(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2005-533486
(P2005-533486A)
(43)公表日　平成17年11月10日(2005.11.10)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A01K 67/027	A01K	67/027		4B064
A61K 39/395	A61K	39/395	Y	4B065
A61K 49/00	A61K	49/00	A	4C085
A61K 51/00	A61K	49/00	C	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 151 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-569659 (P2003-569659)
(86)(22)出願日　平成15年2月20日 (2003.2.20)
(85)翻訳文提出日　平成16年10月20日 (2004.10.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/005128
(87)国際公開番号　WO2003/070752
(87)国際公開日　平成15年8月28日 (2003.8.28)
(31)優先権主張番号　60/358,994
(32)優先日　平成14年2月20日 (2002.2.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　502352519
ダイアックス、コープ
ＤＹＡＸ　ＣＯＲＰ．
アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ケンブリッジ、テクノロジー、スクエア、３００
(71)出願人　504317868
テクニオン　リサーチ　アンド　ディヴェロップメント　ファンデーション　リミテッド
イスラエル　３２０００　ハイファ，パーク　グートヴィルト，テクニオン　シティ，セナテ　ハウス
(74)代理人　100064447
弁理士　岡部　正夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＭＨＣ－ペプチド複合体結合リガンド

(57)【要約】
免疫グロブリン重鎖可変（ＶＨ）領域および免疫グロブリン軽鎖可変（ＶＬ）領域を含むタンパク質リガンドであって、タンパク質は、ＭＨＣおよびペプチドを含む複合体と結合し、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合せず、ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片であるタンパク質リガンドが開示される。そのようなリガンドを使用する方法、同定する方法も開示される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
免疫グロブリン重鎖可変（ＶＨ）ドメインおよび免疫グロブリン軽鎖可変（ＶＬ）ドメインを含むタンパク質であって、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片であるペプチドとＭＨＣ（主要組織適合性複合体）とからなる複合体と結合し、そのペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にそのペプチドと結合しないことを特徴とする、タンパク質。
【請求項２】
タンパク質が、ペプチドの一部分およびＭＨＣの一部分を含む複合体上のエピトープと結合し、ペプチドが、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片である請求項１に記載のタンパク質。
【請求項３】
ペプチド断片が、ｈＴＥＲＴ由来ペプチドＴ５４０（ＩＬＡＫＦＬＨＷＬ、配列番号５）またはＴ８６５（ＲＬＶＤＤＦＬＬＶ、配列番号６）を含んでなる、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項４】
ペプチド断片が、ｇｐ１００由来ペプチドＧ９－２０９（ＩＭＤＱＶＰＦＳＶ、配列番号１）、Ｇ９－２８０（ＹＬＥＰＧＰＶＴＶ、配列番号２）、またはＧ９－１５４（ＫＴＷＧＱＹＷＱＶ、配列番号３）を含んでなる、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項５】
ペプチド断片が、ＭＵＣ１由来Ｄ６ペプチド（ＬＬＬＴＶＬＴＶＶ、配列番号４）を含んでなる、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項６】
ペプチド断片が、ＴＡＸ由来ペプチドＬＬＦＧＹＰＶＹＶ（配列番号１２１）を含んでなる、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項７】
タンパク質が、細胞に付着している請求項１に記載のタンパク質。
【請求項８】
エフェクタードメインをさらに含んでなる、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項９】
エフェクタードメインが、Ｆｃドメインを含んでなる、請求項８に記載のタンパク質。
【請求項１０】
エフェクタードメインが、標識、または細胞毒素あるいはその成分を含んでなる、請求項８に記載のタンパク質。
【請求項１１】
ＶＨドメインとＶＬドメインが、同じポリペプチド鎖の成分である請求項１に記載のタンパク質。
【請求項１２】
ＶＨドメインとＶＬドメインが、異なるポリペプチド鎖の成分である請求項１に記載のタンパク質。
【請求項１３】
複合体に対するタンパク質の結合の結合定数が、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、$10^{8}M^{-1}$、$10^{9}M^{-1}$、または$10^{10}M^{-1}$である請求項１に記載のタンパク質。
【請求項１４】
可変ドメインの１つが、４Ａ９、４Ｇ９、４Ｃ２、４Ｂ４、３Ｈ２、３Ｇ３、３Ａ１２、３Ｆ５、または３Ｂ１のＣＤＲ（相補性決定領域）と少なくとも８０％同一であるＣＤＲを含んでなる、請求項２に記載のタンパク質。
【請求項１５】
可変領域の１つが、１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４のＣＤＲと

少なくとも８０％同一であるＣＤＲを含んでなる、請求項２に記載のタンパク質。
【請求項１６】
可変領域の１つが、Ｍ３Ａ１、またはＭ３Ｂ８のＣＤＲと少なくとも８０％同一であるＣＤＲを含んでなる、請求項２に記載のタンパク質。
【請求項１７】
可変領域の１つが、Ｔ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２のＣＤＲと少なくとも８０％同一であるＣＤＲを含んでなる、請求項２に記載のタンパク質。
【請求項１８】
タンパク質が、４Ａ９、４Ｇ９、４Ｃ２、４Ｂ４、３Ｈ２、３Ｇ３、３Ａ１２、３Ｆ５、または３Ｂ１が結合するエピトープと重複するか、隣接するか、または実質的に同一であるエピトープと結合する請求項２に記載のタンパク質。
【請求項１９】
タンパク質が、１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４が結合するエピトープと重複するか、隣接するか、または実質的に同一であるエピトープと結合する請求項２に記載のタンパク質。
【請求項２０】
タンパク質が、Ｍ３Ａ１、またはＭ３Ｂ８が結合するエピトープと重複するか、隣接するか、または実質的に同一であるエピトープと結合する請求項２に記載のタンパク質。
【請求項２１】
タンパク質が、Ｔ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２が結合するエピトープと重複するか、隣接するか、または実質的に同一であるエピトープと結合する請求項２に記載のタンパク質。
【請求項２２】
請求項１に記載のタンパク質、および薬剤担体を含む薬剤組成物。
【請求項２３】
タンパク質が、さらに細胞毒素を含んでなる、請求項２２に記載の組成物。
【請求項２４】
タンパク質が、さらに標識を含んでなる、請求項２２に記載の組成物。
【請求項２５】
ＭＨＣおよびペプチドを含む複合体と結合し、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合しない免疫グロブリンを発現するための１つまたは複数の核酸を含む細胞傷害性Ｔ細胞。
【請求項２６】
前記免疫グロブリンが、細胞表面に発現する請求項２５に記載の細胞傷害性Ｔ細胞。
【請求項２７】
免疫グロブリン可変ドメインをコードする第１のセグメントを含む単離核酸であって、前記免疫グロブリン可変ドメインおよび第２の免疫グロブリン可変ドメインを含むタンパク質は、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合し、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合せず、前記ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片である核酸。
【請求項２８】
第２の免疫グロブリン可変ドメインをコードする第２のセグメントをさらに含んでなる、請求項２７に記載の核酸。
【請求項２９】
前記免疫グロブリン可変ドメインが、４Ａ９、４Ｇ９、４Ｃ２、４Ｂ４、３Ｈ２、３Ｇ３、３Ａ１２、３Ｆ５、または３Ｂ１の可変ドメインのＣＤＲと比べて、３つ以下の置換、挿入、または欠失を有するＣＤＲを含んでなる、請求項２７に記載の核酸。
【請求項３０】
前記免疫グロブリン可変ドメインが、１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１

Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４の可変ドメインのＣＤＲと比べて、３つ以下の置換、挿入、または欠失を有するＣＤＲを含んでなる、請求項２７に記載の核酸。

【請求項３１】

前記免疫グロブリン可変ドメインが、Ｍ３Ａ１、またはＭ３Ｂ８の可変ドメインのＣＤＲと比べて、３つ以下の置換、挿入、または欠失を有するＣＤＲを含んでなる、請求項２７に記載の核酸。

【請求項３２】

前記免疫グロブリン可変ドメインが、Ｔ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２の可変ドメインのＣＤＲと比べて、３つ以下の置換、挿入、または欠失を有するＣＤＲを含んでなる、請求項２７に記載の核酸。

【請求項３３】

免疫グロブリン重鎖可変ドメインおよび免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むタンパク質をコードする異種核酸配列を含む宿主細胞であって、タンパク質は、前記ペプチドが複合体に存在する場合、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合し、前記ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片である宿主細胞。

【請求項３４】

そのゲノムが、免疫グロブリン重鎖可変ドメインおよび免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むタンパク質をコードする異種核酸配列を含むトランスジェニック動物であって、前記タンパク質は、前記ペプチドが複合体に存在する場合、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合し、前記ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片である動物。

【請求項３５】

各タンパク質が、予め選択されたＭＨＣ対立遺伝子を有する対象由来の免疫グロブリン可変ドメインを含むタンパク質ライブラリーを用意する工程、

予め選択された対立遺伝子と同じ対立遺伝子を含むことが知られているＭＨＣ複合体を任意選択で選択する工程、

ライブラリーを、複合体のＭＨＣ成分が所与の予め選択されたＭＨＣ対立遺伝子と同じ対立遺伝子であるＭＨＣ－ペプチド複合体に接触させる工程、および

ＭＨＣ－ペプチド複合体と特異的に結合するライブラリーのメンバーを単離する工程を含む方法。

【請求項３６】

単離されたメンバーが、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、$10^{8}M^{-1}$、$10^{9}M^{-1}$、または$10^{10}M^{-1}$の結合定数で複合体と結合する請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

タンパク質ライブラリーのメンバーを単鎖ＭＨＣ－ペプチド複合体に接触させる工程、および

単鎖ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合し、ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合しない１つまたは複数のメンバーを同定する工程を含む方法。

【請求項３８】

タンパク質ライブラリーをＭＨＣ－ペプチド複合体の第１の混合物に接触させる工程、

ライブラリーの複数のメンバーを単離する工程：ここで複数のメンバーの各単離メンバーが、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合する抗原結合ドメインを提示し、抗原結合ドメインによって認識されるエピトープが、ＭＨＣの一部分およびペプチドの一部分を含む、および

ＭＨＣ－ペプチド複合体の第２の混合物に実質的に結合しない複数のメンバーを同定する工程を含む方法。

【請求項３９】

ＭＨＣが、クラスＩ　ＭＨＣである請求項３６、３７、または３８に記載の方法。

【請求項４０】
ＭＨＣが、クラスＩＩ　ＭＨＣである請求項３６、３７、または３８に記載の方法。
【請求項４１】
ＭＨＣ対立遺伝子が、ヒトＭＨＣ対立遺伝子である請求項３９に記載の方法。
【請求項４２】
対立遺伝子が、ＨＬＡ－Ａ＊０２０１である請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
ペプチドが、ＭＵＣ１、ｈＴＥＲＴ、またはｇｐ１００のペプチド断片である請求項３６、３７、または３８に記載の方法。
【請求項４４】
薬剤組成物として単離メンバーの抗原結合ドメインを製剤化する工程をさらに含んでなる、請求項３８に記載の方法。
【請求項４５】
組成物を対象に投与する工程をさらに含んでなる、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
重鎖可変領域をコードする第１の核酸セグメント、および軽鎖可変領域をコードする第２の核酸セグメントを提供する工程：ここで重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、標的ペプチドが存在する場合、ＭＨＣ－標的ペプチド複合体と結合する抗原結合タンパク質を形成する、
前記第１および第２核酸セグメントを細胞傷害性細胞に導入する工程、および
前記抗原結合タンパク質の発現およびアセンブリを可能にする条件下で、細胞傷害性細胞を維持する工程を含む方法。
【請求項４７】
請求項２７に記載の核酸が提供される請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
表面ＭＨＣ分子にペプチドを提示する標的細胞を除去または殺傷する方法であって、
標的細胞を請求項１に記載のタンパク質と接触させる工程：ここで前記タンパク質は、標的細胞の表面ＭＨＣ分子に提示されたペプチドを特異的に認識する、および
標的細胞を除去または殺傷する工程を含む方法。
【請求項４９】
前記タンパク質が、細胞傷害性薬剤をさらに含んでなる、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記タンパク質が、エフェクター細胞に付着している請求項４８に記載の方法。
【請求項５１】
対象において癌性疾患を治療または予防する方法であって、
前記疾患を治療または予防する有効量で、請求項２２に記載の薬剤組成物を対象に投与する工程を含む方法。
【請求項５２】
試料中のＭＨＣ－ペプチド複合体を検出する方法であって、
試料を請求項１に記載のタンパク質と接触させる工程、および
タンパク質と試料の結合を検出する工程：ここで結合の検出は試料中のＭＨＣ－ペプチド複合体の存在を示すものである、を含む方法。
【請求項５３】
試料が対象に含有されている請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
重鎖可変領域をコードする第１の核酸セグメント、および軽鎖可変領域をコードする第２の核酸セグメントを提供する工程：ここで重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、標的ペプチドが存在する場合、ＭＨＣ－標的ペプチド複合体と結合する抗原結合タンパク質を形成し、標的ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片である、

前記第１および第２核酸セグメントを宿主細胞に導入する工程、および
前記抗原結合タンパク質の発現およびアセンブリを可能にする条件下で、宿主細胞を維持する工程を含む方法。
【請求項５５】
宿主細胞が、細菌細胞である請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
宿主細胞が、哺乳動物細胞である請求項５４に記載の方法。
【請求項５７】
宿主細胞が、昆虫または酵母細胞である請求項５４に記載の方法。
【請求項５８】
細胞の溶解産物または膜由来の抗原結合タンパク質を精製する工程をさらに含んでなる、請求項５４に記載の方法。
【請求項５９】
宿主細胞から抗原結合タンパク質を採取する工程をさらに含んでなる、請求項５４に記載の方法。
【請求項６０】
採取した抗原結合タンパク質を、少なくとも９０％の純度に精製する工程をさらに含んでなる、請求項５９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
近年、腫瘍免疫学における大きな進展によって、腫瘍に対する免疫応答に関してより広い理解がもたらされた。例えばメラノーマに関して、ヒトメラノーマおよび他の腫瘍細胞は、癌患者由来の細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）によって認識される抗原を発現する（Boon and van der Bruggen（1996）J Exp Med 183, 725-9、Rosenberg（2001）Nature 411, 380-4、Renkvist and Parmiani（2001）Cancer Immunol Immunother 50, 3-15）。これらの腫瘍関連免疫応答に関連する分子認識事象のカスケードには、癌細胞におけるＭＨＣ（主要組織適合性複合体）クラスＩ分子と複合した特異的ペプチドの発現が含まれる。例えば、ヒトメラノーマは、クラスＩ　ＨＬＡ－Ａ２分子との複合体で免疫系に提示される腫瘍関連ペプチドを発現する（Anichini et al.（1993）J.Exp.Med.177, 989-98、Coulie et al.（1994）J.Exp.Med.180, 35-42）。ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏでＣＴＬの標的として癌関連抗原のいくつかのカテゴリーが報告されており、例えば種々の腫瘍および正常精巣で発現される癌精巣抗原、メラノサイト分化抗原、正常遺伝子の点突然変異、悪性組織で過剰発現される抗原、ならびにウイルス抗原などである（Renkvist and Parmiani（2001）Cancer Immunol Immunother 50, 3-15）。種々の腫瘍におけるこれらの抗原の存在を実証する有力な実験上の証拠があるが、それらは充分に強力な抗腫瘍免疫応答を誘発できないようである（Rivoltini et al.（1998）Crit Rev Immunol 18, 55-63）。
【０００２】
したがって、現代の癌免疫療法アプローチの多くは、それらの腫瘍抗原に対するＴ細胞反応性を誘導および増強するように設計されている。癌ペプチドに関する徹底的な研究は、抗原ペプチドまたはタンパク質を用いる癌患者の治療的ワクチン接種を含む多くの臨床試験を行っている（Rosenberg（2001）Nature 411, 380-4、Offringa and Melief（2000）Curr Opin Immunol 12, 576-82）。さらに、いくつかの研究は、患者の免疫系がその腫瘍に対する有効な免疫応答を誘出できないのは、多くの場合、不良な抗原提示によるものであることを実証した（Restifo et al.（1993）J.Exp.Med.177, 265-72、Seliger and Ferrone（2000）Immunol. Today 21, 455-64）。それにもかかわらず、これらの研究は、腫瘍細胞、腫瘍抽出物、ＲＮＡ負荷樹状細胞、または腫瘍細胞－樹状細胞ハイブリッドワクチン接種によるワクチン接種プロトコルを用いる新しい免疫療法ストラテジーの開発を促した（Esche（1999）Curr Opin Mol Ther 1, 72-81、Kugler et al.（2000）Nat. Med.

6, 332-36）。腫瘍細胞の表面に提示される腫瘍特異的ＭＨＣ－ペプチド複合体は、抗体ベースの治療アプローチのユニークかつ特異的な標的を提供する可能性もある。そのようなストラテジーを開発するためには、ペプチド－ＭＨＣ複合体を特異的に認識する組換え抗体などの標的結合部分を単離しなければならない。

【０００３】

近年のＭＨＣ－ペプチド四量体の出現は、フローサイトメトリーによって四量体－Ｔ細胞結合をモニタすることにより、たとえ抗原特異的Ｔ細胞集団が希少であるときにも、健康時および疾患時の抗原特異的Ｔ細胞集団を研究するための新しいツールを提供した（Altman et al.（1996）Science 274, 94-96、Lee et al.（1999）Nat. Med. 5, 677-85、Ogg et al.（1998）Science 279, 2103-06）。しかしながら、今日までのところ、抗原（ＭＨＣ－ペプチド）提示を検出、視覚化、計数、研究するために利用できるツールは数少ない。実際、いくつかの研究は、患者の免疫系がその腫瘍に対する有効な免疫応答を誘出できないのは、多くの場合、不良な抗原提示によるものであることを実証した（Restifo et al.（1993）J.Exp.Med.177, 265-72、Seliger and Ferrone（2000）Immunol. Today 21, 455-64）。Ｔ細胞受容体様特異性を有する抗体は、例えば細胞表面の特異的ＭＨＣ－ペプチド複合体の直接視覚化によって、そのような腫瘍または抗原提示細胞の抗原提示能を測定することを可能にした。この目的のために、組換え可溶性Ｔ細胞受容体を用いる試みは、それらの標的に対する親和性が本来低いこと、ならびに組換え操作分子としての不安定性のために概して失敗している（Wulfing and Pluckthun（1994）J Mol Biol 242, 655-69）。したがって、ＴＣＲ様抗体は標的化剤としての使用に加えて、腫瘍細胞表面、腫瘍転移、リンパ器官、およびプロフェッショナル抗原提示細胞における、標的腫瘍抗原、すなわちＭＨＣ－ペプチド複合体の存在、発現パターン、および分布に関する正確な情報を得るための有用なツールとしての機能を果たす。

【０００４】

クラスＩ　ＭＨＣ－ペプチド複合体を特異的に認識する抗体は、抗原提示を研究するため、Ｔ細胞エピトープを提示する抗原提示細胞の場所を限定し、定量するため、またはマウスモデルの標的ツールとして、マウス系において用いられてきた（Andersen et al.（1996）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93, 1820-24、Porgador（1997）Immunity 6, 715-26、Day（1997）Proc Natl Acad Sci USA 94, 8064-9、Zhong（1997）Proc Natl Acad Sci USA 1997 94, 13856-61、Zhong（1997）J Exp Med. 186, 673-82、Dadaglio（1997）Immunity 6, 727-38、Murphy et al.（1989）Nature 338, 765-8、Aharoni（1991）Nature.351, 147-50、Krogsgaard et al.（2000）J Exp Med. 191, 1395-412、Reiter and Pastan（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94, 4631-36）。

【非特許文献１】Boon and van der Bruggen（1996）J Exp Med 183, 725-9
【非特許文献２】Rosenberg（2001）Nature 411, 380-4
【非特許文献３】Renkvist and Parmiani（2001）Cancer Immunol Immunother 50, 3-15
【非特許文献４】Anichini et al.（1993）J.Exp.Med.177, 989-98
【非特許文献５】Coulie et al.（1994）J.Exp.Med.180, 35-42
【非特許文献６】Rivoltini et al.（1998）Crit Rev Immunol 18, 55-63
【非特許文献７】Offringa and Melief（2000）Curr Opin Immunol 12, 576-82
【非特許文献８】Restifo et al.（1993）J.Exp.Med.177, 265-72
【非特許文献９】Seliger and Ferrone（2000）Immunol. Today 21, 455-64
【非特許文献１０】Esche（1999）Curr Opin Mol Ther 1, 72-81
【非特許文献１１】Kugler et al.（2000）Nat. Med.6, 332-36
【非特許文献１２】Altman et al.（1996）Science 274, 94-96
【非特許文献１３】Lee et al.（1999）Nat. Med. 5, 677-85
【非特許文献１４】Ogg et al.（1998）Science 279, 2103-06
【非特許文献１５】Wulfing and Pluckthun（1994）J Mol Biol 242, 655-69
【非特許文献１６】Andersen et al.（1996）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93, 1820-24

【非特許文献１７】Porgador (1997) Immunity 6, 715-26
【非特許文献１８】Day (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94, 8064-9
【非特許文献１９】Zhong (1997) Proc Natl Acad Sci USA 1997 94, 13856-61
【非特許文献２０】Zhong (1997) J Exp Med. 186, 673-82
【非特許文献２１】Dadaglio (1997) Immunity 6, 727-38
【非特許文献２２】Murphy et al. (1989) Nature 338, 765-8
【非特許文献２３】Aharoni (1991) Nature.351, 147-50
【非特許文献２４】Krogsgaard et al. (2000) J Exp Med. 191, 1395-412
【非特許文献２５】Reiter and Pastan (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94, 4631-36
【非特許文献２６】Schreuder et al、「The HLA Dictionary 2001:a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5,-DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens」, Human Immunology 2001, 62, 826-849
【非特許文献２７】Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication 91-3242号
【非特許文献２８】Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196, 901-917
【非特許文献２９】Ward et al. (1989) Nature 341, 544-0546
【非特許文献３０】Bird et al. (1988) Science 242, 423-426
【非特許文献３１】Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883
【非特許文献３２】Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 444-453
【非特許文献３３】E. Meyers and W. Miller ((1989)CABIOS 4, 11-17
【非特許文献３４】Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989) 6.3.1-6.3.6.
【非特許文献３５】Bowie et al. (1990) Science 247, 1306-1310
【非特許文献３６】Bjorkman et al. (1987) Nature 329: 506-512
【非特許文献３７】Fremont et al. (1998) Immunity 8: 305-17
【非特許文献３８】Renkvist et al. (2001) Cancer Immunol Immunother 50: 3-15
【非特許文献３９】Boon and van der Bruggen (1996) J Exp Med 183: 725-9
【非特許文献４０】Rosenberg (2001) Nature 411: 380-4
【非特許文献４１】Renkvist et al. (2001) Cancer Immunol Immunother 50: 3-15
【非特許文献４２】Denkberg and Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30: 3522-32
【特許文献１】米国特許第5,223,409号
【非特許文献４３】Smith (1985) Science 228: 1315-1317
【特許文献２】国際出願92/18619
【特許文献３】国際出願91/17271
【特許文献４】国際出願92/20791
【特許文献５】国際出願92/15679
【特許文献６】国際出願93/01288
【特許文献７】国際出願92/01047
【特許文献８】国際出願92/09690
【特許文献９】国際出願90/02809
【非特許文献４４】de Haard et al. (1999) J. Biol. Chem 274: 18218-30
【非特許文献４５】Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4: 1-20
【非特許文献４６】Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2: 371-8
【非特許文献４７】Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372
【非特許文献４８】Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85
【非特許文献４９】Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281
【非特許文献５０】Griffiths et al. (1993) EMBO J12: 725- 734
【非特許文献５１】Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226: 889-896

【非特許文献５２】Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628
【非特許文献５３】Gram et al. (1992) PNAS 89: 3576-3580
【非特許文献５４】Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377
【非特許文献５５】Rebar et al. (1996) Methods Enzymol. 267: 129-49
【非特許文献５６】Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137
【非特許文献５７】Barbas et al. (1991) PNAS 88: 7978-7982
【非特許文献５８】Santini (1998) J. Mol. Biol. 282: 125-135
【非特許文献５９】Rosenberg et al. (1996) Innovations 6: 1-6
【非特許文献６０】Houshm et al. (1999) Anal Biochem 268: 363-370
【特許文献１０】国際出願00/71694
【特許文献１１】米国特許第5,658,727号
【非特許文献６１】Lu et al. (1995) Biotechnology 13: 366
【非特許文献６２】Boder and Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15: 553-557
【特許文献１２】米国特許仮出願第60/326,320号
【非特許文献６３】Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9022
【非特許文献６４】Hanes et al. (2000) Nat Biotechnol. 18: 1287-92
【非特許文献６５】Hanes et al. (2000) Methods Enzymol. 328: 404-30
【非特許文献６６】Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231(1-2): 119-35
【非特許文献６７】Roberts and Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297-12302
【特許文献１３】米国特許第6,207,446号
【特許文献１４】米国特許第5,874,214号
【非特許文献６８】Leung et al. (1989) Technique 1: 11-15
【非特許文献６９】Stemmer (1994) Nature 389-391
【非特許文献７０】Coco et al. (2001) Nature Biotech. 19: 354
【非特許文献７１】Zooler et al. (1987) Nucl Acids Res 10: 6487-6504
【非特許文献７２】Reidhaar-Olson (1991) Methods Enzymol. 208：564-586
【非特許文献７３】Griffiths et al. (1994) EMBO J 13: 3245
【非特許文献７４】Wells et al. (1985) Gene 34: 315-323
【特許文献１５】米国特許第4,760,025号
【特許文献１６】米国特許第5,869,644号
【非特許文献７５】A. F. Williams and A. N. Barclay 1988 Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405
【特許文献１７】国際出願00/70023号
【非特許文献７６】Knappik et al. (2000) J. Mol. Biol. 296: 57-86
【非特許文献７７】Bergthorsdottir et al. (2001) J Immunol. 166: 2228
【非特許文献７８】Haard et al. (1999) J. Biol. Chem 274: 18218-30
【特許文献１８】米国特許第4,683,195号
【特許文献１９】米国特許第4,683,202号
【非特許文献７９】Saiki, et al. (1985) Science 230,1350-1354
【特許文献２０】米国特許第6,066,457号
【特許文献２１】米国特許第6,132,997号
【特許文献２２】米国特許第5,716,785号
【非特許文献８０】Sarkar et al., Science (1989) 244: 331-34
【非特許文献８１】Stofler et al., Science (1988) 239: 491
【特許文献２３】米国特許第5,130,238号
【特許文献２４】米国特許第5,409,818号
【特許文献２５】米国特許第5,554,517号
【特許文献２６】米国特許第5,854,033号
【特許文献２７】米国特許第6,143,495号

【特許文献２８】米国特許第5,455,166号
【特許文献２９】米国特許第5,624,825号
【特許文献３０】米国特許第5,631,169号
【特許文献３１】米国特許第4,868,103号
【特許文献３２】米国特許第5,641,640号
【非特許文献８２】Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag
【非特許文献８３】Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345
【非特許文献８４】Szabo et al. (1995) Curr. Opin.Struct. Biol. 5: 699-705
【非特許文献８５】Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Hrbor Laboratory, N.Y. (2001)
【非特許文献８６】Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Intercience, N.Y. (1989)
【非特許文献８７】Davis, L. et al. Basic Methods in Molecular Biology (1986)
【非特許文献８８】Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13 (1988)
【非特許文献８９】Grant et al. Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Ed. Wu & Grossman, Acad. Press, N.Y. 153: 516-544 (1987)
【非特許文献９０】Glover, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press、ワシントンDC, Ch. 3 (1986)
【非特許文献９１】Bitter, Heterologous Gene Expression in Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y. 152: 673-684 (1987)
【非特許文献９２】The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II (1982)
【非特許文献９３】Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, ニューヨーク (1989)
【非特許文献９４】Renkvist et al. (2001) Cancer Immunol Immunother 50: 3-15
【非特許文献９５】Scopes (1994) Protein Purification: Principles and Practice, ニューヨーク: Springer-Verlag
【非特許文献９６】Powers et al. (2001) J Immunol Methods. 251: 123-35
【非特許文献９７】Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220
【非特許文献９８】Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621
【特許文献３３】米国特許第4,399,216号
【特許文献３４】米国特許第4,634,665号
【特許文献３５】米国特許第5,179,017号
【非特許文献９９】Burton and Woof (1992) Adv. Immunol. 51: 1-84
【非特許文献１００】Jefferies et al. (1998) Immnnol. Rev. 163: 59-76
【特許文献３６】米国特許第5,849,992号
【非特許文献１０１】Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19
【非特許文献１０２】USP 24/NF 19
【非特許文献１０３】Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J.R. Robinson, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
【特許文献３７】米国特許第5,399,163号
【特許文献３８】米国特許第5,383,851号
【特許文献３９】米国特許第5,312,335号
【特許文献４０】米国特許第5,064,413号
【特許文献４１】米国特許第4,941,880号
【特許文献４２】米国特許第4,790,824号
【特許文献４３】米国特許第4,596,556号
【特許文献４４】米国特許第4,487,603号

【特許文献４５】米国特許第4,486,194号
【特許文献４６】米国特許第4,447,233号
【特許文献４７】米国特許第4,447,224号
【特許文献４８】米国特許第4,439,196号
【特許文献４９】米国特許第4,475,196号
【特許文献５０】米国特許第4,522,811号
【特許文献５１】米国特許第5,374,548号
【特許文献５２】米国特許第5,399,331号
【非特許文献１０４】V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685
【非特許文献１０５】Vaickus, L. (1991) Crit. Rev. in Oncol./Hemotol. 11: 267-97
【特許文献５３】国際出願84/03508号
【特許文献５４】国際出願85/03508号
【非特許文献１０６】Flechner (1973) European Journal of Cancer, 9: 741-745
【非特許文献１０７】Ghose et al. (1972) British Medical Journal, 3: 495-499
【非特許文献１０８】Szekerke et al. (1972) Neoplasma, 19: 211-215
【非特許文献１０９】Hurwitz, E. et al. (1975) Cancer Research, 35: 1175-1181
【非特許文献１１０】Aroon et al. (1982) Cancer Surveys, 1: 429-449
【特許文献５５】米国特許第4,414,148号
【非特許文献１１１】Osawa, T., et al. (1982) Cancer Surveys, 1: 373-388
【特許文献５６】欧州特許第86309516.2号
【非特許文献１１２】Blakely et al. (1996) Cancer Research, 56: 3287-3292
【非特許文献１１３】S.E. Order,「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W. Baldwin et al. (eds.), pp 303-316 (Academic Press 1985)
【非特許文献１１４】Mulligan T et al. (1995) Clin Cancer Res. 1: 1447-1454
【非特許文献１１５】Meredith RF, et al. (1996) J Nucl Med 37: 1491-1496
【非特許文献１１６】Alvarez RD, et al. (1997) Gynecologic Oncology 65: 94-101
【非特許文献１１７】Willemsen et al. (2000) Gene Ther. 7: 1369
【非特許文献１１８】Stanislawski et al. (2001) Nature Immunol. 2: 962
【非特許文献１１９】Stryer (1968) Science, 162: 526
【非特許文献１２０】Brand, L. et al. (1972) Annual Review of Biochemistry, 41: 843-868
【特許文献５７】米国特許第3,940,475号
【特許文献５８】米国特許第4,289,747号
【特許文献５９】米国特許第4,376,110号
【非特許文献１２１】De Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18: 989-994
【非特許文献１２２】Lueking et al. (1999) Anal. Biochem. 270: 103-111
【非特許文献１２３】Ge (2000) Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII
【非特許文献１２４】MacBeath and Schreiber (2000) Science 289: 1760-1763
【特許文献６０】国際出願01/40803号
【特許文献６１】国際出願99/51773A1
【特許文献６２】米国特許第5,627,037号
【特許文献６３】米国特許第5,030,002号
【特許文献６４】米国特許第5,137,809号
【非特許文献１２５】Wensel and Meares (1983) Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York
【非特許文献１２６】D. Colcher et al. (1986) Meth. Enzymol. 121: 802-816
【特許文献６５】米国特許第4,302,438号
【非特許文献１２７】Goding, J.W. (Monoclonal antibodies: principles and practice

: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 2nd ed. London; Orland: Academic Press, 1986. pp 124-126)
【非特許文献１２８】Hunter and Greenwood (1962) Nature 144: 945
【非特許文献１２９】David et al. (1974) Biochemistry 13: 1014-1021
【特許文献６６】米国特許第3,867,517号
【特許文献６７】米国特許第4,376,110号
【非特許文献１３０】Greenwood, F. et al. (1963) Biochem. J. 89: 114-123
【非特許文献１３１】Marchalonis, J. (1969) Biochem. J. 113: 299-305
【非特許文献１３２】Morrison, M. et al. (1971) Immunochemistiy 289-297
【非特許文献１３３】Burchiel, S. et al. (eds.), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111-123 (1982)中のRhodes, B. et al.
【非特許文献１３４】Hnatowich, D.J.et al. (1983) J. Immul. Methods 65: 147-157
【非特許文献１３５】Hnatowich, D. et al. (1984) J. Applied Radiation 35: 554-557
【非特許文献１３６】Buckley, R. G. et al (1984) F.E.B.S. 166: 202-204
【非特許文献１３７】A.R. Bradwell et al., 「Developments in Antibody Imaging」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W. Baldwin et al. (eds.), pp 65-85 (Academic Press 1985)
【特許文献６８】欧州特許A-0 502 814
【非特許文献１３８】Pykett (1982) Scientific American, 246: 78-88
【非特許文献１３９】Flad et al. (1998) Cancer Res 58: 5803-11
【非特許文献１４０】Human Mutation 11: 1-3, 1998
【非特許文献１４１】Denkberg and Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30:3522-32
【非特許文献１４２】Altman et al., (1996) Science 274：94-96
【非特許文献１４３】Denkberg and Reiter (2001) J Immunol 167、270-6
【非特許文献１４４】de Haard et al. (1999) J Biol Chem. 274：18218-30
【非特許文献１４５】Pascolo et al. (1997) J Exp Med. 185,2043-51
【非特許文献１４６】Kawakami et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91：6458-62
【非特許文献１４７】Bakker et al. (1994) J. Exp. Med. 179：1005-09
【非特許文献１４８】Kawakami et al. (1995) J Immunol. 154：3961-68
【非特許文献１４９】Cox et al. (1994) Science 264：716-19
【非特許文献１５０】Dudley and Rosenberg (2000) Cancer J. 6：69-77
【非特許文献１５１】Lee et al. (1999) Nat. Med. 5：677-85
【非特許文献１５２】Ogg et al. (1998) Science 279：2103-06
【非特許文献１５３】Carmon et al. (2000) Int J Cancer. 85：391-7
【非特許文献１５４】Kirkin et al. (1995) Cancer Immunol Immunother. 41：71-81
【非特許文献１５５】Andersen et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93：1820-24
【非特許文献１５６】Porgador (1997) Immunity 6：715-26
【非特許文献１５７】Dadaglio (1997) Immunity 6、727-38
【非特許文献１５８】Murphy et al. (1989) Nature 338：765-8
【非特許文献１５９】Aharoni (1991) Nature. 351：147-50
【非特許文献１６０】Chames and Hoogenboom (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97：7969-74
【非特許文献１６１】Offringa and Melief (2000) Curr Opin Immunol 12：576-82
【非特許文献１６２】Esche (1999) Curr Opin Mol Ther 1：72-81
【非特許文献１６３】Kugler et al. (2000) Nat. Med. 6：332-36
【非特許文献１６４】Pastan (1997) Biochim Biophys Acta. 1333、C1-6
【非特許文献１６５】Lode and Reisfeld (2000) Immunol Res. 21:279-88
【非特許文献１６６】Withoff (2001) Curr Opin Mol Ther. 3：53-62

