。ＥＬＩＳＡはＫＪ－１ｍＡｂの代わりにＦ２３．１ｍＡｂ（このｍＡｂはＴＣＲＶベータ８鎖の一部を検出する）を使用した以外、上記のアッセイと同様であった。４つの候補化合物を展開させ、最高のＴＣＲ発現レベル（＃１３－１）をもつクローンをさらに特性研究するために選定した。

【０３２１】
Ｃ．多価ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ融合分子の生成
哺乳動物細胞中でのＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＩｇＧ２ｂ融合分子の発現は、図９に示すようにＴＣＲの単量体と二量体を産生する。ＩｇＧ２ｂ重鎖融合体を補完するカッパ鎖融合体を加えると、四量体分子の形成に導くことができた。この仮説を試験するために、先ず必要なことは、ＴＣＲ／ＩｇＧ２ｂ融合分子がｓｃＴＣＲ／カッパ融合分子と有効に対形成し得ることを確立することであった。

【０３２２】
ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスカッパ融合分子のクローニングについては、係属中の米国特許出願番号０８／９４３，０８６に記載されている。重鎖／カッパ鎖対形成を証明

するために、キアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）の、接着性細胞の一過性形質導入用のスーパーフェクト（Ｓｕｐｅｒｆｅｃｔ）トランスフェクション試薬プロトコールに従い、一過性形質導入実験を設定した。簡単に説明すると、２．５×１０^{5}個のＣｏｓ－７細胞を６穴プレート（のウエルごと）に播種した。翌日、２μｇのＤＮＡ（１μｇのＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／カッパ＋１μｇのＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ＩｇＧ２ｂ）を１００μｌのＩＭＤＭ培地に加えた。スーパーフェクト試薬（キアゲン）１０μｌを加え、撹拌した。室温、１０分間インキュベーションしてＤＮＡ／デンドリマーを形成させた後、１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ６００μｌを複合体に加えた。ＣＯＳ細胞をＤＰＢＳで洗浄し、複合体をピペットで細胞上に移した。３７℃で２時間後、細胞を再洗浄し、新たな１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭをウエルに加えた。形質導入体はアッセイの前に、５％CO_2下、３７℃で３日間インキュベートした。

【０３２３】

一過性形質導入体の上清につき、ｓｃＴＣＲ／ＩｇＧ２ｂ融合分子とＴＣＲ／カッパ融合分子との対が形成されているか、ＥＬＩＳＡにより試験した。９６穴プレート（ヌンク・マキシソープ）に、ＰＢＳ中、ヤギ抗－マウスカッパポリクローナル抗体（サザン・バイオテック（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ））を４℃で一夜被覆した。１０％ＦＢＳ－ＰＢＳにより１時間ブロックした後、一過性上清を添加して室温で３０分間インキュベートした。洗浄後、抗－マウスＩｇＧ２ｂ－ＨＲＰ接合ポリクローナル抗体（カルタグ（Ｃａｌｔａｇ））を加えて３０分間放置した。ＥＬＩＳＡはＴＭＢ基質により発色し、０．１Ｎ硫酸で反応停止した。（４５０ｎｍで読み取った）吸光度は陰性コントロールよりも４０倍大きく、ｓｃＴＣＲ／カッパとｓｃＴＣＲ／ＩｇＧ２ｂの対形成が成功であったことを示した。

【０３２４】

以下の実施例は組換えＴ細胞レセプターを発現する細胞株の生成について記載する。

実施例７：組換えＴ細胞レセプターを担持するマウスＴ細胞ハイブリドーマの生成

ＭＨＣ抗原分子とＴＣＲ間の相互作用を検出する細胞に基づくスクリーニング方法の開発は、適切なＴＣＲを発現する不死化Ｔ細胞株が入手可能であることで非常に容易になり得る。分離Ｔ細胞と胸腺腫細胞（すなわち、ＢＷ５１４７）間の融合は、マウスＴ細胞ハイブリドーマを生成させることで達成されている。しかし、不死化ヒトＴ細胞株の生成には、同じ方法を容易に適用することができない。より一般化された方法として、不死化Ｔ細胞株は形質導入により生成させ、その細胞表面に組換えＴＣＲを発現させている（参照文献：Ｅｎｇｅｌ ｅｔ ａｌ．１９９２．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：１３１８；Ｈａｓｔｉｎｇｓ ｅｔ ａｌ．１９９６．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：３４６０；Ｂｒａｗｌｅｙ，Ｊ．Ｖ．ａｎｄ Ｐ．Ｃｏｎｃａｎｎｏｎ．１９９９．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６３：４９４６）。同様の方法を本実施例と次の２つの実施例に記載する。各場合において、融合はＴＣＲの細胞外抗原認識ドメインとＣＤ３－ζ鎖の細胞内シグナル伝達ドメイン間で実施された。Ｔ細胞に形質導入した場合、融合分子はＭＨＣ－ペプチド複合体での刺激により機能的活性を示した。この実施例において、形質転換に使用したＴ細胞株は、その表面に内在性ＴＣＲを発現するハイブリドーマであった。実施例８および９において、用いたＴ細胞株はその表面に機能的内在性ＴＣＲを発現しない。

【０３２５】

Ａ．ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ＣＤ３ζ融合分子の構築

ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲのクローニングについては、係属中の米国特許出願番号０８／８１３，７３１（「バクテリオファージコートタンパク質および一本鎖Ｔ細胞レセプターからなる融合タンパク質」）および０８／９４３，０８６（「一本鎖Ｔ細胞レセプターおよび免疫グロブリン軽鎖定常領域からなる融合タンパク質」）に記載されている。

【０３２６】

最新の特許出願（「多特異結合分子およびその用途；文献番号４８，５３１－Ｐ）に、ｐＧＥＭＴ－イージイに基づく「シャトルベクター」について、その構築が記載された。当該ベクターはｐＧＥＭＴ－イージイベクターにクローン化された５′ＡｇｅＩ－３′Ｈｐ

ａＩ／ＢｓｐＥＩ／ＮｒｕＩ／ＣｌａＩ ＤＮＡフラグメントとして増幅されたｓｃＴＣＲから成り立っていた。従って、３′端はリンカーｓｃＦｖ付加用のポリリンカー領域として、また二面特異分子を創生する精製タグ標識として作用する。

【０３２７】

ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ＣＤ３ζ融合分子の構築のために、ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／リンカー／ｓｃＦｖ／タグ／ｐＧＥＭ－Ｔイージイ「シャトルベクター」をＨｐａＩおよびＣｌａＩで消化してポリリンカー領域を除去し、ｐＧＥＭ－Ｔイージイにおける５′ＡｇｅＩ－３′ＨｐａＩフラグメントとしてＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲのみを残した。

【０３２８】

ＣＤ３ζ鎖はマウス特異プライマーＫＣ３１２（５′ＨｐａＩ）およびＫＣ３０４（３′ＣｌａＩ）またはヒト特異プライマーＫＣ３０３（５′ＨｐａＩ）およびＫＣ３０４を使用して、ｃＤＮＡ（マウスｃＤＮＡは２Ｂ４Ｔ細胞ハイブリドーマＲＮＡから作製した；ヒトＣＤ３ζｃＤＮＡはリンダ・シャーマン（Ｌｉｎｄａ Ｓｈｅｒｍａｎ）博士の研究室から恵与頂いた）から増幅した。ＫＣ３０４プライマーはまた５′停止コドンとスプライス部位をエンコードしていた。ＰＣＲ産物は配列決定のためにｐＧＥＭベクター（プロメガ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からのオリジナルベクター）にクローン化した。正しいＣＤ３ζフラグメントを制限消化／ゲル精製により分離し、次いで、ＨｐａＩ／ＣｌａＩ消化ＤＯ１１．１０／ｐＧＥＭベクター（上記）に連結して、図１０に示すように、ｐＧＥＭ－ＴイージイにおけるＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＣＤ３ζまたはＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ヒトＣＤ３ζ融合構築物を創生した。

【０３２９】

哺乳動物ＩｇＧカッパベクターｐＳＵＮ９（係属中米国特許出願番号０８／９４３，０８６に記載）は、ｓｃＴＣＲ／ＣＤ３ζ融合分子の発現用に選択した。発現ベクターおよび融合構築物（ｐＧＥＭ－Ｔイージイ内）は共にＡｇｅＩおよびＣｌａＩにて消化した。ｓｃＴＣＲ／ＣＤ３ζＤＮＡフラグメントを単離し、切断したｐＳＵＮ９ベクターに連結し、最終的哺乳動物細胞発現ベクターＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＣＤ３ζおよびＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ヒトＣＤ３ζを創生した。

【０３３０】

Ｂ．膜結合ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＣＤ３ζ融合分子を発現する２Ｂ４細胞の生成

２Ｂ４Ｔ細胞ハイブリドーマはＢＷ５１４７細胞株をもつＢ１０．ＡマウスからのＴ細胞の融合産物である。２Ｂ４細胞は、$ＩＥ^{k}$との関連で提示された場合、ハト・シトクロムＣ（ＰＣＣ）を認識する。

【０３３１】

２Ｂ４細胞は冷ＤＰＢＳで洗浄することにより形質導入用に準備した。大よそ１０^{7}個の細胞をＤＰＢＳに再懸濁し、２０μｇのＰｖｕＩ－線状化ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＣＤ３ζＤＮＡと混合した。氷上、５分後、細胞はジーン・パルサー（Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ）（バイオラッド（ＢｉｏＲａｄ））セットを用いて、１パルス２５０ボルト、９６０μＦｄとして送達し、エレクトロポレーションを行った。パルス細胞を５分間氷上に放置した。細胞を１０ｍｌの１０％ＩＭＤＭに希釈し、Ｔ－２５$ｃｍ^{2}$フラスコ中で３７℃一夜、５％$ＣＯ_{2}$下で増殖した。

【０３３２】

２４時間後、細胞をＴ－７５$ｃｍ^{2}$フラスコに移し、選択培地（すなわち、１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８含有１０％ＦＢＳ－ＩＭＤＭ）４０ｍｌを加えた。３日後に、「バルク」２Ｂ４形質導入体を９６穴プレートに、選択培地中、１ウエル当たり、１０、１００または１０００個の細胞として塗布した。およそ２週間後、塗布した形質導入体をフローサイトメトリーによりＤＯ１１．１０の発現について選抜した。この細胞を、氷上、ビオチン化Ｆ２３．１ｍＡｂにより３０分間染色した。Ｆ２３．１ｍＡｂはＴＣＲ Ｖベータ８鎖の一部を検出する；従って、ＤＯ１１．１０ＴＣＲには結合するが、２Ｂ４ＴＣＲには結合しない。細胞を緩やかに回転し、上清を吸引して、ストレプトアビジン標識サイクローム（

ＣｙＣｈｒｏｍｅ）を加えた。氷上１５分後、細胞を１％ＦＢＳ／ＤＰＢＳで２回洗浄し、再懸濁した。細胞染色の結果は、ベクトンディッキンソン（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）ＦＡＣＳスキャン（ＦＡＣＳｃａｎ）装置により取得した。

【０３３３】

大よそ９０％の試験コロニーがＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ発現陽性であった。２つの候補化合物を限界希釈により一次クローニング用に選択した。

【０３３４】

２週間後、前記のようにフローサイトメトリーにより一次クローンを選抜した。ＣＤ４およびＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ発現レベルの様々な６つのクローンをさらなる評価研究のために選択した。組換えｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ複合体によるＴ細胞活性化の研究においてのこれらクローンの使用については、実施例１１に記載する。

【０３３５】

実施例８：組換えＴ細胞レセプターおよび組換えＣＤ４分子を担持するマウスＴ細胞株の生成

Ａ．膜結合ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ＣＤ３ζ融合分子を発現するＢＷ５１４７細胞の生成

ＢＷ５１４７（ＢＷ）細胞株は、ＴＣＲアルファおよびベータ鎖の表面発現を欠失するマウス胸腺腫である（この細胞株は多くの場合、Ｔ細胞ハイブリドーマを生成するＴ細胞との融合パートナーとして使用する）。

【０３３６】

ＢＷ細胞は冷ＤＰＢＳで洗浄することにより形質導入用に準備した。大よそ10^{7}個の細胞をＤＰＢＳに再懸濁し、２０μｇのＰｖｕＩ－線状化ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＣＤ３ζＤＮＡと混合した。別のチューブでは、10^{7}個の細胞を２０μｇのＰｖｕＩ－線状化ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ヒトＣＤ３ζＤＮＡと混合した。氷上、５分後、細胞はジーン・パルサー（Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ）（バイオラッド（ＢｉｏＲａｄ））セットを用いて、１パルス２５０ボルト、９６０μＦｄとして送達し、エレクトロポレーションを行った。パルス細胞を５分間氷上に放置した。細胞を１０ｍｌの１０％ＩＭＤＭに希釈し、Ｔ－２５ｃｍ^{2}フラスコ中で３７℃一夜、５％CO_2下で増殖した。

【０３３７】

２４時間後、細胞をＴ－７５ｃｍ^{2}フラスコに移し、選択培地（すなわち、１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８含有１０％ＦＢＳ－ＩＭＤＭ）４０ｍｌをそれぞれに加えた。３日後に、「バルク」ＢＷ形質導入体を９６穴プレートに、選択培地中、１ウエル当たり、１０、１００または１０００個の細胞として塗布した。「バルク」形質導入した培養物についてもそれぞれ維持した。

【０３３８】

大よそ２週間後、「バルク」形質導入した培養物をフローサイトメトリーにより陽性の形質導入体について選抜した。この細胞を、氷上、ＦＩＴＣ－接合Ｈ５７－５９７ｍＡｂにより３０分間染色した。Ｈ５７－５９７ｍＡｂはＴＣＲ Ｃβ鎖の線状エピトープを検出する。細胞を１％ＦＢＳ／ＤＰＢＳで２回洗浄した後、同じバッファーに再懸濁した。細胞染色の結果は、ベクトンディッキンソン（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）ＦＡＣＳスキャン（ＦＡＣＳｃａｎ）装置により得た。「バルク」形質導入した培養物は、図１１に示すように、広範なＴＣＲ発現を示した。

【０３３９】

「バルク」形質導入した培養物は、固定化Ｈ５７－５９７ｍＡｂを用いて、活性化アッセイにより試験した。９６穴プレートを３００ｎｇ／ウエルのｍＡｂで一夜被覆した。翌日、10^{5}個の細胞を各ウエルに加え、５％CO_2下、３７℃で一夜インキュベートすることによりアッセイした。アッセイからの上清を前記のようにマウスＩＬ－２サンドイッチＥＬＩＳＡにより試験した（ＷＯ９９／２１５７２；ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。「バルク」形質導入した培養物は特異的に刺激を受け、本アッセイに基づくＩＬ－２を産生した。

【０３４０】
１０００細胞／ウエルプレート上で増殖した形質導入体は、実施例７に記載のように、ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＣＤ３ζ分子の発現について、フローサイトメトリーにより選抜した。試験した候補化合物の１／３ないし２／３が、ＴＣＲ発現陽性であった。発現レベルの最も高いＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／マウスＣＤ３ζ形質導入体（ＢＷ／Ｄ－Ｚ＃８）を一次クローン化し、展開して、さらに評価した。
【０３４１】
ＢＷ／Ｄ－Ｚ＃８からの一次クローンをフローサイトメトリーにより選抜した。一つのクローン（＃８－３９）を最良の細胞株として選択し、さらに特性を検討するために使用した。
【０３４２】
ＢＷ／Ｄ－Ｚ細胞株は、ｓｃＴＣＲ遺伝子をクローン化した当初のＴ細胞ハイブリドーマＤＯ１１．１０に比較することとした。２つの細胞株を並べて染色すると、形質導入したＢＷ細胞上のＴＣＲ発現レベルが、Ｈ５７－５９７ｍＡｂにより染め出された本来のＴ細胞ハイブリドーマにおけるよりも高いことが明瞭であった。両細胞株を刺激して、ＯＶＡペプチドを負荷したＡＰＣ（Ａ２０細胞）の存在下にＩＬ－２を産生させた。しかし、精製一本鎖ＩＡ^{d}／ＯＶＡをプレートに固定化した場合、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞ハイブリドーマは活性化されたが、ＢＷ／Ｄ－Ｚ細胞株は検出し得るレベルのＩＬ－２を産生し得なかった。これは、ＭＨＣ抗原／ＴＣＲ相互作用の安定化に関与するアクセサリー分子が、活性化アッセイにおいて欠失成分となっていると信じられた。ＣＤ４分子は最も理に適った選択であったが、その理由は、それがＭＨＣ分子に結合するＴＣＲに直接関与し、ＢＷ／Ｄ－Ｚ細胞はその表面にＣＤ４を発現しないからである。
【０３４３】
Ｂ．膜結合ＣＤ４レセプター発現用ベクターの構築
この構築に使用するＣＤ４レセプターは、当初、マウスＴ細胞ハイブリドーマＧＤ１２から生成したｃＤＮＡのＰＣＲ増幅により分離した（Ｇｒａｍｍｅｒ，Ｓ．Ｆ．ｅｔａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４５：２４９（１９９０））。
【０３４４】
２つの異なるＣＤ４レセプターを構築した：細胞外、膜貫通（ＴＭ）および細胞質（ＣＭ）ドメインを含む完全長遺伝子、並びに細胞質ドメインを欠失する端部切断レセプター。後者の構築物は、ＣＤ４細胞外レセプタードメインのＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用に対する寄与、およびその細胞質ドメインを介するこの相互作用の増幅への寄与を解明するために着想したものである。
２つのＣＤ４レセプター遺伝子はＰＣＲにより生成させ、発現ベクターｐＣＤＮＡ３．１：Ｈｙｇｒｏ＋にクローン化した。
【０３４５】
完全長ＣＤ４遺伝子を生成させるために、２種のオリゴヌクレオチドプライマー（表１４参照）を設計し、ＣＤ４レセプター遺伝子の全オープンリーディングフレームと１６９ｂｐの上流配列を含む１５５０ｂｐのＰＣＲフラグメントを増幅した。オリゴヌクレオチドＣＤＦ１およびＣＤＦ３をＰＣＲに用いて、完全長ＣＤ４遺伝子を増幅し、一方、ＣＤＦ１およびＣＤＦ４を用いてＣＤ４デルタＣＭ遺伝子を増幅した。両ＤＮＡフラグメントは近接するＨｉｎｄＩＩＩおよびＸｈｏＩ制限部位をもつように構築した。ＸｈｏＩ部位はＣＤ４の開始メチオニンの９５ｂｐ上流に存在するので、完全長遺伝子をクローン化するために、１４８０ｂｐのＸｈｏＩフラグメントを生成させ、ＸｈｏＩ消化ｐＣＤＮＡ３．１Ｈｙｇｒｏ＋ベクター（クロンテック（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ））に連結した。得られるプラスミドをＢｇｌＩＩで線状化し、（実施例７に記載したように）ＢＷ／Ｄ－Ｚ細胞に形質導入するために使用した。
【０３４６】
末端切除ＣＤ４遺伝子を生成させるために、同様の戦略を考案した。オリゴヌクレオチドプライマーＣＤＦ１およびＣＤＦ４を用い、細胞質ドメインを欠失するＣＤ４レセプター

遺伝子のオープンリーディングフレームと１６９ｂｐの上流配列を含む１４９７ｂｐのＰＣＲフラグメントを増幅した。このフラグメントはＨｉｎｄＩＩＩおよびＸｈｏＩ制限部位が隣接していた。ＸｈｏＩ部位は開始メチオニンの９５ｂｐ上流に存在する。１４２７ｂｐのＸｈｏＩフラグメントはＸｈｏＩ消化ｐＣＤＮＡ３．１Ｈｙｇｒｏ＋ベクター（クロンテック）に連結し、得られるプラスミドをＢｇｌＩＩで線状化し、ＢＷ／Ｄ－Ｚ細胞に形質導入するために使用した。

【０３４７】

【表１４】

表１４：マウスＣＤ４およびＣＤ４デルタＣＭのクローニングに使用するオリゴヌクレオチドプライマー

呼称	配列
ＣＤＦ１	5′-GGG GAA GCT TTT TTC ATT TAC GAA CAT CTG TGA AGG C-3′
ＣＤＦ３	5′-GGG GTC GAG TTA TCA GAT GAG ATT ATG GCT CTT CTG C-3′
ＣＤＦ４	5′-GGG GCT CGA GTT ATC AGC GCT GTT GGT GCC GGC ACC TGA CAC AGC AGA GGA TGC AGA G-3′

【０３４８】

Ｃ．膜結合ＣＤ４レセプターを発現するＢＷ：Ｄ－Ｚ細胞の生成

完全長または末端切除したＣＤ４遺伝子で形質導入したＢＷ／Ｄ－Ｚ細胞を１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）および１ｍｇ／ｍｌのハイグロマイシンを含有するＩＭＤＭ培地中で増殖させた。耐性コロニーを限界希釈によりクローン化し、ＣＤ４レセプターの表面発現についてＦＡＣＳ分析により試験した。約10^5個の細胞をＦＩＴＣ標識ラット抗マウスＣＤ４抗体（ファーミンゲン（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ））と、１％血清含有ＰＢＳ５０μｌ中、混合した。組換えＣＤ４レセプターの細胞表面発現について、図１２Ａに示すように、フローサイトメトリーにより分析した。

【０３４９】

陽性クローンはＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲの膜結合発現について、ＦＡＣＳ分析により試験した。約10^5個の細胞を抗－ＴＣＲベータ鎖ビオチン化抗体Ｈ５７と混合した。細胞を洗い、ストレプトアビジン－ＦＩＴＣと混合し、図１２Ｂに示すように、フローサイトメトリーにより分析した。試験した二重陽性細胞株の中、ＢＷＤＺ：ＣＤ４＋（２Ｅ１１）およびＢＷＤＺ：デルタＣＭ（Ｄ６）を、同族体ＯＶＡ－ペプチド提示細胞（ＡＰＣ）を用いるさらなるＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用研究のために選択した。実施例１２に記載した固定化組換えｓｃＩＡ^d／ＯＶＡ分子による刺激の検討に、同じＴ細胞株を使用した。

【０３５０】

Ｄ．ペプチド負荷ＡＰＣによるＢＷＤＺ：ＣＤ４＋Ｔ細胞の刺激

ＢＷＤＺ：ＣＤ４＋細胞が同族体ＡＰＣにより刺激を受けることを証明するために、Ａ２０細胞をＯＶＡペプチドと混合した。ＡＰＣを二倍段階希釈し、10^5個のＴ細胞と混合した。細胞混合物を１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ培地２００μｌ中、３７℃で一夜インキュベートした。培地中のＩＬ－２産生を、前記のＩＬ－２特異ＥＬＩＳＡにより定量した。ＩＬ－２の産生は、図１３に示すように、Ｔ細胞刺激の程度を示す。ＤＯ１１．１０細胞は陽性コントロールとして用い、ＢＷ細胞は陰性コントロールとして用いた。ＣＤ４を発現する２種の細胞株のＩＬ－２産生を、２Ｂ４／ＤＺと比較した。完全長ＣＤ４アクセサリー分子を付加すると、ＢＷ／ＤＺ細胞のＩＬ－２産生はＤＯ１１．１０細胞の７５％～８０％まで回復した。細胞質ドメインを欠失する末端切除ＣＤ４分子は、比較すると、僅かに１０％の回復であった。予測されるとおり、ＣＤ４細胞質ドメインは、ｌｃｋ$^{5\,6}$のリクルートを介してＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用の増幅において主たる役割を演じる。

【０３５１】

実施例９：組換えヒトＴ細胞レセプターを発現するヒトＴ細胞株の生成
Ａ．ヒトＭＢＰ反応性細胞株Ｅ１１からＴＣＲαおよびβ鎖のｃＤＮＡクローンを含有するベクターの構築
ヒトＴ細胞株Ｅ１１はヒトＭＨＣＩＩタンパク質ＨＬＡ－ＤＲ２（ＤＲＢ１＊１５０１）との関連で、ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ８３－１０２、ＹＤＥＮＰＶＶＨＦＦＫＮＩＶＴＰＲＴＰＰ）からのペプチドを認識し、かつそれと反応する。このものは当初、多発性硬化症の患者から単離されたものであり、コリキサ・コープ（Ｃｏｒｉｘａ Ｃｏｒｐ．）が凍結細胞ペレットとして我々に提供した。
【０３５２】
全ＲＮＡはキアゲン（Ｑｉａｇｅｎ）からのＲＮイージイ（ＲＮｅａｓｙ）キットを用い、1×10^{8}個の細胞から調製した。ＲＬＴ（溶菌）バッファーに希釈した後、調製物をさらに処理加工するために、1×10^{7}個の細胞に等量分割した。最終ＲＮＡ濃度は分光測光法により定量した。第一鎖ｃＤＮＡは、５′ＲＡＣＥｃＤＮＡ合成プライマーおよびＳＭＡＲＴＩＩオリゴ（クロンテック（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ）、メンローパーク（Ｍｅｎｌｏ Ｐａｒｋ）、カリフォルニア）を用い、業者の使用者マニュアル（ＰＴ３２６９－１、１９９９年３月）にある説明どおりに調製した。使用したオリゴヌクレオチドを表１５に掲載する。第一鎖（ＲＡＣＥ）のＰＣＲ増幅は、次の場合を除き、指示どおりに実施した：反応容量は二倍の１００μｌとし、ＥｘＴａｑ酵素とバッファー（パンベラ・コープ（Ｐａｎｖｅｒａ Ｃｏｒｐ．））を用いた。この反応に使用する遺伝子特異プライマーは、αおよびβ鎖の定常領域、可変領域（「Ｎ末端」）に密接して、または末端（「Ｃ末端」）位もしくはその近傍に準備した。ＲＡＣＥ反応は４つすべての組み合わせに対して期待通りのサイズの産物を生じ、これらの産物は、次いで配列分析のためにｐＧＥＭ－Ｔイージイ（プロメガ・コープ、マジソン、ウィスコンシン）にクローン化した。１２種のβ鎖候補化合物を分析して、２つの可変領域遺伝子配列を得た；１２のクローンの中、１１種はＴＲＶＢ１２－４であり、１２クローンの中の一つはＴＲＶＢ１４であった（ＩＧＭＴ命名法については、インムノジーンティック（ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ）データベース参照：ｈｔｔｐ；／／ｉｍｇｔ．ｃｎｕｓｃ．ｆｒ：８１０４）。１４種のα鎖を分析して、ほぼ等しい頻度で２つの配列を得た；１４種のクローンの中、５種はＴＲＡＶ９ｓ１であり、１４クローンの中、７種はＴＲＡＶ２２ｓ１であり、残りの２種はＴＲＡＶ１ｓ３とＴＲＡＶ４ｓ１であった（ＩＧＭＴ命名法）。
【０３５３】
【表１５】

表１５：Ｅ１１細胞株からＴＣＲαおよびβ鎖のクローニングに使用するオリゴヌクレオチドプライマー

呼称	配列
SMART II	5′-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3′
第一鎖cDNA（ｸﾛﾝﾃｯｸ）	
5′-RACE	5′$(T)_{25}N_{-1}N$-3′ (N=A, C, G, or T; N-1=A, G, or T)
第一鎖cDNA（ｸﾛﾝﾃｯｸ）	
ﾕﾆﾊﾞｰｻﾙ	長鎖（０．２μＭ）
ﾌﾟﾗｲﾏｰ混合物	5′-CTA ATA CGA CTC ACT ATG GGC AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT-3′
	短鎖（1.0μＭ）
	5′-CTA ATA CGA CTC ACT ATG GGC-3′
RACE 5′ﾌﾟﾗｲﾏｰ（ｸﾛﾝﾃｯｸ）	
VW510	5′-ATC CTT TCT CTT GAC CAT GGC CAT C-3′
RACE 3′、β鎖、Ｃ末端	
VW511	5′-CAC AGC GAC CTC GGG TGG GAA CAC-3′
RACE 3′、β鎖、Ｎ末端	
VW512	5′-GCT GGA CCA CAG CCG CAG CGT CAT G-3′
RACE 3′、α鎖、Ｃ末端	
VW513	5′-CAG CTG GTA CAC GGC AGG GTC AGG-3′
RACE 3′、α鎖、Ｎ末端	

【０３５４】
Ｂ．ヒトＣＤ３ζへの融合体としてＴＣＲαおよびβ鎖のｃＤＮＡクローン含有哺乳動物発現ベクターのヒトＭＢＰ反応性細胞株Ｅ１１からの構築並びに哺乳動物細胞の形質導入ＴＣＲαまたはβ鎖を含むキメラ分子を、ヒトＣＤ３ζの膜貫通および細胞質ドメインに遺伝子的に融合したＥ１１細胞株から構築した。インゲル（Ｅｎｇｅｌ）、オッテンホッフ（Ｏｔｔｅｎｈｏｆｆ）およびクラウスナー（Ｋｌａｕｓｎｅｒ）（Ｓｃｉｅｎｃｅ２５６：１３１８－１３２１，１９９２）は、ヒトについて下に記載したと同様に、マウスの構築物が、ラットの好塩基球白血病細胞株にて発現したとき、特異ＭＨＣ抗原分子によって活性化された細胞を生じることを証明した。
【０３５５】
β鎖ＴＲＶＢ１２－４とα鎖ＴＲＶＡ２２ｓ１と９ｓ１の可変領域およびその対応する定常領域を含むＥ１１クローンは、開始メチオニンの５′および膜貫通領域前の定常ドメインの末端に制限エンドヌクレアーゼ部位を導入するためのプライマーでの増幅用鋳型として役立つ。増幅に使用するα鎖クローンはｐＴＶＷ４４３－１および－７（それぞれ、α９ｓ１および２２ｓ１）であり、それらを増幅するために使用するオリゴヌクレオチドプライマーは、表１６に掲載する。簡単に説明すると、５′プライマーは制限部位ＳａｌＩとＫｐｎＩを含んでいた。３′プライマーは消化と連結によるヒトＣＤ３ζフラグメント

とのインフレーム融合を可能とするＨｐａＩ制限部位を含んでいる（すなわち、実施例７に記載したＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ヒトＣＤ３ζｐＧＥＭ－Ｔイージイベクターにおいて）。増幅に用いるβ鎖クローンはｐＴＶＷ４４１－２（β１２－４）であった。この構築物の５′プライマーは、制限部位ＳａｌＩおよびＨｉｎｄＩＩＩを含んでおり、３′プライマーはヒトＣＤ３ζに対するインフレーム融合のためのＨｐａＩ部位を含んでいた。記載のオリゴヌクレオチドを用いるＰＣＲによる増幅は適切なフラグメントを生成するが、これらのフラグメントは次いでｐＧＥＭ－Ｔイージイにクローン化し、プラスミドｐＴＶＷ４５０－１、ｐＴＶＷ４５１－１およびｐＴＶＷ４４９－１（それぞれ、α９ｓ１、α２２ｓ１およびβ１２－４をエンコードするフラグメントを含む）とした。これらのプラスミドはＳａｌＩおよびＨｐａＩで消化し、同じ酵素で切断したＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ／ヒトＣＤ３ζｐＧＥＭ－Ｔイージイベクターにクローニングするために必要なフラグメントとした。得られるプラスミド、ｐＴＶＷ４５５－１、ｐＴＶＷ４５４－１およびｐＴＶＷ４５３－１（それぞれ、α９ｓ１、α２２ｓ１およびβ１２－４をエンコードする）は、ヒトＣＤ３ζ膜貫通および細胞質ドメインとインフレーム融合したＴＣＲαまたはβ鎖の細胞外ドメインを含んでいた。これらの融合フラグメントは、次いで、哺乳動物細胞での発現用のインビトロゲン（ＩｎＶｉｔｒｏｇｅｎ）（カールスバッド（Ｃａｒｌｓｂａｄ）、カリフォルニア）のベクター、すなわち、β鎖用のｐｃＤＮＡ３．１（＋）（Ｇ４１８選択）またはα鎖用のｐｃＤＮＡ３．１（＋）／ハイグロ（ハイグロマイシン抗生物質耐性）に移入した。交互薬物耐性マーカーは、形質導入哺乳動物細胞において両プラスミド存在下での選択を可能とした。α９ｓ１／ｈＣＤ３ζフラグメントは、ＫｐｎＩからＮｏｔＩまでのフラグメントとしてｐｃＤＮＡ３．１（＋）／ハイグロにクローン化した。α２２ｓ１／ｈＣＤ３ζフラグメントは、制限酵素ＳａｌＩで切断し、酵素Ｔ４ポリメラーゼで補完することにより形成した平滑断端とＮｏｔＩ末端を含むフラグメントとしてｐｃＤＮＡ３．１（＋）／ハイグロにクローン化した。対応するｐｃＤＮＡ３．１（＋）／ハイグロベクターは、制限酵素ＨｉｎｄＩＩＩで切断し、Ｔ４ポリメラーゼで補完し、次いでＮｏｔＩで切断することにより調製した。β１２－４／ｈＣＤ３ｚフラグメントは、ＨｉｎｄＩＩＩからＮｏｔＩまでのフラグメントとしてｐｃＤＮＡ３．１（＋）にクローン化した。これらのクローニング工程から得られるベクターは、ｐＴＶＷ４５６－１、ｐＴＶＷ４５９－１およびｐＴＶＷ４５７－１と指定し、それぞれα９ｓ１／ｈＣＤ３ζ、α２２ｓ１／ｈＣＤ３ζおよびβ１２－４／ｈＣＤ３ζを含んでいる。

【０３５６】

【表１６】

表１６：ＣＤ３ζ融合物としてＴＣＲαおよびβ鎖のクローニングに使用するオリゴヌクレオチドプライマー

呼称	配列
VW535	5′-TAT GGT CGA CAA GCT TCA CAG AGG GCC TGG TCT GG-3′
（β12－4 用 5′ﾌﾟﾗｲﾏｰ、ﾘｰﾀﾞｰのATGの47nt前にHindII と SalI 部位挿入）	
VW537	5′-TAT GGT CGA CGG TAC CCC AGA AAA GAC CTC CAG AAA ATA GC-3′
（α9s1用 5′ﾌﾟﾗｲﾏｰ、ﾘｰﾀﾞｰのATGの49nt前にSalI とKpnI 部位挿入）	
VW536	5′-GGT GGT TAA CGT CTG CTC TAC CCC AGG CCT C-3′
（β定常域用3′ﾌﾟﾗｲﾏｰ、定常領域３番目のｼｽﾃｲﾝの直前にHpaI部位挿入）	
VW539	5′-GGT GGT TAA CGG AAC TTT CTG GGC TGG GGA AGA AGG-3′
（α定常域用3′ﾌﾟﾗｲﾏｰ、定常領域３番目のｼｽﾃｲﾝの直前にHpaI部位挿入）	
VW540	5′-TAT GGT CGA CGG TAC CCT TCA TGT TAA GGA TCA AGA CCA TTA TTT GC-3′
（22s1用 5′ﾌﾟﾗｲﾏｰ、ﾘｰﾀﾞｰのATGの45nt前にSalI とKpnI 部位挿入）	

【０３５７】

ヒトＴ細胞株Ｊ．ＲＴ３（ＡＴＣＣ番号ＴＩＢ－１５３）は、ＴＣＲ－ｈＣＤ３ζ融合体を形質導入するために選択したものであり、ＴＣＲβ鎖を発現しないジャーカットリンパ芽球株の誘導体である。これらの細胞はエレクトロポレーションにより、プラスミドｐＴＶＷ４５６－１、ｐＴＶＷ４５９－１およびｐＴＶＷ４５７－１単独で、またはα鎖＋β鎖の対、すなわち、ｐＴＶＷ４５６－１＋ｐＴＶＷ４５７－１またはｐＴＶＷ４５９－１＋ｐＴＶＷ４５７－１として形質導入した。形質導入体の選択は適切な抗生物質、Ｇ４１８またはハイグロマイシンまたはその両方を用いて実施した。二重の選択（両抗生物質使用）は２段階で実施した。細胞は形質導入し、抗生物質不含培地で１～２日間増殖した。次いで、形質導入体の増殖をＧ４１８含有培地にて選択した。７日後に、ハイグロマイシンを増殖培地に添加した。ＴＣＲ融合分子の発現は、抗体で染色した細胞のＦＡＣＳ分析により評価した。該抗体はＴ－細胞レセプター複合体のヒトα／β鎖の単形性決定基（クローンＢＭＡ０３１、ベックマン・クールター（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）、マイアミ、フロリダ）または該複合体の特異的β鎖可変領域（クローン５６Ｃ５、ベックマン・クールター）を検出するものである。これらの細胞はＤＲ２制限抗原提示細胞ＤＯ２０８９１５（ジョン・ホプキンス・ラボラトリーズ（Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、ボルチモア、メリーランド）により活性化されるかをアッセイするものであり、該細胞はアミノ酸残基８３～１０２個を含むヒトＭＢＰペプチド（アミノ酸配列：ＹＤＥＮＰＶＶＨＦＦＫＮＩＶＴＰＲＴＰＰ）でパルスし、α鎖とβ鎖の組み合わせが機能的ＴＣＲを生じることを確認してあった。スクリーニングアッセイに組換えＴ細胞を使用することについては、実施例１３に記載する。

【０３５８】

以下の実施例はＭＨＣ／ペプチド複合体からなるＭＨＣ抗原を用いての本発明の種々のスクリーニング方法論に関する。

【０３５９】

実施例１０：細胞に基づくＴ細胞活性化アッセイの使用によるＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を阻害する化合物の同定

Ｔ細胞に基づくスクリーニングアッセイは、ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用のインヒビターを検出するために開発した。通常、Ｔ細胞は、それらの表面に特異的ＭＨＣ／ペプチド複合体を担持する抗原提示細胞（ＡＰＣ）と接触させたときに活性化される。例えば、ＯＶＡペプチドでパルスしたＩＡ^{d}－陽性Ａ２０ＡＰＣとインキュベーションすると、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞は活性化されて、ＩＬ－２を産生する。多くの異なる細胞表面レセプター間の相互作用はＴ細胞応答のレベルに関係するが、ＤＯ１１．１０ＴＣＲとＯＶＡ／ＩＡ^{d}複合体間の特異的相互作用は応答開始のために必要とされる。ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド複合体間の相互作用のみによる応答を他の表面レセプターが関係する応答と区別するために、精製組換え一本鎖ＭＨＣ／ペプチド複合体によりＴ細胞応答を刺激するアッセイ方法を開発した。この方法は、以前に記載されている異なるＭＨＣ／ペプチド複合体に応答するＴ細胞の能力をモニターするために使用することができる（ＵＳＳＮ０９／２０４，９７９）。この方法は、ＭＨＣ／ペプチド複合体に応答するＴ細胞の能力を阻害または刺激する化合物を検出するのに特に有用である。

【０３６０】

とりわけ興味深いのは、低分子量化合物、例えば、ＭＨＣ／ペプチド複合体に応答するＴ細胞を阻害またはそれに拮抗する有機化合物、ペプチドおよび核酸類の検出である。より具体的には、ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド複合体間の相互作用に拮抗する低分子化合物の検出に大きな関心がある。かかる化合物は、免疫疾患治療のための免疫抑制剤候補の開発に有益である。ＭＨＣ／ペプチド複合体に応答するＴ細胞の能力を刺激する化合物は、ワクチン対策の展開に有益である。

【０３６１】

膨大な数の化合物の分析を容易にするために、「二重」アッセイフォーマットを開発したが、このフォーマットでは、Ｔ細胞の刺激とＴ細胞応答の測定の両方を、図５Ｂに示すように、マイクロタイタープレートの単一のウエルで実施することができる。このアッセイ

では、抗－サイトカインｍＡｂと刺激性ｓｃ－ＭＨＣ／ペプチド複合体をウエルに固定化する。ＭＨＣ／ペプチド－制限Ｔ細胞は、可溶性試験化合物または化合物の希釈物とともにこのウエルに加える。活性化Ｔ細胞により産生されたサイトカインは、抗－サイトカイン抗体が捕捉する。一定時間インキュベーションした後、Ｔ細胞と化合物を除き、ウエルを洗浄して二次抗－サイトカインｍＡｂを加えて、Ｔ細胞が産生したサイトカイン量を検出するようにする。固定化ｓｃ－ＭＨＣ／ペプチド複合体によるＴ細胞刺激を阻害する化合物は、希釈した化合物を容れたウエルで観察されるよりも、サイトカインの産生を低下させる。

【０３６２】

例えば、精製したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡタンパク質５０ｎｇとラット抗－マウスＩＬ－２ｍＡｂ（ファーミンゲン・パーツ番号１８１６１Ｄ）１００ｎｇとを、同時に、９６穴マイクロタイタープレート（ヌンク・マキシソープ）のウエルにＰＢＳ（セルグロ（Ｃｅｌｌｇｒｏ）カタログ番号２１－０３１－ｃｖ）５０μｌ中で被覆した。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ；シグマ・パーツ番号２６５０）含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）１００μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地１００μｌを容れた。次いで、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞（培地１００μｌ中1×10^{5}細胞）を加えた。１０％CO_2下、３７℃で８時間インキュベーションした後、細胞を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄した。ビオチン化抗－ＩＬ－２ｍＡｂ（ファーミンゲン・パーツ番号１８１７２Ｄ）（１０％ＦＢＳ含有ＰＢＳ１００μｌ中１００ｎｇ）を各ウエルに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中のアビジンペルオキシダーゼ（シグマ・パーツ番号Ａ３１５１）２５０ｎｇを各ウエルに加えた。３７℃３０分後、ウエルを洗い、ＴＭＢ基質（バイオＦＸラボラトリーズ・カタログ番号ＴＭＢＷ－０１００－０１）１００μｌを加えた。基質反応を１Ｍ硫酸で停止させ、ＴＭＢ発色団産物の吸光度を４５０ｎｍで読み取った。このアッセイにおいて、吸光度の読み取り値は、細胞が産生したＩＬ－２量と相関する。

【０３６３】

各アッセイ成分を滴定することにより、シグナル／ノイズ比５以上を達成した。化学ライブラリーからの小型分子２０００種につき、上記アッセイフォーマットでＩＬ－２産生を阻害するか、試験した。各プレートの複数ウエルに希釈化合物（ＤＭＳＯ）を容れ、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ刺激ＤＯ１１．１０Ｔ細胞が産生するＩＬ－２量を確定した。ＩＬ－２産生量を有意に低下させた化合物、すなわち、本アッセイで標準偏差が３を超えるＩＬ－２吸光度読み取り値が、希釈剤ウエルで観察されるよりも低い値を示した化合物について、さらに評価した。

【０３６４】

例えば、アッセイプレート５－２において、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞刺激は、コントロール化合物の希釈剤としてＤＭＳＯを用い、上記のように８個のウエルでアッセイした。これらウエルでの平均ＩＬ－２吸光度読み取り値は２．１９８であり、標準偏差は０．２４８であった。４０種の化合物につき、このマイクロタイタープレート上で二重測定を実施した。２種の化合物（５Ｅ１１および５Ｆ６）が、コントロール（平均値－３ＳＤ＝１．４５４）よりも有意に低いＩＬ－２吸光度読み取り値（それぞれ、１．２５６および０．１３６）を示し、これらの化合物がｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ刺激ＤＯ１１．１０Ｔ細胞によるＩＬ－２産生を阻害することを示している。他の３８種の化合物を収容したウエルの平均ＩＬ－２吸光度読み取り値は、１．４５４未満となることはなく、これが阻害応答の範囲を示している。試験した２０００種の化合物の中、４６種がこのアッセイフォーマットにおいてｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ刺激ＤＯ１１．１０Ｔ細胞によるＩＬ－２産生を阻害することが、繰り返し認められた。

【０３６５】

阻害作用がｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ：ＤＯ１１．１０ＴＣＲ相互作用の特異的干渉によるかどうか、また他の非特異的阻害起源によるものではないのかを決めるために、抗－ＣＤ３ｍ

ＡｂによるＴ細胞刺激に対する阻害化合物の影響を評価した。抗－ＣＤ３抗体は、ＭＨＣ／ペプチド複合体が認識する部位とは異なる部位でＴＣＲ／ＣＤ３複合体に結合することができる。この抗体をウエルに固定化した場合、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞によるＩＬ－２産生を刺激することができる。このアッセイのために、抗－ＣＤ３抗体（ファーミンゲン・パーツ番号０１５１１Ｄ）２５ｎｇおよびラット抗－マウスＩＬ－２ｍＡｂ１００ｎｇを９６穴マイクロタイタープレートのウエルにＰＢＳ５０μｌ中で同時に被覆した。２４時間後、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）１００μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地１００μｌを容れた。次いで、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞（培地１００μｌ中1×10^{5}細胞）を加えた。１０％CO_2下、３７℃で８時間インキュベーションした後、細胞を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄した。ビオチン化抗－ＩＬ－２ｍＡｂ（１０％ＦＢＳ含有ＰＢＳ１００μｌ中１００ｎｇ）を各ウエルに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中のアビジンペルオキシダーゼ２５０ｎｇを各ウエルに加えた。３７℃３０分後、ウエルを洗い、ＴＭＢ基質１００μｌを加えた。基質反応を１Ｍ硫酸で停止させ、ＴＭＢ産物の吸光度を４５０ｎｍで読み取った。代表的なアッセイ結果を図１４に示す。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ介在刺激を阻害した３０種の化合物は、抗－ＣＤ３アッセイにおいて、微々たるＩＬ－２産生阻害しか示さないことが判明した。これらの結果は、これらの化合物が、ＭＨＣ／ペプチド依存性刺激を阻害するにもかかわらず、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体を介する刺激に対して応答するＴ細胞の能力には影響しないことを示している。従って、これらの化合物は、ＩＬ－２の産生または放出に導く細胞間メカニズムの阻害を介して作用するとは思われない。

【０３６６】

この３０種の阻害化合物について、次いで、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡおよび抗－ＣＤ３Ａｂアッセイにおいて滴定し、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ介在刺激を用量依存的に阻害することを示した。これら滴定曲線の例を図１５Ａおよび１５Ｂに示し、３０種の阻害化合物の中の代表的なものを図１６に示す。

【０３６７】

阻害作用がｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ複合体中のＯＶＡペプチドとの相互作用に特異的なものであったのかどうかを決定するために、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤによるＴ細胞刺激に対する阻害化合物の影響を評価した。固定化したｓｃＩＡ^{d}／ＧＤがＧＤ１２Ｔ細胞ハイブリドーマを刺激してＩＬ－２を産生させることは、以前に示されている。当該阻害化合物もまたＧＤ１２細胞に影響を与えるかどうかを試験するために、精製したｓｃＩＡ^{d}／ＧＤタンパク質１００ｎｇとラット抗－マウスＩＬ－２ｍＡｂ１００ｎｇとを、同時に、９６穴マイクロタイタープレートのウエルにＰＢＳ５０μｌ中で被覆した。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）１００μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地１００μｌを容れた。次いで、ＧＤ１２Ｔ細胞（培地１００μｌ中1×10^{5}細胞）を加えた。１０％CO_2下、３７℃で８時間インキュベーションした後、細胞を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄した。ビオチン化抗－ＩＬ－２ｍＡｂ（１０％ＦＢＳ含有ＰＢＳ１００μｌ中１００ｎｇ）を各ウエルに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中のアビジンペルオキシダーゼ２５０ｎｇを各ウエルに加えた。３７℃３０分後、ウエルを洗い、ＴＭＢ基質１００μｌを加えた。基質反応を１Ｍ硫酸で停止させ、ＴＭＢ産物の吸光度を４５０ｎｍで読み取った。ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ介在ＤＯ１１．１０刺激を阻害した化合物はすべてｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ刺激ＧＤ１２細胞によるＩＬ－２産生をも阻害し、当該化合物がペプチドに特異的な様式で刺激を阻害するのではないことを示した。

【０３６８】

阻害化合物の特異性について、異なるＭＨＣ／ペプチド：Ｔ細胞の組み合わせによりさらに検討した。実施例１に記載したように、ＩＥ^{k}／ＰＣＣを一本鎖ＭＨＣクラスＩＩ分子として構築し、それが２Ｂ４Ｔ細胞を活性化してＩＬ－２を分泌させることを見出した。

二重フォーマットアッセイ法を２Ｂ４細胞とｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣタンパク質を用いて上記のように開発した。このアッセイでは、精製したｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣタンパク質２００ｎｇとラット抗－マウスＩＬ－２ｍＡｂ１００ｎｇとを、同時に、９６穴マイクロタイタープレートのウエルにＰＢＳ５０μｌ中で被覆した。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）１００μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地１００μｌを容れた。次いで、２Ｂ４Ｔ細胞（培地１００μｌ中１×１０^{5}細胞）を加えた。１０％CO_2下、３７℃で８時間インキュベーションした後、細胞を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄した。ビオチン化抗－ＩＬ－２ｍＡｂ（１０％ＦＢＳ含有ＰＢＳ１００μｌ中１００ｎｇ）を各ウエルに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中のアビジンペルオキシダーゼ２５０ｎｇを各ウエルに加えた。３７℃３０分後、ウエルを洗い、ＴＭＢ基質１００μｌを加えた。基質反応を１Ｍ硫酸で停止させ、ＴＭＢ産物の吸光度を４５０ｎｍで読み取った。抗－ＣＤ３Ａｂに比較して、固定化ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡでのＩＬ－２分泌により強い阻害を示した２２種の小型分子について、ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣ：２Ｂ４アッセイにより試験した。一つの小型分子（４２７－Ｆ８）は、ＩＬ－２の分泌で測定した場合、ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣ：２Ｂ４Ｔ細胞相互作用よりもｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ：ＤＯ１１．１０Ｔ細胞相互作用のより強い阻害作用を示した。両方のアッセイにおいて、４２７－Ｆ８を多数回投与したときの阻害率を示す典型的な滴定曲線を表１７に示す。３回の別々のアッセイにおいて同様の結果を観察した。この結果は、試験化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用の阻害に対しある程度の特異性を示し得ることを示唆している。

【０３６９】

【表１７】

表１７：ＭＨＣ／ペプチド刺激Ｔ細胞によるＩＬ－２分泌を阻害する際の化合物４２７－Ｆ８の選択的活性（ＩＬ－２分泌の阻害％）

４２７－Ｆ８濃度（μＭ）	アッセイフォーマット ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ：ＤＯ１１．１０Ｔ細胞	ｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣ：２Ｂ４Ｔ細胞
１６．６	８３	８６
５．５	８５	８６
１．８	８５	８３
０．６	５７	１１
０．２	０	４
０．０６	０	３

【０３７０】

阻害化合物の活性はさらに刺激アッセイにより検討したが、当該アッセイでは、表面に適切なＭＨＣを担持する抗原提示細胞（ＡＰＣ）に外来性ペプチドを負荷し、それを用いてインビトロでＴ細胞応答を刺激する。このアッセイにおいては、抗－ＩＬ－２抗体１００ｎｇを９６穴マイクロタイタープレートのウエルに被覆した。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに、培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）１００μｌ中２×１０^{5}個のＡ２０細胞（ＩＡ^{d}分子担持ＡＰＣ）、培地１０μｌ中ＯＶＡペプチド５μｇ、培地１００μｌ中１×１０^{5}個のＤＯ１１．１０Ｔ細胞、およびＰＢＳ中の試験化合物５μｌを容れた。１０％CO_2下、３７℃で３時間インキュベーションした後、細胞を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄した。ビオチン化抗－ＩＬ－２ｍＡｂ（ファーミンゲン・パーツ番号１８１７２Ｄ）（１０％ＦＢＳ含有ＰＢＳ１００μｌ中１００ｎｇ）を各ウエルに加えた。３７℃で１時間経過後、ウエルを洗浄し、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中のアビジンペルオキシダーゼ（シグマ・パーツ番号Ａ３１５１）２５０ｎｇを各ウエルに加えた。３７℃３０分後、ウエルを洗い、ＡＢＴＳ基質（バイオＦＸ

ラボラトリーズ）１００μｌを加えた。基質反応を発色させ、４０５ｎｍで吸光度を読み取った。吸光度の読み取り値は、ＤＯ１１．１０ＴＣＲと相互作用し、ＩＬ－２産生を刺激するＡ２０細胞上のＯＶＡペプチド－負荷ＩＡ^{d}分子の能力と相関する。ＭＨＣ／ペプチド複合体とＴＣＲ間の相互作用と拮抗する化合物の能力は、４０５ｎｍでの吸光度読み取り値の低下として測定する。候補阻害化合物についてのこれらの典型的な研究結果を表１８に示すが、これらの結果は、該化合物がペプチド負荷ＡＰＣの能力を遮断し、Ｔ細胞応答を刺激し得ることを示している。

【０３７１】

【表１８】

表１８：ＯＶＡペプチド負荷Ａ２０細胞によるＤＯ１１．１０Ｔ細胞刺激に対する試験化合物の阻害作用（ＩＬ－２ ＥＬＩＳＡ値）

２１１－Ｃ３		２１１－Ｃ９		１２Ｇ９		２１１Ｂ９	
μＭ	A-405	μＭ	A-405	μＭ	A-405	μＭ	A-405
0	2.024	0	2.024	0	1.906	0	1.920
2.3	2.128	1	2.101	1.5	2.047	1.8	1.608
7	1.984	3	1.947	5	1.940	5.5	1.154
20	1.437	10	1.289	14	1.795	16.7	1.127
62	0.262	31	0.235	42	1.630	50	0.944

【０３７２】

要約すると、ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を妨害する物質を選抜する実用的な方法が開発された。

【０３７３】

実施例１１：表面ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合タンパク質を発現するように設計調製したＴ細胞ハイブリドーマを使用するスクリーニングアッセイの開発

目標は、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の相互作用に干渉し得るアゴニストおよびアンタゴニストを同定するための細胞－タンパク質に基づく方法を開発することであった。本実施例に記載するように、組換え一本鎖Ｔ細胞レセプターを発現する不死化Ｔ細胞株を用いて、アッセイフォーマットを開発した。この方法の利点は、膨大な数の試験化合物をスクリーニングするために、十分な量の細胞を生成させることができるということである。実施例７に記載したように、２Ｂ４マウスＴ細胞ハイブリドーマを用いて、３ドメインｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合タンパク質としてＤＯ１１．１０ＴＣＲをその表面に発現する新規な細胞株を創生した。ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζをエンコードするＤＮＡで形質導入した２Ｂ４Ｔ細胞では、図１７Ａに示すように、ＯＶＡペプチドでパルスしたＡ２０細胞とともに細胞をインキュベートすると、特異的な刺激が観察された。さらに、これらの同じ細胞は、ＧＤペプチドでパルスしたＡ２０細胞に露呈しても刺激されなかった。表面結合ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡを発現するＮＳＯミエローマ細胞（ＮＤＯ細胞）を使用するもう一つの実験では、図１８に示すように、ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ形質導入Ｔハイブリドーマ細胞の刺激が観察された。ＮＤＯ細胞の存在下にインキュベートした（表面に２Ｂ４ＴＣＲを発現する）野生型２Ｂ４Ｔ細胞は非応答性であった。これらのデータは、ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合物が新しい抗原特異性をもつＴ細胞を再構築するために使用し得るという主張を支持するものである。

【０３７４】

上に考察したように、化学ライブラリーをスクリーニングする理想的な方法は、精製した

組換えＭＨＣ／ペプチド複合体が刺激し得る細胞株を開発することであろう。表面ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合タンパク質を発現するように設計調製したＴ細胞株を刺激するために精製したＭＨＣ／ペプチド分子を使用するという概念を試験するために、１０００または１６０ｎｇのｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ融合タンパク質でウエルを被覆し、適切なＴ細胞を添加した。細胞刺激は培養上清に分泌されたＩＬ－２タンパク質をアッセイすることにより測定した。ＩＬ－２の検出はファーミンゲン（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）から購入した１組の抗－マウスＩＬ－２抗体を用いて実施し、すでに記載されているサンドイッチＥＬＩＳＡフォーマットに使用した（Ｒｈｏｄｅ ｅｔ ａｌ．１９９６．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５７：４８８５）。コントロールウエルには組換えｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭタンパク質を使用した以外、タンパク質を同じ濃度で被覆した。１０^{5}個の２Ｂ４細胞または２Ｂ４形質導入体を、ウエル中、５％CO_2の存在下、３７℃で１４時間インキュベートした後、上清１００μｌを集め、ＩＬ－２についてアッセイした。図１９は１実験からの結果を示す。予期どおりに、ｓｃＩＡ^{d}／ｇＤ－ＩｇＭを被覆したコントロールウエルは、ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ２Ｂ４形質導入体も野生型２Ｂ４Ｔ細胞をも刺激し得なかった。さらに重要なことは、形質導入体のみが固定化ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭタンパク質で提示した場合にＩＬ－２を産生し、対照的に、同一のタンパク質は野生型の２Ｂ４Ｔ細胞を刺激しなかったことである。これらの結果は、組換えＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζをその表面に発現するＴ細胞は、固定化ＩＡ^{d}／ＯＶＡ複合体の存在下で効率的に刺激され得るが、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭ複合体では刺激されないことを示す。

【０３７５】

形質導入細胞株を使用するスクリーニングアッセイ法をさらに開発するために、種々濃度の固定化ｓｃＩＡ^{d}分子を用いて、二重フォーマットアッセイ法を設定した。アッセイ条件は実施例１０に記載の条件と同じとした。このアッセイ結果を表１９に示す。これらの結果は、ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡおよびｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭの両方がＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ形質導入体を刺激し得ることを示している。以前に観察したように、固定化したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ分子は応答刺激において、固定化したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ分子よりもより強力であった。形質導入体のペプチド特異性も観察された。ＭＨＣ抗原複合体に対しＩｇＭフォーマットを使用すると、多価フォーマットの使用がどの程度アッセイの感度を上昇させるかが分かる。

【０３７６】

【表１９】

表１９：ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ複合体によるＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ２Ｂ４形質導入体の活性化（ＩＬ－２ ＥＬＩＳＡ値（A_{405}））

ng 複合体/ウエル	scIA^{d}/OVA-IgM	scIA^{d}/GD-IgM	scIA^{d}/OVA	scIA^{d}/GD
２５０	２．２７４	０．２２４	１．０６３	０．２２７
１２５	２．３２５	０．２３３	１．０５９	０．１７９
６２	１．８２２	０．２２４	１．０３２	０．１６４
３１	１．３２４	０．２２６	０．６４６	０．２１３
１５	０．２７３	０．１９９	０．３９７	０．１５２
７	０．２６４	０．２１３	０．２３６	０．１６３
３	０．２３４	０．１９０		
１	０．２１４	０．１９６		

【０３７７】

上に示した結果に基づき、ＴＣＲ形質導入Ｔ細胞株と固定化ＭＨＣ抗原分子を用いて、スクリーニング方法を開発することができた。例えば、精製したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭタンパク質とラット抗－マウスＩＬ－２ｍＡｂを５０μｌのＰＢＳ中、９６穴マイクロタイターのウエルに同時に被覆した。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）１００μｌまたは２．５％

ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地１００μｌを容れた。次いで、ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ２Ｂ４形質導入体（培地１００μｌ中１×１０^{5}細胞）を加えた。１０％CO_2下、３７℃で８時間インキュベーションした後、細胞を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄した。ビオチン化抗－ＩＬ－２ｍＡｂ（１０％ＦＢＳ含有ＰＢＳ１００μｌ中１００ｎｇ）を各ウエルに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中のアビジンペルオキシダーゼ２５０ｎｇを各ウエルに加えた。３７℃３０分後、ウエルを洗い、ＴＭＢ基質１００μｌを加えた。基質反応を０．１８Ｍ硫酸で停止させ、反応産物の吸光度を４５０ｎｍで読み取った。ＭＨＣ／ペプチド複合体と組換えＴＣＲ間の相互作用に拮抗する化合物の能力は、Ｔ細胞形質導入体が培地に分泌したサイトカイン量の低下として測定する。Ｔ細胞を刺激するＭＨＣ／ペプチド複合体の代わりに抗－ＴＣＲ Ａｂを用いるアッセイは、阻害性化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド複合体の相互作用に拮抗することにより作用するのか、または異なるメカニズムにより作用するのかを決定するために実施する。ＭＨＣ／ペプチド複合体によるＴ細胞刺激を阻害するが、抗－ＴＣＲ抗体による刺激を阻害しない化合物は、リード（手掛かりとなる）化合物として追求し得る。

【０３７８】

実施例１２：表面ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合タンパク質と組換えＣＤ４レセプターを発現するように設計調製したＴ細胞ハイブリドーマを使用するスクリーニングアッセイの開発

次の目標は、細胞に基づくスクリーニング方法をさらに精緻なものとすることであった。組換えＴ細胞は一本鎖ＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合物とＣＤ４レセプターを細胞表面に発現するように設計調製した。これらの操作は、これらの細胞がＭＨＣ／ペプチド複合体により刺激を受けるようにすることができる。この手法の利点は、細胞を特定のアッセイパラメータに適するように設計し、最適化し得ることである。例えば、高レベルの組換えｓｃＴＣＲおよび／またはＣＤ４レセプターを発現する細胞は、ＭＨＣ／ペプチド複合体による刺激に、より高い感度を示し得る。実施例８に記載したように、安定なＢＷＤＺ－ＣＤ４＋Ｔ細胞形質導入体は、ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合タンパク質および組換えＣＤ４レセプター両方を細胞膜上に発現するように生成した。ＢＷＤＺ：ＣＤ４＋Ｔ細胞株の刺激に関わる精製ＭＨＣ／ペプチド分子を使用するという概念を試験するために、種々濃度のｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ融合タンパク質をウエルに被覆した。実施例１０に記載したように、ラット抗－マウスＩＬ－２抗体をウエルに被覆した。次いで、ＢＷＤＺ：ＣＤ４＋Ｔ細胞を添加し、Ｔ細胞の刺激は、実施例１０に記載したように、培養上清に分泌されたＩＬ－２をアッセイすることにより測定した。コントロールウエルは、組換えｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－ＩｇＭタンパク質を使用したこと以外、同じ濃度のタンパク質で被覆した。かかるアッセイの結果を表２０に示す。結果は、固定化したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭが特異的に表面ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲおよびＣＤ４レセプターを発現する組換えＢＷＤＺ：ＣＤ４＋Ｔ細胞を刺激し得ること、また組換えＴ細胞株および固定化ＭＨＣ／ペプチド分子を用いるスクリーニング方法を開発し得たことを示している。