【非特許文献１６７】Willemsen and (2000) Gene Ther. 7：1369
【非特許文献１６８】Reiter and Pastan (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94：4631-36
【非特許文献１６９】Chowdhury and Pastan (1999) Nat Biotechnol. 17：568-72
【非特許文献１７０】Boon and van der Bruggen (1996) J Exp Med 183:725-9
【非特許文献１７１】Rosenberg (2001) Nature 411:380-4
【非特許文献１７２】Renkvist and Parmiani (2001) Cancer Immunol Immunother 50:3-15
【非特許文献１７３】Altman et al. (1996) Science 274:94-96
【非特許文献１７４】Lee et al. (1999) Nat.Med. 5:677-85
【非特許文献１７５】Offringa and Melief (2000) Curr Opin Immunol 12:576-82
【非特許文献１７６】Esche (1999) Curr Opin Mol Ther 1:72-81
【非特許文献１７７】Kugler et al. (2000) Nat.Med. 6:332-36
【非特許文献１７８】Wulfing and Pluckthum (1994) J Mol Biol 242:655-69
【非特許文献１７９】McEachern et al.,(2000) Annu Rev Genet 34:331-58
【非特許文献１８０】Nakamura and Cech (1998) Cell 92:587-90
【非特許文献１８１】Shay et al.,(2001) Hum Mol Genet 10:677-85
【非特許文献１８２】Kim et al.,(1994) Science 266:2011-5
【非特許文献１８３】Prowse and Greider (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:4818-22
【非特許文献１８４】Meyerson and,(1997) Cell 90:785-95
【非特許文献１８５】Nakamura et al.,(1997) Science 277:955-9
【非特許文献１８６】Counter et al.,(1992) Embo J 11:1921-9
【非特許文献１８７】Counter et al,.(1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2900-4
【非特許文献１８８】Harley et al.,(1994) Cold Spring Harb Symp Quant Biol 59:307-15
【非特許文献１８９】Vonderheide et al.,(1999) Immunity 10:673-9
【非特許文献１９０】Minev et al.,(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4796-801
【非特許文献１９１】Counter et al.,(1995) Blood 85:2315-20
【非特許文献１９２】Arai et al.,(2001) Blood 97:2903-7
【非特許文献１９３】de Haard et al.,(1999) J Biol Chem. 274:18218-30
【非特許文献１９４】Denkberg and Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30:3522-32
【非特許文献１９５】Denkberg and Reiter (2001) J Immunol 167, 270-6
【非特許文献１９６】Andersen et al.,(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93:1820-24
【非特許文献１９７】Porgador (1997) Immunity 6:715-26
【非特許文献１９８】Day (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:8064-9
【非特許文献１９９】Zhong (1997) Proc Natl Acad Sci USA 1997 94, 13856-61
【非特許文献２００】Dadaglio (1997) Immunity 6, 727-38
【非特許文献２０１】Aharoni (1991) Nature. 351:147-50
【非特許文献２０２】Krogsgaard et al.,(2000) J Exp Med. 191, 1395-412
【非特許文献２０３】Chames and Hoogenboom (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:7969-74
【非特許文献２０４】Pastan (1997) Biochim Biophys Acta. 1333、C1-6
【非特許文献２０５】Lode and Reisfeld (2000) Immunol Res. 21:279-88
【非特許文献２０６】Withoff (2001) Curr Opin Mol Ther, 3:53-62
【非特許文献２０７】Willemsen et al.,(2000) Gene Ther. 7:1369
【非特許文献２０８】Stryhn et al.,(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93:10338-42
【非特許文献２０９】Reiter and Pastan (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94:4631-36

【非特許文献２１０】Chowdhury and Pastan (1999) Nat Biotechnol. 17:568-72
【非特許文献２１１】Mukherjee et al.,(2000) J Immunol. 165:3451-3460
【非特許文献２１２】Gendler他、(1995) Annu. Rev. Physiol 57:607～634
【非特許文献２１３】Spicer他、(1991) J Biol. Chem. 266: 15099～15109
【非特許文献２１４】Barnd et al.,(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:7159-7163
【非特許文献２１５】Greenlee et al.,(2000) CA Cancer J Clin. 50:7-33
【非特許文献２１６】Carmon et al.,(2000) Int. J Cancer 85:391-397
【非特許文献２１７】Cloutier et al.,(2000) Mol. Immunol. 37:1067-1077

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本発明は、一部には、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合するタンパク質リガンドを提供する。この複合体のペプチド成分は、例えば腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）であることができる。本明細書では、「ＴＡＡ」とは、ＭＨＣ分子に提示されたペプチド断片を指し、そのペプチド断片、またはそのペプチド断片が由来するところのポリペプチドは、腫瘍または癌状態に関連する。RenkvistおよびParmiani（2001）Cancer Immunol Immunother 50、3～15は、典型的なＴＡＡのリストを提供している。本発明のリガンドは、ＴＡＡ、例えばRenkvist（同上）に記載のＴＡＡに特異的に結合することができる。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

好ましい実施形態において、タンパク質リガンドは、抗体、またはその断片で抗原に結合できるものである。他の好ましい実施形態において、タンパク質リガンドは、修飾された足場ポリペプチド（またはペプチド）である。他の好ましい実施形態において、タンパク質リガンドは、例えばアミノ酸２５個未満の、環状ペプチドまたは線状ペプチドである。本明細書に記載の多くの例は、抗体リガンドまたはその断片を取り上げているが、本発明は、本明細書で提供される任意のタンパク質リガンド（例えば抗体および非抗体リガンド）を用いて実施できることが理解されよう。

【０００７】

この抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、複合体内のペプチド部分に対する高い親和性および微細特異性によりＭＨＣ－ペプチド複合体に結合し、したがってｉｎ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏで診断、予防、または治療剤として用いることができる。好ましくは、リガンドは、部分または完全ペプチド特異性でＭＨＣ－ペプチド複合体に結合する。

【０００８】

「ＭＨＣ」は、少なくとも２つのサブユニットを含む主要組織適合性複合体（ＭＨＣ）タンパク質である。サブユニットのアイデンティティは、ＭＨＣ分子のクラスに依存する。例えば、クラスＩ　ＭＨＣは、αサブユニット、およびβ２－ミクログロブリンを含む。他の例において、クラスＩＩ　ＭＨＣは、αサブユニット、およびβサブユニットを含む。

【０００９】

「ＭＨＣ－ペプチド複合体」は、少なくとも１つのＭＨＣおよび１つのペプチドを含む複合体である。このペプチドは、ＭＨＣのペプチド結合溝内で結合している。ペプチドは外因的に添加することができ、あるいは、例えばＴＡＰ２依存処理において、細胞内で複合体に組み上げられる。例えば、ペプチドは、プロテアソームが抗原を処理することによって産生される。

【００１０】

本明細書では、「特異的結合」は、（１）少なくとも$1\times10^{7}\ M^{-1}$の親和力でＭＨＣ－ペプチド複合体に結合し、（２）ＭＨＣ－ペプチド複合体以外の非特異的抗原（例えばＢＳＡ、カゼイン）に結合する親和力より少なくとも２倍、５０倍、１００倍以上高い親和力で優先的にＭＨＣ－ペプチド複合体に結合する抗体の特性を指す。

【００１１】
一態様において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変（ＶＨ）ドメイン、および免疫グロブリン軽鎖可変（ＶＬ）ドメインを含むタンパク質を特徴とする。このタンパク質は、ＭＨＣおよびペプチドを含む複合体と結合し、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合しない。「実質的に結合しない」という用語は、その結合親和力が、複合体に対するタンパク質の結合親和力の２％未満であることを意味する。一般的には、このタンパク質は単離されているものである。ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片、例えば表１に記載のペプチド断片であることができる。

【００１２】
一実施形態において、タンパク質は、標識またはシグナル物質、例えば本明細書に記載の標識またはシグナル物質、あるいは標識またはシグナル物質の少なくとも一成分を含む。他の実施形態において、タンパク質は、細胞毒素、または細胞毒素の少なくとも一成分を含む。他の実施形態において、タンパク質は、不溶性支持体、例えば固体支持体に付着している。例えば、固体支持体は、マルチウェル容器または平面アレイの表面であることができる。

【００１３】
一実施形態において、タンパク質は、細胞に付着している。例えば、タンパク質は、細胞の原形質膜に挿入されている膜貫通ドメインを含むことができる。この細胞は、例えば免疫細胞、例えばＴ細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）であることができる。

【００１４】
タンパク質のＶＨドメインとＶＬドメインは、同じポリペプチド鎖、または異なるポリペプチド鎖の成分であることができる。特定の実施形態において、異なるポリペプチド鎖は、ジスルフィド結合によって結合している。

【００１５】
タンパク質は、エフェクタードメイン、例えばＦｃドメイン、または非免疫グロブリンエフェクタードメイン、例えば標的に特異的に結合する合成ペプチドを含むことができる。他の実施形態において、エフェクタードメインは、抗原結合ドメイン（例えばＭＨＣ－ペプチド複合体以外の標的、またはＭＨＣ－ペプチド複合体の異なるエピトープに特異的）、例えばｓｃＦｖ抗原結合ドメインを含む。

【００１６】
タンパク質の複合体に対する結合の結合定数は、少なくとも10^{7} M^{-1}、10^{8} M^{-1}、10^{9} M^{-1}、または10^{10} M^{-1}であることができる。一実施形態において、ペプチド断片が複合体にある場合、タンパク質は複合体に結合するが、そのペプチド断片と少なくとも３個のアミノ酸が異なる非重複ペプチド断片が複合体にある場合、結合しない。

【００１７】
本発明はさらに、タンパク質および薬剤担体を含む薬剤組成物を提供する。例えば、タンパク質は、細胞毒素および標識（例えば造影成分）を含むことができる。

【００１８】
他の態様において、本発明は、ＭＨＣおよびペプチドを含む複合体と結合する単離タンパク質を特徴とし、複合体の結合エピトープは、ペプチドの一部分およびＭＨＣの一部分を含む。ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片であることができる。ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片、例えば表１に記載のペプチド断片であることができる。一実施形態において、タンパク質は、少なくとも１つの免疫グロブリン可変ドメイン、例えば２つの免疫グロブリン可変ドメイン、例えば１つの免疫グロブリン重鎖可変ドメインと１つの免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含む。他の実施形態において、タンパク質は、合成ペプチド、例えば独立して複合体と結合する合成ペプチドを含む。

【００１９】

一実施形態において、タンパク質は、標識またはシグナル物質、例えば本明細書に記載の標識またはシグナル物質、あるいは標識またはシグナル物質の少なくとも一成分を含む。他の実施形態において、タンパク質は、細胞毒素、または細胞毒素の少なくとも一成分を含む。他の実施形態において、タンパク質は、不溶性支持体、例えば固体支持体に付着している。例えば、固体支持体は、マルチウェル容器または平面アレイの表面であることができる。

【００２０】

一実施形態において、タンパク質は、細胞に付着している。例えば、タンパク質は、細胞の原形質膜に挿入されている膜貫通ドメインを含むことができる。この細胞は、例えば免疫細胞、例えばＴ細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）であることができる。

【００２１】

タンパク質のＶＨおよびＶＬドメインは、同じポリペプチド鎖、または異なるポリペプチド鎖の成分であることができる。特定の実施形態において、異なるポリペプチド鎖は、ジスルフィド結合によって結合している。

【００２２】

タンパク質は、エフェクタードメイン、例えばＦｃドメイン、または非免疫グロブリンエフェクタードメイン、例えば標的に特異的に結合する合成ペプチドを含むことができる。他の実施形態において、エフェクタードメインは、抗原結合ドメイン（例えばＭＨＣ－ペプチド複合体以外の標的、またはＭＨＣ－ペプチド複合体の異なるエピトープに特異的）、例えばｓｃＦｖ抗原結合ドメインを含む。

【００２３】

タンパク質の複合体に対する結合の結合定数は、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、$10^{8}M^{-1}$、$10^{9}M^{-1}$、または$10^{10}M^{-1}$であることができる。一実施形態において、ペプチド断片が複合体にある場合、タンパク質は複合体に結合するが、そのペプチド断片と少なくとも３個のアミノ酸が異なる非重複ペプチド断片が複合体にある場合、結合しない。

【００２４】

本発明はさらに、タンパク質および薬剤担体を含む薬剤組成物を提供する。例えば、タンパク質は、細胞毒素および標識（例えば造影成分）を含むことができる。

【００２５】

他の態様において、本発明は、（１）ＭＨＣおよびペプチドを含む複合体と結合し、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合せず、かつ／または（２）ペプチドの一部分およびＭＨＣの一部分を含むＭＨＣ－ペプチド複合体のエピトープと結合する部分を含む細胞傷害性物質を特徴とする。

【００２６】

一実施形態において、複合体と結合する部分の成分は、免疫グロブリン可変ドメインを含む。他の実施形態において、複合体結合部分は、修飾足場ドメイン（例えば非免疫グロブリン足場ドメイン）、ジスルフィドループ、または線状ペプチドを含む。

【００２７】

細胞傷害性物質は、例えば放射性ヌクレオシド、またはポリペプチド（例えばペプチド）毒素、あるいはそれらの少なくとも一成分を含むことができる。他の例において、細胞傷害性物質は、異種免疫細胞を含む。

【００２８】

細胞傷害性物質の複合体に対する結合の結合定数は、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、$10^{8}M^{-1}$、$10^{9}M^{-1}$、または$10^{10}M^{-1}$であることができる。複合体のペプチドは、例えばｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片、例えば表１に記載の断片であることができる。本発明はさらに、細胞傷害性物質および薬剤担体を含む薬剤組成物を提供する。

【００２９】

他の態様において、本発明は、（１）ＭＨＣおよびペプチドを含む複合体と結合し、結

合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合せず、かつ／または（２）ペプチドの一部分およびＭＨＣの一部分を含むＭＨＣ－ペプチド複合体のエピトープと結合する異種タンパク質を発現するための１つまたは複数の核酸を含む細胞傷害性Ｔ細胞を特徴とする。このタンパク質は、１つまたは複数のポリペプチド鎖を含むことができる。複数の鎖は、単一の核酸によって、例えば単一の核酸の異なるセグメントによって、または複数の核酸によってコードされることができる。タンパク質は、細胞をＭＨＣ複合体に結合する機能を果たす。

【００３０】

一実施形態において、異種タンパク質は、単独で、または他の因子と共同して複合体と結合する免疫グロブリン可変ドメインを含む。他の実施形態において、異種タンパク質は、単独で、または他の因子と共同して複合体と結合する修飾足場ドメイン（例えば非免疫グロブリン足場ドメイン）、ジスルフィドループ、または線状ペプチドを含む。

【００３１】

一実施形態において、異種タンパク質は、細胞の表面にタンパク質を固定する細胞表面付着シグナルを含む。例えば、付着シグナルは、膜貫通ドメイン、グリコホスファチジル－イノシトールアンカーシグナル、他の細胞表面付着配列を含むことができる。

【００３２】

細胞傷害性Ｔ細胞は、その細胞表面に複合体のＭＨＣおよびペプチド成分を提示する細胞に対し特異的な細胞傷害活性を有することができる。

【００３３】

細胞傷害性Ｔ細胞の複合体に対する結合の結合定数は、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、$10^{8}M^{-1}$、$10^{9}M^{-1}$、または$10^{10}M^{-1}$であることができる。複合体のペプチドは、例えばｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片、例えば表１に記載の断片であることができる。本発明はさらに、細胞傷害性Ｔ細胞および薬剤担体を含む薬剤組成物を提供する。

【００３４】

他の態様において、本発明は、免疫グロブリン可変ドメインおよび第２の免疫グロブリン可変ドメインを含むタンパク質が（１）ＭＨＣおよびペプチドを含む複合体と結合し、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合せず、かつ／または（２）ペプチドの一部分およびＭＨＣの一部分を含むＭＨＣ－ペプチド複合体のエピトープと結合するように、免疫グロブリン可変ドメインをコードするセグメントを含む単離核酸を特徴とする。ペプチドは、例えばｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片であることができる。

【００３５】

核酸は、第２の免疫グロブリン可変ドメインをコードする第２のセグメントを、例えば第１の免疫グロブリン可変ドメインと同じポリペプチド鎖のポリペプチドドメインとして、または第２のポリペプチド鎖として、含むことができる。

【００３６】

一実施形態において、核酸は、標識またはシグナル物質、例えば本明細書に記載の標識またはシグナル物質、あるいは標識またはシグナル物質の少なくとも一成分をコードする領域を含む。他の実施形態において、核酸は、細胞毒素、または細胞毒素の少なくとも一成分をコードする領域を含む。

【００３７】

一実施形態において、核酸は、結合免疫グロブリン可変ドメインに機能可能に結合した細胞表面付着シグナルをコードするドメインを含む。この核酸でコードされたタンパク質は、細胞に付着している。例えば、細胞付着シグナルは、細胞膜に挿入されている膜貫通ドメインを含むことができる。

【００３８】

他の実施形態において、核酸は、エフェクタードメイン、例えばＦｃドメイン、または非免疫グロブリンエフェクタードメイン、例えば標的に特異的に結合する合成ペプチドを

コードする領域を含む。エフェクタードメインは、免疫グロブリン可変ドメインに翻訳的に融合されているか、機能的に結合している。他の実施形態において、エフェクタードメインは、抗原結合ドメイン（例えばＭＨＣ－ペプチド複合体以外の標的、またはＭＨＣ－ペプチド複合体の異なるエピトープに特異的）、例えばｓｃＦｖ抗原結合ドメインを含む。

【００３９】

他の態様において、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変ドメインおよび免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むタンパク質をコードする異種核酸配列を含む宿主細胞を特徴とする。このタンパク質は、ペプチドが複合体に存在する場合、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合する。ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片、例えば表１に記載の断片であることができる。宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えば免疫細胞、あるいは非哺乳動物細胞、例えば酵母細胞などの真核細胞、または原核細胞であることができる。核酸は、タンパク質、または本明細書に記載のタンパク質変種をコードする。

【００４０】

他の態様において、本発明は、そのゲノムが、免疫グロブリン重鎖可変ドメインおよび免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含むタンパク質をコードする異種核酸配列を含むトランスジェニック動物を特徴とし、このタンパク質は、そのペプチドが複合体に存在する場合、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合する。ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片、例えば表１に記載の断片であることができる。

【００４１】

一実施形態において、異種核酸配列は、標識またはシグナル物質、例えば本明細書に記載の標識またはシグナル物質、あるいは標識またはシグナル物質の少なくとも一成分をコードする領域を含む。他の実施形態において、核酸は、細胞毒素、または細胞毒素の少なくとも一成分をコードする領域を含む。

【００４２】

一実施形態において、異種核酸配列は、１つまたは複数の免疫グロブリン可変ドメインに機能可能に結合した細胞表面付着シグナルをコードする領域を含む。この異種核酸配列でコードされたタンパク質は、細胞に付着している。例えば、細胞付着シグナルは、細胞の原形質膜に挿入される膜貫通ドメインを含むことができる。

【００４３】

他の実施形態において、異種核酸配列は、エフェクタードメイン、例えばＦｃドメイン、または非免疫グロブリンエフェクタードメイン、例えば標的に特異的に結合する合成ペプチドをコードする領域を含む。エフェクタードメインは、免疫グロブリン可変ドメインに翻訳的に融合されているか、機能的に結合している。他の実施形態において、エフェクタードメインは、抗原結合ドメイン（例えばＭＨＣ－ペプチド複合体以外の標的、またはＭＨＣ－ペプチド複合体の異なるエピトープに特異的）、例えばｓｃＦｖ抗原結合ドメインを含む。

【００４４】

一実施形態において、異種核酸配列は、調節因子、例えば組織または細胞特異的発現、例えば細胞傷害性免疫細胞などの免疫細胞における発現を導く因子に機能可能に結合している。

【００４５】

本発明はさらに、本明細書に記載の核酸、タンパク質、細胞、またはトランスジェニック動物、および疾患、例えば腫瘍性疾患を治療、予防、または検出するためにそのタンパク質を用いるための指示書を含むキットを特徴とする。

【００４６】

一態様において、下記の工程からなる方法を特徴とする：タンパク質を含むタンパク質ライブラリーであって、各タンパク質が、予め選択されたＭＨＣ対立遺伝子を有する対象由来のＣＤＲ（相補性決定領域）を含む免疫グロブリン可変ドメインを含むタンパク質ラ

イブラリーを準備する工程、予め選択された対立遺伝子と同じ対立遺伝子を含むことが知られているＭＨＣ複合体を任意選択で選択する工程、ライブラリーをＭＨＣ－ペプチド複合体に接触させる工程であって、複合体のＭＨＣ成分が所与の予め選択されたＭＨＣ対立遺伝子と同じ対立遺伝子である工程、およびＭＨＣ－ペプチド複合体と特異的に結合するライブラリーのメンバーを単離する工程を含む方法である。対象由来のＣＤＲ配列は、生殖細胞系ＣＤＲ配列、またはその体細胞突然変異体であることができる。例えば、対象のＣＤＲ配列は、親和性成熟免疫グロブリンドメインをコードしている核酸から単離される。

【００４７】

一実施形態において、単離されたメンバーは、１００ｎＭ、５０ｎＭ、１０ｎＭ、またはそれ以下の親和力で複合体と結合する。他の実施形態において、ライブラリーの複数のメンバー（例えば少なくとも２、５、１０、２０、または５０）が単離され、その複数のメンバーの各メンバーは、複合体と結合し、複合体のペプチドを特異的に認識し、複合体の結合は、１００ｎＭ、５０ｎＭ、またはそれ以下の結合力を有する。

【００４８】

一実施形態において、ライブラリーは、少なくとも10^3、10^4、10^6、10^8、または10^{10}、例えば10^4から10^{12}の第１の複数のタンパク質を含む。一実施形態において、第１の複数のタンパク質の各タンパク質は、単鎖抗体、またはＦａｂ断片である。ライブラリーは、第２の複数のタンパク質、例えば第１の複数のタンパク質と異なるタンパク質を含むことができる。

【００４９】

一実施形態において、ライブラリーの各タンパク質は、アレイに付着している。

他の実施形態において、タンパク質ライブラリーは、提示ライブラリーである。例えば、各タンパク質は、複製可能遺伝子パッケージ、例えばウイルス粒子または細胞に提示される。他の例において、タンパク質は、それをコードする核酸、またはその相補核酸に直接付着している。

【００５０】

一実施形態において、ライブラリーはさらに、第２の複数のタンパク質を含む。第２の複数のタンパク質の各タンパク質は、予め選択されたＭＨＣ対立遺伝子を有する第２の対象由来のＣＤＲを含む免疫グロブリン可変ドメインを含む。他の実施形態において、第２の複数のタンパク質の各タンパク質は、予め選択されたＭＨＣ対立遺伝子以外のＭＨＣ対立遺伝子を有する第２の対象由来のＣＤＲを含む免疫グロブリン可変ドメインを含む。

【００５１】

一実施形態において、ＭＨＣ－ペプチド複合体は、単鎖ＭＨＣ－ペプチド複合体である。例えば、この方法はさらに、原核または真核細胞に単鎖ＭＨＣ－ペプチド複合体を発現させる工程を含む。

【００５２】

一実施形態において、複合体のＭＨＣ成分は、標識、例えばビオチン化（例えばｂｉｒＡタグによる）されている。タグは、支持体、例えば磁性粒子、アレイ、または他の支持体、例えば固体または半多孔質支持体に結合することができる。

【００５３】

一実施形態において、ＭＨＣ－ペプチド複合体は、細胞の表面に付着している。ＭＨＣ－ペプチド複合体は、細胞内でアセンブルすることができ、ペプチドは、細胞プロテアソームによって処理されることができる。ペプチドを生じるタンパク質は、過剰発現することができる。

【００５４】

一実施形態において、ＭＨＣ－ペプチド複合体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでアセンブルされる。複合体は、支持体、例えば磁性粒子、アレイ、または他の支持体、例えば固体または半多孔質支持体に付着していることができる。

【００５５】

一実施形態において、複合体のペプチド成分は、ＭＵＣ１、ｈＴＥＲＴ、ＴＡＸ、またはｇｐ１００のペプチド断片、例えば表１に記載の断片、またはRenkvist他（同上）に記載のペプチド断片である。

【００５６】

他の実施形態において、ＭＨＣ－ペプチド複合体は、細胞表面、例えば生細胞表面に付着している。ライブラリーは、その細胞に接触している。細胞は、複数のＭＨＣ－ペプチド複合体を提示することができる。細胞は、ペプチド、例えば外因性ペプチドを負荷されていることができ、細胞は、そのペプチドなどを含むタンパク質を過剰発現することができる。

【００５７】

単離タンパク質は、薬剤組成物として製剤することができる。この組成物は、対象、例えば試験対象、あるいは疾患、例えば腫瘍性または自己免疫疾患を有すると同定された対象に投与することができる。

【００５８】

製剤化は、単離タンパク質に、毒性物質または標識を付着する工程を含むことができる。本発明はさらに、この方法によって同定されたタンパク質、および同定されたタンパク質を含む薬剤組成物を提供する。

【００５９】

他の態様において、本発明は、タンパク質ライブラリーのメンバーを単鎖ＭＨＣ－ペプチド複合体に接触させる工程、ならびに（１）単鎖ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合し、ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合せず、かつ／または（２）複合体のＭＨＣ成分を含み、複合体のペプチド成分を含むエピトープに結合する１つまたは複数のメンバーを単離する工程を含む方法を特徴とする。

【００６０】

一実施形態において、単離されたメンバーは、１００ｎＭ、５０ｎＭ、１０ｎＭ、またはそれ以下の親和力で複合体と結合する。他の実施形態において、ライブラリーの複数のメンバー（例えば少なくとも２、５、１０、２０、または５０）が単離され、その複数のメンバーの各メンバーは、複合体と結合し、複合体のペプチドを特異的に認識し、複合体の結合は、１００ｎＭ、５０ｎＭ、またはそれ以下の結合力を有する。

【００６１】

一実施形態において、ライブラリーは、少なくとも10^3、10^4、10^6、10^8、または10^{10}、例えば10^4から10^{12}の第１の複数のタンパク質を含む。ライブラリーは、第２の複数のタンパク質、例えば第１の複数のタンパク質と異なるタンパク質を含むことができる。

【００６２】

一実施形態において、第１の複数のタンパク質の各タンパク質は、修飾足場ドメインタンパク質（例えば免疫グロブリン足場ドメイン、非免疫グロブリン足場ドメイン、例えば７０または５０未満のアミノ酸のドメイン）である。第１の複数のタンパク質の各タンパク質は、合成ペプチドを含むことができる。他の実施形態において、第１の複数のタンパク質の各タンパク質は、単鎖抗体、またはＦａｂ断片である。

【００６３】

一実施形態において、ライブラリーの各タンパク質は、アレイに付着している。

他の実施形態において、タンパク質ライブラリーは、提示ライブラリーである。例えば、各タンパク質は、複製可能遺伝子パッケージ、例えばウイルス粒子または細胞に提示される。他の例において、タンパク質は、それをコードする核酸、またはその相補核酸に直接付着している。

【００６４】

単離タンパク質は、薬剤組成物として製剤することができる。この組成物は、対象、例えば試験対象、あるいは疾患、例えば腫瘍性または自己免疫疾患を有すると同定された対

象に投与することができる。

【００６５】

製剤化は、単離タンパク質に、毒性物質または標識を付着する工程を含むことができる。本発明はさらに、この方法によって同定されたタンパク質、および同定されたタンパク質を含む薬剤組成物を提供する。

【００６６】

他の態様において、本発明は、タンパク質ライブラリーをＭＨＣ－ペプチド複合体の第１の混合物に接触させる工程、ライブラリーの複数のメンバーを単離する工程（ここで、複数のメンバーの各単離メンバーが、ＭＨＣに結合する抗原結合ドメインを提示し、抗原結合領域によって認識されるエピトープが、ＭＨＣの一部分およびペプチドの一部分を含む）、ならびにＭＨＣ－ペプチド複合体の第２の混合物に実質的に結合しない複数のメンバーを同定する工程を含む方法を特徴とする。第１および／または第２の混合物は、異なるＭＨＣ対立遺伝子および／または異なるペプチドを有する複合体を含むことができる。一例において、第１および／または第２の混合物は、複数の異なるＭＨＣ－ペプチド複合体を提示する細胞を含む。他の例において、第１および／または第２の混合物は、１つまたは複数の細胞から単離されるか、または１つまたは複数の細胞に提示された複合体を含む。

【００６７】

第１および／または第２の混合物の各複合体のペプチド成分は、細胞によって内因的に処理されているペプチドであることができる。第１の混合物は、１つまたは複数の指示された細胞由来の複合体を含むことができ、第２の混合物は、１つまたは複数の正常細胞由来の複合体を含むことができる。

【００６８】

この方法はさらに、同定後に、同定されたメンバーの１つによってＭＨＣ－ペプチド複合体を精製する工程を含むことができる。精製複合体は、例えば精製ＭＨＣ－ペプチド複合体のペプチド成分（例えば質量分析によって）および／またはＭＨＣ対立遺伝子を同定するために特徴付けることができる。

【００６９】

例えば、指示された細胞は、癌細胞、または免疫疾患を有する個体の細胞であることができる。第１および／または第２の混合物は、細胞、例えば生細胞、哺乳動物細胞、および／または癌細胞を含むことができる。細胞は、ＴＡＰ１またはＴＡＰ２活性を有することができる。細胞は、磁性粒子に付着していることができる。

一実施形態において、単離されたメンバーは、１００ｎＭ、５０ｎＭ、１０ｎＭ、またはそれ以下の親和力で第１の混合物の複合体に結合する。他の実施形態において、ライブラリーの複数のメンバー（例えば少なくとも２、５、１０、２０、または５０）が単離され、その複数のメンバーの各メンバーは、複合体と結合し、複合体のペプチドを特異的に認識し、複合体の結合は、１００ｎＭ、５０ｎＭ、またはそれ以下の結合力を有する。

【００７０】

一実施形態において、複合体のＭＨＣ成分は、クラスＩ　ＭＨＣであることができる。他の実施形態において、複合体のＭＨＣ成分は、クラスＩＩ　ＭＨＣであることができる。ＭＨＣ対立遺伝子は、例えばSchreuder et al,「The HLA Dictionary 2001:a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5,-DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens」, Human Immunology 2001, 62, 826-849に記載の任意のＨＬＡアロタイプであることができる。例えば、対立遺伝子は、Ａ＊０２０１である。一実施形態において、ライブラリーは、少なくとも10^3、10^4、10^6、10^8、または10^{10}、例えば10^4から10^{12}の第１の複数のタンパク質を含む。ライブラリーは、第２の複数のタンパク質、例えば第１の複数のタンパク質と異なるタンパク質を含むことができる。

【００７１】

一実施形態において、第１の複数のタンパク質の各タンパク質は、修飾足場ドメインタ

ンパク質（例えば免疫グロブリン足場ドメイン、非免疫グロブリン足場ドメイン、例えば７０または５０未満のアミノ酸のドメイン）である。第１の複数のタンパク質の各タンパク質は、合成ペプチドを含むことができる。他の実施形態において、第１の複数のタンパク質の各タンパク質は、単鎖抗体、またはＦａｂ断片である。

【００７２】

一実施形態において、ライブラリーの各タンパク質は、アレイに付着している。

他の実施形態において、タンパク質ライブラリーは、提示ライブラリーである。例えば、各タンパク質は、複製可能遺伝子パッケージ、例えばウイルス粒子または細胞に提示される。他の例において、タンパク質は、それをコードする核酸、またはその相補核酸に直接付着している。

【００７３】

同定されたタンパク質は、薬剤組成物として製剤することができる。この組成物は、対象、例えば試験対象、あるいは疾患、例えば腫瘍性または自己免疫疾患を有すると同定された対象に投与することができる。

【００７４】

製剤化は、同定されたタンパク質に、毒性物質または標識を付着する工程を含むことができる。本発明はさらに、この方法によって同定されたタンパク質、および同定されたタンパク質を含む薬剤組成物を提供する。

【００７５】

他の態様において、本発明は、複数のタンパク質を含むコレクションを特徴とする。複数のタンパク質の各タンパク質は、（１）ＭＨＣおよびペプチドを含む複合体と結合し、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合せず、かつ／または（２）ＭＨＣの一成分およびペプチドの一成分を含むエピトープに結合する。結合複合体のペプチドは、複数のタンパク質の各タンパク質に関して異なることができ、あるいは複数のタンパク質の各タンパク質、または少なくともいくつかのタンパク質に関して同じであることができる。結合複合体のＭＨＣは、複数のタンパク質の各タンパク質に関して同じ対立遺伝子であることができ、あるいは複数のタンパク質の各タンパク質に関して異なる対立遺伝子であることができる。複数のタンパク質は、少なくとも２、１０、または２０のタンパク質を含むことができる。

【００７６】

複数のタンパク質の少なくともいくつかのタンパク質が結合するペプチドは、癌特異的抗原のペプチドであることができる。このペプチドは、Renkvist他（同上）に記載のペプチド、および／またはウイルス抗原、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、ｇｐ１００、またはｈＴＥＲＴ由来のペプチド、例えば表１のペプチドであることができる。

【００７７】

複数のタンパク質の各タンパク質は、支持体（例えばアレイ）、提示パッケージ、または細胞に付着していることができる。

【００７８】

本発明はさらに、上述のタンパク質のコレクションを準備する工程、細胞をコレクションの各タンパク質に接触させる工程、および細胞にコレクションのタンパク質が結合しているかどうかを判定する工程を含む方法を提供する。関連した方法は、細胞の表面からペプチドを溶出する工程、ペプチドをＭＨＣタンパク質と結合して、複合体を形成する工程、コレクションの１つまたは複数のタンパク質が複合体の１つに結合しているかどうかを判定する工程を含む方法を提供する。

【００７９】

他の態様において、本発明は以下の工程を含む方法を特徴とする：重鎖可変領域をコードする第１の核酸セグメント、および軽鎖可変領域をコードする第２の核酸セグメントを準備する工程（ここで、重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、標的ペプチドが存在する場合、ＭＨＣ－標的ペプチド複合体と結合する抗原結合タンパク質を形成する）、前記第１および第２核酸セグメントを細胞傷害性細胞に導入する工程、および前記抗原結合タンパ

ク質の発現およびアセンブリを可能にする条件下で細胞傷害性細胞を維持する工程。

【００８０】

導入は、第１および第２核酸セグメントを含むウイルスを用意する工程、および細胞傷害性細胞をそのウイルスに感染させる工程を含むことができる。導入は、ｉｎ　ｖｉｖｏ（例えば対象動物において）、またはｅｘ　ｖｉｖｏで行うことができる。この方法はさらに、導入後、細胞傷害性細胞を、対象、例えば試験動物、患者、あるいは疾患、例えば腫瘍性または自己免疫疾患であると同定された対象に投与する工程を含むことができる。

【００８１】

他の態様において、本発明は、表面ＭＨＣ分子にペプチドを提示する標的細胞を除去または殺傷する方法を特徴とする。この方法は、標的細胞を本明細書に記載のタンパク質と接触させる工程であって、そのタンパク質が、標的細胞の表面ＭＨＣ分子に提示されたペプチドを特異的に認識する工程、および標的細胞を除去または殺傷する工程を含む。例えば、標的細胞は、癌細胞である。

【００８２】

タンパク質は、細胞傷害性薬剤を含むことができる。タンパク質は、例えばタンパク質を標的細胞に接触させる前、タンパク質を標的細胞に接触させる間、またはその後に、エフェクター細胞に付着させることができる。

【００８３】

他の態様において、本発明は、対象において癌性疾患を治療または予防する方法を特徴とする。この方法は、その疾患を治療または予防する有効量で、本明細書に記載の細胞傷害性物質または細胞傷害性細胞を対象に投与する工程を含む。

【００８４】

他の態様において、本発明は、ｉｎ　ｖｉｖｏで対象を画像化する方法を特徴とする。この方法は、本明細書に記載のタンパク質を対象に投与する工程であって、そのタンパク質がさらにｉｎ　ｖｉｖｏで画像化され得る標識を含む工程、および対象においてタンパク質の分布を検出する工程を含む。

【００８５】

他の態様において、本発明は、試料中のＭＨＣ－ペプチド複合体を検出する方法を特徴とする。この方法は、試料を本明細書に記載のタンパク質と接触させる工程、およびタンパク質と試料の結合を検出する工程であって、結合の検出が、試料中のＭＨＣ－ペプチド複合体の存在を示す工程を含む。

【００８６】

試料は、細胞を含むことができる。この方法はさらに、タンパク質によって結合していない細胞から、タンパク質によって結合している細胞を選別する工程を含むことができる。例えば、このタンパク質は蛍光標識され、選別は蛍光活性化細胞選別を含む。他の例において、タンパク質は、不溶性支持体、例えばカラムマトリクス、または磁性粒子に付着している。

【００８７】

他の態様において、本発明は、重鎖可変ドメインをコードする第１の核酸セグメント、および軽鎖可変ドメインをコードする第２の核酸セグメントを用意する工程（ここで重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインは、標的ペプチドが存在する場合、ＭＨＣ－標的ペプチド複合体と結合する抗原結合タンパク質を形成する）、前記第１および第２核酸セグメントを宿主細胞に導入する工程、および前記抗原結合タンパク質の発現およびアセンブリを可能にする条件下で宿主細胞を維持する工程を含む方法を特徴とする。標的ペプチドは、ｇｐ１００、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片、例えば表１に記載のペプチドであることができる。

【００８８】

第１および第２核酸セグメントは、同じ核酸、または異なる核酸のセグメントであることができる。一実施形態において、第１および第２核酸セグメントは、インフレームであり、単一のポリペプチドとして翻訳される。核酸は、第１核酸セグメントと第２核酸セグ

メントとの間に位置する、リンカーをコードする第３のセグメントを含むことができる。他の実施形態において、第１および第２核酸セグメントは、個別のポリペプチド鎖として翻訳される。個別のポリペプチド鎖は、非ペプチド結合によって共有結合されていることができる。

【００８９】

抗原結合タンパク質は、可溶性であって分泌されることができる、あるいは宿主細胞の表面に付着していることができる。後者の場合、例えば、抗原結合タンパク質は、宿主細胞膜に挿入された膜貫通ドメイン、および任意選択で細胞質ドメイン、例えばＴ細胞受容体細胞質ドメインを含むポリペプチドを含むことができる。

【００９０】

宿主細胞は、細菌細胞、または真核細胞、例えば酵母、昆虫、植物、または哺乳動物細胞（例えばヒト、齧歯動物、乳畜哺乳動物細胞）であることができる。例えば、哺乳動物細胞は、ＣＯＳ細胞、またはＴ細胞である。

【００９１】

導入は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで起こることができる。維持は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、または対象においてｉｎ　ｖｉｖｏで起こることができる。例えば宿主細胞は、対象の細胞、治療される個体と血縁関係にある細胞（例えば祖父母を共有）、治療される個体と同じＭＨＣ対立遺伝子を有する対象の細胞である。

【００９２】

一実施形態において、Ｔ細胞は、細胞表面ペプチドが標的ペプチドである細胞表面ＭＨＣ－ペプチド複合体を含む細胞に対する細胞傷害活性を媒介する。例えば、Ｔ細胞は、癌細胞に対する細胞傷害活性を媒介する。

【００９３】

抗原結合タンパク質は、精製タグを含むことができる。

この方法はさらに、細胞を囲む媒質および／または細胞の溶解産物もしくは膜由来の抗原結合タンパク質を精製する工程を含むことができる。この方法はさらに、精製タンパク質を修飾する工程を含むことができる。この方法はさらに、宿主細胞を、細胞表面ペプチドが標的ペプチドである細胞表面ＭＨＣ－ペプチド複合体を含む細胞に接触させる工程を含むことができる。

【００９４】

他の態様において、本発明は、重鎖可変領域をコードする第１の核酸セグメント、および軽鎖可変領域をコードする第２の核酸セグメントを発現する宿主細胞を用意する工程であって、発現した重鎖可変領域および発現した軽鎖可変領域は、ＭＨＣ－ペプチド複合体のエピトープと結合する抗原結合タンパク質としてアセンブルし、エピトープは、ＭＨＣの一部分およびペプチドの一部分を含み、ペプチドは、ｈＴＥＲＴ、ＭＵＣ１、ＴＡＸ、またはｇｐ１００の断片である工程、および宿主細胞から抗原結合タンパク質を採取する工程を含む方法を特徴とする。例えば、宿主細胞は、トランスジェニック動物、例えば哺乳動物の細胞である。宿主細胞は、線維芽細胞、乳腺細胞、免疫細胞であることができる。一実施形態において、抗原結合タンパク質はさらに、精製タグを含む。この方法はさらに、採取した抗原結合タンパク質を、少なくとも５０、７０、８０、９０、９５、または９９％の純度に精製する工程を含むことができる。

【００９５】

さらに本発明は、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、抗体断片、およびそれらの薬剤組成物、ならびにそのような抗体および断片を作製するための核酸、組換え発現ベクター、および宿主細胞を提供する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでＭＨＣ－ペプチド複合体を検出する、あるいは特定のＭＨＣ－ペプチド複合体を提示する細胞を除去または殺傷するために本発明の抗体を用いる方法も本発明に包含される。例えば、このペプチドは癌関連抗原である。

【００９６】

本発明のタンパク質リガンドは、高い親和性および特異性で、ＭＨＣ－ペプチド複合体

、好ましくはヒトＭＨＣ－ペプチド複合体と相互作用し、例えばそれらに結合する。好ましくは、タンパク質リガンドは、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合しない。タンパク質リガンドが結合するエピトープは、例えばＭＨＣの一部分、および結合ペプチドの一部分を含むことができる。結合ペプチドは、ＴＡＡであることができる。

【００９７】

例えば、タンパク質リガンドは、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、好ましくは、少なくとも$10^{8}M^{-1}$、$10^{9}M^{-1}$、または$10^{10}M^{-1}$の結合定数で、ヒトＭＨＣ－ペプチド複合体に結合する。一実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、本明細書に記載の抗体、例えば抗（ｇｐ１００ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４など）、抗（ｈＴＥＲＴペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば４Ａ９、４Ｂ４、４Ｃ２、４Ｇ９、３Ａ１２、３Ｂ１、３Ｆ５、３Ｇ３、または３Ｈ２など）、抗（ＭＵＣ１ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＭ３Ａ１またはＭ３Ｂ８など）、または抗（ＴＡＸペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＴ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２など）（例えばＴＡＸはＨＴＬＶ－１由来である）のエピトープの全てまたは一部と結合する。抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、例えば本明細書に記載の抗体、例えば抗（ｇｐ１００ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４など）、抗（ｈＴＥＲＴペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば４Ａ９、４Ｂ４、４Ｃ２、４Ｇ９、３Ａ１２、３Ｂ１、３Ｆ５、３Ｇ３、または３Ｈ２など）、抗（ＭＵＣ１ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＭ３Ａ１またはＭ３Ｂ８など）、または抗（ＴＡＸペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＴ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２など）の結合を阻害、例えば競合的に阻害することができる。抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、エピトープ、例えば立体構造または線状エピトープに結合することができ、結合したとき、エピトープは、本明細書に記載の抗体、例えば抗（ｇｐ１００ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４など）、抗（ｈＴＥＲＴペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば４Ａ９、４Ｂ４、４Ｃ２、４Ｇ９、３Ａ１２、３Ｂ１、３Ｆ５、３Ｇ３、または３Ｈ２など）、抗（ＭＵＣ１ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＭ３Ａ１またはＭ３Ｂ８など）、または抗（ＴＡＸペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＴ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２など）の結合を妨げる。エピトープは、上記または本明細書の別の場所に記載の抗体によって認識されたものに対して、空間的に近接、または機能的に関連していることができ、例えば線状配列または空間構造的に重複または隣接エピトープであることができる。好ましくは、エピトープは、ペプチドの一部分、例えばｇｐ１００、ＭＵＣ１、またはｈＴＥＲＴのペプチド断片を含む。

【００９８】

ＴＡＡを含むＭＨＣ－ペプチド複合体で癌細胞を同定することができる。本発明の抗体は、これらの細胞の細胞表面、特に生細胞の細胞表面に結合する。好ましくは、本発明のタンパク質リガンドはさらに、ＭＨＣ－ペプチド複合体とともに内在化され、これにより抗体にコンジュゲートした薬剤、例えば細胞傷害性薬剤または標識化剤の細胞内送達が可能となる。したがって、本発明のタンパク質リガンドは、生正常細胞、良性増殖性細胞、および表面のＭＨＣ－ペプチド複合体中にＴＡＡに提示する癌性細胞を標的にするために用いることができる。

【００９９】

好ましい一実施形態において、タンパク質リガンドは抗体である。本明細書において、「抗体」という用語は、少なくとも１つ、好ましくは２つの重（Ｈ）鎖可変領域（本明細書ではＶＨと略す）、および少なくとも１つ、好ましくは２つの軽（Ｌ）鎖可変領域（本明細書ではＶＬと略す）を含むタンパク質を指す。ＶＨおよびＶＬ領域は、「相補性決定

領域」（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変性の領域とその間に点在する「フレームワーク領域」（ＦＲ）と呼ばれるより保存された領域とに細分することができる。フレームワーク領域およびＣＤＲの範囲は正確に定義されている（参照により本明細書の一部とするKabat, E. A. et al.（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第５版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication 91-3242号、およびChothia, C. et al.（1987）J. Mol. Biol. 196, 901-917を参照されたい）。ＶＨおよびＶＬはそれぞれ、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された３つのＣＤＲおよび４つのＦＲからなる。ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。

【０１００】

抗体のＶＨまたはＶＬ鎖はさらに、重鎖または軽鎖定常領域を含み、それによってそれぞれ免疫グロブリン重鎖または軽鎖を形成することができる。一実施形態において、抗体は、２つの免疫グロブリン重鎖および２つの免疫グロブリン軽鎖の四量体であり、免疫グロブリン重鎖および軽鎖は、例えばジスルフィド結合によって相互に連結している。重鎖定常領域は、３つの領域ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３からなる。軽鎖定常領域は、１つの領域ＣＬからなる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合領域を含有する。抗体の定常領域は、典型的に、免疫系の種々の細胞（例えばエフェクター細胞）、および古典的補体系の第１成分（Ｃｌｑ）を含む、宿主組織または因子に対する抗体の結合を媒介する。「抗体」という用語は、ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＤ、ＩｇＭ型（ならびにそれらのサブタイプ）の完全免疫グロブリンを含み、免疫グロブリンの軽鎖は、カッパまたはラムダ型であってよい。

【０１０１】

本明細書では、「免疫グロブリン」という用語は、免疫グロブリン遺伝子に実質的にコードされた１つまたは複数のポリペプチドからなるタンパク質を指す。認識されたヒト免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ（ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）、ガンマ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、デルタ、イプシロン、およびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。全長免疫グロブリン「軽鎖」（約２５Ｋｄ、または２１４アミノ酸）は、ＮＨ２末端の可変領域遺伝子（約１１０アミノ酸）、およびＣＯＯＨ末端のカッパまたはラムダ定常領域遺伝子によってコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」（約５０Ｋｄ、または４４６アミノ酸）は、可変領域遺伝子（約１１６アミノ酸）、および他の上述の定常領域遺伝子の１つ、例えばガンマ（約３３０アミノ酸をコード）によって同様にコードされる。

【０１０２】

本明細書では、抗体（単に「抗体部分」または「断片」）の「抗原結合断片」という用語は、ＭＨＣ－ペプチド複合体（例えばヒトＭＨＣ－ペプチド複合体、例えばペプチドがＴＡＡである複合体）に特異的に結合する能力を保持している全長抗体の１つまたは複数の断片を指す。抗体の「抗原結合断片」という用語に包含される結合断片の例には、（ｉ）Ｆａｂ断片、すなわちＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、およびＣＨ１領域からなる１価断片、（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、すなわちヒンジ領域でジスルフィド橋によって結合した２つのＦａｂ断片を含む２価断片、（ｉｉｉ）ＶＨおよびＣＨ１領域からなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬおよびＶＨ領域からなるＦｖ断片、（ｖ）ＶＨ領域からなるｄＡｂ断片（Ward et al.（1989）Nature 341, 544-546）、および（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）、が含まれる。さらに、Ｆｖ断片の２つの領域ＶＬおよびＶＨは、別個の遺伝子によってコードされるが、ＶＬおよびＶＨ領域対が１価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作製することのできる合成リンカーによって、組換え法を用いてそれらを結合することができる（単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られる。例えばBird et al.（1988）Science 242, 423-426、およびHuston他（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85、5879～5883を参照のこと）。そのような単鎖抗体は、抗体の「抗原結合断片」という用語にも包含される。これらの抗体断片は、当分野の技術者に知られている通常の技法を用いて得られ、断片は、完全抗体と同じ方法で実用のためにスクリーニングされる。

【０１０３】
抗体は、好ましくは、モノ特異的な、例えば組換え抗体、モノクローナル抗体、またはそれらの抗原結合断片である。「モノ特異的抗体」という用語は、同定または合成の方法に関わらず、特定の標的、例えばエピトープに対して単一結合特異性および親和性を示す抗体を指す。この用語は、「モノクローナル抗体」、あるいは、本明細書では単一分子組成物の抗体またはその断片の製剤を指す「モノクローナル抗体組成物」を含む。この用語はさらに、以下に記載する「組換え抗体」を含む。

【０１０４】
抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体は、全長（例えばＩｇＧ（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、ＩｇＭ、ＩｇＡ（例えばＩｇＡ１、ＩｇＡ２）、ＩｇＤ、およびＩｇＥであるが、好ましくはＩｇＧ）であることができ、あるいは抗原結合断片（例えばＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、またはｓｃＦｖ断片）のみを含むことができる。抗体またはその抗原結合断片は、２つの重鎖免疫グロブリン、および２つの軽鎖免疫グロブリンを含むことができ、あるいは単鎖抗体であることができる。抗体は、任意選択で、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、またはミュー定常領域遺伝子から選択された定常領域を含むことができる。好ましい抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体は、ヒト抗体、例えばヒトＩｇＧ１定常領域、またはその一部分に実質的に由来する重鎖および軽鎖定常領域を含む。本明細書で、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされている抗体クラス（例えばＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。

【０１０５】
好ましい実施形態において、抗体（またはその断片）は、組換えまたは修飾抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、例えばキメラ、ヒト化、脱免疫化、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ産生抗体である。本明細書において、「組換え」または「修飾」ヒト抗体という用語は、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離される全ての抗体、例えば宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現された抗体、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニック動物（例えばマウス）から単離された抗体、あるいは他のＤＮＡ配列へのヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体などである。そのような組換え抗体は、ヒト化、ＣＤＲグラフト、キメラ、脱免疫化、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ産生抗体を含み、任意選択で、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来の定常領域を含むことができる。他の実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体は、ヒト抗体である。

【０１０６】
さらに、例えば抗（ｇｐ１００ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４など）、抗（ｈＴＥＲＴペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば４Ａ９、４Ｂ４、４Ｃ２、４Ｇ９、３Ａ１２、３Ｂ１、３Ｆ５、３Ｇ３、または３Ｈ２など）、抗（ＭＵＣ１ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＭ３Ａ１またはＭ３Ｂ８など）、または抗（ＴＡＸペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＴ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２など）の、本明細書に記載の抗体の重複エピトープ、隣接エピトープ、および／または実質的に同一のエピトープ（例えば同一エピトープ）と結合する抗体、またはその抗原結合断片も本発明の範囲内である。

【０１０７】
さらに、例えば抗（ｇｐ１００ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４など）、抗（ｈＴＥＲＴペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば４Ａ９、４Ｂ４、４Ｃ２、４Ｇ９、３Ａ１２、３Ｂ１、３Ｆ５、３Ｇ３、または３Ｈ２など）、抗（ＭＵＣ１ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＭ３Ａ１またはＭ３Ｂ８など）、または抗（ＴＡＸペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＴ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２など）などの、本明細書に記載の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体

）抗体のＭＨＣ－ペプチド複合体への結合を競合的に阻害する、またはそれらと競合する抗体、またはその抗原結合断片も本発明の範囲内である。

【０１０８】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体の任意の組み合わせは、本発明の範囲内であり、例えばＭＨＣ－ペプチド複合体の異なる領域に結合する２つ以上の抗体、例えばＭＨＣ－ペプチド複合体の２つの異なるエピトープに結合する抗体、例えば２重特異性抗体である。

【０１０９】

一実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、またはその抗原結合断片は、少なくとも１つの軽鎖または重鎖免疫グロブリン（好ましくは少なくとも１つの軽鎖免疫グロブリン、および少なくとも１つの重鎖免疫グロブリン）を含む。好ましくは、各免疫グロブリンは、それぞれ抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）軽鎖または重鎖可変領域由来、すなわち抗（ｇｐ１００ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば１Ａ１１、１Ａ７、１Ａ９、１Ｃ８、１Ｄ７、１Ｇ２、２Ｂ２、２Ｃ５、２Ｄ１、２Ｆ１、Ｇ２Ｄ１２、Ｇ３Ｆ１２、Ｇ３Ｆ３、またはＧ３Ｇ４など）、抗（ｈＴＥＲＴペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えば４Ａ９、４Ｂ４、４Ｃ２、４Ｇ９、３Ａ１２、３Ｂ１、３Ｆ５、３Ｇ３、４Ｅ７、３Ｃ１０、または３Ｈ２など）、抗（ＭＵＣ１ペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＭ３Ａ１、Ｍ３Ｃ８、Ｍ２Ｂ１またはＭ３Ｂ８など）、または抗（ＴＡＸペプチド－ＭＨＣ複合体）抗体（例えばＴ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、またはＴ３Ｆ２など）の１つの可変領域由来のＣＤＲと実質的に同一の相補性決定領域（ＣＤＲ）を、少なくとも１つ、２つ、好ましくは３つ有する軽鎖または重鎖可変領域を含む。

【０１１０】

好ましい実施形態において、抗体（またはその断片）は、図１Ａから２８Ａ（軽鎖ＣＤＲ、すなわち図１Ａ、２Ａ、３Ａ、～２８Ａ）、または図１Ｂから２８Ｂ（重鎖ＣＤＲ、すなわち図１Ｂ、２Ｂ、３Ｂ、～２８Ｂ）の配列、あるいはそれらと実質的に同一の配列から選択されたアミノ酸配列を有する図１から２８に記載の抗体の軽鎖または重鎖可変領域由来のＣＤＲを少なくとも１つ、２つ、好ましくは３つ含む。抗体の重鎖および軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３に対応する配列番号を、表２から５に記載する。他の実施形態において、抗体（またはその断片）は、図１から２８に記載または上に記載の抗体の軽鎖または重鎖可変領域由来の少なくとも１つ、２つ、好ましくは３つのＣＤＲを有することができる。好ましい一実施形態において、抗体、またはその抗原結合断片は、ヒト抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、例えば図１から２８に記載の抗体由来の６つのＣＤＲ全てを含む。それらの実施形態において、ＣＤＲは、図１Ａから２８Ａ（軽鎖ＣＤＲ、すなわち図１Ａ、２Ａ、３Ａ、～３８Ａ）、または図１Ｂから２８Ｂ（重鎖ＣＤＲ、すなわち図１Ｂ、２Ｂ、３Ｂ、～３８Ｂ）のアミノ酸配列を有する。一実施形態において、抗体重鎖および軽鎖アミノ酸配列は、それぞれ本明細書に記載の抗体の関連（例えば実質的に同一または変種）重鎖および軽鎖アミノ酸配列である。

【０１１１】

他の好ましい実施形態において、抗体（またはその断片）は、図１Ａから２８Ａ（軽鎖ＣＤＲ、すなわち図１Ａ、２Ａ、３Ａ、～２８Ａ）、または図１Ｂから２８Ｂ（重鎖ＣＤＲ、すなわち図１Ｂ、２Ｂ、３Ｂ、～２８Ｂ）のアミノ酸配列と比べて、アミノ酸１０個ごとに３、２．５、２、１．５、１、または０．５以下の置換、挿入、または欠失だけ異なるアミノ酸配列を有する、図１から２８に記載の抗体の軽鎖または重鎖可変領域由来の少なくとも１つ、２つ、好ましくは３つのＣＤＲを含む。さらに、抗体、またはその抗原結合断片は、６つのＣＤＲを含むことができ、各ＣＤＲは、ヒト抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、例えば図１から２８に記載の抗体の対応するＣＤＲと比べて、アミノ酸１０個ごとに３、２．５、２、１．５、１、または０．５個以下の置換、挿入、または欠失がある点でだけ異なる。

【０１１２】

他の実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、またはその抗原結合断片の軽鎖または重鎖免疫グロブリンはさらに、図１から２８に記載の抗体の対応するフレー

ムワークと比べて、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、またはＦＲ４において、アミノ酸１０個ごとに３、２．５、２、１．５、１、または０．５以下の置換、挿入、または欠失を有する軽鎖または重鎖可変フレームワークを含むことができる。好ましい実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、またはその抗原結合断片の軽鎖または重鎖免疫グロブリンはさらに、図１から２８に記載の抗体の対応するフレームワークと同一の、軽鎖または重鎖可変フレームワーク、例えばＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、またはＦＲ４を含む。

【０１１３】

一実施形態において、軽鎖または重鎖可変フレームワークは、（ａ）例えばヒト成熟抗体、またはヒト生殖細胞系配列、あるいはコンセンサス配列由来の軽鎖または重鎖可変フレームワーク残基など、ヒト軽鎖または重鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基の少なくとも８０％、９０％、９５％、好ましくは１００％を含む軽鎖または重鎖可変フレームワーク、（ｂ）例えばヒト成熟抗体、またはヒト生殖細胞系配列、あるいはコンセンサス配列由来の軽鎖または重鎖可変フレームワーク残基など、ヒト軽鎖または重鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基の２０％から８０％、４０％から８０％、または６０％から９０％を含む軽鎖または重鎖可変フレームワーク、（ｃ）非ヒトフレームワーク（例えば齧歯動物フレームワーク）、あるいは（ｄ）例えば脱免疫化、または部分ヒト化など、例えば抗原性または細胞傷害性決定基を除去するために修飾された非ヒトフレームワークから選択することができる。

【０１１４】

一実施形態において、重鎖または軽鎖フレームワークは、図１から２８（ＡおよびＢ）に記載の配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上同一であるか、あるいは図１から２８（ＡおよびＢ）に記載のアミノ酸配列と少なくとも１または５残基但し４０、３０、２０、または１０残基未満で異なるアミノ酸配列を含む。

【０１１５】

好ましい抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体は、図１から２８（ＡおよびＢ）に示したアミノ酸配列を有する少なくとも１つ、好ましくは２つの軽鎖可変領域、および少なくとも１つ、好ましくは２つの重鎖可変領域を含み、重鎖および軽鎖の組み合わせは、示された組み合わせである。

【０１１６】

他の実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、またはその抗原結合断片の軽鎖または重鎖可変フレームワークは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、１６、または１７個の、例えばヒト成熟抗体、ヒト生殖細胞系配列、またはコンセンサス配列由来の軽鎖または重鎖可変フレームワーク残基など、ヒト軽鎖または重鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基を含む。一実施形態において、ヒト軽鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基は、ヒト生殖細胞系の同じ位置に見出される残基と同じである。好ましくは、ヒト軽鎖可変フレームワーク由来のアミノ酸残基は、その同じ位置においてヒト生殖細胞系で最も一般的な残基である。

【０１１７】

本明細書に記載の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、単独で用いることができ、例えば非誘導体化または非コンジュゲート形態で対象に投与するか、あるいはｉｎ　ｖｉｔｒｏで用いることができる。他の実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、他の機能分子、例えば他のペプチド、タンパク質、同位体、細胞、または不溶性支持体（例えばビーズ、マトリクス、またはアレイなどの平面支持体）に結合、誘導体化、または修飾することができる。例えば、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、１つまたは複数の他の分子物質、例えば特に抗体（例えばリガンドが抗体であり、２特異性または多特異性抗体を形成する場合）、毒素、放射性同位体、治療（例えば細胞傷害性または細胞増殖抑制性）薬剤または物質などに機能的に結合させることができる（例えば化学結合、遺伝子融合、非共有結合などによる）。例えば、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、放射性イオン（例えばα、γ、またはβ－放射体）、例えばヨウ素（^{1}

^{31}Ｉまたは^{125}Ｉ）、イットリウム（^{90}Ｙ）、ルテチウム（^{177}Ｌｕ）、アクチニウム（^{225}Ａｃ）、レニウム（^{186}Ｒｅ）、またはビスマス（^{211}ＢｉまたはBi）に結合させることができる。

【０１１８】

他の態様において、本発明は、薬剤として許容される担体、賦形剤、または安定剤、および少なくとも１つの本明細書に記載の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンド（例えば抗体、またはその断片）を含む、組成物、例えば薬剤組成物を提供する。好ましくは、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合しない。一実施形態において、組成物、例えば薬剤組成物は、２つ以上の前述の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの組み合わせを含む。

【０１１９】

他の態様において、本発明は、癌性病変を治療、予防、または検出するために抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、またはそのような薬剤の組み合わせをどのように用いるかについての指示書と共に、単独で用いる、あるいは他の治療様式、例えば細胞傷害性薬剤または標識化剤、例えば本明細書に記載の細胞傷害性薬剤または標識化剤と組み合わせて用いるための、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体（またはその断片）、例えば本明細書に記載の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体（またはその断片）を含むキットを特徴とする。好ましくは、抗体は、ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合しない。

【０１２０】

本発明はさらに、本明細書に記載の重鎖および軽鎖免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片をコードする核酸配列を特徴とする。例えば、本発明は、それぞれ本明細書に記載の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体の重鎖および軽鎖可変領域をコードする第１および第２の核酸を特徴とする。他の態様において、本発明は、本発明の核酸を含有する宿主細胞およびベクターを特徴とする。

【０１２１】

他の態様において、本発明は、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、またはその抗原結合断片を産生する方法を特徴とする。この方法は、重鎖可変領域、例えば本明細書に記載の重鎖可変領域をコードする第１の核酸を用意する工程、軽鎖可変領域、例えば本明細書に記載の軽鎖可変領域をコードする第２の核酸を用意する工程、および前記軽鎖および重鎖可変領域のアセンブリを可能にし、抗原結合タンパク質を形成する条件下で、宿主細胞に前記第１および第２核酸を発現させる工程を含む。第１および第２の核酸は結合している、あるいは結合していないことができ、例えばそれぞれ同じベクター、または異なるベクターに発現している。

【０１２２】

宿主細胞は、真核細胞、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または原核細胞、例えば大腸菌であることができる。例えば、哺乳動物細胞は、培養細胞または細胞系であることができる。哺乳動物細胞の例には、リンパ球細胞系（例えばＮＳＯ）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、ＣＯＳ細胞、卵母細胞、およびトランスジェニック動物由来の細胞、例えば乳腺上皮細胞が含まれる。例えば、本明細書に記載の抗体をコードする核酸は、トランスジェニック動物に発現させることができる。一実施形態において、核酸を組織特異的プロモーター（例えば乳腺特異的プロモーター）の制御下に置き、トランスジェニック動物において抗体を産生する。例えば、抗体分子は、トランスジェニック動物、例えばトランスジェニックウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、または齧歯動物の乳中に分泌される。

【０１２３】

本発明はさらに、細胞、例えば正常、良性、増殖性細胞（例えば肺、乳、腎、尿路上皮、結腸、前立腺、または肝癌および／または転移に見出される細胞）を処置、例えば除去または殺傷する方法を特徴とする。本発明の方法は、細胞を処置する、例えば除去または

殺傷するのに充分な量で、細胞を抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドに接触させる工程を含む。リガンドは、他の物質、例えば細胞傷害性物質を含むことができる。抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、細胞表面、例えば膜アンカーに融合したリガンドをコードする遺伝子でトランスフェクトされ、それによってＴ細胞がリガンド特性を有するように調整された細胞傷害性Ｔリンパ球の表面に提示されることもできる。本発明の方法は、そのような疾患を治療または予防するための有効量で、対象に抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを投与することによって、例えば疾患、例えば癌性疾患（例えば悪性または転移性疾患）あるいは非癌性疾患（例えば良性または増殖性疾患）を治療するために用いることができる。

【０１２４】

本発明の方法は、例えばｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏの培養細胞において用いることができる。例えば、癌性または転移性細胞（例えば肺、乳、腎、尿路上皮、結腸、前立腺、または肝癌性または転移性細胞）は培地中、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養することができ、接触工程は、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを培地に添加することによって達成することができる。この方法は、ｉｎ　ｖｉｖｏ（例えば治療または予防）プロトコルの一部として、対象に存在する細胞（例えば癌性または転移性細胞）に対して行うことができる。ｉｎ　ｖｉｖｏ実施形態の場合、接触工程は対象内で達成され、リガンドの細胞への結合と細胞の処置、例えば殺傷または除去との両方を可能にする有効な条件下で、対象に抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを投与する工程を含む。

【０１２５】

本発明の方法は、例えばこれに限定されるものではないが、充実性腫瘍、軟組織腫瘍、および転移性病変を含む癌性疾患を治療または予防するために用いることができる。充実性腫瘍の例には、肺、乳、リンパ、胃腸（例えば結腸）、および尿生殖路（例えば腎、尿路上皮細胞）、咽頭を冒すもの、ならびに大部分の結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸癌、および食道癌を含む腺癌などの、様々な器官系の悪性腫瘍、例えば肉腫、腺癌、および癌腫が含まれる。前述の癌の転移性病変も、本発明の方法および組成物を用いて、治療または予防することができる。

【０１２６】

対象は、哺乳動物、例えば霊長類、好ましくは高等霊長類、例えばヒト（例えば、本明細書に記載の疾患、例えば癌を有する、またはそのリスクのある患者）であることができる。

【０１２７】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、またはその断片、例えば本明細書に記載の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体、またはその断片は、全身的に（例えば経口、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、経皮、または吸入によって）、局所的に、または鼻、喉、気管支などの粘膜への塗布によって対象に投与することができる。

【０１２８】

本発明の方法はさらに、以下の１つまたは複数の減少、例えば腫瘍の大きさの減少、腫瘍マーカーの減少、例えば癌特異的抗原（ＴＡＡ）のレベルまたは癌特異的ＭＨＣ－ペプチド複合体のレベル、例えば骨のスキャンでの新しい病変出現の減少、新しい疾患関連症状出現の減少、または軟組織塊の大きさの縮小または安定化、または臨床結果の改善に関連する任意のパラメーターに関して対象をモニタする工程を含むことができる。対象は、以下の１つまたは複数の期間モニタすることができる。治療の開始前、治療中、治療の１つまたは複数の要素が投与された後である。モニタリングは、同じ抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドによるさらなる治療、または追加の薬剤による追加治療の必要性を評価するために用いることができる。一般に、上記の１つまたは複数のパラメーターの減少は、対象の状態の改善を示すものである。

【０１２９】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、非コンジュゲート形態で単独で用い、それによってＴＡＡを提示する細胞を除去または殺傷することができる。例えば、リガンドが

抗体である場合、除去または殺傷は、例えば補体媒介性細胞溶解および／またはエフェクター細胞媒介性細胞殺傷などの抗体依存性細胞殺傷機構によって媒介されることができる。他の実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、細胞を殺傷または除去するのに有効な物質、例えば細胞傷害性薬剤または部分に結合することができる。例えば、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、放射性イオン（例えばα、γ、またはβ－放射体）、例えばヨウ素（^{131}Ｉまたは^{125}Ｉ）、イットリウム（^{90}Ｙ）、ルテチウム（^{177}Ｌｕ）、アクチニウム（^{225}Ａｃ）、またはビスマス（^{213}Ｂｉ）に結合させることができる。本発明の方法および組成物は、他の治療様式と組み合わせて用いることができる。一実施形態において、本発明の方法は、前記疾患を治療または予防する有効量で、細胞傷害性薬剤と組み合わせて、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンド、例えば抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体またはその断片を対象に投与する工程を含む。リガンドおよび細胞傷害性薬剤は、同時に、または連続して投与することができる。他の実施形態において、本発明の方法および組成物は、外科的処置および／または放射線処置と組み合わせて用いられる。

【０１３０】

他の態様において、本発明は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて試料中の特定のＭＨＣ－ペプチド複合体の存在を検出する方法を特徴とする（例えば生体試料、組織生検材料、例えば癌性病変）。本方法は、本明細書に記載の疾患、例えば癌性疾患を評価する、例えば診断または病期分類するために用いることができる。この方法は、（ｉ）抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドとＭＨＣ－ペプチド複合体タンパク質との相互作用の発生を可能にする条件下で、試料（および任意選択で、参照試料、例えばコントロール試料）を本明細書に記載の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドに接触させる工程、および（ｉｉ）抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドと試料（および任意選択で、参照試料、例えばコントロール試料）との複合体の形成を検出する工程を含む。複合体の形成は、ＭＨＣ－ペプチド複合体タンパク質の存在を示すものであり、本明細書に記載の治療の適合性または必要性を示唆する可能性がある。例えば、参照試料、例えばコントロール試料と比べて、試料中の複合体形成の統計的に有意な変化は、試料中のＭＨＣ－ペプチド複合体の存在を示すものである。

【０１３１】

他の態様において、本発明は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて特定のＭＨＣ－ペプチド複合体の存在を検出する方法を提供する（例えば対象におけるｉｎ　ｖｉｖｏ画像化）。本方法は、本明細書に記載の疾患、例えば癌性疾患を評価する、例えば診断、場所限定、または病期分類するために用いることができる。この方法は、（ｉ）抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドとＭＨＣ－ペプチド複合体タンパク質との相互作用の発生を可能にする条件下で、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンド（例えば抗体、またはその抗原結合断片）を対象（および任意選択でコントロール対象）に投与する工程、および（ｉｉ）リガンドとＭＨＣ－ペプチド複合体との複合体の形成を検出する工程であって、対照、例えばコントロール対象または対象ベースラインと比べて、対象における複合体形成の統計的に有意な変化は、特定のＭＨＣ－ペプチド複合体の存在を示すものである工程を含む。

【０１３２】

他の実施形態において、本明細書に記載の疾患（例えば癌性疾患）を診断または病期分類する方法が提供される。この方法は、（ｉ）その疾患を有する、または有するリスクのある対象を同定する工程、（ｉｉ）その疾患を罹患している組織または細胞の試料を得る工程、（ｉｉｉ）リガンドとＭＨＣ－ペプチド複合体との相互作用の発生を可能にする条件下で、前記試料またはコントロール試料を抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドに接触させる工程、および（ｉｖ）相互作用を検出する工程を含む。好ましくは、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、結合ペプチドの不在下では実質的にＭＨＣと結合せず、ＭＨＣの不在下では実質的にペプチドと結合しない。例えば、ペプチドはＴＡＡであることができる。参照試料、例えばコントロール試料と比べて、リガンドとの複合体形成の統計的に有意な増加は、その疾患、またはその疾患の病期を示すものである。

【０１３３】
好ましくは、ｉｎ ｖｉｖｏおよびｉｎ ｖｉｔｒｏ診断法に用いられる抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、結合または非結合結合体の検出を容易にするために、検出可能物質で直接または間接的に標識される。適切な検出可能物質には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、および放射性材料が含まれる。一実施形態において、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、放射性イオンに結合している。他の実施形態において、リガンドは、ＮＭＲ造影剤で標識される。
【０１３４】
本発明はさらに、一連のアミノ酸および核酸配列を包含するポリペプチドおよび核酸を提供する。「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合によって連結された２つ以上のアミノ酸残基の線状ポリマーを指し、本明細書では「ペプチド」という用語は、約３０未満のアミノ酸を含む短いポリペプチドを指す。
【０１３５】
本明細書に記載のタンパク質をコードしているプラスミドは、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に従って、American Type Culture Collection（ATCC）、（10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209）に寄託することができる。
【０１３６】
「単離」または「精製」ポリペプチドまたはタンパク質は、そのタンパク質が由来した細胞または組織供給源由来の細胞材料または他の混入タンパク質を実質的に含まず、あるいは化学的に合成されたとき、化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。「実質的に含まない」とは、タンパク質の製剤が少なくとも１０％の純度であることを意味する。好ましい実施形態において、タンパク質の製剤は、約３０％、２０％、１０％、好ましくは５％（乾燥重量）未満の他のタンパク質（本明細書では「混入タンパク質」とも呼ばれる）、または化学的前駆体を含む。タンパク質またはその生物活性部分が組換えによって産生されるとき、同様に好ましくは、培地および／または混入細胞内容物（例えば組換え細胞の内因性タンパク質）を実質的に含まず、すなわち他の材料は、タンパク質製剤の容量の約２０％未満であり、より好ましくは約１０％未満であり、最も好ましくは約５％未満である。本発明は、乾燥重量で少なくとも０．０１、０．１、１．０、および１０ミリグラムの単離または精製製剤を含む。
【０１３７】
本明細書では、「天然」核酸分子は、天然に生じるヌクレオチド配列を有するＲＮＡまたはＤＮＡ分子を指す。例えば天然核酸分子は、天然タンパク質をコードする。同様に「天然」タンパク質は、天然に生じるアミノ酸配列を有するタンパク質を指す。
【０１３８】
「異種」配列は、人工的に細胞、または核酸のコンテクストに導入される配列を指す。異種配列は、内因性遺伝子のコピーであることができるが、例えば外因性プラスミドまたは内因性の位置以外の位置で染色体部位に挿入される。
【０１３９】
「単離核酸分子」または「精製核酸分子」という用語には、核酸の天然源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を含む。例えば、ゲノムＤＮＡに関して、「単離」という用語は、そのゲノムＤＮＡが本来属す染色体から分離された核酸分子を含む。
【０１４０】
本明細書では、「実質的に同一」（または「実質的に相同」）という用語は、第１および第２アミノ酸またはヌクレオチド配列が類似の活性を有するように、第２アミノ酸配列またはヌクレオチド配列と同一または等価の（例えば類似の側鎖を有する、例えば保存的アミノ酸置換）充分な数のアミノ酸残基またはヌクレオチドを含有する第１アミノ酸またはヌクレオチド配列を指す。抗体の場合、第２の抗体は、同じ特異性を有し、少なくとも５０％の親和性を有する。
【０１４１】

本明細書に開示の配列に類似または相同の（例えば少なくとも約８５％の配列同一性）配列も本出願の一部である。ある実施形態において、配列同一性は、約８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、またはそれ以上であることができる。あるいは、選択的ハイブリダイゼーション条件下で（例えば高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件）、核酸セグメントが相補鎖にハイブリダイズするとき、実質的な同一性が存在する。核酸は、全細胞、細胞溶解産物、あるいは部分的に精製された、または実質的に純粋な形態に存在することができる。

【０１４２】

２つの配列間の「相同性」または「配列同一性」（本明細書ではこれらの用語は同義的に用いられる）の算出は、以下のように行われる。配列は、最適な比較のためにアラインされる（例えば、最適アラインメントのために第１および第２アミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較のために、非相同性配列は無視することができる）。好ましい実施形態において、比較のためにアラインされる参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも３０％、好ましくは少なくとも４０％、より好ましくは少なくとも５０％、さらに好ましくは少なくとも６０％、さらに好ましくは少なくとも７０％、８０％、９０％、１００％である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第１配列のある位置が、第２配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占有されているとき、この分子はその位置において同一である（本明細書では、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と同義である）。２つの配列間の同一性パーセントは、２つの配列の最適アラインメントのために導入される必要のあるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一位置の数の関数である。