【０３７９】

【表２０】

表２０：ｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭ複合体によるＢＷＤＺ：ＣＤ４＋形質導入体の活性化（ＩＬ－２ ＥＬＩＳＡ値（$Ａ_{405}$））

ng複合体/ウエル	scIA^{d}/OVA-IgM	scIA^{d}/GD-IgM
１０００	１．２７７	０．３７５
２００	０．３４０	０．３０９
４０	０．３０５	０．２８２

【０３８０】
例えば、精製したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡ－ＩｇＭタンパク質およびラット抗－マウスＩＬ－２ｍＡｂを５０μｌのＰＢＳ中、９６穴マイクロタイターのウエルに同時に被覆した。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）１００μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地１００μｌを容れた。次いで、ＢＷＤＺ：ＣＤ４＋形質導入体（培地１００μｌ中１×１０^{5}細胞）を加えた。１０％$ＣＯ_{2}$下、３７℃で８時間インキュベーションした後、細胞を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄した。ビオチン化抗－ＩＬ－２ｍＡｂ（１０％ＦＢＳ含有ＰＢＳ１００μｌ中１００ｎｇ）を各ウエルに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中のアビジンペルオキシダーゼ２５０ｎｇを各ウエルに加えた。３７℃３０分後、ウエルを洗い、ＴＭＢ基質１００μｌを加えた。基質反応を０．１８Ｍ硫酸で停止させ、吸光度を４５０ｎｍで読み取った。ＭＨＣ／ペプチド複合体と組換えＴＣＲ間の相互作用に拮抗する化合物の能力は、Ｔ細胞形質導入体が培地に分泌したサイトカイン量の低下として測定する。Ｔ細胞を刺激するＭＨＣ／ペプチド複合体の代わりに抗－ＴＣＲ Ａｂを用いるアッセイは、阻害性化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド複合体の相互作用に拮抗することにより作用するのか、または異なるメカニズムにより作用するのかを決定するために実施する。ＭＨＣ／ペプチド複合体によるＴ細胞刺激を阻害するが、抗－ＴＣＲ抗体による刺激を阻害しない化合物は、リード（手掛かりとなる）化合物として追求し得る。

【０３８１】
実施例１３：自己免疫ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用のインヒビターを検出するための細胞に基づくスクリーニングアッセイ法の開発
我々の目標は、ヒト自己免疫疾患と関係するＴＣＲとＭＨＣ抗原分子間の相互作用に干渉し得るアンタゴニストを同定するための細胞－タンパク質に基づく方法をさらに開発することにあった。本実施例に記載するように、多発性硬化症の患者から分離したＴ細胞より誘導される組換えＴ細胞レセプターを発現する不死化Ｔ細胞株を用いて、アッセイフォーマットを考案した。ヒトＴ細胞株またはクローンを培養により大量に増殖させることは非常に困難であり、増殖を拡張した後では多くの場合、その抗原に対する特異性を失ってしまう。組換えＴ細胞を用いる手法の利点は、膨大な数の試験化合物をスクリーニングするために、十分な量の細胞を生成させることができるということである。実施例９に記載したように、ＴＣＲα鎖およびβ鎖は、ＭＢＰ制限ヒトＭＳ Ｔ細胞株Ｅ１１からクローン化した。ヒトＣＤ３ζ膜貫通および細胞質ドメインと枠内融合したＴＣＲα鎖およびβ鎖の細胞外ドメインを発現し得る発現ベクターを生成させ、不死化Ｔ細胞に形質導入した。形質導入した細胞はＭＢＰペプチド負荷$ＤＲ２^{+}$ＡＰＣによる刺激アッセイに使用する。Ｅ１１ ＴＣＲ形質導入細胞株を用い、その結果として、固定化したｓｃＤＲ２／ＭＢＰタンパク質によるスクリーニングアッセイ法を開発することができる。

【０３８２】
例えば、精製したｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧタンパク質（実施例４参照）および抗－ヒトＩＬ－２ｍＡｂを５０μｌのＰＢＳ中、９６穴マイクロタイターのウエルに同時に被覆

した。組換えＴ細胞から直線的応答を引き出すために必要なｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－ＩｇＧの量は実験的に決定する。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）１００μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地１００μｌを容れた。次いで、Ｅ１１ ＴＣＲ Ｔ細胞形質導入体（培地１００μｌ中１×１０^{5} 細胞）を加えた。１０％CO_2下、３７℃で８時間インキュベーションした後、細胞を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄した。ビオチン化抗－ＩＬ－２ｍＡｂ（１０％ＦＢＳ含有ＰＢＳ１００μｌ中１００ｎｇ）を各ウエルに加えた。４℃で一夜インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、１０％ＦＢＳ－ＰＢＳ１００μｌ中のアビジンペルオキシダーゼ２５０ｎｇを各ウエルに加えた。３７℃３０分後、ウエルを洗い、ＴＭＢ基質１００μｌを加えた。基質反応を０．１８Ｍ硫酸で停止させ、吸光度を４５０ｎｍで読み取った。ＭＨＣ／ペプチド複合体と組換えＴＣＲ間の相互作用に拮抗する化合物の能力は、Ｔ細胞形質導入体が培地に分泌したサイトカイン量の低下として測定する。Ｔ細胞を刺激するＭＨＣ／ペプチド複合体の代わりに抗－ＴＣＲ Ａｂを用いるアッセイは、阻害性化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド複合体の相互作用に拮抗することにより作用するのか、または異なるメカニズムにより作用するのか、を決定するために実施する。ＭＨＣ／ペプチド複合体によるＴ細胞刺激は阻害するが、抗－ＴＣＲ抗体による刺激は阻害しない化合物は、リード（手掛かりとなる）化合物として追求し得る。

【０３８３】

実施例１４：ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を調節する化合物を同定するためのモデル細胞に基づくスクリーニング法の開発

本実施例では、ＴＣＲとＭＨＣ抗原分子との相互作用を特異的に調節するアゴニストおよびアンタゴニストについて化学ライブラリーをスクリーニングするための、細胞に基づくモデルとなるスクリーニングシステムにつき記載する。このモデルは２種以上の異なる抗原特異Ｔ細胞レセプターをその表面に発現する不死化Ｔ細胞株（例えば、Ｔ細胞ハイブリドーマ）に基づいている。例えば、当該Ｔ細胞はその内在性ＴＣＲおよびユニーク抗原特異性をもつ組換え一本鎖ＴＣＲをも発現し得た。スクリーニングアッセイの目標は、ＴＣＲの一つについて、他のＴＣＲと比較して、ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を増強（アゴニスト）するか、または減弱（アンタゴニスト）する際に分別作用を示す化合物を同定することである。これらの細胞は、上記の固定化ＭＨＣ／ペプチド分子（例えば、一本鎖単量体、ＩｇＧまたはＩｇＭ）を予め被覆したウエルによるプレートアッセイに使用する。ＭＨＣ／ペプチドはＴ細胞によるＩＬ－２分泌を刺激する。化合物は、Ｔ細胞によるＩＬ－２分泌を増強するか、または阻害するその能力について選抜する。ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド複合体との間の相互作用は一般に弱く、またＩＬ－２の産生／分泌過程には多くのステップがあるために、多くの化合物の同定は、ＩＬ－２産生の低下により証明されるように、Ｔ細胞刺激に（特異的に、また非特異的に）干渉する化合物について予測する。ユニーク標的に特異的な２つのＴＣＲを発現するＴ細胞の使用は、非特異的（ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチドとは関係のない）メカニズムによりＴ細胞刺激を阻害する化合物に対し内部コントロールを提供することにより、スクリーニング過程を容易なものとする。例えば、選抜すべき化合物の多くは、必ずしもＴＣＲとＭＨＣ／ペプチドとの相互作用の時点ではなく、恐らくＴＣＲが引き金を引いた後のシグナル伝達経路に沿う時点で、ＩＬ－２産生を遮断する。一般的な細胞毒性の影響をもつ化合物もまたＩＬ－２産生を遮断する。異なるＭＨＣ／ペプチド複合体での刺激の試験によると、二重のＴＣＲ細胞株は、阻害化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用に干渉することで作用するのか、またはＩＬ－２産生／分泌過程のある他の時点で作用するのかを決定する上で非常に有用である。

【０３８４】

この実施例のために、内在性２Ｂ４ＴＣＲおよび組換えＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲを発現するモデル細胞株を実施例７記載のように生成させた。２Ｂ４およびＤＯ１１．１０ＴＣＲを介しての刺激に対するＴ細胞株の応答性を評価するために、該細胞を、ペプチドパルスした抗原提示細胞（ＡＰＣ）を収容するウエル中でインキュベートした。例えば、２Ｂ

４形質導入体をＯＶＡまたはＰＣＣでパルスしたＡ２０（ＩＡ^{d}）細胞とともに、またはＯＶＡまたはＰＣＣでパルスしたＣＨ１２（ＩＥ^{k}）細胞とともにインキュベートした。これらの実験結果（図１７Ａおよび図１７Ｂ）は、２Ｂ４形質導入体と野生型２Ｂ４細胞がＰＣＣでパルスしたＣＨ１２細胞には応答するが、ＯＶＡでパルスしたＣＨ１２細胞またはＰＣＣでパルスしたＡ２０には応答しないことを示した。しかし、ＯＶＡでパルスしたＡ２０細胞の存在下では、２Ｂ４形質導入体が応答し、ＩＬ－２を産生したが、野生型の２Ｂ４細胞は非応答性であった。これらのデータが示唆することは、Ｔ細胞は少なくとも２種類の機能的に識別可能な抗原特異ＴＣＲを発現するように設計調製することができるということである。次の実験は、これらの２Ｂ４形質導入体が固定化したＭＨＣ／ペプチド分子に応答性を示すか、試験することであった。これらの検討を進める理論的根拠は実施例１０で説明し、その結果を実施例１１に示す。

【０３８５】

モデルアッセイシステムは、ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲと固定化したｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡとの相互作用を遮断する化合物を同定するために開発する。ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ２Ｂ４形質導入体を用いるアッセイは、実施例１１に記載のように実施する。ＤＯ１１．１０ＴＣＲとＩＡ^{d}／ＯＶＡとの相互作用を遮断することにより細胞の刺激を阻害することのできる化合物は、従って、同じＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ２Ｂ４形質導入体と固定化したｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣを用いて刺激アッセイにより選抜する。２Ｂ４ＴＣＲとｓｃＩＥ^{k}／ＰＣＣとの連結が細胞刺激に至る場合には、インヒビター化合物は恐らくＤＯ１１．１０ＴＣＲとｓｃＩＡ^{d}／ＯＶＡとの相互作用の特異的遮断を標的とすることにより作用する。しかし、細胞刺激の阻害が、使用したＭＨＣ／ペプチド複合体とは無関係であることが判明した場合には、当該化合物は恐らくＴ細胞刺激の非特異的インヒビターとして分類されよう。

【０３８６】

長期目標は、異なるＭＨＣファミリーにより限定される２種以上のＴＣＲで再構築した一つの細胞株を創生することである。この手法の利点は、各スクリーニング実験内で複数の細胞株を取り扱い、処理する煩雑さが除かれるということである。

【０３８７】

実施例１５：ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用のインヒビター同定用細胞表面レセプターに基づく検出アッセイ法の開発

多価ＭＨＣ／ペプチド複合体とＴＣＲを用い、その表面に同族体レセプターを担持する細胞を蛍光染色した（Ａｌｔｍａｎ Ｊ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７４：９４－９６）。例えば、Ｔ細胞ハイブリドーマは多量体ｓｃ－クラスＩＩ－Ｉｇ分子を用いて特異的に染色することができる。本研究において、ＧＤ１２またはＤＯ１１．１０Ｔ細胞ハイブリドーマ（５×１０^{5}細胞／ウエル）を１０μｇ／ウエルのｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－Ｉｇ分子とともに３７℃で一夜インキュベートした。ＧＤ１２ＴＣＲはＩＡ^{d}との関連でｇＤ２４６－２６１ペプチドに特異的であり、一方、ＤＯ１１．１０ＴＣＲはＩＡ^{d}との関連でＯＶＡ３２３－３３９ペプチドに特異的である。一夜インキュベーションした後、細胞をＰＢＳで洗い、抗－マウスＩｇＧ２ｂｍＡｂ－ビオチンおよびストレプトアビジン－サイクローム（Ｃｙｃｈｒｏｍｅ）と４℃で１時間インキュベートした。次いで、細胞をＰＢＳ、１％ホルムアルデヒド含有ＰＢＳ、およびＰＢＳで洗浄した。染色した細胞のフローサイトメトリーは、ｓｃＩＡ^{d}／ＧＤ－Ｉｇ分子がＧＤ１２Ｔ細胞ハイブリドーマを特異的に染色すること、しかし、ＤＯ１１．１０Ｔ細胞は染色し得なかったことを示した（図２０）。抗－マウスＩｇＧ２ｂｍＡｂ－ビオチンおよびストレプトアビジン－サイクロームのみとインキュベートしたＧＤ１２Ｔ細胞では、細胞染色を観察しなかった。これらの結果は、本アッセイが多価ＭＨＣ／ペプチド複合体をプローブとして使用して、細胞表面ＴＣＲを検出し得ることを証明している。

【０３８８】

Ｔ細胞表面上の抗原を検出するための単一プレート基準細胞ＥＬＩＳＡについては、文献にも記載されている（参照：Ｇｒｕｎｏｗ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｉｍ

ｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １７１：９３－１０２）。これらのアッセイ法ではモノクローナル抗体の結合を検出したが、同様のアッセイフォーマットを、多価ＭＨＣ／ペプチド複合体と細胞表面ＴＣＲとの相互作用を阻害する化合物を検出するために開発し得た。例えば、ＧＤ１２Ｔ細胞をポリリジン被覆９６穴マイクロタイタープレートの増殖培地に加える。プレートを１０％CO_2下に３７℃でインキュベートし、Ｔ細胞ハイブリドーマが被覆ウエルに接着するようにする。多価ｓｃＩＡ^d／ＧＤ－Ｉｇ分子を試験化合物（またはコントロールとしての希釈化合物）とともに細胞に加える。インキュベーション後、未結合ｓｃＩＡ^d／ＧＤ－Ｉｇ分子を除き、接着細胞を洗浄する。様々な市販入手可能なプローブ、例えば、酵素結合および蛍光色素結合抗体などを使用し、ｓｃＩＡ^d／ＧＤ－Ｉｇ分子とＧＤ１２ＴＣＲ間の相互作用を示すことが可能であった。例えば、抗－ＩｇＧ２ｂｍＡｂ－ＨＰＲプローブを添加して、ＴＣＲ－結合ｓｃＩＡ^d／ＧＤ－Ｉｇ分子を検出することができる。未結合の抗体を除去し、ウエルをＴＭＢ基質とインキュベートし、ＴＣＲ：ｓｃＩＡ^d／ＧＤ－Ｉｇ：抗－ＩｇＧ２ｂｍＡｂ－ＨＰＲ複合体を検出する。発色後、１Ｍ硫酸で反応を停止し、４５０ｎｍでの吸光度を測定する。最初の検討では、Ｔ細胞の適当な数、およびＭＨＣ／ペプチド－ＴＣＲ相互作用の良好な感度の直線性検出に必要な多価ｓｃ－クラスＩＩ－Ｉｇ分子の量と開示抗体プローブの量を決定する。コントロール実験は、異なるＭＨＣ多量体、例えば、ｓｃＩＡ^d／ＯＶＡ－ＩｇなどをｓｃＩＡ^d／ＧＤ－Ｉｇの代わりに加え、アッセイのバックグランドを確立する。特異的ＭＨＣ／ペプチド－ＴＣＲ相互作用を阻害する試験化合物の能力はシグナルの減損として測定する。例えば、細胞表面ＧＤ１２ＴＣＲとｓｃＩＡ^d／ＧＤ－Ｉｇ多量体間の相互作用を阻害する試験化合物は、希釈化合物と当該細胞とＭＨＣ／ペプチドプローブとを含むコントロールウエルにて観察されるよりも、吸光度の読み取り値が低くなる。阻害化合物の特異性は、従って、異なるＴＣＲとその対応する多価ＭＨＣ／ペプチドプローブを担持する細胞を用いて、他の細胞に基づくＥＬＩＳＡにて検討することができた。

【０３８９】

実施例１６：ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を増強および阻害する化合物を同定するためのタンパク質に基づくスクリーニング方法の開発

本実施例の目標は、組換えＴＣＲとＭＨＣ抗原試薬を用いて、タンパク質－タンパク質結合アッセイ法を開発することであった。タンパク質に基づくアッセイ法を確立することによって、高速大量処理スクリーニング法が開発され、標的のＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を直接増強または低下させる化合物の同定が可能となった。かかるスクリーニングアッセイ法の利点は、細胞に基づくアッセイ法に比べて、細胞毒性であるか、または非特異的細胞性応答に影響するものとして検出される「擬陽性」化合物の数を減少させることである。ここで採られる手法は、精製組換えＴＣＲとＭＨＣ抗原複合体を用いて、ＥＬＩＳＡフォーマットを確立するためのものであった。

【０３９０】

簡単に説明すると、２６４ＴＣＲ（野生型ヒト腫瘍サプレッサータンパク質ｐ５３から分離され、ＨＬＡ－２によって制限されているペプチドフラグメント２６４～２７２）をエンコードするｃＤＮＡはリンダ・シャーマン（Ｌｉｎｄａ Ｓｈｅｒｍａｎ）博士（スクリップス（Ｓｃｒｉｐｐｓ）研究所、ラホーラ、カリフォルニア）から提供頂いた。Ｖα３．１およびＶβ３．０遺伝子の増幅は、係属中の米国特許出願番号０８／８１３，７３１（バクテリオファージコートタンパク質および一本鎖Ｔ細胞レセプターを含んでなる融合タンパク質）および０８／９４３，０８６（一本鎖Ｔ細胞レセプターおよび免疫グロブリン軽鎖定常領域を含んでなる融合タンパク質）に記載のとおりに実施したが、使用したオリゴヌクレオチドは２６４ＴＣＲに特異的なものであった。３－ドメインｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質としての２６４ＴＣＲのクローニングは、ＤＯ１１．１０ＴＣＲについて記載されている方法と同様に実施した（上記係属中の米国特許出願参照）。２６４ｓｃＴＣＲカッパ融合ベクターは、培地中可溶性タンパク質発現用ＣＨＯ細胞に形質導入した。次いで、２６４ｓｃＴＣＲタンパク質は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により確認しながら、アフィニティカラム上均一となるまで精製した。

【０３９１】
別に、ＨＬＡ－Ａ２およびベーター２－ミクログロブリン分子の調製に使用するベクターシステムは、ジョン・アルトマン（Ｊｏｈｎ Ａｌｔｍａｎ）博士（エモリー大学、アトランタ、ジョージア）に提供頂いたが、これらについてはアルトマンらが記載している（Ａｌｔｍａｎ，Ｊ．Ｄ．，Ｐ．Ａ．Ｈ．Ｍｏｓｓ，Ｐ．Ｊ．Ｒ．Ｇｏｕｌｄｅｒ，Ｄ．Ｈ．Ｂａｒｏｕｃｈ，Ｍ．Ｇ．ＭｃＨｅｙｚｅｒ－Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｊ．Ｉ．Ｂｅｌｌ，Ａ．Ｊ．ＭｃＭｉｃｈａｅｌ＆Ｍ．Ｍ．Ｄａｖｉｓ．１９９６．Ｓｃｉｅｎｃｅ２７４：９４－９６）。対象となるペプチドを負荷したＨＬＡ－Ａ２分子を調製するために、マーク・デービス（Ｍａｒｋ Ｄａｖｉｓ）博士（スタンフォード大学、パロアルト、カリフォルニア）によるプロトコールに従い、機能的分子を形成した（参照文献：Ａｌｔｍａｎ ｅｔ ａｌ．１９９６．Ｓｃｉｅｎｃｅ２７４：９４－９６）。正しく折りたたまれたペプチド／ＨＬＡ－Ａ２複合体を、５０ｋＤに移動した単一ピークとしてセファデックス－２００サイズ排除カラムにより単離した。次いで、このタンパク質複合体をビオチンリガーゼ（アビディティ（Ａｖｉｄｉｔｙ）、デンバー、コロラド）によりビオチン化し、Ｃ－末端ＢｉｒＡ配列に１個のビオチン部分を付着させた。ビオチン化Ａ２複合体はストレプトアビジンにより多量体化したが、ストレプトアビジンは１分子当たり４個までのビオチン残基を結合させることのできるビオチン特異タンパク質である。ＨＬＡ－Ａ２とストレプトアビジンタンパク質をそれぞれ４：１のモル比で用いて、四量体のＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体を生成させた。（単量体に比較して）四量体を使用することの利点は、ＴＣＲとの相互作用に際して四量体が発揮する結合活性がより大きいことである。この事実を支持するものとして、ＢＩＡコア装置を用いてのタンパク質結合の研究は、可溶性四量体ＨＬＡ－Ａ２／２６４ペプチド複合体が、単量体ＨＬＡ－Ａ２／２６４ペプチド複合体よりも、相当に強く、固定化２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質に結合することを示した。

【０３９２】
これらの知見に基づき、ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を証明するために、ＨＬＡ－Ａ２／２６４ペプチド四量体技法を用いてＥＬＩＳＡを開発した。このアッセイでは、２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質を、２、１および０．５μｇ／ウエルの量で９６穴プレートに被覆した。次いで、プレートを洗浄し、２６４／ＨＬＡ－Ａ２四量体でプローブした。結果を図２１に示すが、この結果は、２６４ペプチドを含むが、１４９ペプチドは含まないＨＬＡ－Ａ２四量体が、ペプチドに特異的な様式で、固定化した２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパタンパク質に結合したことを示唆している。この研究は、ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド分子の相互作用を検出するために、タンパク質に基づくＥＬＩＳＡを使用するための「原理の証明」を立証している。ここに記載した結果は、このアッセイフォーマットを他のＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド対に適用して、高速大量処理スクリーニング方法によるアゴニストおよびアンタゴニスト化合物を同定するタンパク質に基づくアッセイ手技を確立し得ることを示唆している。

【０３９３】
例えば、精製した２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質を、５０μｌのＰＢＳ中、９６穴マイクロタイターのウエルに被覆する。直線的応答を引き出すために必要な２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質の量は実験的に決定する。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）５０μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地５０μｌを容れる。次いで、ＨＬＡ－Ａ２／２６４四量体（５０μｌ培地中）を加える。室温で３０分間インキュベーションした後、タンパク質溶液を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄する。ウサギ抗－ストレプトアビジン抗血清を各ウエルに加える。室温で２０分間インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、ＨＲＰに接合したヤギ抗－ウサギＩｇ抗血清を加える。室温３０分後、ウエルを洗浄し、ＡＢＴＳ基質を加える。基質反応を発色させ、４０５ｎｍでの吸光度を読み取る。吸光度読み取り値は２６４ｓｃＴＣＲ被覆ウエルに結合したＨＬＡ－Ａ２／２６４ペプチド四量体の量と相関する。

【０３９４】
ＭＨＣ／ペプチド複合体と組換えＴＣＲ間の相互作用に拮抗する化合物の能力は、４０５ｎｍでの吸光度の読み取り値の低下として測定する。ＭＨＣ／ペプチド複合体の代わりに抗－ＴＣＲ Ａｂを用いたときのアッセイは、阻害化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド複合体相互作用に拮抗することにより作用するのか、またはタンパク質：タンパク質相互作用の一般的な阻害を介して作用するのかを決定するために実施する。ＭＨＣ／ペプチド複合体の結合を阻害するが、抗－ＴＣＲ抗体の結合は変えない化合物は、リード（手掛かりとなる）化合物として追求し得る。ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド分子の他の対を用いるアッセイは、阻害化合物の特異性を決定するために実施する。

【０３９５】
ＭＨＣ／ペプチド複合体と組換えＴＣＲ間の相互作用を増大させる化合物の能力は、４０５ｎｍでの吸光度読み取り値の増加として測定する。上記のように、ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド分子又は抗－ＴＣＲ抗体の他の対を用いるアッセイは、刺激性化合物の特異性を決定するために実施する。ＨＬＡ－Ａ２／ｐ５３ ２６４－２７２ペプチド複合体は腫瘍抗原でもあるので、ＴＣＲとこの抗原との相互作用を特異的に刺激する化合物は、治療用抗癌剤の開発に有用であることが分かる。当該ペプチドが感染性病原から誘導したものである場合に、ＴＣＲとＭＨＣ抗原複合体間の特異的相互作用を刺激する化合物を同定するために、同様のスクリーニング方法を開発することができた。かかる方法の最終ゴールは、抗感染剤を単離することである。

【０３９６】
実施例１７：ヒト自己免疫疾患と関連するＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を阻害する化合物を同定するためのタンパク質に基づくスクリーニング方法の開発
本実施例の目標は、ヒト自己免疫疾患と関連する組換えヒトＴＣＲおよびヒトＭＨＣ抗原試薬を用いて、タンパク質－タンパク質結合アッセイ法を開発することであった。タンパク質に基づくアッセイ法を確立することによって、自己免疫ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用に直接拮抗する化合物を同定するために、高速大量処理選抜法を開発することができた。これらの化合物は潜在的に選択的免疫抑制剤の開発につながる可能性を秘めている。

【０３９７】
Ｅ１１ヒトＴ細胞クローンから誘導されるＴＣＲは、哺乳動物細胞において組換え３－ドメイン一本鎖可溶性ＴＣＲとして発現される。適切な発現ベクターの構築、哺乳動物細胞の形質導入と選択、およびｓｃＴＣＲの産生と精製に使用する方法については、実施例６および以下の文献に記載されている：Ｗｅｉｄａｎｚ，ｅｔａｌ．１９９８．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２２１：５９；米国特許出願番号０８／８１３，７３１および０８／９４３，０８６。

【０３９８】
自己免疫ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を証明するために、Ｅ１１ｓｃＴＣＲとｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－Ｉｇ（実施例４参照）を用い、ＥＬＩＳＡを開発することができた。このアッセイ法においては、Ｅ１１ｓｃＴＣＲタンパク質を９６穴プレートに被覆する。次いで、プレートを洗浄し、ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－Ｉｇでプローブする。洗浄工程に続いて、結合したｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－Ｉｇをヤギ抗－ヒトＩｇＧ－ＨＲＰでプローブし、ＴＭＢ基質での発色により検出する。４５０ｎｍでの吸光度にて、Ｅ１１ｓｃＴＣＲ被覆ウエルに結合したｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－Ｉｇの量を決定する。本研究は自己免疫ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチドの相互作用を検出するために、タンパク質に基づくＥＬＩＳＡを使用することについて「原理の証明」を立証しており、高速大量処理スクリーニング方法によるアンタゴニスト化合物を同定するタンパク質に基づくアッセイ手技を確立する。

【０３９９】
例えば、精製したＥ１１ｓｃＴＣＲタンパク質を５０μｌのＰＢＳ中、９６穴マイクロタイターのウエルに被覆する。直線的応答を引き起こすために必要なＥ１１ｓｃＴＣＲ融合タンパク質の量は実験的に決定する。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％

ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）５０μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地５０μｌを容れる。次いで、ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－Ｉｇ（５０μｌ培地中）を加える。室温でインキュベーションした後、タンパク質溶液を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄する。ＨＲＰに接合したヤギ抗－ヒトＩｇ抗血清を加える。室温３０分後、ウエルを洗浄し、ＴＭＢ基質を加える。基質反応を０．１８Ｍ硫酸で停止させ、４５０ｎｍでの吸光度を読み取る。吸光度読み取り値は、Ｅ１１ｓｃＴＣＲ被覆ウエルに結合したｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－Ｉｇの量と相関する。

【０４００】

ＭＨＣ／ペプチド複合体と組換えＴＣＲ間の相互作用に拮抗する化合物の能力は、４５０ｎｍでの吸光度読み取り値の低下として測定する。ＭＨＣ／ペプチド複合体の代わりに抗－ＴＣＲ Ａｂを用いたときのアッセイは、阻害化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド複合体相互作用に拮抗することにより作用するのか、またはタンパク質：タンパク質相互作用の一般的な阻害を介して作用するのかを決定するために実施する。ＭＨＣ／ペプチド複合体の結合を阻害するが、抗－ＴＣＲ抗体の結合は変えない化合物はリード（手掛かりとなる）化合物として追求し得る。ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド分子の他の対を用いるアッセイは、阻害化合物の特異性を決定するために実施する。自己免疫ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ／ペプチド複合体との相互作用を特異的に阻害する化合物は、治療用免疫抑制剤の開発に有用であることが分かる。

【０４０１】

実施例１８：ヒト自己免疫疾患と関連するＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を阻害する化合物を同定するための均一系スクリーニング方法の開発

本実施例の目標は、ヒト自己免疫疾患と関連する組換えヒトＴＣＲおよびヒトＭＨＣ／ペプチド試薬を用いて、タンパク質－タンパク質結合均一系アッセイ法を開発することにあった。均一系アッセイが有利な点は、未結合成分の分離を要しないこと、あるいは洗浄工程を必要としないことである。数多くの異なるシステムが均一系アッセイを、細胞に基づくアッセイまたはタンパク質に基づくアッセイとして実施することを可能にしている。

【０４０２】

本実施例に記載したアッセイフォーマットでは、特殊化したビーズまたは微粒子を採用する。ビーズに基づく試薬は広範なフォーマットで市販品として入手可能であり、例えば、組換えタンパク質の高い受容能力をもつ結合／捕捉、効率的な検出、および異なる分離法と均一系アッセイ方法の使用が可能となる。多くの高速大量処理スクリーニング方法にとって、ビーズに基づく試薬は有利である。

【０４０３】

例えば、アルファスクリーン試薬（パッカード（Ｐａｃｋａｒｄ）バイオサイエンス）に基づく均一系発光近接アッセイは、自己免疫ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を証明するために、Ｅ１１ＴＣＲおよびＤＲ２／ＭＢＰ分子を用いて開発することができる。このアッセイフォーマットにおいては、２個の小ビーズをＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド複合体で標識し、ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用により接近させる。レーザー光励起により、「ドナー（供与体）」ビーズが化学信号を発するが、これは「アクセプター（受容体）」ビーズが密に接近しなければ検出されない。ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用がビーズを会合させると、化学反応のカスケードが作用して著しく増幅されたシグナルを発生させる。このＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用がシグナルを発生させる能力を調節（増減）する能力について、化合物を試験することができる。

【０４０４】

Ｅ１１ヒトＴ細胞クローンから誘導したＴＣＲは、記載のように、哺乳動物細胞において組換え３－ドメイン一本鎖可溶性ＴＣＲとして発現される。実施例１および２に記載した方法を用いて、Ｅ１１ｓｃＴＣＲのＣ末端にｂｉｒＡ標的配列を包含させる。精製したＥ１１ｓｃＴＣＲタンパク質は、実施例１および２に記載のように、ビオチンリガーゼでビオチン化する。

【０４０５】
このアッセイ法では、Ｅ１１ｓｃＴＣＲ－ビオチンタンパク質をストレプトアビジン被覆ドナービーズに結合させる。ｓｃＤＲ２／ＭＢＰ－Ｉｇ（実施例４参照）は抗－ヒトＩｇＧ被覆アクセプタービーズに結合する。ビーズを混合し、Ｅ１１ｓｃＴＣＲタンパク質とｓｃＤＲ２／ＭＢＰ複合体間で会合させる。この相互作用はドナービーズとアクセプタービーズとを接近させ（＜２００ｎｍ）、光誘発化学反応を起こし、検出可能なシグナルを生成させる。ドナービーズとアクセプタービーズを最適に被覆し、タンパク質被覆ビーズ間の相互作用を可能とするのに必要な条件は、実験的に決定する。ドナービーズでの化学反応を６８０ｎｍの光で誘発する。近接アクセプタービーズへのエネルギー転移に続いて、発生するシグナルは５２０～６２０ｎｍで測定可能である。この測定は時間分解モードで実施し、アッセイにおける蛍光化合物のバックグランドの影響を最小とすることができる。本研究は自己免疫ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチドの相互作用を検出するために、均一系タンパク質に基づく均一アッセイを使用することについて「原理の証明」を立証しており、高速大量処理スクリーニング方法によるアンタゴニスト化合物を同定するための均一系アッセイ手技を確立する。

【０４０６】
例えば、Ｅ１１ｓｃＴＣＲドナービーズとｓｃＤＲ２／ＭＢＰアクセプタービーズとをマイクロタイターウエル中で混合し、検出可能なシグナルを発生させる。直線的応答を生じさせるために必要な反応条件は実験的に決定する。２．５％ジメチルスルホキシド含有媒体または２．５％ＤＭＳＯ中の試験化合物を含有する媒体をウエルに加える。６８０ｎｍでのレーザー励起に続いて、蛍光シグナルはアルファクエスト（ＡｌｐｈａＱｕｅｓｔ）ＨＳＴマイクロプレート・アナライザー（パッカード）を用い、時間分解モード（２０ｍ秒遅延）、５５０ｎｍで検出する。蛍光シグナルはＥ１１ｓｃＴＣＲドナービーズに結合したｓｃＤＲ２／ＭＢＰアクセプタービーズの量と相関する。

【０４０７】
ＭＨＣ／ペプチド複合体とＴＣＲとの相互作用に拮抗する化合物の能力は、５５０ｎｍでの蛍光シグナル量の減少として測定する。ＭＨＣ／ペプチド複合体の代わりに抗－ＴＣＲ　Ａｂを用いたときのアッセイは、阻害化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド複合体相互作用に拮抗することにより作用するのか、またはタンパク質：タンパク質相互作用の一般的な阻害を介して作用するのかを決定するために実施する。ＭＨＣ／ペプチド複合体の結合を阻害するが、抗－ＴＣＲ抗体の結合は変えない化合物はリード（手掛かりとなる）化合物として追求し得る。ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド分子の他の対を用いるアッセイは、阻害化合物の特異性を決定するために実施する。自己免疫ＴＣＲとその同族体ＭＨＣ／ペプチド複合体との相互作用を特異的に阻害する化合物は、治療用免疫抑制剤の開発に有用であることが分かる。

【０４０８】
実施例１９：ＴＣＲ：ＭＨＣ抗原相互作用を増強および阻害する化合物を同定するためのタンパク質に基づくスクリーニング方法の開発
本実施例の目標は、組換えＴＣＲとＭＨＣ抗原試薬を用いて、タンパク質－タンパク質結合アッセイ法を開発することであった。タンパク質に基づくアッセイ法を確立することによって、高速大量処理スクリーニング法が開発され、標的のＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を直接増強または低下させる化合物の同定が可能となった。かかるスクリーニングアッセイ法の利点は、細胞に基づくアッセイ法に比べて、細胞毒性であるか、または非特異的に細胞性応答に影響するものとして検出される「擬陽性」化合物の数を減少させることである。ここで採られる手法は、精製組換えＴＣＲとＭＨＣ抗原複合体を用いて、ＥＬＩＳＡフォーマットを確立するためのものであった。

【０４０９】
簡単に説明すると、２６４ＴＣＲ（野生型ヒト腫瘍サプレッサータンパク質ｐ５３から分離され、ＨＬＡ－Ａ２によって制限されているペプチドフラグメント２６４～２７２）をエンコードするｃＤＮＡはリンダ・シャーマン（Ｌｉｎｄａ　Ｓｈｅｒｍａｎ）博士（ス

クリップス（Ｓｃｒｉｐｐｓ）研究所、ラホーラ、カリフォルニア）から提供頂いた。Ｖα３．１およびＶβ３．０遺伝子の増幅は、係属中の米国特許出願番号０８／８１３，７３１（バクテリオファージコートタンパク質および一本鎖Ｔ細胞レセプターを含んでなる融合タンパク質）および０８／９４３，０８６（一本鎖Ｔ細胞レセプターおよび免疫グロブリン軽鎖定常領域を含んでなる融合タンパク質）に記載のとおりに実施したが、使用したオリゴヌクレオチドは２６４ＴＣＲに特異的なものであった。３－ドメインｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質としての２６４ＴＣＲのクローニングは、ＤＯ１１．１０ＴＣＲについて記載されている方法と同様に実施した（上記係属中の米国特許出願参照）。２６４ｓｃＴＣＲカッパ融合ベクターは、培地中可溶性タンパク質発現用ＣＨＯ細胞に形質導入した。次いで、２６４ｓｃＴＣＲタンパク質は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により確認しながら、アフィニティカラム上均一となるまで精製した。

【０４１０】

別に、ＨＬＡ－Ａ２およびベーター２－ミクログロブリン分子の調製に使用するベクターシステムは、ジョン・アルトマン（Ｊｏｈｎ Ａｌｔｍａｎ）博士（エモリー大学、アトランタ、ジョージア）に提供頂いたが、これらについてはアルトマンらが記載している（Ａｌｔｍａｎ，Ｊ．Ｄ．，Ｐ．Ａ．Ｈ．Ｍｏｓｓ，Ｐ．Ｊ．Ｒ．Ｇｏｕｌｄｅｒ，Ｄ．Ｈ．Ｂａｒｏｕｃｈ，Ｍ．Ｇ．ＭｃＨｅｙｚｅｒ－Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｊ．Ｉ．Ｂｅｌｌ，Ａ．Ｊ．ＭｃＭｉｃｈａｅｌ＆Ｍ．Ｍ．Ｄａｖｉｓ．１９９６．Ｓｃｉｅｎｃｅ２７４：９４－９６）。対象となるペプチドを負荷したＨＬＡ－Ａ２分子を調製するために、マーク・デービス（Ｍａｒｋ Ｄａｖｉｓ）博士（スタンフォード大学、パロアルト、カリフォルニア）によるプロトコールに従い、機能的分子を形成した（参照文献：Ａｌｔｍａｎ ｅｔ ａｌ．１９９６．Ｓｃｉｅｎｃｅ２７４：９４－９６）。正しく折りたたまれたペプチド／ＨＬＡ－Ａ２複合体を、５０ｋＤに移動した単一ピークとしてセファデックス－２００サイズ排除カラムにより単離した。次いで、このタンパク質複合体をビオチンリガーゼ（アビディティ、デンバー、コロラド）によりビオチン化し、Ｃ－末端ＢｉｒＡ配列に１個のビオチン部分を付着させた。ビオチン化Ａ２複合体はストレプトアビジンにより多量体化したが、ストレプトアビジンは１分子当たり４個までのビオチン残基を結合させることのできるビオチン特異タンパク質である。ＨＬＡ－Ａ２とストレプトアビジンタンパク質をそれぞれ４：１のモル比で用いて、四量体のＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体を生成させた。（単量体に比較して）四量体を使用することの利点は、ＴＣＲとの相互作用に際して四量体が発揮する結合活性がより大きいことである。この事実を支持するものとして、ＢＩＡコア装置を用いてのタンパク質結合の研究は、可溶性四量体ＨＬＡ－Ａ２／２６４ペプチド複合体が、単量体ＨＬＡ－Ａ２／２６４ペプチド複合体よりも、相当に強く、固定化２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質に結合することを示した。

【０４１１】

これらの知見に基づき、ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を証明するために、ＨＬＡ－Ａ２／２６４四量体技法を用いてＥＬＩＳＡを開発した。このアッセイでは、２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質を、２、１および０．５μｇ／ウエルの量で９６穴プレートに被覆した。次いで、プレートを洗浄し、２６４／ＨＬＡ－Ａ２四量体でプローブした。結果を図２１に示すが、この結果は、２６４ペプチドを含むが、１４９ペプチドは含まないＨＬＡ－Ａ２四量体が、ペプチドに特異的な様式で、固定化した２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパタンパク質に結合したことを示唆している。

【０４１２】

第二のＥＬＩＳＡはＨＬＡ－Ａ２／２６４またはＨＬＡ－Ａ２／１４９四量体技法を用いて開発した。本アッセイのために、四量体は上記のように調製したが、ただし、ビオチン化ＨＬＡ－Ａ２複合体はストレプトアビジンペルオキシダーゼ（カークガード・アンド・ペリー（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ａｎｄ Ｐｅｒｒｙ）ラボラトリーズ）を用いて多量体化し、ＨＬＡ－Ａ２／２６４－ＨＲＰまたはＨＬＡ－Ａ２／１４９－ＨＲＰ四量体を形成した。次いで、標識した四量体をプローブとして用い、プレート結合ＴＣＲを検出した。Ｔ

ＣＲを固定化するために、抗－ＴＣＲベータ定常ドメイン特異抗体Ｈ５７（ＢＤファーミンゲン）を５０μｌのＰＢＳ中、２５０ｎｇ／ウエルの量で、４℃で一夜のインキュベーションにより９６穴マイクロタイタープレートのウエルに被覆した。抗体を除去し、ウエルをＰＢＳ中１０％の血清で１時間ブロックした。ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液２００μｌで３回洗浄した。精製した２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質を１％血清含有ＰＢＳ５０μｌに加えた。室温で１時間後、ウエルを洗浄し、ＨＬＡ－Ａ２／２６４－ＨＲＰ（またはコントロールＨＬＡ－Ａ２／１４９－ＨＲＰ）四量体を１％血清含有ＰＢＳ５０μｌに加えた。室温で２時間後、ウエルを洗浄し、ＡＢＴＳ基質１００μｌを加え、２０分間発色させた。基質反応は４０５ｎｍの吸光度で読み取ったが、これはＴＣＲ融合タンパク質が結合した標識ＭＨＣ／ペプチドの量を表す。これらの検討結果は、２６４ｓｃＴＣＲとＨＬＡ－Ａ２／２６４－ＨＲＰプローブとの間に特異的相互作用のあることを示したが、２６４ＴＣＲとコントロールＨＬＡ－Ａ２／１４９－ＨＲＰプローブとの間には相互作用がなかった（図２２Ａおよび２２Ｂ）。直線応答を生じるために必要な２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質およびＨＬＡ－Ａ２．２６４－ＨＲＰプローブの量は、実験的に決定した。上昇する２６４ｓｃＴＣＲ濃度対上昇するＨＬＡ－Ａ２／２６４－ＨＲＰ濃度のマトリックス検討も実施し、応答の直線性範囲を決定した（図２３Ａおよび２３Ｂ）。もう一つの検討では、精製した２６４ｓｃＴＣＲ－ＩｇＧ１融合タンパク質と２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質との間の比較を行った。両方のタンパク質がその能力において同等であり、ＨＬＡ－Ａ２／２６４－ＨＲＰプローブと相互作用することが判明した（図２４Ａ～Ｄ）。

【０４１３】

これらの研究は、ＴＣＲおよびＭＨＣ／ペプチド分子の相互作用を検出するために、タンパク質に基づくＥＬＩＳＡを使用するための「原理の証明」を立証している。ここに記載したこれらの結果は、このアッセイフォーマットを他のＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド対に適用してタンパク質に基づくアッセイ手法を確立し、高速大量処理スクリーニング方法により、アゴニストおよびアンタゴニスト化合物を同定し得ることを示唆している。

【０４１４】

例えば、上記の２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ：ＨＬＡ－Ａ２／２６４－ＨＲＰ　ＥＬＩＳＡは、ＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド相互作用を阻害する化合物用に、化学ライブラリーを選抜するために使用した。この実験においては、ＨＬＡ－Ａ２／２６４－ＨＲＰプローブを２６４ｓｃＴＣＲ被覆ウエルに加えることにより、８０種の異なる化合物を５０μＭの濃度で個々に試験した。ＥＬＩＳＡは上に記載のとおりに実施した。ＥＬＩＳＡ反応を阻害する各化合物の能力を測定した。一つの化合物が基質反応を５０μＭで８０％まで阻害し、そのＩＤ$_{50}$が２μＭであることが判明した。これらの結果は、ＴＣＲとＭＨＣ抗原間の相互作用に拮抗する化合物の同定に、かかるタンパク質に基づくアッセイを用いる可能性を示している。

【０４１５】

もう一つの例において、精製した２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質は、ＰＢＳ５０μｌ中、９６穴マイクロタイターのウエルに被覆する。直線的応答を引き出すために必要な２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパ融合タンパク質の量は実験的に決定する。２４時間後に、被覆溶液を除き、ウエルに２．５％ジメチルスルホキシド含有培地（１０％ＦＢＳ含有ＩＭＤＭ）５０μｌまたは２．５％ＤＭＳＯ中に試験化合物を含む培地５０μｌを容れる。次いで、ＨＬＡ－Ａ２／２６４四量体（５０μｌ培地中）を加える。室温で３０分間インキュベーションした後、タンパク質溶液を除き、ウエルを１％トリトンＸ－１００含有トリス緩衝塩溶液で洗浄する。ウサギ抗－ストレプトアビジン抗血清を各ウエルに加える。室温で２０分間インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、ＨＲＰに接合したヤギ抗－ウサギＩｇ抗血清を加える。室温３０分後、ウエルを洗浄し、ＡＢＴＳ基質を加える。基質反応を発色させ、４０５ｎｍでの吸光度を読み取る。吸光度読み取り値は、２６４ｓｃＴＣＲ被覆ウエルに結合したＨＬＡ－Ａ２／２６４四量体の量と相関する。

【０４１６】

ＭＨＣ／ペプチド複合体と組換えＴＣＲとの相互作用に拮抗する化合物の能力は、４０５ｎｍでの吸光度読み取り値の減少として測定する。ＭＨＣ／ペプチド複合体の代わりに抗－ＴＣＲ Ａｂを用いたときのアッセイは、阻害化合物がＴＣＲ：ＭＨＣ／ペプチド複合体相互作用に拮抗することにより作用するのか、またはタンパク質：タンパク質相互作用の一般的な阻害を介して作用するのかを決定するために実施する。ＭＨＣ／ペプチド複合体の結合を阻害するが、抗－ＴＣＲ抗体の結合は変えない化合物はリード（手掛かりとなる）化合物として追求し得る。ＴＣＲとＭＨＣ／ペプチド分子の他の対を用いるアッセイは、阻害化合物の特異性を決定するために実施する。

【０４１７】

ＭＨＣ／ペプチド複合体と組換えＴＣＲとの相互作用を増大させる化合物の能力は、４０５ｎｍでの吸光度読み取り値の増加として測定する。上記のように、ＴＣＲおよびＭＨＣ／ペプチド分子または抗－ＴＣＲ抗体の他の対を使用するアッセイは、刺激性化合物の特異性を決定するために実施する。ＨＬＡ－Ａ２／ｐ５３ ２６４－２７２ペプチド複合体は腫瘍抗原でもあるので、ＴＣＲとこの抗原との相互作用を特異的に刺激する化合物は、治療用抗癌剤の開発に有用であることが分かる。当該ペプチドが感染性病原から誘導したものである場合のＴＣＲとＭＨＣ抗原複合体間の特異的相互作用を刺激する化合物を同定するために、同様のスクリーニング方法を開発することができた。かかる方法の最終ゴールは、抗感染剤を単離することである。

【０４１８】

本明細書に開示した文献はすべて本明細書中に参考として援用される。

本発明について具体的な態様に関連させて記載したが、本発明の改変および変動は、例えば、上記特許請求の範囲に定義した本発明の範囲から逸脱することなく構築することができる。

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１Ａ～Ｂは種々のＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）と同族体主要組織適合（ＭＨＣ）ペプチド複合体との間の相互作用を示す図面である。

【図２】

図２は試験化合物検出のための本発明の一方法を示す概略図である。この例では、小分子インヒビターがＴＲＣ／ＭＨＣ抗原相互作用を阻害し、不所望の免疫応答を遮断する一助となる。

【図３】

図３は自己免疫疾患を遮断する試験化合物検出のための特定タンパク質に基づく方法を示す概略図である。

【図４】

図４は自己免疫応答を遮断する試験化合物検出のための特定細胞に基づく方法を示す概略図である。

【図５】

図５ＡはＤＯ１１．１０ＴＣＲおよびｓｃ－ＩＡ^{d}／ＯＶＡ相互作用のインヒビターについて化学ライブラリーをスクリーニングする際の本発明の「原理証明」例を示す概略図である。

図５Ｂは高速大量処理スクリーニングフォーマットを使用してＤＯ１１．１０ＴＣＲおよびｓｃ－ＩＡ^{d}／ＯＶＡ相互作用のインヒビターを検出する際の、別の本発明「原理証明」例を示す概略図である。検出されるインヒビターは、内部コントロールと比較した吸光度の差により同定される。

【図６】

図６Ａは多発性硬化症（ＭＳ）を阻害する試験化合物を検出する方法の具体例を示す概略図である。

図６Ｂは高速大量処理スクリーニングを使用する試験化合物の具体的検出法を示す概略図である。この図において、該方法は多発性硬化症（ＭＳ）を阻害する分子の検出のために

最適化される。
【図７】
図７Ａ～ＣはＩＥ^{k}クローニングのために実施した工程を示す図面である。図７Ａ：種々のαおよびβ鎖フラグメントを含む遺伝的構築物。図７Ｂ：一本鎖ＩＥ^{k}分子の結合したペプチドとの構築。図７Ｃ：ＩＥ^{k}一本鎖を含む昆虫細胞発現ベクター。各図に使用した略号は図７Ｃに定義する。
【図８】
図８はｓｃ－ＩＡ^{d}－ＩｇＧ分子を還元型（レーン１～２）および非還元型（レーン３～４）で示すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。レーン５はタンパク質のサイズマーカーを示す。レーン番号は左から右への順で示す。
【図９】
図９はＤＯ１１．１０ｓｃ－ＴＣＲ－ＩｇＧ２ｂ融合を示すＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルの写真である。レーン１は抗体コントロールを示し、レーン２はＤＯ１１．１０ｓｃ－ＴＣＲ－ＩｇＧ２ｂ融合タンパク質を示す。
【図１０】
図１０は本発明の種々のＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合構築物を示す概略図である。
【図１１】
図１１は蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）実験の結果を示すグラフであり、種々のＤＯ１１．ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合構築物を発現するＢＷ５１４７形質移入体は抗－ＴＣＲ抗体プローブで染色した。
【図１２】
図１２Ａおよび１２ＢはＢＷＤＺ：ＣＤ４＋形質移入体のＦＡＣＳ特性を示す。図１２Ａ：ＦＡＣＳによる表面ＣＤ４発現の検出。図１２Ｂ：ＦＡＣＳによる表面ＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ発現の検出。
【図１３】
図１３はペプチド－パルス抗原提示細胞（ＡＰＣ）によるＢＷＤＺ：ＣＤ４＋細胞の刺激結果を示すグラフである。
【図１４】
図１４はＤＯ１１．１０Ｔ細胞刺激アッセイにおけるＩＬ－２産生阻害の結果を示すグラフである。
【図１５】
図１５Ａおよび１５Ｂは２種類の検出された試験化合物１８０Ｂ１０（図１５Ａ）および２９Ｄ１１（図１５Ｂ）の滴定結果を示すグラフである。
【図１６】
図１６は例示となる阻害化合物を示す図面である。
【図１７】
図１７Ａおよび１７ＢはペプチドーパルスＡＰＣによるＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ２Ｂ４形質移入体刺激の結果を示すグラフである。図１７ＡはＯＶＡペプチド負荷Ａ２０ＡＰＣを用いるＴ細胞刺激アッセイを示す。図１７ＢはＰＣＣペプチド負荷ＣＨ１２細胞を用いるＴ細胞刺激アッセイを示す。
【図１８】
図１８はＮＤＯＡＰＣによるＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ２Ｂ４形質移入体刺激の結果を示すグラフである。
【図１９】
図１９はＤＯ１１．１０ｓｃＴＣＲ－ＣＤ３ζ融合移入２Ｂ４　Ｔ細胞ハイブリドーマの刺激結果を示すグラフである。
【図２０】
図２０は多価ＭＨＣ／ペプチド分子を用いるＴ細胞染色を説明するグラフである。
【図２１】
図２１はＨＬＡ－Ａ２／２６４ペプチドと２６４ｓｃ－ＴＣＲ－カッパの相互作用に対す

るＥＬＩＳＡ値を示すグラフである。
【図２２】
図２２Ａはタンパク質に基づくＥＬＩＳＡアッセイの応答特異性を示す表である。この情報をグラフ化して図２２Ｂに示す。
【図２３】
図２３Ａはタンパク質ＥＬＩＳＡにおける濃度依存性を示す表である。この情報をグラフ化して図２３Ｂに示す。
【図２４】
図２４Ａおよび２４Ｂは、タンパク質ＥＬＩＳＡにおいて異なるＴＣＲ試薬の比較を示すグラフである。グラフ中の情報を図２４Ｃおよび２４Ｄにそれぞれ示す。