【０１４３】

配列の比較、および２つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを用いて達成することができる。好ましい実施形態において、２つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Ｂｌｏｓｓｕｍ　６２マトリクス、またはＰＡＭ２５０マトリクス、ならびにギャップウェイト１６、１４、１２、１０、８、６、または４、および長さウェイト１、２、３、４、５、または６を用い、ＧＣＧ（登録商標）ソフトウェアパッケージ（Accelrys、San Diego、CAから入手可能）のＧＡＰプログラムに組み込まれているNeedleman and Wunsch（1970）J. Mol. Biol. 48, 444-453）アルゴリズムを用いて決定される。他の好ましい実施形態において、２つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰマトリクス、ならびにギャップウェイト４０、５０、６０、７０、または８０、および長さウェイト１、２、３、４、５、または６を用い、ＧＣＧ（登録商標）ソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラムを用いて決定される。特に好ましいパラメーターの組（ある分子が本発明の配列同一性または相同性限界の範囲内にあるかどうかを判定するために適用すべきパラメーターに関して実施者が不確かである場合、用いられるべきパラメーター）は、ギャップペナルティ１２、ギャップ伸長ペナルティ４、およびフレームシフトギャップペナルティ５を用いるＢｌｏｓｓｕｍ６２スコアマトリクスである。

【０１４４】

本明細書では、「相同」という用語は「類似」と同義であり、対象となる配列が、１つまたは複数のアミノ酸置換の存在だけ参照配列と異なることを意味する（適度なアミノ酸挿入または欠失も存在できる）。現在、参照配列に対する相同性または類似性の程度を算出する好ましい手段は、アルゴリズムデフォルトまたは算出した配列関連性の有意性を求めるための推奨パラメーターを用い、いずれの場合もＢＬＡＳＴアルゴリズム（National Center of Biotechnology Information（NCBI）、National Institutes of Health、Bethesda MDから入手可能）を使用する手段である。２つのアミノ酸またはヌクレオチド配列の同一性パーセントは、ＰＡＭ１２０ウェイト残基表、ギャップ長ペナルティ１２、およびギャップペナルティ４を用い、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれているE. Meyers and W. Miller((1989) CABIOS 4, 11-17)のアルゴリズムを用いて求

めることもできる。

【０１４５】

本明細書では、「低いストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高いストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応を行うためのガイダンスは、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.（1989）6.3.1-6.3.6.に見出すことができる。水系または非水系法がこの文献に記載されており、いずれも用いることができる。本明細書に記載する特定のハイブリダイゼーション条件は以下のとおりである。１）約４５℃、６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）での低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、それに続く少なくとも５０℃（低ストリンジェンシー条件の場合、洗浄の温度は５５℃まで上げることができる）、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳによる２回洗浄、２）約４５℃、６×ＳＳＣでの中程度ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、それに続く６０℃、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳによる１回または複数回の洗浄、３）約４５℃、６×ＳＳＣでの高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、それに続く６５℃、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳによる１回または複数回の洗浄、好ましくは４）非常に高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、６５℃、０．５Ｍのリン酸ナトリウム、７％ＳＤＳ、それに続く６５℃、０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳによる１回または複数回の洗浄である。非常に高いストリンジェンシー条件（４）は好ましい条件であり、別段の指示のない限り、用いられるべき条件である。

【０１４６】

本発明の結合体ポリペプチドは、追加の保存的または非必須アミノ酸置換を有することができ、これはポリペプチド機能に実質的な影響を与えないことが理解される。特定の置換が許容されるかどうか、すなわち結合活性などの所望の生物学的特性に悪影響を与えないかどうかは、Bowie et al.（1990）Science 247, 1306-1310に記載のとおり判定することができる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によって置換されるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。

【０１４７】

「非必須」アミノ酸残基は、生物活性を排除することなく、より好ましくは生物活性を実質的に変えることなく、例えば抗体などの結合体の野生型配列から変更することのできる残基である。一方「必須」アミノ酸残基の場合はそのような変化が起こる。

【０１４８】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および請求の範囲からより明らかとなるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【０１４９】

本発明の一部では、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合して特異的に複合体のペプチド成分を認識するタンパク質を同定する方法を提供する。いくつかの実施形態では、同定されるタンパク質は抗体である。他の実施形態では、同定されるタンパク質は、抗体以外のおよび／またはＴ細胞受容体以外のタンパク質である。同定されるタンパク質は、また、例えば小ペプチド（例えば７～２５個のアミノ酸の環状または線形のペプチド）、ポリペプチド（例えば少なくとも２０個のアミノ酸のポリペプチド）または多重鎖タンパク質（例えば、少なくとも２個のペプチドまたはポリペプチドを含む）であってもよい。例えば、タ

ンパク質は、例えば小ペプチドまたは修飾されたタンパク質骨格であってよい。本発明は、例えば研究、診断、治療および予防のためにそのようなタンパク質を使う各種方法も提供する。

【０１５０】

これらのＭＨＣ－ペプチド複合体を認識する同定されたタンパク質は、複合体に結合した異なるペプチド配列を区別できる。いくつかの実施形態では、同定されたタンパク質は、複合体のＭＨＣ成分の対立遺伝子に対しても特異的または少なくとも部分的に特異的である。

【０１５１】

本発明は、特定のＭＨＣ－ペプチド複合体と結合する特定の抗体も提供する。

－ＭＨＣ－ペプチド複合体－

ＭＨＣ－ペプチド複合体は２つの成分を含む。ペプチド成分とＭＨＣ成分である。ペプチド成分は、ＭＨＣ成分の溝内に伸びたコンホメーションで結合している。ペプチド成分は、典型的には３０未満のアミノ酸で構成される。

【０１５２】

ＭＨＣ成分は、主要組織適合複合体である。ＭＨＣ複合体には２つの主要なクラスがある。クラスＩとクラスＩＩである。各々の複合体は、２つのポリペプチド鎖のヘテロダイマーを含む。

【０１５３】

クラスＩ複合体は、αポリペプチドとβ２－ミクログロブリンから作られる。αポリペプチドは、３つの細胞外球状領域、α１、α２およびα３を有する膜貫通タンパク質である。各α鎖は、小さな細胞外タンパク質であるβ２－ミクログロブリンと非共有結合で結合している。α鎖は、また、非常に多形性である。クラスＩ分子は、ほとんど全ての有核細胞の表面に存在する。

【０１５４】

ペプチドと結合しているクラスＩ複合体の三次元結晶構造が、例えばBjorkman et al. (1987) Nature 329: 506-512に記載されている。約８～１０個のアミノ酸のペプチドが、ペプチド結合部位に伸びたコンホメーションで結合している。

【０１５５】

クラスＩＩ分子は、２つの鎖、αとβから作られる。両方の鎖は、膜貫通領域、免疫グロブリン領域とアミノ末端ペプチド結合領域を含む。両鎖のペプチド結合領域は多形性である。クラスＩＩ分子は、Ｂリンパ球とマクロファージなどの限られた抗原提示細胞の表面に存在する。

【０１５６】

ペプチドが結合しているクラスＩＩ複合体の三次元結晶構造が、例えばFremont et al. (1998) Immunity 8: 305-17に記載されている。クラスＩＩ分子のペプチド結合部位は、クラスＩ分子のそれに似ている。しかし、それはより長く（例えば１５～２４のアミノ酸）、より異質のペプチドを結合することができる。

【０１５７】

ペプチド成分は、抗原の細胞内プロセシングによる産物である。ＴＡＰ経路は、細胞表面に分泌されるＭＨＣ複合体がプロセシングされた抗原からのペプチド成分を確実に含むようにする。このように、プロセシングされた抗原は細胞表面に提示され、細胞内含有物が異物または異所性であるかを免疫系に示す。

【０１５８】

Ｔ細胞は、特異的にＭＨＣ－ペプチド複合体を認識するＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を含む。各Ｔ細胞受容体は、ＭＨＣ提示ペプチドに対し独自の特異性を有する。複合体を認識したＴ細胞受容体はＴ細胞を活性化して、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）の場合、認識された抗原ペプチドを提示する細胞を殺す。

ＭＨＣ複合体と癌

【０１５９】

腫瘍細胞は、非腫瘍細胞と比較して異なって腫瘍細胞内に発現される抗原によって同定できる。これらの抗原の一部はプロテアソームによってペプチド断片にされ、これらの断片はＭＨＣ分子と組み合わされてＭＨＣ複合体として細胞表面に提示される。これらの抗原は、「腫瘍関連抗原」またはＴＡＡと呼ばれ、Ｔ細胞によって特異的に認識されるエピトープを提示する。Renkvist et al. (2001) Cancer Immunol Immunother 50: 3-15は、多くの公知のＴ細胞限定エピトープを表にしている。この文献に記載されている方法を使用して、これらのＴ細胞限定エピトープ、例えば、ＭＨＣ分子と結合してエピトープのペプチド成分を特異的に認識する免疫グロブリンなどを特異的に認識するタンパク質リガンドを同定できる。

【０１６０】

治療への応用では、腫瘍特異性Ｔ細胞限定エピトープは腫瘍細胞を周辺の正常細胞から識別する。したがって、これらのエピトープの１つを特異的に認識するタンパク質リガンドは、正常細胞、特に周辺正常細胞ではなく腫瘍細胞に特異的に細胞毒の活性を届けることができる。診断と研究への応用では、タンパク質リガンドによる腫瘍特異性Ｔ細胞定義エピトープの認識により腫瘍細胞の存在が特定される。

【０１６１】

腫瘍に対する自然のＴ細胞媒介反応性が観察されたケースがいくつかある（Boon and van der Bruggen (1996) J Exp Med 183: 725-9; Rosenberg (2001) Nature 411: 380-4; Renkvistet al. (2001) Cancer Immunol Immunother 50: 3-15）。それ故に、Ｔ細胞媒介癌療法を考案することが望ましい。特に、Ｔ細胞細胞毒性を癌細胞に向かわせるために特定のペプチド－ＭＨＣ複合体を特異的に認識するタンパク質リガンドを使用する。（下記「Ｔ細胞再プログラミング」も参照）。

ＭＨＣ複合体と病原体

【０１６２】

ＭＨＣ複合体は、病原体、特にウィルス、細胞内のバクテリアおよび他の生物など細胞内の病原体の抗原に由来するペプチド断片も提示する。このように、ＭＨＣタンパク質は、ある場合には生活史のかなりの部分を感染細胞内ですごして免疫監視機構を避けようとする病原体に対して、自然の防御を提供する。さらに、多くの場合、病原体は長期間細胞内に潜伏できる。

【０１６３】

ＭＨＣタンパク質上に提示された場合、病原体に由来するペプチドを特異的に認識するタンパク質リガンドを、治療および診断で使うことができる。癌細胞への応用で記載されているように、タンパク質リガンドは、感染細胞を殺すために細胞毒を送達するために使用できる。それに加えて、タンパク質リガンドは、対象（患者）内の感染細胞の場所を特定するｉｎ　ｖｉｖｏ画像化のため、またｉｎ　ｖｉｔｒｏで感染細胞を検出するためにまたは病原体に由来するプロセシングされたペプチドを検出するために標本を検査するのに使用できる。

【０１６４】

－ＭＨＣ－ペプチド結合タンパク質の同定－

本発明は、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合するタンパク質リガンドの同定方法を提供する。この方法は、特定のペプチドが複合体に存在する場合だけ結合するが、特定のペプチドが存在しない場合、および他の重複しないもしくは無関係なペプチドが存在する場合にはタンパク質リガンドの同定に使用できる。多くの場合、同定されるタンパク質は、少なくとも部分的に特異的である。典型的な同定されるタンパク質は、特定のペプチドが存在するならば、また特定のペプチドと比較して２つの置換基を有する関連ペプチドが存在するならば、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合できる。

【０１６５】

同定されるタンパク質は、小ペプチド（例えば７～２０個のアミノ酸のペプチド）、ポリペプチド（例えば少なくとも２０個のアミノ酸のポリペプチド）または多重鎖タンパク質（例えば、少なくとも２個のペプチドまたはポリペプチドを含む）であってよい。

【０１６６】
発明者は予想外にも、生殖細胞系とくらべて変異が皆無かあってもわずかな免疫グロブリン遺伝子を発現しているＢ細胞のｍＲＮＡから作製された提示ライブラリーから、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合する多数のヒトＦａｂ断片を発見した（下記の「実施例」を参照）。他の特徴の中でも、これらの発見は、ペプチド提示のための単鎖ＭＨＣ複合体をスクリーニングに利用すること、および免疫化していない対象、特に標的であるＭＨＣ－ペプチド複合体と同じＭＨＣ対立遺伝子を有する対象から構築された提示ライブラリーを利用することを示している。
【０１６７】
この方法では、ライブラリー（例えば、発現ライブラリーや提示ライブラリー）を用意し、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合するポリペプチド成分を有する構成メンバーを同定するために、ライブラリーをスクリーニングする。
【０１６８】
このスクリーニングは、多くの方法で実施できる。
一実施形態では、細菌によって産生されたＭＨＣクラスＩαポリペプチドとβ２－ミクログロブリンを、例えば細菌の封入体から精製する。これらのタンパク質は、ＭＨＣ－ペプチド複合体のペプチド成分存在下で、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで変性されて再び折りたたまれる（リフォールディングされる）。さらに、α鎖とβ２ミクログロブリンは、例えばDenkberg and Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30: 3522-32に記載されているように、例えば約１５個のアミノ酸リンカーによって共有結合で結合できる。この鎖の１つ（例えばα鎖）は、ビオチン化されたＢｉｒＡ配列またはヘキサ－ヒスチジン標識などの精製ハンドルを含むことができる。この精製された複合体で提示ライブラリーを選別し、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合するライブラリーの構成メンバーを同定することができる。
【０１６９】
細菌からの精製とリフォールディングは、ＭＨＣ－ペプチド複合体の均一性を改善する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで複合体に取り込まれる特定の対象とするペプチドは、ＭＨＣ複合体との結合をめぐって多数の細胞内ペプチドと競争する必要はなく、その結果、例えば提示ライブラリーを結合させるための同質の標的となる。
【０１７０】
他の実施形態では、対象とする細胞（例えば癌細胞または感染細胞）を支持体に付着させ、細胞を提示ライブラリーと接触させる。細胞と結合するライブラリーの構成メンバーを単離して特性分析を行う。例えば、細胞は患者から単離するか、または病気の実験室モデルを使用して調製できる。
【０１７１】
他の実施形態では、ＴＡＰ２活性欠損組織培養細胞が使われる。例えば、ＲＭＡＳ－ＨＨＤ細胞が使用できる。これらの細胞に、対象とする対立遺伝子のＭＨＣタンパク質を発現する核酸を導入する。トランスフェクションされた細胞に対象とするペプチドを負荷する。その後、提示ライブラリーを細胞に接触させ、その細胞と特異的に結合する提示ライブラリーメンバーを同定する。他の実施形態では、対象とするポリペプチドをコードする遺伝子が細胞中に同時トランスフェクションされてその中で発現する。この細胞は当然ポリペプチドに対してプロセシングを行い、プロセシングされたペプチドをＭＨＣクラスＩとの関連で提示する。
【０１７２】
この方法では、ライブラリーを用意して、ライブラリーをスクリーニングしてＭＨＣ－ペプチド複合体と結合するタンパク質をコードする構成メンバーを同定する。好ましくは、タンパク質はＭＨＣに結合したペプチドがない場合はＭＨＣとは実質的に結合せず、ＭＨＣがない場合にはペプチドと実質的に結合しない。このペプチドは、例えばＴＡＡであってもよい。このスクリーニングは、多くの方法で実施できる。例えば、ライブラリーは提示ライブラリーであってよい。
【０１７３】

複合体のＭＨＣ成分にタグをつけて組換えで発現させてもよい。この組換えＭＨＣはペプチド、例えば合成ペプチド、と再構成される。ＭＨＣ－ペプチド複合体は支持体、例えば正磁性ビーズまたは他の磁気応答性粒子に付着される。

【０１７４】

ＭＨＣ複合体は、細胞表面で発現されてもよい。提示ライブラリーは、例えばＭＨＣ複合体が対象とするペプチドを提示する場合のみ、細胞に特異的に結合する構成メンバーを同定するためにスクリーニングできる。

【０１７５】

－提示ライブラリー－

提示ライブラリーは、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合して複合体のペプチド部分を認識するタンパク質を同定するために使用される。提示ライブラリーは実体の集合であり、各実体には、接近可能な多様化タンパク質成分とこのタンパク質成分をコードするか同定できる成分が含まれる。タンパク質成分はどんな長さでもよく、例えば３アミノ酸でも３００以上のアミノ酸でもよい。選択では、ライブラリーの各構成メンバーの変化にとんだタンパク質成分はＭＨＣ－ペプチド複合体でプローブされ、多様化タンパク質成分がＭＨＣ－ペプチド複合体と結合するならば、提示ライブラリーメンバーは一般的には支持体に保持されることによって同定される。

【０１７６】

保持された提示ライブラリーメンバーは支持体から回収されて分析される。分析には、類似したまたは異なる条件下での増幅と以降の選択を含めてよい。例えば、正と負の選択を交互に行ってよい。分析には、詳細な特性分析のために、多様化タンパク質成分のアミノ酸配列の決定およびポリペプチド成分の精製も含まれてよい。

【０１７７】

様々なフォーマットが提示ライブラリーで使用できる。実施例には以下が含まれる。

ファージ提示：フォーマットの１つはウィルス、特にバクテリオファージを利用する。このフォーマットは、「ファージ提示」と呼ばれる。多様化タンパク質成分は、典型的には共有結合でバクテリオファージコートタンパク質と結合している。このリンケージは、コートタンパク質と融合した多様化タンパク質成分をコードする核酸の翻訳から起こる。このリンケージには、可撓性のペプチドリンカー、プロテアーゼ部位または終止コドンの抑制の結果として取り込まれたアミノ酸が含まれてよい。ファージ提示が記載されている。例えば、Ladner et al., 米国特許第5,223,409号; Smith (1985) Science 228: 1315-1317; 国際出願92/18619; 国際出願91/17271; 国際出願92/20791; 国際出願92/15679; 国際出願93/01288; 国際出願92/01047; 国際出願92/09690; 国際出願90/02809; de Haard et al. (1999) J. Biol. Chem 274: 18218-30; Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4: 1-20; Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2: 371-8; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3: 81-85; Huse et al. (1989) Science 246: 1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J12: 725- 734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89: 3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Rebar et al. (1996) Methods Enzymol. 267: 129-49; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; Barbas et al. (1991) PNAS 88: 7978-7982。

【０１７８】

ファージ提示システムは、繊維状ファージ（ファージｆ１、ｆｄおよびＭ１３）ならびに他のバクテリオファージ（例えばＴ７バクテリオファージおよびラムドイドファージ）のために開発されている（Santini (1998) J. Mol. Biol. 282: 125-135; Rosenberg et al. (1996) Innovations 6: 1-6; Houshm et al. (1999) Anal Biochem 268: 363-370を参照）。繊維状ファージ提示システムは、一般的に遺伝子ＩＩＩタンパク質などのマイナーなコートタンパク質、および主要なコートタンパク質である遺伝子ＶＩＩＩタンパク質との融合を利用するが、遺伝子ＶＩタンパク質、遺伝子ＶＩＩタンパク質、遺伝子ＩＸタ

ンパク質またはその領域など他のコートタンパク質との融合も利用できる（国際出願00/71694を参照）。好ましい実施形態では、融合は遺伝子ＩＩＩタンパク質の領域、例えばアンカー領域または「根っこ」との間で起こる（遺伝子ＩＩＩタンパク質アンカー領域の記載に関しては、米国特許第5,658,727号を参照）。

【０１７９】

多様化タンパク質成分の結合価数も制御できる。多様化タンパク質成分をコードしている配列を完全なファージゲノムにクローニングすると変異体が複数提示されるが、それは遺伝子ＩＩＩタンパク質の全てのコピーが多様化タンパク質成分と融合するからである。価数を減らすには、ファージミド系を利用できる。この系では、遺伝子ＩＩＩと融合した多様化タンパク質成分をコードする核酸がプラスミド、一般的に７００ヌクレオチド未満の長さのプラスミドに提供される。このプラスミドはファージ複製開始点を含み、プラスミドを有する細菌細胞にヘルパーファージ（例えばＭ１３Ｋ０１）を感染させるとプラスミドはバクテリオファージ粒子に取り込まれる。このヘルパーファージは、遺伝子ＩＩＩならびにファージ複製および構築に必要な他のファージ遺伝子の無傷のコピーを提供する。ヘルパーファージはその複製開始点に欠陥があり、野生型の起点を持つプラスミドと比較して、このヘルパーファージゲノムは効率的にファージ粒子に取り込まれない。

【０１８０】

多様化タンパク質成分を示しているバクテリオファージは増殖させ、標準のファージ調製方法、例えば生育培地からのＰＥＧ沈降を使用して回収することができる。

【０１８１】

個々の提示ファージの選択の後、選択された多様化タンパク質成分をコードする核酸は、選択されたファージを使って細胞に感染させることによって、個々のコロニーまたはプラークを選択し、核酸を単離して配列決定できる。

【０１８２】

細胞ベースの提示：他のフォーマットでは、ライブラリーは細胞提示ライブラリーである。タンパク質は、細胞、例えば真核細胞または原核細胞の表面に提示される。典型的な原核細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）細胞、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ（枯草菌）細胞および芽胞である（例えば、Lu et al. (1995) Biotechnology 13: 366を参照）。典型的な真核細胞は、酵母（例えばＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ、ＨａｎｓｅｕｌａまたはＰｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）である。酵母表面提示は、例えばBoder and Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15: 553-557に記載されている。２００１年１０月１日出願の米国特許仮出願第60/326,320号は、Ｆａｂ断片のような免疫グロブリンタンパク質の提示に使える酵母提示システムを記載している。

【０１８３】

一実施形態では、免疫グロブリン可変領域をコードする核酸は、酵母提示ベクターにクローニングされる。クローニングでは、可変領域の少なくとも１つをコードしている核酸と、酵母細胞表面タンパク質、例えばＦｌｏ１、ａ－ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ、α－ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎの断片、またはそれに由来する断片、例えばＡｇａ２ｐおよびＡｇａ１ｐをコードする核酸とを結合する。これらのタンパク質の領域は、多様な核酸配列によってコードされているポリペプチドを、ＧＰＩアンカー（例えば、ａ－ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎ、α－ａｇｇｌｕｔｉｎｉｎまたはそれに由来する断片、例えばＡｇａ２ｐとＡｇａ１ｐ）により膜貫通領域（例えばＦｌｏ１）を通してつなぎ留めることができる。ベクターは、細胞表面に２つのポリペプチド鎖が発現され、鎖の１つが酵母細胞表面タンパク質に結合するように構成できる。例えば、これら２つの鎖は免疫グロブリン鎖であってよい。

【０１８４】

リボソーム提示：ＲＮＡとそのＲＮＡによってコードされるポリペプチドは、ＲＮＡを翻訳中のリボゾームまたはできたばかりのポリペプチドがまだ付着しているリボソームを安定させることによって、物理的に連結することができる。一般的に、高濃度の二価Mg^{2+}と低温が使われる。例えば、Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. US

A 91: 9022とHanes et al. (2000) Nat Biotechnol. 18: 1287-92;Hanes et al. (2000) Methods Enzymol. 328: 404-30およびSchaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231(1-2): 119-35を参照。

【０１８５】

ペプチド－核酸の融合：他のフォーマットは、ペプチド－核酸融合を利用する。ポリペプチド－核酸融合は、例えばRoberts and Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297-12302および米国特許第6,207,446号に記載されているように、共有結合で結合したピューロマイシン基を含むｍＲＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏ翻訳によって起こすことができる。このｍＲＮＡをその後ＤＮＡに逆転写し、ポリペプチドと架橋することができる。

【０１８６】

他の提示フォーマット：他の提示フォーマットは、多様化タンパク質成分にポリペプチドを同定する非核酸タグを付加した、非生物的提示である。例えば、このタグはポリペプチドを提示するビーズに付着した化学タグまたは高周波タグでよい（例えば、米国特許第5,874,214号参照）。

【０１８７】

足場：足場領域を評価する基準には下記が含まれる。（１）アミノ酸配列、（２）いくつかの相同領域の配列、（３）三次元構造および／または（４）ある範囲のｐＨ、温度、塩分、有機溶剤濃度およびオキシダント濃度における安定性データ。一実施形態では、足場領域は小さな、安定したタンパク質領域、例えば１００、７０、５０、４０または３０未満のアミノ酸のタンパク質である。この領域には１つまたは複数のジスルフィド結合が含まれてもよいし、金属、例えば亜鉛とキレートを形成してもよい。

【０１８８】

提示のための足場には、下記が含まれてよい。抗体（例えばＦａｂ断片、単鎖Ｆｖ分子（ｓｃＦＶ）、単一領域抗体、カメリド（ｃａｍｅｌｉｄ）抗体とカメライズド（ｃａｍｅｌｉｚｅｄ）抗体）；Ｔ細胞受容体；ＭＨＣタンパク質本体;細胞外領域（例えば、フィブロネクチンＩＩＩ型反復、ＥＧＦ反復）;プロテアーゼインヒビター（例えばクーニッツ領域、エコチン（ｅｃｏｔｉｎ）、ＢＰＴＩ、その他）；ＴＰＲ反複；トリフォイル（ｔｒｉｆｏｉｌ）構造;ジンクフィンガー領域；ＤＮＡ結合性タンパク質;特に単量体ＤＮＡ結合タンパク；ＲＮＡ結合タンパク質;酵素、例えば、プロテアーゼ（特に不活化プロテアーゼ）、ＲＮアーゼ；シャペロン、例えばチオレドキシンおよび熱ショックタンパク質；ならびに細胞内のシグナリングドメイン（例えばＳＨ２とＳＨ３ドメイン）。

【０１８９】

小さな足場ドメインの例には以下が含まれる。クーニッツ領域（５８個のアミノ酸、３個のジスルフィド結合）、Ｃｕｃｕｒｂｉｄａ　ｍａｘｉｍａトリプシンインヒビター領域（３１個のアミノ酸、３個のジスルフィド結合）、グアニリン関連ドメイン（１４個のアミノ酸、２個のジスルフィド結合）、グラム陰性菌からの熱安定性エンテロトキシンＩＡ関連ドメイン（１８個のアミノ酸、３個のジスルフィド結合）、ＥＧＦドメイン（５０個のアミノ酸、３個のジスルフィド結合）、クリングルドメイン（６０個のアミノ酸、３個のジスルフィド結合）、菌類の炭水化物結合性ドメイン（３５個のアミノ酸、２個のジスルフィド結合）、エンドセリンドメイン（１８個のアミノ酸、２個のジスルフィド結合）および連鎖球菌性Ｇ　ＩｇＧ結合性ドメイン（３５個のアミノ酸、０個のジスルフィド結合）。

【０１９０】

小さな細胞内足場ドメインの例には、ＳＨ２、ＳＨ３およびＥＶＨドメインが含まれる。通常、どのようなモジュールドメインでも、細胞内であれ細胞外であれ、使用できる。

【０１９１】

足場ドメインは、合成ペプチドを含むことができる。「合成ペプチド」は、３０以下のアミノ酸の人工ペプチドである。合成ペプチドは、１つまたは複数のジスルフィド結合を含むことができる。他の合成ペプチド、いわゆる「線形ペプチド」は、システインが欠けている。合成ペプチドは、溶液中ではほとんど構造を有さないか（例えば、構造化されて

いない）、異質の構造を有するか（例えば、交互コンホメーションもしくは「ゆるい構造」）、または特異な自然の構造を有す（例えば、協同的に折りたたまれている）。若干の合成ペプチドは、標的分子に結合すると特定の構造を示す。いくつかの典型的な合成ペプチドは、１個のジスルフィド結合と約４～１２個の非システイン残基のループを有する、いわゆる「環状ペプチド」である。以下の配列が一例であり、

【０１９２】

Ｘａａ－Ｘａａ－Ｘａａ－Ｃｙｓ－（Ｘａａ）ｎ－Ｃｙｓ－Ｘａａ－Ｘａａ－Ｘａａ

式中、Ｘａａはいかなる非システインアミノ酸でもよく、ｎは４と１２の間の整数である。アミノ酸の選択は各位置で変更でき、例えば１８個以下のアミノ酸の混合体に変更できる。米国特許第5,223,409号も、足場として機能する他のジスルフィド結合したペプチドおよびポリペプチドを各種記載している。

【０１９３】

他の有用な足場ドメインは、免疫グロブリン（Ｉｇ）ドメインである。提示のために免疫グロブリンドメインを使用する方法は、下記に記載されている（例えば、「抗体提示ライブラリー」を参照）。

【０１９４】

提示テクノロジーは、リガンド、例えば標的の特定のエピトープに対する抗体リガンドなどを得るためにも利用できる。このことは、例えば特定のエピトープを欠いているかエピトープ内で例えばアラニンが突然変異している競合的非標的分子を用いることで可能である。このような非標的分子は、以下に記載するように、負の選択手法の中で、提示ライブラリーを標的に結合する場合は競合分子として、または、例えば洗浄液中の標的に非特異的な解離する提示ライブラリーメンバーを捕獲するために予備溶出剤として使用できる。

【０１９５】

反復選択：好ましい一実施形態では、提示ライブラリー手法は反復して使われる。最初の提示ライブラリーは、標的の１つまたは複数のリガンドを同定するために使用される。これらの同定されたリガンドは、その後突然変異方法を使用して変更されて第２の提示ライブラリーが形成される。その後、より高い親和性のリガンドが、例えばよりストリンジェントまたは競合的な結合条件および洗浄条件を用いて、第２のライブラリーから選択される。

【０１９６】

若干の実施形態では、突然変異誘発は結合面にあることが知られているかその可能性がある領域が目標である。例えば、同定されるリガンドが抗体であるならば、本明細書で記載されているように、突然変異誘発は重鎖または軽鎖のＣＤＲ領域を目標にすることができる。さらに、突然変異誘発はＣＤＲの近くまたは隣接するフレームワーク領域を目標にすることができる。抗体の場合、突然変異誘発は、例えば段階的に正確に改良するために、ＣＤＲの１つまたは少数に限定することもできる。同様に、同定されたリガンドが酵素であるならば、突然変異誘発は活性部位と周辺を目標にすることができる。

【０１９７】

いくつかの典型的な突然変異生成手法には、以下が含まれる。誤りがちのＰＣＲ（Leung et al. (1989) Technique 1: 11-15）、組換え、ランダム開裂を利用したＤＮＡシャフリング（Stemmer (1994) Nature 389-391; 「核酸シャフリング」と呼ぶ、ＲＡＣＨＩＴＴ（商標）（Coco et al. (2001) Nature Biotech. 19: 354）、部位特定突然変異誘発（Zooler et al. (1987) Nucl Acids Res 10: 6487-6504）、カセット式変異誘発（Reidhaar-Olson (1991) Methods Enzymol. 208：564-586）および変性オリゴヌクレオチドの組み込み（Griffiths et al. (1994) EMBO J 13: 3245）。

【０１９８】

反復選択の一例では、本明細書で記載される方法は、まず、多様化タンパク質成分に対する最小の結合特異性または活性、例えば１ｎＭ、１０ｎＭもしくは１００ｎＭの結合平衡解離定数を有する、ＭＨＣ－ペプチド複合体結合タンパク質リガンドを提示ライブラリ

ーから同定するために使用される。最初の同定されたタンパク質リガンドをコードする核酸配列が、例えば最初のタンパク質リガンドと比較して特性（例えば結合能、動態または安定性）が強化された第２のタンパク質リガンドを同定するために、変異の導入のために鋳型核酸として使用される。

【０１９９】

オフレート選択：遅い解離速度は、特にポリペプチドとその標的の間の相互作用に関して高親和性を予想させるので、本明細書で記載される方法は、標的に対する結合相互作用に関して望ましい動力学的解離速度（すなわち、低下した）を有するリガンドを単離するために使用できる。

【０２００】

解離が遅いリガンドを提示ライブラリーから選択するために、ライブラリーは固定化標的に接触させる。固定化標的は、その後非特異的または弱く結合した生体分子を取り除く第１の溶液で洗浄する。その後、固定化標的は遊離標的、つまり粒子に結合していない標的複製物の飽和量を含む第２の溶液で溶出される。遊離標的は、標的から解離する生体分子と結合する。再結合は、固定標的の非常に薄い濃度と比較して、遊離標的の飽和量によって効果的に阻止される。

【０２０１】

第２の溶液の状態は、実質上生理的、またはストリンジェントであってよい。一般的に、第２の溶液の状態は、第１の溶液のそれと同一である。第２の溶液の画分は、早期の画分と後期の画分を区別するために、経時的に採取される。後期の画分には、早期画分中の生体分子より遅い速度で標的から解離する生体分子が含まれる。

【０２０２】

さらに、長期インキュベーションの後でさえ標的に結合したままの提示ライブラリーメンバーを回収することも可能である。これらはカオトロピックな条件を使って解離できるか、または標的に付着したまま増幅することができる。例えば、標的に結合したファージは、細菌細胞に接触させることができる。

【０２０３】

特異性のための選択またはスクリーニング：本明細書に記載の提示ライブラリーのスクリーニング法は、非標的分子と結合する提示ライブラリーメンバーを捨てる選択工程またはスクリーニング工程を含むことができる。非標的分子の例として下記が含まれる。（ｉ）ＭＨＣに結合していないＴＡＡペプチド;（ｉｉ）ペプチドに結合していないＭＨＣ;（ｉｉｉ）対象とするペプチドとは異なるペプチドと結合しているＭＨＣ;および（ｉｖ）対象とするペプチドと結合しているが、対象とするＭＨＣと異なる対立遺伝子を有するＭＨＣ。

【０２０４】

一実施例では、標的ＭＨＣ－ペプチド複合体と関連非標的分子および関連するが異なる非標的分子とを識別するために、いわゆる「負の選択」の段階が使用される。提示ライブラリーまたはそのプールは、非標的分子に接触させられる。非標的と結合しないサンプルの構成メンバーが採取され、後の標的分子との結合の選択、または後の負の選択のためにも使われる。負の選択の段階は、標的ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合するライブラリーメンバーの選択の前でも後でもよい。

【０２０５】

他の実施例では、スクリーニングの段階が使われる。提示ライブラリーメンバーが標的ＭＨＣ－ペプチド複合体との結合のために単離された後、各単離されたライブラリーメンバーは、非標的分子（例えば、上記非標的）と結合する能力が試験される。例えば、高スループットＥＬＩＳＡスクリーンがこのデータの取得のために用いられる。このＥＬＩＳＡスクリーンは、各ライブラリーメンバーと標的との結合のための量的データを取得するためにも使用できる。非標的および標的との結合データは、標的ＭＨＣ－ペプチド複合体と特異的に結合するライブラリーメンバーを同定するために、例えば、コンピュータとソフトウェアを使用して比較できる。

【０２０６】
－多様性－
提示ライブラリーには、提示されたポリペプチド中の１つまたは複数の位置の変異が含まれる。
【０２０７】
特定位置の変異は合成されたものでも自然でもよい。若干のライブラリーでは、合成の多様性および自然の多様性が含まれる。
【０２０８】
合成多様性：ライブラリーには、人工合成の配列に由来する多様な核酸配列の領域が含まれてよい。一般的に、これらは変性オリゴヌクレオチド母集団から形成され、これには所定の各位置のヌクレオチドの分布が含まれる。分布に関して所定の配列が含まれるかどうかはランダムである。合成の多様性の変性した供与源の一例は、ＮＮＮを含むオリゴヌクレオチドであり、Ｎは等しい割合の４つのヌクレオチドのいずれかである。
【０２０９】
合成の多様性は、例えば核酸配列の所定のトリヌクレオチドにおけるコドン数をＮＮＮよりも小さい分布に制限するために、より制約的であってもよい。例えば、このような分布は、コドンのある位置の４つ未満のヌクレオチドを使って構築できる。さらに、トリヌクレオチド追加手法は、さらに分布を制約するために使用できる。
【０２１０】
いわゆる「トリヌクレオチド追加手法」は、例えばWells et al. (1985) Gene 34: 315-323、米国特許第 4,760,025号および第5,869,644号に記載されている。オリゴヌクレオチドは、固相支持体上で一度に１つのコドン（すなわちトリヌクレオチド）が合成される。支持体には合成のための多くの官能基が含まれるので、多くのオリゴヌクレオチドが平行して合成される。支持体は、まず第１の位置のコドンのセットを含む混合液を含有している溶液にさらされる。このユニットは保護されているので、別のユニットが追加されない。第１の混合液を含有している溶液が洗い流されると固相支持体は脱保護されるので、第２の位置のコドンセットを含有している第２の混合液を付着している第１のユニットに加えることができる。この方法は、順番に複数のコドンをアセンブルするために繰り返される。トリヌクレオチド追加手法は、所定の位置で多くのアミノ酸をコードする核酸の合成を可能にする。これらのアミノ酸の頻度は、混合液中のコドンの比率によって制御できる。さらに、所定位置のアミノ酸の選択は、単一ヌクレオチドの混合物が合成の間に追加される場合がそうであるように、コドンテーブルの象限に制限されない。
【０２１１】
自然の多様性：ライブラリーには、異なる自然配列に由来する（またはそれに基づいて合成される）多様な核酸配列の領域が含まれてよい。提示ライブラリーに含まれてよい自然の多様性の例は、免疫細胞に存在する配列多様性である（以下も参照）。核酸はこれらの免疫細胞から調製され、ポリペプチド提示のためのフォーマットに組み込まれる。自然の多様性のもう１つの例は、異なる生物種で見られる配列の多様性である。例えば、多様な核酸配列は、土壌などの環境サンプルから増幅でき、それを提示ライブラリーの構築に使用できる。
【０２１２】
－抗体提示ライブラリー－
一実施形態では、提示ライブラリーは多様なポリペプチドのプールを提供し、それぞれは１つの免疫グロブリン領域、例えば免疫グロブリン可変領域を含む。提示ライブラリーは、例えばヒト抗原を認識するヒト抗体または「ヒト化」された抗体を同定するために特に有用である。このような抗体は癌のようなヒトの疾患を治療するための治療用物質として利用できる。抗体の定常領域と枠組み（フレームワーク）領域はヒトのものなので、これらの治療用抗体は自身が抗原として認識され標的とされるのを避けることができるであろう。定常部は、ヒト免疫系のエフェクター機能を入れるために最適化もされる。ｉｎｖｉｔｒｏでの提示選択過程は、正常ヒト免疫系が自己抗原に対して抗体を十分に産生で

きないことを克服する。

【０２１３】

典型的抗体提示ライブラリーは、ＶＨドメインおよびＶＬドメインを含むポリペプチドを提示する。「免疫グロブリンドメイン」は、免疫グロブリン分子の可変ドメインまたは定常ドメインの１ドメインを指す。免疫グロブリンドメインは、一般的に、約７つのβ鎖と保存された１つのジスルフィド結合で形成される２つのβシートを含む（例えば、A. F. Williams and A. N. Barclay 1988 Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405を参照）。提示ライブラリーは、抗体をＦａｂ断片（例えば、２つのポリペプチド鎖を使って）または単鎖Ｆｖ（例えば、単一のポリペプチド鎖を使って）として提示できる。他のフォーマットも使用できる。

【０２１４】

Ｆａｂと他のフォーマットの場合のように、提示された抗体は軽鎖または重鎖の一部として定常部を含むことができる。一実施形態では、例えばＦａｂの場合のように、各鎖は１つの定常部を含む。他の実施形態では、更なる定常部が提示される。

【０２１５】

抗体ライブラリーは、多くの方法で構築できる（例えば、国際出願00/70023号を参照）。さらに、各方法の要素は、他の方法の要素と組み合わせることができる。これらの方法は、変異が単一の免疫グロブリン領域（例えばＶＨもしくはＶＬ）または複数の免疫グロブリン領域（例えばＶＨもしくはＶＬ）に導入されるように利用できる。変異は、免疫グロブリン可変領域、例えば１つまたは複数のＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４の領域に、重鎖および／または軽鎖可変領域のそのような領域を参考にして、導入できる。一実施形態では、変異は所定の可変領域の３つのＣＤＲ（相補性決定領域）全てに導入される。他の好ましい実施形態では、変異は、例えば重鎖可変ドメインのＣＤＲ１およびＣＤＲ２に導入される。いかなる組み合わせも可能である。１つの方法では、抗体ライブラリーは、ＣＤＲをコードする多様なオリゴヌクレオチドを核酸の対応する領域に挿入することによって構築される。このオリゴヌクレオチドは、単量体のヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを使って合成できる。例えば、Knappik et al. (2000) J. Mol. Biol. 296: 57-86は、ＣＤＲをコードするオリゴヌクレオチドを構築する方法として、トリヌクレオチド合成およびそのオリゴヌクレオチドを受容するための遺伝子操作された制限部位を有する鋳型を使った方法を記載している。

【０２１６】

他の方法では、動物、例えば齧歯動物を特定のペプチドを含むＭＨＣ－ペプチド複合体、またはＭＨＣと結合したその表面に特定のペプチドを提示する細胞で免疫化する。この細胞は、ＭＨＣタンパク質の特定の対立遺伝子を持つことができる。動物は、さらに応答を刺激するために、任意に抗原を追加投与される。その後、脾細胞が動物から単離され、提示ライブラリーでの発現のためにＶＨおよび／またはＶＬドメインをコードしている核酸を増幅してクローン化する。当然、この場合、標的に特異的な抗体をコードする核酸を取得するために、提示ライブラリーをスクリーニングする必要はないかもしれない。

【０２１７】

他の方法では、抗体ライブラリーはナイーブな生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子から増幅した核酸から構築される。増幅された核酸は、ＶＨおよびＶＬドメインをコードしている核酸を含む。免疫グロブリンをコードしている核酸の供与源を以下に記載する。増幅は、例えば保存された定常部にアニールするプライマーを用いてＰＣＲで行ってもよいし、別の増幅方法で行ってもよい。

【０２１８】

免疫グロブリン領域をコードしている核酸は、例えばヒト、霊長類、マウス、ウサギ、ラクダまたは齧歯動物の免疫細胞から得られる。一実施例では、細胞は特定の特性に関して選択される。各種成熟段階のＢ細胞が選択できる。他の実施例では、Ｂ細胞はナイーブである。

【０２１９】

一実施形態では、蛍光標示式細胞分取法（ＦＡＣＳ）が、表面結合ＩｇＭ、ＩｇＤまたはＩｇＧ分子を発現するＢ細胞の分取に使用される。さらに、ＩｇＧの異なるアイソタイプを発現しているＢ細胞を単離できる。他の好ましい実施形態では、ＢまたはＴ細胞がｉｎ ｖｉｔｒｏで培養される。このような細胞は、例えば支持細胞と培養するか、あるいはマイトジェンまたは他の調節試薬、例えばＣＤ４０への抗体、ＣＤ４０リガンドもしくはＣＤ２０、酢酸ミリスチン酸ホルボール、細菌性リポ多糖、コンカナバリンＡ、フィトヘマグルチニンまたはヤマゴボウマイトジェンなどを添加することによって、ｉｎ ｖｉｔｒｏで刺激することができる。

【０２２０】

他の実施形態では、このような細胞は免疫系の疾患、例えば全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、リウマチ様関節炎、脈管炎、シェーグレン症候群、全身性硬化症または抗燐脂質症候群を有する対象から単離される。この対象はヒトでもよいし、または動物、例えば人間の病気の動物モデルもしくは相似の疾患を有する動物でもよい。他の実施形態では、この細胞はヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むヒト以外のトランスジェニック動物から単離される。

【０２２１】

好ましい一実施形態では、細胞は体細胞超変異のプログラムを発動した。細胞を、例えば抗免疫グロブリン、抗ＣＤ４０、および抗ＣＤ３８抗体による処理で刺激して、免疫グロブリン遺伝子の体細胞変異を起こさせることができる（例えば、Bergthorsdottir et al. (2001) J Immunol. 166: 2228を参照）。他の実施例では、細胞はナイーブである。

【０２２２】

免疫グロブリン可変ドメインをコードしている核酸は、以下の例示的な方法によって自然のレパートリーから単離できる。まず、ＲＮＡを免疫細胞から単離する。完全長（すなわち、キャップが形成されている）ｍＲＮＡを分離する（例えば、キャップが形成されていないＲＮＡを仔ウシ腸管のホスファターゼで分解する）。その後キャップをタバコの酸性ピロホスファターゼで取り除き、逆転写を利用してｃＤＮＡを生成する。

【０２２３】

第１の（アンチセンス）鎖の逆転写は、いかなる方法でもいかなる適当なプライマーを使用してもできる。例えば、Haard et al. (1999) J. Biol. Chem 274: 18218-30を参照。プライマー結合領域は、例えば免疫グロブリンの異なるアイソタイプを逆転写するために、異なる免疫グロブリン間で一定にしてよい。プライマー結合領域は、免疫グロブリンの特定のアイソタイプに特異的でもよい。一般的に、プライマーは少なくとも１つのＣＤＲをコードしている配列の３’側の領域に特異的である。他の実施形態では、ポリ－ｄＴプライマーが使える（重鎖遺伝子にとっては好ましいかもしれない）。

【０２２４】

合成配列を、逆転写された鎖の３’末端に連結できる。合成配列は、逆転写後のＰＣＲ増幅において順方向プライマーの結合のためのプライマー結合部位として使用できる。合成配列を使用すると、有効な多様性を完全に捕えるための異なる順方向プライマーのプールの使用を不要にすることができる。

【０２２５】

その後、可変領域をコードしている遺伝子を、例えば操作を１回または複数回繰り返して増幅する。複数回操作を行う場合は、忠実度を高めるために入れ子のプライマーが使える。増幅された核酸は、次に提示ライブラリーベクターにクローニングされる。

【０２２６】

いかなる核酸配列増幅方法を使用して増幅してもよい。多様性を最大にして偏らせない方法が好ましい。核酸増幅には様々な手法が使用できる。ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ;米国特許第4,683,195号および第4,683,202号、Saiki, et al. (1985) Science 230,1350-1354）は異なる温度の周期を利用して核酸合成サイクルを進める。転写ベースの方法はＲＮＡポリメラーゼによるＲＮＡ合成を利用して核酸を増幅する（米国特許第 6,066,457号;米国特許第 6,132,997号;米国特許第 5,716,785号;Sarkar et al., Science (1989) 2

44: 331-34; Stofler et al., Science (1988) 239: 491）。NASBA（米国特許第5,130,238号;第 5,409,818号;および第5,554,517号）は、転写、逆転写およびＲｎａｓｅＨベースの分解の周期を利用してＤＮＡサンプルを増幅する。他の増幅方法としては、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ;米国特許第5,854,033号および第6,143,495号）と鎖置換増幅（ＳＤＡ;米国特許第5,455,166号および第5,624,825号）が含まれる。

【０２２７】

－二次スクリーニング法－

標的と結合する提示ライブラリーメンバーの候補を選んだ後に、各提示ライブラリーメンバー候補は、例えばＭＨＣ－ペプチド複合体との結合特性をさらに分析するために、さらに分析できる。各提示ライブラリーメンバー候補は、１つまたは複数の二次スクリーニングアッセイを行うことができる。例えば、このアッセイでは、例えばペプチド部分および／またはＭＨＣ対立遺伝子に対する特異性の評価のために、異なるＭＨＣ－ペプチド複合体との相対的結合を測定できる。このアッセイの目的は、結合特性、触媒特性、生理学的特性（例えば細胞毒性、腎クリアランス、免疫原性）、構造的性質（例えば安定性、コンホメーション、オリゴメリゼーション状態）または別の機能上の特性のためでよい。同じアッセイを、例えばｐＨ、イオンまたは熱感受性を測定するために条件を変えて繰り返し使用できる。

【０２２８】

結合特性のための例示的なアッセイには、以下が含まれる。

ＥＬＩＳＡ：提示ライブラリーによってコードされるポリペプチドは、ＥＬＩＳＡアッセイを使用して結合特性をスクリーニングすることもできる。例えば、各ポリペプチドを、底部表面が、例えば限定的な量の標的でコーティングされたマイクロタイタープレートに接触させる。プレートは緩衝液で洗浄して、非特異的に結合したポリペプチドを取り除く。次に、プレートに結合したポリペプチドを、そのポリペプチドを例えば標識またはポリペプチドの定常部分で認識できる抗体でプレートをプローブして定量する。抗体はアルカリホスファターゼのような酵素と結合し、その結果適当な基質が提供される場合は比色産物が生じる。ポリペプチドは細胞から精製できるか、または提示ライブラリーフォーマットで、例えば繊維状バクテリオファージのコートとの融合体としてアッセイできる。ＥＬＩＳＡアッセイの他の態様では、ライブラリーの各ポリペプチドを使用してマイクロタイタープレートの異なる穴をコーティングする。次にＥＬＩＳＡは一定の標的分子を使って各穴を探索する。

【０２２９】

均一結合アッセイ：候補ポリペプチドと標的との結合相互作用は、均一アッセイを使って分析でき、つまりアッセイの全ての成分が加えられた後はそれ以上流体の操作は必要ではない。例えば、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）が均一アッセイとして利用できる（例えば、Lakowicz et al. 米国特許第5,631,169号; Stavrianopoulos et al.米国特許第4,868,103号を参照）。第１の分子の蛍光団標識（例えば、画分で同定される分子）は、第２の分子（例えば標的）が第１の分子の近くにある場合は、その発された蛍光エネルギーが第２の分子上の蛍光標識によって吸収されるように選択される。第２の分子の蛍光標識は、それが転移エネルギーを吸収するときに蛍光を発する。標識間のエネルギー転移の効率は分子を隔てている距離に関係しているので、分子間の空間的関係を評価できる。結合が分子間で起こる状況では、アッセイにおける「受容体」分子標識の蛍光発光はできるだけ最大にするのがよい。ＦＲＥＴによるモニタリングを意図した結合事象は、当技術分野でよく知られている標準蛍光定量的検出手段によって都合よく測定できる（例えば、蛍光計を使って）。第１または第２の結合分子の量を滴定することによって結合曲線を作製し、平衡結合定数を推定できる。

【０２３０】

均一アッセイの他の例は、Ａｌｐｈａ　Ｓｃｒｅｅｎ（Packard Bioscience, Meriden CT）である。Ａｌｐｈａ　Ｓｃｒｅｅｎは２個の標識ビーズを使う。１つのビーズはレーザーで励起すると一重項酸素を生み出す。他のビーズは一重項酸素が第１のビーズから拡

散してそれと衝突するとき、光シグナルを発生する。このシグナルは２つのビーズが近接しているときだけ発生する。ビーズの１つは提示ライブラリーメンバーに、他は標的に付着させてもよい。シグナルを測定して結合程度を決定する。

【０２３１】

均一アッセイは、候補ポリペプチドを提示ライブラリービークル（例えばバクテリオファージ）に付着させたまま実施できる。

【０２３２】

表面プラズモン共振（ＳＰＲ）：提示ライブラリーから単離される分子と標的との結合相互作用は、ＳＰＲを使って分析できる。ＳＰＲまたは生体分子相互作用分析（Biomolecular Interaction Analysis：ＢＩＡ）は、いずれの相互作用物に標識することなくリアルタイムで生物特異性相互作用を検出できる。ＢＩＡチップの結合表面（結合事象を示す）における質量が変化する結果、表面近くの光の屈折率が変化する（表面プラズモン共振（ＳＰＲ）の光学現象）。屈折度の変化は検出可能なシグナルを生み出し、それらは生体分子間のリアルタイムな反応の指数として測定される。ＳＰＲを利用する方法が記載されている。例えば、米国特許第5,641,640号;Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag;Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345;Szabo et al. (1995) Curr. Opin.Struct. Biol. 5: 699-705およびBIAcore International AB （ウプサラ、スウェーデン）によって提供されるオンライン情報源。

【０２３３】

ＳＰＲから得られる情報は、生体分子の標的との結合に関する平衡解離定数（K_d）ならびにK_{on}およびK_{off}などの動力学パラメーターの正確な定量的測定を提供するために利用できる。このようなデータは異なる生体分子を比較するのに使用できる。例えば、提示ライブラリーから選択される核酸によってコードされるタンパク質を比較して、標的と親和性の高いタンパク質または遅いK_{off}を有するタンパク質を個々に同定することができる。この情報は、構造活性相関（ＳＡＲ）を開発するためにも利用できる。例えば、成熟した親タンパク質の動力学および平衡結合パラメーターを親タンパク質のパラメーターと比較することができる。特定の結合パラメーター、例えば高親和性と遅いK_{off}と相関する特定位置の変異アミノ酸を同定できる。この情報は構造モデリングと組み合わせることができる（例えば、相同性モデリング、エネルギー最小化または結晶学もしくはＮＭＲによる構造決定を使って）。その結果、タンパク質とその標的間の物理的相互作用が理解され、これにより他の設計手法を導くことができる。

【０２３４】

タンパク質アレイ：提示ライブラリーから同定されるポリペプチドは、固相支持体、例えばビーズまたはアレイの上に固定できる。タンパク質アレイに関しては、各ポリペプチドが支持体上の固有のアドレスに固定化される。一般的に、このアドレスは二次元のアドレスである。タンパク質アレイは下記に記載されている（例えば、診断薬を参照）。

【０２３５】

細胞のアッセイ：候補ポリペプチド（例えば、提示ライブラリーその他によって既に同定されている）は、例えば細胞アッセイを用いて生物学的活性または他の機能上の活性をスクリーニングすることができる。例えば、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合する抗体の場合、その活性とは表面ＭＨＣ群の上でペプチドを提示する細胞に対する細胞を介したまたは補体を介した細胞毒性であろう。抗体は哺乳類の細胞で発現させ、収穫し、次に細胞または補体を介した細胞毒性を試験できる。

【０２３６】

例えば、クロム放出試験が細胞媒介細胞毒性のアッセイに使える。末梢血リンパ球（ＰＢＬ）がエフェクター細胞として調製され、一方、標的ＭＨＣ－ペプチド複合体を発現する標的細胞が^{51}Ｃｒでロードされる。標的細胞は、洗浄後平底マイクロタイタープレートに播種される。ＰＢＬ（５０μｌ）がリガンド（例えば既知の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドまたは候補リガンド）と組み合わされて標的細胞に添加される。最大の放出はＴｗｅｅｎ－２０を標的細胞へ添加して測定され、一方、最小の放出はＰＢＬが存在

しない状態で測定される。一晩インキュベーションした後、上清に放出される^{51}Ｃｒがγシンチレーションカウンターで計数される。

【０２３７】

他の実施形態では、細胞ライブラリーは細胞アレイの形態である。同様に、細胞アレイは、検出可能ないかなる適当な活性もスクリーニングできる。

－リガンド生産－

【０２３８】

標準の組換え核酸法を用いて、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合してペプチド部分を認識するタンパク質リガンドを発現できる。通常、タンパク質リガンドをコードしている核酸配列は、核酸発現ベクターにクローニングされる。当然、タンパク質が複数のポリペプチド鎖を含むならば、各鎖は同じか異なる細胞で発現される発現ベクター、例えば同じか異なるベクターにクローニングしなければならない。タンパク質が十分に小さいならば、すなわち、タンパク質が５０未満のアミノ酸のペプチドであるならば、タンパク質は自動化された有機物合成法を使って合成できる。抗体生成法も下記で提供される。

【０２３９】

タンパク質リガンドを発現する発現ベクターには、タンパク質リガンドまたはその断片をコードしているセグメントに加えて、対象とする核酸に可作動的に結合した調節配列、例えばプロモーターを含めることができる。多数の適当なベクターとプロモーターが当技術分野で既知であり、本発明の組換え構築物の作製のために市場で入手できる。以下のベクターは、例示的に提示されている。細菌用：ｐＢｓ、ｐｈａｇｅｓｃｒｉｐｔ、ＰｓｉＸ１７４、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ、ｐＢｓ　ＫＳ、ｐＮＨ８ａ、ｐＮＨ１６ａ、ｐＮＨ１８ａ、ｐＮＨ４６ａ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）;ｐＴｒｃ９９Ａ、ｐＫＫ２２３－３、ｐＫＫ２３３－３、ｐＤＲ５４０およびｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）。真核生物用：ｐＷＬｎｅｏ、ｐＳＶ２ｃａｔ、ｐＯＧ４４、ＰＸＴＩ、ｐＳＧ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）ｐＳＶＫ３、ｐＢＰＶ、ｐＭＳＧおよびｐＳＶＬ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）。好ましいライブラリーの好ましい１クラスは提示ライブラリーであり、以下それを記載する。

【０２４０】

当業者に既知の方法を用いて、本発明のポリヌクレオチドと適切な転写／翻訳調節シグナルを含有しているベクターを構築できる。これらの方法には、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ組換えＤＮＡ技術、合成手法およびｉｎ　ｖｉｖｏ組換え／遺伝子組換えが含まれる。例えば、Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Hrbor Laboratory, N.Y. (2001)およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)に記載の手法を参照。プロモーター領域は、ＣＡＴ（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクターまたは選択可能なマーカーを有する他のベクターを用いて、望みのいかなる遺伝子からでも選択できる。２つの適当なベクターは、ｐＫＫ２３２－８およびｐＣＭ７である。特定の名をつけられた細菌性プロモーターには、ｌａｃＩ、ｌａｃＺ、Ｔ３、Ｔ７、ｇｐｔ、ｌａｍｂｄａ　Ｐおよびｔｒｃが含まれる。真核プロモーターには、前初期のＣＭＶ、ＨＳＶチミジンキナーゼ、初期および後期のＳＶ４０、レトロウイルスからのＬＴＲ、マウスメタロチオネイン－Ｉならびに各種当分野で既知の組織特異的プロモーターが含まれる。

【０２４１】

通常、組換え発現ベクターは複製開始点と、宿主細胞の形質転換を可能にする選択マーカー、例えば大腸菌（Ｅ．　ｃｏｌｉ）のアンピシリン耐性遺伝子とＳ．　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅの栄養要求性マーカー（例えば、ＵＲＡ３、ＬＥＵ２、ＨＩＳ３およびＴＲＰｌ遺伝子）、ならびに下流の構造配列の転写を指示する高度に発現される遺伝子に由来するプロモーターを含む。そのようなプロモーターは、中でも３－ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）などの解糖酵素、ａ－因子、酸性ホスファターゼまたは熱ショックタンパク質をコードするオペロンに由来してもよい。本発明のポリヌクレオチドは、翻訳開始および

翻訳終了配列を有し、また好ましくは翻訳されたタンパク質のペリプラズム間隙または細胞外の培地への分泌を指示することのできるリーダー配列を有するよう適当な相で組み立てられる。任意に、本発明の核酸は、望みの特徴、例えば発現された組換え産物の安定化または簡易精製を付与するＮ末端識別ペプチドを含む融合タンパク質をコードしてもよい。細菌の有用な発現ベクターは、適当な翻訳開始および終止シグナルと共に本発明のポリヌクレオチドを、任意に機能的プロモーターを有する可作動読取り相に挿入することによって構築される。ベクターは１つまたは複数の表現型選択マーカーと複製開始点を含むので、ベクターの維持が確実になり、また望みであれば宿主内での増幅が可能になる。形質転換のための適当な原核宿主には、Ｅ．ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ（枯草菌）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ（ネズミチフス菌）、ならびにＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、ＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓおよびＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ属の各種が含まれるが、好みで他の種も選択してよい。

【０２４２】

代表的ではあるがそれには限定されない実施例として、細菌の有用発現ベクターには既知のクローニングベクターｐＢＲ３２２（ＡＴＣＣ ３７０１７）の遺伝要素を含む市販のプラスミドに由来した選択マーカーおよび細菌の複製開始点が含まれてよい。そのような市販ベクターとしては、 例えばｐＫＫ２２３－３（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｆｉｎｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、ウプサラ、スウェーデン）およびｐＧＥＭ１（Ｐｒｏｍｅｇａ、マディソン、ウィスコンシン州、米国）が含まれる。

【０２４３】

本発明は、さらに本発明のベクターを含有している宿主細胞を提供するが、そこでは既知の形質転換法、トランスフェクション法または感染方法を使用して核酸が宿主細胞に導入されている。例えば、宿主細胞は抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの成分をコードしているライブラリーメンバーまたは核酸を含むことができる。宿主細胞は哺乳類の細胞などの真核宿主細胞、酵母細胞などの下等真核宿主細胞でもよく、または宿主細胞は細菌細胞などの原核細胞でもよい。宿主細胞への組換え構築物の導入は、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ、デキストラン媒介トランスフェクションまたはエレクトロポレーションによって可能である（Davis, L. et al. Basic Methods in Molecular Biology (1986)）。

【０２４４】

いずれの宿主／ベクター系を用いても、本発明の標的要素の１つまたは複数を同定できる。これらにはそれには限定されないが、ＨｅＬａ細胞、ＣＶ－１細胞、ＣＯＳ細胞およびＳｆ９細胞のような真核宿主、ならびにＥ．ｃｏｌｉおよびＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓのような原核宿主が含まれる。最も好ましい細胞は、通常特定のリポーターポリペプチドまたはタンパク質を発現しない細胞、またはこれらリポーターポリペプチドまたはタンパク質を自然の低いレベルで発現する細胞である。

【０２４５】

本発明の宿主は、酵母または他の菌類であってもよい。酵母では、構成的または誘導性のプロモーターを含有している多くのベクターが使用できる。詳しく知りたければ、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13 (1988);Grant et al. Expression and Secretion Vectors for Yeast, in Methods in Enzymology, Ed. Wu & Grossman, Acad. Press, N. Y. 153: 516-544 (1987);Glover, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press、ワシントンDC, Ch. 3 (1986);Bitter, Heterologous Gene Expression in Yeast, in Methods in Enzymology, Eds. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y. 152: 673-684 (1987);およびThe Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II (1982)を参照。

【０２４６】

本発明の宿主は、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｓｅｒｒａｔｉａ ｍａｒｅｓｃａｎｓなど他の腸内細菌科、桿菌、各種シュードモナス属菌、または形質転換ができ、トランスフェクション

ができ、感染させることができる他の原核生物などの原核細胞でもよい。

【０２４７】

本発明は、さらに、本発明のポリヌクレオチドを含有するように遺伝子操作された宿主細胞を提供する。例えば、そのような宿主細胞は、既知の形質転換、トランスフェクションまたは感染方法を使用して宿主細胞に導入された本発明の核酸を含有してもよい。本発明は、さらに、本発明のポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作された宿主細胞を提供し、そこではそのようなポリヌクレオチドは細胞内でポリヌクレオチドの発現を促す、宿主細胞にとって異種の調節配列と連携して作動する。

【０２４８】

宿主細胞は哺乳類の細胞などの高等真核宿主細胞、酵母細胞などの下等真核宿主細胞でよく、または宿主細胞は細菌細胞などの原核細胞でよい。

【０２４９】

宿主細胞への組換え構築物の導入は、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、ＤＥＡＥ、デキストラン媒介トランスフェクションまたはエレクトロポレーションによって可能である（Davis, L. et al. Basic Methods in Molecular Biology (1986)）。本発明のポリヌクレオチドの１つを含有している宿主細胞は、単離された断片によってコードされた遺伝子産物を作製するために従来の方式で用いることができる（ＯＲＦの場合）。

【０２５０】

いずれの宿主／ベクター系を用いても、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの１つまたは複数を発現できる。これらにはそれには限定されないが、ＨｅＬａ細胞、ＣＶ－１細胞、ＣＯＳ細胞およびＳｆ９細胞のような真核宿主、ならびにＥ．ｃｏｌｉおよびＢ．ｓｕｂｔｉｌｉｓのような原核宿主が含まれる。最も好ましい細胞は、通常特定のポリペプチドおよびタンパク質を発現しない細胞、またはこれらポリペプチドまたはタンパク質を自然の低いレベルで発現する細胞である。成熟したタンパク質は、哺乳類の細胞、酵母、細菌または他の細胞中で適当なプロモーターの制御下で発現させることができる。無細胞の翻訳系を使用しても、本発明のＤＮＡ構築物に由来するＲＮＡを使ってそのようなタンパク質を産生することができる。原核宿主および真核宿主で使用する適当なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Sambrook et al.によってMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, ニューヨーク（1989）に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれている。

【０２５１】

各種哺乳動物細胞培養系を使用しても、組換えタンパク質を発現させることができる。

哺乳類の発現系の例としては、サル腎臓繊維芽細胞のＣＯＳ－７系統がありこれはGluzman, Cell 23: 175 (1981)に記載されており、その他に互換性のベクター、例えばＣ１２７、３Ｔ３、ＣＨＯ、ＨｅＬａ、およびＢＨＫ細胞系を発現できる細胞系が含まれる。哺乳類の発現ベクターには、複製開始点、適当なプロモーター、さらにはいかなる必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライシングドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列ならびに５’側の非転写隣接配列が含まれる。

【０２５２】

ＳＶ４０ウィルスゲノムに由来するＤＮＡ配列、例えばＳＶ４０起点、初期プロモーター、エンハンサー、スプライスおよびポリアデニル化部位を使用して必要な非転写遺伝要素を提供してもよい。細菌培養で生成する組換えポリペプチドとタンパク質は、通常、細胞ペレットからの初期抽出に続く塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーの１つまたは複数のステップによって単離される。いくつかの実施形態では、鋳型核酸はポリペプチド標識、例えばペンタヒスチジンまたはヘキサヒスチジンもコードする。組換えポリペプチドは、次にアフィニティークロマトグラフィーを使って精製できる。

【０２５３】

タンパク質の発現で使用される微生物細胞は、凍結融解処理、音波処理、機械的破壊または細胞溶解剤の使用を含むいかなる都合のよい方法を使用しても破壊できる。多くの種類の細胞が、タンパク質の発現に適した宿主細胞の働きをする可能性がある。Scopes (19

94) Protein Purification: Principles and Practice, ニューヨーク: Springer-Verlag は、組換え（および非組換えの）タンパク質を精製する多くの一般的方法を提供している。これらの方法には、例えばイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、選択的沈降、透析および疎水性相互作用クロマトグラフィーが含まれる。これらの方法は、抗ＭＨＣ－ペプチド複合体タンパク質リガンドを精製する方策を考案するために適合させることができる。

【０２５４】

哺乳類の宿主細胞には、例えばサルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト腎臓２９３細胞、ヒト表皮性Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ２０５細胞、３Ｔ３細胞、ＣＶ－１細胞、他の形質転換霊長類細胞系、正常二倍体細胞、一次組織のｉｎ ｖｉｔｒｏ培養に由来する細胞株、一次性の外植片、ＨｅＬａ細胞、マウスＬ細胞、ＢＨＫ、ＨＬ－６０、Ｕ９３７、ＨａＫまたはＪｕｒｋａｔ細胞が含まれる。

【０２５５】

あるいは、酵母のような下等真核生物または細菌のような原核生物でタンパク質を産生できるかもしれない。潜在的に適当な酵母株には、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ株、Ｃａｎｄｉｄａまたは非相同的タンパク質を発現することができるいかなる酵母株も含まれる。適性があると思われる細菌株には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ（大腸菌）、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ（枯草菌）、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ（ネズミチフス菌）、または非相同的タンパク質を発現できるいかなる菌株も含まれる。タンパク質が酵母または細菌内で作られるならば、機能蛋白質を得るために、その中で生成するタンパク質の、例えば適当な部位のリン酸エステル化またはグリコシル化による修飾が必要かもしれない。そのような共有結合的付着は、既知の化学的方法または酵素法を使って達成できる。本発明の他の実施例では、細胞および組織を、誘導性調節エレメントの管理下で本発明のポリヌクレオチドを含んでいる内因性の遺伝子を発現するように変えてもよく、その場合には、内因性遺伝子の調節配列は相同組み換えで取り替えてもよい。本明細書で記載されているように、遺伝子ターゲッティングを用いて、遺伝子の既存の調節領域を別の遺伝子から単離された調節配列または遺伝子操作方法によって合成された新規調節配列と取り替えることができる。

【０２５６】

このような調節配列は、プロモーター、エンハンサー、足場－付着領域、負の調節要素、転写開始部位、調節タンパク質結合部位またはこれら配列の組み合わせで構成されてよい。あるいは、生成したＲＮＡまたはタンパク質の構造または安定性に影響を及ぼす配列は、ポリアデニル化シグナル、ｍＲＮＡ安定性要素、スプライス部位、タンパク質の運搬もしくは分泌特性を強化するか修正するためのリーダー配列、またはタンパク質もしくはＲＮＡ分子の機能もしくは安定性を変えるか改善する他の配列を含むターゲッティングによって取り替えてもよく、取り除いてもよく、加えてもよく、そうでなければ修飾してもよい。

【０２５７】

抗体産生：ある抗体、例えばＦａｂは、細菌細胞、例えばＥ．ｃｏｌｉ細胞内で生成できる。例えば、Ｆａｂが、提示実体とバクテリオファージタンパク質（またはその断片）の間にサプレスできる終止コドンを含むファージ提示ベクター内の配列でコードされるならば、ベクター核酸は終止コドンをサプレスできない細菌細胞にシャッフルできる。この場合、Ｆａｂは遺伝子ＩＩＩタンパク質に融合しないで培地に分泌される。

【０２５８】

抗体は、真核細胞内でも生成できる。一実施形態では、抗体（例えばｓｃＦｖ）は酵母、例えばＰｉｃｈｉａ（例えばPowers et al. (2001) J Immunol Methods. 251: 123-35 を参照）、ＨａｎｓｅｕｌａまたはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓの細胞内で発現する。

【０２５９】

好ましい一実施形態では、抗体は哺乳類の細胞内で生成される。クローン抗体またはそ

の抗原結合性断片を発現するための好ましい哺乳類宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ細胞）（Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220に記載されている、例えばKaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621に記載されているＤＨＦＲ選択マーカーと共に使用されるｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞を含む）、ＮＳ０骨髄腫細胞とＳＰ２細胞などのリンパ球細胞系、ＣＯＳ細胞、およびトランスジェニック動物、例えばトランスジェニック哺乳類からの細胞が含まれる。例えば、細胞は乳房上皮細胞である。

【０２６０】

多様化された免疫グロブリン領域をコードしている核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは宿主細胞内でベクターの複製を調節する配列（例えば複製起点）のような別の配列、および選択マーカー遺伝子を有してもよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号および第5,179,017号を参照）。例えば、一般的に選択マーカー遺伝子は、Ｇ４１８、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞に付与する。好ましい選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子（ｄｈｆｒ－宿主細胞内でメトトレキサート選択／増幅と使用）およびネオ遺伝子（Ｇ４１８選択に使用）が含まれる。

【０２６１】

本発明の抗体またはその抗原結合部の組換え発現のための例示的な系では、抗体重鎖と抗体軽鎖を共にコードしている組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションによってｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞に導入される。組換え発現ベクター内では、抗体の重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝子の高度転写を進めるために各々作動的にエンハンサー／プロモーター調節要素（例えば、ＳＶ４０、ＣＭＶ、アデノウィルスなどに由来するもの、例えばＣＭＶエンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節要素またはＳＶ４０エンハンサー／ＡｄＭＬＰプロモーター調節要素）と結合される。組換え発現ベクターもＤＨＦＲ遺伝子を運搬し、それによりメトトレキサート選択／増幅を用いた、ベクターでトランスフェクションされたＣＨＯ細胞の選択が可能になる。選択された形質転換宿主細胞は、抗体の重鎖および軽鎖の発現のために培養され、無傷の抗体が培地から回収される。標準の分子生物学的手法を用いて、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクションし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養して、培地から抗体を回収する。例えば、ある抗体は、プロテインＡまたはプロテインＧによるアフィニティークロマトグラフィーで単離できる。

【０２６２】

Ｆｃ領域を含む抗体に関しては、好ましくは抗体産生系はＦｃ領域がグリコシル化された抗体を合成する。例えば、ＩｇＧ分子のＦｃ領域は、ＣＨ２領域のアスパラギン２９７位でグリコシル化される。このアスパラギンは、二アンテナ型オリゴ糖による修飾のための部位である。このグリコシル化は、Ｆｃγ受容体と補体Ｃ１ｑ媒介によるエフェクター機能に必要なことが実証されている（Burton and Woof (1992) Adv. Immunol. 51: 1-84; Jefferies et al. (1998) Immnnol. Rev. 163: 59-76）。好ましい一実施形態では、このＦｃ領域は、アスパラギン２９７に対応している残基を適切にグリコシル化する哺乳類の発現系で生成される。このＦｃ領域は、真核生物の他の翻訳後修飾も含むことができる。

【０２６３】

抗体は、トランスジェニック動物によっても生成される。例えば、米国特許第5,849,992号は、トランスジェニック哺乳類の乳腺内で抗体を発現する方法を記載している。乳汁特異的プロモーター、ならびに対象とする抗体および分泌のためのシグナル配列をコードする核酸を含む導入遺伝子が構築される。そのようなトランスジェニック哺乳類の雌が産生する乳汁には、その中に分泌される対象とする抗体が含まれる。この抗体は乳汁から精製してもよいし、またはある用途では直接使用できる。

【０２６４】

－医薬組成物－

他の態様では、本発明は、組成物、例えば医薬適合性の組成物を提供し、これには抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンド、例えば、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合することが確認されているか本明細書で記載されている抗体分子、他のポリペプチドまたはペプチドが、医薬適合性のある担体と共に調剤されて含まれる。本明細書で使われるように、「医薬組成物」はｉｎ　ｖｉｖｏ画像化のための標識リガンドならびに治療組成物を含む。

【０２６５】

本明細書で使われるように、「医薬適合性のある担体」は、いかなる、また、全ての溶剤、分散剤、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、ならびに生理的適合性のあるそのような剤を含む。好ましくは、担体は静脈内、筋肉内、皮下、腸管外、脊髄または表皮への投与（例えば、注射または注入）に適する。投与経路に従い、活性合成物、すなわちタンパク質リガンドは、合成物を不活化するかもしれない酸の作用および他の自然条件から合成物を保護するための材料でコーティングしてもよい。