【図１】

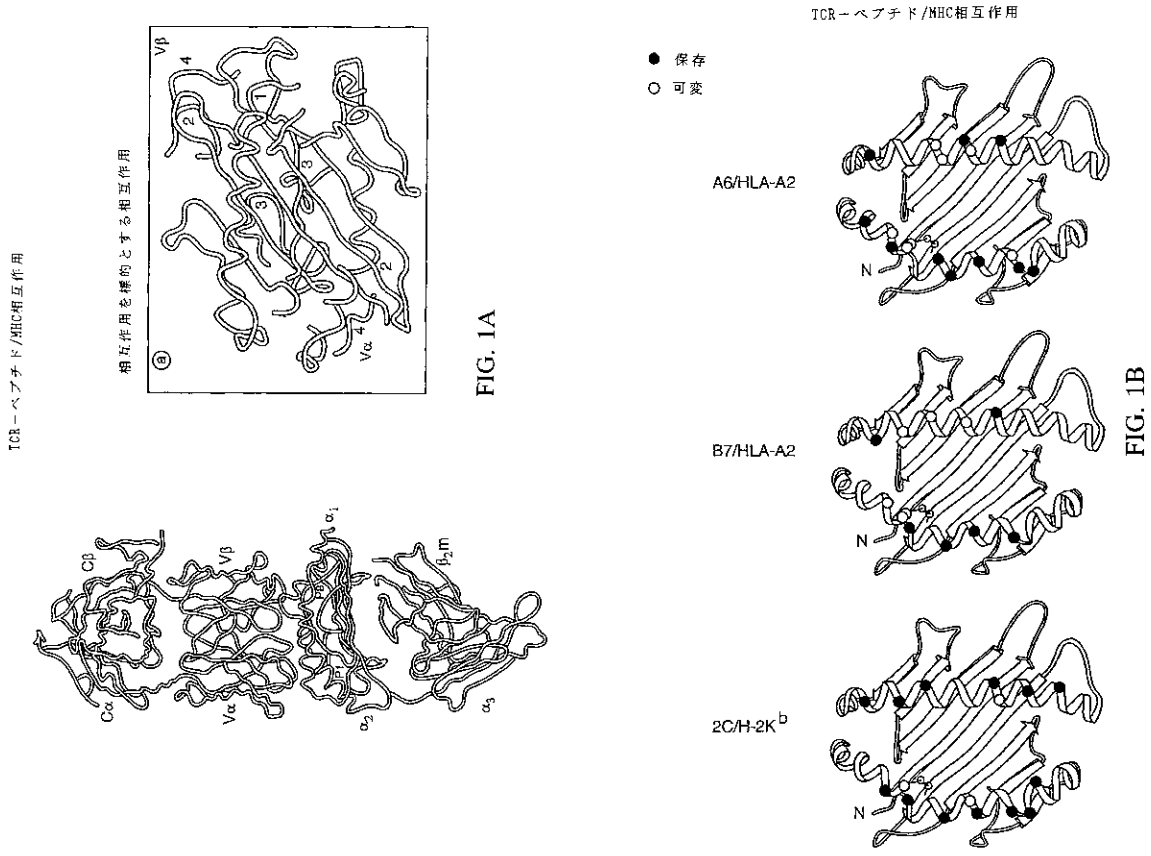


FIG. 1A

FIG. 1B

【図２】

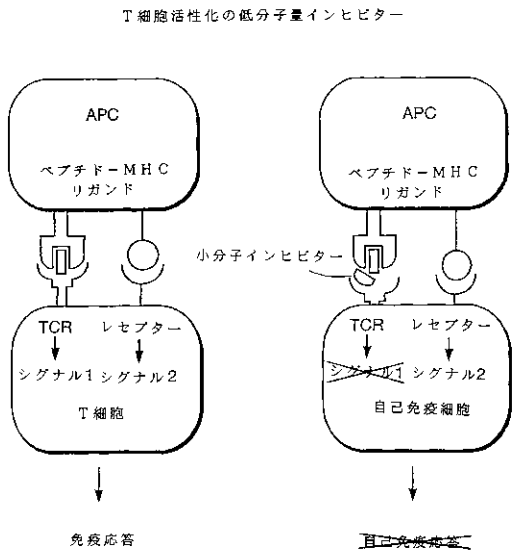


FIG. 2

【図３】

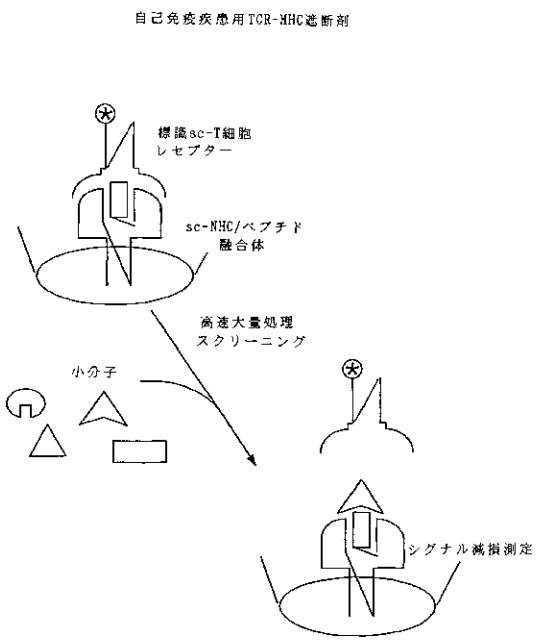


FIG. 3

【図４】

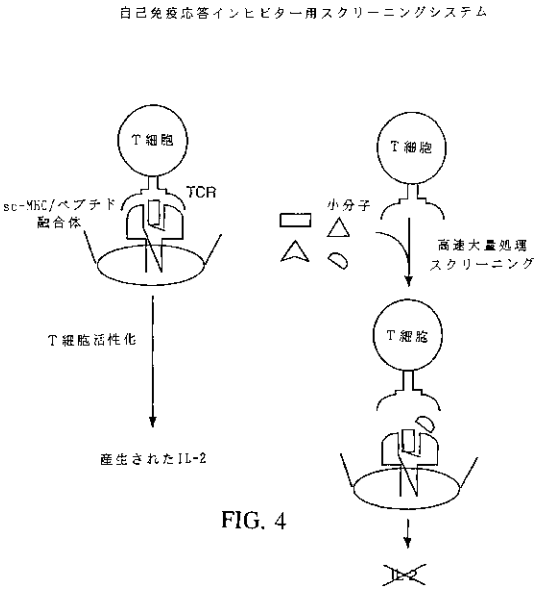


FIG. 4

【図５】

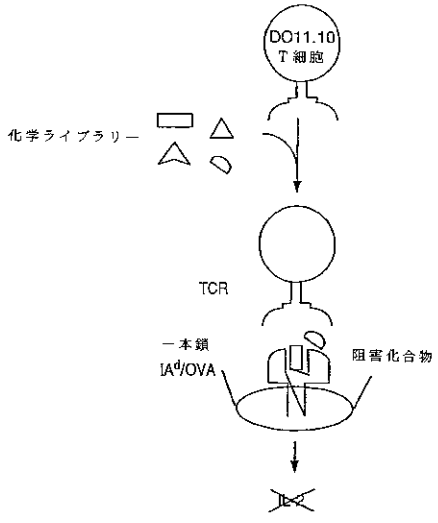


FIG. 5A

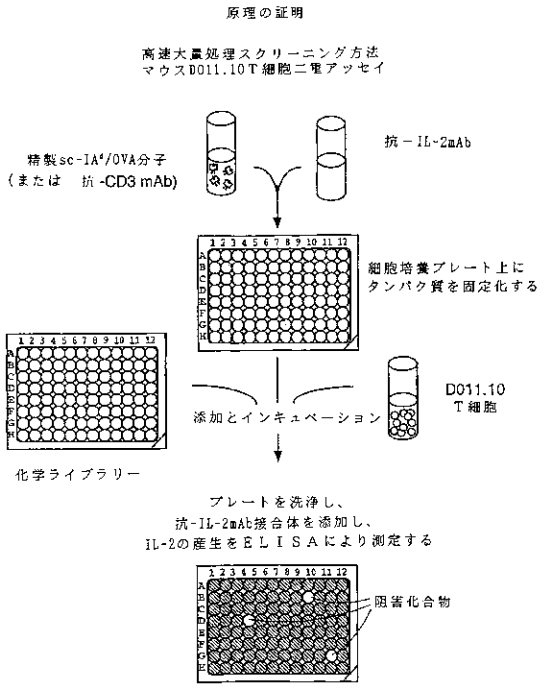


FIG. 5B

【図６】

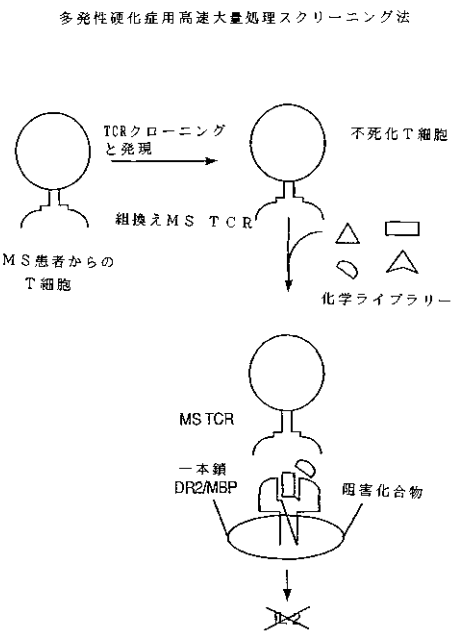


FIG. 6A

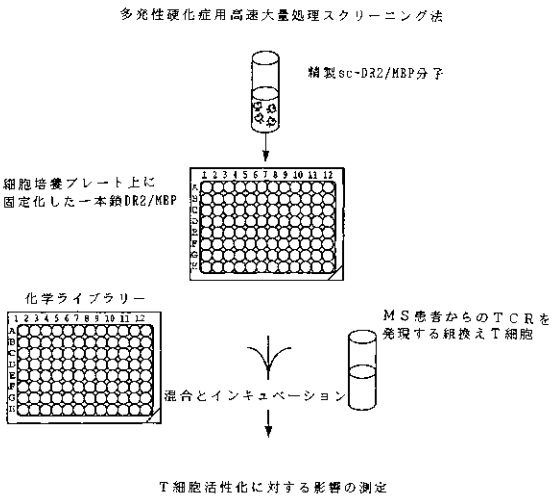


FIG. 6B

【図７】

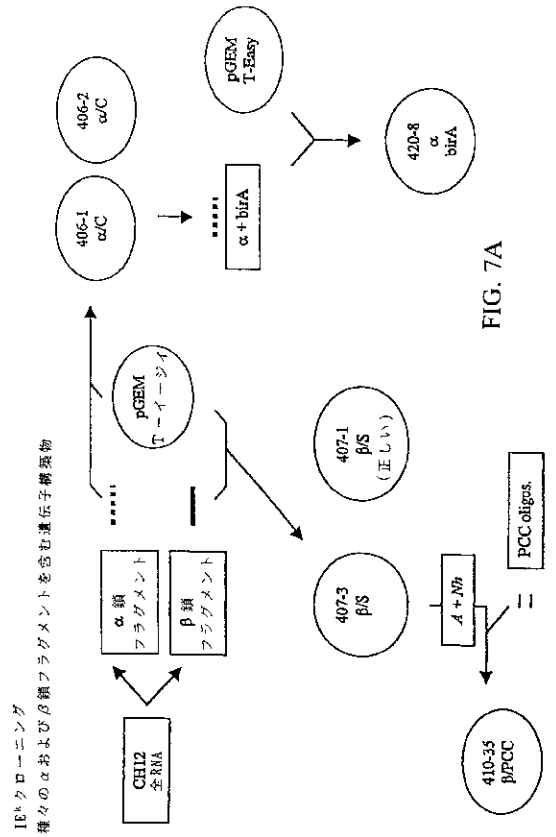


FIG. 7A

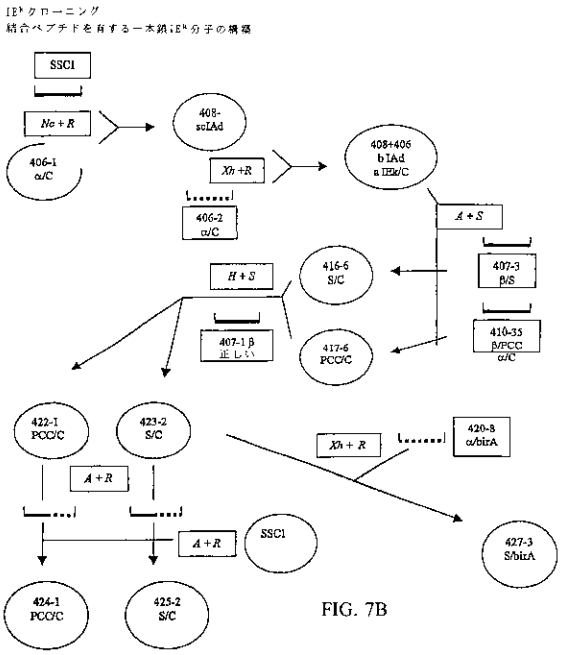


FIG. 7B

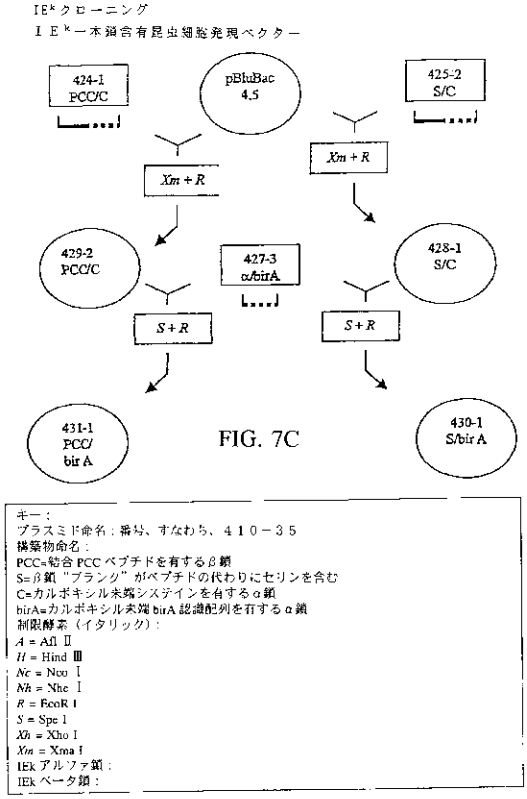


FIG. 7C

【図８】

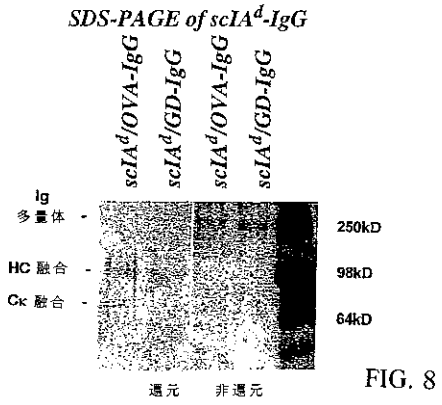


FIG. 8

【図９】

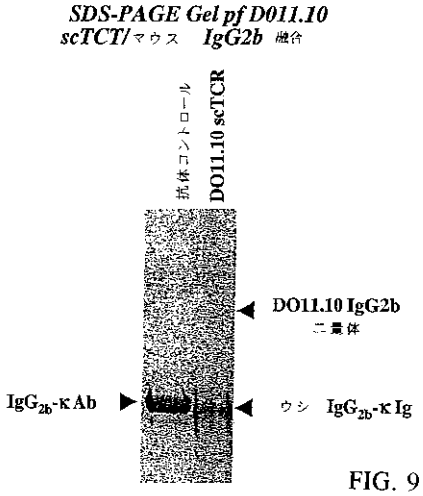


FIG. 9

【図１０】

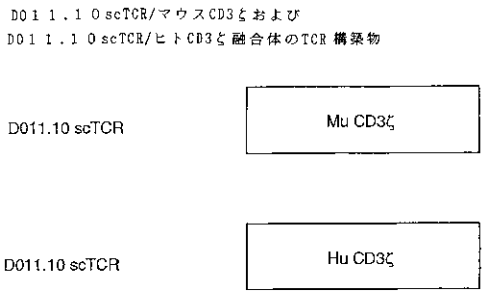


FIG. 10

【図１１】

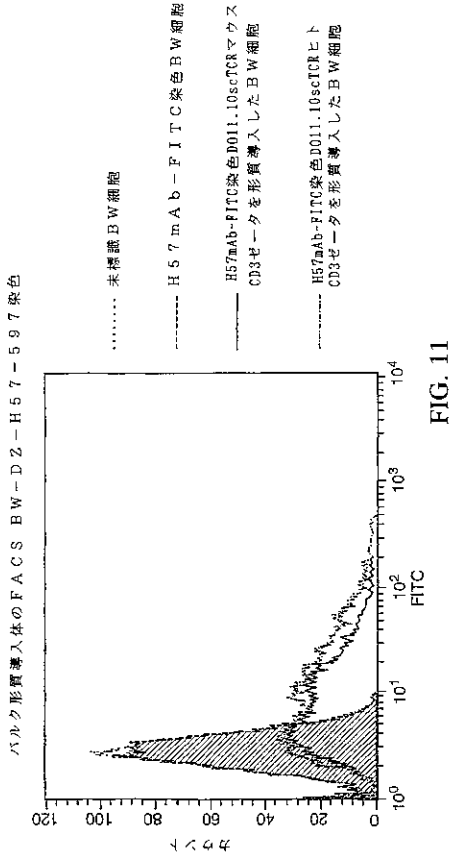


FIG. 11

【図１２】

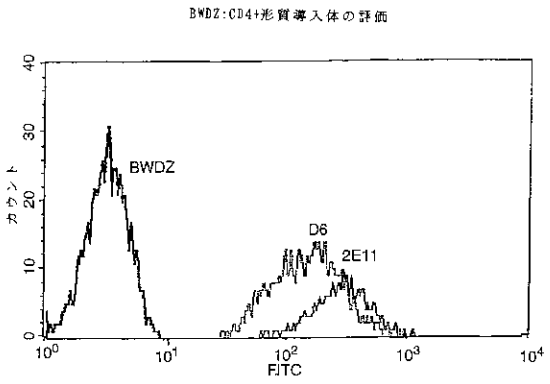


FIG. 12A

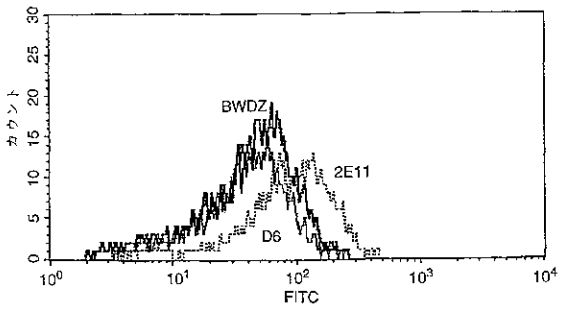


FIG. 12B

【図１３】

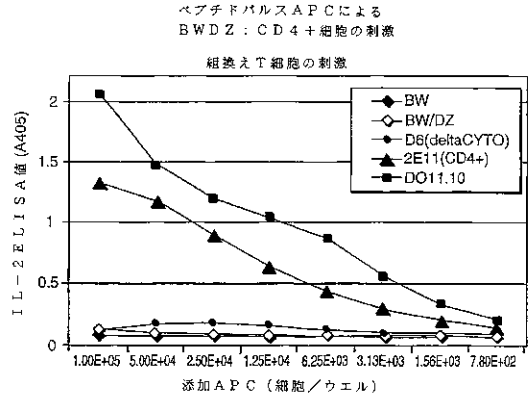


FIG. 13

【図１４】

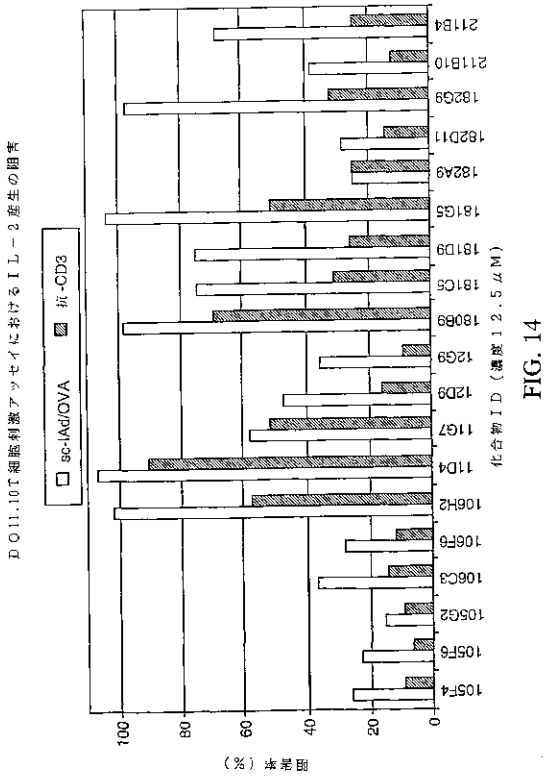


FIG. 14

【図１５】

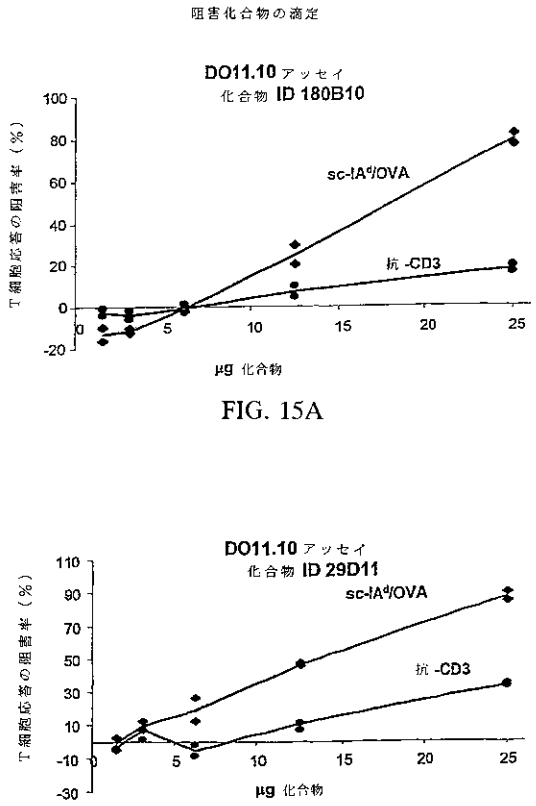


FIG. 15A

FIG. 15B

【図１６】

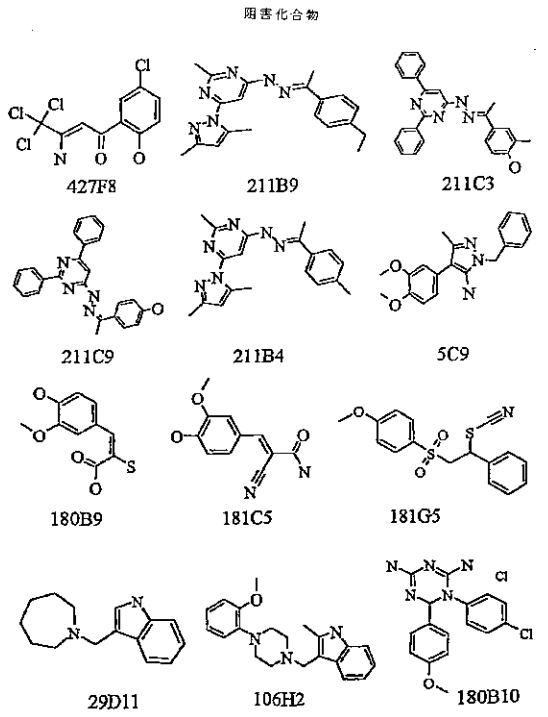


FIG. 16

【図１７】

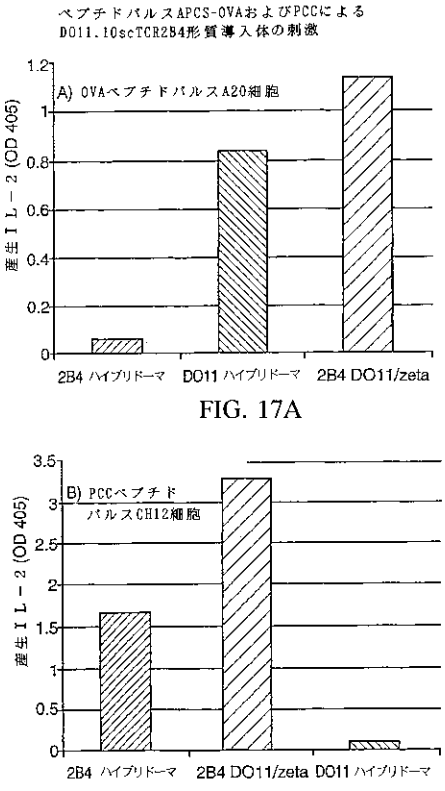


FIG. 17A

FIG. 17B

【図１８】

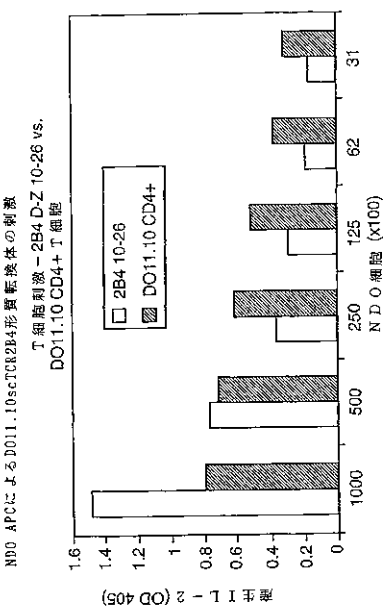


FIG. 18

【図１９】

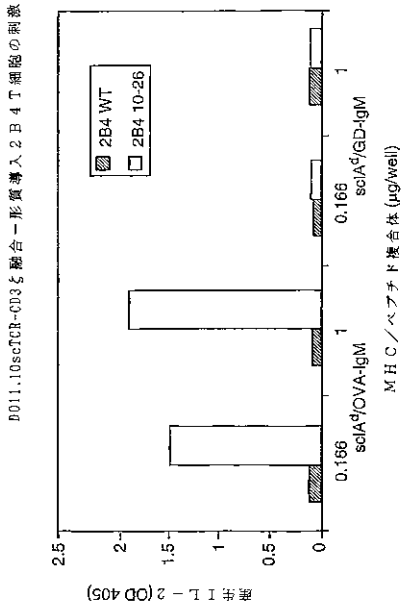


FIG. 19

【図２０】

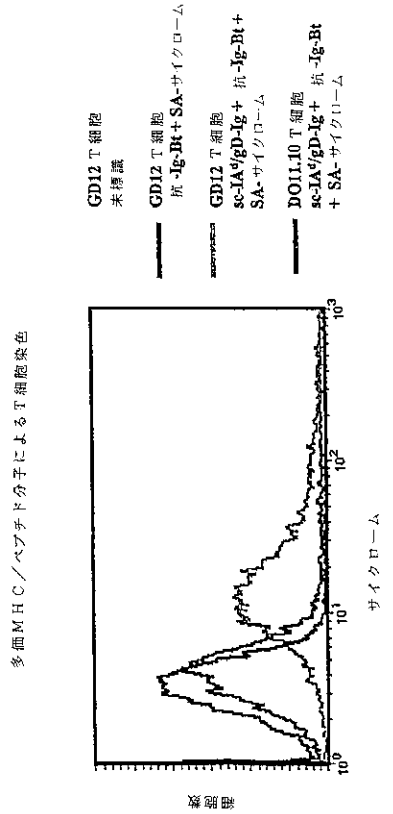


FIG. 20

【図２１】

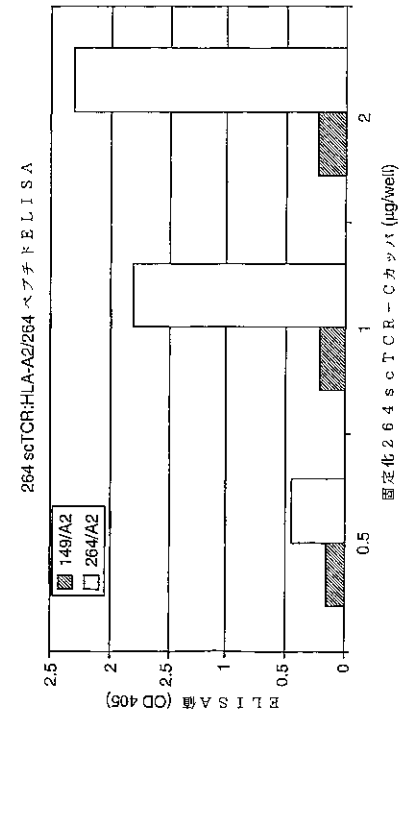


FIG. 21

【図２２】

タンパク質に基づくＥＬＩＳＡ：応答の特異性

２６４ｓｃＴＣＲ結合プレート：
HLA-A2/264-HRP 対
HLA-A2/149-HRP プローブ

nM HLA-A2	264	149
0	0.07	0.07
1	1.51	0.07
2.15	2.26	0.07
4.3	2.56	0.07
8.5	3	0.08
16.5	3.12	0.08
33	3.16	0.09
67	3.17	0.12

FIG. 22A

HLA-A2-264-HRP と 264scTCR-カッパ間の特異的相互作用

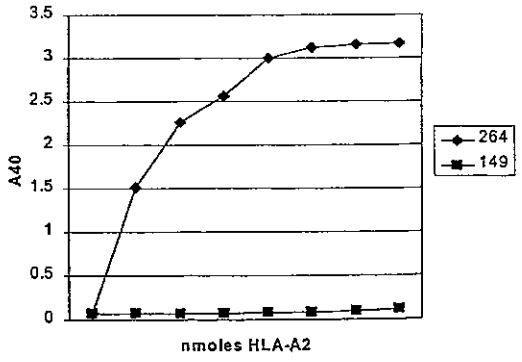


FIG. 22B

【図２３】

タンパク質ＥＬＩＳＡ：濃度依存性
２６４ｓｃＴＣＲ－Ｃカッパおよび２６４ＨＬＡ－Ａ２－ＨＲＰ滴定

											1.05
										2.1	0.17
									4.2	0.27	0.16
								8.4	0.44	0.25	0.16
							16.66	0.74	0.42	0.24	0.15
						33.3	1.38	0.69	0.43	0.23	0.11
					66.6	2.21	0.97	0.79	0.34	0.16	0.07
				66.6	2.08	1.84	1.36	0.71	0.26	0.1	0.06
			33.3	2.08	2.03	2.27	1.23	0.49	0.14	0.07	
		16.7	2.85	2.78	2.27	2.04	0.81	0.2	0.07		
	8.4	2.78	2.27	1.24	0.68	1.34	0.357	0.06			
	4.2	2.27	1.24	0.68		0.56	0.12				
	2.1	1.24	0.68			0.1					
	1.05	0.68									
nmoles											
四量体											

nmolesTCR

FIG. 23A

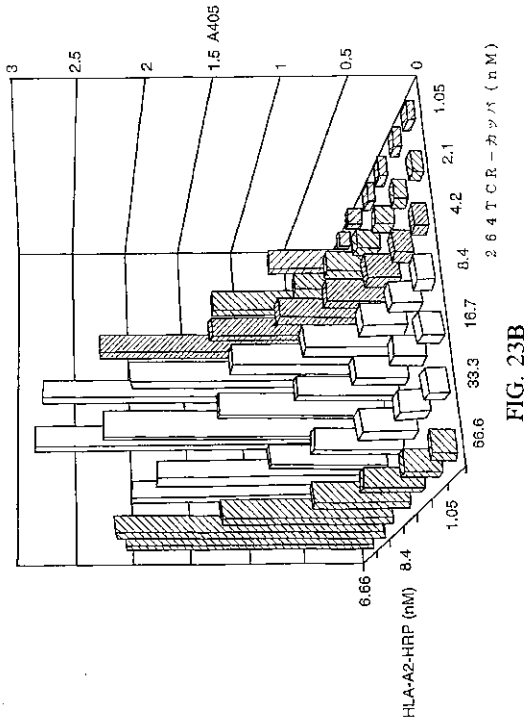


FIG. 23B

【図２４】

タンパク質ＥＬＩＳＡ：異なるＴＣＲ試薬の比較

264 scTCR-C カッパ 対
264 scTCR-IgG1

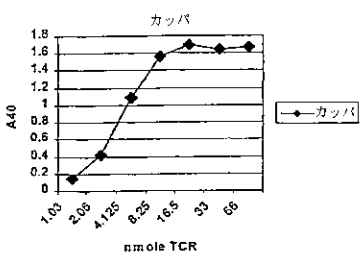


FIG. 24A

	カッパ
1.03	0.15
2.06	0.42
4.125	1.09
8.25	1.57
16.5	1.69
33	1.64
66	1.67

FIG. 24C

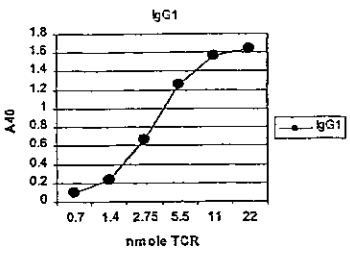


FIG. 24B

	IgG1
0.7	0.1
1.4	0.23
2.75	0.66
5.5	1.26
11	1.57
22	1.64

FIG. 24D

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/90747 A2

(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/48

(21) International Application Number: PCT/US01/15699

(22) International Filing Date: 16 May 2001 (16.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/206,920 25 May 2000 (25.05.2000) US

(71) Applicant: SUNOL MOLECULAR CORPORATION [US/US]; 2810 North Commerce Parkway, Miramar, FL 33025 (US).

(72) Inventors: RHODE, Peter; 14857 SW 42nd Lane, Miami, FL 33185 (US). WITTMAN, Vaughan; 2967 Westbrook, Weston, FL 33332 (US). WEIDANZ, Jon, A.; 820 SW 141st Avenue, Miami, FL 33184 (US). BURKHARDT, Martin; 121 NE 45th Street, Miami, FL 33137 (US). CARD, Kimberlyn, E.; 1120 SW 87th Avenue, Pembroke Pines, FL 33025 (US). TAI, Rony; 5024 N.W. 102nd Drive, Coral Springs, FL 33076 (US). ACEVEDO, Jorge; 14929 SW 104th Street, 21-24, Miami, FL 33196 (US). WONG, Hing, C.; 2966 Wentworth, Weston, FL 33332 (US).

(74) Agents: BUCHANAN, Robert, L. et al.; Dike, Bronstein, Roberts & Cushman, Intellectual Property Patent Group, Edwards & Angell, LLP, P.O. Box 9169, Boston, MA 02209 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 01/90747 A2

(54) Title: MODULATION OF T-CELL RECEPTOR INTERACTIONS

(57) Abstract: Disclosed are methods for identifying compounds that modulate an immune complex that includes a T cell receptor (TCR) and a major histocompatibility complex (MHC) antigen. The invention has many useful applications including providing high throughput screening assays for detecting compositions that can modulate an immune response.

MODULATION OF T-CELL RECEPTOR INTERACTIONS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

The present application is a continuation-in-part of U.S. Provisional Patent Application no. 60/206,920 filed on May 25, 2000, the disclosure of which is incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the compounds that modulate interactions between a T cell receptor (TCR) and a major histocompatibility complex (MHC) antigen. In one aspect, the invention features methods for identifying the test compounds. In other aspects, the invention provides test compounds detected and identified by the methods, pharmaceutical preparations that include the compounds, as well as methods for using those compounds therapeutically. The invention has many important applications including use in high throughput screening formats to select compounds that can reduce or eliminate harmful immune responses or that can enhance or initiate helpful immune responses.

BACKGROUND

Antigen-specific T cells recognize and respond to specific peptides bound to the binding groove or cleft of a major histocompatibility complex (MHC, including MHC of humans known as HLA). The presentation of peptides by the MHC molecule and the recognition by antigen-specific T cells represent an important immunosurveillance strategy for identifying and responding to foreign antigens. The antigenic peptides are non-covalently bound to particular "binding pockets" comprised of polymorphic residues of the MHC protein's binding groove. The MHC-bound antigenic peptides specifically interact with T cell receptors (TCRs) on the

surface of the T cells and modulate an immune response. See generally *Fundamental Immunology 3rd Ed.*, W. Paul Ed. Rsen Press LTD. New York (1993).

See also U.S. Patent No. 5,869,270 to Rhode, P. et al. (assigned to Sunol Molecular Corporation).

MHC molecules are membrane-bound heterodimeric glycoproteins that include an α and a β chain. For class II MHC molecules, the α1 and β1 domains associate to form a peptide binding grove. Antigenic peptides bind the MHC molecule through interaction between anchor amino acids on the peptide and the binding pockets formed by the α1 and β1 domains. The x-ray crystallographic structure of a human class II HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide has show in atomic detail the interactions between the peptide and the MHC molecule. See Brown, J. H. et al. (1993) *Nature* 364: 33-39; Stern, L. J. et al. (1994) *Nature* 368: 215-221; and Garboczi, D.N. et al. (1999) *Immunity* 10: 1-7.

MHC class I molecules have different domain organizations than MHC class II molecules. In class I MHC molecules, the α1 and α2 domains associate to form the peptide binding groove. However both classes of MHC molecules have overall similar structure with a peptide binding site or groove that is distal to membrane domains. See e.g., Rudensky, A.Y. et al., (1991) *Nature* 353:622-626. See also U.S. Patents 5,284,935; 5,260,422; 5,194,425; 5,130,297; and WO 92/18150, WO 93/10220 for discussions of MHC molecules.

The T-cell response is modulated by antigen binding to a T-cell receptor (TCR). One type of TCR is a membrane bound heterodimer consisting of an α and β chain. This TCR is thought to resemble an immunoglobulin variable (V) and constant (C) region. The TCR α chain includes a covalently linked V-α and C-α chain, whereas the β chain includes a V-β chain covalently linked to a C-β chain. The V-α and V-β chains form a pocket or cleft that can bind to superantigen or peptide antigen

in the context of the MHC molecule or to an alloreactive MHC molecule. See generally Paul, W., *supra*.

It has been reported that if TCR α and β chains are not assembled into a complex that includes a particular cluster of differentiation (CD) protein, i.e., a CD3 complex comprising γ, δ, ε, and ζ chains, the TCR can be degraded. See e.g., Shin et al. (1993) *Science* 259: 1901.

There is recognition that MHC molecules complexed with antigenic peptides can induce selective immunosuppression by several different mechanisms. See e.g., Guery, J. et al. (1993) *Critical Reviews in Immunology* 13(3/4): 195-206.

More specifically, it has been reported that peptide-MHC complexes on the surface of antigen presenting cells (APCs) will only induce clonal expansion of a T cell line specific for the MHC bound peptide if the antigen presenting cells also deliver co-stimulatory signals. One proposed approach takes advantage of this requirement for T cell activation and inhibits T cell development by interaction with the antigenic peptide bound to the MHC molecule in the absence of co-stimulatory signals. See Nicolle, M. et al., *J. Clin. Invest.* (1994) 93: 1361-1369; and Sharma, S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA (1991) 88: 11465-11469.

There has been a substantial effort toward understanding the immune complex formed between the TCR and its compatible (cognate) MHC. One approach has been to use X-ray crystallography to study the complex at the atomic level. See Garboczi, D.N., et al. (1996) *Nature* 384:134-141, Garcia, K.C., et al. (1998) *Science* 279:1166-1172, Ding, Y.H., et al. (1998) *Immunity* 8:403-411 and Reinherz, E.L., et al. (1999) *Science* 286:1913-1921. Using this approach, it has been reported that different TCR:MHC/peptide immune complexes feature similar binding interactions. These reports have been supported by mutagenesis studies. See Rabinowitz J.D. et al. (1996) *Immunity* 5:125-135, Lyons D.S. et al. (1996) *Immunity* 5:53-61, Brawley J.V.

& Concannon P. (1999) *J. Immunol.* 163:4946-4952, Hornell T.M.C. et al. (1999) *J. Immunol.* 163:3217-3225.

These efforts have further suggested that minor amino acid changes in either the antigenic peptide or the MHC molecule can produce MHC/peptide complexes that do not optimally stimulate T cell responses. For example, such complexes have been reported to be T cell antagonists and weak agonists. In some cases, changes in the antigenic peptide can result in MHC/peptide complexes that act as T cell super agonists.

There have been efforts toward understanding interactions between a TCR and its cognate MHC/peptide and the formation of an immune complex that leads to stimulation of T cell responses. For example, the stability of TCR:MHC/peptide immune complexes is important for optimal T cell responses. Oligomerization of multiple TCR:MHC/peptide immune complexes may also be important for optimal responses. See Lyons D.S. et al. (1996) *Immunity* 5: 53-61, Cochran, J.R. et al. (2000) *Immunity* 12: 241-250.

There have been efforts to develop efficient screening methods for detecting compounds using cell-based and protein-based protocols. For example, some of these screens have identified compounds that reportedly inhibit protein: protein interactions. See Tian, S.S. et al. (1998) *Science* 281: 257-259, Kelly T.A. et al. (1999) *J. Immunol.* 163: 5173-5177, Jenh, C.H. et al. (1998) *Anal. Biochem.* 256: 47-55.

It would be desirable to have compounds that can modulate interactions between a TCR and its cognate MHC. It would be further desirable to have efficient methods for detecting the compounds that are compatible with a wide variety of high throughput screening paradigms.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention generally relates to compounds that modulate interactions between a T cell receptor (TCR) and a major histocompatibility complex

(MHC, including HLA in humans) antigen. In one aspect, the invention features methods for detecting compounds that can modulate interactions between the TCR and its cognate MHC antigen molecule.

More particularly, we have developed methods for detecting compounds that modulate TCR:MHC antigen interactions particularly by increasing or decreasing presence of the immune complex formed between such molecules. The word "modulate" as it is used in reference to a method of this invention, is intended to mean detected compounds that preferably act as agonists or antagonists of the immune complex and, more generally, as modulators of the TCR:MHC antigen complexes themselves.

The term "MHC antigen" or "MHC antigen molecule" is used in reference to an MHC-based molecule that specifically binds the TCR. The MHC component of the MHC antigen can consist of but is not limited to classical or non-classical MHC class Ia, class Ib or class II molecules or to MHC homologues (See Maenaka, K & Jones, E.Y. 1999. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:745-753). The MHC antigen can consist of but is not limited to MHC/peptide complexes, MHC/superantigen complexes, MHC/lipid (or gylocolipid) complexes or alloreactive (xenoreactive) MHC molecules.

The methods of this invention broadly involve contacting at least one TCR molecule with at least one cognate MHC antigen (as defined above) preferably in the presence or absence of at least one test compound. By the term "cognate" as it is used to reference a particular TCR or MHC antigen molecule is meant that molecule which serves as a specific binding partner for the other molecule. In many embodiments, the methods will include about one TCR molecule and about one cognate MHC antigen molecule. Typical contact between the molecules is usually conducted under pre-determined conditions that foster specific binding between the TCR and MHC antigen molecules. That specific binding generally assists formation of the immune complex and may help stabilize that complex in some instances. Detected test compounds significantly increase or decrease that specific binding relative to at least one control which control can be performed at the same or different

time than when the test compound was detected by the method. Compounds having a desired activity or more than one of such activities are thus identified in the method as being capable of modulating formation of the immune complex. The test compounds so identified can be further selected according to the invention. Such identified and selected compounds have many important applications including use as agents for modulating (increasing or decreasing) a wide spectrum of immune responses *in vitro* and *in vivo*. Illustrative of such immune responses include immune surveillance, auto-immune disorders, infection, proliferative disorders such as cancer, graft acceptance and the like.

Practice of the present invention provides many advantages particularly in light of prior screening attempts. For example, the methods of this invention are fully compatible with a wide range of TCR and MHC antigen molecules. This feature of the invention is important as it expands the repertoire of probe formats for detecting the test compounds. As an example, the methods of this invention can accommodate fully soluble TCR and MHC antigen molecules as well as less soluble molecules such as those expressed on cell surfaces. Accordingly, the invention is very flexible and can be used in a wide spectrum of different test formats, e.g., those that use fully soluble proteins, cell-expressed membrane proteins, or combinations thereof including screening strategies in which one of the molecules is fully soluble and the other is expressed by a desired cell. In marked contrast, prior screening attempts have employed more restricted screening formats where only one or a few molecule types have been employed.

Other advantages are provided by this invention. For example, in embodiments in which a particular method uses at least one class I or class II MHC antigen molecule, practice of the invention can eliminate the need to purify MHC molecules previously loaded with tightly bound peptides from antigen presenting cells (APCs). In contrast, prior screening attempts have reported use of MHC molecules prepared by difficult and time intensive purification steps. In contrast, the present methods are compatible with use of a wide range of class I or class II MHC antigen

molecules that are much easier to make and use. See e.g., the U.S. Pat. No. 5,869,270 to Rhode, P. et al.; the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

Additionally, many embodiments of the present methods offer more sensitivity than that reported in prior screening attempts. For example, it has been disclosed that a multi-valent array of MHC antigen complexes is necessary to stimulate certain TCR expressing cells. That is, it was reported that monovalent MHC antigen complexes would not work as good probes in many screening attempts. In marked contrast, the methods of this invention can be used to detect test compounds using a range of class I or class II MHC antigen molecules including monovalent and multi-valent molecules. See the discussion below and the U.S. Pat. No. 5,869,270 for disclosure relating to making and using such molecules.

Further, prior screening attempts have often focused cell expressed TCR heterodimers as probes. It is believed that this format is unnecessarily restrictive and may in some instances negatively impact screening results. In contrast, the methods of this invention are not limited to a particular TCR molecule or test format. Instead, the invention is fully compatible with broad spectrum of TCR molecules including, but not limited to, naturally-occurring TCRs, fully soluble TCR molecules including recombinant single chain constructs, as well as cell-anchored single chain and heterodimeric TCR molecules.

Additional flexibility of the invention is manifested by the wide spectrum of MHC antigen molecules that can be employed including naturally-occurring MHC molecules, fully soluble MHC molecules including, but not limited to, single chain constructs, as well as those constructs expressed by cells as cell surface molecules. Moreover, what is referred to herein as "empty" MHC molecules can also be used in accord with this invention.

Accordingly, practice of the present invention can substantially increase the pool of testable TCR and MHC antigen probe molecules. The considerable size of this pool also increases the number of testable immune complexes, thereby expanding

the universe of test compounds that can be detected, identified and selected by the present methods. In contrast, prior screening attempts have been limited to one or only a few probe types, usually TCR and MHC heterodimers. This deficiency is believed to substantially reduce the potential number of detected compounds in many assay settings.

Still further, prior screening attempts have often been limited to detecting TCR:MHC-peptide interactions by using only one or a few limited methods. Typical of such methods involve relatively insensitive and often imprecise measurements of cell granulation. In marked contrast, the present invention provides a wide array of methods for detecting those interactions generally by monitoring the immune complex in the presence and absence of the test compounds. More specific detection methods offer more sensitive and reliable indicators of the TCR:MHC antigen interactions which methods can be conducted using direct or indirect techniques.

In particular, the capacity of this invention to accommodate a wide range of methods for detecting the immune complex provides notable advantages. One advantage is that such methods make the invention even more flexible and tailorable to a wide range of different screening paradigms.

For example, in embodiments in which highly sensitive detection of the immune complex is desirable, the invention can be used with indirect detection methods, e.g., to amplify weak or intermittent signals typical of TCR:MHC antigen interactions. Alternatively, in embodiments in which presence of the immune complex is especially robust, the invention can be employed using methods that involve direct detection of immune complex, its TCR and/or MHC antigen components, or the test compound. Such an embodiment may be very practical in settings in which rapid screening of test compounds is indicated. In contrast, prior methods for detecting TCR:MHC-peptide interactions as reported in prior screens has, until now, been much more restricted and generally less sensitive, thereby decreasing or even eliminating opportunities to detect many useful test compounds.

Additional advantages are provided by this invention.

For example, in some embodiments of this invention, the capacity of one or more test compounds to modulate an immune complex of interest can be compared against a variety of controls. An exemplary control is the detection of the immune complex in the absence of the test compounds. However in certain situations more refined controls may be indicated to select against those test compounds which non-specifically impact the immune complex. More particularly, the invention provides a variety of what is sometimes referred to as "internal controls" that can be used to help detect test compounds with capacity to specifically modulate subject TCR:MHC antigen interactions.

In one embodiment, such an internal control will include the subject (first) TCR or MHC antigen molecule and at least one antibody, usually a monoclonal antibody, that binds the TCR or MHC antigen molecule specifically. Particular antibodies of interest will bind the TCR or MHC antigen molecule generally outside the region involved in specific binding and formation of the immune complex. Other particular antibodies suitably bind, usually specifically, a CD protein closely associated with the TCR molecule typically in embodiments in which the TCR molecule is cell expressed.

In the foregoing example of the invention, the complex formed between the antibody and the TCR or MHC antigen molecule is referred to herein as a "control immune complex" or like phrase. Formation of the control immune complex in accord with this invention typically facilitates a detectable response in the method such as but not limited to a cell response. Such a response can be directly or indirectly measured apart from or along with the (experimental) immune complex, i.e., that complex formed by interaction between the subject (first) TCR and MHC antigen molecules of interest. A particular test compound will desirably modulate formation of the experimental immune complex but will impact the control immune complex much less and preferably not at all.

In another embodiment, the control immune complex includes a second TCR molecule and its cognate MHC antigen molecule preferably wherein the second TCR molecule has a different binding specificity than the first TCR molecule. In this example of the invention, particular test compounds of interest will modulate the immune complex formed between the subject (first) TCR and its cognate MHC antigen molecule. However, the test compounds will impact the control immune complex with the second TCR molecule and its cognate MHC antigen molecule much less and preferably not at all.

As discussed, presence of the immune complexes including the particular control immune complexes disclosed can be detected using a wide variety of detection formats including those relying on direct or indirect techniques. Practice of one or more of the internal controls can be conducted prior to, during, or after screening of the test compounds.

In embodiments of the invention in which use of one or more of the foregoing controls is preferred, substantial advantages can be realized. For example, methods employing such controls can offer much better sensitivity, selectivity and/or reliability. That is, in embodiments in which at least one control such as the internal controls discussed are used, presence of the control helps to facilitate the detection and selection of the test compounds, e.g., by identifying those which non-specifically interfere with TCR:MHC antigen interactions. This feature of the invention can often improve screens for test compounds that specifically modulate an immune complex of interest. In contrast, prior screening attempts have not always provided good controls and it is not clear whether such attempts can provide sensitive and reliable results.

Accordingly, it will be apparent that the invention is highly flexible and can be adapted to screen a wide range of test compounds. A preferred test compound in accord with this invention will exhibit one or more desired activities including capacity to modulate subject TCR:MHC antigen interactions.

For example, in embodiments in which the methods are adapted to detect antagonists, a suitable test compound will show at least about 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% to about a 100% decrease in the presence of the immune complex relative to at least one suitable control. As discussed, that immune complex is formed between the subject TCR and its cognate MHC antigen molecule. As also discussed, the presence of the immune complex can be readily detected using a variety of direct and indirect detection techniques. An illustrative control involves conducting the assay in the absence of the test compound. Alternatively, or in addition, the control can be one or more of the internal controls mentioned previously and in the discussion that follows.

However in embodiments in which invention is used to detect agonists, the assay employed will preferably show at least about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% to about 100% up to about a 500% to about 1000% increase in the presence of the immune complex relative to at least one suitable control.

As pointed out, the invention can be used in a wide range of formats. For example, the invention can be employed in what is known as " high throughput" or "ultra throughput" type screening methods. In this embodiment, the invention is particularly useful for screening large pools of test compounds including libraries of same for those particular compounds with capacity to modulate the immune complex.

Further, the methods of this invention can be used in combination with one or more *in vivo* screening regimens to determine more precisely the capacity of detected test compounds to modulate subject TCR:MHC-peptide interactions. For example, in one embodiment, the invention can be used to pre-screen (or concurrently screen) suitable test compounds for use in a mammal such as those recognized animal models used to identify compounds impacting immune surveillance, auto-immune disorders, infection, proliferative disorders such as cancer, and/or graft acceptance. The

monitored function in the animal may be pre-existing e.g., a genetic predisposition, or it may be induced, e.g., chemically or surgically.

Significantly, the present invention contemplates multiple detection formats (e.g., a combination of *in vitro* and *in vivo* assays) to facilitate the detection of highly useful test compounds that can modulate TCR:MHC antigen interactions and particularly the presence of desired immune complexes. This feature of the invention greatly extends the flexibility of the invention and provides for more specific selection and identification of useful test compounds.

Such broad spectrum testing, by *the in vitro* and/or *in vivo* methods, provides additional advantages. Thus, for example, many of the methods can be used to perform multiple analyses, thereby enhancing the efficiency and probability of identifying test compounds that can specifically modulate subject immune complexes and exhibit substantial therapeutic capacity. This feature of the invention is especially useful when large numbers of compounds need to be tested such as when high throughput or ultra throughput methods are used. For instance, libraries of test compounds can be made by standard synthetic methods including combinatorial-type chemistry manipulations and then tested in accord with the invention. Alternatively, the methods of this invention can be used with test compounds already available such as small molecules, large molecules, including compounds present in commercially available chemical libraries.

Accordingly, in one aspect, the invention features methods for identifying compounds that modulate TCR:MHC antigen interactions. In one embodiment, the method includes at least one of and preferably all of the following steps:

a) contacting a first TCR molecule and a class I or class II MHC antigen molecule in the presence or absence of at least one test compound, the contacting being under conditions sufficient to bind the TCR and the MHC antigen molecules specifically as an immune complex,

b) detecting presence of the immune complex in the presence and absence of the test compound; and

c) selecting a test compound that alters specific binding between the TCR and MHC antigen molecules. Preferably, the method further includes identifying the selected compound as being capable of modulating the immune complex.

In a particular embodiment of the method, the invention provides a screen for identifying test compounds that modulate the immune complex that includes the TCR and its cognate MHC antigen. In a more specific embodiment, the method includes at least one and preferably all of the following steps:

a) contacting cells expressing a first TCR molecule including T cell hybridomas with an class I or class II MHC antigen molecule bound to a solid support in the presence or absence of a test compound, the contacting being under conditions sufficient to bind the TCR and the bound MHC antigen molecule specifically as an immune complex,

b) detecting presence of the immune complex in the presence and absence of the test compound by measuring a cell response from the cells; and

c) selecting a test compound that alters specific binding between the first TCR and bound MHC antigen molecules. Preferably, the method further includes identifying the selected compound as being capable of modulating the immune complex.

As discussed, the methods of this invention can be used to screen for desired test compounds using one or a combination of strategies. As also discussed, it will often be very useful to include, as a control, one or more steps that detect the immune complex in the absence of the test compound. However in embodiments in which presence of the immune complex is already understood in a particular assay format, such steps can be omitted if desired.

In other embodiments, the control may include, alternatively or in addition to detecting the immune complex without the test compound, at least one suitable internal control. In embodiments in which use of at least one internal control is indicated, the method will generally include steps for detecting presence of the control immune complex in the presence and absence of the test compound. Choice of

whether to include the foregoing controls will be guided by understood parameters such as the TCR and MHC antigen molecules used, the assay format selected and sensitivity required.

In another aspect, the present invention provides pharmaceutical compositions that preferably include at least one of the compounds detected and identified by the present methods. Such compositions may include the compounds as the sole therapeutic agent or may combine same with one or more other recognized agents including drugs having acknowledged effects on immune system function.

The present invention also provides methods for inhibiting an immune response in a mammal. In one embodiment, the method includes administering a therapeutically effective amount of at least one of the pharmaceutical compounds provided herein. The methods include, but are not limited to, administration of at least one of the pharmaceutical compounds as the sole active agent. In another embodiment, the methods provide for administration of at least one of the pharmaceutical compounds in combination with at least one other recognized agent such as those drugs with acknowledged therapeutic effects on the immune system.

In another aspect, the invention provides kits and particularly diagnostic or research kits for performing the methods disclosed herein. A particular kit of this invention includes, preferably as a packaged combination, a first container that includes at least one TCR molecule or a functional fragment thereof; and a second container that includes at least one MHC antigen molecule or a functional fragment thereof. Optionally, the kit may further include one or more buffers for performing the methods as well as directions for using the kit. Also optionally, the kit may include one or more of the controls described herein. In one embodiment, the controls include at least one naturally-occurring, synthetic or semi-synthetic compound with a recognized capacity to modulate specific binding between an identified TCR molecule and an identified MHC antigen molecule; or functional fragments thereof. Preferably, the compound decreases that specific binding.

Additionally provided by this invention are recombinant TCR molecules that include a mammalian CD3ζ (zeta) sequence; or functional fragment thereof. Such molecules are, in one embodiment, single chain constructs that can be functionally positioned in cell membranes.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1A-B are drawings showing interactions between various T cell receptors (TCRs) and cognate major histocompatibility (MHC) peptide complexes.

Figure 2 is a schematic drawing showing one method of the invention for detecting test compounds. In this example, a small molecule inhibitor inhibits TCR/MHC antigen interactions and helps to block undesirable immune responses.

Figure 3 is a schematic drawing showing a particular protein-based method for detecting test compounds that block autoimmune disorders.

Figure 4 is a schematic drawing showing a particular cell-based method for detecting test compounds that block autoimmune responses.

Figure 5A is a schematic drawing showing a "proof of principle" example of the invention in which a chemical library is screened for inhibitors of DO11.10 TCR and sc-IA^d/OVA interactions.

Figure 5B is a schematic drawing showing another "proof of principle" example of the invention in which a high throughput screening format is used to detect inhibitors of D011.10 TCR and sc-IA^d/OVA interactions. Detected inhibitors are identified by differences in optical absorbance compared to internal controls.

Figure 6A is a schematic drawing showing a specific example of a method for detecting test compounds that inhibit multiple sclerosis (MS).

Figure 6B is a schematic drawing showing a specific method for detecting test compounds in which a high throughput screen is used. In the figure, the method is optimized to detect molecules that inhibit multiple sclerosis (MS).

Figure 7A-C are drawings showing steps conducted for IE^k cloning. Figure 7A: Genetic constructs containing various α and β chain fragments. Figure 7B: Construction of single chain IE^k molecules with linked peptide. Figure 7C: Insect cell expression vectors including IE^k single chain. Abbreviations used in each of the figures are defined in Figure 7C.

Figure 8 is a photographic representation of an SDS-PAGE gel showing the sc-IA^d-IgG molecule in reduced (lanes 1-2) and non-reduced (lanes 3-4) form. Lane 5 shows protein size markers. Lane numbers are from left to right.

Figure 9 a photographic representation of an SDS-PAGE gel showing the DO11.10 sc-TCR-IgG2b fusion. Lane 1 shows an antibody control and lane 2 shows the DO11.10 scTCR-IgG2b fusion protein.

Figure 10 is a schematic drawing showing various TCR-CD3ζ fusion constructs of the invention.

Figure 11 is a graph showing the results of a fluorescence activated cell sorting (FACS) experiment in which BW5147 transfectants expressing various DO11.10 scTCR-CD3ζ fusion constructs were stained with an anti-TCR antibody probe.

Figure 12A and 12B are graphs showing FACS characterization of BWDZ:CD4+ transfectants. Figure 12A: Detection of surface CD4 expression by FACS. Figure 12B: Detection of surface DO11.10 scTCR expression by FACS.

Figure 13 is a graph showing results of stimulation of BWDZ:CD4+ cells by peptide pulsed antigen presenting cells (APCs).

Figure 14 is a graph showing results of inhibition of IL-2 production in a DO11.10 T cell stimulation assay.

Figure 15A and 15B are graphs showing results of titration of two detected test compounds 180B10 (Figure 15A) and 29D11 (Figure 15B).

Figure 16 is a drawing showing illustrative inhibitory compounds.

Figure 17A and 17B are graphs showing results of stimulation of DO11.10 sc-TCR 2B4 transfectants by peptide-pulsed APCs. Figure 17A shows a T cell stimulation assay using OVA peptide-loaded A20 APCs. Figure 17B shows a T cell stimulation assay using PCC peptide-loaded CH12 cells.

Figure 18 is a graph showing results of stimulation of DO11.10 scTCR 2B4 transfectants by NDO APCs.

Figure 19 is a graph showing results of stimulation of DO11.10 sc-TCR-CD3ζ fusion transfected 2B4 T cell hybridomas.

Figure 20 is a graph illustrating T cell staining using multi-valent MHC/peptide molecules.

Figure 21 is a graph showing ELISA values for HLA-A2/264 peptide and 264 sc-TCR-kappa interactions.

Figure 22A is a table showing specificity of response of a protein-based ELISA assay. The information is displayed graphically in Figure 22B.

Figures 23A is a table showing concentration dependence of protein ELISA. The information in the table is displayed graphically in Figure 23B.

Figures 24A and 24B are graphs showing comparison of different TCR reagents in protein ELISA. The information in the graphs is shown in Figures 24C and 24D, respectively.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

As discussed above, the present invention features methods for detecting compounds that can modulate interactions between a TCR and its cognate MHC antigen molecule. In particular, the invention provides highly useful screening methods for detecting and identifying the compounds. Further provided are compounds identified and selected by the methods, pharmaceutical compounds or preparations that include at least one of the selected test compounds, as well as methods for using those preparations therapeutically to treat an immune disorder in a human patient.

As also discussed, the invention is broadly applicable to what has been referred to as "high throughput" or "ultra throughput" screening paradigms. This embodiment of the invention is especially useful for manipulating and testing large pools of test compounds for those with good capacity to modulate TCR and MHC antigen interactions. More particular compounds identified by the methods of this invention can reduce or eliminate harmful immune responses triggered by unwanted TCR and MHC antigen interactions. Alternatively, such pharmaceutical compounds can be employed prophylactically to help eliminate, reduce the severity, or delay the onset of the immune disorder in the patient. Particular patients have or are suspected of having the immune disorder including those "at risk" for developing that disorder such as those with a pre-determined genetic disposition to such a disorder.

There has been recognition that modest amino acid changes within an MHC molecule or its antigenic (presenting) peptide, even conservative amino acid changes, can provide MHC/peptide complexes that are inactive or act as antagonists, weak

antagonists, or super agonists with respect to stimulating T cell responses. Similar modest amino acid changes in the TCR have been shown to alter T cell specificity to peptide and MHC. See, for example, Rabinowitz J.D. et al. (1996) *Immunity* 5:125-135, Brawley J.V. & Concannon P. (1999) *J. Immunol.* 163:4946-4952, Hornell T.M.C. et al. (1999) *J. Immunol.* 163:3217-3225. Chemical compounds that can interact with the MHC antigen complex or the TCR may alter the interaction with the cognate receptor and may similarly act as T cell antagonists or agonists.

Moreover, available X-ray crystallographic studies have suggested that there are significant amino acid interactions between the TCR and conservative and polymorphic side chains on the MHC. Further these studies have suggested that there are interactions between the TCR and the side chains of the peptide, and the peptide backbone of both the MHC and the peptide. Without wishing to be bound to any theory, it is believed that the present invention is well-suited to detect compounds that can impact and especially block or enhance those interactions. More preferably, such compounds can serve as specific antagonists or agonists of the immune complex formed between the TCR and MHC antigen *in vitro* and *in vivo*.

By way of illustration and not limitation, Figures 1A-B show some important TCR-peptide/MHC interactions. Many of these interactions exemplify relatively low affinity binding between the TCR and MHC antigen molecules. In particular, Figure 1A shows the overall peptide backbone structure of one entire TCR:MHC/peptide complex (right panel) and a view of the peptide/MHC combining site with the CDRs (numbered) of the TCR superimposed onto the MHC/peptide structure (left panel) (See Garboczi, D.N., et al. (1996) *Nature* 384:134-141, Garcia, K.C., et al. (1998) *Science* 279:1166-1172). Figure 1B shows conserved and variable MHC residues contacted by different cognate TCRs (See Garboczi, D.N. & Biddison, W.E. (1999) *Immunity* 10:1-7). Without wishing to be bound to theory, the present invention can take advantage of these interactions by detecting test compounds with capacity to modulate these and other low affinity interactions between the TCR and MHC antigen molecules.

The information provided by Figures 1A-B has facilitated understanding about multiple targets within the TCR:MHC antigen complex. This understanding has helped implementation of the present invention to detect and identify test compounds that modulate those targets. Many of the compounds detected by the methods may act very specifically, e.g., in a peptide-specific, MHC allele specific, MHC family-specific or MHC class-specific manner.

In addition, compounds that interact with the TCR:MHC antigen complex may alter the stability of the complex or the ability of the complex to multimerize. These compounds may act as T cell antagonists or agonists.

As mentioned previously, in one embodiment the invention can detect compounds that antagonize T cell activation, e.g., by specific MHC alleles or MHC families. This feature of the invention can provide important advantages including paving the way for the development and implementation of a wide range of therapeutic strategies. Such approaches include those optimized to treat an immune disorder including recognized autoimmune diseases. Significantly, many autoimmune diseases are acknowledged to have a strong genetic association with specific MHC alleles and/or MHC families. Thus it is another object of this invention to provide methods that can be tailored to particular patients or patient groups to detect test compounds that modulate (e.g., reduce or block) the TCR and MHC interactions in an MHC allele and/or family specific manner.

As indicated above, the formation of the immune complex is exemplified by a complex array of low affinity yet specific interactions between the TCR and the MHC antigen molecule. These and other factors can limit use of methods for studying high affinity receptor-ligand interactions and assessing formation of the TCR:MHC antigen complex. These limitations include the lack of sensitivity, difficulties in determining the specificity of the interactions and high assay variability. A number of features of the invention address these limitations. As described more fully below, the invention employs suitable protein- and cell-based reagents to boost the sensitivity and decrease the variability of the assay to detect the formation of the immune complex. In a

particular embodiment, the invention also includes the use of suitable internal controls. As described below and in the Examples, internal controls employing non-cognate TCR or MHC antigens can be particularly useful in assessing the specificity of the cognate TCR:MHC antigen interactions. Use of other internal controls of the invention is advantageous in detecting test compounds that specifically modulate interactions between the TCR and the MHC antigen molecule.

As will be more fully explained below, the present methods can accommodate a wide variety of TCR and MHC antigen molecules. Generally stated, suitable molecules can be naturally-occurring or recombinant and can usefully encompass a range of fully soluble or cell-anchored (membrane-bound) molecules. It is emphasized that this feature of the invention is very important as it provides, e.g., a framework for the design and implementation of many different and useful screening formats. This feature helps to expand opportunities for detecting test compounds with important therapeutic activity. Illustrative of such formats include protein-based and cell-based screening assays such as those already mentioned as well as those described below.

By the term "TCR molecule" or related phrase including the plural form as that term is used to describe a molecule used in a screening method of this invention is meant a naturally-occurring or recombinant molecule that includes at least a portion of the TCR V-α and V-β chains or the TCR V-γ and V-δ chains up to and including the entire length of each chain. Preferred chain lengths are sufficient to form a pocket or cleft that can specifically bind to superantigen or more preferably an antigen in the context of an MHC molecule or to an alloreactive MHC molecule. In most instances, the TCR molecule will bind MHC antigen molecule through a plurality of non-covalent bonds. Suitable TCR molecules can be mono- or multi-valent as needed in a particular assay format. Methods for identifying such TCR molecules are known and include standard TCR binding tests such as those described below.

Illustrative TCR molecules for use with this invention have been disclosed in pending U.S. patent application serial nos. 08/943,006 entitled *Soluble Single-chain T cell Receptors* filed on October 2, 1997 and 08/813,731 entitled *Fusion Proteins Comprising Bacteriophage Coat Protein and a Single-chain T cell Receptor* filed on March 7, 1997; the disclosures of which are incorporated herein by reference.

The U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications each describe a wide variety of TCR molecules and functional fragments thereof suitable for use with the present methods. For example, a suitable sc-TCR molecule includes V-α and V-β chains covalently linked through a suitable peptide linker sequence. Particularly, the V-α chain can be covalently linked to the V-β chain through a suitable peptide linker sequence fused to the C-terminus of the V-α chain and the N-terminus of the V-β chain. The V-α and V-β chains of the sc-TCR fusion protein are generally about 200 to 400 amino acids in length, preferably about 300 to 350 amino acids in length, and will be at least 90% identical, and preferably 100% identical to the V-α and V-β chains of a naturally-occurring TCR. By the term "identical" is meant that the amino acids of the V-α or V-β chain are 100% homologous to the corresponding naturally-occurring TCR V-β or V-α chains.

As disclosed in the U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications, the V-β chain of the sc-TCR molecule can, if desired, further include a C-β chain or fragment thereof fused to the C-terminus of the V-β chain. Further, the V-α chain can include a C-α chain or fragment thereof fused to the C-terminus of the V-α chain and the N-terminus of the peptide linker sequence. Generally, in those fusion proteins including a C-β chain fragment, the fragment will have a length of approximately 50 to 126 amino acids and will usually not include the last cysteine residue at position 127. For those fusion proteins comprising a C-α chain, the length can vary between approximately 1 to 90 amino acids (i.e. the C-α chain up to but not including the final cysteine). For example, in one embodiment, the fusion protein includes a C-α chain fragment between about 1 to 72 amino acids starting from amino acid 1 to 72. In another embodiment, the C-α chain fragment is between about 1 to 22 amino acids

starting from the first amino acid to 22 (leucine). The C-α chain fragment typically does not include any cysteine resides except the $C_{\alpha 90}$ variant which includes two cysteine residues.

As disclosed in the U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications, to facilitate expression of fully soluble and functional protein, the Ig-C_L chain or suitable Ig-C_L fragment is covalently linked to the sc-TCR molecule, e.g., to the C-terminus of the V-β chain or C-β fragment. Although typically not preferred, it is possible to covalently link the Ig-C_L or fragment thereof to the N- terminus of the V-α chain. In most cases, choice of Cα and Cβ chain length will be guided by several parameters including the particular V chains selected and intended use of the soluble fusion molecule.

Additional sc-TCR proteins of the invention include, but are not limited to those having two peptide linker sequences, where the first peptide linker sequence is fused between the C-terminus of the V-α chain and the N-terminus of the V-β chain. The C-terminus of the V-β chain can be fused to the N-terminus of a C-β chain fragment. The second peptide linker is then fused to the C-terminus of the V-β chain or C-β chain fragment and the N-terminus e.g., of an Ig-C_L chain, or Ig-C_L chain fragment or an effector or tag molecule.

In other illustrative embodiments, sc-TCR proteins can be made by fusing the V-β chain to the V-α chain through a suitable peptide linker in which the C-terminus of the V-β chain or C-β chain fragment thereof and the N-terminus of the V-α chain are covalently linked. An Ig-C_L chain or fragment can be covalently linked to the C- or N-terminus of the molecule as desired although generally linkage at the C-terminus will be preferred.

The peptide linker sequence of the sc-TCR proteins are typically selected so that the sc-TCR molecule forms a binding site which resembles that of a naturally-occurring TCR V-α and V-β chain. The Vα and Vβ chains can be derived from

uninduced T-cells although in most cases the V chains are those associated with a pathology, e.g., an immune-related disorder or disease.

Specifically preferred linker sequences have been disclosed throughout the U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications.

As an illustration, the peptide linker sequence separating the Vα,β chains flexibly positions the V-chains in a pocket that is capable of specifically binding a ligand such as a desired MHC antigen. For example, ligand binding to the sc-TCR fusion protein can be used to modulate T-cell activity as determined by assays described in the U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications referenced above. Fusion of Ig-C_L chain or Ig-C_L chain fragment to the sc-TCR molecule can increase assay performance in some settings, e.g., by facilitating soluble expression of the sc-TCRs and maintaining sc-TCR integrity in aqueous solutions such as cell media.