【０２６６】

「医薬適合性のある塩」は、親化合物の望みの生物学的活性を保持し、かつ、いかなる望ましくない毒性学的影響も付与しない塩を指す（例えば、Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照）。そのような塩の例には、酸添加塩および塩基添加塩が含まれる。酸添加塩には、非毒性無機酸、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などに由来するもの、ならびに非毒性の有機酸、例えば脂肪族モノカルボン酸、脂肪族ジカルボン酸、フェニル置換されたアルカノン酸、ヒドロキシアルカノン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などに由来するものが含まれる。塩基添加塩には、アルカリ土類金属、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどに由来するもの、ならびに非毒性有機アミン、例えばＮ，Ｎ’－ジベンジルエチレンジアミン、Ｎ－メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどに由来するものが含まれる。

【０２６７】

本発明の組成物は様々な形態をとってよい。これらには、例えば、液剤（例えば注射剤および注入剤）、分散剤または懸濁剤、錠剤、ピル、散剤、リポソームおよび坐薬のような液体、半固体、および固体の剤型が含まれる。好ましい剤型は、意図された投与様式および治療用途に依存する。典型的な好ましい組成物の剤型は注射剤または注入剤であり、例えば、ヒトへの抗体の投与で使用されるものに類似している組成物などである。好ましい投与様式は腸管外投与である（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内投与）。好ましい一実施形態では、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドが静脈内注入または注射によって投与される。好ましい他の実施形態では、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは筋注または皮下注射によって投与される。

【０２６８】

用語「非経口投与」および「非経口的に投与される」は、本明細書では経腸および局所投与以外の通常注射による投与様式を意味し、これらには、それには限定されないが、経静脈、筋肉内、動脈内、髄膜下、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、上皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内の注射および注入が含まれる。

【０２６９】

医薬組成物は、一般的に製造および貯蔵の条件下で無菌で安定していなければならない。医薬組成物は、試験により投与のための規制基準および工業標準を満たしていることを保証することができる。例えば、製剤中のエンドトキシンレベルは、USP 24/NF 19の方法に従って、カブトガニ変形細胞溶解試験（例えば、Bio Whittaker lot # 7L3790、感度０．１２５ＥＵ／ｍｌ、のキットを使用）により試験できる。医薬組成物の無菌性は、USP 24/NF 19の方法に従ってチオグリコール酸塩培地を使って測定できる。例えば、製剤を使ってチオグリコール酸塩培地に接種し、３５℃で１４日以上インキュベーションする。培地を定期的に検査して微生物の増殖を検出する。

【０２７０】
組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散剤、リポソーム、または高濃度の薬剤に適する他の注文構造に製剤できる。無菌の注射溶液は、必要に応じて上記成分の１つまたは組み合わせの入った適切な溶剤中に活性合成物（すなわちリガンド）を必要量取り込ませ、さらにろ過滅菌することによって調製できる。通常、分散剤は、活性合成物を塩基性分散媒および上記の中の必要な成分を含有する無菌の媒体に取り込ませて調製される。無菌の注射溶液を調製するための無菌散剤の場合、好ましい調製法は、活性成分と望みのいかなる付加成分との散剤を、事前にろ過滅菌したその溶液から産生する減圧乾燥と凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えばレシチン等の被覆剤を用いて、分散物の場合は必要な粒径を保って、また界面活性剤を使用して維持される。注射組成物の遅延式吸収は、吸収を遅らせる試薬、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含ませることでもたらされる。

【０２７１】
本発明の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）タンパク質リガンドは、当技術分野で知られている様々な方法によって投与できるが、多くの用途においては、好ましい経路／投与様式は静脈内注射または注入である。例えば治療用途の場合、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、３０、２０、１０、５または１ｍｇ／分未満の速度の静脈内注入を用いて投与し、約１～１００ｍｇ／$ｍ^2$ または７～２５ｍｇ／$ｍ^2$ の用量を達成できる。投与の経路および／または様式は、望まれる結果によって異なる。ある実施形態では、活性合成物は合成物を急速な放出から保護するキャリヤで調製してもよく、この例としてはインプラントおよびマイクロカプセル化送達系などの徐放製剤が含まれる。生体分解性、生体適合性のポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などが利用できる。そのような製剤の調製のための多くの方法は、特許が取得されているか公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J.R. Robinson, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照。

【０２７２】
ある実施形態では、リガンドは、例えば非活性の希釈液または同化性食用担体と一緒に経口投与してもよい。合成物（および望みにより他の成分）は、硬いもしくは軟らかい殻のゼラチンカプセルに封入してもよく、または錠剤に圧縮してもよく、または直接対象の食事に取り込ませてもよい。治療のための経口投与の場合、合成物を賦形剤に取り込ませ、可消化錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハース、その他の形で使用してもよい。非経口投与以外の方法で本発明の合成物を投与するためには、合成物をその不活化を防止する材料で覆うか、またはその材料と一緒に投与する必要があるかもしれない。

【０２７３】
医薬組成物は、当技術分野で公知の医療器具で投与できる。例えば、好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物は針不要の皮下注射器具で投与でき、そのような器具は、例えば米国特許第5,399,163号、第5,383,851号、第5,312,335号、第5,064,413号、第4,941,880号、第4,790,824号、または第4,596,556号で開示されている。本発明に役立つ公知のインプラントおよびモジュールの例として以下が含まれる：米国特許第4,487,603号は、制御された速度で投薬するための植込型マイクロインフュージョンポンプを開示している;米国特許第4,486,194号は、皮膚を通して投薬するための治療装置を開示している;米国特許第4,447,233号は、投薬を正確な注入速度で実施するための投薬インフュージョンポンプを開示している;米国特許第4,447,224号は、連続投薬のための可変流植込型注入液器具を開示している;米国特許第4,439,196号は、多室コンパートメントを有する浸透圧ドラッグデリバリーシステムを開示している;米国特許第4,475,196号は、浸透圧ドラッグデリバリーシステムを開示している。当然、他にも多くのそのようなインプラント、デリバリー系およびモジュールが公知である。

【０２７４】

ある実施形態では、本発明の合成物は、ｉｎ　ｖｉｖｏで確実に適切な分布を示すように製剤できる。例えば、血液－脳関門（ＢＢＢ）は多くの高親水性化合物を排除する。本発明の治療用合成物が確実にＢＢＢ（望まれる場合）を通過するように、それらを、例えばリポソームに製剤できる。リポソームの製造方法に関しては、例えば米国特許第4,522,811号；第5,374,548号;第5,399,331号を参照。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送され、目標へのドラッグデリバリーを強化する１つまたは複数の部分を含んでよい（例えば、V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685を参照）。

【０２７５】

薬剤投与計画は、最適の望みの応答（例えば治療反応）を提供するように調整される。例えば、単一のボーラスを投与してもよいし、ある時間にわたって分割して投与してもよいし、または治療状況の緊急度合いによって用量を減らしたり増やしたりしてもよい。投与の容易さと投薬量の均一性のために、非経口の組成物を投薬量単位で製剤することは、特に有利である。本明細書で使われる投薬量単位の剤型は、治療対象の統一投薬量として適している物理的に別個の単位を指し、各単位は、活性合成物の、必要な薬剤担体と連携して望みの治療効果を生じると予め計算で決定された量を含有する。本発明の投薬量単位剤型の仕様は、以下に強く影響されまたそれにより直接決まる；（ａ）活性合成物の特有の性質および達成すべき特定の治療効果、ならびに（ｂ）そのような活性合成物を個人の感受性の処置のために合成する上での当技術分野に固有の限界。

【０２７６】

それには限定されないが、本発明の抗体の治療的または予防的有効量の例示的範囲は、０．１～２０ｍｇ／ｋｇであり、より好ましくは１～１０ｍｇ／ｋｇである。抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体は、３０、２０、１０、５または１ｍｇ／分未満の速度の静脈内注入を用いて投与し、約１～１００ｍｇ／$ｍ^2$ または約５～３０ｍｇ／$ｍ^2$ の用量を達成できる。分子量が抗体より小さいリガンドでは、適当な量は比例して少なくなる。投薬量の値は、軽減すべき状態の種類と程度によって異なる可能性があることに注意するべきである。さらに、いかなる特定の対象に関しても、特有の薬剤投与計画が個人の必要および組成物の投与を管理監督する人の専門的判断に従って時間の経過に伴って調節されなければならないこと、また、本明細書で述べられる投薬量範囲は例示的なものに過ぎず、請求されている組成物の適用範囲および実施を限定するものではないことを理解されたい。

【０２７７】

本発明の医薬組成物は、本発明の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの「治療的有効量」または「予防的有効量」を含んでもよい。「治療的有効量」は、必要な投薬量および投薬期間で望みの治療効果を成し遂げるために有効な量を指す。組成物の治療的有効量は、個人の疾病状態、年齢、性別および体重、ならびに個人で望みの反応を引き出すタンパク質リガンドの能力などの要素によって異なるかもしれない。治療的有効量は、組成物のいかなる毒性効果または有害効果よりも治療上の有益な効果が上回っている場合の量でもある。「治療的有効投薬量」は、測定可能なパラメーター、例えば腫瘍の増殖率を、未処置の対象と比較して好ましくは最低約２０％、より好ましくは最低約４０％、より好ましくは最低約６０％、より好ましくは最低約８０％抑制する。合成物の測定可能なパラメーター、例えば癌を抑制する能力は、ヒト腫瘍における効力を予測させる動物モデル系で評価できる。あるいは、組成物のこの特性は、合成物の抑制する能力を、例えば熟練者には公知のｉｎ　ｖｉｔｒｏ検査により調査することで評価できる。

【０２７８】

「予防的有効量」は、必要な投薬量および投薬期間で望みの予防効果を成し遂げるために有効な量を指す。一般的に、予防的用量は疾患の発生前またはその初期に対象で用いられるので、予防的有効量は治療的有効量より少ない。

【０２７９】

また、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合するタンパク質リガンドおよび治療、予防または診断のための使用説明書を含むキットも、本発明の適用範囲内である。一実施形態では、診断用の使用説明書には、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、例えば標本中で、例えば癌もしくは新生

物疾患の患者からの生検材料または細胞で、あるいはｉｎ　ｖｉｖｏでＭＨＣ－ペプチド複合体を検出するための、リガンド（例えば、抗体またはその抗原結合断片または他のポリペプチドもしくはペプチド）の使用法が含まれる。他の実施形態では、治療用の使用説明書には、癌または新生物疾患の患者における推奨される投薬量および／または投与様式が含まれる。このキットには、診断薬もしくは治療薬、例えば本明細書に記載の診断薬もしくは治療薬などの追加の試薬が最低１つ、および／または１つまたは複数の追加の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドが、適宜１つまたは複数の別々の医薬に製剤されて含まれる。

【０２８０】

－治療法－

ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合し、および／または本明細書で記載の方法で同定されるタンパク質リガンドは、治療および予防の用途に有用である。例えば、独立にまたは治療の一環として、これらのリガンドは、例えばｉｎ　ｖｉｔｒｏもしくはｅｘ　ｖｉｖｏで培養中の細胞に投与でき、または癌など様々な疾患の治療、予防および／もしくは診断のために対象にｉｎ　ｖｉｖｏで投与できる。他の実施例では、リガンドは細胞毒性細胞などの細胞で発現される。リガンドを発現している細胞は、疾患の治療、予防および／または診断のために使用される。

【０２８１】

本明細書で使われる用語「治療する」または「治療」は、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体の単独での、もしくは第２の剤と併用しての患者などの対象への適用または投与と定義されるか、あるいは、剤を、対象、例えば疾患（例えば、本明細書で記載の疾患）、疾患の症状もしくは疾患の素因を有する患者から単離された組織または細胞、例えば細胞系に、疾患、疾患症状、または疾患素因を治癒し、癒し、軽減し、和らげ、変え、直し、改善し、向上させ、または影響を及ぼす目的で適用または投与することと定義される。細胞を治療するとは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでまたはｉｎ　ｖｉｖｏで細胞を阻止し、アブレーションし死滅させること、あるいは別の方法で細胞、例えば異所性の細胞の、疾患、例えば本明細書で記載の疾患（例えば癌疾患）を媒介する能力を低下させることを指す。一実施形態では、「細胞を治療する」ことは、細胞、例えば過増殖性細胞の活性および／または増殖の減少を指す。このような減少は必ずしも細胞の完全な消滅を意味せず、細胞の活性および数の、例えば統計学的に有意な減少を示す。抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体の適用または投与は、抗体単独もしくは抗体抱合体の可溶性合成物の形で行え、あるいは、例えばエフェクター細胞などの細胞表面に対して行える。いくつかの実施形態では、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体をコードする核酸が投与される。

【０２８２】

本明細書で使われるように、疾患を治療するために有効な抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの量、または「治療的有効量」は、患者へ単回もしくは複数回投与されたときに、例えば癌細胞（例えば、ＭＨＣと連携してＴＡＡを提示する細胞）などの細胞を治療するために、または本明細書で記載の疾患を有する患者を治療しなかった場合に予想されるものより延命させ、治癒し、軽減し、和らげ、または改善するために有効なリガンドの量を指す。本明細書で使われるように、新生物の「増殖を抑制する」とは、その増殖と転移を減速するか、妨害するか、抑えるか、停止させることを指しており、必ずしも新生物の増殖を完全に無くすことを示しているわけではない。

【０２８３】

本明細書で使われるように、疾患を予防するために有効な抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの量、またはリガンドの「予防的有効量」は、対象へ単回もしくは複数回投与されたときに、例えば癌などの疾患の発生もしくは再発を予防するか遅らせるために有効な、例えば本明細書で記載した抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体などの抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの量を指す。

【０２８４】

用語「誘発」、「抑制」、「強化」、「上昇」、「増加」、「減少」またはその種のも

の、例えば、２つの状態の間の量的相違を示すようなものは、２つの状態の間の、例えば統計学的に有意な違いを指す。例えば、「ＴＡＡを提示する過増殖性の細胞の増殖を阻止するために有効な量」は、細胞の増殖速度が未処置の細胞と例えば統計学的に有意に異なることを意味する。好ましい実施形態では、ＴＡＡはｈＴＥＲＴ、ＭＵＣ１、ＴＡＸまたはｇｐ１００である。

【０２８５】

本明細書で使われるように、用語「対象」にはヒトとヒト以外の動物が含まれる。好ましいヒト動物には、異常な細胞増殖または細胞分化を特徴とする疾患を有するヒトの患者が含まれる。本発明の用語「ヒト以外の動物」には、非哺乳類（例えばニワトリ、両生類、爬虫類動物）および非ヒト霊長動物、ヒツジ、イヌ、ウシ、ブタなど、全ての脊椎動物が含まれる。

【０２８６】

一実施形態では、対象はヒト被験者である。あるいは、対象は、ＭＨＣ上にＴＡＡ様抗原を提示して本発明のリガンドが交差反応する複合体を形成する細胞を含む哺乳類でよい。本発明のタンパク質リガンドは、ヒト被験者に治療目的で投与できる（以下でさらに議論される）。さらに、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、非ヒト哺乳類に獣医の目的のために、またはヒトの病気の動物モデルとして投与することができる。後者に関しては、そのような動物モデルは、リガンドの治療効力を評価する（例えば、投薬量と投薬スケジュールを試験する）ために役立つかもしれない。

【０２８７】

一実施形態では、本発明は細胞（例えば、非癌性の細胞、例えば正常、良性もしくは過形成細胞、または癌細胞、例えば悪性細胞、例えば充実性腫瘍、軟部組織腫瘍もしくは転移性病巣に見られる細胞（例えば、腎臓、尿路上皮、結腸、直腸、肺、乳房もしくは肝臓の癌および／または転移に見られる細胞））を治療する方法（例えば、アブレーションまたは殺滅）を提供する。本発明の方法は、細胞を抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンド、例えば本明細書に記載の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）抗体と、細胞をアブレーションするか殺すかして処置するに十分な量で接触させる段階を含む。

【０２８８】

標記方法は、例えばｉｎ　ｖｉｔｒｏでまたはｅｘ　ｖｉｖｏで培養中の細胞に対しても使用できる。例えば、癌性または転移性の細胞（例えば、腎臓、尿路上皮、結腸、直腸、肺臓、乳房、卵巣、前立腺または肝臓の癌性もしくは転移性細胞）を培地でｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養し、接触させる段階は抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを培地に加えることによって行う。この方法は、ｉｎ　ｖｉｖｏ（例えば、治療または予防）プロトコルの一部として、対象に存在する細胞（例えば、癌性または転移性の細胞）に対して実施することができる。ｉｎ　ｖｉｖｏの実施形態に関しては、接触させる段階は対象内で遂行され、その段階では抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドが、リガンドの細胞への結合と細胞の処置、例えばアブレーションもしくは殺滅、との両方を可能にするために有効な条件下で、対象へ投与される。

【０２８９】

この方法は癌の治療に利用できる。本明細書で使われるように、用語「癌」、「過増殖性」、「悪性」および「新生物性」は互換性があり、急速な増殖または新生物を特徴とする異常な状態または条件にある細胞を指す。これらの用語には、全ての種類の癌性増殖もしくは腫瘍形成過程、転移性組織または悪性転換細胞、組織もしくは器官が含まれ、組織病理学的タイプおよび侵襲性のステージとは直接関係ない。「病的過増殖性」細胞は、悪性腫瘍増殖を特徴とする疾病状態で見られる。

【０２９０】

用語「新形成」の医学的な一般の意味は、通常の成長調節への反応の喪失として起こる「新しい細胞増殖」を指し、例えば新生物細胞増殖が含まれる。「過形成」は、異常に高い増殖率を見せている細胞を指す。しかし、本明細書で使われているように、その文脈が示すように新形成と過形成の用語は互換性があり、一般的に異常な細胞増殖率を見せてい

る細胞を指している。新形成と過形成は「腫瘍」を含み、それは良性でもよく、前悪性でもよく、悪性でもよい。

【０２９１】

癌性疾患の例には、それには限定されないが、充実性腫瘍、軟部組織腫瘍および転移性病巣が含まれる。充実性腫瘍の例には、悪性腫瘍、例えば各種器官系の肉腫、腺癌および癌腫が含まれ、例えば肺臓、乳房、リンパ系、胃腸（例えば結腸）、尿生殖管（例えば、腎臓、尿路上皮性細胞）、咽頭、前立腺、卵巣を侵す悪性腫瘍、ならびに、大部分の結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝癌、肺臓の非小細胞癌腫、小腸の癌その他の悪性腫瘍を含む腺癌が含まれる。前記癌の転移病巣も、本発明の方法と組成物を用いて治療または予防できる。

【０２９２】

標記方法は、各種器官系統の悪性腫瘍、例えば肺臓、乳房、リンパ系、胃腸（例えば結腸）、尿生殖管、前立腺、卵巣、咽頭を侵す悪性腫瘍、ならびに大部分の結腸癌、腎細胞癌、前立腺癌および／または睾丸腫瘍、肺臓の非小細胞癌腫、小腸の癌および食道癌などの悪性腫瘍が含まれる腺癌の治療に役立つ可能性がある。治療できる例示的な充実性腫瘍としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、大腸癌腫、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌腫、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆道癌、絨毛膜癌、精上皮腫、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、睾丸腫瘍、肺臓癌腫、小細胞肺臓癌腫、非小細胞肺臓癌腫、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、神経膠星状細胞腫、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫が含まれる。

【０２９３】

用語「癌腫」は、当業者によって認識されており、気管支癌腫、胃腸系癌腫、尿生殖器系癌腫、精巣の癌腫、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌腫およびメラノーマを含む上皮組織または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。典型的な癌腫には、頸部、肺臓、前立腺、乳房、頭頸部、結腸および卵巣の組織から形成されるものが含まれる。この用語は癌肉腫も含み、例えば癌性および肉腫性の組織から成る悪性腫瘍を含む。「腺癌」は、腺組織に由来する癌腫、またはその中で腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌腫を指す。

【０２９４】

用語「肉腫」は、当業者によって認識されており、間葉性派生物の悪性腫瘍を指す。

標記方法は、造血器官起源の過形成／新生物細胞、例えば骨髄性、リンパ球系もしくは赤血球系に由来する細胞またはその前駆細胞の増殖を抑制するためにも使用できる。例えば、本発明は、それには限定されないが、急性の前骨髄白血病（ＡＰＭＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）および慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）を含む各種骨髄性疾患の治療を検討している（Vaickus, L. (1991) Crit. Rev. in Oncol./Hemotol. 11: 267-97でレビューされている）。標記方法によって治療できるリンパ系の悪性腫瘍には、それには限定されないが、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）が含まれ、これにはＢ系統ＡＬＬおよびＴ系統ＡＬＬ、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、前リンパ球性白血病（ＰＬＬ）、毛様細胞白血病（ＨＬＬ）およびヴァルデンシュトレームマクログロブリン血症（ＷＭ）が含まれる。本発明の処置方法によって考慮される他の悪性リンパ腫の形態には、それには限定されないが、非ホジキンリンパ腫とその変異体、末梢Ｔ細胞リンパ腫、成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫（ＡＴＬ）、皮膚Ｔ細胞リンパ腫（ＣＴＣＬ）、大顆粒リンパ性白血病（ＬＧＦ）およびホジキン病が含まれる。

【０２９５】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの投与方法は、「医薬組成物」に記載されている。使用される分子の適当な投薬量は、対象の年齢および体重、ならびに使用される特定の薬剤によって決まる。リガンドを競合薬として使用して望ましくない相互作用を阻止し

、減らすことができ、この相互作用は例えば自然のまたは病理学的因子とＭＨＣ－ペプチド複合体、例えば、ペプチドがｈＴＥＲＴ、ＭＵＣ１、ＴＡＸもしくはｇｐ１００のようなＴＡＡであるＭＨＣ－ペプチド複合体との間の相互作用である。

【０２９６】

一実施形態では、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを用いて、癌細胞およびｉｎｖｉｖｏの通常細胞、良性過形成性の細胞、癌細胞を殺すか、除去する。リガンドは単独でも使うことができ、または、例えば細胞毒や放射性同位体などの剤と抱合させることもできる。本方法では、リガンドを単独で、または細胞毒性剤に付着させて、そのような処置が必要な対象に投与する。

【０２９７】

用語「細胞毒性剤」、「細胞増殖抑制剤」および「抗腫瘍因子」は本明細書では互換的に使用されており、それらは異常癌細胞などの過増殖性の細胞の成長もしくは増殖を抑制する性質を有する剤（例えば、細胞増殖抑制剤）、またはそれらの細胞の殺滅を誘発する性質を有する剤を指す。癌治療の実施形態では、用語「細胞毒性剤」は用語「抗癌」または「抗腫瘍」と互換的に使用され、それらは新生物、特に充実性腫瘍、軟部組織腫瘍または転移性病巣の発達や進行を抑制する剤を意味する。

【０２９８】

それには限定されないが、抗癌剤には、例えば抗微小管剤、トポイソメラーゼ阻害物質、抗代謝剤、分裂抑制剤、アルキル化剤、挿入剤、シグナル伝達経路を妨害する剤、アポトーシスを促進する剤、放射線、および他の腫瘍関連抗原（裸の抗体、イムノトキシンおよび放射性抱合体を含む）に対する抗体が含まれる。クラス別の抗癌剤の例を、以下に詳細に提供する。抗チューブリン／抗微小管、例えばパクリタキセル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビン、タキソテール；トポイソメラーゼＩ阻害物質、例えばトポテカン、カンプトセシン、ドキソルビシン、エトポシド、ミトキサントロン、ダウノルビシン、イダルビシン、テニポシド、アムサクリン、エピルビシン、メルバロン、ピロキサントロン塩酸塩；抗代謝剤、例えば５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、リン酸フルダラビン、シタラビン／Ａｒａ－Ｃ、トリメトレキサート、ゲムシタビン、アシビシン、アラノシン、ピラゾフリン、Ｎ－ホスホルアセチル－Ｌ－アスパレート＝ＰＡＬＡ、ペントスタチン、５－アザシチジン、５－アザ２’－デオキシシチジン、アラＡ、クラドリビン、５－フルオロウリジン、ＦＵＤＲ、チアゾフリン、Ｎ－［５－［Ｎ－（３，４－ジヒドロ－２－メチル－４オキソキナゾリン－６－イルネチル）－Ｎ－メチルアミノール－２－テノイル］－Ｌ－グルタミン酸；アルキル化剤、例えばシスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシンＣ、ＢＣＮＵ＝カルムスチン、メルファラン、チオテパ、ブスルファン、クロランブシル、プリカマイシン、ダカルバジン、イホスファミドリン酸塩、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、ウラシルマスタード、ピポブロマン、４－イポメアノール）；他の作用機構を通して作用する剤、例えばジヒドロレンペロン、スピロムスチンおよびデシペプチド；生体応答調節剤、例えばインターフェロンのような抗腫瘍反応を強化する剤；アポトーシス剤、例えばアクチノマイシンＤ；ならびに、抗ホルモン剤、例えばタモキシフェンのような抗エストロゲン剤、または、例えば４’－シアノ－３－（４－フルオロフェニルスルフォニル）－２－ヒドロキシ－２－メチル－３’－（トリフルオロメチル）プロピオンアニリドのような抗男性ホルモン。

【０２９９】

ＴＡＡに特異的な抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドはＴＡＡを提示する癌細胞を認識するので、リガンドが結合するいかなる細胞も破壊される。あるいは、リガンドは癌細胞の近くの細胞と結合して殺傷し、このようにして周囲の細胞に栄養、増殖シグナルその他を頼っている可能性のある癌細胞を間接的に攻撃する。このように、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンド（例えば、細胞毒で修飾された）は、癌性組織中の細胞（癌細胞そのものも含む）を選択的に殺すか除去することができる。

【０３００】

リガンドを用いて各種細胞毒の送達をしてもよく、これには治療薬、放射性化合物、植物、菌類または細菌起源の分子、生物学的なタンパク質およびその混合剤が含まれる。細胞毒性剤は細胞内で作用する細胞毒性剤でよく、例えば本明細書に記載されているように、近距離高エネルギーαエミッターなどの近距離照射エミッターでよい。

【０３０１】

酵素活性を有するトキシンとその断片の例として、ジフテリア毒素Ａ断片、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素Ａ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ（緑膿菌）から）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデッシンＡ鎖、αサクリン、特定のシナアブラギリタンパク質、特定のＤｉａｎｔｈｉｎ（ナデシコ）タンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａ（ヨウシュヤマゴボウ）タンパク質（ＰＡＰ、ＰＡＰＩＩおよびＰＡＰ－Ｓ）、Ｍｏｒｏｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害物質、クルシン、クロチン、Ｓａｐｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌ阻害物質、ゲロニン、マイトジリン、レストリクトシン、フェノマイシンおよびエノマイシンがある。イムノトキシンの酵素活性ポリペプチドを調製するための方法が国際出願84/03508号および国際出願85/03508号で記載されており、それらは参照として本明細書に、また下記添付実施例に組み込まれている。抗体と抱合できる細胞毒部分の例として、アドリアマイシン、クロラムブシル、ダウノマイシン、メトトレキサート、ネオカルチノスタチンおよびプラチナがある。

【０３０２】

ポリペプチドトキシンの場合、組換え核酸手法を用いて、リガンド（またはそのポリペプチド成分）と細胞毒（またはそのポリペプチド成分）をコードする核酸を翻訳融合体として構築できる。この組換え核酸は、次に、例えば細胞内で発現され、コードされた融合ポリペプチドが単離される。

【０３０３】

細胞毒性の剤でタンパク質リガンド（例えば抗体）を抱合する方法は、前に記載されている。抗体でクロラムブシルを抱合する方法は、Flechner (1973) European Journal of Cancer, 9: 741-745；Ghose et al. (1972) British Medical Journal, 3: 495-499;およびSzekerke et al. (1972) Neoplasma, 19: 211-215で記載されており、これらは参照として本明細書に組み込まれている。ダウノマイシンおよびアドリアマイシンを抗体と抱合させる方法は、Hurwitz, E. et al. (1975) Cancer Research, 35: 1175-1181、およびAroon et al. (1982) Cancer Surveys, 1: 429-449で記載されており、これらは参照として本明細書に組み込まれている。抗体－リシン抱合体を調製する方法は、米国特許第4,414,148号、およびOsawa, T., et al. (1982) Cancer Surveys, 1: 373-388、ならびにその引用文献で記載されている。カップリング方法も欧州特許第 86309516.2号に記載されている。

【０３０４】

通常細胞、良性の過形成細胞、または癌性の細胞を殺すか除去するために、第１のタンパク質リガンドは、プロドラッグ活性化因子に近接しているときのみ活性化されるプロドラッグと抱合される。このプロドラッグ活性化因子は、第２のタンパク質リガンド、好ましくは標的分子上の非競合部位と結合するタンパク質リガンドと抱合される。２つのタンパク質リガンドが競合結合部位と非競合部位のいずれに結合するかは、従来の競合結合検定法で決定できる。本発明の実施での使用に適する薬剤－プロドラッグの組み合わせは、Blakely et al. (1996) Cancer Research, 56: 3287-3292に記載されている。

【０３０５】

あるいは、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、高エネルギー放射性エミッター、例えばγエミッターである^{131}Ｉのようなラジオアイソトープに結合でき、これらは腫瘍部位に限局されると数細胞長の範囲を死滅させる。例えば、S.E. Order,「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin et al. (eds.), pp 303-316 (Academic Press 1985) を参照。他の適当な放射性同位体には、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉおよび^{211}Ａｔなどのαエミッター、ならび

に^{186}Ｒｅおよび^{90}Ｙなどのβエミッターが含まれる。さらに、Ｌｕ^{117}も画像化と細胞毒性剤として使える可能性がある。

【０３０６】

^{131}Ｉ、^{90}Ｙおよび^{177}Ｌｕで標識された抗体を使った放射線免疫治療（ＲＩＴ）は、臨床で盛んに研究されている。これら３つの核種の物理的特性には顕著な差異があるので、放射性核種の選択は最大の放射線量を腫瘍に送達するために非常に重要である。^{90}Ｙのより高いβエネルギー粒子は、大きな腫瘍には都合よいかもしれない。^{131}Ｉの比較的低いエネルギーのβ粒子は理想的であるが、放射性ヨウ化分子のｉｎ　ｖｉｖｏ脱ハロゲンは、抗体を内在化する上で大きな不利である。これに対して、^{177}Ｌｕはわずか０．２～０．３ｍｍの範囲の低エネルギーβ粒子を有し、^{90}Ｙと比較して非常に低い放射線量を骨髄に送達する。さらに、より長い物理半減期（^{90}Ｙと比較して）のために、腫瘍滞留時間はより長い。その結果、骨髄に対しては比較的低い放射線量で、^{177}Ｌｕ標識の剤のより高い活性（より多いｍＣｉ量）を投与できる。各種癌の治療における^{177}Ｌｕ標識抗体の使用を検討する臨床研究がいくつか実施されている。（Mulligan T et al. (1995) Clin Cancer Res. 1: 1447-1454;Meredith RF, et al. (1996) J Nucl Med 37: 1491-1496;Alvarez RD, et al. (1997) Gynecologic Oncology 65: 94-101）。

【０３０７】

一実施形態では、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを直接ｉｎ　ｖｉｖｏで用い、自然の補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）または抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を通して抗原を発現している細胞を消滅させることができる。本発明のタンパク質リガンドは、補体結合エフェクター領域、例えばＩｇＧ１、－２および－３からのＦｃ部、または補体に結合するＩｇＭの対応する部分を含むことができる。一実施形態では、標的細胞の個体群は、ｅｘ　ｖｉｖｏで本発明の結合体と適切なエフェクター細胞で治療される。この治療は、補体または補体を含有する血清の添加で補うことができる。さらに、本発明のタンパク質リガンドでコーティングされた標的細胞に対する食作用は、補体タンパク質の結合で向上させることができる。他の実施形態では、補体結合エフェクター領域を含むタンパク質リガンドでコーティングされた標的細胞は、補体によって溶解される。

【０３０８】

他の実施形態では、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを用いて、他のエフェクター、例えば内因性免疫系による特定のＭＨＣ－ペプチド複合体の認識を阻止する。この実施のためには、「阻止」リガンドは、エフェクター領域、例えばＦａｂを欠いた抗体でもよい。例えば、ＭＨＣ複合体はグリア細胞またはランゲルハンス細胞表面にあってよい。多発性硬化症と糖尿病のような自己免疫性疾患は、これらの細胞に対する内因性の免疫系による攻撃と関連付けられている。これらの種類の細胞に特異的なＭＨＣ－ペプチドの認識を妨げる抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、例えば全身にまたは局所的に提供できる。例えば、阻止リガンドは、同じ組織内にあるかまたは全く同じである外因性もしくは内因性の細胞によって発現されてもよい。

【０３０９】

関連した実施例では、阻止リガンドは、細胞内で、例えば細胞分泌経路で阻止リガンドを保持させるシグナル配列を含む。例えば、小胞体保持を引き起こすＫＤＥＬ配列を、阻止リガンドのポリペプチド成分（例えば、抗体では鎖の１つ）に付加できる。

【０３１０】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを予防的に使用して殺傷または除去する方法も本発明に含まれる。例えば、これらの材料を用いて癌の発達または進行を予防したり遅らせたりできる。

【０３１１】

本発明の治療方法を癌の治療に活用すると、多くの恩恵がある。タンパク質リガンドがＭＨＣ－ペプチド複合体の多様化タンパク質成分を特異的に認識する実施形態では、他の組織は関与せず、剤が高濃度で直接治療が必要な部位に送達される。本発明に従った治療法は、臨床パラメーターで効果的に監視できる。あるいは、これらのパラメーターを用い

てそのような治療を採用すべき時期を示すことができる。

【０３１２】

本発明の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、現行の癌治療法、例えばそれには限定されないが外科手術、放射線療法および化学療法の１つまたは複数と併用して投与できる。

【０３１３】

－Ｔ細胞再プログラミング－

Ｔ細胞を再プログラミングしてそのＭＨＣ分子上で特定のペプチドを提示する細胞を狙うようにできる。特異的にＭＨＣ－ペプチド複合体を認識するタンパク質は、本明細書で記載されている方法で単離できる。タンパク質を形成するポリペプチド鎖をコードしている核酸は、Ｔ細胞に導入されてから発現する。

【０３１４】

一実施形態では、抗（ＭＨＣ－ペプチド）リガンドをコードしている核酸は、リガンドが宿主細胞表面で発現するように膜アンカーに機能的に融合される。抗（ＭＨＣ－ペプチド）リガンドは、抗体またはその断片でよい。一実施形態では、核酸はＦａｂ断片をコードし、断片の２つの鎖の１つは膜に固定される。他の実施形態では、断片の両方の鎖が膜に固定される。

【０３１５】

一実施形態では、単離されたタンパク質が抗原結合ドメインを含むならば、この抗原結合ドメインの可変ドメインをコードしている核酸は、融合核酸が単鎖抗体ドメインをコードするようにフレームに加えられる。単鎖構築物を使用すると、２つの可変ドメインが異種細胞で発現するときにはそれらが確実に一体となり、２つのドメインの片方が過剰になることはない。

【０３１６】

他の実施形態では、両方の可変領域をコードするが分離したポリペプチドとしてコードする核酸が、例えば各コード核酸のプロモーターまたは分岐プロモーターまたは多シストロン性カセットを用いて構築される。

【０３１７】

核酸は次に、Ｔ細胞、一般的にはヒトＴリンパ球、例えば自己Ａ２．１拘束Ｔリンパ球に導入される。例えば、この核酸は、例えば対象とするアロタイプを発現するＴ細胞を一定割合有するドナーまたは患者から、ヒトＴ細胞の集団の細胞に導入できる。この核酸はレトロウイルスのベクターを使って導入できる。例えば、この核酸はレトロウイルスのベクターにクローニングできる（例えば、Willemsen et al. (2000) Gene Ther. 7: 1369およびStanislawski et al. (2001) Nature Immunol. 2: 962に記載されている）。

【０３１８】

この核酸は、レトロウイルスのパッケージング系統、例えば２９３Ｔ細胞に、例えばリン酸カルシウム沈降法などのトランスフェクションによって導入できる。一実施形態では、この核酸は培養Ｔリンパ球へ移される。例えば、トランスフェクションされた２９３Ｔ細胞は、抗ＣＤ３抗体で活性化されＩＬ－２で処理されたＰＢＭＣと共培養される。共培養の間、２９３細胞によって産生されたレトロウイルスがＰＢＭＣ細胞に感染する。感染Ｔ細胞の機能は、例えばリガンドの対象であるＭＨＣペプチドを発現する標的細胞の存在下でクロム放出試験を使って試験できる。このＴ細胞は、対象にも導入できる。

【０３１９】

関連した実施例では、受容Ｔリンパ球は治療が必要な（すなわち、Ｔリンパ球が自家細胞である）患者などの対象から取得できる。ベクターの導入の後、修飾されたＴリンパ球は対象に再導入できる。当然、そのような治療のためのＴリンパ球は他の供与源から得ることができる。例えば、受容者Ｔリンパ球は、例えば有害免疫反応を最小化するために、類似した遺伝構成を有する対象の親族または他の個体からも得られる。