As discussed above and in the U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications, an sc-TCR fusion protein of the invention can include, if desired, a covalently linked Ig-C_L chain or suitable Ig-C_L chain fragment linked, e.g., to the C-terminus of the sc-TCR molecule. In one embodiment, the sc-TCR fusion protein includes a fused mammalian Ig-C_L chain, preferably a full-length murine or human Ig-C_L chain such as the Cκ chain. The nucleic acid and protein sequences of several Ig-C_L chains have been disclosed. See, e.g., *Fundamental Immunology*, (1993) 3rd Ed. W. Paul. Ed. Raen Press Ltd. New York; and Kabat, E.A., et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th Ed.) Public Health Services, National Institutes of Health.

The term Ig-C_L chain is also meant to include an immunoglobulin light chain constant region which varies from a disclosed full-length sequence by one or more amino acid substitutions or additions. For example, an amino acid can be added to a disclosed Ig-C_L chain sequence at one or both ends of the chain, e.g., by conventional recombinant methods. In addition, the recombinant methods can be used to substitute a given

amino acid in the chain if desired. Generally, the amino acid addition will include between about 1 to 30 neutral or hydrophilic amino acids, preferably between about 1 to 10 of such amino acids. An amino acid substituted for another amino acid in the Ig-C_L chain will be a conservative or non-conservative amino acid replacement. Accordingly, a tyrosine amino acid in a Ig-C_L chain sequence substituted with a phenylalanine will be an example of a conservative amino acid substitution, whereas an arginine replaced with an alanine would represent a non-conservative amino acid substitution. As will be pointed out below for Ig-C_L chain fragments, a sc-TCR fusion protein comprising the fused Ig-C_L chain will be fully soluble and functional.

In some embodiments of the present methods, it will be useful to use an Ig-C_L chain fragment such as a murine or human Cκ chain fragment. For example, a suitable Ig-C_L chain fragment can be fused to a sc-TCR molecule when it is desirable to minimize molecular weight of the fusion protein. By the phrase "suitable Ig-C_L chain fragment" or related term is meant an Ig-C_L fragment which when fused to a desired sc-TCR molecule forms a fully soluble and functional sc-TCR fusion protein as defined below. A desired Ig-C_L chain fragment (both Cκ and Cλ type) can be made according to standard recombinant methods, e.g., by PCR amplification of a murine or human Cκ or Cλ chain fragment followed by ligation of the PCR product to the DNA segment or vector encoding a desired sc-TCR molecule. As noted below, the PCR product can be manipulated to include restriction enzyme cleavage sites to facilitate cloning. Generally, a suitable murine or human Cκ chain fragment will be between about 70 to 150, preferably between about 90 to 120, and more preferably between about 100 to 110 amino acids in length. Examples of suitable murine or human Cκ chain DNA sequences are disclosed below. See Examples 5, 6 and 7 below.

Preferred sc-TCR proteins disclosed in the U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications are fully functional and soluble. By the term "fully functional" or similar term is meant that the fusion protein specifically binds ligand and particularly MHC antigen. Assays for detecting such specific binding are

disclosed herein and include standard immunoblot techniques such as Western blotting.

The term "specific binding" or similar term is used herein to describe binding between an antibody and antigen. The antibody (preferably a monoclonal antibody) binds the antigen to form a specific binding pair. Typically, the antibody does not recognize and bind to other molecules as determined by Western blotting, ELISA, RIA, gel mobility shift assay, enzyme immunoassay, competitive assays, saturation assays or other suitable protein binding assays.

The term "specific immune complex" or similar term is used herein to reference a binding pair that includes a specific TCR molecule and its cognate MHC antigen molecule. The specific immune complex may include one type of antigen molecule or more than one type provided that each antigen molecule facilitates formation of the specific binding pair (ie. TCR:antigen:MHC molecule).

Methods for detecting specific immune complexes are known and will vary depending on intended use of the invention. For example, in embodiments in which screening is performed in an essentially cell free format (ie. protein-protein based), preferred methods will include Western blotting, ELISA, RIA, gel mobility shift assay, enzyme immunoassay, competitive assays, saturation assays or other suitable protein binding assays. In cell based embodiments of the invention including those screens in which one or more cell responses are used to identify candidate compounds, detection of those responses will be taken as being indicative of formation of the specific immune complexes. Examples of suitable cell responses are provided below and include cytokine production particularly from T cells.

The sc-TCR fusion proteins disclosed in the U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications can comprise Vα,β chains for which a substantially full-length coding sequence is readily available. Methods for obtaining full-length TCR V chain sequences from cell sources are well known. Alternatively, the Vα,β chains

regions can be obtained by PCR amplification of publicly available Vα, β chains for which at least a portion of the sequence is known. Exemplary Vβ gene sequences include V β 8.1, V β 6.1, V β 5.1, V β 5.2, V β 5.3, V β 2.1, and V β 2.3 gene sequences. See Abe et al. (1992) PNAS (USA) 89: 4066; Wang, et al., 1993); *PNAS* (USA) 90: 188; Lahesma et al. (1993) *J. Immunol.* 150: 4125; Kotzin, et al., (1991) *PNAS* (USA) 88: 9161; Uematsu, et al. (1991) *PNAS* (USA) 88: 8534. See also, Kabat, E.A., et al. *supra* and Chotia, C. et al., (1988) *EMBO J.* 7:3745 for additional TCR V chain sequence.

In particular, Example 3 and Figures 7 and 8 from the USSN 08/943,066 application provides oligonucleotide primers for PCR amplifying a variety of V-α and V-β chains.

As particularly disclosed in the USSN 08/943,066 application, exemplary sc-TCR fusion proteins are generally encoded by a DNA segment including covalently linked in sequence: promoter/leader sequence/ V-α chain/single-chain linker sequence/V-β chain/Cκ chain; promoter/leader sequence/V-α chain/single-chain linker sequence/V-β chain, C-β chain fragment/Cκ chain; promoter/leader sequence/ V-α chain, C-α chain/single chain linker sequence/V-β chain/Cκ chain; or promoter/leader sequence/ V-α chain, C-α chain fragment/single-chain linker sequence/V-β chain, C-β chain fragment/Cκ chain. Exemplary sc-TCR molecules are as described above except that an the C_K chain is not encoded by the DNA segment. The DNA vectors encoding the sc-TCR proteins are introduced into desired cells, including those specific expression systems disclosed herein, for soluble expression of the fusion protein.

More specific vectors for making and using the scTCR molecules are taught throughout the U.S.S.N. 08/943,006 and 08/813,731 applications.

The methods of this invention are compatible with use of other TCR molecules including those in a heterodimeric format. Examples of such molecules

include TCR V chains covalently linked to immunoglobulin constant regions. See e.g., Gregoire, C., et al. (1991) *PNAS*, 88, 8077 (reporting how to make and use heterodimeric αβ TCR chains that include a Cα ,Vα sequence joined to the C region of a kappa light chain (Cκ)). The reference also disclosed a VβCβCκ sequence. See also Weber, S., et al. (1992) *Nature*, 356: 793.

See also the following references for examples of how to make and use other scTCR molecules for use with this invention. Novotny, J. et al. *PNAS* (USA) 88, 8646 (1991); Soo Hoo, W.F. et al. *PNAS* (USA) 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plückthun, A., *J. Mol. Biol.* 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. *PNAS* (USA) 90 3830 (1993); PCT WO 96/13593; Ward, E.S. et al., *J. Mol. Biol.* 224, 885, (1992); Schlueter, C.J. et al. *J. Mol. Biol.* 256, 859 (1996); Mariuzza, R.A. and Winter, G., (1989) 264:7310; Gascoigne, N.R.J., et al., *PNAS* (USA) (1987), 84:2936.

Preferred TCR molecules for use in accord with of the invention are of sufficient size to allow for specifically binding of the TCR to the MHC antigen. In embodiments where the MHC antigen is a peptide-MHC molecule, the TCR molecules contain at least the CDR binding loops forming the MHC-peptide binding pocket. Useful α/β TCR molecules containing an MHC-peptide binding pocket preferably consists of at least the α chain variable domain (about amino acid 1 to about amino acid 110 to about 130 dependent on CDR length of the α chain) and β chain variable domain (about amino acid 1 to about amino acid 110 to about 130 dependent on CDR length of the β chain).

A more preferred TCR molecule for use in accord with this invention exhibits significant binding activity in what has been referred to as the standard TCR binding test. Preferably, the TCR molecule specifically binds its cognate MHC antigen molecule to a level that is at least about 50%, preferably at least about 80%, and more preferably at least about 90% to 99% as much as a suitable control. Examples of a suitable control include the TCR molecule as it occurs naturally (i.e., as a wild-type

heterodimer) or a recombinant TCR. In most instances, the control will be a fully soluble recombinant TCR, preferably a soluble single-chain TCR.

In such an assay, TCR interaction with immobilized MHC antigen is monitored by surface plasmon resonance (SPR) with a BIAcore 2000 system (BIAcore, Inc.). Typically, about 500-5000 resonance units (RU) of MHC antigen are coupled to a BIAcore CM5 chip by standard NHS/EDC coupling chemistry. The subject TCR and control TCR (in PBS) are separately injected at a flow rate of 10-50 μl/min over the MHC antigen surface. Multiple injections are carried out in which the concentration of the each TCR range between 2 μM to 20 μM. Based on the SPR binding curves, rate constant analyses are performed using the BIAevaluation 2.1 software (BIAcore, Inc.). The calculated association and dissociation rate constants, affinity constant and half-life of the control TCR:MHC antigen interactions are taken as 100%.

By the term "MHC antigen" or related phrase including the plural form used in a screening method of this invention is used in reference to an MHC-based molecule that specifically binds the TCR. The MHC antigen can consist of but is not limited to MHC/peptide complexes, MHC/superantigen complexes, MHC/lipid (or glycolipid) complexes or alloreactive (xenoreactive) MHC molecules. The MHC component of the MHC antigen can consist of but is not limited to classical or nonclassical MHC class Ia, class Ib or class II molecules or to MHC homologues (including human HLA molecules) (See Maenaka, K & Jones, E.Y. 1999. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:745-753). The MHC component used in a screening method of this invention is meant a naturally-occurring or recombinant molecule that includes at least a portion of the MHC chains up to and including the entire length of each chain. In one embodiment, these chains are sufficient to form a peptide (or lipid) binding groove or cleft that can specifically bind a presenting peptide (or lipid). In accord with this invention, the presenting peptide can be non-covalently bound to the peptide binding groove of an "empty" MHC component via stable hydrogen bonding. Such complexes are often referred to as being "loaded". Also in accord with this invention,

the MHC antigen molecule can include a covalently linked (i.e. fused) presenting peptide such as those class I and class II molecules disclosed in U.S. Pat. No. 5,869,270; the disclosure of which is incorporated herein by reference. Suitable MHC antigen molecules for use with this invention can be mono- or multi-valent as described below. In embodiments in which the MHC component is a naturally occurring or recombinant class I molecule, the MHC antigen molecule may further include a naturally occurring or recombinant β2- microglobulin molecule.

In another embodiment, the MHC antigen molecule can consist of naturally-occurring or recombinant molecules that includes at least a portion of the MHC chains and superantigen chain up to and including the entire length of each chain. These chains are sufficient to form a MHC/superantigen complex. Superantigens are proteins that are capable of binding to TCRs utilizing particular V gene segments, regardless of the nature of the other parts of the TCR. See Kotzin, B.L. et al (1993) *Adv. Immunol.* 54:99-166. Preferred superantigens of the invention include Mls antigens, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SPE-A, SPE-B, SPEC, ExFT and TSST.

In another embodiment, the MHC antigen molecule can consist of naturally-occurring or recombinant molecules that includes at least a portion of an alloreactive (xenoreactive) MHC chains up to and including the entire length of each chain. These chains are sufficient to form an alloreactive MHC complex. Alloreactive MHC molecules are non-self MHC molecules recognized by (self) T cells as foreign molecules. Binding of the TCR to the alloreactive MHC molecule may or may not be dependent on particular peptide antigens bound to the MHC molecule. See Obst, R. et al. (2000) *J. Exp. Med* 191:805-812.

Class I molecules are integral membrane proteins comprising a glycoprotein heavy chain having three extracellular domains (i.e. α1,α2 and α3), a transmembrane domain and a cytoplasmic domain. The heavy chain is non-covalently associated with a soluble subunit β2-microglobulin. The α1 and α2 domains of the heavy chain

fold together to form the peptide binding groove. The association between the heavy chain and β2-microglobulin helps to stabilize the peptide binding groove. In embodiments in which the MHC component is a class I molecule, the MHC component may consist of any combination of a naturally occurring or recombinant class I heavy chain (or fragments thereof) and a naturally occurring or recombinant β2- microglobulin molecule (or fragments thereof). In other embodiments, the MHC component can consist of a single chain construct of the class I heavy chain (or fragment thereof) and β2-microglobulin (or fragments thereof). The MHC component of the invention can consist of any fragment (in any molecular arrangement) of the class I heavy chain and/or β2-microglobulin sufficient to allow for formation of a functional MHC antigen (i.e. an MHC antigen capable of specific interaction with the TCR). The MHC component of the invention can also consist of a chimeric molecule comprised of any fragment (in any molecular arrangement) of the class II chains, class I heavy chain and/or β2-microglobulin sufficient to allow for formation of a functional MHC antigen.

Additional MHC antigen molecules suitable for use with the present invention have been disclosed in U.S. Patent application serial no. 08/776,084 entitled *MHC Complexes and Uses Thereof*, filed on January 17, 1997, which application is based on PCT application PCT/US95/09816 and is a continuation of U.S. Patent application no. 08/382,454, filed on February 1, 1995, which application is a continuation of U.S. Patent application no. 08/283,302, filed on July 29, 1994; the disclosures of which are incorporated herein by reference.

Particularly disclosed in the 08/776,084, PCT/US95/09816, 08/382,454, and 08/283,302 patent applications are a wide variety of heterodimeric MHC molecules (class I and class II) suitable for use with this invention. See also McCluskey, J. et al. *J. Immunol.* 141: 1451; PCT/US92/10030; and U.S. Pat. No. 5,820,866 to Kappler and Marrack (disclosing additional class I and class II MHC molecules); the disclosures of which are incorporated herein by reference.

Additionally suitable MHC antigen molecules have been disclosed in U.S. Patent application no. 08/960,190 entitled *Soluble MHC Complexes and Methods of Use Thereof*, filed on October 29, 1997, PCT WO 96/04314 and PCT 97/28191; the disclosures of which are hereby incorporated by reference.

Briefly, the applications disclose highly useful single-chain ("sc-") MHC class I and class II complexes suitable for use with this invention. Particularly disclosed are sc-MHC class I and class II complexes with recombinantly fused presenting peptides (referred to as sc-MHC peptide fusion molecules), empty sc-MHC molecules (referred to as having no recombinantly fused presenting peptides), and loaded sc-MHC complexes (referred to as including non-covalently attached presenting peptides).

More particularly disclosed in the 08/960,190, PCT WO 96/04314 and PCT 97/28191 applications is how to make and use a variety of sc-MHC molecules with a modified class II β2 chain and/or a fused Ig-C_L chain or suitable Ig-C_L chain fragment as provided. Also reported are what is referred to as "polyspecific" MHC complexes that have or do not have the modified class II β2 chain and/or the fused Ig-C_L chain or Ig-C_L chain fragment.

See also the U.S. Patent no. 5,869,270 to Rhode, P. et al. (disclosing additionally preferred sc-MHC molecules for use with this invention); the disclosure of which has already been incorporated herein by reference.

Particular MHC antigen molecules for use in accordance with the invention contain an MHC component of sufficient size to allow for specifically binding of the MHC antigen to the TCR. In embodiments where the MHC antigen is a peptide-MHC molecule, the MHC component contains at least a peptide binding groove. Useful class II MHC components containing a peptide binding groove consists of at least the class II α1 domain (about amino acid 1 to about amino acid 84 of the α chain) and β1 domain (about amino acid 1 to about amino acid 95 of the β chain).

Useful class I MHC components containing a peptide binding groove consist of at least the class I α1 and α2 domains (about amino acid 1 to about amino acid 182 of the heavy chain). In embodiments where the MHC antigen is an alloreactive MHC molecule, the MHC component contains at least the alloreactive MHC determinant and, in the case where alloreactivity is dependent on peptide, a peptide binding groove. The nature of the alloreactive MHC determinant and dependency on peptide vary depending on the TCR specificity and can be determined experimentally. See Obst, R. et al. (2000) *J. Exp. Med.* 191:805-812. In embodiments where the MHC antigen is a superantigen-MHC complex, the MHC component contains at least the superantigen binding site. The superantigen binding site on the MHC component lies outside of the peptide-binding groove and varies dependent on the superantigen component. See Kotzin, B.L. et al (1993) *Adv. Immunol.* 54:99-166. Methods for identifying suitable MHC antigen molecules include standard MHC antigen binding tests described below.

A more preferred MHC antigen molecule for use in accord with this invention exhibits significant binding activity in what has been referred to as the standard MHC antigen binding test. Preferably, the MHC antigen molecule specifically binds its cognate TCR molecule to a level that is at least about 70%, preferably at least about 80%, and more preferably at least about 90% to 99% as much as a suitable control. Examples of a suitable control include the MHC antigen molecule as it occurs naturally (i.e., as a wild-type heterodimer) or a recombinant MHC antigen molecule. In most instances, the control will be a fully soluble recombinant MHC antigen molecules, preferably a soluble single-chain MHC antigen molecule. Methods for making and using such molecules have been fully described above including the U.S. Pat. No. 5,869,270.

In such an assay, MHC antigen interaction with immobilized TCR is monitored by surface plasmon resonance (SPR) with a BIAcore 2000 system (BIAcore, Inc.). Typically, about 500-5000 resonance units (RU) of TCR are coupled to a BIAcore CM5 chip by standard NHS/EDC coupling chemistry. The subject

MHC antigen and control MHC antigen are separately injected in PBS at a flow rate of 10-50 μl/min over the TCR surface. Multiple injections are carried out in which the concentration of the each MHC antigen range between 2 μM to 20 μM. Based on the SPR binding curves, rate constant analyses are performed using the BIAevaluation 2.1 software (BIAcore, Inc.). The calculated association and dissociation rate constants, affinity constant and half-life of the control TCR:MHC antigen interactions are taken as 100%.

As discussed, in certain invention embodiments it will be useful to use MHC molecules that include lipid, glycolipid, alloreactive, xenoreactive and/or superantigen components.

In embodiments in which MHC/lipid and glycolipid molecules are of interest, there is an MHC class I-like family of molecules that can be used with this invention. Preferred members of that family are known as the CD1 family. There is recognition that this specific family can present bacterial lipid antigens to T cells. Specific examples of these complexes include CD1c/hexosyl-1-phosphoisoprenoid, CD1c/mannosyl-beta1-phosphodolichol, CD1b/lipoarabinomannan, CD1b/mycolic acid lipid. See generally Moody DB, et al. (1999) *Immunol Rev.* 172:285-96 as well as references disclosed therein.

Particular alloreactive MHC molecules for use in accord with this invention can include nearly any human MHC molecule present in an organ or tissue graft. Preferably, that molecule is not shared by the host (leading to host-versus-graft T cell responses) or any MHC molecules present in the host that are not shared by the graft (leading to graft-versus-host T cell responses). Generally, the graft survival is most dependent on lowering the alloreactive response to MHC class II antigens. More specific alloreactive MHC molecules include those predominant in the Caucasian population, e.g., HLA-A1, HLA-A2, HLA-B7, HLA-B35, HLA-B44, HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR6, HLA-DR7, HLA-DQ6,

HLA-DQ7 and HLA-DQ8. See generally *Cellular and Molecular Immunology* 3rd Ed. Abbas, Lichtman, Pober, Abbas and Schmitt, W.B. Saunders, Philadelphia, 1997.

In addition, it is possible to use many xenoreactive MHC molecules with this invention including xenograft MHC molecules. More specific examples include swine MHC molecules in swine xenograft organ transplants, human MHC molecules reactive to xenograft T cells. Preferred human MHC molecules include those listed above. Preferred swine MHC molecules include SLA-1 to -6, SLA-DR, and SLA-DQ molecules. See generally Chardon P, et al. (1999) *Immunol Rev.* 167:179-92 and references disclosed therein.

Additionally useful TCR molecules and MHC antigens molecules for use with the present invention are disclosed in the Examples Section, below.

In another aspect, the present invention provides suitable test compounds detected and identified by the methods provided herein.

As discussed, practice of the invention now makes it possible to detect test compounds that modulate interactions between the TCR and MHC antigen molecule in a protein: protein, protein:cell or cell:cell assay format. As also discussed, relevant TCR and MHC antigen interactions, generally detected through the resulting immune complex, can be measured directly or indirectly as needed.

Particular methods of this invention are designed to detect and identify test compounds that interact with (e.g., bind to) a TCR molecule. The term "interact" is meant to include, but is not limited to the extracellular domain (ECD-TCR) or the cytoplasmic domain (CD-TCR) of the TCR molecule. Preferred interactions will occur at or near the binding site, pocket or cleft responsible for specific binding to a cognate MHC antigen molecule. Thus test compounds of special interest will interact with the TCR pocket or cleft that can bind to superantigen or peptide antigen in the context of a suitable MHC molecule or to an alloreactive MHC molecule.

Additional methods are also designed to identify compounds that interact with (e.g., bind to) an MHC antigen molecule. Thus the term "interact" in the context of the MHC antigen molecule includes, but is not limited to, the extracellular domain (ECD-MHC) or the cytoplasmic domain (CD-MHC) of the MHC molecule, the peptide antigen or the superantigen. Preferred interactions will occur at or near the MHC peptide (or lipid) binding groove and other sites impacting specific binding with the TCR molecule. More particular compounds will often interact with the MHC peptide binding groove or near that groove.

Additional methods are also designed to identify compounds that interact with (e.g., bind to) an TCR:MHC antigen complex. Thus the term "interact" in the context of the TCR:MHC antigen complex includes, but is not limited to, the ECD-TCR, the CD-TCR, the ECD-MHC, the CD-MHC, the peptide antigen or the superantigen. Preferred interactions will occur at or near sites impacting the stability of the complex or at or near sites impacting the ability of the complex to form multimers.

Suitable test compounds for use in accord with the screening methods of this invention include, but are not limited to, peptides, polypeptides, antibodies and fragments thereof, and other organic compounds (e.g., peptidomimetics and non-peptidomimetics) that bind to the TCR molecule, the MHC antigen molecule, or both; and either mimic the activity triggered by specific binding between the TCR and MHC antigen molecule (i.e., an agonistic compound) or inhibit the activity triggered (i.e., an antagonistic compound); as well as peptides, antibodies or fragments thereof, and other organic or in organic compounds that can increase or decrease specific binding between a desired TCR molecule and its cognate MHC antigen molecule.

Such compounds can particularly include, but are not limited to, peptides such as, for example, soluble peptides, including but not limited to members of random peptide libraries; (see, e.g., Lam, K. S. et al., 1991, *Nature* 354:82-84; Houghten, R. et al., 1991, *Nature* 354:84-86), and combinatorial chemistry-derived molecular library made of D- and/or L- configuration amino acids, phosphopeptides (including, but not limited to, members of random or partially degenerate, directed phosphopeptide

libraries; see, e.g., Songyang, Z. et al., 1993, *Cell* 72:767-778). Also contemplated are compounds that include or consist of antibodies (including, but not limited to, polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric or single chain antibodies, and Fab, $F(ab')_2$ and Fab expression library fragments, and epitope-binding fragments thereof), as well as small, medium and large organic or inorganic molecules. See U.S. Pat. No. 5,980,892, for example.

For more specific disclosure relating to making and using a variety of molecular libraries suitable for use with this invention see e.g., U.S. Pat. Nos. 6,001579 (tag encoded combinatorial libraries); 5,573,905 (encoded combinatorial libraries); 5,639,603 (diverse molecular libraries); 5,880,972 (methods and apparatus for making combinatorial chemistry libraries); the disclosures of which are incorporated herein by reference. See also Nielsen, J. et al. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115: 9812; Brenner, S. and R. Lerner (1992) *PNAS (USA)* 89: 5381-5383; and Pinella, C. et al. (1992) *Biotechniques*, 13: 901. See also EPO publication no. 0 432 691 A1 (disclosing certain peptides that bind MHC molecules).

Alternatively, or in addition, many useful chemical libraries can be obtained from commercial vendors such as Chembridge, ArQule, CombiChem, Pharmacopeia, Trega Biopharmaceuticals, and Tripos.

However, in some instances a more focused screen of test compounds may be desired. In many of these cases, standard computer and searching technologies can permit pre-identification of candidate compounds, as well as manipulation of previously identified compounds. Such compounds can thus be "pre-screened" for capacity to modulate interaction between a given TCR and MHC antigen molecules. Such "pre-screening" of candidate compounds can be accomplished by performing the following general steps:

1. For example, having found such TCR and MHC antigen molecules that specifically interact to form an immune complex, the active sites or regions are

identified. Such active sites might typically be ligand binding sites, such as the interaction domains of the TCR molecule, MHC antigen molecule; or both molecules. The active site can be identified using standard methods including, for example, from characterization of the amino acid sequences of the TCR or MHC antigen polypeptide chains or from study of complexes of the TCR with its cognate MHC antigen. In the former case, sequence homology comparison with known active sites on other TCR or MHC antigen molecules can be used to find the active site. In the latter case, mutational, chemical or X-ray crystallographic methods can be used to find the active site by finding where on the TCR or MHC antigen the cognate ligand is found.

2. Next, the three dimensional geometric structure of the active site is determined. This can be done by known methods, including X-ray crystallography, which can determine a nearly complete molecular structure at the atomic level. On the other hand, solid or liquid phase NMR can be used to determine certain intra-molecular distances. Any other experimental method of structure determination can be used to obtain partial or complete geometric structures. The geometric structures may be measured with a complexed ligand, natural or artificial, which may increase the accuracy of the active site structure determined.

If an incomplete or insufficiently accurate structure is determined, the methods of computer based numerical modeling can be used to complete the structure or improve its accuracy. Nearly any recognized modeling method may be used, including parameterized models specific to particular biopolymers such as proteins or nucleic acids, molecular dynamics models based on computing molecular motions, statistical mechanics models based on thermal ensembles, or combined models. For most types of models, standard molecular force fields, representing the forces between constituent atoms and groups, are often necessary, and can be selected from force fields known in physical chemistry. The incomplete or less accurate experimental structures can serve as constraints on the complete and more accurate structures computed by these modeling methods.

3. Finally, having determined the structure of the active site, either experimentally, by modeling, or by a combination, candidate modulating compounds can be identified by searching databases containing compounds along with information on their molecular structure. Such a search seeks compounds having structures that match the determined active site structure and that interact with the groups defining the active site. Such a search can be manual, but is preferably computer assisted. Compounds found from this search can be viewed as those with potential to modulate TCR:MHC antigen interactions.

Alternatively, these methods can be used to identify improved modulating compounds from an already known modulating compound. The composition of the known compound can be modified and the structural effects of modification can be determined using the experimental and computer modeling methods described above applied to the new composition. The altered structure is then compared to the active site structure of the compound to determine if an improved fit or interaction results. In this manner systematic variations in composition, such as by varying side groups, (e.g., methyl, hydroxyl, carbonyl, carboxyl, hydrogen, and the like) can be quickly evaluated to obtain modified modulating compounds or ligands of improved specificity or activity.

Examples of molecular modeling systems include, but are not limited to, the CHARMM and QUANTA programs (Polygen Corporation, Waltham, Mass.). CHARMM performs the energy minimization and molecular dynamics functions. QUANTA performs the construction, graphic modeling and analysis of molecular structure. QUANTA allows interactive construction, modification, visualization, and analysis of the behavior of molecules with each other. See the following references for general disclosure relating to computer modeling of compounds such as drugs that are interactive with specific-proteins: Rotivinen, et al., 1988, *Acta Pharmaceutical Fennica* 97:159-166; *Ripka, New Scientist* 54-57 (Jun. 16, 1988); McKinaly and Rossmann, 1989, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxiciol.* 29:111-122; Perry and Davies, *OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design* pp.

189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); and Lewis and Dean, 1989 *Proc. R. Soc. Lond.* 236:125-140 and 141-162.

Other computer programs that screen and graphically depict chemicals are available from companies such as BioDesign, Inc. (Pasadena, Calif.), Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada), and Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario). Although these are primarily designed for application to drugs specific to particular proteins, they could in principle be adapted to design drugs that modulate TCR and MHC antigen interactions. Such drugs could then be further screened in accordance with the methods of this invention.

Although the foregoing computer assisted methods can be used in some embodiments of this invention to "pre-screen" candidate compounds, it will often be more desirable to use the present methods with known libraries of candidate compounds. Alternatively, highly useful chemical libraries can be made and used according to established procedures. Such libraries may include, without limitation, natural products or synthetic chemicals, and biologically active materials, including amino acids (including modified amino acids), peptides, polypeptides, and proteins. Such libraries serve as a rich source of candidate compounds that can be selected to identify those acting as antagonists or agonists of interactions between the TCR and MHC antigen molecules. See generally Drews J. (2000) *Science* 287:1960-1964, Schreiber S.L. (2000) *Science* 287:1964-1969.

Optimal practice of the present invention usually involves use of an acceptable in vitro detection format which format, as discussed, can be direct or indirect as needed. A preferred detection format is designed to detect compounds that interact with (e.g., bind to) the subject TCR molecule, MHC antigen molecule; or both. Such detection formats usefully monitor and preferably quantify presence of the immune complex in the presence and absence of the test compound.

As mentioned, the invention is compatible with one or a combination of formats for detecting the immune complex. For example, presence of the immune

complex (or even one of the control immune complexes) can be achieved according to established direct or indirect detection principles. Those skilled in the field of the invention will be able to determine operative and optimal assay conditions for particular combinations of TCR and MHC antigen molecules by virtue of the guidance provided herein and sometimes a modest level of routine experimentation.

With respect to particular formats, one way to detect presence of the immune complex is to detectably label an antibody capable specifically binding the complex. An illustrative label is linking the antibody, usually a monoclonal antibody, to an enzyme and using the detectably labeled antibody an enzyme immunoassay (EIA). See Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)", 1978, *Diagnostic Horizons* 2:1-7, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; ; Voller, A. et al., 1978, *J. Clin. Pathol.* 31:507-520; Butler, J. E., 1981, *Meth. Enzymol.* 73:482-523; Maggio, E. (ed.), 1980, *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla.,; Ishikawa, E. et al., (eds.), 1981, *Enzyme Immunoassay*, Kgaku Shoin, Tokyo).

See also Harlow and Lane (eds.) in: *Antibodies: A Laboratory Manual* 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; and Bishop, G.A. et al. (1992) in *Biotechniques* 12: 326-330 (disclosing an cellular ELISA for detection of cell surface material); and Kelly, T.A. et al. (1999) *J. of Immunol.* 5173-5177; the disclosures of which is incorporated herein by reference.

In this embodiment of the detection method, the enzyme which is bound to the antibody will react with an appropriate substrate, preferably a chromogenic substrate, in such a manner as to produce a chemical moiety that can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorimetric or by visual means. Enzymes which can be used to detectably label the antibody include, but are not limited to, malate dehydrogenase, staphylococcal nuclease, delta-5-steroid isomerase, yeast alcohol dehydrogenase, alphaglycerophosphate, dehydrogenase, triose phosphate isomerase, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, asparaginase, glucose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucoamylase and

acetylcholinesterase. The detection can be accomplished by colorimetric methods which employ a chromogenic substrate for the enzyme. Detection may also be accomplished by visual comparison of the extent of enzymatic reaction of a substrate in comparison with similarly prepared standards.

Good detection may also be achieved by using any of a variety of other immunoassays. For example, by radioactively labeling the antibodies or antibody fragments capable of specifically binding the immune complex, it is possible to detect TCR:MHC antigen interactions in the methods of this invention through the use of a radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, which is incorporated by reference herein). The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a gamma counter or a scintillation counter or by autoradiography.

Also, it is possible to label the antibody or fragment thereof with a fluorescent compound. When the fluorescently labeled antibody or fragment is exposed to light of the proper wave length, its presence can then be detected due to fluorescence. Among the most commonly used fluorescent labeling compounds are fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde and fluorescamine.

Further, the antibody or fragment can also be detectably labeled using fluorescence emitting metals such as ^{152}Eu, or others of the lanthanide series. These metals can be attached to the antibody using such metal chelating groups as diethylenetriaminepentacetic acid (DTPA) or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA).

For example, see the HTRF (homogeneous time-resolved fluorescence) antibody reagent for assay development and high throughput screening using europium provided by the Packard Instrument Company. See also U.S. Pat. no.

4,568,649; EPO 0154734 and Japanese patent application no. 84, 52452; the disclosures of which are incorporated herein by reference.

Other methods for detectably labeling the antibody or fragment are well known to those working in this field. For example, the antibody can be detectably labeled by coupling it to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged antibody is then determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of particularly useful chemiluminescent labeling compounds are luminol, isoluminol, theromatic acridinium ester, imidazole, acridinium salt, adamantyl dioxetamer, thioxene derivatives and oxalate ester. Further, the antibody or fragment can also be detectably labeled using photosensitizer compounds. See e.g., U.S. Pat. no. 5,807,675 and references disclosed therein.

Also envisioned are detection formats based, in part or in whole, on biotinylation of molecules and using streptavidin or conjugates thereof to visualize the biotinylated molecules. More specific examples of this format are provided in the following Examples.

Likewise, a bioluminescent compound may be used to detectably label the antibody or fragment used to detect presence of the immune complex. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in, which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Important bioluminescent compounds for purposes of labeling are luciferin, luciferase and aequorin.

The antibody or fragment thereof can also be labeled with a protein that has fluorescent properties. Examples of such proteins include green fluorescent protein and its derivatives.

Further, a bioeffector tag may be used to detectably label the antibody or fragment used to detect presence of the immune complex. The bioeffector tag is a compound that is capable of effecting a measurable biological response, i.e. a cellular responses detected *in vitro*. Examples of useful bioeffector tags are natural and artificial ligands or antibodies (or fragments thereof) directed against cellular receptors. Particularly useful bioeffector tags are cytokines such as IL-2.

Examples of other suitable protein (and non-protein) tags are disclosed in the U.S. Pat. Appl. No. 08/813,781 filed on March 7, 1997, as well as the U.S. Pat. No. 09/422,375, filed on October 21, 1999; the disclosures of which are incorporated herein by reference. Particular examples of such probes include EE, myc, 6Xhis. Also preferred are tags that are specifically bound by a protein including an antibody, cell receptor, protein A, protein G, avidin, streptavidin; or a functional fragment thereof. Additionally useful tags include those which can be directly or indirectly modified by one or more proteolytic enzymes, protein kinase, biotin ligase; or a functional fragment thereof.

Alternatively, it may be useful in some embodiments to label the immune complex directly. This can be accomplished by a variety of methods including suitably labeling at least one of the TCR molecule, MHC antigen molecule, or the test compounds. When the molecule to be labeled is a protein, any of the methods described herein for labeling antibodies can be similarly to label TCR and/or MHC antigen molecules. Use of radionuclides (radioactive isotopes) such as those of iodine, e.g., ^{125}I or ^{131}I may be indicated. In embodiments in which the test compounds are detectably labeled, choice of an appropriate radionuclide will depend, e.g., on the chemical properties of the test compound and the degree of sensitivity required. Such radionuclides can include, e.g., ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P and the like.

A particular method of labeling MHC peptides has been disclosed in EPO 0 432 691 A1. Additional peptides have been disclosed. See Hemmer et al. (1998) *J. of Immunol.* 3631-3636 and U.S. Pat. No. 5,614,192 (disclosing therapeutic T cell receptor peptides).

Further specific detection formats are well-suited for use with the present invention.

More particular detection formats involve detecting presence of the immune complex indirectly, e.g., by monitoring and often quantifying at least one cell response. That cell response is pre-determined to be impacted by presence of the immune complex. Thus, in many embodiments of the invention, detection of the cell response in a method is taken to be indicative of presence of the immune complex. Examples of suitable cell responses include increases or decreases in at least one of cell adhesion, membrane potential, intracellular or extracellular ion concentration, intracellular kinase activity, phosphatase activity, intracellular protein transport, endogenous or heterologous gene expression, protein production or secretion including the production of at least one cytokine, cell proliferation, apoptosis, RNA synthesis, or DNA synthesis. See generally *Cellular and Molecular Immunology* 3rd Ed. Abbas, Lichtman, Pober Abbas and Schmitt, W.B. Saunders,Philadelphia, 1997.

Of course in embodiments of the present invention in which a protein:protein screening method is employed it may be more useful to monitor directly or indirectly formation of the immune complex along lines previously discussed.

However in embodiments in which at least one of the TCR or MHC antigen molecules is manipulated in a cell based format it may, in some instances, be more useful to detect at least one of the cell responses as being indicative of the immune complex. In one embodiment, cells expressing the TCR molecule, e.g., T cells, T cell hybridomas or cells expressing recombinant TCRs, are monitored for manifestation of at least one of the cell responses.

By way of illustration, in embodiments in which a cell is expressing the TCR molecule at least one of the cell responses detected can be cell mediated synthesis and secretion of at least one cytokine, e.g., interleukin-2 (IL-2). In this example of the invention, production of the cytokine (or more than one cytokine), when compared

with to one or more suitable controls is taken to be indicative of productive TCR:MHC antigen interactions and more specifically, presence of the immune complex. One or a combination of different strategies including methods discussed above can be used to detect presence of the cytokine in a particular assay format. In a more particular example, the cytokine is detected in an antibody "sandwich" type assay in which a first antibody, usually a monoclonal antibody, is coated on to a solid support where it specifically binds the cytokine and a second antibody, also usually a monoclonal antibody, binds the immobilized cytokine at a different site than the first antibody. In many embodiments, detectably labeling at least the second antibody will be generally preferred.

See Schwarz, M.K. et al. (1999) in *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 3: 407-417 for a discussion relating to cytokines.

In additional embodiments, cell responses resulting from the formation of the TCR:MHC antigen immune complex may be detected as changes in gene expression. Changes in gene expression can be measured by a variety of methods, including measurement of transcription activity or messenger RNA levels of inducible or repressible genes. In addition, changes in promoter activity can be examined using endogenous or exogenous "reporter" genes. For example, a reporter construct can be generated in which a TCR responsive promoter element such as the IL-2 promoter is linked to the reporter gene for a detectable protein such as firefly luciferase or green fluorescent protein. The construct could then be stably introduced into a cell line expressing TCR on its surface. In these cells, induction of the reporter gene transcription and the resulting increase in luciferase activity, when compared with to one or more suitable controls, is taken to be indicative of productive TCR:MHC antigen interactions and more specifically, presence of the immune complex. Luciferase activity can be measured by standard methods for detecting bioluminescent following luciferase-dependant oxidation of the luciferin substrate. For example, assay reagents (Steady-Glo™) specifically designed for measuring luciferase activity in high throughput screening formats are available from Promega Corp.

In yet additional embodiments, cell responses resulting from the formation of the TCR:MHC antigen immune complex may be detected as changes in intracellular ion concentrations. For example, formation of the TCR:MHC antigen complex results in increases in intracellular calcium ion concentration and acidification of the T cell. The level of these responses correlates with the ability of the MHC antigen to act as an agonist, partial agonist and antagonist (See Wulfing, C. et al. 1997. *J. Exp. Med.* 185:1815-1825). In this example of the invention, changes in intracellular ion concentrations, when compared with to one or more suitable controls is taken to be indicative of productive TCR:MHC antigen interactions and more specifically, presence of the immune complex. One or a combination of different strategies can be used to detect changes in intracellular ion concentrations in a particular assay format. In a more particular example, intracellular calcium ion mobilization is detected in using a fluorescein-based reagent, such as Fluo-3 AM, which increases its fluorescence intensity approximately 100-fold upon binding Ca^{2+}. High throughput screening methods to detect intracellular calcium mobilization using the Fluo-3 AM reagent and a fluorometric imaging plate reader (See, for example, Jurewicz, A. et al. (1999) *Genet. Eng. News* 19, **44**) can be used to study cellular responses in T cells mediated by the productive TCR:MHC antigen complex formation.

As will be readily apparent to those of skill in this particular field, choice of a particular detection format will be guided by recognized parameters including the TCR and MHC molecules of interest, the affinity and/or affinity of those molecules for each other, and the level of assay specificity required for optimal detection of the test compounds.

In a particular embodiment, practice of the present invention for the specific detection of particular immune complexes may be aided by the inclusion of suitable internal controls. Such internal controls may include control complexes formed between the TCR and non-cognate MHC antigen molecule or between the MHC antigen and a non-cognate TCR. Generally stated, suitable non-cognate molecules can be naturally-occurring or recombinant and can usefully encompass a range of fully soluble or cell-anchored (membrane-bound) molecules. The amount of the

control complex formed represents the level of nonspecific association between the TCR (or MHC antigen) and its non-cognate pair and can be used as the background control value when evaluating specific interactions between the TCR and cognate MHC antigen molecule.

In embodiments in which what has been referred to as "high throughput" or "ultra throughput" screening methods are desired, particular detection formats may be very useful. Examples of such formats include, but are not limited to, cell free systems such as those embodiments of the invention using fully soluble TCR and MHC molecules. More specific examples of such formats include, but are not limited to, cell free assays based on optical, fluorescence or luminescence intensity, time resolved fluorescence, proximity-based energy transfer (including fluorescence resonance energy transfer assays, scintillation proximity assays and luminescence proximity assays), fluorescence polarization spectroscopy, and fluorescence correlation spectroscopy. See e.g., Silverman, L. et al. (1998) *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 2: 397-403.

A variety of cell based detection formats have also been disclosed that can be used in accord with this invention. Such formats more specifically encompass cell-based assays, including, but not limited to, optical, fluorescence or luminescence intensity-based assays, fluorescent resonance energy transfer, time resolved fluorescence, luminescent and scintillation proximity assays, and what is known as two-hybrid and three-hybrid systems. See e.g., Fernandes, P.B (1998) *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 2: 597-603; Gonzalez, J. E. and Negulescu, P.A. (1998) *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 9: 624-631; Jenh, C-H. (1998) *Analytical Biochem.* 256: 47-55; Wu, P. et al. (1997) *Analytical Biochem.* 249: 29-36 .

Additionally suitable detection methods particularly in embodiments using cell based formats include fluorescence activated cell sorting (FACS) techniques. See e.g., Altman, J.D. et al. (1996) *Science* 274: 94-96.

Compounds detected and identified by the method may be useful, for example, in decreasing or increasing formation of the immune complex that includes the TCR and MHC antigen molecules; decreasing or increasing the stability of the immune complex, or decreasing or increasing the avidity of the TCR or MHC antigen molecule for the other. Other uses of the detected compounds include use in the modulation of *in vivo* TCRs and MHC antigen molecules. More specific in vivo methods including methods for modulating an immune response *in vivo* are discussed below.

Once a particular detection format (or group of formats) has been selected, an important consideration in performing the methods of this invention is the appropriate preparation of at least one reaction mixture including at least one TCR molecule and at least one MHC antigen molecule of interest. In one embodiment, the MHC antigen molecule consists of an MHC component with a covalently linked (i.e. fused) presenting peptide. However in other embodiments it may be more useful to generate a peptide-MHC complex by loading the peptide onto the MHC molecule by recognized methods. In other embodiments, the MHC component can contain a covalently linked superantigen. Alternatively, the MHC component can be complexed to the superantigen chain by recognized methods. At least one test compound is added to the mixture and the mixture is treated under conditions sufficient to allow the TCR and MHC antigen molecules to interact. Preferably, and in the absence of a test compound that antagonizes TCR:MHC antigen interactions, the TCR and MHC antigen molecules form a plurality of specific non-covalent bonds that facilitate formation of the immune complex. If desired, that immune complex can be removed from the reaction mixture and analyzed, e.g., by methods already discussed. If desired, the immune complex can be detected using sedimentation centrifugation, electrophoresis, filtration, chromatography or a related molecular sizing technique.

The particular TCR and MHC antigen molecules employed in methods of this invention will vary depending on recognized parameters, e.g., the goals of the

screening assay, the sensitivity desired, the size of the pool of test compounds, and whether a fully soluble or cell-based screening format has been selected.

For example, in many embodiments, it will be useful to express the TCR molecule using a cell based approach including use of specific cells provided in the Examples, which follow. In this example of the invention, the MHC antigen molecule can be fully soluble although the molecule can be expressed by a suitable APC or other cell as needed. In embodiments in which the TCR molecule and/or the MHC antigen molecules include full-length or nearly full-length chains, detection of the immune complex is facilitated by detecting the TCR molecule, the MHC antigen molecule, or both molecules, using, e.g., the direct or indirect detection formats already mentioned.

More particular methods of this invention can be conducted using one or a combination of specific reaction formats. In one embodiment of the method, a suitable MHC antigen molecule is immobilized onto a solid support or phase. The immobilized MHC antigen molecule is subsequently contacted by an appropriate TCR molecule, usually its cognate, which can be detectably labeled if desired. At least one test compound is then brought into contact with the TCR and MHC antigen molecules, although in some instances it may be useful to add the test compound prior to adding the TCR molecule including prior to immobilizing the MHC antigen molecule to the solid phase. Alternatively, the test compound can be added after formation of the immune complex. As a control, the TCR molecule, is added to another reaction chamber in which the MHC antigen molecule is bound to the same or similar solid support. However instead of adding the test compound, an aliquot of a suitable blanking solution such as water, buffer or the like is added usually in a volume similar to that used in the experimental reaction. Next, the immune complex is detected as in the experimental reaction. In these embodiments of the method, detection of the immune complex can be achieved using direct or indirect detection formats as needed. For example, the TCR molecule, MHC antigen molecule, test compound, or all three molecules may be directly or indirectly labeled to facilitate good detection of the immune complex. Test compounds are then selected by criteria

discussed above including capacity to increase or decrease formation and/or stability of the immune complex.

By the phrase "solid support" or "solid phase" is meant nearly any support capable of binding a TCR or MHC antigen molecule. Well-known supports or carriers include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, gabbros, magnetite, dendrimers and silicon wafers. The nature of the carrier can be either soluble to some extent or insoluble for the purposes of the present invention. The support material may have virtually any possible structural configuration so long as the coupled molecule is capable of binding to an antigen or antibody. Thus, the support configuration may be spherical, as in a bead, or cylindrical, as in the inside surface of a test tube, or the external surface of a rod. Alternatively, the surface may be flat such as a sheet, test strip, etc. Preferred supports include polystyrene beads. Bead-based reagents are commercially available in a wide variety of formats that allow for high capacity binding/capture of recombinant proteins, efficient detection and the use of different separation and homogeneous assay methods. For many high throughput screening methods, bead-based reagents are advantageous. Those skilled in the field of the invention will know many other suitable carriers for binding TCR and MHC antigen molecules, or will be able to ascertain the same by use of routine experimentation.

An illustrative example of the invention is represented schematically in Figure 2. In Figure 2, a small molecule inhibitor substantially blocks interaction between an MHC antigen consisting of a peptide-MHC ligand of an APC and a TCR expressed by a suitable cell. In this embodiment, the TCR:MHC antigen interaction is assisted by another receptor such as a CD molecule. Presence of the small molecule inhibitor blocks a subject immune response. However in the absence of the small molecule inhibitor that immune response is manifested.

Another embodiment of the invention is shown in Figure 3. In this example, a subject TCR molecule is detectably labeled and the test molecules are added to the

reaction in a "high throughput" or "ultra throughput" screening format. It is emphasized however that such high volume screening is not necessary to practice this invention but may help analyze large pools of test compounds. In this example of the invention, a plurality of reaction chambers will often be used in which each reaction chamber includes the detectably labeled TCR molecule, the immobilized MHC antigen molecule and at least one and preferably about one test molecule per reaction chamber. A test compound detected in accord with this embodiment will facilitate a significant loss of signal indicative of a corresponding reduction in the presence of the immune complex in the presence of the test compound. In some embodiments, pools of compounds can be used where the concentration of each compound in the pool exceeds the limits of detection of the assay.

Alternatively, the particular screening method shown in Figure 3 can be adapted so that the MHC antigen molecule is detectably labeled and the TCR molecule is immobilized to the solid support or phase. In another embodiment, the test compound can be detectably labeled instead of or in addition to the TCR molecule and/or the MHC antigen molecule. Choice of a particular screening paradigm will be guided by parameters already discussed including the goals of the screening assay and the level of sensitivity needed.

For example, the screen illustrated in Figure 3 could be readily adapted to detect antagonists of a specific autoimmune disorder. In this embodiment, the TCR and MHC antigen molecules employed in the screen will be pre-selected to consist of those recognized to participate in or are suspected of participating in the immune disorder. Examples of such TCR and MHC antigen molecules are provided herein including the Examples and discussion, which follows.

It is emphasized that the precise order of manipulating any of the TCR molecules, MHC antigen molecules, or test compounds in accord with this invention is usually not important so long as desired screening results can be readily met. That is, when it is desirable to test compounds for capacity to modulate formation of the immune complex, it will often be very useful to add those compounds prior to or

during addition of the TCR and MHC antigen molecules. However in embodiments in which the screening method is designed to detect test compounds that modulate previously formed immune complexes, the test compounds can be added prior to, during, or after the TCR and MHC antigen molecules are combined as required. Thus the order of addition of components in a particular assay setting will be guided by recognized parameters including the specific objectives of the screening format implemented.

In many instances, what is referred to in the field as "titre" or "microtiter" plate may conveniently be utilized as the solid phase. A 96 well microtitre plate will often be preferred however plates with more wells may be indicated for more comprehensive screening paradigms. The anchored component may be immobilized by non-covalent or covalent attachment in accordance with accepted practice. For example, non-covalent attachment may be accomplished by simply coating the solid surface with a solution of the TCR or MHC antigen protein for an amount of time necessary to bind same to the solid phase. Alternatively, an immobilized antibody, preferably a monoclonal antibody, specific for the protein to be immobilized may be used to anchor the protein to the solid surface. The surfaces may be prepared in advance and stored if needed.

More specifically, practice of the invention can involve adding the nonimmobilized component to the coated surface containing the anchored component (which may be the TCR molecule or the MHC antigen molecule). After the reaction is complete, unreacted components are removed (e.g., by washing) under conditions such that any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways that involve direct or indirect detection formats. Where the previously nonimmobilized component is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that immune complexes between the TCR and MHC antigen molecules was productive. Where the previously nonimmobilized component is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; e.g., using a labeled antibody specific for the previously

nonimmobilized component (the antibody, in turn, may be directly labeled or indirectly labeled with a labeled anti-Ig antibody).

In another embodiment of the invention, a suitable MHC antigen molecule is immobilized onto a suitable solid phase such as a 96 well microtitre plate. In this example, the MHC antigen molecule consists of an MHC component that carries a covalently fused presenting peptide. Alternatively, the MHC antigen molecule can consist of a complex in which case the presenting peptide is preferably loaded onto the MHC component before conducting additional manipulations. In other embodiments, the MHC antigen can consist of an MHC component complexed with a covalently linked or unlinked superantigen. After about 12 to about 48 hours of incubation to help maximize the immobilization, the MHC antigen molecule is removed from the plate and the wells filled with a suitable cell culture medium such as DMEM, IMDM and the like. Next, the test compound is added to each well before or during addition of cells expressing the cognate TCR molecule. The cells are then incubated for a time sufficient to respond to the bound MHC antigen molecule, generally between from about a few hours up to about 3 days or more. A preferred cell response for detecting presence of the immune complex is cytokine production, and preferably IL-2 production.

For example, Figure 4 shows a desired MHC antigen molecule immobilized on a solid support such as the multi-well plates mentioned previously. In this embodiment, the MHC antigen molecules consist of an MHC component that is covalently linked presenting peptide. However as has been mentioned, empty MHC molecules can be used in this method in embodiments in which loading with the presenting peptide is preferred. In other embodiments, the MHC antigen can consist of an MHC component complexed with a covalently linked or unlinked superantigen. In this example of the invention, suitable cells expressing a desired TCR molecule such as naturally-occurring T cells or recombinant T cell hybridomas, are contacted to the immobilized MHC antigen molecules. At least one or more test compounds can be screened according to a desired format, preferably one of the "high throughput" or "ultra throughput" already discussed. The test compounds can be added at nearly any

point of the assay including before, during or after addition of the cells to the wells or immobilization of the MHC antigen molecule to those wells. In this illustration of the invention, the monitored cell response is production of IL-2. As can also be seen in Figure 4, in the absence of a suitable test compound, specific binding between the TCR and the MHC antigen molecules is productive and leads to formation of an immune complex. That immune complex triggers T cell activation and production of the IL-2 cytokine. However, binding of a suitable test compound such as an antagonist of formation of the immune complex reduces the cell response and resulting IL-2 production from the T cells. The test compound is thus detected and selected from the other compounds by observing a reduction in the cytokine production.

In a more particular embodiment, the cytokine produced by the cells and secreted into the culture media is detected by transferring the culture media to wells that had been coated with a antibody specific to the cytokine. After an appropriate incubation period to allow binding of the cytokine to the immobilized antibody (i.e. 2 hours at 25°C), the culture media in each well is removed (by washing in PBS) and a detectably labeled antibody is added to the wells which antibody preferably binds the cytokine molecule. After incubating the labeled antibody, for example, for about a few hours up to a day or so, the wells are treated by one or a combination of different reagents suited to visualize binding of the labeled antibody to the cytokine molecule. A number of acceptable visualization formats have already mentioned including those involving generation of a chromogen. As mentioned, one cytokine is interleukin-2 (IL-2) although the present screening methods are compatible with the detection of other detectable molecules indicative of the cell response including other cytokines.

Another embodiment of the invention is intended to be one example of "proof of principle". It is shown schematically in Figure 5A. In this example, T cell hybridomas are used that expresses a DO11.10 T cell receptor. The MHC antigen molecule is bound, e.g., to the wells of the multi-well plate and in this example is a (sc-) IA^d/OVA protein which specifically interacts with the DO11.10 TCR. Suitable

test compounds, e.g., provided in a "high throughput" or "ultra throughput" format, are added before, during or after addition of the recombinant T cells. In this illustration, the monitored cell response is production of IL-2.

As can be also be seen in Figure 5A, in the presence of an appropriate test compound, specific binding between the DO11.10 TCR and the sc-IA^d/OVAMHC antigen molecule is blocked, thereby preventing formation of the immune complex. Absence of sufficient immune complex reduces or prevents T cell activation and production of the IL-2 cytokine. A reduction in the amount of the IL-2 cytokine can be readily detected using a variety of suitable direct or indirect formats.

Another embodiment of the screening method shown in Figure 5A is shown schematically in Figure 5B. This example of the invention is sometimes referred to as a "dual" assay format to designate capacity of the method to perform T cell stimulation and to measure T cell responses in one or a few wells. For example, in a more particular embodiment, a suitable MHC antigen molecule such the purified sc-IA^d/OVA is immobilized onto a multi-well culture plate along with a suitable amount of anti-IL-2 monoclonal antibody (i.e. capture antibody). Each well of the plate includes at least one test compound and typically about one of such compounds. Subsequently, T cells expressing the DO11.10 TCR are added to each well and after providing a sufficient incubation time, are washed away. Next, IL-2 production is measured in each of the wells by adding a suitable amount of detectably labeled antibody capable of specifically binding the IL-2 immobilized by the capture antibody. Typically, an ELISA detection format will be preferred although other immunological detection formats may be used as needed for specific test formats. As can be seen in Figure 5B, inhibitory compounds that act as antagonists are readily identified by measurement of optical absorbance.

A more specific example of the foregoing screens is discussed below in Example 10. In this illustration of the invention, about 2000 small molecules were screened from a commercially available chemical library. Significantly, Example 10 shows that thirty compounds were detected that showed much lower IL-2 absorbance

readings, i.e., the compounds reduced formation and/or stability of the immune complex formed between the DO11.10 TCR and the sc-IA^d/OVA protein.

In another embodiment, a desired MHC antigen molecule is associated with the cell membrane. In this embodiment, the MHC antigen molecule can consist of an MHC component that is covalently linked to presenting peptide. However, MHC molecules can be used in this method in embodiments in which loading with the presenting peptide is preferred. In other embodiments, the MHC antigen can consist of an MHC component complexed with a covalently linked or unlinked superantigen. For example, MHC antigens can consist of MHC/peptide complexes present on APCs pulsed with particular peptide. Methods for preparing suitable peptides and pulsing same are known in this field. See e.g., Sette, A. et al. (1987) *Nature* 328:395-399 and Martin, R. et al. (1990) *J. Immunol.* 145:540-548. In this example of the invention, suitable cells expressing a desired TCR molecule such as naturally-occurring T cells or recombinant T cell hybridomas, are contacted to the MHC antigen molecules. At least one test compound can be screened according to a desired format. The test compounds can be added at nearly any point of the assay including before, during or after addition of the cells to the wells. In this illustration of the invention, the monitored cell response is production of IL-2. In the absence of a suitable test compound, specific binding between the TCR and the MHC antigen molecules is productive and leads to formation of an immune complex. That immune complex triggers T cell activation and production of the IL-2 cytokine. However, binding of a suitable test compound such as an antagonist of formation of the immune complex reduces the cell response and resulting IL-2 production from the T cells. The test compound is thus detected and selected from the other compounds by observing a reduction in the cytokine production.

Example 10 below provides a more specific illustration of this embodiment of the invention. In this example, A20 APCs, the OVA peptide and DO11.10 T cells are mixed to allow complex formation between the OVA peptide and the IA^d molecules on the A20 cells and stimulation of the DO11.10 T cells by the IA^d/OVA complex. In this example, stimulation of the DO11.10 T cells is measured by IL-2 cytokine

production as described below. Test compounds were added to the OVA-pulsed A20:DO11.10 T cell mixture to assess the ability of the test compounds to affect formation of the immune complex and cytokine production. Significantly, Example 10 shows that four compounds were detected that showed much lower IL-2 absorbance readings, i.e., the compounds reduced formation and/or stability of the immune complex formed between the DO11.10 TCR and the IA^d/OVA complex.

As discussed, it is an object of this invention to provide highly efficient screening methods that can facilitate the detection of many test compounds. Preferably, detected test compounds specifically modulate the immune complex formed between cognate TCR and MHC antigen pairs.

In accord with this objective, the invention provides strategies for selecting against test compounds that can modulate cells nonspecifically, e.g., by impacting IL-2 production from cells. In this embodiment, any of the foregoing methods can be repeated and the effects of the detected compounds on non-specific T cell stimulation assayed.

For example, one way to assay for non-specific T cell stimulation is by using an antibody in the method that is capable of binding a cluster of differentiation (CD) proteins such as CD3. As discussed, the CD3 protein has been reported to be closely associated with many TCRs. In this example of the invention, the antibody can be immobilized onto the wells prior to, during, or after addition of the TCR or MHC antigen molecules . Presence of the immobilized antibody will generally activate T cells and stimulate them to produce a cytokine such as IL-2. Thus a test compound that interferes with the antibody mediated activation of the T cells is designated as one that does not specifically modulate the immune complex formed between the TCR and MHC antigen molecules. Although such test compounds may be of interest in some instances, more preferred test compounds of this invention will specifically modulate TCR:MHC antigen interactions as detected by presence or absence of the immune complex.

Turning to Figure 5B again, one embodiment of this particular screen is shown in which an anti-CD3 antibody is used as a control. As discussed, sometimes this control will be referred as a "control immune complex", "internal control" or similar phrase.

It is an important objective of this invention to provide methods that, if desired, can be adapted to detect test compounds that specifically modulate MHC antigen dependent stimulation of the T cells while having no or little impact on the ability of these cells to respond to stimulation through a TCR/CD complex such as TCR/CD3. A more specific illustration of the control immune complex is discussed below in Example 10. There, specific test compounds of interest modulate MHC antigen mediated stimulation of the TCR cells and have insignificant or negligible inhibition of IL-2 production mediated by the anti-CD3 antibody.

If desired, the present methods can be used with one or a combination of control immune complexes such as the TCR/CD3 complex already mentioned. As discussed, analysis of such control immune complexes in the presence and absence of test compounds can help refine a particular screen (assuming refinement is needed) . and facilitate the detection of compounds that specifically modulate the immune complexes. For example, another control immune complex well suited for use with the present invention comprises an anti-TCR antibody, usually an anti-TCR monoclonal antibody. In this embodiment, the anti-TCR antibody preferably specifically binds to a TCR epitope outside the receptor binding site, i.e., it will not prohibit binding between the TCR and its cognate MHC antigen molecule as determined by conventional protein:protein binding experiments. Examples of such monoclonal antibodies are known in the field. See e.g., Haskins, K. et al. (1983) *J. Exp. Med.* 157: 1149-1169, Kubo, R.T. et al. (1989) *J Immunol.* 142:2736-2742, and Brenner, M.B. et al. (1984) *J Exp. Med.* 160:541-551. Preferred use of the anti-TCR antibody as a control immune complex is discussed below in Example 11.

In some instances such as when a desired test compound weakly modulates particular TCR and MHC antigen interactions in a given assay setting, it may be very useful to boost the sensitivity of that assay. Such enhancement can be achieved by one or a combination of different strategies including enhancing direct or indirect detection of the immune response using conventional methods. Alternatively, such sensitivity enhancement can be achieved by manipulating the TCR and/or MHC antigen molecules such as by providing those molecules as multi-valent complexes. Example 15 provides a particular illustration of this technique.

In one embodiment, assay sensitivity can be enhanced by increasing the ability of cells to respond to stimulation from the immune complex. In particular, there is recognition in the field that interactions between costimulatory receptors, such as certain CD molecules on the T cell surface, and their cognate ligands can stimulate the initiation and amplification of intracellular signals mediated by the TCR:MHC antigen interactions. Thus it is a further object of this invention to provide naturally-occurring or recombinant cells expressing desired TCR or MHC antigen molecules which cells further express at least one suitable costimulatory receptor, such as CD28 or LFA. In this embodiment of the invention, co-expression of the costimulatory receptor with the TCR and/or MHC antigen molecules can under the preferred assay conditions enhance the cellular responses to the immune complex, thereby boosting assay sensitivity and reliability. Preferred assay conditions include, but are not limited to, the addition of the cognate ligands or antibodies (or fragments thereof) capable of binding the costimulatory receptor, wherein the cognate ligands or antibodies are added as soluble, immobilized or cell-associated molecules.

Another way to boost assay sensitivity is to provide for better presence of the immune complexes. In particular, there is recognition in the field that certain CD proteins can facilitate interaction with MHC antigen molecules. Thus it is a further object of this invention to provide naturally-occurring or recombinant cells expressing desired TCR or MHC antigen molecules which cells further express at least one suitable CD protein, e.g., CD4 or CD8. In this embodiment of the invention, co-expression of the CD protein with the TCR and/or MHC antigen molecules can

facilitate formation of the immune complex, thereby boosting assay sensitivity and reliability.

In a particular embodiment of the method, cells are engineered to express a desired TCR molecule, e.g., a sc-TCR fusion molecule, and a CD4 protein or fragment thereof on the cell surface. In another embodiment, a desired TCR molecule is provided as a sc-TCR fusion molecule which molecule is engineered to include, as part of the fusion protein, at least a portion of another CD molecule such as CD3ζ or functional fragment thereof. In still another embodiment, the sc-TCR-CD3ζ construct is co-expressed with the CD molecule, usually CD4 or CD8. In many instances, co-expression of the TCR molecule with the CD protein(s) will allow the cells to be more sensitive to simulation by the MHC antigen molecule. In this example, the MHC antigen molecule can be provided as a fully soluble protein or in a cell-based format as required.

Example 12 below provides a more specific illustration of this embodiment of the invention. Here, the DO11.10 TCR is present as a sc-CD3ζ fusion protein expressed by cells that also express a recombinant CD4 protein on the cell surface. A cognate MHC antigen molecule, scIA^{d}/OVA is immobilized onto suitable multi-well plates along with a suitable anti-IL-2 antibody, usually a monoclonal, generally for about 12-48 hours. That antibody can be added to the plates prior to, during, or along with the immobilization of the MHC antigen molecule. Subsequently, recombinant cells co-expressing the single chain TCR and CD4 proteins are added to the wells and cultured for several hours or up to a few days or more. IL-2 production by the cells is measured along lines described previously.

In an embodiment of the method, the MHC antigen constructs can be covalently linked to an immunoglobulin fragment such as IgM, IgG, IgA and the like; as well as a functional fragment thereof. If desired, control wells can be prepared in which cell stimulation is measured using different MHC antigen. If also desired, further controls may be conducted such as use of at least one of the internal controls

described above including those described specifically in the Examples. In this embodiment of the invention, the capacity of a test compound to modulate stimulation of the recombinant cells will be measured as a corresponding increase or decrease in the amount of cytokine produced by the cells. Test compounds that inhibit T cell stimulation by the MHC antigen but do not inhibit stimulation by the anti-TCR antibody can be pursued as lead compounds.

A specific example of this method is schematically shown in Figure 6A. Here, the TCR and MHC antigen probes employed have been implicated in multiple sclerosis (MS); a common human autoimmune disorder resulting in severe axon demyelination. Figure 6A shows an embodiment of the method in which test compounds are screened for those that modulate interactions with the MS TCR and MHC antigen probes. The T cell is preferably derived from T cells obtained from a human MS patient. Alternative, as shown, cells (i.e., recombinant MS TCR cells) are made by TCR cloning and expression steps such as those provided herein. The recombinant MS TCR cells are then added to the multi-well plates (having bound MHC antigen molecules) along lines discussed previously. In this illustration, at least one test compound is added to the wells, usually about one test compound, either before, during or after addition of the recombinant MS TCR cells. Preferably, the method is conducted in a high throughput screening format. In this example of the invention, the test compound is detected by a reduction or elimination of the amount of IL-2 produced by the MS TCR cells compared with at least one suitable control, e.g., the amount of IL-2 produced from the cells in the absence of the test compound.

As shown in Figure 6B, purified sc-DR2/MBP (a single chain class II MHC with fused MBP presenting peptide) is immobilized onto a multi-well cell culture plate. Suitably, the plate includes a chemical library in which each well preferably includes at least one and usually about one test compound. Next, T cells expressing relevant TCRs are obtained by conventional means from a patient who is suffering from or is suspected of suffering from or susceptible to MS. In most cases however, the patient will be suffering from MS as indicated by recognized parameters. As an alternative, recombinant cells expressing relevant TCRs can be generated. A suitable

amount of the T cells are then added to each well as the screen is conducted along lines mentioned above. In this embodiment, the cell response is measured in the presence and absence of the test compounds from the chemical library which response can be cytokine production as mentioned previously.

Of course, the foregoing specific methods for detecting test compounds that module MS immune complexes can be readily adapted to screen other TCR and MHC antigen molecules of interest.

A more specific example of the foregoing screening methods is provided by Example 13 below. In this example of the invention, suitable T cell V-α and V-β chains are obtained from a specific human MS T cell line restricted for myelin basic protein (MBP). Nucleic acid encoding the chains can be fused, if desired, to a human CD3ζ sequence or functional fragment of that sequence. The resulting construct is then expressed in suitable cells and particularly immortalized T cells. Such transfected cells are then manipulated along lines already discussed. That is, the immortalized T cells are added to multi-well plates in which each well includes immobilized or cell expressed cognate MHC antigen, e.g., MBP peptide-loaded $DR2^+$ APCs. Alternatively, MHC antigen molecules can be generated in which the presenting peptide is covalently linked to the MHC as provided herein and in the U.S. Pat. No. 5,869,270. Thus, this is an embodiment of the invention in which the detection format is entirely cell based.

More particularly, Example 13 provides a detection format in which the MS restricted TCR is cell based and the cognate MHC antigen molecule, (sc-$DR2^+$/MBP) is immobilized onto the wells. In this example of the invention, the MHC antigen protein can be fused to an acceptable immunoglobulin molecule such as IgM, IgG, IgA and the like; or a fragment thereof. After immobilizing the scDR2/MBP molecules to the wells for a few hours up to a day or so, the recombinant T cells are added to the wells in medium and incubated therein for a few hours up to a few days. Each of the wells also includes at least one and often one test compound provided in a

suitable solvent. The test compound may be added at any point in the assay including prior to, during or after addition of the T cells or immobilization of the MHC antigen molecule. However, addition of the test compound along with the T cells is generally preferred for this illustration of the invention. Capacity of the compounds to modulate interaction between the MHC antigen and the TCR molecule can be monitored directly or indirectly as described earlier. Also in this example, the production of IL-2 is measured along lines discussed. If desired, this particular method can include one or more controls, including incubation of the recombinant cells in the absence of the test compounds. Additional controls that can also be employed include those control immune complexes described earlier. Particular test compounds detected by the method will significantly modulate interactions between the TCR and MHC antigen molecules but will not modulate stimulation by the anti-TCR or anti-CD3 antibodies described above. Preferred are test compounds that show substantial antagonistic activity in this assay.

In another embodiment, the invention provides cell based screening methods in which cells are designed to express at least two different antigen specific TCRs on the surface of the cells. This particular example of the invention provides advantages. For example, it often allows the method to be more sensitive to test compounds that show distinct effects toward different TCRs. As in the illustration, the test compounds may exhibit capacity to modulate one of the TCR molecules while modulating the other much less so or not at all.

By way of illustration of this embodiment, suitable cells such as immortalized T cells are engineered to express a desired (first) TCR molecule along with what is sometimes referred to herein as a "control" or "second" TCR molecule. Such cells could then be used along lines discussed previously, e.g., with APCs expressing an MHC antigen molecule of interest or with immobilized MHC antigen molecules. Capacity of the compounds to modulate interaction between the MHC antigen and the first TCR molecule can be monitored directly or indirectly as already described. Such interactions can then be compared with capacity of the compounds to modulate specific interaction between the second TCR molecule and its cognate MHC antigen.

In many instances, it will be desirable to measure cytokine production, including secretion of IL-2 by cells according to methods already outlined. Particular compounds of interest will modulate interaction between the first TCR and its cognate MHC antigen while providing much less or no modulation between the second TCR molecule and its cognate MHC antigen.

Accordingly, it is an object of this invention to provide methods that include, as needed, at least one suitable internal control. Thus any one of the foregoing methods can include at least one the following steps:

1) contacting a subject TCR molecule, e.g., the first TCR molecule with at least one antibody, preferably a monoclonal antibody, capable of specifically binding the TCR preferably at one or more epitopes outside the sites bound by the MHC antigen molecule, the contacting being in the presence or absence of the test compound and under conditions sufficient to bind the TCR and the antibody as a control immune complex,

2) detecting presence of the control immune complex in the presence and absence of the test compound; and

3) selecting a test compound that does not detectably alter (increase or decrease) specific binding between the TCR and antibody.

In another embodiment, the methods can include, as needed, at least one the following steps:

1) contacting a second TCR molecule with its cognate MHC antigen molecule, the contacting being in the presence or absence of the test compound and under conditions sufficient to bind the second TCR and the MHC antigen as a control immune complex,

2) detecting presence of the control immune complex in the presence and absence of the test compound; and

3) selecting a test compound that does not detectably alter (increase or decrease) specific binding between the second TCR and MHC antigen molecule. Preferably, the second TCR has a different MHC antigen binding specificity than the subject (first) TCR molecule indicated above.

As discussed, the choice of whether or not to include one or more internal controls will be guided by recognized parameters such as the test compounds to be screened and the amount of sensitivity and selectivity required.

Example 14 below provides another specific illustration of the invention particularly with respect to including an internal control. In this example, the first TCR molecule is a single chain D011.10 TCR molecule and the second TCR molecule is an endogenous TCR. To evaluate responsiveness of the cells to stimulation through the first and second TCR molecules, the cells are incubated in appropriate multi-well plates that include a suitable control MHC antigen molecule. For example, suitable control MHC antigens can consist of MHC/peptide complexes present on the appropriate APCs pulsed with particular peptide. Methods for preparing suitable peptides and pulsing same are known in this field. See e.g., Sette, A. et al. (1987) *Nature* 328:395-399, Martin, R. et al. (1990) *J. Immunol.* 145:540-548. Preferably, that peptide when presented in the context of the APCs predominantly stimulates the second TCR but not the first TCR. The cognate MHC antigen molecule for the first TCR is usually immobilized to the wells as outlined previously. The MHC antigen molecule can consist of an MHC component that carries a fused presenting peptide or is loaded with a peptide as desired. That peptide is preferably specific for the first TCR molecule and not the second TCR molecule. In other embodiments, the MHC antigen can consist of an MHC component complexed with a covalently linked or unlinked superantigen. That superantigen is preferably specific for the first TCR molecule and not the second TCR molecule.

In this example of the invention, at least one test compound can be added to the wells along lines previously discussed including before, during or after addition of the APCs or immobilization of the MHC antigen molecules. As an illustration, the test compound can be added after immobilizing the MHC antigen molecules and before adding cells expressing the TCR molecules. A preferred cell response is cytokine production and particularly IL-2 production although in some instances it may be useful to monitor other cells responses such as those mentioned herein. In

this embodiment, particular test compounds of interest will modulate interactions between the first TCR and its MHC antigen while providing little or no modulation between the second TCR and its MHC antigen. More particular test compounds of interest will show good inhibition of interactions between the first TCR and its cognate MHC antigen but will not show similar inhibition with respect to the second TCR and its cognate MHC antigen.

In more specific embodiment, the present invention encompasses a screening method that utilizes cell lines reconstituted with at least two TCR molecules preferably restricted by different MHC antigens. This feature of the invention provides numerous advantages including minimizing any assay variability.

A number of the examples below provide another specific illustration of the invention particularly with respect to including additional internal controls. For example, internal controls may include control complexes formed between the TCR and non-cognate MHC antigen molecule or between the MHC antigen and a non-cognate TCR. As described, these control complexes represent the nonspecific association between the TCR (or MHC antigen) and its non-cognate pair and can be useful as a negative control to evaluate the level of specific interactions between the TCR and cognate MHC antigen molecule. For example, particular embodiments illustrated in Examples 3, 5, 11, 12, 14, 15 and 16 utilize suitable MHC antigen molecules for establishing the nonspecific association between a TCR and a non-cognate MHC antigen molecule. In each of these examples, the non-cognate MHC antigen is a peptide-MHC complex carrying a peptide that differs from the cognate peptide specifically recognized by the TCR. Other embodiments illustrated in Examples 11, 14, and 15 utilize suitable TCRs for establishing the nonspecific association between an MHC antigen molecule and a non-cognate TCR.

Practice of the present invention provides many advantages particularly in light of prior cell-based screening attempts (See i.e., WO 96/36881). For example, the methods of this invention are fully compatible with a wide range of TCR and MHC antigen molecules. This feature of the invention is important as it expands the

repertoire of cell- and protein-based assay formats for detecting the test compounds. In contrast to prior screening attempts, the method of the invention also provides for a number of internal controls that select against test compounds that modulate cell responses nonspecifically. As described, one of the major limitations with cell-based screening assays in general has been the detection of "false positive" compounds that modulate the measured cellular response nonspecifically or indirectly. Preferred use of the present invention substantially reduces and in some cases eliminates false positive or misleading test results.

As discussed, one way to boost or enhance the sensitivity of the present methods is to provide subject TCR molecules and/or MHC antigen molecules as multi-valent complexes. In this embodiment, the invention can provide significant advantages. For example, it is recognized in the field that multi-valent MHC antigen molecules can stimulate T cell responses to a greater degree, in some cases to a much greater degree, than monomeric MHC antigen molecules. See Abastado, J. (1995) *J. Exp. Med.* 182:439-447 and Hamad, A.R. et al. (1998) *J. Exp. Med.* 188:1633-1640.

For example, practice of the methods with multi-valent TCR and/or MHC antigen molecules can desirably increase the avidity of weakly interacting TCR:MHC antigen complexes. One way to achieve this result is to covalently link or fuse at least one "adapter" or "tag" molecule to the TCR molecule, the MHC antigen molecule, or both molecules. These adapters or tags act to directly or indirectly promote the formation of multi-valent complexes. Illustrative adapters or tags include biotin, streptavidin and immunoglobulin molecules such as immunoglobulin variable and/or constant domains including IgG and IgM heavy chains, κ and λ chains; or functional fragments thereof. Particular adapters of interest can be specifically bound by another molecule including protein A, protein G, biotin, streptavidin or an antibody such as a monoclonal antibody. The antibody may be detectably-labeled or not as required. Other adapters of interest are protein domains that are capable of associating to form multimeric complexes, such as leucine zipper domains. Multi-valent forms of the MHC antigen and TCR molecules may also be generated by chemically cross-linking

the molecules, either directly or indirectly. Further descriptions of the multi-valent forms of the MHC antigen molecule of the invention can be found in the U.S. Patent Application No. 08/960,190.

Further descriptions of the multi-valent forms of the TCRs of the invention can be found in a U.S. Patent Application No. 09/422,375 entitled *Polyspecific Binding Molecules and Uses Thereof*, filed on October 21, 1999; the disclosure of which has already been incorporated by reference.

See also the U.S. Patent application serial no. 09/422,375 for disclosure relating to other MHC antigen molecules and TCR molecules for use with this invention including multi-valent forms of such molecules.

For example, in one embodiment, a subject MHC antigen molecule can be fused by standard methods to a suitable adapter or tag molecule, e.g., an immunoglobulin constant domain such as IgG or a functional fragment thereof. In a particular example, the MHC antigen molecule is preferably configured as single chain MHC construct that includes a fused presenting peptide and the adapter. Usually the adapter or tag will be fused to the C-terminus of the single chain construct although other arrangements such as fusion to the N-terminus may be indicated for some applications. Particular multi-valent complexes will generally have about 2 to about 10 units, preferably about 2 to 5 units, with about 4 units (i.e. a tetramer) being useful for many applications.

Examples 3 and 5 below describe more specific methods of the invention using multi-valent complexes to enhance the sensitivity of the assays detecting formation of immune complexes. In these examples, multi-valent MHC antigens were generated and immobilized on a solid support i.e. multi-well plates as described previously. In this embodiment, the MHC antigen molecule is an MHC component that is covalently linked to presenting peptide. However as has been mentioned, empty MHC molecules can be used in this method in embodiments in which loading with the presenting peptide is preferred. In other embodiments, the MHC antigen can

consist of an MHC component complexed with a covalently linked or unlinked superantigen. Different methods can be used to generate multi-valent complexes as described. In Example 3, the MHC antigen molecule, scIA^d/OVA, was fused to the immunoglobulin constant domains of the IgG heavy chain and kappa chains. In Example 4, the scIA^d/OVA molecule was fused to the immunoglobulin constant domains of the IgM heavy chain. In both examples, multimerization of the scIA^d/OVA molecules was mediated by the immunoglobulin scaffold. In this embodiment of the invention, cells expressing the DO11.10 TCR are added to the wells and cultured for several hours or up to a few days or more. IL-2 production by the cells is measured along lines described previously. As described in Examples 3 and 5 below, a significant enhancement (2 to 10 fold) in assay sensitivity is provided by use of multi-valent complexes.

In another embodiment in which the multi-valent MHC antigen molecules are used, cells expressing a cognate TCR molecule are contacted by at least one fully soluble multi-valent MHC antigen molecule, typically in an overnight incubation. Test compounds can be added to the wells along lines previously discussed including before, during or after addition of the cells or the multi-valent MHC antigen molecule. Subsequently, the cells are washed and the cells are contacted by an detectably labeled antibody capable of specifically binding the multi-valent MHC antigen molecule (now bound to the cells). The cells are then analyzed for presence or absence of the detectable label. Presence of the detectable label is taken to be indicative of formation of TCR:MHC antigen complexes. Particular test compounds of interest are those that show capacity to modulate formation of the immune complexes when compared to one or more of those controls mentioned herein.

A more specific example of the method is the plate-based assay format described below in Example 15. In this illustration of the invention, the MHC antigen molecule is a sc-IA^d/GD-Ig fusion protein and the cells are T cell hybridomas that express the DO11.10 or GD12 TCR. The multi-valent MHC antigen molecules are prepared in the method by incubation with an anti-Ig monoclonal antibody detectably labeled with biotin. That biotin is itself tagged by further incubation with streptavidin

linked to cytochrome. In this particular example of the invention, the control performed is the co-incubation of the multi-valent MHC antigen with cells expressing the DO11.10 T cells. As explained in the Example 15, flow cytometry (i.e. FACS) of the stained cells indicated that the scIA^{d}/GD-Ig molecules specifically stained the GD12 T cell hybridoma but failed to stain cells expressing the DO11.10 cells.

The embodiment of the invention exemplified by Example 15 can be adapted to screen test compounds in a variety of screening formats such as those high or ultra throughput assays mentioned above and in the Examples below. Typically, test compounds will be identified and selected for capacity to specifically modulate interaction between the GD12 T cell hybridoma and its cognate multi-valent MHC antigen molecule. Particular test compounds of interest will manifest a readily detectable alteration (increase or decrease) in the cell signal. This specific assay can be further adapted to screen other TCR:MHC antigen pairs and, if desired, the DO11.10 cells can be employed as a useful control for those test compounds which modulate the TCR:MHC antigen interactions non-specifically.

In another embodiment, the invention provides methods that employ soluble molecules including fully soluble TCR and MHC antigen molecules. In one embodiment, the invention particularly provides protein-based screening methods for detecting test compounds that modulate TCR:MHC antigen interactions. This feature of the invention can provide important advantages including reducing or eliminating "false positive" signals that can in some instances emanate from non-specific effects on cell responses. Typically, approaches that include ELISA, fluorescence-based and homogeneous assay formats will be preferred although other direct or indirect detection formats may be more useful in particular screening paradigms.

In this particular example of an ELISA-based format of the invention, the screen includes three useful components: 1. the soluble TCR which recognizes a cognate MHC antigen molecule, 2. the soluble cognate MHC antigen molecule and 3. the inhibitory compound which blocks the specific interaction between the TCR and

MHC antigen molecule. The assay, for this example, is formatted such that the TCR (1) is fixed in a well of a microtiter plate and the MHC antigen molecule (2) and the inhibitory compound (3) are added, allowed to bind the TCR (1) and the extent of binding is then disclosed by adding a labeled antibody or other agent which recognizes the MHC antigen and provides a readout through a chemical reaction (label = horseradish peroxidase [HRP] or alkaline phosphatase [AP]) or direct measurement (label = radioactive isotope or fluorescent compound).

For example, in one approach, a recombinant cell is made that expresses a soluble subject TCR, e.g., in a recombinant single chain format. Suitable amounts of the sc-TCR are purified and then immobilized onto a solid support or phase such as a multi-well plate, usually for a few hours up to about 24 hours or more. Typically, each well of the plate will include the immobilized TCR molecule. Subsequently, a suitable amount of a detectably labeled MHC antigen molecule is added to each of the wells. In one embodiment, the detectable label is selected to provide for multimerization of the MHC antigen molecule although in other embodiments the label need not provide for multimerization. As needed, the MHC antigen molecule can consist of an MHC component carrying a fused presenting peptide. Alternatively, the MHC molecule can be empty in which case the molecule can be loaded with presenting peptide in accord with established procedures. In other embodiments, the MHC antigen can consist of an MHC component complexed with a covalently linked or unlinked superantigen. However in instances in which multimeric MHC antigen molecules are used it will often be possible to boost the avidity of weakly interacting complexes. Thus it will be readily apparent that this embodiment of the invention may be preferred where the subject immune complex is known or suspected of being weakly interacting.

In this example, test compounds can be added to the wells along lines previously discussed including before, during or after addition of the TCR or MHC antigen molecules. Particular test compounds of interest will desirably modulate specific binding between the TCR molecule and the multimerized or monomeric MHC antigen molecules.

A particular example of this embodiment is provided below in Example 16. In this embodiment, the screening method is designed to detect test compounds that are capable of modulating immune complexes formed between the 264 TCR and its cognate MHC antigen, the HLA-A2 class I molecule loaded with the peptide 264-272 fragment of the p53 human tumor suppressor protein.

Another particular example of this embodiment is provided below in Example 17. In this embodiment, the screening method is designed to detect test compounds that are capable of modulating autoimmune immune complexes formed between a single-chain TCR derived from an MS patient and its cognate MHC antigen, a single-chain HLA-DR2 molecule covalently linked to an MBP peptide.

The format of this assay can be varied widely. For instance, the MHC antigen can be fixed on the plate and probed with a soluble mono- or multi-valent TCR. Alternatively, the reaction may be formatted to run in solution by fixing one or the other of the reagents to beads or dendrimers to facilitate solution chemistry, capture or detection.

In a more specific illustration, the screen can be formatted as follows: the MHC antigen is attached to the plate, the plate is washed and blocked, soluble TCR is added and allowed to incubate at room temperature for 1 hour. The plate is washed, enzyme- or biotin-linked antibody is added and allowed to interact with the TCR complex for 30 min to 1 hr. The plate is washed, reprobed with enzyme-linked avidin (if necessary) and washed. A chromogenic enzyme substrate is added and the enzyme is allowed to convert the substrate to the chromophore product. The reaction is stopped and results are collected on a plate reader measuring optical absorbance at the wavelength appropriate for the chromophore product. In the case where the MHC antigen consists of a peptide-MHC complex, the overall avidity of the TCR for the MHC antigen is the sum of the affinities of the TCR for the MHC without peptide or with an irrelevant peptide (Reich et al. (1997) *Nature* 387:617-620 measured the K_d of

this interaction to be > 2 mM for the 2B4 TCR and an empty IE^k), the affinity of the TCR for the MHC loaded with the appropriate peptide (Reich et al. *ibid.* - K_d of 2B4 for IE^k/MCC peptide = 50-90 μM; Seibel et al. (1997) *J. Exp. Med* 185:1919-1927 - K_d of DO11 for IA^d/OVA peptide = 31 μM), and the additional stability provided by oligomer formation (Reich et al.). The valency of the TCR used will effect the overall assay conditions (O'Herrin S.M. et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186:1333-1345 showed an approximately 50 fold higher affinity when using divalent vs. monovalent TCRs) and is one of the variables that requires refinement.

In another embodiment, the assay may be formatted as a homogeneous assay to avoid problems associated with sample transfer and wash steps. A homogeneous assay is preferred for high throughput and ultra high through put screening. Particularly preferred homogeneous assay are those that rely of detection of fluorescence or luminescence probes for the formation of the immune complex. More specific examples of such formats include, but are not limited to assays based on optical, fluorescence or luminescence intensity, time resolved fluorescence, proximity-based energy transfer (including fluorescence resonance energy transfer assays, scintillation proximity assays and luminescence proximity assays), fluorescence polarization spectroscopy, and fluorescence correlation spectroscopy.

Example 18 below provides a particular example of this embodiment. In this example, the screening method is designed to detect test compounds that are capable of modulating autoimmune immune complexes formed between a single-chain TCR derived from an MS patient and its cognate MHC antigen, a single-chain HLA-DR2 molecule covalently linked to an MBP peptide. The purified MS sc-TCR and sc-DR2/MBP proteins will be immobilized onto donor and acceptor beads, respectively. The acceptor beads are designed to emit a chemiluminescent signal when brought into close proximity of the donor beads by the interactions between the immobilized TCR and MHC antigen molecules. The TCR- and MHC antigen-coated beads will be added to microtiter wells and the luminescent signal resulting from productive formation of the immune complex will be measured in a time-resolved mode. Test

compounds can be added to the wells along lines previously discussed including before, during or after addition of the TCR or MHC antigen molecules. Particular test compounds of interest will desirably modulate specific binding between the TCR molecule and the MHC antigen molecules.

Previous screening methods have been used to detect compounds that inhibit or stimulate T cell responses. One method screened for peptides or peptidomimetics that when bound to the peptide-binding groove of empty MHC molecules could block the ability of the MHC molecule to present other peptide antigens (See Lamont A.G. et al. (1990) *J. Immunol.* 144:2493-2498, Falcioni F. et al. (1999) *Nature Biotech.* 17:562-567). As disclosed, this method identified compounds (i.e. MHC antagonists) that block the formation of a functional MHC antigen molecule. Another method screened for peptides that when bound to the peptide-binding groove of empty MHC molecules resulted in formation of MHC-peptide complexes that could act as TCR antagonists or agonists (See De Magistris M.T. et al. (1992) *Cell* 68:625-634, Sette A. et al. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:413-413, Wilson D.B. et al. (1999) *J. Immunol.* 163:6424-6434, Hiemstra, H.S. et al. (2000) *Curr. Opin. Immunol.* 12:80-84. Abrams S.I. et al. (2000) *Curr. Opin. Immunol.* 12:85-91). As reported, this method identified compounds that act in the context of the MHC as peptide antigens and antigen mimics (agonists) or as so-called altered peptide ligands (antagonists).

The present invention features screening methods that differ from those described above including the particular screens described in the immediately preceeding paragraph. As an illustration, the invention features methods for detecting and identifying compounds that modulate the interactions between the TCR and its cognate MHC antigen, including (pre-formed) cognate peptide-MHC complexes. The methods of the invention are not constrained to identifying compounds that bind to the peptide-binding groove of empty MHC molecules. Thus, the methods of the invention offer advantages in detecting a broad variety (or range) of compounds that modulate interactions between the TCR and the MHC antigen molecule. In addition, the present invention provides for particular advantages in detecting compounds that interact with TCR and/or MHC antigen molecules. As taught, the compounds

identified by the methods of the invention would be expected to have different properties (i.e., binding specificities, composition, pharmacology) than those identified by the methods described above.

It is emphasized that notwithstanding the specific examples discussed above, the present invention is highly flexible and amenable to use of one or a combination of different screening formats including use of fully soluble molecules, cell based formats; and combinations thereof (e.g., one fully soluble molecule and one cell expressed molecule), and to any disease for which TCR:MHC antigen interactions play a role.

For many applications of the invention, components of specific screens will include soluble single chain TCR, soluble single chain MHC with or without genetically linked peptide or superantigen, a library of small molecules or other potential agonist or antagonist agents, and other compounds which are necessary to generate a detectable signal. The antagonist compounds will be screened to identify those that specifically block the interaction of the TCR with the MHC antigen. In the case where the MHC antigen is a peptide-MHC complex, screening will identify antagonist compounds that block TCR interactions with peptide presented by the MHC molecule as well as those that generally inhibit interaction with the MHC component or a specific MHC family. In the case where the MHC antigen is a superantigen-MHC complex, screening will identify antagonist compounds that block TCR interactions with superantigen bound by the MHC molecule as well as those that generally inhibit interaction with the MHC component. In the case where the MHC antigen is a alloreactive (xenoreactive) MHC molecule, screening will identify antagonist compounds that block TCR interactions with the alloreactive (xenoreactive) MHC component.

In this embodiment, the present methods can provide additional advantages. As discussed, the screen can efficiently select for test compounds that specifically inhibit the interaction of a TCR with a MHC molecule bearing a unique peptide or those that inhibit the interaction with a particular MHC family. This compound could

then be used to suppress autoimmune diseases or allergic conditions triggered by the interaction of the T cell (bearing the TCR) with the antigen presenting cell (bearing the peptide associated with the MHC). These inhibitory compounds would offer a significant advantage over therapies which suppress the overall immune response by inhibiting the reaction specific for the disease while leaving the rest of the immune response intact.

In another embodiment, the screen can efficiently select for test compounds that specifically inhibit the interaction of a TCR with a MHC molecule bearing a superantigen. This compound could then be used to suppress illness and disease conditions triggered by the interaction of the T cell (bearing the TCR) with the antigen presenting cell (bearing the superantigen associated with the MHC). Again, these inhibitory compounds would offer a significant advantage over therapies which suppress the overall immune response by inhibiting the reaction specific for the disease while leaving the rest of the immune response intact.

In yet another embodiment, the screen can efficiently select for test compounds that specifically inhibit the interaction of a TCR with an alloreactive (xenoreactive) MHC molecule. This compound could then be used to suppress immune responses associated with tissue transplantation triggered by the interaction of the T cell (bearing the TCR) with the antigen presenting cell (bearing the alloreactive or xenoreactive MHC). Again, these inhibitory compounds would offer a significant advantage over therapies that suppress the overall immune response by inhibiting the reaction specific for the disease while leaving the rest of the immune response intact.

In other embodiments, agonist compounds will be screened to identify those that specifically augment the interaction of the TCR with the MHC antigen. In the case where the MHC antigen is a peptide-MHC complex, screening will identify agonist compounds which augment TCR interactions with peptide presented by the MHC molecule as well as those which generally augment interaction with the MHC component or a specific MHC family. In the case where the MHC antigen is a

superantigen-MHC complex, screening will identify agonist compounds that augment TCR interactions with superantigen bound by the MHC molecule as well as those that generally augment interaction with the MHC component. In the case where the MHC antigen is an alloreactive MHC molecule, screening will identify agonist compounds that augment TCR interactions with the alloreactive MHC component.

In this embodiment, the present methods can provide additional advantages. As discussed, the screen can efficiently select for test compounds that specifically augment the interaction of a TCR with a MHC molecule bearing a unique peptide or those that augment the interaction with a particular MHC family. This compound could then be used to stimulate immune responses triggered by the interaction of the T cell (bearing the TCR) with the antigen presenting cell (bearing the peptide associated with the MHC). Such compounds could be useful in the treatment of infectious agents and cancer. These agonist compounds would offer a significant advantage by offering a unique method of stimulating the immune reaction specific for the disease. These compounds may be useful in conjunction with traditional immunostimulatory therapies, such as vaccination.

In other embodiments, the agonists compounds could be useful in the treatment of immune disorders such as autoimmune diseases and allergies. Use of such compounds may lead to immune deviation or induction of immune responses capable of down regulating or suppressing the harmful immune response.

As discussed, the TCR may be one of several forms of the soluble molecule depending, e.g., upon the conditions of the assay. The preceding discussion and the examples, which follow, provide for many of these soluble TCR molecules. For example, the molecule can be expressed as a three domain single chain form (scTCR), i.e. the alpha variable domain (Vα) is fused to the beta variable domain (Vβ) and beta constant domain (Vβ) via a 20 amino acid glycine-serine linker ($[G_4S]_4$). In its monomeric form the TCR can be expressed as a soluble single chain or fused to a kappa constant region. Multimeric complexes of the TCR can be produced in a

number of ways; by genetic fusion to the Ig constant region (CH1, CH2, and CH3) to produce a dimer, by co-expression of the scTCR-IgG kappa chain and scTCR-IgG heavy chain in a cell to produce a tetrameric complex, as well as other methods described herein.

The screening method is compatible with other TCR molecules. For example, higher order multimers may be made by changing the IgG to IgA or IgM. Functional multimers may also be formed by chemically cross-linking the scTCR to soluble solid supports such as dendrimers. Description of the forms and other uses of the multimeric TCR molecules will be filed in another patent disclosure. Also see U.S. Patent Application No. 09/422,375. Alternate forms of the TCR molecule may also be produced which contain the MHC-binding regions of the co-receptors CD4 or CD8.

The MHC antigen molecule employed in the screen may include a genetically tethered (presenting) peptide and may be one of several forms of the soluble molecule depending upon the conditions of the assay. Description of the soluble forms of this particular MHC antigen molecule can be found, e.g., in the U.S. Patent Application No. 08/596,387 and the U.S. Patent Application No. 08/960,190. Multimeric forms of the MHC antigen, similar to those described for the TCR, may be produced for the assay if necessary.

As discussed, the present screening methods are flexible and can be tailored to detect, identify and select different test compounds depending, e.g., on the subject TCR/MHC antigen molecules and desired results.

For example, it will often be preferred to detect test compounds that behave as an antagonist of a particular immune complex. In this embodiment, the particular testing method employed will preferably show at least about a 10% decrease in the formation and/or stability of the subject immune complex relative to at least one of the suitable controls provided herein.

Additionally preferred test compounds are deemed capable of being an agonist of the immune complex if the testing method shows at least a 10% increase in the formation and/or stability of the immune complex relative to at least one of the suitable controls provided herein.

More specifically preferred test compounds are capable of inhibiting or eliminating formation of the subject immune complex. Further preferred test compounds are capable of increasing or decreasing the affinity constant [K_A] of the immune complex.

Methods for determining the affinity constant are known in the field and include conventional thermodynamic measurements. See, for example, Alam, SM et al. (1999) *Immunity* 10:227-237. More specifically, if [TCR] is the molar concentration of unbound TCR molecule, [MHC antigen] is the molar concentration of unbound MHC antigen molecule and [TCR/MHC antigen] is the molar concentration of the immune complex, then K_A can be readily determined by measuring the amount of immune complex at about equilibrium. In embodiments in which detection of antagonistic test compounds is indicated, that compound preferably shows at least about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% or 100% decrease in affinity constant relative to at least one of the suitable controls provided herein such as the K_A in the absence of the test compound.

However in other embodiments in which the detection method is optimized to screen for agonists of the subject immune complex, preferred test compounds will show about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% or 100% up to a 500% to about 1000% increase in affinity constant K_A relative to the control.

Also preferred are test compounds that are deemed to increase or decrease the rate of formation of the immune complex.

Rates of immune complex formation can be ascertained using conventional thermodynamic approaches. See, for example, Alam, SM et al. (1999) *Immunity* 10:227-237. In particular, the rate of immune complex formation [k_f] and the rate of dissociation [k_r] can be readily ascertained using such approaches and related techniques. Generally, to determine the rates of formation and dissociation, formation of a subject immune complex between a particular TCR and MHC antigen molecule is monitored over a time period (e.g., a few seconds up to several minutes or more) in the presence and absence of the test compound. In embodiments in which the test compound is deemed to be an antagonist, that compound preferably shows at least about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% or 100% decrease in the rate of immune complex formation [k_f] relative to at least one of the suitable controls discussed herein, e.g.,. the rate of immune complex formation in the absence of the test compound.

Alternatively, in embodiments in which the test compound is deemed to destabilize the immune complex and enhance the rate of dissociation, that compound preferably shows about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% or 100% up to a 500% to about 1000% increase in rate of dissociation [k_r] relative to the control.

In those embodiments in which the test compound enhances the rate of dissociation of the immune complex, that test compound may sometimes be referred to herein as destabilizing TCR/MHC antigen interactions and/or destabilizing the immune complex.

Also preferred are test compounds that show capacity to modulate immune complex avidity. Avidity can be observed and quantified, if desired, by one or a combination of immunological techniques such as those described below. In embodiments in which a particular test compound reduces the avidity of a TCR and MHC antigen molecules, that compound preferably shows at least about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more

preferably at least about 75% or 100% decrease in avidity relative to at least one of the suitable controls provided herein including such avidity in the absence of the test compound. In another embodiment however in which the test compound is deemed to be an agonist, that compound preferably shows about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% or 100% up to a 500% to about 1000% increase in avidity relative to the control.

Also preferred are test compounds that show capacity to modulate immune complex multimerization. Multimerization can be observed and quantified, if desired, by one or a combination of techniques. See, for example, Alam et al. (1999) *Immunity* 10:227-237, Reich et al. (1997) Nature 387:617-620. In embodiments in which a particular test compound reduces the multimerization of a TCR and MHC antigen molecules, that compound preferably shows at least about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% or 100% decrease in avidity relative to at least one of the suitable controls provided herein including such multimerization in the absence of the test compound. In another embodiment however in which the test compound is deemed to be an agonist, that compound preferably shows about a 10%, preferably at least about 20%, more preferably at least about 50%, and still more preferably at least about 75% or 100% up to a 500% to about 1000% increase in multimerization relative to the control.

Further preferred are test compounds that show capacity to modulate, i.e., increase or decrease at least one cell response, typically a T cell or T cell hybridoma response, by about 1.5 to about 100 times relative to a suitable control. In particular embodiments of the methods disclosed herein, a preferred response is cytokine production and particularly production of the IL-2 cytokine.

Additionally suitable test compounds of the invention preferably have negligible capacity to modulate formation of a control immune complex. In one embodiment, that control immune complex includes the TCR molecule and an antibody capable of specifically binding an epitope on the TCR molecule not

specifically bound by a particular MHC antigen molecule such as a peptide bound MHC molecule (anti-TCR antibody). Alternatively, the control immune complex includes at least one cluster of differentiation (CD) protein associated with the TCR molecule, e.g., in a cell membrane. Preferably, the CD protein is CD3 and the antibody is capable of specifically binding CD3 associated with the TCR molecule (anti-CD3 antibody).

As discussed, it is an object of this invention to provide useful pharmaceutical compositions that include at least one of the test compounds detected by the present methods. Such compositions can be administered to a subject in any of several ways. For example, a given test compounds or combination of test compounds can be administered as a prophylactic to prevent the onset of or reduce the severity of a targeted immune condition. Alternatively, such test compounds or pharmaceutical compositions can be administered before, during or after the course of the targeted condition.

A pharmaceutical compound of this invention, sometimes referred to as a treatment compound, can be administered to a subject, either alone or in combination with one or more therapeutic agents, as a pharmaceutical composition in mixture with conventional excipient, i.e. pharmaceutically acceptable organic or inorganic carrier substances suitable for parenteral, enteral or intranasal application which do not deleteriously react with the active compounds and are not deleterious to the recipient thereof. Suitable pharmaceutically acceptable carriers include but are not limited to water, salt solutions, alcohol, vegetable oils, polyethylene glycols, gelatin, lactose, amylose, magnesium stearate, talc, silicic acid, viscous paraffin, perfume oil, fatty acid monoglycerides and diglycerides, petroethral fatty acid esters, hydroxymethyl-cellulose, polyvinylpyrrolidone, etc. The pharmaceutical preparations can be sterilized and if desired mixed with auxiliary agents, e.g., lubricants, preservatives, stabilizers, wetting agents, emulsifiers, salts for influencing osmotic pressure, buffers, colorings, flavorings and/or aromatic substances and the like which do not deleteriously react with the active compounds.

Such compositions may be prepared for use in parenteral administration, particularly in the form of liquid solutions or suspensions; for oral administration, particularly in the form of tablets or capsules; intranasally, particularly in the form of powders, nasal drops, or aerosols; vaginally; topically e.g. in the form of a cream; rectally e.g. as a suppository; etc.

The pharmaceutical agents may be conveniently administered in unit dosage form and may be prepared by any of the methods well known in the pharmaceutical arts, e.g., as described in *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980). Formulations for parenteral administration may contain common excipients such as sterile water or saline, polyalkylene glycols such as polyethylene glycol, oils of vegetable origin, hydrogenated naphthalenes and the like. In particular, biocompatible, biodegradable lactide polymer, lactide/glycolide copolymer, or polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers may be useful excipients to control the release of certain test compounds identified by the methods of this invention.

Other potentially useful parenteral delivery systems include ethylene-vinyl acetate copolymer particles, osmotic pumps, implantable infusion systems, and liposomes. Formulations for inhalation administration contain as excipients, for example, lactose, or may be aqueous solutions containing, for example, polyoxyethylene-9-lauryl ether, glycocholate and deoxycholate, or oily solutions for administration in the form of nasal drops, or as a gel to be applied intranasally. Formulations for parenteral administration may also include glycocholate for buccal administration, methoxysalicylate for rectal administration, or citric acid for vaginal administration. Other delivery systems will administer the therapeutic agent(s) directly at a body site of interest

A pharmaceutical composition of this invention can be employed in the present treatment methods as the sole active pharmaceutical agent or can be used in combination with other active ingredients including known agents with recognized immunomodulatory effects. Examples of such agents include, but are not limited to, cyclosporin, certain cytotoxic agents, lymphocyte immune globulin,

adrenocorticosteroids, sulfasalazine, FK-506, methoxsalen, rapamycin, and thalidomide. For disclosure relating to these and other useful agents see, e.g., *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (8th ed.) Gilman, A. et al. (eds.) McGraw-Hill Health Professionals Division, pp. 1264-1276, (1993).

The concentration of one or more treatment compounds in a therapeutic composition will vary depending upon a number of factors, including the dosage of the particular formulation to be administered, the chemical characteristics (e.g., hydrophobicity) of the composition employed, and the intended mode and route of administration. In general terms, one or more than one of the detected test compounds may be provided in an aqueous physiological buffer solution containing about 0.1 to 10% w/v of a compound for parenteral administration.

It will be appreciated that the actual preferred amounts of active compounds used in a given therapy will vary according to e.g. the specific compound being utilized, the particular composition formulated, the mode of administration and characteristics of the subject, e.g. the species, sex, weight, general health and age of the subject. Optimal administration rates for a given protocol of administration can be readily ascertained by those skilled in the art using conventional dosage determination tests conducted with regard to the foregoing guidelines. Suitable dose ranges may include from about 1μg/kg to about 100mg/kg of body weight per day.

Therapeutic compounds of the invention are suitably administered in a protonated and water-soluble form, e.g., as a pharmaceutically acceptable salt, typically an acid addition salt such as an inorganic acid addition salt, e.g., a hydrochloride, sulfate, or phosphate salt, or as an organic acid addition salt such as an acetate, maleate, fumarate, tartrate, or citrate salt. Pharmaceutically acceptable salts of therapeutic compounds of the invention also can include metal salts, particularly alkali metal salts such as a sodium salt or potassium salt; alkaline earth metal salts such as a magnesium or calcium salt; ammonium salts such an ammonium or

tetramethyl ammonium salt; or an amino acid addition salts such as a lysine, glycine, or phenylalanine salt.

For many applications of this invention, it will be helpful to use TCR and MHC antigen molecules that are substantially pure particularly in embodiments in which fully soluble molecules are employed. Preferably, such molecules will have been isolated from cell substituents that naturally accompany it so that the fusion proteins are present in at least 90 to 95% homogeneity (w/w). TCR and MHC antigen molecules including recombinant fusion proteins having at least 98 to 99% homogeneity (w/w) are most preferred for many applications of this invention such as those involving pharmaceutical, clinical and research use. Once substantially purified the molecules should be substantially free of contaminants for such applications. Once purified partially or to substantial purity, the molecules can be used therapeutically, or in performing *in vitro* or *in vivo* assays as disclosed herein. Substantial purity can be determined by a variety of standard techniques such as chromatography and gel electrophoresis. See generally Sambrook et al. in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed. 1989); and Ausubel et al. (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York for discussion relating to many of these standard methods; the disclosures of which are incorporated herein by reference.

As discussed, the TCR and MHC antigen molecules can be separated and purified by appropriate combination of known techniques. These methods include, for example, methods utilizing solubility such as salt precipitation and solvent precipitation, methods utilizing the difference in molecular weight such as dialysis, ultra-filtration, gel-filtration, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, methods utilizing a difference in electrical charge such as ion-exchange column chromatography, methods utilizing specific affinity such as affinity chromatography, methods utilizing a difference in hydrophobicity such as reverse-phase high performance liquid chromatography and methods utilizing a difference in isoelectric point, such as isoelectric focusing electrophoresis, metal affinity columns such as Ni-NTA. See generally Sambrook et al. and Ausubel et al. *supra* for disclosure relating to these methods.

By the term "fully soluble" or similar term is meant that the subject TCR or MHC antigen molecule is not readily sedimented under low G-force centrifugation (e.g. less than about 30,000 revolutions per minute in a standard centrifuge) from an aqueous buffer, e.g., cell media. Further, the fusion molecule is soluble if the it remains in aqueous solution at a temperature greater than about 5-37°C and at or near neutral pH in the presence of low or no concentration of an anionic or non-ionic detergent. Under these conditions, a soluble protein will often have a low sedimentation value e.g., less than about 10 to 50 svedberg units.

As used herein, the terms "fragment" or "functional fragment" as used in reference to a TCR molecule means a portion of that molecule (heterodimer or single chain construct comprising essentially full-length V chains) that is capable of specifically binding at least about 70% and preferably at least about 80%, 90%, 95% up to 100% or more of a particular MHC antigen molecule when compared to the corresponding full-length molecule. As an illustration, a full-length sc-TCR is defined as a molecule with a full-length V-α and V-β chain. Similarly, a full-length TCR heterodimer is defined as a molecule having full-length α and β chains particularly those also with corresponding transmembrane and cytoplasmic domains.

As used in reference to a MHC antigen molecule as disclosed herein, the term "fragment" or "functional fragment" means a portion of that molecule (heterodimer or single chain construct comprising essentially full-length chains) that is capable of specifically binding at least about 70% and preferably at least about 80%, 90%, 95% up to 100% or more of a particular TCR molecule when compared to the corresponding full-length molecule. As an illustration, a full-length sc-MHC is defined as a molecule with a full-length α and β chain. Similarly, a full-length MHC or HLA heterodimer is defined as a molecule having full-length α and β chains particularly those also with corresponding transmembrane and cytoplasmic domains.

The terms "fragment" or "functional fragment" as used to reference a particular CD3ζ sequence is meant a portion of the full-length sequence capable of inducing a cellular response of this invention. Preferred are fragments capable of binding at least about 70% and preferably at least about 80%, 90%, 95% up to 100% or more of a particular cellular response when compared to the corresponding full-length molecule.

Assays for detecting specific binding of the fragments and functional fragments disclosed are discussed herein and specifically include flow cytometry and BIAcore assays.

Example 1 - Generation of monovalent single-chain MHC/peptide complexes.

A. Construction of vectors for expressing soluble single-chain IE^k MHC class II molecules with a specific presenting peptide.

The goal of these studies was to develop screening methods for detecting agonists and antagonists of interaction between the MHC antigen molecule, such as an MHC/peptide complex, and the T cell receptor (TCR). It has been demonstrated previously that the MHC class II/peptide complex could be generated as a recombinant single-chain molecule that retains its ability to interact with TCR and stimulate T cell responses (Rhode et al. 1996. *J. Immunol.* **157**: 4885, WO 99/21572, USSN 09/204,979). The generation of single-chain (sc) murine IA^d/peptide and human HLA-DR2/peptide complexes has been described (WO 99/21572, USSN 09/204,979). The sc-class II molecules consists of a fusion between the β1-β2 fragment and the α1-α2 fragment via a flexible peptide linker. In addition, antigenic peptide sequences were linked to the amino terminus of the β1 domain via a peptide linker. For example, sequences encoding the chicken ovalbumin peptide, OVA 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) or the HSV-1 glycoprotein D peptide, GD 246-261 (APYTSTLLPPELSETP) were linked to the β1 gene fragment of the $scIA^d$ gene fusion to create the $scIA^d$/OVA and $scIA^d$/GD molecules, respectively. The antigenic peptides were positioned such that they could bind to the peptide-binding groove formed by the properly folded α1 and β1 domains. These molecules were shown to be capable of specifically stimulating T cell responses in vitro. For example, the $scIA^d$/OVA protein when immobilized on a tissue culture plate was capable of stimulating IL-2 release from the DO11.10 T cell hybridoma whereas the $scIA^d$/GD protein stimulated IL-2 release from the GD12 T cell hybridoma (Rhode et al. 1996. *J. Immunol.* 157: 4885). As described in the example below, these T cell assays were modified to identify compounds that inhibited the sc-MHC/peptide molecule's ability to stimulate T cell responses. As a control for the MHC specificity of these inhibitors, a T cell assay involving specific stimulation using a different murine sc-class

II/peptide complex was developed. Generation of this murine sc-class II/peptide molecule, single-chain IE^k linked to PCC 88-104 (scIE^k/PCC), is described as follows.

The MHC class II genes used for the scIE^k/PCC constructs were isolated by PCR amplification of cDNA generated from the appropriate APC, CH12 cells. Modified versions of gene fragments of the IE^k α and β chains were generated by PCR amplification using the cloned genes as template DNA. These fragments were assembled in the cloning scheme shown in Fig. 7A-C of the drawings and resulted in a chimeric gene encoding the antigenic peptide, PCC 88-104, linked to a single-chain IE^k molecule.

The development of the various genetic constructs containing individual α and β chain fragments is described in the following paragraph. The α1-α2 gene fragment first strand cDNA served as the template for PCR amplification using primers VW487 (470) and VW489 (477). The sequences of the oligonucleotides used in cloning are shown in Table 1. This fragment was extended at the 3' end by reamplifying with VW487 (470) and VW485 (471) which resulted in the α fragment ending with the IA^d transmembrane "hinge" region followed by the amino acid sequence MSGGGGC. This fragment was cloned into pGEM T-Easy (Clonetech, Palo Alto, CA) to yield plasmid pTVW406. Subsequent amplification of this α chain insert with primers VW487 (470) and VW490 yielded a fragment flanked by *Xho*I and *EcoR*I containing a "birA" site for in vitro biotinylation at the 3' end. This fragment was cloned into pGEM T-Easy to yield plasmid pTVW420-8. Both the C terminal and the BirA terminal fragments contain a *Xho*I restriction site at the 5' end and an *EcoR*I restriction site at the 3' end. The β1-β2 gene fragment first strand cDNA served as the template for PCR amplification using primers VW486 (469) and VW488 (472). This fragment was extended at the 5' end by reamplifying with VW484 (468) and VW486 (469), which resulted in the β fragment beginning with LSSAS where the codons for LS represents an *Afl*II restriction site and those for AS represents a *Nhe*I restriction site. The fragment was cloned into pGEM T-Easy (Clonetech, Palo Alto, CA) to yield plasmids pTVW407-1 and -3. The resulting construct had 13 amino acids preceding

the first amino acid of the mature β chain, LS (*Afl*II) S AS (*Nhe*I) GGGGSGGG. Oligonucleotide primers, VW482 (466) and VW483 (467), encoding the PCC peptide (KAERADLIAYLKQATAK) and overhanging cohesive ends which match those left by digestion with *Afl*II and *Nhe*I, were annealed and cloned into pTVW407-3 which had been digested with *Afl*II + *Nhe*I to yield plasmid pTVW410-35.

A description of the construction of the scIE^k with follows. A pGEM T-Easy vector containing the scIA^d/OVA fusion gene was constructed to serve as a cloning template for the scIE^k gene. The *Nco*I to *Eco*RI fragment from plasmid SSC1 (see WO 99/21572, USSN 09/204,979) containing the scIA^d/OVA fusion gene was introduced into a pGEM T-Easy based vector (pTVW406) cut with the same restriction enzymes. This resulting cloning template (pTVW408) contains the β chain leader sequence, the β chain with linked peptide flanked by the restriction sites *Afl*II + *Spe*I, a 20 amino acid linker sequence $(G_4S)_4$, and the α chain flanked by restriction sites *Xho*I *and EcoRI*. Alpha chain sequence containing a carboxyl terminal C derived from pVW406-2 was introduced into pTVW408 as a restriction fragment bounded by *Xho*I and *Eco*RI resulting in a vector, 406 + 408, that contained the IA^d β chain and the IE^k α chain. The IE^k β chain fragments containing either the linked PCC peptide or a single serine (derived from pTVW407-3and 410-35, respectively) were cloned into this plasmid backbone after digestion with *Afl*II and *Spe*I resulting in plasmids pTVW417-6 and pTVW416-6, respectively. The β chain in these constructs contained a mutation that resulted in amino acid 38 being changed from an asparagine (N) to a serine (S). This was corrected by replacing a *Hind*III to *Spe*I fragment in pTVW417-6 and pTVW416-6 with one from pTVW407-1 (which contained the correct β chain sequence) to yield plasmids pTVW422-1 (containing PCC peptide) and pTVW423-2 (containing serine). The resulting scIE^k gene fusions were cloned back into plasmid SSC1 as *Afl*II/*Eco*RI fragments resulting in plasmids pTVW424-1 (PCC) and pTVW425-2 (S). This was done in order to incorporate sequences important for efficient translation (i.e. the Kozak sequence). The sequence encoding the birA site was added to the single chain construct by cloning a *Xho*I to *Eco*RI fragment from pTVW420-8 into pTVW423-2 resulting in plasmid pTVW427-3.

Insect cell expression vectors containing the scIE^k genes were constructed in plasmid pBluBac4.5 (InVitrogen) such that they encoded each of the following combinations of β and α chain; β preceded by the PCC peptide linked to α with a carboyl-terminal cysteine (PCC/C), β preceded by serine ("blank" form) linked to α with a carboxyl-terminal cysteine (S/C), β preceded by the PCC peptide linked to α with a carboxyl-terminal birA sequence (PCC/birA), and β preceded by serine ("blank" form) linked to α with a carboxyl-terminal birA sequence (S/birA). The PCC/C and S/C forms of the vectors were constructed by cloning *Xma*I to *EcoR*I fragments from pTVW424-1 and pTVW425-2, respectively, into pBlueBac4.5 cut with the same enzymes yielding plasmids pTVW429-2 and pTVW428-1, respectively. The birA forms of these vectors were made by cloning a *Spe*I to *EcoR*I fragment from pTVW427-3 into pTVW429-2 and pTVW428-1 to yield pTVW431-1 (PCC/birA) and pTVW430-1 (S/birA).

Table 1
Oligonucleotides used in cloning

Designation	Sequence
VW482(466)	5'-tta agt aag gca gaa cga gca gat cta ata gct tat cta aaa caa gcc acc gcg aag g-3'
VW483(467)	5'-cta gcc ttc gcg gtg gct tgt ttt aga taa gct att aga tct gct cgt tct gcc tta c-3'
VW484(468)	5'-ctt aag tag cgc tag cgg agg ggg cgg aag cgg cgg agg ggc aag ctt cag acc atg g-3'
VW485(471)	5'-ccc gaa ttc tat tag cag cct cct cca cct gac att ggg agg agg gtt ttc tc-3'
VW486(469)	5'-cca cta gtc cac tcg acc gtg aca gg-3'
VW487(470)	5'-ggt tcc tcg agt atc aaa gag gaa cac acc atc-3'
VW488(472)	5'-gga ggg gca agc ttc aga cca tgg-3'
VW489(477)	5'-tga cat tgg gag gag ggt ttt ctc ttc-3'
VW490	5'-gta cga att cta tta ttc gtg cca ttc gat ttt ctg agc ttc gaa gat gtc gtt cag gcc tcc tcc acc tga cat-3'

B. Production of soluble scIE^k/PCC molecules in insect cells.

Purified plasmids pTVW429-2, pTVW430-1 and pTVW401-1 were used in cotransfection with Bac-N-Blue DNA (InVitrogen) and recombinant virus was isolated and enriched as described in Invitrogen's Bac-N-Blue Transfection Kit Manual, Version F. SF9 cells were used throughout.

Supernatant samples from plates or production flasks were tested for the presence of recombinant product ($scIE^k$) by ELISA. The ELISA involves coating 100 ng of 14-4-4S (PharMingen) anti-IE^k antibody onto wells of Nunc Maxisorp plates in 100 µl of PBS (phosphate buffered saline) overnight at 4°C. Blocking was done with 200 µl 10%FBS (fetal bovine serum)-PBS for at least one hour at 37 C and plates were washed three times with wash buffer (Tris-buffered saline (TBS) - 0.1% Tween 20). Samples were added at 100 µl/well and incubated 1 hr at room temperature. Plates were then washed 4 times with 200 µl wash buffer and 50 ng of biotinylated antibody 17-7-3 (PharMingen) was added in 100 µl 10%FBS-PBS followed by incubation for 1 hour at room temperature. Plates were washed 5 times with wash buffer and 100 µl of a 100 ng/ml NeutrAvidin horseradish peroxidase conjugated (Pierce) was added. After incubation for one hour at room temperature the plates were washed 5 times with wash buffer and 100 µl of using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) reagent (BioFX Laboratories) was added per well. One hundred µl of 0.18M H_2SO_4 was added to quench the reaction and absorbance was read at 450 nm.

The cotransfection mixes were plated for individual plaques as outlined in the InVitrogen manual. Isolated blue plaques were used to prepare small-scale plate lysates to be used as viral stocks and to be tested for IE^k reactivity by the ELISA described above. An example of A_{450} values for supernatants from 5 plaques resulting from a cotransfection with pTVW431-1 (PCC/birA) is shown in Table 2. The specificity of the signal is due to the secretion of $scIE^k$/PCC into culture supernatant by SF9 cells.

Table 2
IE^k ELISA of insect cell culture supernatant from cotransfection
A_{450} values

	Plaque Designation				
µl supernatant	A	B	C	D	E
100	0.495	0.432	0.235	0.427	0.292
50	0.276	0.243	0.146	0.280	0.177
25	0.162	0.162	0.110	0.189	0.127
0	0.052	0.051	0.055	0.053	0.055

High titer virus stocks were prepared from the small-scale plate lysates and used to infect 1-liter cultures of SF9 cells grown to 1 x 10^6 cells/ml. Supernatant from these infections was used to purify the $scIE^k$ as described below. The purified $scIE^k$ with linked PCC peptide was assayed for its ability to modulate the activation of the 2B4 T cell hybridoma as described below.

C. Purification of $scIE^k$/PCC molecules expressed in insect cells.

Supernatant from SF9 cells infected with recombinant baculovirus expressing sc IE^k/PCC protein was harvested 5 days after infection. Cells were removed from the medium by centrifugation at 9,500 x g, 4°C for 10 minutes. The pH of the clarified supernatant was then adjusted to 8 resulting in a cloudy white precipitate. This precipitate was removed by centrifugation at 12,000 x g, 4°C for 30 min to 2 hours. The supernatant from this centrifugation was filtered through a 0.2µ filter in preparation for immunoaffinity chromatography.

Immunoaffinity chromatography was carried out by applying the sample prepared as above on to a column of Sepharose 4B (Pharmacia) cross-linked with N22, an anti-IA and IE antibody produced by ATCC (American Type Culture Collection) cell line HB225. The column was equilibrated with 20 mM Tris pH 8.0 and was washed with this buffer until the A_{280nm} baseline was reached. The antibody column was then washed with the same buffer containing 1 M NaCl to remove nonspecifically bound proteins. The IE^k protein was eluted by application of PBS

followed by 50mM glycine-NaOH, pH11. The protein eluted in two peaks (monitored by A_{280}), the first in the PBS and the second in pH 11. The peak eluted at pH 11 was immediately adjusted to pH 7-8 with HCl. The samples from each peak were then concentrated and buffer exchanged into PBS by ultrafiltration. The purity and functionality of IE^k samples were tested by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and T cell activation assay (see below), respectively. Purified $scIE^k$/PCC from this preparation showed no contaminating bands on a Coomassie stained polyacrylamide gel and a total protein concentration of 0.37 mg/ml as assayed by absorbance.

D. Activation of T cells by $scIE^k$/PCC complex.

The T cell hybridoma 2B4 responds to the PCC peptide in the context of IE^k class II MHC molecules by producing IL-2. The production of IL-2 was assessed in an activation assay performed as described in the following paragraph. Individual wells in Nunc Maxisorp plates were coated with a mixture of $scIE^k$/PCC and anti-murine IL-2 antibody (PharMingen, 18161D) suspended in 100 µl PBS such that the $scIE^k$ molecule was present at concentrations between 400 and 12.5 ng/well and the anti-IL2 antibody was present at 100 ng/well. After coating overnight at 4°C the solution was removed from the plate and 1 x 10^5 2B4 cells were added per well in 100 µl of iMDM containing 10%FBS. The plate was incubated for 8 hours at 37°C in 10% CO_2 and then washed three times with wash buffer (TBS with 0.1% Tween-20). Biotin-labeled anti-murine IL-2 antibody (PharMingen, 18172D) in 10% FBS-PBS was added and incubated overnight at 4°C. Plates were then washed 3 times with wash buffer and 100 µl of a 100 ng/ml NeutrAvidin horseradish peroxidase conjugated (Pierce) was added and incubated for 15 min. to one hour at room temperature. This incubation was followed by 3 washes with wash buffer and 100 µl of TMB substrate was added and allowed to develop. One hundred µl of 0.18M H_2SO_4 was added to quench the reaction and absorbance was read at 450 nm. Results of one assay demonstrating that the $scIE^k$/PCC activates 2B4 cells are shown in Table

3. Peak stimulation took place between 100 and 200 ng of scIE^k/PCC fixed on the plate and absorbance values decreased at higher and lower concentrations.