【０３２０】

－診断用途－

ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合し、本明細書で記載の方法で同定されるタンパク質リガンドは、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏでの診断、治療および予防の用途に有用である。

【０３２１】

一態様では、本発明は、特定のペプチドを提示するＭＨＣ－ペプチド複合体の存在をｉｎ ｖｉｔｒｏ（例えば、癌組織などの組織や生検材料などの生体試料）またはｉｎ ｖｉｖｏ（例えば、対象のｉｎ ｖｉｖｏ画像化）で検出するための診断法を提供する。

【０３２２】

この方法では、（ｉ）試料を抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドと接触させ、（ｉｉ）抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドと試料間で形成された複合体を検出する。この方法では、標準試料（例えば対照試料）をリガンドと接触させて、リガンドと試料間の複合体の形成程度を、標準試料のそれと比較して測定することもできる。対照試料または対象と比較した、試料または対象における複合体の形成における変化、例えば統計的に有意な変化は、試料中のＭＨＣ上での特定のペプチド（例えばＴＡＡ）の提示を示すものと成りうる。

【０３２３】

他の方法では、（ｉ）抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを対象に投与し、（ｉｉ）抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドと対象間で形成された複合体を検出する。検出には、複合体の形成の場所または時間を決定することを含めることができる。

【０３２４】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、結合または非結合の抗体の検出を容易にするために、検出可能な物質で直接または間接的に標識できる。適当な検出可能な物質には、各種酵素、人工基、蛍光物質、発光材料および放射性物質が含まれる。

【０３２５】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドとＭＨＣ－ペプチド複合体間の複合体の形成は、ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合したリガンドか非結合のリガンドを測定または可視化することによって検出できる。従来の検出アッセイ、例えば酵素結合抗体免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または組織免疫組織化学を利用できる。抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドの標識に加えて、試料中のＭＨＣ－ペプチド複合体の存在は、検出可能な物質で標識された標準物質と非標識の抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを利用した競合イムノアッセイによって検定できる。

【０３２６】

蛍光団と発色団で標識されたタンパク質リガンドが調製できる。抗体その他のタンパク質は約３１０ｎｍまでの波長の光を吸収するので、約３１０ｎｍ、好ましくは４００ｎｍを超える波長でかなりの吸収を示す蛍光部分を選ぶ必要がある。各種適当な蛍光剤および発色団が、Stryer (1968) Science, 162: 526およびBrand, L. et al. (1972) Annual Review of Biochemistry, 41: 843-868によって記載されている。タンパク質リガンドの蛍光発色基による標識は、従来の方法、例えば米国特許第3,940,475号、第4,289,747号および第4,376,110号で開示されている方法で可能である。上述の望ましい特性を多く有する蛍光剤の一群はキサンテン系染料であり、これにはフルオレセインとローダミンが含まれる。他の群の蛍光化合物は、ナフチルアミン類である。一旦蛍光団または発色団で標識されると、タンパク質リガンドは試料中のＭＨＣ－ペプチド複合体の存在または場所を、例えば蛍光顕微鏡検査法（例えば共焦点または逆重畳積分鏡検）を使って検出するために利用できる。

【０３２７】

組織学的分析：免疫組織化学は、本明細書で記載されるタンパク質リガンドを使って実施できる。例えば、抗体の場合、抗体は標識（例えば精製またはエピトープ標識）で合成できるか、または、例えば標識もしくは標識結合基を抱合させて検出可能に標識することができる。例えば、キレーターを抗体に付着させることができる。抗体は、次に組織調製物、例えば顕微鏡スライド上の固定された組織切片と接触させる。結合のためにインキュ

ベーションした後、調製物を洗浄して結合していない抗体を取り除く。調製物は、次に、例えば鏡検により検査して、抗体が調製物と結合しているかどうかを同定する。

【０３２８】

当然、抗体（または他のポリペプチドもしくはペプチド）は結合時には標識されていなくてもよい。結合および洗浄の後、抗体は検出できるように標識される。

【０３２９】

タンパク質アレイ。抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、タンパク質アレイ上にも固定化できる。このタンパク質アレイは、例えば医療試料（例えば分離細胞、血液、血清、生検材料、など）をスクリーニングするための診断手段として使える。当然、このタンパク質アレイは、他のリガンド、例えばＭＨＣ－ペプチド複合体または他の癌特異的抗原のような他の標的分子と結合するリガンドを含むことができる。

【０３３０】

ポリペプチドアレイの産生方法は、例えばDe Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18: 989-994; Lueking et al. (1999) Anal. Biochem. 270: 103-111; Ge (2000) Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeath and Schreiber (2000) Science 289: 1760-1763; 国際出願01/40803号、および国際出願99/51773A1に記載されている。アレイのためのポリペプチドは、例えばGenetic MicroSystemsまたはBioRoboticsからの市販のロボット装置を使うと高速でスポットできる。アレイ基板は、例えばニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば表面修飾ガラスでよい。アレイは、多孔性のマトリックス、例えばアクリルアミド、アガロースまたは他のポリマーも含むことができる。

【０３３１】

例えば、アレイは抗体のアレイ、例えば上記De Wildtに記載のアレイでよい。タンパク質リガンドを生成する細胞は、アレイフォーマットのフィルター上で増殖させることができる。ポリペプチドの生産が誘発され、発現したポリペプチドは細胞の位置でフィルターに固定される。例えば、抗体の少なくとも一部は、異なるＭＨＣ－ペプチド複合体を認識できる。

【０３３２】

タンパク質アレイを標識標的と接触させ、各固定化ポリペプチドリガンドへの標的の結合の程度を測定できる。標的が未標識の場合、サンドイッチ法を、例えば標識プローブを用いて実施し、未標識の標的の結合を検出できる。

【０３３３】

アレイの各アドレスにおける結合程度についての情報は、プロフィールとして、例えばコンピューターデータベース内に保存できる。タンパク質アレイを用いて、試料中に提示されている（例えば、試料の１つまたは複数の細胞上で提示されている）ＭＨＣ－ペプチド複合体を同定できる。

【０３３４】

ＦＡＣＳ（蛍光活性化細胞分取）：抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを用いて、例えば試料（例えば患者からの試料）中の細胞を標識できる。リガンドも、蛍光化合物に付着させられる（またはそうすることが可能）。次に、細胞は蛍光活性化細胞分取（例えば、Becton Dickinson Immunocytometry Systems, サンノゼCA のソーターを使用、米国特許第5,627,037号; 第5,030,002号; および第5,137,809号も参照）で選別できる。細胞がソーター中を通るときにレーザー光線は蛍光化合物を励起し、一方、検出器は通過する細胞を数え、かつ蛍光を検出して蛍光化合物が細胞に付着しているかどうかを測定する。各細胞に結合した標識の量を定量、分析し、試料の特徴を把握することができる。

【０３３５】

ソーターは細胞をそらすこともでき、リガンドに結合した細胞をリガンドに結合していない細胞から分離することができる。分離された細胞は培養し、および／または特徴を把握することができる。

【０３３６】

ｉｎ　ｖｉｖｏ画像化：他の実施例では、本発明はｉｎ　ｖｉｖｏのＴＡＡをＭＨＣ分

子上に提示している癌性組織の存在を検出する方法を提供する。この方法では、（ｉ）対象（例えば、癌または新生物疾患を有す患者）に対して抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドを検出可能なマーカーと抱合させて投与し、（ｉｉ）対象を、ＴＡＡを提示している組織または細胞から前記検出可能なマーカーを検出する手段に曝す。このタンパク質リガンドは、ペプチドがない場合はＭＨＣとは実質的に結合せず、ＭＨＣがない場合にはペプチドと実質的に結合しない。例えば、対象は、例えばＮＭＲまたは他の断面撮影手段で撮像される。

【０３３７】

本発明に従う画像診断に役立つ標識の例には、放射能標識、例えば^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{123}Ｉ、^{99m}Ｔｃ、^{32}Ｐ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃおよび^{188}Ｒｈ；蛍光標識、例えばフルオレセインとローダミン；核磁気共鳴放射性標識、ポジトロン放出断層撮影（「ＰＥＴ」）スキャナーで検出可能な陽電子放出同位体；ルシフェリンのような化学発光体；ならびに酵素マーカー、例えばペルオキシダーゼまたはホスファターゼが含まれる。近距離探知器プローブによって検出できる同位体などの近距離照射エミッターも使用できる。タンパク質リガンドは、公知の手法を使ってそのような試薬で標識できる。例えば、抗体の放射能標識に関する手法についてはWensel and Meares (1983) Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New Yorkを参照、またD. Colcher et al. (1986) Meth. Enzymol. 121: 802-816も参照。

【０３３８】

本発明の放射能標識リガンドはｉｎ　ｖｉｔｒｏでの診断検査にも使える。同位体で標識されたリガンドの比活性は、半減期、放射性標識の同位体的純度および抗体への標識の取り込まれ方によって決まる。

【０３３９】

ポリペプチドを放射性同位元素（^{14}Ｃ、^{3}Ｈ、^{35}Ｓ、^{125}Ｉ、^{32}Ｐ、^{131}Ｉなど）で標識する手法は公知である。例えば、トリチウム標識方法は、米国特許第4,302,438号で記載されている。ヨード化、トリチウム標識、および^{35}Ｓ標識手法、例えばネズミのモノクローナル抗体用に変更された手法は、例えばGoding, J.W. (Monoclonal antibodies: principles and practice : production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry, and immunology 2nd ed. London; Orland: Academic Press, 1986. pp 124-126）に記載されている。ポリペプチド（例えば抗体）をヨード化する他の方法は、Hunter and Greenwood (1962) Nature 144: 945、David et al. (1974) Biochemistry 13: 1014-1021および米国特許第3,867,517号と第4,376,110号に記載されている。画像化に役立つ放射能標元素には、例えば^{123}Ｉ、^{131}Ｉ、^{111}Ｉｎ、^{99m}Ｔｃが含まれる。抗体をヨード化するための方法は、Greenwood, F. et al. (1963) Biochem. J. 89: 114-123; Marchalonis, J. (1969) Biochem. J. 113: 299-305; およびMorrison, M. et al. (1971) Immunochemistiy 289-297に記載されている。^{99m}Ｔｃ－標識化のための方法は、Burchiel, S. et al. (eds.), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111-123 (1982)中のRhodes, B. et al. によって記載されている。^{111}Ｉｎ－標識化抗体に適する方法は、Hnatowich, D.J.et al. (1983) J. Immul. Methods 65: 147-157、Hnatowich, D. et a. (1984) J. Applied Radiation 35: 554-557およびBuckley, R. G. et al (1984) F.E.B.S. 166: 202-204に記載されている。

【０３４０】

放射能標識リガンドの場合、リガンドは患者に投与され、リガンドが反応する抗原を有す腫瘍に限局され、例えばガンマカメラもしくは発光断層撮影を用いた放射性核スキャンなどの公知の手法を使ってｉｎ　ｖｉｖｏで検出されるか「画像化される」。例えば、A. R. Bradwell et al.,「Developments in Antibody Imaging」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W. Baldwin et al. (eds.), pp 65-85（Academic Press 1985）を参照。あるいは、放射能標識が陽電子（例えば^{11}Ｃ、^{18}Ｆ、^{15}Ｏおよび^{13}Ｎ）を放出する場合は、ブルックヘブン国立研究所にある指定のＰｅｔ　ＶＩ

のような陽電子放射体軸横断断層撮影スキャナーが使える。

【０３４１】

ＭＲＩ造影剤：磁気共鳴画像化法（ＭＲＩ）はＮＭＲを用いて生きている対象の内部の特徴を視覚化するもので、予後、診断、治療および手術に役立つ。ＭＲＩは放射性トレーサー化合物なしで使用しても明らかな利益がある。いくつかのＭＲＩ手法が欧州特許A-0 502 814にまとめられている。通常、異なる環境中での水プロトンの緩和時間定数Ｔ１およびＴ２に関する差異を利用して画像を作製する。しかし、これらの相違は、鮮明な高分解能の画像を生むには十分ではないことがある。

【０３４２】

これらの緩和時間定数の相違は、造影剤によって強化することができる。そのような造影剤の例には多くの磁気剤、常磁性剤（これは、主にＴ１を変える）および強磁性体または超常磁性体（これは、主にＴ２応答を変える）が含まれる。キレート（例えばＥＤＴＡ、ＤＴＰＡおよびＮＴＡキレート）を用いていくつかの常磁性物質（例えば、Fe^{+3}、Mn^{+2}およびGd^{+3}）を付着させる（そして、毒性を減らす）ことができる。他の剤は、例えば直径が１０μｍ未満から約１０ｎｍの粒子の形状をとることができる。粒子は、強磁性体、反強磁性体または超常磁性体の性質を持つことができる。粒子の例として、磁鉄鉱（Fe_3O_4）、γ－Fe_2O_3、フェライトおよび遷移元素の他の磁気鉱物化合物が含まれる。磁性粒子には、非磁性体を含むか含まない１つまたは複数の磁気結晶が含まれてよい。非磁性体には、合成または天然の高分子が含まれる（セファロース、デキストラン、デキストリン、デンプンなど）。

【０３４３】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンドは、ＮＭＲ活性^{19}Ｆ原子またはそのような原子を複数含有する指示基でも標識できるが、但し（ｉ）自然に多量存在するフッ素原子の実質的に全てが^{19}Ｆ同位元素であって、したがってフッ素含有化合物の実質的に全てがＮＭＲ活性であり、（ｉｉ）トリフルオロ酢酸無水物のような多くの化学的に活性ポリフッ化化合物は、比較的安価で市販され、（ｉｉｉ）多くのフッ素化物が、ヘモグロビン置換として酸素を運ぶために利用されるペルフルオロポリエーテルのように、人での使用が医学的に許容できることが分かっている必要がある。インキュベーションのためにそのような時間を割いた後に、癌性の組織を見つけて画像化するために、Pykett (1982) Scientific American, 246: 78-88によって記載されたような器具の１つを使って、全身ＭＲＩが実施される。

【０３４４】

ＭＨＣ－ペプチド複合体に結合するタンパク質リガンドを含むキットおよび診断用の使用説明書も本発明の適用範囲内であり、この説明書には、ｉｎ ｖｉｔｒｏで、例えば標本中で、例えば癌もしくは新生物疾患の患者からの生検材料または細胞で、あるいはｉｎ ｖｉｖｏで対象の画像化により、ＭＨＣ－ペプチド複合体を検出するための、抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンド（例えば、抗体もしくはその抗原結合断片または他のポリペプチドもしくはペプチド）の使用法が含まれる。このキットには、さらに少なくとも１つの追加の試薬、例えば標識または別の診断用薬を含めることができる。ｉｎ ｖｉｖｏの使用のためには、リガンドは医薬組成物として製剤できる。

【０３４５】

－質量分析－

他の例示的な応用では、ＭＨＣ－ペプチド複合体と特異的に結合するタンパク質リガンドを用いて、その表面にそのような複合体を有する細胞または細胞から放出されたタンパク質複合体を単離する。複合体のペプチドは、質量分析によって分析される。

【０３４６】

この細胞は、ＦＡＣＳによって、またはタンパク質リガンドが付着した（または付着するようになる）支持体へ結合させることにより単離できる。単離の後、ペプチドは細胞の表面から溶出でき、質量分析、例えばＭＡＬＤＩ質量分析によって分析できる。溶出したペプチドの分子量を用いて細胞のプロフィールを作製でき、また例えば、リガンドの標的

である複合体によって提示されたペプチドのアイデンティティを確認すること、また他のＭＨＣ複合体によって表面に提示された他のペプチドを同定することができる。

【０３４７】

タンパク質複合体はペプチドリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製され、同じように分析できる。Flad et al. (1998) Cancer Res 58: 5803-11は、ＭＡＬＤＩを用いてＨＬＡ－クラスＩタンパク質によって提示されたペプチドを同定したことを記載している。

【０３４８】

抗（ＭＨＣ－ペプチド複合体）リガンド

表１は、癌細胞によってＭＨＣ複合体として提示されるペプチドの例をリストする。ＭＨＣ上に提示された場合にこれらのペプチドと特異的に結合するタンパク質リガンドを同定できる。

【０３４９】

【表１】

表1

たんぱく質	断片名	アミノ酸配列	SEQ ID NO
gp100	G9-209	(IMDQVPFSV)	SEQ ID NO:1
gp100	G9-280	(YLEPGPVTV)	SEQ ID NO:2
gp100	G9-154	(KTWGQYWQV)	SEQ ID NO:3
MUC1	D6	(LLLTVLTVV)	SEQ ID NO:4
TAX		(LLFGYPVYV)	SEQ ID NO:121
hTERT	T540	(ILAKFLHWL)	SEQ ID NO:5
hTERT	T865	(RLVDDFLLV)	SEQ ID NO:6

タンパク質リガンドが同定できる追加のペプチド－ＭＨＣ複合体のリストについては、Renkvist et al. (2001) Cancer Immunol Immunother 50: 3-15を参照。

表２は、そのペプチド成分がｇｐ１００のペプチド断片であるＭＨＣ－ペプチド複合体と結合する抗体をリストする。

【０３５０】

【表２】

表2

抗体名	認識された MHC 結合ペプチド	核酸配列 SEQ ID NO:		アミノ酸配列 SEQ ID NO:	
		軽鎖	重鎖	軽鎖	重鎖
1A11	G9-209	7	9	8	10
1A7	G9-209	11	13	12	14
1A9	G9-209	15	17	16	18
1C8	G9-209	19	21	20	22
1D7	G9-209	23	25	24	26
1G2	G9-209	27	29	28	30
2B2	G9-208	31	33	32	34
2C5	G9-208	35	37	36	38
2D1	G9-208	39	41	40	42
2F1	G9-208	43	45	44	46
G2D12	G9-154	47	49	48	50
G3F12	G9-154	51	53	52	54
G3F3	G9-154	55	57	56	58
G3G4	G9-154	59	61	60	62

表３は、そのペプチド成分がｈＴＥＲＴのペプチド断片であるＭＨＣ－ペプチド複合体と結合する抗体をリストする。

【０３５１】

【表３】

表3

抗体名	認識された MHC 結合ペプチド	核酸配列 SEQ ID NO:		アミノ酸配列 SEQ ID NO:	
		軽鎖	重鎖	軽鎖	重鎖
4A9	T540	83	85	84	86
4B4	T540	87	89	88	90
4C2	T540	91	93	92	94
4G9	T540	95	97	96	98
3A12	T865	99	101	100	102
3B1	T865	103	105	104	106
3F5	T865	107	109	108	110
3G3	T865	111	113	112	114
3H2	T865	115	117	116	118

表４は、そのペプチド成分がＭＵＣ－１のペプチド断片であるＭＨＣ－ペプチド複合体と結合する抗体をリストする。

【０３５２】

【表４】

表4

抗体名	認識された MHC 結合ペプチド	核酸配列 SEQ ID NO:		アミノ酸配列 SEQ ID NO:	
		軽鎖	重鎖	軽鎖	重鎖
M3A1	MUC-1 D6	63	65	64	66
M3B8	MUC1-D6	67	69	68	70

表５は、そのペプチド成分がＴＡＸのペプチド断片であるＭＨＣ－ペプチド複合体と結合する抗体をリストする。

【０３５３】

【表５】

表5

抗体名	認識された MHC 結合ペプチド	核酸配列 SEQ ID NO:		アミノ酸配列 SEQ ID NO:	
		軽鎖	重鎖	軽鎖	重鎖
T3E3	TAX	71	73	72	74
T3F1	TAX	75	77	76	78
T3F2	TAX	79	81	80	82

－ＨＬＡクラスと対立遺伝子－

以下は、ＨＬＡ対立遺伝子の例である：Ａ；Ｂ；Ｃｗ；ＤＭＡ；ＤＭＢ；ＤＯＡ；ＤＰＡ１；ＤＰＢ１；ＤＱＡ１；ＤＱＢ１；ＤＲＡ；ＤＲＢ１；ＤＲＢ３；ＤＲＢ４；ＤＲＢ５；ＤＲＢ６；ＤＲＢ７；Ｅ；Ｇ；ＭＩＣＡ；ＴＡＰ１；ＴＡＰ２。Human Mutation 11: 1-3, 1998も参照。

【０３５４】

以下の発明はさらに以下の例で例示されるが、それらはさらに限定するものと解釈されてはならない。本出願を通して引用されている全ての参照、係属中の特許出願および公表特許の内容は、参照により明示的に本明細書に組み込まれている。

【実施例１】

【０３５５】

選択およびスクリーニングのための方法

１．１　ビオチン化ｓｃＭＨＣ／ペプチド複合体の作製

記載のように（Denkberg and Reiter（2000）Eur. J Immunol. 30：3522-32）、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）内で産生された封入体のｉｎ　ｖｉｔｒｏリフォールディングによって、ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体を生成した。簡単に言えば、β２ｍとＨＬＡ－Ａ２遺伝子が可撓性ペプチドリンカーによって互いに連結している単鎖β２ミクログロブリン－ＨＬＡ－Ａ２（ｓｃＭＨＣ）構築体を、Ｃ末端での部位特異的ビオチン化用のＢｉｒＡ認識配列を含むように設計した（ｓｃＭＨＣ－ＢｉｒＡ）。この構築体は大腸菌内で発現され、ＩＰＴＧで誘導すると、大量の組換えタンパク質を含む細胞内封入体が貯留される。封入体を精製し、還元し、続いて５～１０モル過剰の抗原ペプチド存在下で酸化還元－混合緩衝系（０．１Ｍトリス、０．５Ｍアルギニン、０．０９ｍＭ酸化型グルタチオン、ｐＨ８．０）中でリフォールディングする。正確にフォールディングされたＭＨＣ－ペプチド複合体を単離し、陰イオン交換Ｑ－セファロースクロマトグラフィー（Ｐｈａｒｍａｃｉａ

）によって精製した。既に記載のように（Denkberg and Reiter（2000）Eur. J Immunol. 30：3522-32）、セントリコン－３０ユニット（Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ）を用いたろ過を使用して、溶出緩衝液をトリス－ＨＣｌ（１０ｍＭ、ｐＨ８．０）と交換し、ＢｉｒＡ酵素（Avidity、米国コロラド州Denver）を用いた特異的なビオチン化のためにｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体を１ｍｇ／ｍｌまで濃縮した。Ｇ－２５脱塩カラムを用いて過剰なビオチンをビオチン化複合体から除去した。既に記載のようにDenkberg and Reiter（2000）Eur. J Immunol. 30：3522-32）、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、サイズ排除クロマトグラフィー、およびＥＬＩＳＡアッセイを含む様々な生化学的手段によってｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体の均一性と純度を分析した。ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体の生物学的機能を、ＣＴＬ系およびペプチド特異的な形のクローンを染色する四量体の能力によって決定した。ｓｃＭＨＣ－ペプチド四量体の生成およびＣＴＬ染色手順は、既に詳細に記載されている（Denkberg and Reiter（2000）Eur. J Immunol. 30：3522-32；Denkberg and Reiter（2001）J Immunol 167、270-6）。

【０３５６】

１．２　ビオチン化複合体に対するファージ－抗体の選択

３．７×１０^{10}個の異なるＦａｂクローンを含む大きなヒトＦａｂライブラリーを選択に使用した（de Haard et al.（1999）J Biol Chem. 274：18218-30）。ファージ（１０^{13}個）をまず室温で１時間、ＰＢＳ含有２％脱脂粉乳中でストレプトアビジン被覆常磁性ビーズ（２００ｍｌ；Ｄｙｎａｌ、Ｏｓｌｏ）と一緒にプレインキュベートして、ストレプトアビジン結合体を除去した。また、ストレプトアビジン被覆常磁性ビーズ（２００ｍｌ；Ｄｙｎａｌ、Ｏｓｌｏ）を室温で１時間、ＰＢＳ＋２％牛乳中でインキュベートした。続いて、残ったファージを、減少量のビオチン化ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体（１回目に５００ｎＭ、次の回から１００ｎＭ）と一緒に１時間インキュベートした。ストレプトアビジン磁気ビーズを加え、この混合物を連続回転させながら１５分間インキュベートした。ビオチン化複合体に結合したファージを引き落とすために磁力を加えた。ストレプトアビジン結合複合体をＰＢＳ／０．１％ツイーンで１０回、ＰＢＳで２回洗浄した後、トリエチルアミン（ＴＥＡ）（１００ｍＭ）１ｍｌを用いた５分間のインキュベーションによって結合ファージを溶出した。トリス－ＨＣｌ（１Ｍ、ｐＨ７．４）１００μｌを加えることによって溶出混合物を中和し、大腸菌ＴＧ１細胞（ＯＤ６００＝０．５）を３７℃で３０分間感染させるために使用した。細菌を１００μｇ／ｍｌアンピシリンおよび２％グルコースを含む２ＹＴプレート（２ＹＴ／Ａ／Ｇ）上で３０℃で一晩増殖させた。

【０３５７】

コロニーを２ＹＴ／Ａ／Ｇのプレートから捕集し、培地５０ｍｌ中で１：１００に希釈した。細胞をＯＤ６００ｎｍ＝０．５まで増殖させ、培養物５ｍｌにＭ１３ＫＯ７ヘルパーファージ（５×１０^{11}ｃｆｕ）を加えた。３７℃で３０分間インキュベートした後、細胞を遠心分離し、２ＹＴ／アンピシリン（１００μｇ／ｍｌ）／カナマイシン（５０μｇ／ｍｌ）２５ｍｌ中に再懸濁させ、３０℃で一晩増殖させた。ファージを培養上清から捕集し、ＰＥＧ沈殿によって次回のパニングのために精製した。選択した抗体の多様性をＤＮＡフィンガープリント法によって決定した。プライマーｐＵＣ－リバース（５’－ＡＧＣＧＧＡＴＡＡＣＡＡＴＴＴＣＡＣＡＣＡＧＧ－３’；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１９）およびｆｄ－ｔｅｔ－ｓｅｑ２４（５’－ＴＴＴＧＴＣＧＴＣＴＴＴＣＣＡＧＡＣＧＴＴＡＧＴ－３’；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２０）を用いて、異なるクローンのＦａｂＤＮＡをＰＣＲ増幅させた。得ら由来
れたＰＣＲ断片をＢｓｔＮＩ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、米国マサチュセッツ州）（２時間、３７℃）で消化し、アガロースゲル電気泳動によって分析した。

【０３５８】

１．３　可溶性組換えＦａｂ抗体の発現および精製

ＦａｂのＣＨ１領域に融合したヘキサ－ヒスチジンタグを用いて可溶性ＦａｂをＢＬ２１細胞のペリプラスム画分から精製した。本発明者らは、それぞれの複合体について２～４個のＦａｂクローンをつくり分析した。これらのクローンはファージおよび可溶性Ｆａ

ｂ断片を用いたＥＬＩＳＡによって検定したそれらの特異性パターンに基づいて選択された。Ｆａｂ特異的クローンの一晩スターターカルチャーを３０℃で増殖させた。細胞を２ＹＴ／Ａ／Ｇ　５００ｍｌ中で１：１００に希釈し、ＯＤ６００ｎｍ＝０．８～１．０まで増殖させ、３０℃で４時間１ｍＭ　ＩＰＴＧを加えることによって誘導して組換えＦａｂ抗体を発現させた。この細胞を遠心分離し、そのペレットをＢ－ＰＥＲ溶液（Ｐｉｅｒｃｅ）５ｍｌ中に再懸濁させてペリプラスム内容物を放出させた。室温で３０分間回転インキュベートさせた後、この溶液を遠心分離（１５０００ｒｐｍ、１５分）し、その上清を予洗したＴＡＬＯＮビーズ懸濁液（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）０．５ｍｌと一緒に室温で４５分間インキュベートした。この溶液をＢｉｏｒａｄ使い捨てカラムに加え、沈降させた後、ビーズをＰＢＳ／０．１％ツイーン２０（ｐＨ８．０）１０ｍｌで３回洗浄した。１００ｍＭイミダゾールのＰＢＳ溶液０．５ｍｌを用いて結合Ｆａｂを溶出した。溶出したＦａｂをＰＢＳに対して２回透析して（一晩、４℃）、残余イミダゾールを除去した。精製したＦａｂの均一性および純度を、非還元および還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上での分析によって決定した。

【０３５９】

１．４　ファージクローンおよび精製したＦａｂ抗体を用いたＥＬＩＳＡ

ビオチン化ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体を用いたＥＬＩＳＡによって個々のファージクローンおよび可溶性Ｆａｂ断片の結合特異性を決定した。ＥＬＩＳＡプレート（Ｆａｌｃｏｎ）をＢＳＡ－ビオチン（１μｇ／ウェル）で一晩コーティングした。洗浄した後、プレートをストレプトアビジン（１μｇ／ウェル）と一緒にインキュベートし（１時間、室温）、十分に洗浄し、さらにＭＨＣ／ペプチド複合体０．５μｇと一緒にインキュベートした（１時間、室温）。ＰＢＳ／２％を用いて室温で３０分間プレートをブロックし、続いてファージクローン（～10^9ファージ／ウェル）または様々な濃度の可溶性精製Ｆａｂと一緒に、また洗浄後には１：１０００ＨＲＰ結合／抗ｍｙｃ抗体と一緒に、室温で１時間インキュベートした。ＴＭＢ試薬（Ｓｉｇｍａ）を用いて検出を行った。

【０３６０】

１．５　フローサイトメトリー

単鎖β２Ｍ－ＨＬＡ－Ａ２遺伝子でトランスフェクトさせたＢ細胞系ＲＭＡＳ－ＨＨＤ（Pascolo et al.（1997）J Exp Med. 185,2043-51）、ＥＢＶ形質転換Ｂ－リンパ芽球ＪＹ細胞または指示された腫瘍細胞を使用して、組換えＦａｂ抗体の細胞表面発現ＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体との反応性を決定した。約10^6個のＲＭＡＳ－ＨＨＤ細胞を無血清ＲＰＭＩで２回洗浄し、１００μＭのペプチドを含有する培地中で２６℃で一晩インキュベートした。ＪＹ細胞にペプチド（１００μＭ）を３７℃で負荷した。続いてＡＰＣを３７℃で２～３時間インキュベートして、ＭＨＣ－ペプチド複合体の細胞表面発現を安定化させた。細胞を１００μｌ中の組換えＦａｂ抗体（１０～１００μｇ／ｍｌ）と一緒に４℃で６０～９０分間インキュベートした。３回洗浄した後、細胞をＦＩＴＣ標識抗ヒトＦａｂ（Ｊａｃｋｓｏｎ）と一緒にインキュベートした。最終洗浄後に細胞を氷冷ＰＢＳ中に再懸濁させた。

【０３６１】

付着性腫瘍細胞をトリプシン処理によって回収し、冷ＲＰＭＩ中に再懸濁させた。

上記でＲＭＡＳ－ＨＨＤペプチド負荷細胞について説明したように、後続の洗浄およびインキュベーションは全て氷冷ＰＢＳ中で行った。細胞の分析はＦＡＣＳｔａｒフローサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）によって行い、その結果をＷｉｎＭＤＩプログラムで分析した（Trotter J.、Scripps、米国カリフォルニア州La JollaのＦＡＣＳ装置から得られたオンライン情報源も参照のこと）。

【０３６２】

１．６　競合結合アッセイ

フレキシブルＥＬＩＳＡプレートをＢＳＡ－ビオチンでコーティングし、ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体（１００μｌ中１０μｇ）を記載のように固定化した。可溶性精製Ｆａｂの結合は、［^{125}Ｉ］－Ｆａｂと特異的固定化ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体との結合を

阻害する精製したＦａｂの能力を試験する競合結合分析によって行った。Ｂｏｌｔｏｎ－Ｈｕｎｔｅｒ試薬を用いて、組換えＦａｂ抗体を［^{125}Ｉ］で標識した。競争相手として高濃度非標識Ｆａｂ断片の存在下で、標識したＦａｂをトレーサー（３～５×１０^{5}ＣＰＭ／ウェル）としてウェルに加えた。次いで、結合アッセイをＰＢＳ中で室温で１時間行った。最後に、プレートをＰＢＳで十分に（５回）洗浄し、結合した放射能をガンマカウンターで測定した。固定化ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体に結合した［^{125}Ｉ］標識Ｆａｂの５０％阻害を達成するのに必要な競争相手の濃度を推定することによってＦａｂの見掛け上の親和力を決定した。２０～４０倍過剰な非標識Ｆａｂを加えることによって非特異的結合を決定した。

【実施例２】

【０３６３】

ＧＰ１００－ＨＬＡ－Ａ２抗体

ここで、本発明者らは初めて、Ｔ細胞の抗原特異的なＭＨＣ拘束特異性を備えた高親和性ヒト組換えＦａｂ抗体の一パネルを単離した。これらの抗体は、ヒト黒色腫分化抗原ｇｐ１００の一般的なＨＬＡ－Ａ２拘束エピトープ３種を認識する。ＨＬＡ－Ａ２は、多くの癌関連ペプチドを提示する最も高頻度なヒトＭＨＣ対立遺伝子である。抗体は、異なるｇｐ１００由来エピトープを示す組換え操作した単鎖ＭＨＣ－ペプチド複合体について選択したファージ抗体ライブラリーの大きな非免疫レパートリーから単離した。

【０３６４】

本発明者らは、このパネルの抗体が、ＨＬＡ－Ａ２分子が、抗体を選択するのに用いられたペプチドを提示しているときだけＨＬＡ－Ａ２分子を認識し、他のｇｐ１００由来エピトープまたは他のＨＬＡ－Ａ２拘束対照ペプチドと複合体を形成したＨＬＡ－Ａ２分子とは結合しないことを示す。したがって、それらは、ＴＣＲ様拘束を示す。さらにこれらの抗体は、抗原提示細胞ならびに黒色腫の腫瘍細胞表面上の特異的なＨＬＡ－Ａ２／ｇｐ１００エピトープをフローサイトメトリーによって直接可視化するのに使用されている。

【０３６５】

結果：

３種の黒色腫由来ｇｐ１００ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含む組換え単鎖ＭＨＣ－ペプチド複合体

【０３６６】

ｇｐ１００は、ほとんどの黒色腫細胞で発現される６６１個のアミノ酸からなるメラノサイト系特異的膜糖タンパク質である。このタンパク質は、黒色腫患者から単離された多くのＨＬＡ－Ａ２拘束黒色腫反応性腫瘍浸潤性リンパ球（ＴＩＬ）によって認識される（Kawakami et al.（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91：6458-62；Bakker et al.（1994）J. Exp. Med. 179：1005-09）。ｇｐ１００にはＴ細胞エピトープが５種確認されており；そのうちの３種は、異なる患者由来のＣＴＬによって認識される一般的な免疫原性エピトープ（Kawakami et al.（1995）J Immunol. 154：3961-68；Cox et al.（1994）Science 264：71619）：Ｇ９２０９（ＩＭＤＱＶＰＦＳＶ；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）、Ｇ９２８０（ＹＬＥＰＧＰＶＴＶ；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、およびＧ９１５４（ＫＴＷＧＱＹＷＱＶ；ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）である。３種のｇｐ１００由来エピトープを示す組換えＭＨＣ－ペプチド複合体は、既に記載されている単鎖ＭＨＣ（ｓｃＭＨＣ）構築体を用いることによって作製した（Denkberg and Reiter（2000）Eur. J Immunol. 30:3522-32；Denkberg and Reiter（2001）J Immunol 167、270-6）。この構築体では、ＨＬＡ－Ａ２の細胞外領域は、１５－アミノ酸可撓性リンカーを用いてβ２－ミクログロブリンを含む単鎖分子と連結している。ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体は、３種のそれぞれのｇｐ１００由来ペプチドの存在下で、ｓｃＭＨＣ構築体を用いて形質転換した細菌培養物の封入体のｉｎ　ｖｉｔｒｏリフォールディングによって生成した。可溶性組換えｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体は、イオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーを使用した精製プロトコルを用いてリフォールディング溶液から得られた。リフォールディングしたｇｐ１００由来ペプチドＭＨＣ複合体は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびサイズ排除クロマトグラ

フィーでの分析によって示されたように、極めて高純度で均質であり、単量体型であった。この戦略によって精製した組換えｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体は、それらの生化学、生物物理学、および生物学的特性について既に詳細に特徴付けられており、機能的であることがわかっている（Denkberg and Reiter（2000）Eur. J Immunol. 30:3522-32；Denkberg and Reiter（2001）J Immunol 167、270-6）。リフォールディングしたｇｐ１００由来ＭＨＣ－ペプチド複合体が機能的であることを実証するために、本発明者らは、それらのｇｐ１００由来Ｇ９２０９に特異的なＣＴＬクローンを染色する能力を試験した（Dudley and Rosenberg（2000）Cancer J. 6：69-77）。このために、本発明者らは、既に記載のようにｓｃＭＨＣ－Ｇ９２０９四量体を作製した（Denkberg and Reiter（2000）Eur. J Immunol. 30:3522-32）。今のところ、これはＭＨＣ－ペプチド－ＴＣＲ相互作用の低親和性を克服するのに十分に確立された戦略である（Altman et al.,（1996）Science 274：94-96；Lee et al.,（1999）Nat. Med. 5：677-85；Ogg et al（1998）Science 279：2103-06）。ｓｃＭＨＣ－Ｇ９２０９四量体は、Ｇ９２０９限定ＣＴＬクローンＲ６Ｃ１２を特異的に染色することができた（図２９Ａ）。しかし、Ｇ９２８０エピトープ含有四量体は、これらの細胞（図２９Ｂ）ともＨＴＬＶ－１由来、ＨＬＡ－Ａ２拘束エピトープＴＡＸ３４含有四量体（図２９Ｃ）とも結合しなかった。ｓｃＭＨＣ－Ｇ９２０９四量体は、インターフェロン－γの分泌によって示されるように、Ｒ６Ｃ１２　ＣＴＬを活性化させることもできた。これらの結果から、組換えｓｃＭＨＣ複合体が機能的であり、天然ＭＨＣ－ペプチド複合体の立体構造を保持することが示唆される。