Table 3
Activation of 2B4 T cells by scIE^k/PCC protein

scIE^k/PCC (ng/well)	Absorbance (450nm)
400	0.216
200	0.485
100	0.413
50	0.234
25	0.081
12.5	0.054
0	0.056

Example 2 - Generation of multi-valent single-chain IA^d/peptide-biotin/avidin complexes.

A. Construction of vectors for expressing scIA^d/peptide-BirA complexes.

Example 1 describes the generation and use of monovalent sc-class II/peptide molecules in stimulating T cell responses. One of the limitation of monovalent complexes as probes for MHC antigen-TCR interactions is the intrinsic low affinity between the MHC antigen molecule and the TCR. This problem can be overcome through the formation of multi-valent MHC antigen complexes. These multi-valent complexes have a number of uses in developing screening methods (described in the examples below) for detecting inhibitors of the MHC antigen-TCR interaction. Described in this example and in examples 3 to 5 are methods for generating multi-valent single-chain MHC antigen complexes.

One method of generating multi-valent MHC antigens such as multi-valent MHC/peptide complexes involves biotinylating the MHC/peptide molecule and binding up to four of the biotinylated molecules to a single avidin molecule. Specific peptide sequences that serve as target sequences for the biotin ligase enzyme can be

added to the MHC/peptide molecule. These sequences allow the enzymatic addition of a single biotin moiety per MHC/peptide molecule. The biotinylated MHC/peptide molecules can then form multi-valent complexes (dimers to tetramers) via high affinity interactions between the biotin and avidin.

For example, a DNA sequence encoding the IA^d α1-α2 fragment tagged with the biotin ligase BirA target sequence, GGGSLNDIFEAQKIEWHE, was transferred from pTVW 421-41 as a *XhoI-EcoRI* fragment into pTVW408-1to create pMBBir1. This vector was then cut with *SalI* and the restriction site overhang was digested to create a blunt end. The vector was then cut with NcoI and the DNA insert fragment was purified. The Blubac III vector (InVitrogen part number 120415) was cut with Hind III and the restriction site overhang was digested to create a blunt end. The vector was then cut with NcoI and the vector backbone fragment was purified and ligated to the insert fragment. The resulting Blubac III vector, pMB033, carries the $scIA^d$/OVA-BirA insert.

B. Production of soluble $scIA^d$/OVA-BirA molecules in insect cells.

The Blubac III vector carrying the $scIA^d$/OVA-BirA insert was used in a cotransfection and recombinant virus was enriched from wild type AcMNPv by plaque purification (see D.R. O'Reilly et al. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. W. H. Freeman & Co. New York (1992) and the InVitrogen Bac-N-Blue Transfection Kit Instruction Manual Version G Catalog # K855-01). SF9 cells were used throughout.

Insect cells were infected at high multiplicity of infection (moi) in TNMFH insect cell media (JRH Biosciences part no. 51942-79P) with 10% fetal bovine serum (Hyclone SH 30071.03) to produce recombinant $scIA^d$/OVA-BirA protein. Approximately 96 hours post infection, the pH of the infection supernatant was adjusted to 8.0 with 10N NaOH, centrifuged at high speed (greater then 10,000 X g) to remove particulate matter and 0.2 μm filtered. The processed supernatant was

tested by an IA-specific ELISA as described previously (Rhode et al. 1996. *J. Immunol.* **157**: 4885).

C. Purification and multimerization of scIA^d/OVA-BirA molecules.

Filtered infection supernatant at pH 8.0 was applied onto a column of Protein A Sepharose cross-linked with M5, an anti-IA^d monoclonal antibody. Following sample application, the immunoaffinity column was washed with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 until A_{280nm} baseline was reached. The antibody column was then washed with the same buffer containing 1M NaCl as above to remove non-specific bound proteins. The scIA^d/OVA-BirA protein was then eluted with 50 mM glycine NaOH, pH 11. The eluted peak protein (monitored by A_{280nm}) was immediately adjusted to pH 8.0 with 2M glycine, pH 2.0, concentrated and buffer exchanged into PBS by ultrafiltration. The purified sample was stored at 4-8°C. The purity and functionality of the scIA^d/OVA-BirA sample were tested by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Biotinylation of the lysine in the BirA tag was achieved by addition of E.coli Biotin Ligase enzyme (Avidity BIRA500) and Biomix buffers A and B (Avidity, supplied with Biotin Ligase). Biotinylated protein was incubated with avidin to form complexes of the scIA^d/OVA-BirA. At a 4:1 ratio of scIA^d/OVA-BirA:Avidin, about 80% of the scIA^d/OVA-BirA molecules formed multimeric complexes larger than monomer as seen by SDS-PAGE.

D. Activation of T cells by multi-valent scIA^d/OVA-BirA complexes.

To test the activity of these multimers, either multimer or monomer (no avidin) was coated on Nunc microtiter wells, DO11.10 cells were added and after 24 hours supernatant was harvested and relative IL-2 levels were determined by ELISA as described previously (Rhode et al. 1996. *J. Immunol.* **157**: 4885). Absorbance values for a typical experiment are shown in Table 4.

Table 4
Activation of DO11.10 T cells by multi-valent scIA^d/OVA-BirA complexes

IL-2 ELISA Values (A_{450})

ng complex/well	Stimulation by multi-valent scIA^d/OVA-BirA complexes	Stimulation by monovalent scIA^d/OVA-BirA complexes
1000	1.865	1.164
500	1.598	1.055
125	0.916	0.513
62	0.744	0.398
31	0.554	0.242

It was shown that the scIA^d/OVA-BirA molecule could be biotinylated, that a single molecule of avidin could bind more than one molecule of biotinylated scIA^d/OVA-BirA and that multimer was a much more potent stimulator of IL-2 production than monomer.

Example 3 - Generation of multi-valent single-chain IA^d/peptide-IgG complexes.

A. Construction of vectors for expressing scIA^d/peptide-IgG complexes.

A second strategy to create multi-valent MHC antigen complexes made use of the immunoglobulin constant domains as a molecular scaffold. In this approach, expression vectors were constructed encoding single-chain MHC/peptide molecules as fusion to the constant domains of IgG heavy and light chains. The generation of DNA constructs expressing peptide-linked single-chain MHC class II molecules fused to immunoglobulin Cκ domains has been described previously (WO 99/21572). The pIADK vector contains an expression cassette encoding the OVA 323-339 peptide linked to an scIA^d fused to the mouse IgG Cκ domain. The pDRHK vector contains an expression cassette encoding the human MBP 84-102 peptide linked to an scDR2 (1501) fused to the human IgG Cκ domain. Assembly of these vectors was described

in detail previously (WO 99/21572). These vectors have been deposited with the ATCC pursuant to the Budapest Treaty. The DNA vectors were deposited on September 17, 1997 and have been assigned Accession Nos. 209274 (pDRHK) and 209275 (pIADK). These vectors and their construction intermediates served as starting materials for the construction of the vectors described below and in Example 4.

In addition, a vector was constructed for the mammalian expression of the scIA^d/GD-mouse IgG Cκ fusion. To construct this vector, a bacterial shuttle vector pJA (see WO 99/21571) containing the scIA^d/OVA construct was digested with *EcoRV* and *NheI* to remove sequence encoding the OVA peptide. Annealed oligonucleotides (OPR225/OPR226 - oligonucleotides are listed in Table 5) encoding the gD 246-261 peptide were subcloned into the digested pJA vector, resulting in the pIAGK shuttle vector. The pIAGK vector was then digested with *EcoRV* and *BstBI*. The fragment containing the scIA^d/GD gene was purified and subcloned into *EcoRV*/*BstBI*-digested pIADK vector, resulting in the pIAGMK expression vector. This vector is capable of expressing the scIA^d/GD-Cκ fusion in mammalian cells.

Vectors capable of expressing fusions between the scIA^d/peptide molecules and the C_H1-C_H2-C_H3 domains of murine IgG2b heavy chain have been constructed. For the scIA^d/OVA construct, pIADK served as template DNA for PCR amplifications using oligonucleotide primers OPR237 and OPR239. For the scIA^d/GD construct, pIAGMK served as template DNA for PCR amplifications using oligonucleotide primers OPR238 and OPR239. The resulting PCR product carries the scIA^d/OVA or scIA^d/GD gene fusions carrying a 5' *NruI* site and a 3' *EcoRI* site needed for cloning into the mammalian expression vector, pSUN7. This pCDNA3-based vector carries an expression cassette encoding immunoglobulin leader sequence and the mouse IgG2b C_H1-C_H2-C_H3 domains. In this vector, *NruI* and *EcoRI* restriction sites are located near the 3' end of the leader sequence and the beginning (5' end) of the C_H1 domain, respectively. The PCR products were cloned into pGEM-T Easy generating the pGEM-GD7 vector for the scIA^d/GD construct and the pGEM-

OVA3 vector for the scIA^d/OVA construct. Following sequence verification, the scIA^d/GD and scIA^d/OVA gene fragments were isolated following digestion with *NruI* and *EcoRI*. The purified fragments were subcloned into *NruI*/*EcoRI*-cut pSUN7 resulting in the pJA-IgG2b/GD and pJA-IgG2b/OVA expression vectors for the scIA^d/GD-IgG heavy chain fusion and scIA^d/OVA-IgG heavy chain fusion, respectively.

Table 5

Oligonucleotides used in scIA^d/peptide-IgG vector construction

OPR225	5'-ATC GCC CCC TAC ACC AGC ACC CTG CTG CCC CCC GAG CTG AGC GAG ACC CCC G-3'
OPR226	5'-CTA GCG GGG GCT TCG CTC AGC TCG GGG GGC AGC AGG GTG CTG GTG TAG GGG GCG AT-3'
OPR237	5'-CAC CGC GTC GCG ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC ATC TCT CAG GCT GTT CAC-3'
OPR238	5'-CAC CGC GTC GCG ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC GCC CCC TAC ACC AGC ACC CTG CTG CCC-3'
OPR239	5'-CAC CGC GAA TTC GCT CCC TGA CAT GGG GGC TGG AAT CTC AGG TTC-3'

B. Mammalian cell production and purification of multimeric scIA^d/peptide IgG fusions.

To express multimeric scIA^d/GD-IgG molecules, mammalian cells were co-transfected with the pIAGMK and pJA-IgG2b/GD vectors and a vector, pPUR (Clontech) containing a gene that confers resistance to puromycin. Briefly, CHO cells were mixed with the linearized plasmid DNAs and transfected using Superfect transfection reagent by the manufacturer's instructions (Qiagen). The transfected cells were grown in non-selective IMDM medium overnight. Puromycin selective medium (IMDM medium, 20 μg/ml puromycin) was then added and the cells were transferred to 96 wells flat bottom tissue culture plates. Colonies of the cells co-transfected with the vectors became evident after 14-21 days. The transfectants carrying both the scIA^d/GD-Cκ and scIA^d/GD-Ig heavy chain vectors were expanded and were screened for expression of the soluble scIA^d-Ig fusion molecules by an ELISA specific for the IgG2b heavy chain/kappa chain multimer. Briefly, the ELISA

involves coating 100 ng of goat anti-mouse IgG2b (Southern Biotechnology Associates) onto wells of Nunc Maxisorp plates in 100 µl of PBS (phosphate buffered saline) overnight at 4°C. The coating solution was removed and 200 µl 10%FBS (fetal bovine serum)-PBS was added to each well for 2-3 hr at room temperature to block the wells. The blocking solution was removed and samples were added at 100 µl/well and incubated 1 hr at room temperature. Plates were then washed 4 times with 200 µl wash buffer and 100 µl goat anti-mouse kappa chain-HRP (Southern Biotechnology Associates - Stock diluted 1/1000 in sample diluent) and incubated for 2 hr at room temperature. Plates were washed 6 times with wash buffer and 100 µl of TMB was added. After color development, 100 µl of 0.18M H_2SO_4 was added to quench the reaction and absorbance was read at 450 nm. Positive wells were also screened with an IA-specific ELISA described previously (WO 99/21572, USSN 09/204,979). Based on the results of these assays, positive transfectants were selected and cloned by limiting dilution cloning as described previously (USSN 09/204,979). The cloned transfectants were expanded and growth for 2-3 weeks in multiple T175 tissue culture flasks to produce 2-4 L of culture media containing the scIA^d/GD-IgG multimer. Similar work was carried out to generate CHO cell lines co-transfected with the pIADK and pIA-IgG2b/OVA vectors. These transfectants were expanded in T175 flasks to produce 2-4 L of culture media containing the scIA^d/OVA-IgG multimer.

The sc-class II-IgG fusion molecules were purified by affinity chromatography using Protein A-Sepharose by standard methodologies (USSN 09/204,979). In some cases, an additional chromatography step using an anti-bovine IgG Ab column was added to remove residual serum bovine immunoglobulin. SDS-PAGE analysis of purified scIA^d/OVA-Ig and scIA^d/GD-Ig molecules is shown in Figure 8.

C. Activation of T cells by multi-valent scIA^d/OVA-IgG complexes.

The purified scIA^d/OVA-IgG and scIA^d/GD-IgG complexes were tested for their ability to activate the peptide-specific T cell hybridomas as measured by IL-2 production. This method involves coating the scIA^d/peptide-IgG protein and a rat anti-mouse IL-2 monoclonal antibody (PharMingen part no. 18161D) onto Maxisorp wells (NUNC Part No. 469949) in PBS overnight at 4°C. The coating solution was removed and 1 x 10^5 T cells (DO11.10 or GD12) were added per well in 200 µl IMDM (MediaTech Cellgro, Part No. 15-016-CV) containing 10 % FBS. Following an 8 hour incubation in a humid incubator at 37°C with 10% CO_2, the plates were washed 3 times with wash buffer and an anti-IL-2 antibody conjugated to biotin (PharMingen part no. 18172D) was added at 100 ng/well in 100 µl 10% FBS-PBS. Following an overnight incubation at 4°C, wells were washed 3 times with wash buffer and 250 ng of avidin peroxidase (Sigma part no. A3151) in 100 µl 10% FBS-PBS was added per well. Following incubation at 37°C for 30 minutes, the wells were washed 5 times with wash buffer and 100 µl ABTS substrate (Kirkegaard and Perry, Part No. 5060-00) was added per well. Absorbance was measured at 405 nm. The result of an activation assay using DO11.10 cells is shown in Table 6 and using GD12 cells is shown in Table 7. Changing the antigenic peptide in the scIA^d-IgG construct from OVA to GD eliminated the ability of the single chain molecule to stimulate IL-2 production by the DO11.10 cells whereas the opposite specificity was seen for the GD12 cells. The ability of the scIA^d/peptide-IgG protein to activate T cell responses was further characterized by comparison with the monovalent scIA^d/OVA molecules in the T cell activation assays. These assays showed that the immobilized scIA^d/peptide-IgG molecules were 2-8 fold more active in stimulating T cell responses than the scIA^d/peptide monomers.

Table 6
Activation of DO11.10 T cell by scIA^d/OVA complexes

	IL-2 ELISA Values (A_{405})			
ng complex/well	scIA^d/OVA-IgG	scIA^d/GD-IgG	scIA^d/OVA	scIA^d/GD
100	2.90	0.166	3.06	0.152
50	2.11	0.155	1.19	
25	0.758	0.166	0.209	

12.5	0.184	0.159	0.176

Table 7
Activation of GD12 T cell by scIA^d/GD complexes

IL-2 ELISA Values (A_{405})

ng complex/well	scIA^d/GD-IgG	scIA^d/OVA-IgG	scIA^d/GD	scIA^d/OVA
100	3.16	0.115	0.484	0.123
50	1.76	0.122	0.138	
25	0.751	0.115	0.121	
12.5	0.347	0.123	0.134	

Example 4 - Generation of *multi*-valent single-chain DR2/MBP-IgG complexes.

A. Construction of vectors for expressing multimeric single-chain DR2/MBP-IgG complexes.

Construction of the vector expressing the scDR2/MBP-IgG heavy chain fusion was carried out as follows. The pDRHK vector served as template DNA for PCR amplifications using oligonucleotide primers OPR254 and OPR257 (see Table 8). The resulting PCR product carries the scDR2/MBP gene fusion and a 5' *BsiWI* site and a 3' *EcoRI* site needed for cloning into the mammalian expression vector, pJRS355. This pCDNA3-based vector carries an expression cassette encoding immunoglobulin leader sequence and the human IgG1 C_H1-C_H2-C_H3 domains. In this vector, the *BsiWI* and *EcoRI* restriction sites are located near the 3' end of the leader sequence and the beginning (5' end) of the C_H1 domain, respectively. The PCR product was cloned into pGEM-T generating the JA-DR2-3 vector. Following sequence verification, the scDR2/MBP gene fragment was isolated from JA-DR2-3 following digestion with *BsiWI* and *EcoRI*. The purified fragment was subcloned into *BsiWI*/*EcoRI*-cut pJRS355 resulting in the pD2MIgH expression vector.

Table 8
Oligonucleotides used in scDR2/MBP-IgG vector construction

OPR254	5'-CAC CGC GAA TTC GCT CCC TGG GAG AGG GCT TGG AGC ATC-3'
OPR257	5'-CAC CGC GCG TAC GTC TTG TCC TAC GAC GAG AAC CCC GTG-3'

B. Mammalian cell production and purification of multimeric scDR2/MBP IgG fusions

To generate cell lines expressing multimeric scDR2/MBP-IgG molecules, a CHO cell line previously transfected with the pDRKH expression vector was used. These cells are described in detail in USSN 09/204,979. The pDRKH-transfected CHO cells were mixed with the linearized pD2MIgH and supercoiled pMACS

plasmid DNAs and electroporated using a Gene Pulser (Biorad). The pMACS vector allows for the transient expression of a membrane bound CD4 protein. The co-transfected cells were selected for cell surface CD4 expression as described previously (USSN 09/204,979). The cells were grown in non-selective IMDM medium in 96 wells flat bottom tissue culture plates. Colonies of the cells transfected with the vectors became evident after 14-21 days. The transfectants carrying both the scDR2/MBP-Cκ and scDR2/MBP-Ig heavy chain vectors were expanded and were screened for expression of the soluble scDR2-Ig fusion molecules by an ELISA specific for the heavy chain - HLA-DR fusion. Briefly, the ELISA involves coating 1 μg of sheep anti-Fd antiserum (The Binding Site) onto wells of Nunc Maxisorp plates in 100 μl of PBS (phosphate buffered saline) overnight at 4°C. The coating solution was removed and 300 μl 10%FBS (fetal bovine serum)-PBS was added to each well for 2-3 hr at room temperature to block the wells. The blocking solution was removed and samples were added at 100 μl/well and incubated 1 hr at room temperature. Plates were then washed 4 times with 200 μl wash buffer and 100 μl anti-HLA-DR monoclonal antibody L243-HRP (Stock diluted 1/1000 in sample diluent) and incubated for 2 hr at room temperature. Plates were washed 6 times with wash buffer and 100 μl of TMB was added. After color development, 100 μl of 0.18M H_2SO_4 was added to quench the reaction and absorbance was read at 450 nm. Positive transfectants were also screened with a DR-specific ELISA described previously (WO 99/21572, USSN 09/204,979). Based on the results of these assays, positive transfectants were selected and cloned by limiting dilution cloning as described previously (USSN 09/204,979). The cloned transfectants were expanded and growth for 2-3 weeks in multiple T175 tissue culture flasks to produce 2-4 L of culture media containing the scDR2/MBP-IgG multimer.

Example 5 - Generation of multi-valent scIA^d/peptide-IgM molecules.

A. Construction of vectors for expressing soluble scIA^d/peptide-IgM fusion molecules in insect cells.

As another approach of using the Ig scaffold to form multi-valent complexes, expression vectors were constructed encoding single-chain MHC/peptide molecules as fusion to the C_H2-C_H3-C_H4 domains of IgM. The C_H2-C_H3-C_H4 portion of the human IgM heavy chain was amplified using RT/PCR from the human B lymphoma cell line RL (ATCC number CRL-2261). Total RNA was prepared using the Qiagen total RNA kit (Part No. 14162) and cDNA was produced using the primer MBimr (5'-GGG GGG CCA TGG CTC GAG TCA GTA GCA GGT GCC AGC TG-3'). The cDNA served as template for PCR amplifications done using MBimr and MBimf (5'-GGGG GGA TCC GTG ATT GCT GAG CTG CCT CC-3'). The amplified gene fragment was ligated into the InVitrogen pGEM T-Easy vector (Part No. A1360) for sequence verification and was transferred as a *BamHI/XhoI* fragment into the PSL1190 vector (Pharmacia).

Gene fragments containing either the OVA 323-339 or HSV 246-261 antigenic peptides genetically linked to scIA^d fusion as described in pMBSC2.1 (USSN 5,869,270) were amplified by PCR using primers MB101 (5'-GGG CCA TGG CTC TGC AGA TCC CCA GCC-3') and MB100 (5'-GGG GGA TCC ACT AGC CCG GGA CCA GTG-3'). The PCR products were digested with *NcoI* and *BamHI* and transferred into the IgM -PSL1190 vector cut with *NcoI/BamHI*, resulting in pMB062 carrying the scIA^d/OVA-IgM construct and pMB063 carrying the scIA^d/GD-IgM construct. The entire gene fusion was transferred as a *NcoI/HindIII* fragment into the pBlubac III vector from InVitrogen (Part No. 120415), resulting in pMB060 carrying the scIA^d/OVA-IgM construct and pMB061 carrying the scIA^d/GD-IgM construct.

B. Production of soluble scIA^d/peptide-IgM fusion molecules in insect cells.

The pMB060 and pMB061 vectors with insert were each used in a cotransfection and recombinant virus was enriched from wild type AcMNPv by plaque purification (see D.R. O'Reilly et al. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. W. H. Freeman & Co. New York (1992) and the InVitrogen Bac-

N-Blue Transfection Kit Instruction Manual Version G Catalog # K855-01). SF9 cells were used throughout.

Insect cells were infected at high multiplicity of infection (moi) in TNMFH insect cell media (JRH Biosciences part no. 51942-79P) with 10% fetal bovine serum (Hyclone SH 30071.03) to produce recombinant scIA^d/OVA-IgM protein. Approximately 96 hours post infection, the pH of the infection supernatant was adjusted to 8.0 with 10N NaOH, centrifuged at high speed (greater then 10,000 x g) to remove particulate matter and 0.2 μm filtered. The processed supernatant was tested by ELISA to identify soluble fusion protein. The ELISA was carried out by coating 100 ng of M5/114 (ATCC TIB 120) anti -IA^d onto wells of a 96 well microtiter plate in 50 μl of PBS. A high protein rinse was done with 125 μl 10%FBS-PBS to remove unbound antibody. Samples are diluted into 10% FBS-PBS and were added at 100 μl/well. After 1 hour at 37°C, the plates were washed 3 times with 375 μl of wash buffer (PBS with 0.05% Tween-20). Biotinylated goat anti-human IgM (Sigma part no. B-1265) was added at a 1:4000 dilution in 100 μl 10% FBS-PBS 10% FBS. After 1 hour at 37°C, the plates were washed 3 times with wash buffer. Avidin peroxidase (Sigma Part No. A3151) was added at 250 ng/well in 100 μl 10% FBS-PBS and incubated for 30 minutes at 37°C. Plates were then washed 5 times with 375 μl of wash buffer and 100 μl of ABTS substrate (Kirkegaard and Perry, Part No. 5060-00) was added per well. Absorbance was measured at 405 nm.

Infection was done by adding 1 purified plaque to 50 ml of growth media containing SF9 cells at high viability. After 72 hours, 10 ml of the 50 ml infection was used as virus stock to infect 400 ml SF9 cells. After 96 hours, the ELISA was performed as above on supernatant from the 400 ml infection. Mean absorbance of duplicate wells is shown in Table 9 below. The specificity of the signal observed shown to be due to secretion of scIA^d/OVA-IgM into infection supernatant by SF9 cells.

Table 9

scIA^d/OVA-IgM ELISA of insect cell infection supernatants

Sample Dilution	Absorbance (405 nm)
Undiluted	1.274
1:2	0.964
1:4	0.739
1:8	0.488
1:16	0.361
1:32	0.279

Negative controls including sample diluent ($A_{405} = 0.171$) and insect cell produced scIA^d/OVA without an IgM tail ($A_{405} = 0.175$) showed background binding in this assay.

Supernatant from insect cells infected with the baculovirus carrying the scIA^d/GD-IgM expression cassette showed similar production of the scIA^d/GD-IgM molecules by this ELISA.

C. Purification of scIA^d/peptide-IgM fusion molecules.

Filtered infection supernatant at pH 8.0 was applied onto a column of Protein A Sepharose cross-linked with M5, an anti-IA^d monoclonal antibody. Following sample application, the immunoaffinity column was washed with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0 until A_{280nm} baseline was reached. The antibody column was then washed with the same buffer containing 1M NaCl as above to remove non-specific bound proteins. The scIA^d/OVA-IgM protein was then eluted with 50 mM glycine NaOH, pH 11. The eluted peak protein (monitored by A_{280nm}) was immediately adjusted to pH 8.0 with 2M glycine, pH 2.0, concentrated and buffer exchanged into PBS by ultrafiltration. The purified sample was stored at 4-8°C. The purity and functionality of the scIA^d/OVA-IgM sample was tested by SDS-PAGE and T cell activation, respectively. Purified scIA^d/OVA-IgM from this preparation showed no contaminating bands on a Coomassie stained polyacrylamide gel and total protein was 60 μg/ml by total protein assay. When analyzed without reduction of the interchain disulfide bonds, the scIA^d/OVA-IgM protein appear to be composed of higher order

(trimers and greater) multimers. Similar purification methods were used to generate scIA^d/GD-IgM protein from infected insect cell culture supernatant.

D. Activity of scIA^d/peptide-IgM complexes in stimulating T cell responses.

The purified scIA^d/OVA-IgM complexes were tested whether they could activate the OVA-specific DO11.10 T cell hybridoma as measured by IL-2 production. This method involves coating the scIA^d/OVA-IgM protein (or scIA^d/GD-IgM protein as a control) and a rat anti-mouse IL-2 monoclonal antibody (PharMingen part no. 18161D) onto Maxisorp wells (NUNC Part No. 469949) in PBS overnight at 4°C. The coating solution was removed and 1 x 10^5 DO11.10 cells were added per well in 200 µl IMDM (MediaTech Cellgro, Part No. 15-016-CV) containing 10 % FBS. Following an 8 hour incubation in a humid incubator at 37°C with 10% CO_2, the plates were washed 3 times with wash buffer and an anti-IL-2 antibody conjugated to biotin (PharMingen part no. 18172D) was added at 100 ng/well in 100 µl 10% FBS-PBS. Following an overnight incubation at 4°C, wells were washed 3 times with wash buffer and 250 ng of avidin peroxidase (Sigma part no. A3151) was added per well in 100 µl 10% FBS-PBS. Following incubation at 37°C for 30 minutes, the wells were washed 5 times with wash buffer and 100 µl ABTS substrate (Kirkegaard and Perry, Part No. 5060-00) was added per well. Absorbance was measured at 405 nm. The results of one activation assay are shown in Table 10 below. Changing only the antigenic peptide in the scIA^d-IgM construct from OVA to GD eliminated the ability of the single chain molecule to stimulate IL-2 production by the DO11.10 cells. Neither DO11.10 cells with immobilized anti-IL2 antibody alone nor DO11.10 cells with scIA^d/GD-IgM and anti-IL2 antibody resulted in IL-2 secretion.

Table 10
Activation of DO11.10 T cell by multi-valent scIA^d/OVA-IgM complexes

IL-2 ELISA Values (A_{405})

ng complex/well	Stimulation by scIA^d/OVA-IgM	Stimulation by scIA^d/GD-IgM
300	0.853	0.248
100	1.700	0.221
33	1.637	0.206
11	0.601	0.188
4	0.230	0.179
1	0.195	0.184
0.3	0.192	0.189
Anti-IL-2 alone	0.214	0.200

To further characterize the ability of the scIA^d/peptide-IgM protein to activate T cell responses, the multi-valent scIA^d/peptide-IgM molecules were directly compared to the monovalent scIA^d/peptide molecules in the T cell activation assays described above. The results of assays using DO11.10 and GD12 T cells are shown in Table 11 and 12, respectively. These assays showed that the immobilized scIA^d/peptide-IgM molecules were 5-10 fold more active in stimulating T cell responses than the scIA^d/peptide monomers. The peptide specificity of the response was observed for both monomeric and multimeric scIA^d/peptide molecules.

Table 11
Activation of DO11.10 T cell by scIA^d/OVA complexes

	IL-2 ELISA Values (A_{405})				
ng complex/well	scIA^d/OVA-IgM	scIA^d/GD-IgM	scIA^d/OVA	scIA^d/GD
250	1.475	0.193	0.665	0.180
125	1.610	0.180	1.059	0.179
62	1.334	0.157	1.032	0.164
31	1.417	0.165	0.646	0.213
15	1.178	0.140	0.397	0.152
7	0.838	0.148	0.236	0.163
3	0.529	0.140		
1	0.268	0.153		

Table 12
Activation of GD12 T cell by scIA^d/GD complexes

	IL-2 ELISA Values (A_{405})			
ng complex/well	scIA^d/OVA-IgM	scIA^d/GD-IgM	scIA^d/OVA	scIA^d/GD
250	0.232	1.406	0.230	0.688
125	0.235	1.324	0.189	0.913
62	0.201	1.076	0.183	0.863
31	0.190	0.982	0.181	0.450
15	0.185	0.833	0.160	0.174
7	0.170	0.799	0.178	0.156
3	0.188	0.623		
1	0.156	0.404		

The results from Examples 2, 3 and 5 clearly show that the multi-valent forms of the scIA^d/peptide complex are more potent at stimulating T cell responses than the monovalent form. These complexes would be preferred in screening methods where T cell responses to the MHC/peptide complex require a elevated threshold of TCR:MHC/peptide interaction. Such screening methods using T cells expressing recombinant scTCR-CD3ζ fusions are described in Examples 11-14 below. The multi-valent MHC/peptide complexes are also preferred in screening methods that

rely on the detection of interactions between the MHC/peptide complex and membrane-bound TCR (see Example 15) or purified TCR (see Examples 16 and 17).

Example 6 - Generation of multi-valent DO11.10 single-chain T cell receptor complexes.

A. Construction of vectors expressing the DO11.10 scTCR/murine IgG2b fusion molecule.

As described above, development of screening methods to detect interactions between the MHC antigen molecule and the TCR can be greatly facilitated by the availability of monovalent and preferably multi-valent MHC antigen complexes and TCR reagents. Methods for generating monovalent and multi-valent single-chain TCR (scTCR) molecules have been described previously (Weidanz, et al. 1998. *J. Immunol. Methods* **221**:59, U.S. Patent Applications No. 08/813,731 and 08/943,086). This example describes use of these methods to create multi-valent DO11.10 scTCR molecules for screening application such as those described in Examples 16 and 17.

The cloning of the DO11.10 scTCR has been described in the pending U.S. Applications No. 08/813,731 ("Fusion Proteins Comprising Bacteriophage Coat Protein and A Single-chain T Cell Receptor") and 08/943,086 ("Fusion Proteins Comprising Single-Chain T-Cell Receptor and an Immunoglobulin Light Chain Constant Region").

The mammalian IgG2b expression vector pSUN7 has been described in the most recent TCR patent application ("Polyspecific Binding Molecules and Uses Thereof", Ref. No. 48,531-P).

For the construction of the DO11.10 scTCR/murine IgG2b fusion molecule, the pSUN7 expression vector was digested with *Nru*I and *EcoR*I (which drops out the scFv originally cloned into the vector). The DO11.10 scTCR was reamplified from pSUN23 using specific primers KC267 (5' *Nru*I) and KC268 (3' *EcoR*I) (see Table

13). The PCR products were cloned into the pGEM-T Easy vector for sequencing. The correct DO11.10 scTCR fragment was isolated by restriction digest/gel purification and then ligated into the *NruI/EcoRI*-digested pSUN7 expression vector to create the final DO11.10 scTCR/murine IgG2b expression vector.

Table 13
Oligonucleotides used in cloning

KC267	5'-GAG GTG TCG CGA GAG CAG GTG GAG CAG CTT CC-3'
KC268	5'-GTG GAG GAA TTC GTC TGC TCG GCC CCA G-3'
KC303	5'-GAG GTG GTT AAC GAT CCC AAA CTC TGC TAC-3'
KC304	5'-GAG GTG ATC GAT AAG TGT ACT TAC GTT TTT AGC GAG GGG GCA GGG C-3'
KC312	5'-GAG GTG GTT AAC GAT CCC AAA CTC TGC TAC TTG CTA GAT GGA ATC CTC-3'

B. Mammalian expression of the DO11.10 scTCR/murine IgG2b fusion molecules.

The CHO cells were prepared for transfection by washing with cold DPBS. Approximately 10^7 cells were resuspended in DPBS and mixed with 20 μg of *PvuI*-linearized DO11.10 scTCR/murine IgG2b DNA. After 5 minutes on ice, the cells were electroporated using a Gene Pulser (BioRad) set to deliver one pulse of 250 volts, 0.25 μFd. The pulsed cells were placed on ice for 5 minutes. The cells were diluted into 10 ml of IMDM (with 10% FBS) and grown in T-25cm^2 flasks overnight at 37°C with 5% CO_2.

The transfected cells were diluted 1:200 and plated out the next day in 96 well plates in selective medium (i.e. 10% FBS-IMDM with 0.75 mg/ml G-418 sulfate).

Approximately two weeks later, colonies were tested by ELISA for protein expression. A 96 well plate (Nunc Maxisorp) was coated with the KJ-1 mAb (this mAb recognizes correctly folded DO11.10 TCR) in PBS overnight at 4°C. After blocking with 10% FBS-PBS for 1 hour, the colony supernatants were added and incubated for 30 minutes at room temperature. After washing, an anti-murine IgG2b-

HRP conjugated polyclonal antibody (Caltag) was added for 30 minutes. The ELISA was developed using TMB substrate and quenched with 0.1N sulfuric acid. The absorbance was read at 450nm.

Only 10% of the tested colonies were positive in the ELISA. Three candidates were chosen for expansion and primary cloning by limiting dilution.

Approximately ten days later, the primary clones were tested by ELISA to select for the highest protein producing cell line. The ELISA was similar to the assay described above except the F23.1 mAb (this mAb detects a portion of the TCR V beta 8 chain) was used in place of the KJ-1 mAb. Four candidates were expanded and the clone with the highest TCR expression level (#13-1) was chosen for further characterization studies.

C. Generation of multi-valent DO11.10 scTCR fusion molecules.

Expression of the DO11.10 scTCR/murine IgG2b fusion molecule in mammalian cells produces monomers and dimers of TCR as shown in Fig. 9. The addition of a kappa chain fusion to complement the IgG2b heavy chain fusion could lead to the formation of tetrameric molecules. To test this hypothesis, it was first necessary to establish that a scTCR/IgG2b fusion molecule could pair effectively with a scTCR/kappa fusion molecule.

The cloning of the DO11.10 scTCR/murine kappa fusion molecule has been described in the pending U.S. Application No. 08/943,086. To demonstrate heavy chain/kappa chain pairing, a transient transfection experiment was set up following Qiagen's Superfect Transfection Reagent protocol for transient transfection of adherent cells. Briefly, 2.5 x 10^5 Cos-7 cells were seeded (per well) in a 6 well plate. The next day, 2 μg of DNA (1 μg of DO11.10 scTCR/kappa plus 1 μg of DO11.10 scTCR/IgG2b) was added to 100 μl of IMDM medium. Ten μl of the Superfect Reagent (Qiagen) was then added and mixed. After a 10 minutes incubation at room

temperature to allow DNA/dendrimer formation, 600 µl of IMDM containing 10% FBS was added to the complexes. The COS cells were washed with DPBS and the complexes were pipetted onto the cells. After 2 hours at 37°C, the cells were washed again and fresh IMDM containing 10% FBS was added to the wells. The transfections were incubated at 37°C with 5% CO_2 for 3 days before being assayed.

Supernatant from the transient transfections was tested by ELISA for pairing of the scTCR/IgG2b fusion molecule with the scTCR/kappa fusion molecule. A 96 well plate (Nunc Maxisorp) was coated with goat anti-murine kappa polyclonal antibody (Southern Biotech) in PBS overnight at 4°C. After blocking with 10% FBS-PBS for 1 hour, the transient supernatants were added and incubated for 30 minutes at room temperature. After washing, an anti-murine IgG2b-HRP conjugated polyclonal antibody (Caltag) was added for 30 minutes. The ELISA was developed using TMB substrate and quenched with 0.1N sulfuric acid. Absorbance (read at 450 nm) was 40 times greater than the negative control, clearly indicating that the successful pairing of scTCR/kappa with scTCR/IgG2b.

The following examples describe the generation of cell lines expressing recombinant T cell receptors.

Example 7 - Generation of a murine T cell hybridoma carrying a recombinant T cell receptor.

Development of cell-based screening methods to detect interactions between the MHC antigen molecule and the TCR can be greatly facilitated by the availability of immortalized T cell lines expressing the appropriate TCR. Fusions between isolated T cells and thymoma cells (i.e. BW5147) have been made to generate murine T cell hybridomas. However the same methods can not be readily applied to the generation of immortalized human T cell lines. As more generalized method, immortalized T cell lines have been generated by transfection to express recombinant TCRs on the cell surface (see Engel et al. 1992. Science 256:1318; Hastings et al.

1996. J. Immunol. 157:3460; Brawley, J.V. and P. Concannon. 1999. J Immunol. 163:4946). A similar approach is described in this and the next two examples. In each case, a fusion was made between the extracellular antigen recognition domains of the TCR and the intracellular signaling domain of the CD3-ζ chain. When transfected into T cells, the fusion molecules showed functional activity when stimulated with MHC-peptide complex. In this example, the T cell line used in the transfection was a hybridoma expressing an endogenous TCR on its surface. In examples 8 and 9, the T cell lines used do not express functional endogenous TCRs on their surfaces.

A. Construction of the DO11.10 scTCR/CD3ζ fusion molecules.

The cloning of the DO11.10 scTCR has been described in the pending U.S. Applications No. 08/813,731 ("Fusion Proteins Comprising Bacteriophage Coat Protein and A Single-chain T Cell Receptor") and 08/943,086 ("Fusion Proteins Comprising Single-Chain T-Cell Receptor and an Immunoglobulin Light Chain Constant Region").

In the most recent patent application ("Polyspecific Binding Molecules and Uses Thereof", Ref. No. 48,531-P), the construction of a pGEM T-Easy-based "shuttle vector" was described. The vector consisted of a scTCR amplified as a 5' *Age*I-3' *Hpa*I/*Bsp*EI/*Nru*I/*Cla*I DNA fragment cloned into the pGEM-T Easy vector. The 3' end then served as a polylinker region for the addition of a linker, a scFv and a purification tag to create a bispecific molecule.

For the construction of the DO11.10 scTCR/CD3ζ fusion molecules, the DO11.10 scTCR/linker/scFv/tag/pGEM-T Easy "shuttle vector" was digested with *Hpa*I and *Cla*I to remove the polylinker region, leaving only the DO11.10 scTCR as a 5' *Age*I-3' *Hpa*I fragment in pGEM-T Easy.

The CD3ζ chains were amplified from cDNA (murine cDNA was made from 2B4 T cell hybridoma RNA; human CD3ζ cDNA was a kind gift from Dr. Linda Sherman's laboratory) using mouse specific primers KC312 (5' *Hpa*I) and KC304 (3' *Cla*I) or human specific primers KC303 (5' *Hpa*I) and KC304. The KC304 primer also encoded for a 5' stop codon and splice site. The PCR products were cloned into the pGEM vector (the original vector from Promega) for sequencing. Correct CD3ζ fragments were isolated by restriction digest/gel purification and then ligated into the *Hpa*I/*Cla*I-digested DO11.10/pGEM vector (described above) to create either a DO11.10 scTCR/murine CD3ζ or DO11.10 scTCR/human CD3ζ fusion construct in pGEM-T Easy, shown in Fig. 10.

The mammalian IgG kappa vector pSUN9 (described in the pending U.S. Application No. 08/943,086) was selected for expression of the scTCR/CD3ζ fusion molecules. The expression vector and the fusion constructs (in pGEM-T Easy) were both digested with *Age*I and *Cla*I. The scTCR/CD3ζ DNA fragments were isolated and ligated into the cut pSUN9 vector to create the final mammalian cell expression vectors, DO11.10 scTCR/murine CD3ζ and DO11.10 scTCR/human CD3ζ.

B. Generation of 2B4 cells expressing membrane-bound DO11.10 scTCR/murine CD3ζ fusion molecules.

The 2B4 T cell hybridoma is the result of a fusion of T cells from B10.A mice with the BW5147 cell line. 2B4 cells recognize pigeon cytochrome C (PCC) when presented in the context of IE^k.

2B4 cells were prepared for transfection by washing with cold DPBS. Approximately 10^7 cells were resuspended in DPBS and mixed with 20 μg of PvuI-linearized DO11.10 scTCR/murine CD3ζ DNA. After 5 minutes on ice, the cells were electroporated using a Gene Pulser (BioRad) set to deliver one pulse of 250 volts, 960 μFd. The pulsed cells were placed on ice for 5 minutes. The cells were diluted into 10 ml of 10% IMDM and grown in a T-25cm^2 flask overnight at 37°C with 5% CO_2.

After 24 hours, the cells were transferred to a T-75cm^2 flask and 40 ml of selective medium (i.e. 10% FBS-IMDM with 1 mg/ml G418) was added. Three days later, the "bulk" 2B4 transfectants were plated out in 96 well plates at 10, 100 or 1000 cells per well in selective medium. Approximately two weeks later, the plated transfectants were screened for DO11.10 expression using flow cytometry. The cells were stained with biotinylated- F23.1 mAb for 30 minutes on ice. The F23.1 mAb detects a portion of the TCR V beta 8 chain; therefore it binds to the DO11.10 TCR but not the 2B4 TCR. The cells were gently spun, the supernatant was aspirated and streptavidin-labeled CyChrome was added. After 15 minutes on ice, the cells were

washed twice with 1% FBS/DPBS and resuspended. Cell staining results were acquired on a Becton Dickinson FACScan instrument.

Approximately 90% of the tested colonies were positive for DO11.10 scTCR expression. Two candidates were selected for primary cloning by limiting dilution.

Two weeks later, primary clones were screened by flow cytometry as previously described. Six clones, with various levels of CD4 and DO11.10 scTCR expression, were chosen for further characterization studies. Use of these clones in T cell activation studies using recombinant scIA^d/OVA complexes is described in Example 11.

Example 8 - Generation of murine T cell lines carrying recombinant T cell receptor and recombinant CD4 molecules.

A. Generation of BW5147 cells expressing membrane-bound DO11.10 scTCR/CD3ζ fusion molecules.

The BW5147 (BW) cell line is a mouse thymoma that lacks surface expression of TCR alpha and beta chains. (This cell line is often used as the fusion partner with T cells to generate T cell hybridomas.)

The BW cells were prepared for transfection by washing with cold DPBS. Approximately 10^7 cells were resuspended in DPBS and mixed with 20 μg of *Pvu*I-linearized DO11.10 scTCR/murine CD3ζ DNA. In a separate tube, 10^7 cells were mixed with 20 μg of *Pvu*I-linearized DO11.10 scTCR/human CD3ζ DNA. After 5 minutes on ice, the cells were electroporated using a Gene Pulser (BioRad) set to deliver one pulse of 250 volts, 960 μFd. The pulsed cells were placed on ice for 5 minutes. The cells were diluted into 10 ml of 10% IMDM and grown in T-25cm^2 flasks overnight at 37°C with 5% CO_2.

After 24 hours, the cells were transferred to T-75cm^2 flasks and 40 ml of selective medium (i.e. 10%FBS-IMDM with 1 mg/ml G418) was added to each. Three days later, the "bulk" BW transfectants were plated out in 96 well plates at 10, 100 or 1000 cells per well in selective medium. A "bulk" transfected culture was also maintained for each.

Approximately two weeks later, the "bulk" transfected cultures were screened for positive transfectants using flow cytometry. The cells were stained with FITC-conjugated H57-597 mAb for 30 minutes on ice. The H57-597 mAb detects a linear epitope of the TCR Cβ chain. After washing twice with 1% FBS/DPBS, the cells were resuspended in the same buffer. Cell staining results were acquired on a Becton Dickinson FACScan instrument. The "bulk" transfected cultures both showed a broad range of TCR expression, as shown in Fig. 11.

The "bulk" transfected cultures were also tested in an activation assay using immobilized H57-597 mAb. A 96 well plate was coated with 300 ng/well of mAb overnight. The following day, 10^5 cells were added to each well and the assay was incubated overnight at 37°C with 5% CO_2. The supernatants from the assay were tested in a murine IL-2 sandwich ELISA as described previously (WO 99/21572, USSN 09/204,979). The "bulk" transfected cultures were specifically stimulated to produce IL-2 based on this assay.

The transfectants that grew on the 1000 cells/well plate were screened by flow cytometry for expression of the DO11.10 scTCR/murine CD3ζ molecule as described in Example 7. One-third to two-thirds of the tested candidates were positive for TCR expression. The DO11.10 scTCR/murine CD3ζ transfectant (BW/D-Z #8) with the highest expression level was primary cloned, expanded and further characterized.

Primary clones from BW/D-Z #8 were screened by flow cytometry. One clone (#8-39) was selected as the best cell line to use for additional characterization studies.

The BW/D-Z cell line was to compare to the original T cell hybridoma DO11.10 from which the scTCR gene was cloned. When the two cell lines were stained side-by-side, it was evident that the level of TCR expression on the transfected BW cells was higher than on the native T cell hybridoma as disclosed by the H57-597 mAb. Both cell lines were stimulated to produce IL-2 in the presence of APCs (A20 cells) loaded with the OVA peptide. However, when purified single-chain IA^d/OVA was immobilized on a plate, the DO11.10 T cell hybridoma was activated but the BW/D-Z cell line failed to produce detectable levels of IL-2. It was believed that an accessory molecule, involved in the stabilization of the MHC antigen/TCR interaction, might be the missing component in the activation assay. The CD4 molecule was the most logical choice as it is directly involved in TCR binding to MHC molecule and the BW/D-Z cells do not express CD4 on their surface.

B. Construction of vectors for expression of membrane bound CD4 receptors.

The CD4 receptor used for this construct was originally isolated by PCR amplification of cDNA generated from the mouse T cell hybridoma GD12 (Grammer, S.F. et al. *J. Immunol.* 145:249 (1990)).

Two different CD4 receptor genes were constructed: a full-length gene containing the extracellular, transmembrane (TM) and cytoplasmic (CM) domains, and a truncated receptor lacking a cytoplasmic domain. The latter construct was conceived to elucidate the contribution of CD4 extracellular receptor domain to the TCR.MHC/peptide interaction and to the amplification of this interaction through its cytoplasmic domain.

The two CD4 receptor genes were generated by PCR and were cloned into the expression vector pCDNA3.1: Hygro+.

To generate the full length CD4 gene, two oligonucleotide primers (see Table 14) were designed to amplify a 1550 bp PCR fragment containing the entire open reading frame of the CD4 receptor gene and 169bp of upstream sequence. Oligonucleotides CDF1 and CDF3 were used in PCR to amplify the full-length CD4 gene while CDF1 and CDF4 were used to amplify the CD4 deltaCM gene. Both DNA fragments were constructed with flanking *Hind*III and *Xho*I restriction sites. Since an *Xho*I site is present 95bp upstream of the initiating methionine of CD4, to clone the full-length gene, a 1480 bp *Xho*I fragment was generated and ligated to an *Xho*I digested pCDNA3.1 Hygro+ vector (Clontech). The resulting plasmid was linearized with *Bgl*II and used to transfect BW/D-Z cells (as described in Example 7).

A similar strategy was devised to generate the truncated CD4 gene. The oligonucleotide primers CDF1 and CDF4 were used to amplify a 1497 bp PCR fragment containing the open reading frame of the CD4 receptor gene lacking the cytoplasmic domain and containing 169 bp of upstream sequence. This fragment was flanked with *Hind*III and *Xho*I restriction sites. An *Xho*I site is present 95bp upstream of the initiating methionine. A 1427 bp *Xho*I fragment was ligated to a *Xho*I digested pCDNA3.1 Hygro+ vector (Clontech) and the resulting plasmid was linearized with *Bgl*II and used to transfect BW/D-Z cells.

Table 14
Oligonucleotide primers used in cloning of murine CD4 and CD4 delta CM

Designation	Sequence
CDF1	5'-GGG GAA GCT TTT TTC ATT TAC GAA CAT CTG TGA AGG C-3'
CDF3	5'-GGG GTC GAG TTA TCA GAT GAG ATT ATG GCT CTT CTG C-3'
CDF4	5'-GGG GCT CGA GTT ATC AGC GCT GTT GGT GCC GGC ACC TGA CAC AGC AGA GGA TGC AGA G-3'

C. Generation of BW/D-Z cells expressing membrane-bound CD4 receptors.

BW/D-Z cells transfected with either the full length or the truncated CD4 genes were grown in IMDM medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 1 mg/ml Hygromycin. Resistant colonies were cloned by limited dilutions and were examined by FACS analysis for surface expression of CD4 receptor. Approximately 10^5 cells were mixed with FITC labeled rat anti murine CD4 antibody (PharMingen) in 50 µl of PBS with 1% serum. Cell surface expression of the recombinant CD4 receptor was analyzed by flow cytometry as shown in Figure 12A.

Positive clones were also examined by FACS analysis for membrane bound expression of DO11.10 scTCR. Approximately 10^5 cells were mixed with anti-TCR beta-chain biotinylated antibody H57. The cells were washed and mixed with streptavidin-FITC and analyzed by flow cytometry as shown in Fig. 12B. Of the double positive cell lines examined, BWDZ:CD4+ (2E11) and BWDZ:deltaCM (D6) were selected for further TCR:MHC/peptide interaction studies using cognate OVA-peptide presenting cells (APCs). The same T cell lines were used in stimulation studies with immobilized recombinant $scIA^d$/OVA molecules described in Example 12.

D. Stimulation of BWDZ:CD4+ T cells by peptide-loaded APCs.

To demonstrate that BWDZ:CD4+ cells are stimulated with cognate APCs, A20 cells were mixed with OVA peptide. A two-fold serial dilution of APCs was made and mixed with 10^5 T cells. The cell mix was incubated in 200 µl of IMDM medium containing 10% FBS at 37°C overnight. Production of IL-2 in the culture media was determined by an IL-2 specific ELISA as described previously. Production of IL-2 indicates the extent of T cell stimulation, as shown in Fig. 13. DO11.10 cells were used as a positive control and BW cells were used as a negative control. The IL-2 production of the two cell lines expressing CD4 was compared to that of the 2B4/DZ. The addition of the full-length CD4 accessory molecule restored IL-2 production of the BW/DZ cells up to 75%-80% of that of DO11.10 cells. The truncated CD4 molecule lacking the cytoplasmic domain restored only 10% by comparison. As predicted, CD4 cytoplasmic domain plays a major role in amplifying the TCR:MHC/peptide interaction, through its recruitment of lck[56].

Example 9 - Generation of a human T cell line expressing recombinant human T cell receptor.

A. Construction of vectors containing cDNA clones of the TCR α and β chains from the human MBP-reactive cell line E11.

The human T cell line E11 recognizes and reacts to a peptide from myelin basic protein (MBP 83-102, YDENPVVHFFKNIVTPRTPP) in the context of the human MHC II protein HLA-DR2 (DRB1*1501). It was originally isolated from a patient with multiple sclerosis and was provided to us as a frozen cell pellet by Corixa Corp.

Total RNA was prepared from 1 x 10^8 cells using the RNeasy kit from Qiagen. After dilution in RLT (lysis) buffer, the preparation was divided into aliquots equivalent to 1 x 10^7 cells for further processing. Final RNA concentration was

determined spectrophotometrically. First strand cDNA was prepared using the 5' RACE cDNA synthesis primer and the SMART II oligo from Cloneteeh (Menlo Park, CA) as outlined in their user manual (PT3269-1, March 1999). Oligonucleotides used are listed in Table 15. PCR amplification of the first strand (RACE) was performed according to instructions with the following exceptions; the reaction volume was doubled to 100 µl and ExTaq enzyme and buffer (Panvera Corp.) were used. The gene specific primers used in the reaction primed in the constant region of the α and β chain, either close to the variable region ("N terminal") or at or near the end ("C terminal"). The RACE reactions yielded products of the expected size for all four of the combinations and these products were then cloned into pGEM-T Easy (Promega Corp., Madison,WI) for sequence analysis. Analysis of 12 β chain candidates yielded two variable region gene sequences; 11 of 12 clones were TRVB12-4 and one of 12 clones was TRVB14 (IGMT nomenclature, see ImMunoGeneTics databases, http://imgt.cnusc.fr:8104). Analysis of 14 α chains yielded two sequences in approximately equal frequency; 5 of 14 clones were TRAV9s1, 7 of 14 clones were TRAV22s1 and the remaining two were TRAV1s3 and TRAV4s1 (IGMT nomenclature).

Table 15

Oligonucleotide printers used in cloning of TCR α and β chains from the E11 cell line

designation	sequence
SMART II 1st strand cDNA (Clonetech)	5'-AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG-3'
5'-RACE 1st strand cDNA (Clonetech)	5'$(T)_{25}N_{-1}N$-3' (N=A, C, G, or T; N-1=A, G, or T)
Universal primer mix	long (0.2 µM) 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATG GGC AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT-3' short (1.0 µM) 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATG GGC-3'
RACE 5' primer (Clonetech)	

VW510 5'-ATC CTT TCT CTT GAC CAT GGC CAT C-3'
RACE 3', β chain, C terminal

VW511 5'-CAC AGC GAC CTC GGG TGG GAA CAC-3'
RACE 3', β chain, N terminal

VW512 5'-GCT GGA CCA CAG CCG CAG CGT CAT G-3'
RACE 3', α chain, C terminal

VW513 5'-CAG CTG GTA CAC GGC AGG GTC AGG-3'
RACE 3', α chain, N terminal

B. Construction of mammalian expression vectors containing cDNA clones of the TCR α and β chains from the human MBP-reactive cell line E11 as fusions to human CD3ζ and transfection of mammalian cells.

Chimeric molecules were constructed that contained either the TCR α or β chain(s) from the E11 cell line fused genetically to the transmembrane and cytoplasmic domain of human CD3ζ. Engel, Ottenhoff and Klausner (Science **256**:1318-1321, 1992) demonstrated that murine constructs, similar to those described below for human, when expressed in a rat basophilic leukemia cell line produced cells which could be activated by the specific MHC antigen molecules.

The E11 clones containing variable regions for the β chain TRVB12-4 and the α chains TRVA22s1 and 9s1 and their corresponding constant regions served as templates for amplification with primers to introduce restriction endonuclease sites 5' of the initiating methionine and at the end of the constant domain before the transmembrane region. The α chain clones used for amplification were pTVW443-1 and -7 (α 9s1 and 22s1 respectively) and oligonucleotide primers used to amplify them are listed in Table 16. Briefly, the 5' primers contained the restriction sites *SalI* and *KpnI*. The 3' primer contains a *HpaI* restriction site that allows an inframe fusion with a human CD3ζ fragment upon digestion and ligation (i.e. in the DO11.10

scTCR/human CD3ζ pGEM-T Easy vector described in Example 7). The β chain clone used for amplification was pTVW441-2 (β 12-4). The 5' primer for this construct contained the restriction sites *SalI* and *HindIII* and the 3' primer contained the *HpaI* site for inframe fusion to human CD3ζ. Amplification by PCR using the oligonucleotides described generated appropriate fragments that were then cloned into pGEM-T Easy to make plasmids pTVW450-1, pTVW451-1 and pTVW449-1 (containing fragments encoding α9s1, α22s1 and β12-4 respectively). These plasmids were digested with *SalI* and *HpaI* to yield fragments necessary for cloning into the DO11.10 scTCR/human CD3ζ pGEM-T Easy vector cut with the same enzymes. The resulting plasmids pTVW455-1, pTVW454-1 and pTVW453-1 (encoding α9s1, α22s1 and β12-4 respectively) contained the extracellular domains of TCR α or β chains fused inframe with human CD3ζ transmembrane and cytoplasmic domains. These fusion fragments were then transferred into vectors from InVitrogen (Carlsbad, CA) for expression in mammalian cells, either pcDNA3.1(+) (G418 selection) for the β chain or pcDNA3.1(+)/hygro (hygromycin antibiotic resistance) for the α chain. The alternate drug resistance markers allowed for selection of the presence of both plasmids in transfected mammalian cells. The α9s1/hCD3ζ fragment cloned into pcDNA3.1(+)/hygro as a *KpnI* to *NotI* fragment. The α22s1/hCD3ζ fragment was cloned into pcDNA3.1(+)/hygro as a fragment containing a blunt end, made by cutting with the restriction enzyme *SalI* and filling in with the enzyme T4 polymerase, and a *NotI* end. The corresponding pcDNA3.1(+)/hygro vector was prepared by cutting with the restriction enzyme *HindIII* and filling in with T4 polymerase then cutting with *NotI*. The β12-4/hCD3z fragment was cloned into pcDNA3.1(+) as a *HindIII* to *NotI* fragment. The vectors resulting from these cloning steps are designated pTVW456-1, pTVW459-1 and pTVW457-1 and contain α9s1/hCD3ζ, α22s1/hCD3ζ and β12-4/hCD3ζ respectively.

Table 16
Oligonucleotide primers used in cloning TCR α and β chains as CD3ζ fusions

designation	sequence

VW535 5'-TAT GGT CGA CAA GCT TCA CAG AGG GCC TGG TCT GG-3'
(5' primer for β 12-4, inserts HindII and SalI site 47 nt preceding ATG in leader)

VW537 5'-TAT GGT CGA CGG TAC CCC AGA AAA GAC CTC CAG AAA ATA GC-3'
(5' primer for α 9s1, inserts SalI and KpnI sites 49 nt preceding ATG in leader)

VW536 5'-GGT GGT TAA CGT CTG CTC TAC CCC AGG CCT C-3'
(3' primer for β constant, inserts HpaI site just before 3rd cysteine in constant region)

VW539 5'-GGT GGT TAA CGG AAC TTT CTG GGC TGG GGA AGA AGG-3'
(3' primer for α constant, inserts HpaI site just before 3rd cysteine in constant region)

VW540 5'-TAT GGT CGA CGG TAC CCT TCA TGT TAA GGA TCA AGA CCA TTA TTT GG-3'
(5' primer for a 22s1, inserts SalI and KpnI sites 45 nt preceding the ATG in the leader.)

The human T cell line, J.RT3 (ATCC number TIB-153), selected for transfection with the TCR-hCD3ξ fusions is a derivative of the Jurkat lymphoblast line which does not express TCR β chain. These cells were transfected by electroporation with plasmids pTVW456-1, pTVW459-1 and pTVW457-1 singly or as α + β chain pairs, i.e. pTVW456-1 + pTVW457-1 or pTVW459-1 + pTVW457-1. Selection of the transfectants was accomplished using the appropriate antibiotic, G418 or hygromycin or both. Dual selection (using both antibiotics) took place in two stages. The cells were transfected and were allowed to grow in antibiotic-free medium for 1-2 days. Growth of the transfectants was then selected with media containing G418. After 7 days, hygromycin was added to the growth media. Expression of the TCR fusion molecules was evaluated by FACS analysis of cells stained with antibodies which detect either a monomorphic determinant of the human α/β chain of the T-cell receptor complex (clone BMA031, Beckman Coulter, Miami, FL) or the specific β chain variable region in the complex (clone 56C5, Beckman Coulter). These cells will be assayed for activation by DR2 restricted antigen presenting cells, DO208915 from Johns Hopkins Laboratories (Baltimore, MD), which have been pulsed with the human MBP peptide containing amino acid residues 83-102 (amino acid sequence YDENPVVHFFKNIVTPRTPP) to confirm that the

combination of α and β chains resulted in a functional TCR. The use of the recombinant T cells in screening assays is described in Example 13.

The following Examples pertain to various screening methodologies of the invention using MHC antigens consisting of MHC/peptide complexes.

Example 10 - Identification of compounds that inhibit TCR:MHC/peptide interactions using a cell-based T cell activation assay.

A T cell-based screening assay was developed to detect inhibitors of the TCR:MHC/peptide interaction. Normally, T cells become activated when they come into contact with antigen presenting cells (APCs) bearing specific MHC/peptide complexes on their surfaces. For example, following incubation with IA^d-positive A20 APCs pulsed with OVA peptide, DO11.10 T cells become activated and produce IL-2. While interaction between a number of different cell surface receptors can contribute to level of the T cell response, the specific interactions between the DO11.10 TCR and the OVA/IA^d complex are required to initiate the response. To separate responses due solely to interaction between the TCR and MHC/peptide complex from those contributed to by other surface receptors, an assay method was developed for stimulating T cell responses with purified recombinant single-chain MHC/peptide complexes. This method can be used to monitor the ability of the T cell to respond to different MHC/peptide complexes as described previously (USSN 09/204,979). This method is also particularly useful in detecting compounds that inhibit or stimulate the ability of the T cell to respond to a MHC/peptide complex.

Of particular interest is the detection of small molecular weight compounds, such as organic chemicals, peptides and nucleic acids, that inhibit or antagonize T cell responses to the MHC/peptide complex. More specifically, detection of small molecular weight compounds that antagonize the interaction between the TCR and the MHC/peptide complex is of great interest. Such compounds could have utility in the development of immunosuppressive drug candidates for treatment of immune

disorders. Compounds that stimulate the ability of the T cell to respond to the MHC/peptide complex could have utility in the development of vaccine strategies.

To facilitate the analysis of a large number of compounds, a "dual" assay format was developed in which both stimulation of the T cells and measurement of the T cells responses can be carried out in a single well of a microtiter plate, as shown in Figure 5B. In this assay, anti-cytokine mAb and the stimulating sc-MHC/peptide complex are immobilized on the well. The MHC/peptide-restricted T cells are added to the well together with the soluble test compound or compound diluent. Cytokines produced by the activated T cells are captured by the anti-cytokine antibody. Following an incubation period, the T cells and compounds are removed, the wells washed and secondary anti-cytokine mAb is added to allow detection of the amount of cytokine produced by the T cells. Compounds that inhibit T cell stimulation by the immobilized sc-MHC/peptide complex result in less cytokine production than is seen in wells receiving compound diluent.

For example, 50 ng of purified scIA^d/OVA protein and 100 ng of rat anti-mouse IL-2 mAb (PharMingen part no. 18161D) were simultaneously coated in 50 µl PBS (Cellgro Catalog no. 21-031-cv) onto wells of a 96 well microtiter plate (Nunc Maxisorp). After 24 hours, the coat solution was removed and the wells received 100 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide (DMSO Sigma part no. 2650) or 100 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. DO11.10 T cells (1×10^5 cells in 100 µl media) were then added. Following an 8 hours incubation at 37°C in 10% CO_2, the cells were removed and the wells were washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Biotinylated anti-IL-2 mAb (PharMingen Part no. 18172D) (100 ng in 100 µl PBS with 10% FBS) was added to each well. After overnight incubation at 4°C, the wells were washed and 250 ng avidin peroxidase (Sigma part no. A3151) in 100 µl 10% FBS-PBS was added to each well. After 30 min at 37°C, the wells were washed and 100 µl of TMB substrate (BioFX laboratories cat no. TMBW-0100-01) was added. Substrate reaction was stopped with 1M sulfuric acid and the absorbance of the TMB chromophore product

was read at 450 nm. In this assay, the absorbance reading correlates with the amount of IL-2 produced by the cells.

By titering each of the assay components, a signal to noise ratio above 5 was achieved. Two thousand small molecules from a chemical library were tested for inhibition of IL-2 production in the above assay format. In each plate, multiple wells were run containing compound diluent (DMSO) to establish the amount of IL-2 produced by the scIA^d/OVA-stimulated DO11.10 T cells. Any compound that significantly lowered the amount of IL-2 produced, i.e. showed IL-2 absorbance readings in this assay more than 3 standard deviations lower than that seen in the diluent wells, was characterized further.

For example in assay plate 5-2, DO11.10 T cell stimulation was assayed in eight wells as described above using DMSO as the control compound diluent. The mean IL-2 absorbance reading for these wells was 2.198 with a standard deviation of 0.248. Forty test compounds were run in duplicate on this microtiter plate. Two compounds (5E11 and 5F6) showed significantly lower IL-2 absorbance readings (1.256 and 0.136, respectively) than the control (mean-3SD = 1.454) indicating that these compounds inhibited IL-2 production by the scIA^d/OVA-stimulated DO11.10 T cells. The mean IL-2 absorbance readings for wells receiving the other 38 compounds were not less than 1.454, indicating the range of the inhibitory responses. Of the 2000 compounds tested, 46 were repeatedly found to inhibit IL-2 production by the scIA^d/OVA-stimulated DO11.10 T cells in this assay format.

To determine if inhibition was due specifically to interference of scIA^d/OVA:DO11.10 TCR interactions and not due to other nonspecific sources of inhibition, the effects of the inhibitory compound on T cell stimulation by anti-CD3 mAb was assessed. Anti-CD3 antibody is able to bind to the TCR/CD3 complex at a different site than is recognized by the MHC/peptide complex. This antibody when immobilized on the well is able to stimulate IL-2 production by the DO11.10 T cell. For this assay, wells of a 96 well microtiter plate were coated simultaneously with 25 ng of anti-CD3 antibody (PharMingen part no. 01511D) and 100 ng of rat anti-mouse

IL-2 mAb in 50 µl PBS . After 24 hours, the coat solution was removed and the wells received 100 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 100 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. DO11.10 T cells (1×10^5 cells in 100 µl media) were then added. Following an 8 hours incubation at 37°C in 10% CO_2, the cells were removed and the wells were washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Biotinylated anti-IL-2 mAb (100 ng in 100 µl PBS with 10% FBS) was added to each well. After overnight incubation at 4°C, the wells were washed and 250 ng avidin peroxidase in 100 µl 10% FBS-PBS was added to each well. After 30 min at 37°C, the wells were washed and 100 µl of TMB substrate was added. Substrate reaction was stopped with 1M sulfuric acid and the absorbance of the TMB product was read at 450 nm. Representative assay results are shown in Figure 14. Thirty compounds that inhibited scIA^d/OVA-mediated stimulation were found to have insignificant inhibition of IL-2 production in the anti-CD3 assay. These results indicate that although MHC/peptide-dependent stimulation was inhibited, these compounds do not affect the ability of the T cells to respond to stimulation through the TCR/CD3 complex. Therefore, it appears unlikely that these compounds act through inhibiting intercellular mechanisms leading to IL-2 production or release.

The thirty inhibitory compounds were then titered out in the scIA^d/OVA and the anti-CD3 Ab assays described above and showed dose dependent inhibition of scIA^d/OVA-mediated stimulation. Examples of these titration curves are shown in Figures 15A and 15B and representatives of the thirty inhibitory compounds are shown in Figure 16.

To determine if inhibition was specific to the interaction with the OVA peptide in the scIA^d/OVA complex, the effects of the inhibitory compounds on T cell stimulation by scIA^d/GD was assessed. It has previously been shown that immobilized scIA^d/GD could stimulate the GD12 T cell hybridoma to produced IL-2. To test whether the inhibitory compounds also had an effect on the GD12 cells, 100 ng of purified scIA^d/GD protein and 100 ng of rat anti-mouse IL-2 mAb were simultaneously coated in 50 µl PBS onto wells of a 96 well microtiter plate. After 24

hours, the coat solution was removed and the wells received 100 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 100 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. GD12 T cells (1 x 10^5 cells in 100 µl media) were then added. Following an 8 hours incubation at 37°C in 10% CO_2, the cells were removed and the wells were washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Biotinylated anti-IL-2 mAb (100 ng in 100 µl PBS with 10% FBS) was added to each well. After overnight incubation at 4°C, the wells were washed and 250 ng avidin peroxidase in 100 µl 10% FBS-PBS was added to each well. After 30 min at 37°C, the wells were washed and 100 µl of TMB substrate was added. Substrate reaction was stopped with 1M sulfuric acid and the absorbance was read at 450 nm. All of the compounds that inhibited scIA^d/OVA-mediated DO11.10 stimulation also inhibited IL-2 production by the sc-IA^d/GD stimulated GD12 cells, indicating that the compounds do not inhibit stimulation in a peptide-specific manner.

The specificity of the inhibitory compounds was examined further using a different MHC/peptide:T cell combination. As described in Example 1, the IE^k/PCC was constructed as a single chain MHC class II molecule and found to activate 2B4 T cells to secrete IL-2. A dual format assay was developed as above using 2B4 cells and the scIE^k/PCC protein. In this assay, 200 ng of purified scIE^k/PCC protein and 100 ng of rat anti-mouse IL-2 mAb were simultaneously coated in 50 µl PBS onto wells of a 96 well microtiter plate. After 24 hours, the coat solution was removed and the wells received 100 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 100 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. 2B4 T cells (1 x 10^5 cells in 100 µl media) were then added. Following an 8 hours incubation at 37°C in 10% CO_2, the cells were removed and the wells were washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Biotinylated anti-IL-2 mAb (100 ng in 100 µl PBS with 10% FBS) was added to each well. After overnight incubation at 4°C, the wells were washed and 250 ng avidin peroxidase in 100 µl 10% FBS-PBS was added to each well. After 30 min at 37°C, the wells were washed and 100 µl of TMB substrate was added. Substrate reaction was stopped with 1M sulfuric acid and the

absorbance was read at 450 nm. Twenty-two small molecules that showed greater inhibition of IL-2 secretion with immobilized scIA^d/OVA compared that of the anti-CD3 Ab were tested in the scIE^k/PCC:2B4 assay. One small molecule (427-F8) showed greater inhibition of the scIA^d/OVA:DO11.10 T cell interaction than the scIE^k/PCC:2B4 T cell interaction as measured by IL-2 secretion. A typical titration curve showing percent inhibition at multiple doses of 427-F8 in both assays is shown in Table 17. Similar results were observed in three independent assays. The results suggest that the test compounds can exhibit some degree of specificity for inhibiting TCR:MHC/peptide interactions.

Table 17
Selective Activity of Compound 427-F8 in Inhibiting IL-2 Secretion by MHC/peptide-Stimulated T Cells

% Inhibition of IL-2 Secretion

	Assay Format	
427-F8 Conc. (uM)	scIA^d/OVA: DO11.10 T cells	scIE^k/PCC: 2B4 T cells
16.6	83	86
5.5	85	86
1.8	85	83
0.6	57	11
0.2	0	4
0.06	0	3

The activity of the inhibitory compounds was examined further in stimulation assays in which antigen presenting cells (APC) carrying the appropriate MHC on their surface are loaded with exogenous peptide and used to stimulate T cell responses in vitro. In this assay, 100 ng of anti-IL2 antibody was coated onto a well of a 96 well microtiter plate. After 24 hours, the coat solution was removed and the wells received 2×10^5 A20 cells (APCs carrying IA^d molecules) in 100 µl media (IMDM with 10% FBS), 5 µg of OVA peptide in 10 µl of media, 1×10^5 DO11.10 T cells in 100 µl of media, and 5 µl of the test compound in PBS. After 3 hrs at 37°C in a 10% CO_2 incubator, the cells were removed and the wells were washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Biotinylated anti-IL-2 mAb (PharMingen Part no. 18172D)

(100 ng in 100 µl PBS with 10% FBS) was added to each well. After 1 hr at 37°C, the wells were washed and 250 ng avidin peroxidase (Sigma part no. A3151) in 100 µl 10% FBS-PBS was added to each well. After 30 min at 37°C, the wells were washed and 100 µl of ABTS substrate (BioFX laboratories) was added. Substrate reaction was developed and the absorbance was read at 405 nm. The absorbance reading correlate with the ability of the OVA peptide-loaded IA^d molecules on the A20 cells to interact with the DO11.10 TCR and stimulate IL-2 production. The ability of a compound to antagonize interactions between the MHC/peptide complex and TCR is measured as a decrease in the amount absorbance read at 405 nm. Typical results of these studies for candidate inhibitory compounds are shown in Table 18 and indicate that the compounds are able to block the ability of the peptide-loaded APC to stimulate T cell responses.

Table 18
Inhibitory effects of test compounds on DO11.10 T cell stimulation by OVA peptide-loaded A20 cells

IL-2 ELISA Values

211-C3		211-C9		12G9		211B9	
µM	A-405	µM	A-405	µM	A-405	µM	A-405
0	2.024	0	2.024	0	1.906	0	1.920
2.3	2.128	1	2.101	1.5	2.047	1.8	1.608
7	1.984	3	1.947	5	1.940	5.5	1.154
20	1.437	10	1.289	14	1.795	16.7	1.127
62	0.262	31	0.235	42	1.630	50	0.944

In summary, a practical method has been developed to screen for substances that will interfere with TCR:MHC antigen interactions.

Example 11 - Development of screening assays using T cell hybridomas engineered to express surface DO11.10 scTCR-CD3ζ fusion protein.

The objective was to further develop a cell-protein based approach for identifying agonists and antagonists capable of interfering with the interaction

between the TCR and MHC antigen molecules. As described in this example, an assay format was developed using an immortalized T cell line expressing a recombinant single-chain T cell receptor. The advantage of this approach is that a sufficient amount of cells can be generated to conduct the screening of a large number of test compounds. As described in Example 7, the 2B4 murine T cell hybridoma was used to create a novel cell line that expresses on its surface the DO11.10 TCR as a three-domain scTCR-CD3ζ fusion protein. Specific stimulation was observed for 2B4 T cells transfected with DNA encoding for DO11.10 scTCR-CD3ζ after incubating cells with A20 cells pulsed with OVA peptide, as shown in Figure 17A. Furthermore, these same cells were not stimulated when exposed to A20 cells pulsed with GD peptide. In another experiment using NSO myeloma cells expressing surface bound scIA^d/OVA (NDO cells), stimulation of the DO11.10 scTCR transfected T hybridoma cells was observed, as shown in Figure 18. The wild-type 2B4 T cells (expressing the 2B4 TCR on their surface) incubated in the presence of the NDO cells were non-responsive. These data support the claim that scTCR-CD3ζ fusions can be used to reconstitute T cells with new antigen specificity.

As discussed above, an ideal approach to screening the chemical libraries would be to develop a cell line that could be stimulated by purified recombinant MHC/peptide complexes. To test the concept of using purified MHC/peptide molecules to stimulate a T cell line engineered to express surface scTCR-CD3ζ fusion protein, wells were coated with either 1000 or 160 ng of scIA^d/OVA-IgM fusion protein and the appropriate T cells were added. Cell stimulation was measured by assaying for IL-2 protein secreted into the culture supernatant. The detection of IL-2 was determined using a pair of anti-murine IL-2 antibodies purchased from PharMingen and were used in a sandwich ELISA format as described previously (Rhode et al. 1996. *J. Immunol.* 157: 4885). Control wells were coated at the same concentrations of protein except the recombinant scIA^d/GD-IgM protein was used. After incubating 10^5 2B4 cells or 2B4 transfectants in the wells for 14 hours at 37°C in the presence of 5% CO_2, 100μl of supernatant was collected and assayed for IL-2. Figure 19 shows the results from one experiment. As expected, control wells coated

with scIA^d/gD-IgM could not stimulate either the DO11.10 scTCR 2B4 transfectant or the wild-type 2B4 T cells. More importantly, only the transfectants produced IL-2 when presented with immobilized scIA^d/OVA-IgM protein, in contrast, the same protein did not stimulate the wild-type 2B4 T cells. These results show that T cells expressing recombinant DO11.10 scTCR-CD3ζ on their surface can be efficiently stimulated in the presence of immobilized IA^d/OVA complexes, but not by scIA^d/GD-IgM complexes.

To further develop a screening assay using the transfected cell line, the dual format assay was set-up using varying concentrations of immobilized scIA^d molecules. The assay conditions were identical to those described in Example 10. The results from this assay are shown in Table 19. These results indicate that both the scIA^d/OVA and the scIA^d/OVA-IgM are capable of stimulating the DO11.10 scTCR transfectants. As was observed previously, immobilized scIA^d/OVA-IgM molecules were more potent in stimulating the response than immobilized scIA^d/OVA molecules. The peptide specificity of the transfectants was also observed. The use of the IgM format for the MHC antigen complex shows how the use of multi-valent formats can increase the sensitivity of the assay.

Table 19
Activation of DO11.10 scTCR 2B4 Transfectants by scIA^d/OVA complexes

IL-2 ELISA Values (A_{405})

ng complex/well	scIA^d/OVA-IgM	scIA^d/GD-IgM	scIA^d/OVA	scIA^d/GD
250	2.274	0.224	1.063	0.227
125	2.325	0.233	1.059	0.179
62	1.822	0.224	1.032	0.164
31	1.324	0.226	0.646	0.213
15	0.273	0.199	0.397	0.152
7	0.264	0.213	0.236	0.163
3	0.234	0.190		
1	0.214	0.196		

Based on the results shown above, a screening method could be developed using a TCR transfected T cell line and immobilized MHC antigen molecules. For example, purified scIA^d/OVA-IgM protein and rat anti-mouse IL-2 mAb are simultaneously coated in 50 µl PBS onto wells of a 96 well microtiter. After 24 hours, the coat solution is removed and the wells receive 100 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 100 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. The DO11.10 scTCR 2B4 transfectants (1 x 10^5 cells in 100 µl media) are then added. Following an 8 hours incubation at 37°C in 10% CO_2, the cells are removed and the wells are washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Biotinylated anti-IL-2 mAb (100 ng in 100 µl PBS with 10% FBS) is added to each well. After overnight incubation at 4°C, the wells are washed and 250 ng avidin peroxidase in 100 µl 10% FBS-PBS is added to each well. After 30 min at 37°C, the wells are washed and 100 µl of TMB substrate is added. Substrate reaction will be stopped with 0.18 M sulfuric acid and the absorbance of the reaction product is read at 450 nm. The ability of a compound to antagonize interactions between the MHC/peptide complex and the recombinant TCR will be measured as a decrease in the amount of cytokine secreted into the culture media by the T cell transfectants. Assays in which anti-TCR Ab is used instead of the MHC/peptide complex to stimulate the T cells will be carried out to determine whether the inhibitory compounds act by antagonizing TCR:MHC/peptide complex interactions or through a different mechanism. Compounds that inhibit T cell stimulation by the MHC/peptide complex but do not inhibit stimulation by the anti-TCR antibody will be pursued as lead compounds.

Example 12 - Development of screening assays using T cell hybridomas engineered to express surface DO11.10 scTCR-CD3ζ fusion protein and recombinant CD4 receptors.

The next goal was to further refine the cell-based screening approach. Recombinant T cells were engineered to express a single-chain TCR-CD3ζ fusion and the CD4 receptor on the cell surface. These manipulations allow these cells to be

stimulated by MHC/peptide complex. The advantages to this approach are that the cells can be designed and optimized to suit the particular assay parameters. For example, cells expressing high levels of recombinant scTCR and/or CD4 receptors may show greater sensitivity to stimulation by MHC/peptide complexes. As described in Example 8, stable BWDZ-CD4+ T cell transfectants were generated that expressed both DO11.10 scTCR-CD3ζ fusion protein and recombinant CD4 receptor on the cell surface. To test the concept of using purified MHC/peptide molecules to stimulate the BWDZ:CD4+ T cell line, wells were coated with varying concentrations of scIA^d/OVA-IgM fusion protein. The wells were also coated with rat anti-mouse IL-2 antibody as described in Example 10. The BWDZ:CD4+ T cells were then added and T cell stimulation was measured by assaying for IL-2 secreted into the culture supernatant as described in Example 10. Control wells were coated at the same concentrations of protein except the recombinant scIA^d/GD-IgM protein was used. The results from such an assay are shown in Table 20. The results indicate that the recombinant BWDZ:CD4+ T cells expressing surface DO11.10 scTCR and CD4 receptor can be specifically stimulated by immobilized scIA^d/OVA-IgM and that a screening method could be developed using recombinant T cell lines and immobilized MHC/peptide molecules.

Table 20
Activation of BWDZ:CD4+ Transfectants by scIA^d/OVA-IgM complexes

IL-2 ELISA Values (A_{405})

ng complex/well	scIA^d/OVA-IgM	scIA^d/GD-IgM
1000	1.277	0.375
200	0.340	0.309
40	0.305	0.282

For example, purified scIA^d/OVA-IgM protein and rat anti-mouse IL-2 mAb are simultaneously coated in 50 µl PBS onto wells of a 96 well microtiter. After 24 hours, the coat solution is removed and the wells receive 100 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 100 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. The BWDZ:CD4+ transfectants (1 x 10^5 cells in 100 µl

media) are then added. Following an 8 hours incubation at 37°C in 10% CO_2, the cells are removed and the wells are washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Biotinylated anti-IL-2 mAb (100 ng in 100 µl PBS with 10% FBS) is added to each well. After overnight incubation at 4°C, the wells are washed and 250 ng avidin peroxidase in 100 µl 10% FBS-PBS is added to each well. After 30 min at 37°C, the wells are washed and 100 µl of TMB substrate added. Substrate reaction is stopped with 0.18 M sulfuric acid and the absorbance read at 450 nm. The ability of a compound to antagonize interactions between the MHC/peptide complex and the recombinant TCR will be measured as a decrease in the amount of cytokine secreted into the culture media by the T cell transfectants. Assays in which anti-TCR Ab is used instead of the MHC/peptide complex to stimulate the T cells will be carried out to determine whether the inhibitory compounds act by antagonizing TCR:MHC/peptide complex interactions or through a different mechanism. Compounds that inhibit T cell stimulation by the MHC/peptide complex but do not inhibit stimulation by the anti-TCR antibody will be pursued as lead compounds.

Example 13 - Development of cell-based screening assays to detect inhibitors of autoimmune TCR:MHC/peptide interactions.

Our objective was to further develop a cell-protein based approach for identifying antagonists capable of interfering with the interaction between the TCR and MHC antigen molecules associated with human autoimmune diseases. As described in this example, an assay format was devised using an immortalized T cell line expressing a recombinant T cell receptor derived from T cells isolated from a multiple sclerosis patient. Human T cell lines or clones are very difficult to grow in large amounts in culture and after extended growth often lose specificity for their antigens. The advantage of the recombinant T cell approach is that a sufficient amount of cells can be generated to conduct the screening of a large number of test compounds. As described in Example 9, the TCR α and β chain genes were cloned from the MBP-restricted human MS T cell line, E11. The expression vectors capable of expressing the extracellular domains of TCR α or β chains fused inframe with

human CD3ζ transmembrane and cytoplasmic domains were generated and transfected into immortalized T cells. The transfected cells will be used in stimulation assays with MBP peptide-loaded DR2+ APCs. The E11 TCR transfected cell line can then be used to develop screening assays with immobilized scDR2/MBP protein.

For example, purified scDR2/MBP-IgG protein (see Example 4) and anti-human IL-2 mAb are simultaneously coated in 50 µl PBS onto wells of a 96 well microtiter. The amount of scDR2/MBP-IgG required to generate a linear response from the recombinant T cell will be determined experimentally. After 24 hours, the coat solution is removed and the wells receive 100 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 100 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. The E11 TCR T cell transfectants (1×10^5 cells in 100 µl media) are then added. Following an 8 hours incubation at 37°C in 10% CO_2, the cells are removed and the wells washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Biotinylated anti-IL-2 mAb (100 ng in 100 µl PBS with 10% FBS) is added to each well. After overnight incubation at 4°C, the wells are washed and 250 ng avidin peroxidase in 100 µl 10% FBS-PBS is added to each well. After 30 min at 37°C, the wells are washed and 100 µl of TMB substrate added. Substrate reaction is stopped with 0.18 M sulfuric acid and the absorbance read at 450 nm. The ability of a compound to antagonize interactions between the MHC/peptide complex and the recombinant TCR will be measured as a decrease in the amount of cytokine secreted into the culture media by the T cell transfectants. Assays in which anti-TCR Ab is used instead of the MHC/peptide complex to stimulate the T cells will be carried out to determine whether the inhibitory compounds act by antagonizing TCR:MHC/peptide complex interactions or through a different mechanism. Compounds that inhibit T cell stimulation by the MHC/peptide complex but do not inhibit stimulation by the anti-TCR antibody will be pursued as lead compounds.

Example 14 - Development of a model cell-based screening method for identifying compounds that modulate TCR:MHC antigen interactions.

This example describes a model cell-based screening system for screening chemical libraries for agonists and antagonists capable of specifically modulating TCR interactions with the MHC antigen molecule. This model is based on an immortalized T cell line (e.g. T cell hybridoma) to express two or more different antigen specific T cell receptors on its surface. For example, the T cell could express its endogenous TCR and also a recombinant single-chain TCR of unique antigen specificity. The objective of the screening assay would be to identify compounds that show a differential effect in agonizing or antagonizing TCR:MHC/peptide interactions for one of the TCRs compared to the other TCR. These cells would be used in a plate assay with wells pre-coated with immobilized MHC/peptide molecules described above (e.g. single chain monomer, IgG or IgM). The MHC/peptide would stimulate IL-2 secretion by the T cell. Compounds would be screened for their ability to augment or inhibit IL-2 secretion by the T cells. Because of the generally weak interaction between TCR and MHC/peptide complex and the many steps in the IL-2 production/secretion process, one would predict the identification of many compounds that interfere (specifically and non-specifically) with T cell stimulation as evidenced by a decrease in IL-2 production. The use of a T cell that expresses two TCRs specific for unique targets would facilitate the screening process by providing an internal control for compounds that inhibit T cell stimulation by non-specific (TCR:MHC/peptide independent) mechanisms. For example, many of the compounds to be screened will probably block IL-2 production at points along the signaling pathway after TCR triggering and not necessarily at the point of TCR interaction with MHC/peptide. Compounds with general cytotoxic effects may also block IL-2 production. By testing stimulation with different MHC/peptide complexes, the dual TCR cell line will be extremely useful in determining whether the inhibitory compound acts by interfering with TCR:MHC/peptide interaction or at some other point in the IL-2 production/secretion process.

For this example, a model cell line expressing the endogenous 2B4 TCR and a recombinant DO11.10 scTCR was generated as described in Example 7. To evaluate the responsiveness of the T cell line to stimulation through the 2B4 and DO11.10

TCR, the cells were incubated in wells containing peptide pulsed antigen presenting cells (APC). For example, 2B4 transfectants were incubated with A20 (IA^d) cells pulsed with either OVA or PCC or with CH12 (IE^k) cells pulsed with OVA or PCC. The results of these experiments (Figure 17A and Figure 17B) showed that the 2B4 transfectants and wild-type 2B4 cells responded to CH12 cells pulsed with PCC but did not respond to CH12 cells pulsed with OVA or to A20 pulsed with PCC. However, in the presence of A20 cells pulsed with OVA, the 2B4 transfectants responded and produced IL-2 whereas the wild-type 2B4 cells were non-responsive. These data suggest that a T cell can be engineered to express at least two functionally distinct antigen specific TCRs. The next experiment was to test these 2B4 transfectants for responsiveness to immobilized MHC/peptide molecules. The rationale for running these studies are explained in Example 10 and the results are shown in Example 11.

A model assay system will be developed to identify compounds that block the DO11.10 scTCR interaction with immobilized $scIA^d$/OVA. Assays using the DO11.10 scTCR 2B4 transfectants will be carried out as described in Example 11. The compounds that can inhibit stimulation of cells by blocking the DO11.10 TCR interaction with IA^d/OVA will then be screened in stimulation assays using the same DO11.10 scTCR 2B4 transfectants and immobilized $scIE^k$/PCC. If 2B4 TCR engagement with $scIE^k$/PCC resulted in cell stimulation, the inhibitor compound probably acts by targeting specific blocking of the DO11.10 TCR interaction with $scIA^d$/OVA. However, if inhibition of cell stimulation was found to be independent of the MHC/peptide complex used, the compound would probably be classified as a non-specific inhibitor of T cell stimulation.

The long-term objective will be to create a cell line reconstituted with two or more TCRs restricted by different MHC families. The advantage to this approach is that the variability of handling and running multiple cell lines within each screening experiment is eliminated.

Example 15 - Development of cell surface receptor-based detection assays for identifying inhibitors of TCR:MHC/peptide interactions.

Multi-valent MHC/peptide complexes and TCRs have been used to fluorescently stain cells bearing the cognate receptors on their surfaces (Altman J.D. et al. (1996) *Science* 274:94-96). For example, T cell hydridomas can be specifically stained using multimeric sc-class II-Ig molecules. In this study, GD12 or DO11.10 T cell hybridomas (5×10^5 cells/well) were incubated overnight at 37°C with 10 µg/well scIA^d/GD-Ig molecules. The GD12 TCR is specific to the gD 246-261 peptide in the context of IA^d, whereas the DO11.10 TCR is specific to the OVA 323-339 peptide in the context of IA^d. Following the overnight incubation, the cells were washed with PBS and incubated with anti-mouse IgG2b mAb-biotin and streptavidin-Cychrome for 1 hour at 4°C. The cells were then washed with PBS, PBS containing 1% formaldehyde, and PBS. Flow cytometry of the stained cells indicated that the scIA^d/GD-Ig molecules specifically stained the GD12 T cell hybridoma but failed to stain the DO11.10 T cells (Figure 20). No cell staining was observed in GD12 T cells incubated with anti-mouse IgG2b mAb-biotin and streptavidin-Cychrome alone. These results demonstrate that this assay can detect cell-surface TCRs using multi-valent MHC/peptide complexes as probes.

Simple plate-based cell ELISAs for detecting antigens on the surface of T cells have also been described in the literature (See Grunow, R. et al. (1994) *J. Immunol. Methods* 171:93-102). While these assays detected binding of monoclonal antibodies, similar assay formats could be developed to detect compounds that inhibited interaction of the multi-valent MHC/peptide complex with the cell-surface TCR. For example, GD12 T cells are added in growth media to poly-lysine coated 96 well microtiter plates. The plates are incubated at 37°C and 10% CO_2 to allow the T cell hydridomas to adhere to the coated wells. The multi-valent scIA^d/GD-Ig molecules are added to the cells with the test compound (or compound diluent as a control). Following incubation, the unbound scIA^d/GD-Ig molecules are removed and the adherent cells washed. A variety of commercially available probes, including

enzyme-linked and fluorochrome -linked antibodies, could be used to disclose the interaction between the scIA^d/GD-Ig molecules and the GD12 TCR. For example, an anti-IgG2b mAb-HPR probe can be added to detect the TCR-bound scIA^d/GD-Ig molecules. Unbound antibody is removed and the wells are incubated with TMB substrate to detect the TCR:scIA^d/GD-Ig:anti-IgG2b mAb-HPR complex. After development, the reactions are stopped with 1M sulfuric acid and the absorbance is determined at 450 nm. Initial studies will determine the appropriate number of T cells and the amounts of multi-valent sc-class II-Ig molecules and disclosing antibody probe required for sensitive and linear detection of the MHC/peptide - TCR interactions. Controls will be run in which a different MHC multimer, such as scIA^d/OVA-Ig, is added instead of the scIA^d/GD-Ig to establish the assay background. The ability of the test compound to inhibit specific MHC/peptide - TCR interactions will be measured as a loss of signal. For example, a test compound that inhibits interaction between the cell-surface GD12 TCR and scIA^d/GD-Ig multimer would result in lower absorbance readings than observed in control wells containing compound diluent with the cells and MHC/peptide probe. The specificity of the inhibitory compounds could then be examined in other cell-based ELISAs using cells bearing different TCRs and their corresponding multi-valent MHC/peptide probes.

Example 16- Development of protein-based screening methods for identifying compounds that augment and inhibit TCR:MHC antigen interactions.

The objective of this example was to develop a protein-protein binding assay using recombinant TCR and MHC antigen reagents. By establishing a protein-based assay, a high throughput screen could be developed to identify compounds that directly agonize or antagonize the target TCR:MHC/peptide interaction. The advantage to such a screening assay compared to the cell-based assay would be the reduction in the number of "false positive" compounds detected that are cytotoxic or nonspecifically affect cellular responses. The approach taken was to establish an ELISA format using purified recombinant TCR and MHC antigen complexes.

Briefly, cDNA encoding the 264 TCR (peptide fragment 264-272 from wild-type human tumor suppressor protein, p53 and restricted by HLA-A2) was provided by Dr. Linda Sherman (Scripps Research Institute, La Jolla, CA). Amplification of the Vα3.1 and the Vβ3.0 genes was carried out as described in the pending U.S. patent applications No. 08/813,731 (Fusion Proteins Comprising Bacteriophage Coat Protein and A Single-Chain T cell Receptor" and 08/943,086 ("Fusion Proteins Comprising Single-Chain T Cell Receptor and an Immunoglobulin Light Chain Constant Region") except that the oligonucleotides used were specific for the 264 TCR. The cloning of the 264 TCR as a three-domain scTCR-C kappa fusion protein was carried out in the same manner as described for the DO11.10 TCR (as described in the pending U.S. parent applications - see above). The 264 scTCR-C kappa fusion vector was transfected into CHO cells for expression of soluble protein in the culture media. The 264 scTCR protein was then purified to homogeneity on an affinity column as confirmed by SDS-PAGE analysis.

Separately, a vector system used to produce the HLA-A2 and beta-2 microglobulin molecules was provided by Dr. John Altman (Emory University, Atlanta, GA) and has been described in Altman et al. (Altman, J.D., P.A.H. Moss, P.J.R. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael & M.M. Davis. 1996. *Science* 274:94-96). To produce HLA-A2 molecules loaded with the peptide of interest, a protocol by Dr. Mark Davis (Stanford University, Palo Alto, CA) (see Altman et al. 1996. *Science* 274:94-96) was followed that resulted in the formation of functional molecules. Correctly folded peptide/HLA-A2 complex was isolated on a Sephadex-200 size exclusion column as a single peak migrating at 50kD. The protein complex was then biotinylated using biotin ligase (Avidity, Denver, CO) to attach a single biotin moiety to a C-terminal BirA sequence. Biotinylated A2 complexes were multimerized using streptavidin, a biotin specific protein capable of binding up to four biotin residues per molecule of streptavidin. Using the HLA-A2 and the streptavidin protein at a molar ratio of 4:1 respectively, tetrameric HLA-A2/peptide complexes were generated. The advantage of using the tetramer (compared to the monomer) is the greater binding avidity displayed by the

tetramer when interacting with TCR. In support of this, protein binding studies using BIAcore instrument showed that the soluble tetrameric HLA-A2/264 peptide complexes bound to immobilized 264 scTCR-C kappa fusion protein to a greater extent than the monomeric HLA-A2/264 peptide complexes.

Based on these findings, an ELISA was developed using the HLA-A2/264 tetramer technology to demonstrate TCR:MHC/peptide interaction. In this assay, the 264 scTCR-C kappa fusion protein was coated at 2, 1 and 0.5 µg/well onto a 96 well plate. The plate was then washed and probed with 264/HLA-A2 tetramer. The results are shown in Figure 21 and suggest that the HLA-A2 tetramer containing the 264 peptide, but not the 149 peptide, bound to the immobilized 264 scTCR-C kappa protein in a peptide specific manner. This study demonstrates a "proof of principle" for using a protein-based ELISA to detect the interaction of TCR and MHC/peptide molecules. The results described here suggest that this assay format could be applied to other TCR:MHC/peptide pairs to establish a protein-based assay approach to identify agonist and antagonist compounds by high throughput screening methods.

For example, the purified 264 scTCR-C kappa fusion protein is coated in 50 µl PBS onto wells of a 96 well microtiter. The amount of 264 scTCR-C kappa fusion protein required to generate a linear response will be determined experimentally. After 24 hours, the coat solution is removed and the wells receive 50 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 50 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. The HLA-A2/264 tetramer (in 50 µl media) is then added. Following a 30 minute incubation at room temperature, the protein solution is removed and the wells are washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Rabbit anti-streptavidin antisera is added to each well. After a 20 minute incubation at room temperature, the wells are washed and goat anti-rabbit Ig antisera conjugated to HRP added. After 30 min at room temperature, the well are washed and ABTS substrate is added. Substrate reaction is developed and the absorbance read at 405 nm. The absorbance reading will correlate with the amount of HLA-A2/264 tetramer bound to the 264 scTCR-coated well.

The ability of a compound to antagonize interactions between the MHC/peptide complex and the recombinant TCR will be measured as a decrease in the absorbance read at 405 nm. Assays in which anti-TCR Ab is used instead of the MHC/peptide complex will be carried out to determine whether the inhibitory compounds act by antagonizing TCR:MHC/peptide complex interactions or through general inhibition of protein:protein interaction. Compounds that inhibit binding of the MHC/peptide complex but do not alter binding of the anti-TCR antibody will be pursued as lead compounds. Assays using other pairs of TCR and MHC/peptide molecules will be carried out to determine the specificity of the inhibitory compounds.

The ability of a compound to increase interactions between the MHC/peptide complex and the recombinant TCR will be measured as an increase in the amount absorbance read at 405 nm. As described above, assays using other pairs of TCR and MHC/peptide molecules or anti-TCR antibodies will be carried out to determine the specificity of the stimulatory compounds. Since the HLA-A2/p53 264-272 peptide complex represents a tumor antigen, compounds that specifically stimulate the TCR interaction with this antigen may prove useful in the development of therapeutic anti-cancer agents. Similar screening methods could be developed to identify compounds that stimulate specific interactions between TCR and MHC antigen complexes in which the peptide is derived from an infectious pathogen. The ultimate goal of such a method would be the isolation of anti-infectious agents.

Example 17 - Development of protein-based screening methods for identifying compounds that inhibit TCR:MHC/peptide interactions associated with human autoimmune diseases.

The objective of this example was to develop a protein-protein binding assay using recombinant human TCR and human MHC antigen reagents associated with human autoimmune disease. By establishing a protein-based assay, a high throughput screen could be developed to identify compounds that directly antagonize

autoimmune TCR:MHC/peptide interactions. These compounds could potentially lead to development of selective immunosuppressive agents.

The TCR derived from the E11 human T cell clone will be expressed as a recombinant three-domain single-chain soluble TCR in mammalian cells. The methods that will be used for construction of the appropriate expression vectors; mammalian cell transfection and selection; and production and purification of the sc-TCR are described in Example 6 and in Weidanz, et al. 1998. *J. Immunol. Methods* 221:59, U.S. Patent Applications No. 08/813,731 and 08/943,086.

An ELISA could be developed using the E11 scTCR and the scDR2/MBP-Ig (see example 4) to demonstrate autoimmune TCR:MHC/peptide interaction. In this assay, the E11 scTCR protein is coated onto a 96 well plate. The plate is then washed and probed with scDR2/MBP-Ig. Following a wash step, the bound scDR2/MBP-Ig is probed with goat anti-human IgG-HRP and detected by TMB substrate development. Absorbance at 450 nm will determine the amount of scDR2/MBP-Ig bound by the E11 scTCR coated well. This study will demonstrate a "proof of principle" for using a protein-based ELISA to detect the interaction of autoimmune TCR and MHC/peptide and will establish a protein-based assay approach to identify antagonist compounds by high throughput screening methods.

For example, purified E11 scTCR protein is coated in 50 µl PBS onto wells of a 96 well microtiter. The amount of E11 scTCR fusion protein required to generate a linear response will be determined experimentally. After 24 hours, the coat solution is removed and the wells receive 50 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 50 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. The scDR2/MBP-Ig (in 50 µl media) is then added. Following incubation at room temperature, the protein solution is removed and the wells washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Goat anti-human Ig antisera conjugated to HRP is added. After 30 min at room temperature, the well are washed and TMB substrate added. Substrate reaction is quenched with 0.18 M sulfuric acid and the absorbance

read at 450 nm. The absorbance reading will correlate with the amount of scDR2/MBP-Ig bound to the E11 scTCR-coated well.

The ability of a compound to antagonize interactions between the MHC/peptide complex and the recombinant TCR will be measured as a decrease in the amount absorbance read at 450 nm. Assays in which anti-TCR Ab is used instead of the MHC/peptide complex will be carried out to determine whether the inhibitory compounds act by antagonizing TCR:MHC/peptide complex interactions or through general inhibition of protein:protein interaction. Compounds that inhibit binding of the MHC/peptide complex but do not alter binding of the anti-TCR antibody will be pursued as lead compounds. Assays using other pairs of TCR and MHC/peptide molecules will be carried out to determine the specificity of the inhibitory compounds. Compounds that specifically inhibit the autoimmune TCR interaction with its cognate MHC/peptide complex may prove useful in the development of therapeutic immunosuppressive agents.

Example 18 - Development of homogeneous screening methods for identifying compounds that inhibit TCR:MHC/peptide interactions associated with human autoimmune diseases.

The objective of this example was to develop a protein-protein binding homogeneous assay using recombinant human TCR and human MHC/peptide reagents associated with human autoimmune disease. Homogeneous assays have the advantage in that no separation of unbound components or washing steps are required. A number of different systems allow for homogeneous assays to be carried out as either cell-based or protein-based assays.

The assay format described in this example employs specialized beads or microspheres. Bead-based reagents are commercially available in a wide variety of formats that allow for high capacity binding/capture of recombinant proteins, efficient detection and the use of different separation and homogeneous assay methods. For many high throughput screening methods, bead-based reagents are advantageous.

For example, a homogeneous luminescent proximity assay based on the AlphaScreen reagents (Packard BioScience) can be developed using the E11 TCR and the DR2/MBP molecules to demonstrate autoimmune TCR:MHC/peptide interaction. In this assay format, two small beads are labeled with TCR and MHC/peptide complexes and brought into proximity by the TCR:MHC/peptide interaction. On laser excitation, a chemical signal generated by the 'Donor' bead which will go undetected without the close proximity of the 'Acceptor' bead. When the TCR:MHC/peptide interaction brings the beads together, a cascade of chemical reactions act to produce a greatly amplified signal. Compounds can be tested for their ability to modulate (increase or decrease) the ability of the TCR:MHC/peptide interaction generate the signal.

The TCR derived from the E11 human T cell clone will be expressed as a recombinant three-domain single-chain soluble TCR in mammalian cells as described. A birA target sequence will also be incorporated into the C terminus of the E11 scTCR using the methods described in Examples 1 and 2. The purified E11 scTCR protein will be biotinylated with biotin ligase as described in Examples 1 and 2.

For this assay, the E11 scTCR-Biotin protein is bound onto streptavidin-coated Donor beads. The scDR2/MBP-Ig (see Example 4) is bound by the anti-human IgG-coated Acceptor beads. The beads are mixed to allow association between the E11 scTCR protein and the scDR2/MBP complex. This interaction brings the Donor bead and Acceptor beads together within the proximity (<200nm) to allow a light-induced chemical reaction to occur and generate a detectable signal. The condition necessary to optimally coat the Donor and Acceptor beads and to allow interaction between the protein-coated beads will be determined experimentally. The chemical reaction is induced in the Donor bead by light at 680 nm. Following energy transfer to the proximal Acceptor bead, the signal generated is measurable at 520-620 nm. This measurement can be made in the time-resolved mode to minimize the background effects of fluorescent compounds in the assay. This study will demonstrate a "proof of principle" for using a homogenous protein-based

homogeneous assay to detect the interaction of autoimmune TCR and MHC/peptide and will establish a homogeneous assay approach to identify antagonist compounds by high throughput screening methods.

For example, the E11 scTCR Donor beads and scDR2/MBP Acceptor beads are mixed in a microtiter well to generate a detectable signal. The reaction conditions required to generate a linear response will be determined experimentally. Media with 2.5% dimethyl sulfoxide or media containing the test compound in 2.5% DMSO is added to the wells. Following laser excitation at 680 nm, the fluorescent signal is detected at 550 nm in the time resolved mode (20 msec delay) using a AlphaQuest-HST Microplate Analyzer (Packard). The fluorescent signal will correlate with the amount of scDR2/MBP Acceptor bead bound to the E11 scTCR Donor bead.

The ability of a compound to antagonize interactions between the MHC/peptide complex and the TCR will be measured as a decrease in the amount fluorescent signal at 550 nm. Assays in which anti-TCR Ab is used instead of the MHC/peptide complex will be carried out to determine whether the inhibitory compounds act by antagonizing TCR:MHC/peptide complex interactions or through general inhibition of protein:protein interaction. Compounds that inhibit binding of the MHC/peptide complex but do not alter binding of the anti-TCR antibody will be pursued as lead compounds. Assays using other pairs of TCR and MHC/peptide molecules will be carried out to determine the specificity of the inhibitory compounds. Compounds that specifically inhibit the autoimmune TCR interaction with its cognate MHC/peptide complex may prove as useful in the development of therapeutic immunosuppressive agents.

Example 19- Development of protein-based screening methods for identifying compounds that augment and inhibit TCR:MHC antigen interactions.

The objective of this example was to develop a protein-protein binding assay using recombinant TCR and MHC antigen reagents. By establishing a protein-based

assay, a high throughput screen could be developed to identify compounds that directly agonize or antagonize the target TCR:MHC/peptide interaction. The advantage to such a screening assay compared to the cell-based assay would be the reduction in the number of "false positive" compounds detected that are cytotoxic or nonspecifically affect cellular responses. The approach taken was to establish an ELISA format using purified recombinant TCR and MHC antigen complexes.

Briefly, cDNA encoding the 264 TCR (peptide fragment 264-272 from wild-type human tumor suppressor protein, p53 and restricted by HLA-A2) was provided by Dr. Linda Sherman (Scripps Research Institute, La Jolla, CA). Amplification of the Vα3.1 and the Vβ3.0 genes was carried out as described in the pending U.S. patent applications No. 08/813,731 (Fusion Proteins Comprising Bacteriophage Coat Protein and A Single-Chain T cell Receptor" and 08/943,086 ("Fusion Proteins Comprising Single-Chain T Cell Receptor and an Immunoglobulin Light Chain Constant Region") except that the oligonucleotides used were specific for the 264 TCR. The cloning of the 264 TCR as a three-domain scTCR-C kappa fusion protein was carried out in the same manner as described for the DO11.10 TCR (as described in the pending U.S. patent applications - see above). The 264 scTCR-C kappa fusion vector was transfected into CHO cells for expression of soluble protein in the culture media. The 264 scTCR protein was then purified to homogeneity on an affinity column as confirmed by SDS-PAGE analysis.

Separately, a vector system used to produce the HLA-A2 and beta-2 microglobulin molecules was provided by Dr. John Altman (Emory University, Atlanta, GA) and has been described in Altman et al. (Altman, J.D., P.A.H. Moss, P.J.R. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael & M.M. Davis. 1996. *Science* 274:94-96). To produce HLA-A2 molecules loaded with the peptide of interest, a protocol by Dr. Mark Davis (Stanford University, Palo Alto, CA) (see Altman et al. 1996. *Science* 274:94-96) was followed that resulted in the formation of functional molecules. Correctly folded peptide/HLA-A2 complex was isolated on a Sephadex-200 size exclusion column as a single peak migrating at

50kD. The protein complex was then biotinylated using biotin ligase (Avidity, Denver, CO) to attach a single biotin moiety to a C-terminal BirA sequence. Biotinylated A2 complexes were multimerized using streptavidin, a biotin specific protein capable of binding up to four biotin residues per molecule of streptavidin. Using the HLA-A2 and the streptavidin protein at a molar ratio of 4:1 respectively, tetrameric HLA-A2/peptide complexes were generated. The advantage of using the tetramer (compared to the monomer) is the greater binding avidity displayed by the tetramer when interacting with TCR. In support of this, protein binding studies using BIAcore instrument showed that the soluble tetrameric HLA-A2/264 peptide complexes bound to immobilized 264 scTCR-C kappa fusion protein to a greater extent than the monomeric HLA-A2/264 peptide complexes.

Based on these findings, an ELISA was developed using the HLA-A2/264 tetramer technology to demonstrate TCR:MHC/peptide interaction. In this assay, the 264 scTCR-C kappa fusion protein was coated at 2, 1 and 0.5 μg/well onto a 96 well plate. The plate was then washed and probed with 264/HLA-A2 tetramer. The results are shown in Figure 21 and suggest that the HLA-A2 tetramer containing the 264 peptide, but not the 149 peptide, bound to the immobilized 264 scTCR-C kappa protein in a peptide specific manner.

A second ELISA was developed using the HLA-A2/264 or HLA-A2/149 tetramer technology. For this assay, the tetramers were prepared as described above, except that the biotinylated HLA-A2 complexes were multimerized using streptavidin-peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratories) to form HLA-A2/264-HRP or HLA-A2/149-HRP tetramers. The labeled tetramers were then used as a probe to detect plate-bound TCR. To immobilize the TCR, the anti-TCR beta-constant domain specific antibody H57 (BD Pharmingen) was coated at 250 ng/well in 50 μl PBS onto wells of a 96 well microtiter plate by overnight incubation at 4°C. The antibody was removed and the wells blocked with 10% serum in PBS for 1 hour. The wells were then washed 3 times with 200 μl of Tris-buffered saline with 1% Triton X-100. The purified 264 scTCR-C kappa fusion protein was added in 50 μl

PBS with 1% serum. After an hour at room temperature, the wells were washed and the HLA-A2/264-HRP (or control HLA-A2/149-HRP) tetramers were added in 50 µl PBS with 1% serum. After 2 hours at room temperature, the wells were washed and 100 µl of ABTS substrate was added and color was allowed to develop for 20 minutes. The substrate reaction was read at an absorbance of 405 nm and represents the amount of labeled MHC/peptide bound by the TCR fusion protein. The results of these studies showed specific interactions between the 264 scTCR and the HLA-A2/264-HRP probe but no interaction between the 264 scTCR and the control HLA-A2/149-HRP probe (Figures 22A and 22B). The amounts of 264 scTCR-C kappa fusion protein and HLA-A2.264-HRP probe required to generate a linear response was determined experimentally. Matrix studies of increasing concentration of 264 scTCR verses increasing concentration of HLA-A2/264-HRP were also carried out to determine the linear range of the response (Figures 23A and 23B). In another study, comparisons were made between purified 264 scTCR-IgG1 fusion protein and 264 scTCR-C kappa fusion protein. Both proteins were found to be equivalent in their ability to interact with the HLA-A2/264-HRP probe (Figures 24A-D).

These studies demonstrate a "proof of principle" for using a protein-based ELISA to detect the interaction of TCR and MHC/peptide molecules. The results described here suggest that this assay format could be applied to other TCR:MHC/peptide pairs to establish a protein-based assay approach to identify agonist and antagonist compounds by high throughput screening methods.

For example, the 264 scTCR-C kappa:HLA-A2/264-HRP ELISA described above was used to screen a chemical library for compounds that inhibited TCR:MHC/peptide interaction. In this experiment, 80 different compounds were individually tested at 50 µM by addition with the HLA-A2/264-HRP probe to the 264 scTCR-coated wells. The ELISA was carried out as described above. The ability of each compound to inhibit the ELISA reaction was determined. One compound was found to inhibit the substrate reaction by 80% at 50 µM and to have an ID_{50} of 2µM.

These results indicate the feasibility of using such a protein-based assay to identify compounds that antagonize interactions between the TCR and MHC antigen.

In another example, the purified 264 scTCR-C kappa fusion protein is coated in 50 µl PBS onto wells of a 96 well microtiter. The amount of 264 scTCR-C kappa fusion protein required to generate a linear response will be determined experimentally. After 24 hours, the coat solution is removed and the wells receive 50 µl media (IMDM with 10% FBS) with 2.5% dimethyl sulfoxide or 50 µl media containing the test compound in 2.5% DMSO. The HLA-A2/264 tetramer (in 50 µl media) is then added. Following a 30 minute incubation at room temperature, the protein solution is removed and the wells are washed with Tris buffered saline with 1% Triton X-100. Rabbit anti-streptavidin antisera is added to each well. After a 20 minute incubation at room temperature, the wells are washed and goat anti-rabbit Ig antisera conjugated to HRP added. After 30 min at room temperature, the well are washed and ABTS substrate is added. Substrate reaction is developed and the absorbance read at 405 nm. The absorbance reading will correlate with the amount of HLA-A2/264 tetramer bound to the 264 scTCR-coated well.

The ability of a compound to antagonize interactions between the MHC/peptide complex and the recombinant TCR will be measured as a decrease in the absorbance read at 405 nm. Assays in which anti-TCR Ab is used instead of the MHC/peptide complex will be carried out to determine whether the inhibitory compounds act by antagonizing TCR:MHC/peptide complex interactions or through general inhibition of protein:protein interaction. Compounds that inhibit binding of the MHC/peptide complex but do not alter binding of the anti-TCR antibody will be pursued as lead compounds. Assays using other pairs of TCR and MHC/peptide molecules will be carried out to determine the specificity of the inhibitory compounds.

The ability of a compound to increase interactions between the MHC/peptide complex and the recombinant TCR will be measured as an increase in the amount

absorbance read at 405 nm. As described above, assays using other pairs of TCR and MHC/peptide molecules or anti-TCR antibodies will be carried out to determine the specificity of the stimulatory compounds. Since the HLA-A2/p53 264-272 peptide complex represents a tumor antigen, compounds that specifically stimulate the TCR interaction with this antigen may prove useful in the development of therapeutic anti-cancer agents. Similar screening methods could be developed to identify compounds that stimulate specific interactions between TCR and MHC antigen complexes in which the peptide is derived from an infectious pathogen. The ultimate goal of such a method would be the isolation of anti-infectious agents.

All references disclosed herein are incorporated by reference.

While the invention has been described with reference to specific embodiments, modifications and variations of the invention may be constructed without departing from the scope of the invention, which is defined, e.g., in the following claims.

What is claimed is:

1. A method for identifying compounds that modulate an immune complex comprising a T cell receptor (TCR) and a major histocompatibility complex (MHC) antigen, the method comprising:

a) contacting a first TCR molecule and MHC antigen molecule in the presence or absence of at least one test compound, the contacting being under conditions sufficient to bind the TCR and the MHC antigen molecules specifically as an immune complex,

b) detecting presence of the immune complex in the presence and absence of the test compound,

c) selecting a test compound that alters specific binding between the TCR and MHC antigen molecules; and

d) identifying the selected compound as being capable of modulating the immune complex.

2. The method of claim 1, wherein the MHC antigen is an MHC based-molecule comprising of an MHC/peptide complex, MHC/superantigen complex, MHC/lipid (or glycolipid) complex, or an alloreactive or xenoreactive MHC molecule.

3. The method of claims 1 and 2, wherein at least one of the TCR or MHC components is a heterodimer.

4. The method of claim 3, wherein the heterodimer is naturally-occurring or recombinant.

5. The method of claims 1-4, wherein the TCR molecule is a recombinant single-chain (sc-) molecule.

6. The method of claims 1-5, wherein the TCR molecule is fully soluble.

7. The method of claims 1-5, wherein the TCR molecule is expressed by cells as a surface molecule.

8. The method of claim 7, wherein the TCR molecule comprises a transmembrane domain.

9. The method of claims 1-8, wherein the TCR molecule is multivalent.

10. The method of claims 1-9, wherein the TCR molecule comprises at least a portion of a mammalian immunoglobulin molecule.

11. The method of claim 10, wherein the fused immunoglobulin molecule comprises a constant domain, or a functional fragment thereof.

12. The method of claim 11, wherein the constant domain comprises at least a portion of a κ or λ light chain constant domain (C_L).

13. The method of claim 11, wherein the constant domain is a heavy chain constant domain.

14. The method of claims 10-13, wherein the immunoglobulin molecule has an IgG, IgM, IgA or a chimeric isotype.

15. The method of claims 14, wherein the mammalian heavy chain has an IgG isotype and comprises at least a C_H2-C_H3 domain.

16. The method of claim 15, wherein the mammalian IgG heavy chain comprises a C_H1-C_H2-C_H3 domain.

17. The method of claims 14, wherein the mammalian heavy chain has an IgM isotype and comprises a C_H2-C_H3-C_H4 domain.

18. The method of claim 10, wherein the mammalian immunoglobulin molecule comprises or consists of murine or human sequence.

19. The method of claims 9-18, wherein the TCR molecule further comprises at least one tag for joining two or more TCR molecules together.

20. The method of claim 19, wherein the TCR molecule is capable of forming a dimer, trimer, tetramer or higher order complex.

21. The method of claims 1-20, wherein the TCR molecule comprises at least a portion of a fused mammalian CD3 ζ sequence.

22. The method of claim 21, wherein the fused mammalian CD3 ζ sequence comprises a transmembrane and a cytoplasmic domain; or a functional fragment thereof.

23. The method of claims 1-22, wherein the MHC component of the MHC antigen is class I, class II, or a combination thereof.

24. The method of claim 23, wherein the MHC component of the MHC antigen is a heterodimer or a recombinant single-chain molecule.

25. The method of claim 24, wherein the MHC antigen molecule is an MHC/peptide complex, each MHC antigen molecule comprising a fused presenting peptide.

26. The method of claim 24, wherein the MHC antigen molecule is an MCH/peptide complex, the method further comprises loading the MHC component with a suitable presenting peptide.

27. The method of claim 26, wherein the loading of the presenting peptide is performed prior to or during the contacting step.

28. The method of claims 1-27, wherein the MHC antigen molecule is fully soluble.

29. The method of claims 1-28, wherein the MHC antigen molecule is expressed by cells as a surface molecule.

30. The method of claim 29, wherein the MHC antigen molecule comprises at least a portion of a transmembrane domain.

31. The method of claims 1-30, wherein the MHC antigen molecule is multivalent.

32. The method of claims 1-31, wherein the MHC antigen molecule comprises at least a portion of a fused mammalian immunoglobulin molecule.

33. The method of claim 32, wherein the fused immunoglobulin molecule of the MHC antigen molecule comprises a constant domain; or a functional fragment thereof.

34. The method of claim 33, wherein the constant domain comprises at least a portion of a κ or λ light chain constant domain (C_L).

35. The method of claim 33, wherein the constant domain is a heavy chain constant domain.

36. The method of claims 32-35, wherein the immunoglobulin molecule has an IgG, IgM, IgA or a chimeric isotype.

37. The method of claims 32-36, wherein the mammalian heavy chain has an IgG isotype and comprises at least a C_H2-C_H3 domain.

38. The method of claim 37, wherein the mammalian IgG heavy chain comprises a C_H1-C_H2-C_H3 domain.

39. The method of claims 32-36, wherein the mammalian heavy chain has an IgM isotype and comprises a C_H2-C_H3-C_H4 domain.

40. The method of claim 32, wherein the mammalian immunoglobulin molecule comprises or consists of murine or human sequence.

41. The method of claims 31-40, wherein the MHC antigen molecule further comprises at least one tag for joining two or more MHC antigen molecules together.

42. The method of claim 41, wherein the MHC antigen molecule is capable of forming a dimer, trimer, tetramer or higher order complex.

43. The method of claims 1-42, wherein the MHC antigen molecule comprises at least a portion of a fused mammalian CD3 ζ sequence.

44. The method of claim 43, wherein the fused mammalian CD3 ζ sequence comprises a transmembrane and a cytoplasmic domain; or a functional fragment thereof.

45. The method of claims 1-5, and 7-44, wherein the TCR molecule is expressed by cells as a surface molecule comprising at least one transmembrane domain; or functional fragment thereof.

46. The method of claim 45, wherein the cognate MHC antigen molecule is bound to a solid support.

47. The method of claims 1-27, 29-46, wherein the MHC antigen molecule is expressed by cells as a surface molecule comprising at least one transmembrane domain.

48. The method of claim 47, wherein the TCR molecule is bound to a solid support.

49. The methods of claims 46 or 48, wherein at least one of the bound MHC antigen or TCR molecules is bound to at least one of a dendrimer, synthetic or semi-synthetic polymer.

50. The method of claim 49, wherein the solid support is a tissue culture well or plate, a test strip, chromatography matrix, electrophoretic matrix, or a bead.

51. The method of claim 50, wherein the bead is magnetic.

52. The method of claims 45 and 47, wherein the detecting step further comprises detecting at least one response from cells expressing the TCR molecule, cells expressing the MHC antigen molecule; or both, the response resulting from the stable formation of the immune complex.

53. The method of claim 52, wherein the cell response detected by the method is at least one of cell adhesion, membrane potential, intracellular or extracellular ion concentration, intracellular kinase activity, phosphatase activity,

intracellular protein transport, endogenous or heterologous gene expression, protein production or secretion including the production of at least one cytokine, cell proliferation, apoptosis, RNA synthesis, or DNA synthesis.

54. The method of claim 53, wherein the method further comprises measuring production of at least one cytokine by cells expressing the TCR molecule.

55. The method of claim 54, wherein the cytokine produced by the expressing cells is interleukin-2 (IL-2).

56. The method of claims 54-55, wherein the production is measured by contacting the cytokine with a first antibody capable of specifically binding the cytokine to form a complex comprising the first antibody and the cytokine.

57. The method of claim 56, wherein the first antibody is bound to a solid support.

58. The method of claims 56-57, wherein the cytokine production is further measured by contacting the complex with a detectably-labeled second antibody capable of specifically binding the cytokine.

59. The method of claim 58, wherein presence of the detectably-labeled second antibody is indicative of the immune complex formed in the presence and absence of the test compound.

60. The method of claim 53, wherein the detected cell response is T cell activation or proliferation.

61. The method of claim 60, wherein the T cell activation is measured in a standard T cell activation assay.

62. The method of claim 45, wherein the TCR expressing cells express at least one other type of cell surface TCR molecule.

63. The method of claim 62, wherein the other type of cell surface TCR molecule comprises or consists of a second TCR molecule having a different MHC antigen binding specificity than the first TCR molecule.

64. The method of claim 63, wherein the second cell surface TCR molecule is used in the method as a control.

65. The method of claims 62-64, wherein the second TCR molecule is a naturally-occurring TCR receptor endogenous to the expressing cells.

66. The method of claims 62-64, wherein the second TCR molecule is a recombinant heterodimer or a single chain (sc-) molecule.

67. The method of claims 62-66, wherein the test compound has a negligible capacity to modulate formation of a control immune complex comprising the second TCR molecule and its cognate MHC antigen.

68. The method of claims 62-67, wherein the test compound has a negligible capacity to modulate stability of a control immune complex comprising the second TCR molecule and its cognate MHC antigen.

69. The method of claims 45-68, wherein the method further comprises co-expressing with the TCR molecule(s) with at least one cluster of differentiation (CD) molecule.

70. The method of claim 69, wherein the CD molecule is capable of potentiating at least one of the cell responses.

71. The method of claim 70, wherein the CD molecule is recombinant.

72. The method of claim 71, wherein the recombinant CD molecule co-expressed by the cells is CD4.

73. The method of claims 1-72, wherein the T cells are T cell hybridomas.

74. The method of claim 73, wherein the T cell hybridomas are capable of producing at least one cytokine.

75. The method of claim 74, wherein the cytokine is interleukin-2 (IL-2).

76. The method of claims 19-20 and 41-42, wherein the tag comprises an amino acid sequence comprising at least one biotin ligase target sequence.

77. The method of claim 76, wherein the biotin ligase target sequence comprises at least the *BirA* sequence.

78. The method of claims 1-77, wherein at least one of the TCR or MHC antigen molecules is detectably-labeled.

79. The method of claims 1-78, wherein the label is directly or indirectly detectable.

80. The method of claim 79, wherein the label is directly detectable and includes at least one of a fluorescent, phosphorescent, luminescent, chromogenic or chemiluminescent label; or a precursor thereof.

81. The method of claim 79, wherein the label is a radionuclide.

82. The method of claim 79, wherein the label is indirectly detectable and includes at least one of a tag or an enzyme.

83. The method of claim 82, wherein the tag specifically binds an antibody, cell receptor, protein A, protein G, avidin, streptavidin or a functional fragment thereof or is the target for specific modification by a proteolytic enzyme, protein kinase, biotin ligase or a functional fragment thereof.

84. The method of claim 82, wherein the enzyme is horseradish peroxidase (HRP), beta-galactosidase (b-gal), or alkaline phosphatase (AP).

85. The method of claims 78-84, wherein the detection is accomplished by using an ELISA detection format.

86. The method of claims 1-85, wherein the selection step further comprises identifying the test compound as having the negligible capacity to modulate formation of a control immune complex.

87. The method of claims 1-86, wherein the selection step further comprises identifying the test compound as having negligible capacity to modulate stability of a control immune complex.

88. The method of claims 86 or 87, wherein the control immune complex comprises a first TCR and an antibody capable of specifically binding the first TCR.

89. The method of claims 86 or 87, wherein the control immune complex comprises a CD3 molecule and an antibody capable of specifically binding a CD3 protein.

90. The method of claims 86 or 87, wherein the control immune complex comprises a second TCR and its cognate MHC antigen molecule.

91. The method of claim 90, wherein the second TCR molecule has a different MHC antigen binding specificity than the first TCR molecule.

92. The method of claims 90 and 91, wherein the second TCR and its cognate MHC antigen molecule are naturally-occurring or recombinant molecules.

93. The method of claims 86-92, wherein formation or stability of the control immune complex is detected by measuring production of at least one cytokine by cells expressing the TCR molecule or CD3 molecule.

94. The method of claims 1-93, wherein the MHC component of the MHC antigen molecule is a sc-MHC or HLA molecule or an MHC or HLA heterodimer.

95. The method of claim 1-94, wherein the MHC antigen is a superantigen-MHC complex comprising a Mls antigen, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SPE-A, SPEC, ExFT or TSST superantigen.

96. A method for identifying compounds that modulate an immune complex comprising a T cell receptor (TCR) and a major histocompatibility complex (MHC) antigen, the method comprising:

a) contacting cells expressing a first TCR molecule with an MHC antigen molecule bound to a solid support in the presence or absence of a test compound, the contacting being under conditions sufficient to bind the TCR and the bound MHC antigen molecule specifically as an immune complex,

b) detecting presence of the immune complex in the presence and absence of the test compound by measuring at least one response from the cells,

c) selecting a test compound that alters specific binding between the first TCR and bound MHC antigen molecules; and

d) identifying the selected compound as being capable of modulating the immune complex.

97. The method of claim 96, wherein cell response measured in the detection step is production of a cytokine or T cell proliferation.

98. The method of claim 97, wherein the measured cell response is production of the cytokine interleukin-2 (IL-2).

99. The method of claim 98, wherein the method further comprises binding to the solid support a first antibody or functional fragment thereof capable of specifically binding the IL-2 and forming an antibody complex.

100. The method of claim 95, wherein the method further comprises contacting the antibody complex with a detectably-labeled antibody or functional fragment thereof capable of specifically binding the IL-2.

101. The method of claim 100, wherein the method further comprises quantifying the detectable label either directly or indirectly.

102. The method of claim 101, wherein the method comprises an ELISA detection format.

103. The method of claims 96-102, wherein the cells expressing the TCR molecule further express at least one of a second (control) TCR molecule or a CD protein.

104. The method of claim 103, wherein the CD protein is CD4.

105. The method of claims 96-104, wherein the selection step further comprises identifying the test compound as being able to reduce or eliminate formation of the immune complex between the first TCR and MHC antigen molecules.

106. The method of claims 96-105, wherein the selection step further comprises identifying the test compound as having negligible capacity to modulate formation of a control immune complex comprising the second TCR molecule and it cognate MHC antigen.

107. The method of claims 96-106, wherein the T cells express a multiple sclerosis (MS) TCR molecule and the cognate MHC antigen molecule is an MHC/peptide complex comprising a myelin basic protein (MBP) peptide.

108. The method of claim 107, wherein the MS TCR molecule comprises TCR alpha and beta chains from an MBP-restricted MS T cell line.

109. The method of claim 108, wherein the MS TCR is a heterodimer or a recombinant single chain molecule.

110. The method of claims 108-109, wherein the MS T cell line is E11.

111. The method of claims 96-110, wherein the MS T cell molecule comprises a covalently linked CD3ζ sequence or a functional fragment thereof.

112. The method of claims 96-111, wherein the cognate MHC antigen molecule is a single-chain (sc-) DR2/MBP protein or functional fragment thereof.

113. The method of claims 96-112, wherein the MHC component of the MHC antigen molecule is an empty MHC class II HLA-DR2 (DRB1*1501) or a functional fragment thereof.

114. The method of claim 113, wherein the method further comprises contacting the MHC component with an MBP (amino acids 83-102) peptide and loading the MHC component with the MBP peptide to form the MHC antigen molecule.

115. The method of claim 114, wherein the loading step is performed before, after, or contemporaneous with binding to the solid support.

116. The method of claims 96-113, wherein the MHC antigen molecule is an MHC class II HLA-DR2 (DRB1*1501) complex comprising a fused MBP (amino acids 83-102) peptide.

117. The method of claims 112-116, wherein the DR2/MBP protein further comprises a covalently linked IgG heavy chain constant domain; or functional fragment thereof.

118. The method of claims 113-116, wherein MHC component of the DR2/MBP molecule is a heterodimer or recombinant single chain.

119. The method of claims 96-118, wherein the conditions sufficient to bind the TCR and the MHC molecules specifically include incubation in a suitable growth media for about 8 hours at 37°C and in an atmosphere having about 10% carbon dioxide.

120. The method of claims 1-119, wherein the test compound is dissolved in a suitable solvent.

121. The method of claim 120, wherein the solvent is at least one of water, saline, tissue culture media, about 2.5% dimethyl sulfoxide, or a physiologically acceptable buffer or carrier.

122. The method of claims 1-121, wherein the TCR or MHC molecule is multivalent and comprises a fused immunoglobulin domain.

123. The method of claims 21, 22, 43, 44 and 111, wherein the fused CD3ζ chain comprises murine or human sequence.

124. The method of claim 1, wherein the first TCR molecule is fully soluble and the MHC antigen molecule is an MHC/peptide complex.

125. The method of claim 124, wherein the first TCR molecule is a recombinant single chain (sc-) TCR molecule and the MHC antigen is recombinant class I/peptide complex comprising the class I heavy chain and beta-2 microglobulin.

126. The method of claims 124-125, wherein the first TCR molecule is bound to a solid support.

127. The method of claims 124-126, wherein the MHC antigen molecule is bound to a solid support.

128. The method of claims 124-127, wherein the first TCR molecule and the MHC antigen molecule are bound to a solid support.

129. The method of claims 46-128, wherein prior to, during, after or contemporaneous with the binding of at least one of the TCR or MHC antigen molecules to the solid support, the solid support is contacted with the test compound.

130. The method of claims 124-129, wherein at least one of the TCR or MHC molecules is detectably labeled.

131. The method of claim 130, wherein the detectable label is biotin.

132. The method of claim 131, wherein the method further comprises contacting the solid support with a streptavidin or avidin molecule capable of specifically binding the biotin and forming a complex comprising the biotin.

133. The method of claim 132, wherein formation of the complex is detected by contacting the complex with a detectably labeled antibody capable of specifically binding the complex.

134. The method of claims 130-133, wherein the detection is accomplished by using an ELISA format.

135. The method of claims 1-134, wherein the detection is accomplished by using a homogeneous assay format.

136. The method of claims 1-135, wherein the detection is accomplished by means of optical, fluorescent, or luminescent measurement.

137. The method of claims 1-136, wherein the test compound has a negligible capacity to modulate formation of a control immune complex comprising the TCR molecule and an antibody capable of specifically binding:

a) an epitope on the TCR molecule not specifically bound by the MHC antigen molecule (anti-TCR antibody), or
b) a cluster of differentiation (CD) protein associated with the TCR molecule in a cell membrane.

138. The method of claim 137, wherein the CD protein is CD3 and the antibody is capable of specifically binding CD3 associated with the TCR molecule (anti-CD3 antibody).

139. The method of claims 1-138, wherein prior to, during, after or contemporaneous with contacting the first TCR and MHC antigen molecule at least one of the first TCR or MHC antigen molecules is contacted with the test compound.

140. A test compound identified by any one of the methods of claims 1-139.

141. The test compound of claim 140, wherein the test compound is capable of modulating formation of the immune complex between the TCR molecule and its cognate MHC antigen molecule.

142. The test compound of claims 140-141, wherein the test compound is capable of reducing or increasing the rate of formation of the immune complex between the TCR and MHC antigen molecules.

143. The test compound of claims 140-141, wherein the test compound is capable of reducing or enhancing the rate of disassociation between the TCR and MHC antigen molecules.

144. The test compound of claims 140-143, wherein the test compound is capable of reducing or increasing the avidity of the immune complex between the TCR and MHC antigen molecules.

145. The test compound of claims 140-144, wherein the test compound is capable of reducing or increasing the multimerization of the immune complex between the TCR and MHC antigen molecules.

146. The test compound of claims 140-145, wherein the test compound decreases or increases at least one cell response by about 1.5 to about 100 times relative to a suitable control.

147. The test compound of claim 140, wherein the cell response is cytokine production.

148. The test compound of claim 147, wherein the cytokine produced is interleukin-2 (IL-2).

149. The test compound of claims 146-148, wherein the suitable control is the cytokine produced in the presence of an anti-TCR or anti-CD3 antibody.

150. A pharmaceutical composition comprising at least one of the compounds of claims 140-149.

151. A method of inhibiting an immune response in a mammal, the method comprising administering a therapeutically effective amount the pharmaceutical compound of claim 150.

152. A method of stimulating an immune response in a mammal, the method comprising administering a therapeutically effective amount the pharmaceutical compound of claim 150.

153. A kit for performing at least one of the methods of claims 1-139, 151 and 152.

154. A recombinant TCR molecule comprising a mammalian CD3ζ sequence or functional fragment thereof.

155. The recombinant TCR molecule of claim 154, wherein the CD3ζ sequence or functional fragment comprises murine or human sequence.

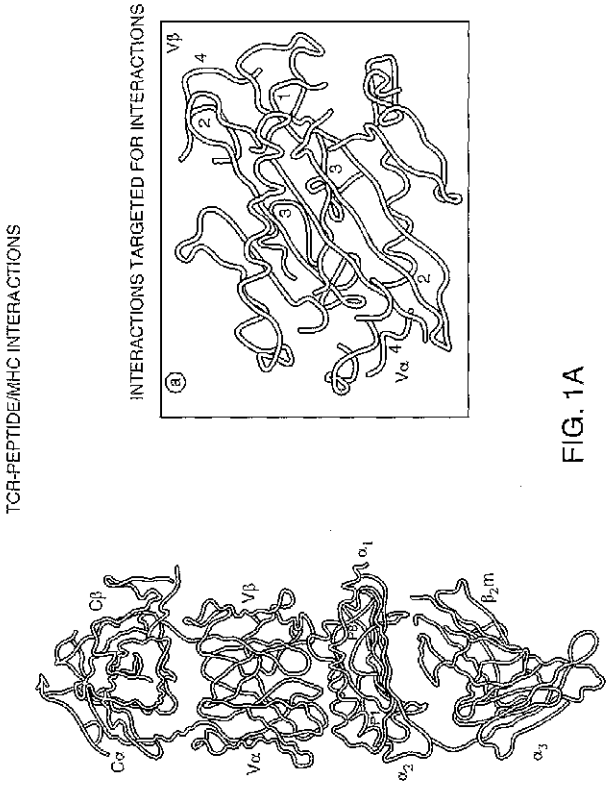
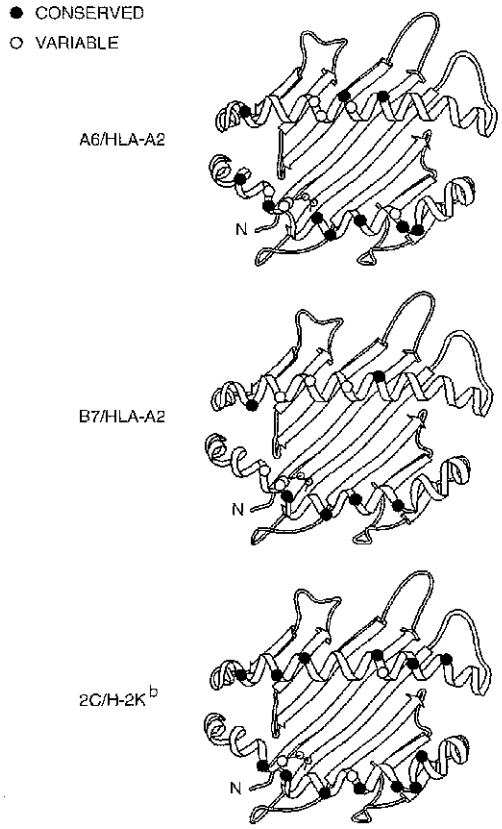

TCR-PEPTIDE/MHC INTERACTIONS
INTERACTIONS TARGETED FOR INTERACTIONS
a
Vβ
Vα
Cβ
Cα
α1
α2
α3
β2m
P6
P7

FIG. 1A

TCR-PEPTIDE/MHC INTERACTIONS



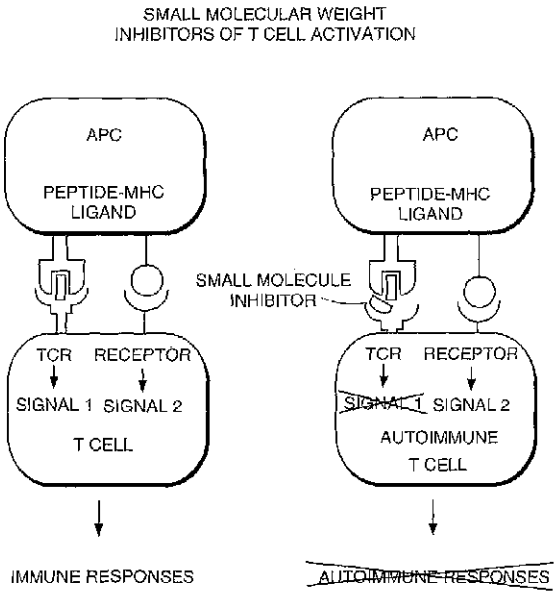

SMALL MOLECULAR WEIGHT
INHIBITORS OF T CELL ACTIVATION
APC
PEPTIDE-MHC
LIGAND
TCR
RECEPTOR
SIGNAL 1
SIGNAL 2
T CELL
IMMUNE RESPONSES
APC
PEPTIDE-MHC
LIGAND
SMALL MOLECULE
INHIBITOR
TCR
RECEPTOR
SIGNAL 1
SIGNAL 2
AUTOIMMUNE
T CELL
AUTOIMMUNE RESPONSES

FIG. 2

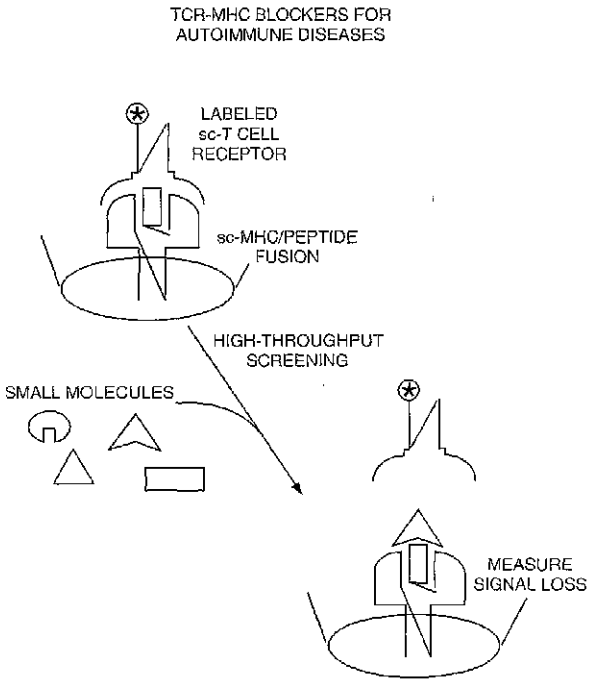

TCR-MHC BLOCKERS FOR
AUTOIMMUNE DISEASES
LABELED
sc-T CELL
RECEPTOR
sc-MHC/PEPTIDE
FUSION
HIGH-THROUGHPUT
SCREENING
SMALL MOLECULES
MEASURE
SIGNAL LOSS

FIG. 3

SCREENING SYSTEMS FOR INHIBITORS
OF AUTOIMMUNE RESPONSES

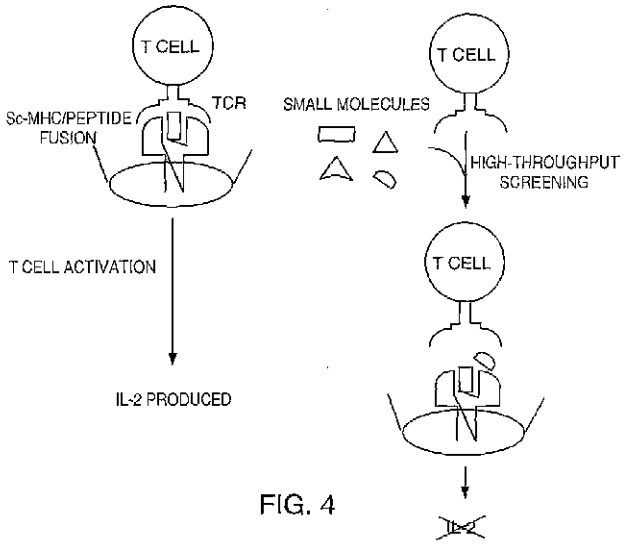


FIG. 4

PROOF OF PRINCIPLE

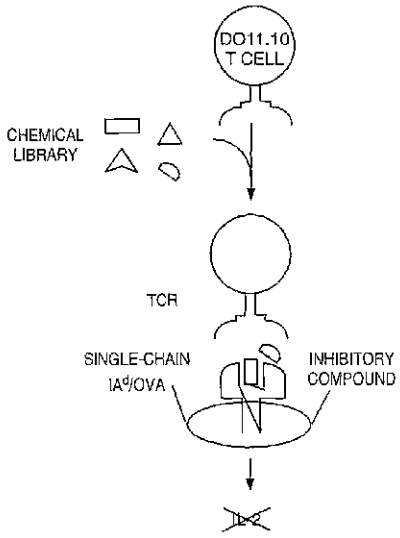


FIG. 5A

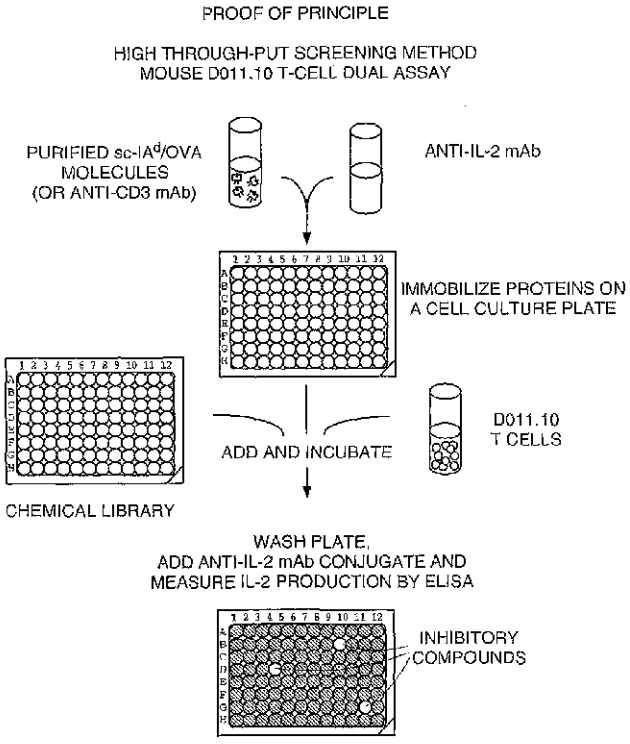

PROOF OF PRINCIPLE
HIGH THROUGH-PUT SCREENING METHOD
MOUSE D011.10 T-CELL DUAL ASSAY
PURIFIED sc-IA^d/OVA MOLECULES (OR ANTI-CD3 mAb)
ANTI-IL-2 mAb
IMMOBILIZE PROTEINS ON A CELL CULTURE PLATE
D011.10 T CELLS
ADD AND INCUBATE
CHEMICAL LIBRARY
WASH PLATE, ADD ANTI-IL-2 mAb CONJUGATE AND MEASURE IL-2 PRODUCTION BY ELISA
INHIBITORY COMPOUNDS

FIG. 5B

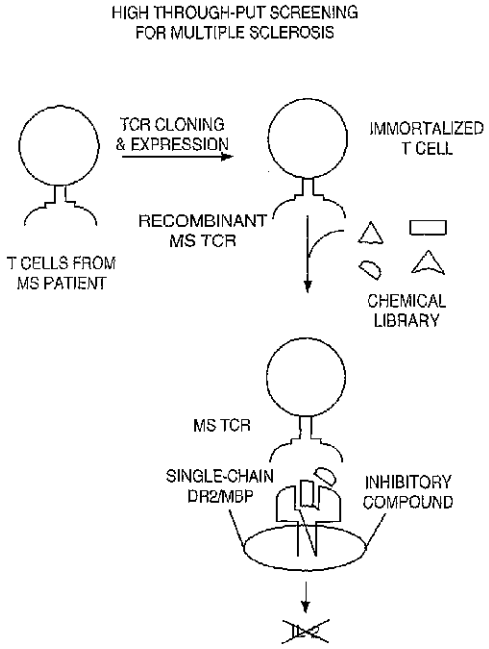

HIGH THROUGH-PUT SCREENING
FOR MULTIPLE SCLEROSIS
TCR CLONING
& EXPRESSION
IMMORTALIZED
T CELL
RECOMBINANT
MS TCR
T CELLS FROM
MS PATIENT
CHEMICAL
LIBRARY
MS TCR
SINGLE-CHAIN
DR2/MBP
INHIBITORY
COMPOUND

FIG. 6A

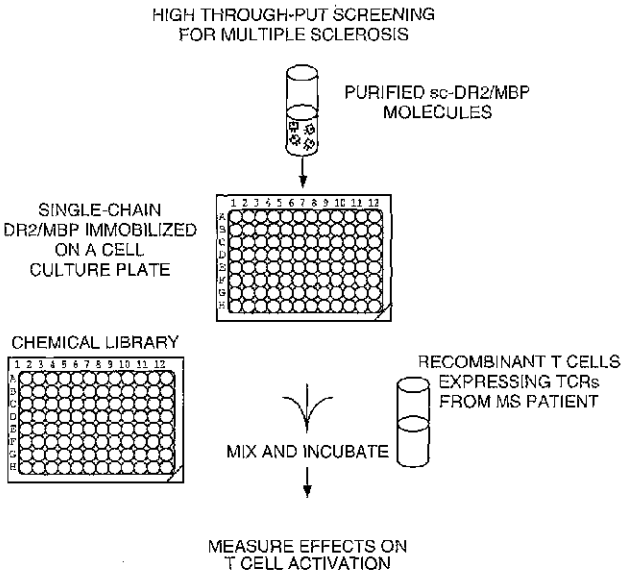

HIGH THROUGH-PUT SCREENING
FOR MULTIPLE SCLEROSIS
PURIFIED sc-DR2/MBP
MOLECULES
SINGLE-CHAIN
DR2/MBP IMMOBILIZED
ON A CELL
CULTURE PLATE
CHEMICAL LIBRARY
RECOMBINANT T CELLS
EXPRESSING TCRs
FROM MS PATIENT
MIX AND INCUBATE
MEASURE EFFECTS ON
T CELL ACTIVATION

FIG. 6B

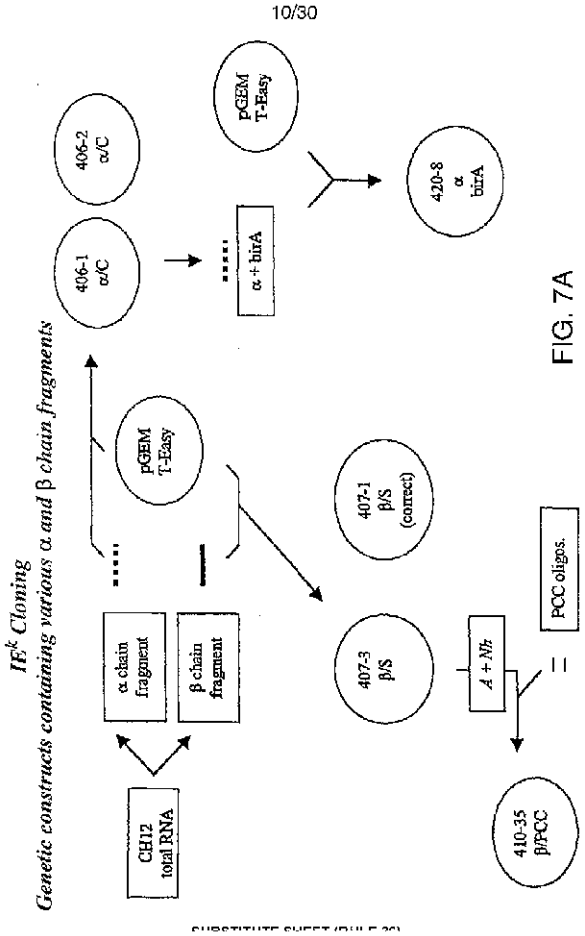

IE^k Cloning
Genetic constructs containing various α and β chain fragments
406-2 α/C
406-1 α/C
pGEM T-Easy
α + birA
420-8 α birA
pGEM T-Easy
α chain fragment
β chain fragment
407-1 β/S (correct)
407-3 β/S
A + Nh
PCC oligos.
=
CH12 total RNA
410-35 β/PCC

FIG. 7A

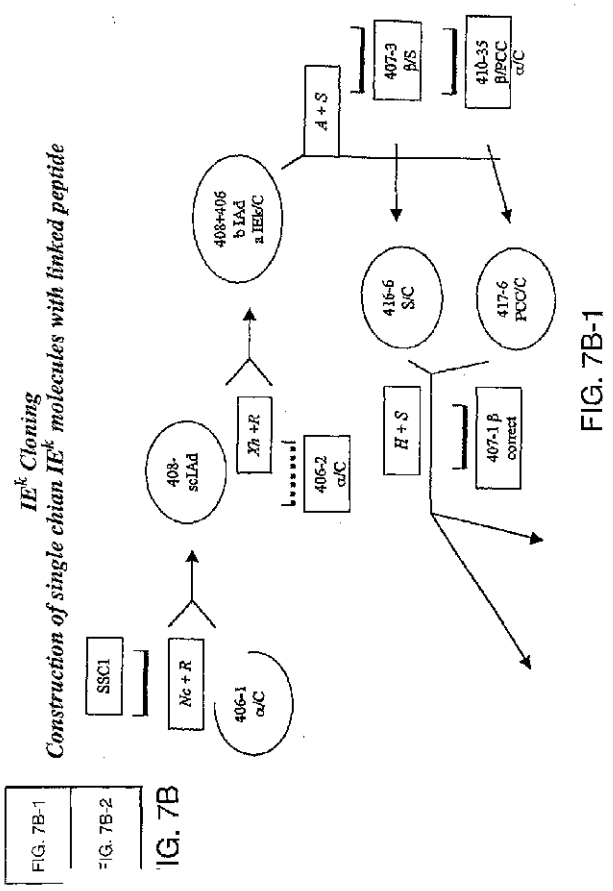

IE^k Cloning
Construction of single chian IE^k molecules with linked peptide
SSC1
Ne + R
406-1 α/C
408-scIAd
Xh +R
406-2 α/C
408+406 b IAd a IEb/C
A + S
407-3 β/S
410-35 β/PCC α/C
416-6 S/C
417-6 PCC/C
H + S
407-1 β correct
FIG. 7B-1
FIG. 7B-2
FIG. 7B

FIG. 7B-1

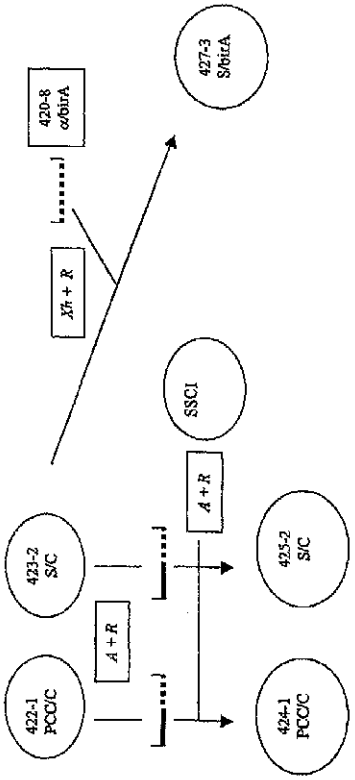
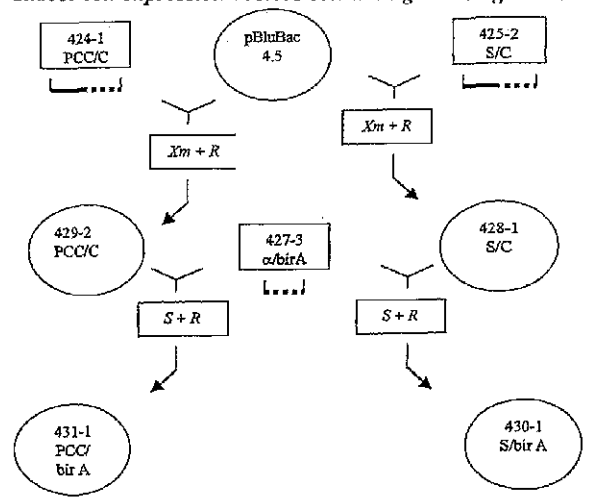

427-3
S/btrA
420-8
α/btrA
Δh + R
SSC1
A + R
423-2
S/C
A + R
425-2
S/C
422-1
PCC/C
424-1
PCC/C

FIG. 7B-2

IE^k Cloning

Insect cell expression vectors containing IE^k single chain



Key:
Plasmid designations: numbers, i.e. 410-35
Construct designations:
PCC = β chain with linked PCC peptide
S = β chain "blank" contains serine in place of peptide
C = α chain with carboxyl-terminal cysteine
birA = α chain with carboxyl-terminal birA recognition sequence
Restriction enzymes (*in italics*):
A = AflII
H = HindIII
Nc = NcoI
Nt = NheI
R = EcoRI
S = SpeI
Xh = XhoI
Xm = XmaI
IEk alpha chain: ▪▪▪
IEk beta chain: ▬

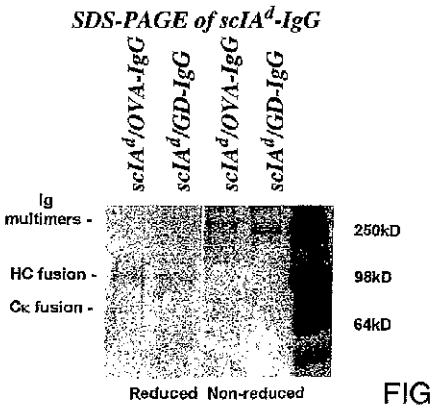

SDS-PAGE of scIA^d-IgG
scIA^d/OVA-IgG
scIA^d/GD-IgG
scIA^d/OVA-IgG
scIA^d/GD-IgG
Ig multimers -
HC fusion -
Ck fusion -
250kD
98kD
64kD
Reduced Non-reduced

FIG. 8

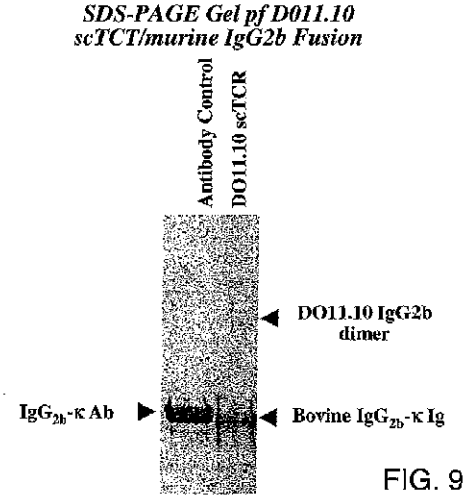

SDS-PAGE Gel pf D011.10
scTCT/murine IgG2b Fusion
Antibody Control
DO11.10 scTCR
DO11.10 IgG2b dimer
IgG$_{2b}$-κ Ab
Bovine IgG$_{2b}$-κ Ig

FIG. 9

TCR CONSTRUCTS FOR D011.10 scTCR/MURINE CD3ζ
AND D011.10 scTCR/HUMAN CD3ζ FUSIONS

FIG. 10

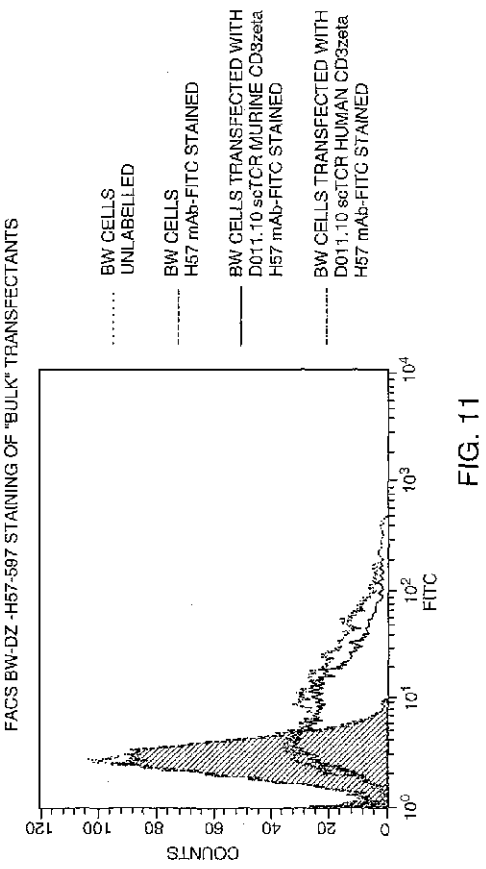

FACS BW-DZ -H57-597 STAINING OF "BULK" TRANSFECTANTS
BW CELLS UNLABELLED
BW CELLS H57 mAb-FITC STAINED
BW CELLS TRANSFECTED WITH D011.10 scTCR MURINE CD3zeta H57 mAb-FITC STAINED
BW CELLS TRANSFECTED WITH D011.10 scTCR HUMAN CD3zeta H57 mAb-FITC STAINED
COUNTS
0
20
40
60
80
100
120
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FITC

FIG. 11

CHARACTERIZATION OF BWDZ:CD4 + TRANFECTANTS

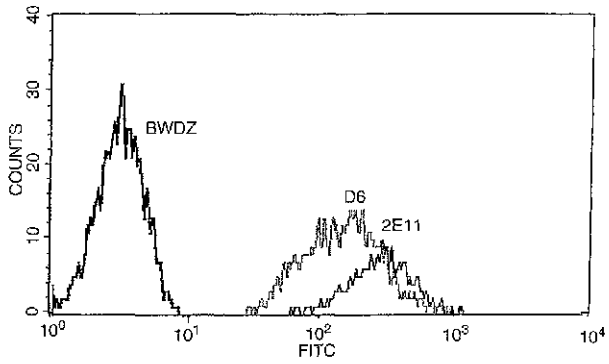
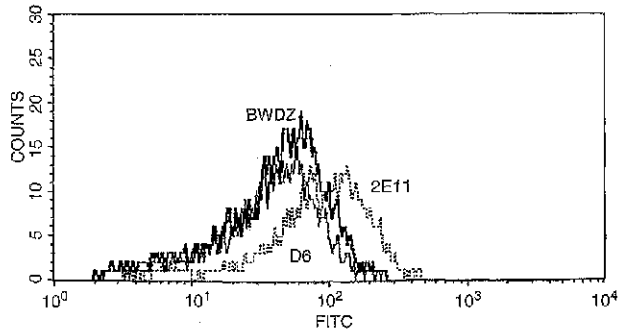


FIG. 12A

DETECTION OF SURFACE CD4 EXPRESSION BY FACS



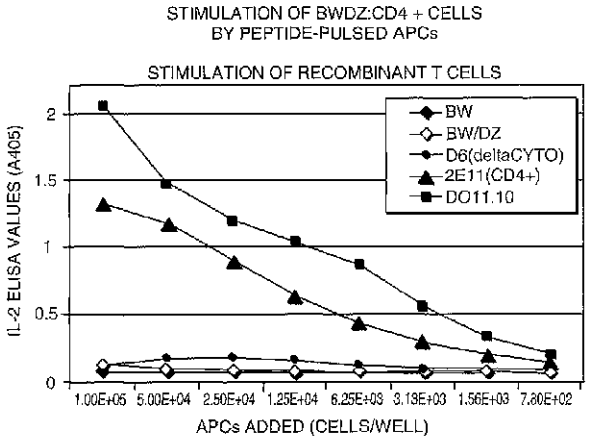

STIMULATION OF BWDZ:CD4 + CELLS
BY PEPTIDE-PULSED APCs
STIMULATION OF RECOMBINANT T CELLS
IL-2 ELISA VALUES (A405)
2
1.5
1
0.5
0
BW
BW/DZ
D6(deltaCYTO)
2E11(CD4+)
DO11.10
1.00E+05
5.00E+04
2.50E+04
1.25E+04
6.25E+03
3.13E+03
1.56E+03
7.80E+02
APCs ADDED (CELLS/WELL)

FIG. 13

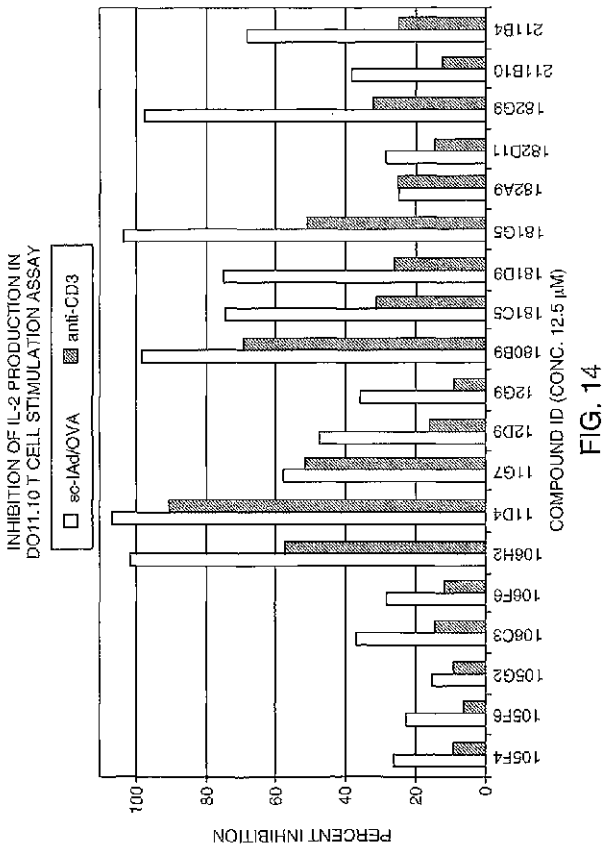

INHIBITION OF IL-2 PRODUCTION IN DO11.10 T CELL STIMULATION ASSAY
ac-IAd/OVA
anti-CD3
PERCENT INHIBITION
0
20
40
60
80
100
COMPOUND ID (CONC. 12.5 µM)
211B4
211B10
182G9
182D11
182A9
181G5
181D9
181C5
180B9
12G9
12D9
11G7
11D4
106H2
106F6
106C3
105G2
105F6
105F4

FIG. 14

Titration Of Inhibitory Compounds

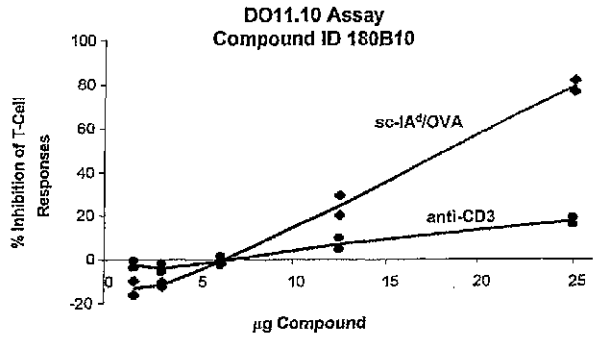


FIG. 15A

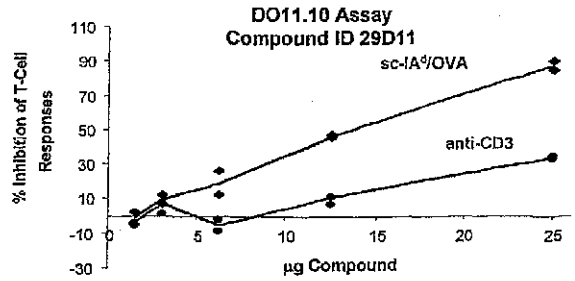


FIG. 15B

Inhibitory Compounds

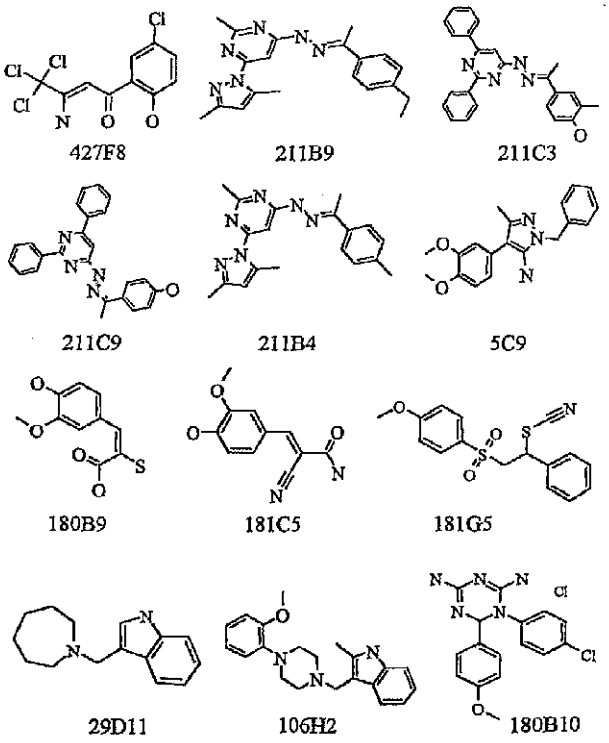


FIG. 16

STIMULATION OF DO11.10 scTCR 2B4 TRANSFECTANTS
BY PEPTIDE-PULSED APCs - OVA AND PCC

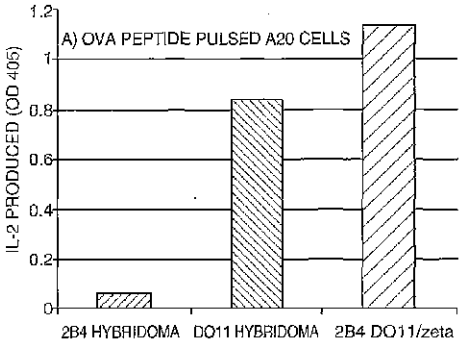


FIG. 17A

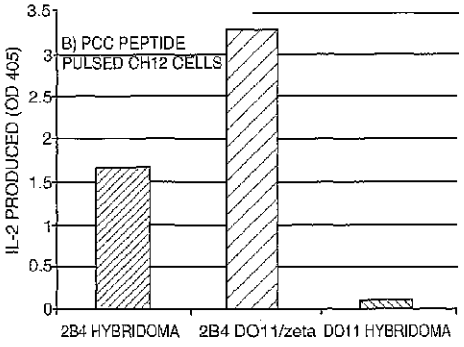


FIG. 17B

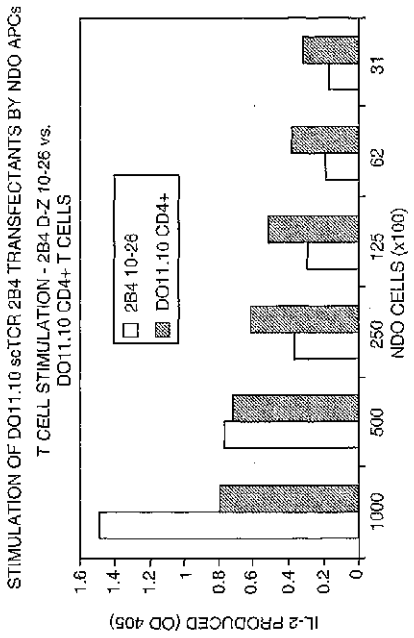

STIMULATION OF DO11.10 scTCR 2B4 TRANSFECTANTS BY NDO APCs
T CELL STIMULATION - 2B4 D-Z 10-26 vs.
DO11.10 CD4+ T CELLS
2B4 10-26
DO11.10 CD4+
IL-2 PRODUCED (OD 405)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1000
500
250
125
62
31
NDO CELLS (x100)

FIG. 18

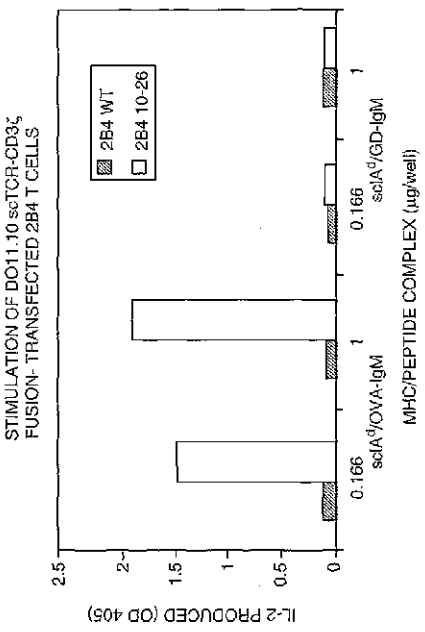

STIMULATION OF DO11.10 scTCR-CD3ζ FUSION- TRANSFECTED 2B4 T CELLS
2B4 WT
2B4 10-26
IL-2 PRODUCED (OD 405)
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.166
1
scIA^d/OVA-IgM
0.166
1
scIA^d/GD-IgM
MHC/PEPTIDE COMPLEX (μg/well)

FIG. 19

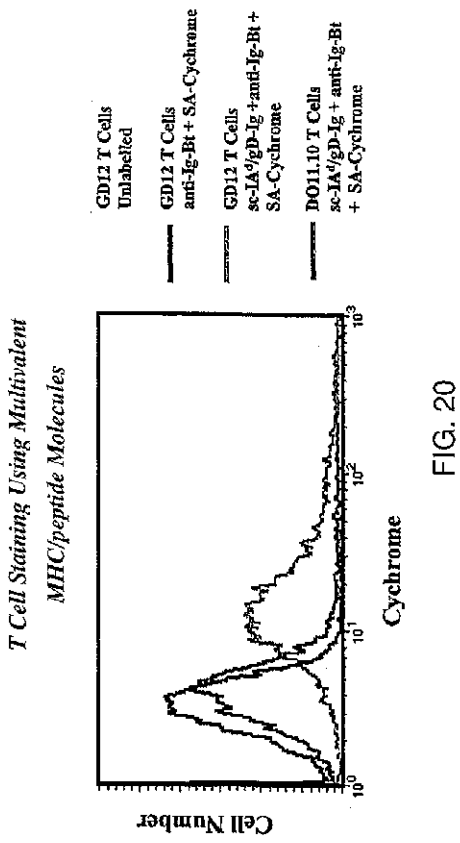

T Cell Staining Using Multivalent
MHC/peptide Molecules
GD12 T Cells
Unlabelled
GD12 T Cells
anti-Ig-Bt + SA-Cychrome
GD12 T Cells
sc-IA^d/gD-Ig +anti-Ig-Bt +
SA-Cychrome
DO11.10 T Cells
sc-IA^d/gD-Ig + anti-Ig-Bt
+ SA-Cychrome
Cell Number
Cychrome
10^0
10^1
10^2
10^3

FIG. 20

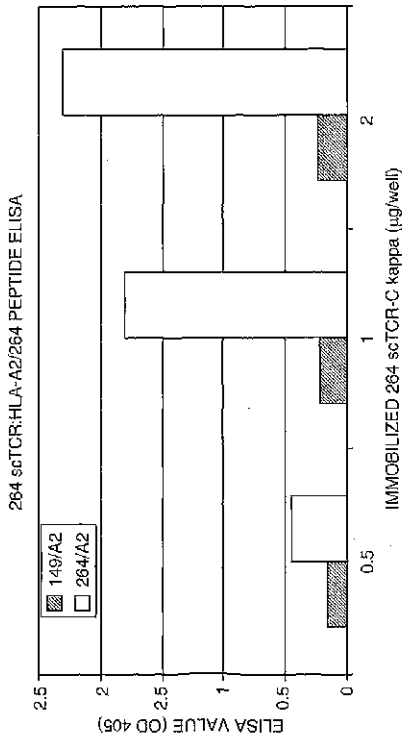

264 scTCR:HLA-A2/264 PEPTIDE ELISA
149/A2
264/A2
ELISA VALUE (OD 405)
2.5
2
2.5
1
0.5
0
IMMOBILIZED 264 scTCR-C kappa (µg/well)
0.5
1
2

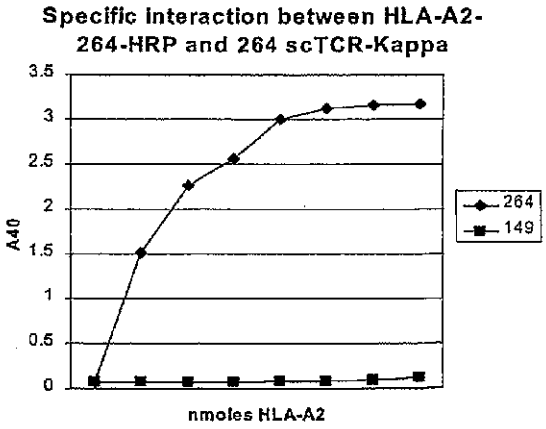
FIG. 21

PROTEIN-BASED ELISA: SPECIFICITY OF RESPONSE

264 scTCR BOUND PLATE:
HLA-A2/264-HRP VERSUS
HLA-A2/149-HRP PROBE

nM HLA-A2	264	149
0	0.07	0.07
1	1.51	0.07
2.15	2.26	0.07
4.3	2.56	0.07
8.5	3	0.08
16.5	3.12	0.08
33	3.16	0.09
67	3.17	0.12

FIG. 22A



PROTEIN ELISA: CONCENTRATION DEPENDENCE

264 scTCR-C kappa AND 264HLA-A2-HRP TITRATION

		nmoles TCR									
		66.6	33.3	16.66	8.4	4.2	2.1	1.05			
	66.6	2.08	2.21	1.38	0.74	0.44	0.27	0.17			
	33.3	2.03	1.84	0.97	0.69	0.42	0.25	0.16			
nmoles	16.7	2.85	2.27	1.36	0.79	0.43	0.24	0.16			
tetramers	8.4	2.78	2.04	1.23	0.71	0.34	0.23	0.15			
	4.2	2.27	1.34	0.81	0.49	0.26	0.16	0.11			
	2.1	1.24	0.56	0.357	0.2	0.14	0.1	0.07			
	1.05	0.68	0.1	0.12	0.06	0.07	0.06	0.06			

FIG. 23A

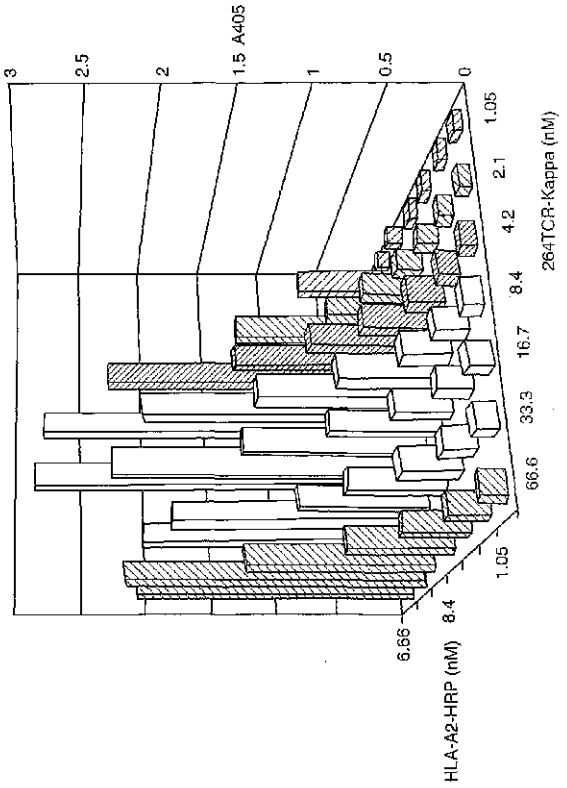

3
2.5
2
1.5 A405
1
0.5
0
1.05
2.1
4.2
8.4
16.7
33.3
66.6
264TCR-Kappa (nM)
1.05
8.4
66.6
HLA-A2-HRP (nM)

FIG. 23B

PROTEIN ELISA: COMPARISON OF DIFFERENT TCR REAGENTS

264 scTCR-C kappa VERSUS 264 scTCR-IgG1

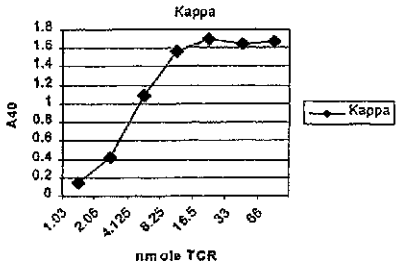


FIG. 24A

	Kappa
1.03	0.15
2.06	0.42
4.125	1.09
8.25	1.57
16.5	1.69
33	1.64
66	1.67

FIG. 24C

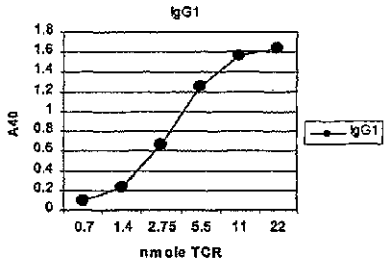


FIG. 24B

	IgG1
0.7	0.1
1.4	0.23
2.75	0.66
5.5	1.26
11	1.57
22	1.64

FIG. 24D

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/090747 A3

(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/569, 33/68

(21) International Application Number: PCT/US01/15699

(22) International Filing Date: 16 May 2001 (16.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/206,920 25 May 2000 (25.05.2000) US

(71) Applicant: SUNOL MOLECULAR CORPORATION [US/US]; 2810 North Commerce Parkway, Miramar, FL 33025 (US).

(72) Inventors: RHODE, Peter; 14857 SW 42nd Lane, Miami, FL 33185 (US); WITTMAN, Vaughan; 2067 Westbrook, Weston, FL 33322 (US); WEIDANZ, Jon, A.; 828 SW 147st Avenue, Miami, FL 33184 (US); BURKHARDT, Martin; 131 NE 45th Street, Miami, FL 33137 (US); CARD, Kimberlyn, E.; 1120 SW 87th Avenue, Pembroke Pines, FL 33025 (US); TAL, Rony; 5021 N.W. 102nd Drive, Coral Springs, FL 33076 (US); ACEVEDO, Jorge; 14929 SW 104th Street, 21-24, Miami, FL 33196 (US); WONG, Hing, C.; 2960 Wentworth, Weston, FL 33332 (US).

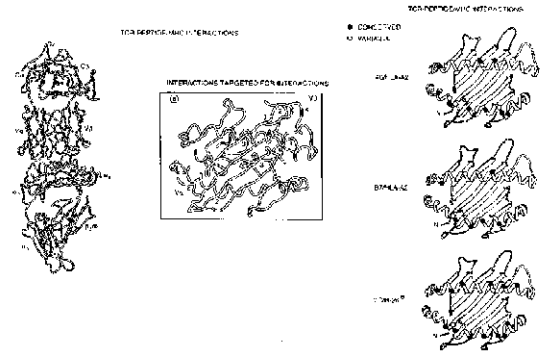
(74) Agents: BUCHANAN, Robert, L. et al.; Dike, Bronstein, Roberts & Cushman, Intellectual Property Patent Group, Edwards & Angell, LLP, P.O. Box 9169, Boston, MA 02209 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,

[Continued on next page]

(54) Title: MODULATION OF T-CELL RECEPTOR INTERACTIONS



(57) Abstract: Disclosed are methods for identifying compounds that modulate an immune complex that includes a T cell receptor (TCR) and a major histocompatibility complex (MHC) antigen. The invention has many useful applications including providing high throughput screening assays for detecting compositions that can modulate an immune response.

WO 01/090747 A3

WO 01/090747 A3

IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
11 July 2002

Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/15699

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/569 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WILLIAMS, W.V. ET AL.: "Modulation of T Cell responses with MHC-derived peptides" IMMUNOL RES, no. 11, 1992, page 11-23 XP001069829 the whole document ---	1-155
Y	NICOLLE M.W. ET AL.: "Specific tolerance to an acetylcholine receptor epitope induced in vitro in myasthenia gravis CD4+ lymphocytes by soluble major histocompatibility complex class I-peptide complexes" J. CLIN. INVEST., vol. 93, April 1994 (1994-04), pages 1361-1369, XP001068785 cited in the application the whole document --- -/--	1-155

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 April 2002	22/05/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Moreno de Vega, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/15699

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 36881 A (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED) 21 November 1996 (1996-11-21)	1-53,60, 61, 69-73, 76, 78-89, 96,101, 105, 120-139, 153-155
Y	the whole document	1-155
Y	RHODE P R ET AL: "SINGLE-CHAIN MHC CLASS II MOLECULES INDUCE T CELL ACTIVATION AND APOPTOSIS" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 157, no. 11, 1996, pages 4885-4891, XP000652225 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-155
X	US 5 869 270 A (SUNOL MOLECULAR CORPORATION) 9 February 1999 (1999-02-09) column 10 -column 68; claims 1-38	1-155
A	WILLCOX B E ET AL: "TCR BINDING TO PEPTIDE-MHC STABILIZES A FLEXIBLE RECOGNITION INTERFACE" IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 10, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 357-365, XP000979767 ISSN: 1074-7613 abstract	1-155
Y	EP 0 997 477 A (SUNOL MOLECULAR CORPORATION) 3 May 2000 (2000-05-03) the whole document	1-155

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

International Application No. PCT/US 01 /15699

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 140-152 relate to an extremely large number of possible compounds defined by a method of screening, such that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. The search of these claims has been focused on the method of screening itself.

Claim 153 tries to define a kit in terms of a method without specifying its components. This claim is so unclear within the meaning of Article 6 PCT that a meaningful search of the claim is impossible. The search has been focused on the method of screening itself.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/15699

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9636881	A	21-11-1996	AU 5769096	A	29-11-1996
			WO 9636881	A2	21-11-1996
US 5869270	A	09-02-1999	AU 729672	B2	08-02-2001
			AU 2253897	A	22-08-1997
			CA 2244755	A1	07-08-1997
			EP 0877760	A1	18-11-1998
			JP 2000515363	T	21-11-2000
			US 6309645	B1	30-10-2001
			WO 9728191	A1	07-08-1997
EP 0997477	A	03-05-2000	EP 0997477	A2	03-05-2000
			AU 696177	B2	03-09-1998
			AU 3403995	A	04-03-1996
			CA 2196085	A1	15-02-1996
			DE 69519101	D1	16-11-2000
			DE 69519101	T2	17-05-2001
			DK 776339	T3	05-02-2001
			EP 0776339	A1	04-06-1997
			ES 2152424	T3	01-02-2001
			JP 10503379	T	31-03-1998
			WO 9604314	A1	15-02-1996

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/543	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｐ	
Ｇ０１Ｎ 33/553	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｕ	
	Ｇ０１Ｎ 33/543	５０１Ａ	
	Ｇ０１Ｎ 33/553		

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

(72)発明者 ジョン エイ ウェイダンツ
アメリカ合衆国 フロリダ州 ３３１８４ マイアミ エス・ダブリュー１４１・アベニュー ８２０
(72)発明者 マーティン バークハード
アメリカ合衆国 フロリダ州 ３３１３７ マイアミ エヌ・イー４５・ストリート １２１
(72)発明者 キンバーリン エフ カード
アメリカ合衆国 フロリダ州 ３３０２５ ペンブローク パインズ エス・ダブリュー８７・アベニュー １１２０
(72)発明者 ロニー タル
アメリカ合衆国 フロリダ州 ３３０７６ コーラル スプリングス エヌ・ダブリュー１０２・ドライブ ５０２４
(72)発明者 ジョージ アセベド
アメリカ合衆国 フロリダ州 ３３１９６ マイアミ エス・ダブリュー１０４・ストリート １４９２９ ２１－２４
(72)発明者 ヒン シー ウォン
アメリカ合衆国 フロリダ州 ３３３３２ ウェストン ウエントワース ２９６６

Ｆターム(参考) 2G045 AA29 AA40 BB20 CA18 CB17 DA36 FA36 FB03 FB05 FB07
FB11 FB12 FB13 FB15
4C084 AA17 NA14 ZB082 ZB092

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004501364A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2001586462	申请日	2001-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	苏诺尔分子公司		
申请(专利权)人(译)	Sunoru分子公司		
[标]发明人	ピーターロード ボーガンウィットマン ジョンエイウェイダンツ マーティンバークハード キンバーリンエフカード ロニータル ジョージアセベド ヒンシーウォン		
发明人	ピーター ロード ボーガン ウィットマン ジョン エイ ウェイダンツ マーティン バークハード キンバーリン エフ カード ロニー タル ジョージ アセベド ヒン シー ウォン		
IPC分类号	A61K45/00 A61P37/04 A61P37/06 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553		
CPC分类号	A61P37/04 A61P37/06 G01N33/505 G01N2333/70539		
FI分类号	G01N33/50.Z G01N33/50.K A61K45/00 A61P37/04 A61P37/06 G01N33/15.Z G01N33/53.P G01N33/53.U G01N33/543.501.A G01N33/553		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CA18 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB11 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB092		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	60/206920 2000-05-25 US		
其他公开文献	JP2004501364A		

摘要(译)

公开了鉴定可调节包含T细胞受体（TCR）和主要组织相容性复合物（MHC）抗原的免疫复合物的化合物的方法。 本发明具有许多有用的应用，包括提供用于检测可以调节免疫应答的组合物的高通量筛选测定。