【０３６７】

黒色腫抗原ｇｐ１００の３種の一般的なＴ細胞エピトープに対するＴＣＲ様特異性を有する組換え抗体の選択

【０３６８】

効率的な選択を可能にするために、既に記載のように、部位特異的ビオチン化のためにＨＬＡ－Ａ２遺伝子のＣ末端に組み込んだＢｉｒＡ配列タグを用いてｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体をビオチン化した（Altman et al.,（1996）Science 274：94-96；Denkberg and Reiter（2000）Eur. J Immunol. 30:3522-32）。３．７×10^{10}個のヒト組換えＦａｂ断片の大きな未処置のレパートリー（de Haard et al.（1999）J Biol Chem. 274：18218-30）をまずストレプトアビジン被覆ビーズと一緒にインキュベートして、抗ストレプトアビジン抗体の選択を防止した。磁場を加えてビーズを沈殿させ、ストレプトアビジンに結合するものを除去したライブラリーを含有する上清を、その後の３種のそれぞれのｇｐ１００由来Ｔ細胞エピトープを含有する可溶性組換えｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体に対する溶液中でのパニングに使用した。可溶性複合体と一緒にライブラリーをインキュベートした後、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズを用いて結合ファージを捕集し、続いてトリエチルアミンで溶出した。３種のそれぞれの異なるｇｐ１００由来ペプチド－ＭＨＣ複合体を用いてパニングを３回行った後、１０００～２５００倍富化されたファージ力価が観察された（表１）。

【０３６９】

ファージ粒子を用いたＥＬＩＳＡを行って、ＢＳＡ－ビオチンストレプトアビジン被覆免疫プレートに固定化したビオチン化組換えｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体に対するファージ特異性を決定した。ＢＳＡ－ビオチン－ストレプトアビジンスペーサーによって、プラスチックに直接結合させるとゆがんでしまうかもしれない複合体の正確なフォールディングが可能になる。各複合体に対する３回目のパニングから無作為に選択したファージの約７０～９０％が、対応するＭＨＣ－ペプチド複合体と反応した（表１）。選択したファージ抗体の厳密な特異性は、他の２種のｇｐ１００由来エピトープを含めた特異的ｇｐ１００由来ペプチドまたは対照ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有するｓｃＭＨＣ　ＨＬＡ－Ａ２複合体でコーティングしたウェルに対する分別ＥＬＩＳＡによって決定した（図３０Ａ～３０Ｃ）。選択した特異的なクローンの多様性パターンをＤＮＡフィンガープリント分析によって評価した。これらの特異性アッセイ後に、２タイプのＦａｂファージクローンが観察された。一方のタイプは、ペプチド特異的でなくＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体と

結合し、もう一方は、ペプチド特異的にＨＬＡ－Ａ２複合体に結合する（表１でＴＣＲ様結合体と呼ばれている）。本発明者らは、これらの特異的なクローンを検定し、以下の特異性の結果を明らかにした：Ｇ９１５４エピトープの場合、分析した９０個のうちの２４個のクローン（２７％）は、ＨＬＡ－Ａ２－Ｇ９１５４複合体と特異的に反応したが、ｇｐ１００由来ペプチドＧ９２８０、Ｇ９２０９を含有する複合体あるいはＨＴＬＶ－１ＴＡＸまたは黒色腫ＭＡＲＴ１含有ｓｃＭＨＣ複合体と反応しなかった（１０個のＴＣＲ様Ｆａｂクローンの代表的な分析結果として表１および図３０Ａ）。これらのクローンの多様性分析から、１０通りの異なるパターンが認められた。したがって、ＴＣＲ様特異性を有するいくつかの異なる抗体が選択された。Ｇ９２０９エピトープの場合、分析した９４個のうちの２０個のクローン（２１％）は、ＨＬＡ－Ａ２－Ｇ９２０９複合体と特異的に反応したが、対照の複合体とは反応しなかった（５個のクローンを分析した表１および図３０Ｂ）。これらの陽性クローンから、４種の異なるフィンガープリントパターンが得られた。最後に、Ｇ９２８０エピトープを含有するＨＬＡ－Ａ２複合体に対するパニングの結果、３種の異なるフィンガープリントパターンを示す１５／９４個の特異的ペプチド拘束クローン（１６％）が得られた（５個のクローンを分析した表１および図３０Ｃ）。最も興味深いのは、ＭＨＣ－ペプチド複合体と結合したファージクローンの１６～２７％が特異的ＴＣＲ様結合体であるという予想外の高頻度である（表１）。

【０３７０】

スクリーニングした３種全てのＨＬＡ－Ａ２－ｇｐ１００ペプチド複合体について、本発明者らは、ＴＣＲ様結合パターンを示すこうしたＦａｂ抗体をいくつか単離し、３種全ての場合において、３回の選択後に（３０～５０％の頻度で）１個の特定のクローンによって集団が占有された。

【０３７１】

ＴＣＲ様特異性を有する組換え可溶性Ｆａｂ抗体の性質

本発明者らは、ファージＥＬＩＳＡアッセイによって分析したように、最も特異的なペプチド依存性およびＴＣＲ様結合パターンを示す各ＨＬＡ－Ａ２－ｇｐ１００由来複合体に対して２～４個のＦａｂクローンを選択した。材料と方法（materials and methods）に記載したように、３種のそれぞれのｇｐ１００由来ＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体と特異的に結合するこれらのＦａｂ断片は、大腸菌ＴＧ１またはＢＬ２１細胞内で可溶性形態で産生され、ＩＭＡＣによって精製された。細菌培養物１リットルから高純度物質が約０．５～２ｍｇ得られた。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析により、予測された分子サイズの均質で高純度なＦａｂの集団が明らかになった。

【０３７２】

精製したこれらのＦａｂ断片の結合特異性を、ＢＳＡ－ビオチン－ストレプトアビジンによってウェルに固定化したビオチン化ＭＨＣ－ペプチド複合体に対するＥＬＩＳＡアッセイによって決定した。固定化された複合体の正確なフォールディングおよび結合アッセイ中のそれらの安定性は、正確にフォールディングしかつペプチドを含有するＨＬＡ複合体とのみ結合する立体構造特異的モノクローナル抗体Ｗ６／３２と反応する能力によって、決定した。本発明者らが可溶性精製Ｆａｂを使用した場合、これらのＥＬＩＳＡアッセイから、極めて特異的な認識パターンが明らかになった（図３１Ａ～３１Ｄ）。Ｇ９１５４ＨＬＡ－Ａ２複合体との結合性で選択された２個のＦａｂクローン、Ｇ２Ｄ１２およびＧ３Ｇ４は、その複合体とだけ結合するが、Ｇ９２０９またはＧ９２８０ペプチドを提示する複合体あるいはＭＵＣ１由来ペプチド（Carmon et al.（2000）Int J Cancer. 85：391-7）またはＨＴＬＶ－１由来ＴＡＸペプチドを含有するＨＬＡ－Ａ２複合体と結合しない（図３１Ａ）。

【０３７３】

Ｇ９２０９ＨＬＡ－Ａ２複合体に特異的なＦａｂクローンは、この複合体のみ認識したが、同じ状況の他の２つのｇｐ１００由来ペプチドあるいは２つのテロメラーゼ由来ＨＬＡ－Ａ２複合体を認識しない（図３１Ｂ）。最後に、ＨＬＡ－Ａ２－Ｇ９２８０特異的Ｆａｂクローンは、それらのＧ９２８０由来複合体のみ認識し、他のどんなＭＨＣ－ペプチ

ド複合体も認識しない（図３１Ｃ）。Ｆａｂ抗体は、他の５～７個のＨＬＡ－Ａ２ペプチド複合体、ペプチド単独、空ＨＬＡ－Ａ２分子（ペプチドがないと不安定なため作製するのが困難である）、ストレプトアビジンあるいは他のタンパク質抗原のいずれも認識しなかった。したがって、これらの抗原特異的Ｆａｂ断片は、ＴＣＲ様分子の結合特徴および優れた特異性を示す。

【０３７４】

特異的および対照の可溶性ｓｃＭＨＣ－ペプチド複合体を溶液中に過剰に存在させ、固定化複合体との結合を競合させた競合実験で、ＥＬＩＳＡ結合特異性の結果を確認した。特異的な可溶性ＭＨＣ－ペプチド複合体で競合が観察されたが、対照の複合体では観察されなかった。溶液中の可溶性Ｇ９２８０含有ＨＬＡ－Ａ２は、Ｆａｂ２Ｆ１と固定化Ｇ９２８０／ＨＬＡ－Ａ２複合体との結合を競合阻害したが、Ｇ９１５４／ＨＬＡ－Ａ２複合体はしなかった。このタイプのアッセイの例を図３１Ｄに示す。

【０３７５】

次に、Ｆａｂ抗体の量を増加させて加えたＢＳＡ－ビオチン－ストレプトアビジン被覆プレートにビオチン化複合体を結合させる飽和ＥＬＩＳＡアッセイを用いてＴＣＲ様可溶性Ｆａｂの親和性結合特性を決定した。３種の特異的なＦａｂと、対応するｇｐ１００由来ＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体との結合は、用量依存性および飽和性であった（図３２Ａ～３２Ｃ）。５０％結合シグナルを推定することにより、これらの抗体が、結合親和性がナノモル範囲の高親和性を持つことが明らかになった。ＴＣＲ様Ｆａｂ断片と、対応するＭＨＣ－ペプチド複合体との見掛けの結合親和性を決定するために、本発明者らは、非標識のＦａｂ断片の濃度をあげながら^{125}Ｉ標識Ｆａｂを結合させる競合結合アッセイを行った。３種のｇｐ１００由来Ｔ細胞エピトープにそれぞれ特異的な３種のＦａｂの見掛けの結合親和性を測定したところ、１５～３０ｎＭであった（図３２Ｄ～３２Ｆ）。これらの結果は、本発明者らが、抗体の大きな非免疫ファージ提示レパートリーからのＴＣＲ様特異性を有する高親和性Ｆａｂ抗体の単離に成功したことを強調する。

【０３７６】

Ｆａｂ抗体とｇｐ１００由来エピトープを示すＡＰＣとの結合

単離した可溶性Ｆａｂ抗体が、組換え可溶性形態の特異的ＭＨＣ－ペプチド複合体とだけでなく、細胞表面で発現された天然形態のＭＨＣ－ペプチド複合体とも結合できることを実証するために、本発明者らは、２つのＡＰＣ系を利用した。１つは、一本鎖形態のヒトＨＬＡ－Ａ２遺伝子でトランスフェクトしたＴＡＰ２欠損ＲＭＡ－Ｓ細胞からなる（Pascolo et al.（1997）J Exp Med. 185,2043-51）（ＨＬＡ－Ａ２．１／Ｄｂ－β２ｍ単鎖）（ＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞）。ｇｐ１００由来または対照ペプチドをＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞に負荷し、選択したＦａｂ抗体のペプチド負荷細胞と結合する能力をＦＡＣＳによってモニタした。ＴＡＰ２変異ＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞のペプチドで誘導されるＭＨＣの安定化は、ＦＡＣＳを用いて抗ＨＬＡ－Ａ２　ＭＡｂ　ＢＢ７．２と、ペプチド負荷および非負荷細胞との反応性を分析することによって決定した。Ｇ９１５４含有ＨＬＡ－Ａ２複合体を認識したＦａｂＧ２Ｄ１２は、Ｇ９１５４ペプチドを負荷したＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞とだけ反応するが、Ｇ９２８０ペプチドを負荷した細胞またはペプチドを負荷していない対照細胞と反応しない。同様に、Ｇ９２０９－ＨＬＡ－Ａ２特異的Ｆａｂ抗体１Ａ９は、Ｇ９２０９ペプチドを負荷したＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞を認識したが、Ｇ９１５４ペプチドを負荷した細胞を全く認識しなかった。Ｇ９２８０特異的Ｆａｂ抗体２Ｆ１のＦＡＣＳ分析で、同様の結果が見られた。ｇｐ１００由来ペプチド間の交差反応試験を含めて、Ｆａｂ抗体を、５種の異なる対照ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを負荷したＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞について分析し、同様な特異性の結果が認められた。Ｇ９１５４エピトープを結合させたＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞は、Ｇ９１５４含有複合体を対象としたＦａｂＧ２Ｄ１２とだけ反応したが、それぞれＧ９２０９またはＧ９２８０エピトープとの複合体のＨＬＡ－Ａ２を認識するＦａｂ　１Ａ９および２Ｆ１とは反応しなかった。

【０３７７】

試験したもう１つのタイプのＡＰＣは、ＨＬＡ－Ａ２を発現するＥＢＶトランスフォー

ムＢリンパ芽球ＪＹ細胞であり、ｇｐ１００由来または対照のペプチドと一緒にインキュベートした。これらの細胞は、ＴＡＰ＋であり、その結果、外来性ペプチドの提示はペプチド交換によって促進される。この戦略を用いて、本発明者らは、細胞表面に提示されるＨＬＡ－Ａ２に提示された外来性および内因性由来ペプチドの混合物を得た。ＨＬＡ－Ａ２／ｇｐ１００特異的抗体である１Ａ９、２Ｆ１、およびＧ２Ｄ１２を試験した際、本発明者らは、それらを選択するのに用いた特異的ｇｐ１００由来ペプチドを結合させたＪＹ細胞が強力に染色されていることを見出したが、他のｇｐ１００または対照ペプチドを使用したときに結合は観察されなかった。ｓｃＨＬＡ－Ａ２と複合体を形成したテロメラーゼ由来ペプチドを認識する対照抗体群は、ｇｐ１００由来ペプチド結合ＪＹ細胞と結合しなかった。さらにこれらの抗体を、ｇｐ１００または対照ペプチドを結合させたＨＬＡ－Ａ２－ＥＢＶ　Ｂ細胞系と一緒にインキュベートしたときにも結合が観察されなかった。

【０３７８】

これらの結果から、Ｆａｂ抗体がＴＣＲ様の優れた特異性を示し、それらの対応するｉｎ　ｓｉｔｕの細胞表面で本来のＨＬＡ－Ａ２複合体を特異的に認識できることがわかっている。

【０３７９】

ｇｐ１００特異的ＴＣＲ様Ｆａｂ抗体と黒色腫細胞との結合

これらのＴＣＲ様Ｆａｂ抗体が内因的に誘導されたＭＨＣ－ペプチド複合体と結合するのか、したがって腫瘍細胞の表面上のこれらの複合体を可視化するのに最終的に使用できるかどうか検討するために、本発明者らは、ＨＬＡ－Ａ２＋黒色腫腫瘍細胞系についてフローサイトメトリー分析を行った（図３３Ａ～３３Ｈ）。これらの細胞は、上記で使用したペプチド負荷ＲＭＡＳ－ＨＨＤまたはＪＹ細胞と比べて細胞表面でのＭＨＣ－ペプチド複合体密度が低いであろう正常な状態を表す。Ｇ９１５４特異的Ｆａｂ抗体Ｇ２Ｄ１２は、ＨＬＡ－Ａ２＋ｇｐ１００＋黒色腫ＦＭ３Ｄ（図３３Ａおよび３３Ｂ）およびＹＵ　ＺＡＺ６細胞（図３３Ｃおよび３３Ｄ）と用量依存的に極めて強く反応したが、ＨＬＡ－Ａ２－黒色腫ＭＺ２－ＭＥＬ３．０細胞（図３３Ｅおよび３３Ｆ）あるいはＨＬＡ－Ａ２＋乳癌腫瘍細胞系ＭＣＦ７（図３３Ｇおよび３３Ｈ）と反応しなかった。抗ＨＬＡ－Ａ２　ＭＡｂ　ＢＢ７．２を使用して、ＨＬＡタイプ発現を確認した（ＨＬＡ－Ａ２特異的プライマーを用いたゲノムＰＣＲの他に）。ＨＴＬＶ－１由来ＨＬＡ－Ａ２－ＴＡＸ複合体に特異的な対照Ｆａｂ抗体は、いずれの細胞系とも結合しなかった（図３３Ａ、３３Ｃ、３３Ｅ、および３３Ｇ）。これらの結果から、一価の形態であっても、Ｆａｂ抗体が高親和性の場合、腫瘍細胞の表面上のＭＨＣ－ペプチド複合体の効率的な検出および可視化が可能になることが実証されている。したがって、これらのＴＣＲ様抗体は、免疫系への腫瘍抗原提示に関連するｇｐ１００発現腫瘍細胞、抗原提示細胞、樹状細胞および他のリンパ球細胞と同じような密度で特異的ＭＨＣ－ペプチド複合体を発現している細胞と結合することができる。それぞれＧ９２０９またはＧ９２８０　ｇｐ１００由来エピトープに特異的なＦａｂ抗体１Ａ９および２Ｆ１も、ＦＭ３Ｄ細胞と反応するが、より低い強度で反応する。これは、抗原変化現象として知られているｇｐ１００由来エピトープの特異発現を反映している。実際に、死滅アッセイにおいて、異なるｇｐ１００由来エピトープに特異的なＣＴＬに対する相対感度の違いによって明らかになったように、ＦＭ３Ｄ細胞は、他の２つのエピトープと比べて高レベルのＧ９１５４エピトープを発現することがわかっている（Kirkin et al.（1995）Cancer Immunol Immunother. 41：71-81）。

【０３８０】

考察

本研究では、本発明者らは、ヒトＦａｂ断片の大きな非免疫のレパートリーから、単一の癌抗原である黒色腫関連抗原ｇｐ１００内のいくつかのＴ細胞エピトープに対する抗体のパネルを選択する能力を実証した。

【０３８１】

これらの抗体は、極めて特異的で特殊な結合パターンを示し、ペプチド特異的方法を用いてＨＬＡ－Ａ２複合体に結合できる。したがって、これらはＴ細胞抗原受容体様特異性

を有する組換え抗体である。親和性が本質的に低いＴＣＲとは対照的に、これらの分子は、ＴＣＲ特異性を保持しながら抗体の高親和性結合特徴を示す。本発明者らは、直接的なＥＬＩＳＡアッセイおよびフローサイトメトリー試験によって、ｇｐ１００の３種の一般的な免疫原性Ｔ細胞エピトープに対して選択したＦＡｂ抗体は、特異的なＨＬＡ－Ａ２複合体とだけ結合し、他の２種のｇｐ１００由来エピトープで作製した対照の複合体あるいは他のＨＬＡ－Ａ２ペプチド複合体と結合しないことを示した。最も重要なことは、これらの組換え抗体が、黒色腫腫瘍細胞に結合することを含めて、細胞の表面上の天然ｇｐ１００由来ＭＨＣ－ペプチド複合体を特異的に認識することである。このように、これらは、腫瘍細胞の表面上の特異的なＭＨＣ－ペプチド複合体を結合および検出できる可溶性高親和性組換えＴＣＲ様抗体の例である。興味深いことに、本発明者らは、それぞれのｇｐ１００由来エピトープに対するいくつかの抗体のレパートリーを単離することができた。これらは、単一の癌抗原内でコードされていても、３種のそれぞれのＴ細胞エピトープに対して極めて特異的な認識パターンを示す。これまでにも、ＴＣＲ様特異性を有する抗体は、免疫化の様々な戦略を使用してネズミＭＨＣ－ペプチド複合体に対して作製されている（Andersen et al.（1996）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93：1820-24；Porgador（1997）Immunity 6：715-26；Dadaglio（1997）Immunity 6、727-38：；Murphy et al.（1989）Nature 338：765-8；Aharoni（1991）Nature. 351：147-50）。近年、同じＦａｂライブラリーを使用してＨＬＡ－Ａ１－ＭＡＧＥ－Ａ１特異的結合抗体が選択された（Chames and Hoogenboom（2000）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97：7969-74）。ＴＣＲ様特異性を示す１つの特異的なクローンＧ８が選択されたが、比較的低い親和性２５０ｎＭを示した。最も目立つのは、本発明者らはここで、スクリーニングした各ＭＨＣ－ペプチド複合体に対するいくつかの異なるＴＣＲ様抗体を選択したのに対し、従来の成功している実験はすべて単一の抗体クローンのみを単離できたことを報告している（Andersen et al.（1996）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93：1820-24；Porgador（1997）Immunity 6：715-26；Chames and Hoogenboom（2000）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97：7969-74）。本発明者らはまた、ｇｐ１００由来Ｇ９２０９含有ＨＬＡ－Ａ２複合体で免疫したＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウスから構築した免疫ファージライブラリーを選択に使用した。大きな非免疫Ｆａｂライブラリーを用いた場合各ＭＨＣ－ペプチド複合体に対していくつかの抗体を単離できるのとは対照的に、ネズミ免疫化ライブラリーからはただ１つの抗体クローンしか単離できなかった。この抗体クローンはＴＣＲ様の優れた特異性を示した。

【０３８２】

このように特異的な優れた特異性を有する高親和性抗体が複数本研究で容易に得られ、それらが場合によってはナノモル親和性であることは、この出願の提示技術力を強調するだけでなく、選択に使用したヒト非免疫抗体ライブラリーの品質をさらに証明する。ＭＨＣ－ペプチド結合抗体の２０～３０％にＴＣＲ様分子の優れた特異性があるという観察は、特にそれらがこうした特異性に偏よりがないと考えられる非免疫レパートリーから選択されているので、やはり驚くべきことである。より最近では、本発明者らは、他の癌関連またはウィルスＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有する多様なＭＨＣ－ペプチド複合体に対して同じファージライブラリーから組換えＦａｂを単離することに成功しており、この挙動がｇｐ１００またはペプチドによらないことが示唆される。

【０３８３】

これらの抗体が予想外に高頻度であることおよびある複合体に対しいくつかの異なる抗体を単離できることは、免疫したまたは未処置のファージライブラリーの使用により単一抗体クローンのみが得られる従来の報告を考えるとさらに驚くべきことである（Andersen et al.（1996）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93：1820-24；Porgador（1997）Immunity 6：715-26；Chames and Hoogenboom（2000）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97：7969-74）。

【０３８４】

ある特定の抗体ファミリーまたは抗体Ｖ遺伝子セグメントがＨＬＡ－Ａ２分子と結合す

る性向を有すること、そしてそのような抗体が多数、非免疫ライブラリーに存在したと考えることでこうした高頻度を説明できたかもしれない。しかし、選択されたクローンの配列は、ＣＤＲで認識できるどんな傾向も含まない、多くの異なる抗体ファミリーおよび生殖細胞系セグメント由来である。ここで単離された抗体のいくつかは高頻度で高親和性であることは、これらの分子がファージライブラリーのＢ細胞ドナー由来の抗体レパートリー中に高頻度で存在し得ることを示唆しているが、このような抗体のｉｎ　ｖｉｖｏの役割は明らかでない。

【０３８５】

ＭＨＣペプチドに対する抗体のこの高頻度の理由が最終的に何であれ、このファージ系手法は、多様なＭＨＣ－ペプチド複合体に対してＴＣＲ様特異性を有する組換え抗体を単離するのにうまく適用できると思われる。したがって、ＭＨＣ－四量体を用いたＴ細胞のレベルだけでなく、この論文に記載したタイプの抗体を用いたＡＰＣおよび患部細胞のレベルでも、癌、ウィルス感染症および自己免疫疾患などの様々な病状における抗原の役割を分析することが今や可能になってきたかもしれない。

【０３８６】

本研究で選択し性質を明らかにしたようなＴＣＲ様特異性を有する組換え抗体は、いくつかの主な研究分野：（１）癌の抗原提示の研究、（２）新しい免疫療法標的分子の開発、および（３）ＴＣＲ－ペプチド－ＭＨＣ相互作用における構造－機能の関係の研究で分子免疫学の新しい貴重なツールとなる。本発明者らは、これらの抗体を使用して、フローサイトメトリーの標準的な方法によって特異的Ｔ細胞エピトープ（ＭＨＣ－ペプチド複合体）の存在を検出および可視化させることができることを示した。病理学で広範囲にわたる使用をもたらす免疫組織化学によって、固定化中にＭＨＣ－ペプチド複合体を適切に保存することにより、抗体を使用してこうした複合体を検出することができる。実際に、予備実験では、免疫組織化学によってこれらのＦａｂが固定された黒色腫細胞系を染色することが実証されている。したがって、これらは、腫瘍細胞、癌腫、抗原提示細胞、およびリンパ球の表面上の特異的な腫瘍関連ＭＨＣ－ペプチド複合体の発現を決定することによって腫瘍細胞上の抗原提示の研究および分析に有用である。こうした抗体はまた、ペプチド、腫瘍細胞抽出物を結合させたＡＰＣ、または樹状－腫瘍細胞ハイブリッドワクチン接種を用いたワクチン接種プロトコルの前、最中、およびその後の抗原提示細胞上のＭＨＣ－ペプチド複合体発現の変化を決定するのに特に有用である（Offringa and Melief（2000）Curr Opin Immunol 12：576-82；Esche（1999）Curr Opin Mol Ther 1：72-81；Kugler et al.（2000）Nat. Med. 6：332-36）。

【０３８７】

ここに記載した分子は、癌ペプチドと複合体を形成させた最も高頻度のＨＬＡハプロタイプ、ＨＬＡ－Ａ２を対象とした高親和性ヒト抗体の最初の例である。極めて特異的なヒト腫瘍抗原を認識するこれらの極めて特異的な分子は、様々な抗体系免疫治療手法の標的狙撃部分として使用することができる。これには、これらの抗体の組換え免疫毒素（Pastan（1997）Biochim Biophys Acta. 1333、C1-6）、サイトカイン分子との融合（Lode and Reisfeld（2000）Immunol Res. 21:279-88）；二重特異性抗体療法（Withoff（2001）Curr Opin Mol Ther. 3：53-62）または免疫－遺伝子療法（Willemsen et al.（2000）Gene Ther. 7：1369）としての使用が含まれている。

【０３８８】

これらのＴＣＲ様Ｆａｂ抗体の使用についての別の興味深い態様は、ＭＨＣ－ペプチド－ＴＣＲ相互作用の構造－機能研究である。特異的ペプチドの特定の残基を変化させ、Ｆａｂ抗体とペプチド特異的Ｔ細胞クローンとの結合に対するこれらの変異の影響を試験することによって、ＴＣＲ様ＦａｂとＴＣＲの間の認識の構造－機能の関係および異なる性質に関する重要なデータが得られるかもしれない。本発明者らが、同じ優れた特異性で結合する多くの異なる抗体配列を選択したことは、構造研究において極めて興味深い。これらの抗体の構造モデルにより、一般的な構造特徴またはＴＣＲでも見られる特徴の同定が可能になる。ＭＨＣ－ペプチドリガンドと複合体を形成したＴＣＲ様Ｆａｂの結晶化

および構造決定は、ＴＣＲと抗体の分子認識における構造の違いを研究することも可能にする重要な目標となる。

【０３８９】

ＴＣＲ様Ｆａｂの免疫診断的および治療的用途に関する最も重要な問題は、標的細胞表面上の特異的なエピトープの低い密度および代謝回転に関係している。エピトープ密度および細胞を狙って殺すことに関して、本発明者らはネズミモデルで既に、ＴＣＲ様免疫毒素分子を用いて効率的に殺すには、ＭＨＣ－ペプチド複合体が数千の密度で存在することがＡＰＣの選択的除去に必要であることを示している（Reiter and Pastan（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94：4631-36）。

【０３９０】

試験した癌細胞上のｇｐ１００由来複合体の密度がいくつであるか決定しなくてはならない。ＦＡＣＳで明確なシフトが見られる事実から、本明細書に記載の組成物および方法を用いて提示レベルが検出可能であることが示唆される。検討すべき他の重要な課題は、抗体の優れた特異性である。本研究で性質を明らかにした抗体は、１０個未満の関係がない他のペプチドのパネルを対照として試験した２つの試験、ＥＬＩＳＡおよびフローサイトメトリーで、ＨＬＡ－Ａ２との関連でそれらの特定のペプチドに特異的であった。ペプチド中に１つまたはいくつかの変異がある関連ペプチドも認識できることが、ＭＨＣ－ペプチド特異的抗体を用いた構造研究から明らかである。それが必要であると考えられる場合、部位特異的変異誘発および再選択法などの追加の方法を使用して抗体の特異性を細かく調整することできる。例えば、特異性の調整は、ある種の応用例、例えば、細胞表面上のＭＨＣに提示された真に天然のペプチドレパートリーに関しては必要とされるかもしれない。他の応用例の場合、研究しているペプチド－ＭＨＣ複合体の相対的なレベルを決定するのに、細かい調整は必要ではないかもしれない。

【０３９１】

本研究で単離したＴＣＲ様Ｆａｂ抗体の特異性に関するさらなる証拠は、Ｔ細胞刺激／阻害アッセイで得られた。そこでは、Ｇ９２０９特異的Ｆａｂ　１Ａ９は、Ｇ９２０９特異的ＣＴＬであるＲ６Ｃ１２からのサイトカイン（インターフェロンγおよびＩＬ－２）の放出を阻害できたが、対照のＧ９２８０特異的Ｆａｂは、ペプチド特異的ＣＴＬ刺激を阻害しなかった。

【０３９２】

これらのＴＣＲ様抗体分子の感度およびターゲティング（標的をねらう）能力を向上させるためには、２つの抗体操作手法を使用することができる。一方は、それらのＴＣＲ様の優れた特異性を変化させることなく親和性成熟法によって親抗体の親和性を増大させる（Chowdhury and Pastan（1999）Nat Biotechnol. 17：568-72）ことであり、第２の手法は、多価にすることによってこれらの組換え一価分子の結合活性を増大させることである。これらの戦略を組み合わせることによって、免疫治療的手法ならびに腫瘍細胞とヒト免疫系の相互作用の研究に対して十分に感度が高く特異的な改善された次世代の抗体分子がもたらされるだろう。

【０３９３】

本発明者らの研究は、ファージ提示提示手法の力と、無数に異なる抗体を含有するレパートリーから特に優れた特異性を選択するその能力を顕著に示している。

【０３９４】

近年クラスＩ　ＭＨＣ－ペプチド複合体の四量体アレイが適用できるようになったことにより、我々は今や抗原特異的Ｔ細胞の希少な集団を検出および研究することが可能になっている（Altman et al.,（1996）Science 274：94-96）。本発明者らの手法から、ＭＨＣ－ペプチド－ＴＣＲ相互作用の別の一面である抗原（ＭＨＣペプチド）提示の表現型分析を可能にする抗体分子が得られる。これらの新しい２つの手法を組み合わせることにより、健康時ならびに癌、ウィルス感染症などの様々な病状下での免疫応答、さらにクラスＩＩ　ＭＨＣ分子に適用した場合には自己免疫疾患、を理解する能力が著しく向上するであろう。本研究で示したように、この手法の有効性および実現可能性により、種々の特異

的なＭＨＣ－ペプチド複合体に対する抗体の生成が、広い形で、現実的になる。
【実施例３】
【０３９５】
テロメラーゼ－ＨＬＡ－Ａ２抗体
免疫系のエフェクター細胞を認識するＭＨＣ提示腫瘍関連抗原についてその性質が最近明らかにされた結果、癌治療に新たな展望が開けた。したがって、Ｔ細胞抗原受容体と同じ特異性を有するこのような腫瘍関連ＭＨＣペプチド複合体を認識する抗体は、ヒト癌の免疫療法ならびに抗原提示の研究にとって貴重である。ほとんどの腫瘍関連抗原は、わずか１種類または２、３種類の腫瘍型でしか発現しないが、最近、多くの癌で広く発現するテロメラーゼの触媒サブユニット（ｈＴＥＲＴ）に由来する特異的Ｔ細胞エピトープが同定され、これらが癌患者由来のＣＴＬによって認識されることがわかった。本発明者等は、ｈＴＥＲＴから得られた２つの異なる抗原Ｔ細胞エピトープを提示する、組換えヒトクラスＩ　ＨＬＡ－Ａ２複合体で、ファージＦａｂ抗体の豊富な非免疫レパートリーをスクリーニングした。本発明者等は、ペプチドに特異的でＭＨＣに拘束されるＴ細胞様結合特性を示す、高親和性ヒト組換えＦａｂ抗体の驚くほど大きなパネルを分離した。分析されたＦａｂは、可溶性組換え同族ＭＨＣペプチド複合体を認識するだけではなく、抗原提示細胞およびｈＴＥＲＴ発現腫瘍細胞の表面に提示されるような天然の複合体も認識する。これらの発見は、独自の精密な特異性を持つが親和性は低いＴ細胞上のＴＣＲを、Ｔ細胞抗原受容体様の特異性を備えた高親和性可溶性抗体分子に転換できることを、初めて実証した。このような分子は、腫瘍および免疫細胞の表面での特異的ＭＨＣペプチド複合体の発現をモニタし、ＴＣＲ－ペプチド－ＭＨＣの相互作用に関する構造機能研究を行い、また免疫療法のための新しいターゲティング剤を開発するのに非常に重要であり広く利用可能であることが示される。
【０３９６】
悪性疾患患者に対して積極的で特異的な免疫用法を増強する戦略の設計および開発は、免疫応答をもたらすメカニズムの理解が進歩するにつれ、その進歩から大きな影響を受けまた利益を得た。これは主に、十分特徴付けられた腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）が利用できるようになったこと、および免疫応答をモニタするために開発された方法の出現に起因する（Boon and van der Bruggen (1996) J Exp Med 183:725-9; Rosenberg (2001) Nature 411:380-4; Renkvist and Parmiani (2001) Cancer Immunol Immunother 50:3-15; Altman et al. (1996) Science 274:94-96; Lee et al. (1999) Nat.Med. 5:677-85）。その結果、抗腫瘍免疫応答は、現在では明確にされたＴＡＡで免疫化を行った患者の臨床的な応答と相関させることができる。特にメラノーマの場合、ヒトメラノーマ細胞およびその他のタイプの腫瘍細胞が、癌患者由来の細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）によって認識された抗原を発現することが、現在はっきりしている（Boon and van der Bruggen (1996) J Exp Med 183:725-9; Rosenberg (2001) Nature 411:380-4; Renkvist and Parmiani (2001) Cancer Immunol Immunother 50:3-15）。したがって、癌患者でより効果的な抗腫瘍免疫応答が生じるように、癌ペプチドまたは樹状細胞によるワクチン接種や養子細胞療法などの様々な戦略を用いてこれらのＴＡＡを標的とするめざましい臨床試験が現在進行中である（Offringa and Melief (2000) Curr Opin Immunol 12:576-82; Esche (1999) Curr Opin Mol Ther 1:72-81; Kugler et al. (2000) Nat.Med. 6:332-36）。腫瘍細胞の表面に存在する腫瘍特異的なＭＨＣペプチド複合体は、抗体をベースにした治療手法において固有で特異的な標的である。そのような方策を開発するには、特異的なペプチド－ＭＨＣ複合体を認識する組換え抗体のような、新しい標的部分を分離しなければならない。そのような抗体は、ターゲティング剤として使用される他、腫瘍細胞表面、腫瘍転移、リンパ器官内、およびプロフェッショナル抗原提示細胞における標的腫瘍抗原、すなわちＭＨＣペプチド複合体の、存在、発現パターン、および分布に関する詳細な情報を得るのに役立つ。Ｔ細胞受容体のような特異性を持つこのような特有の抗体によって、腫瘍細胞表面の特異的ＭＨＣペプチド複合体が直接見えるようになるので、腫瘍細胞の抗原提示能力を測定することが初めて可能になる。その目的で可溶性Ｔ細胞受容体を使用しようとする試み

は、標的に対して本来親和性が低いこと、および組換分子が不安定であることにより、難しいことが明らかになった（Wulfing and Pluckthum (1994) J Mol Biol 242:655-69）。

【０３９７】

この研究で、本発明者等は、テロメラーゼの触媒サブユニット(ｈＴＥＲＴ)由来のＴ細胞エピトープに対するヒト組換え抗体の分離を試みた。興味深いことに、リボ核タンパク質であるテロメラーゼは、ヒト癌の８５％以上で発現する。テロメラーゼは、線状染色体のテロメア末端を維持し、その末端が分解し末端同士で融合するのを防止する（McEachern et al.,(2000) Annu Rev Genet 34:331-58; Nakamura and Cech (1998) Cell 92:587-90; Shay et al.,(2001) Hum Mol Genet 10:677-85; Kim et al,(1994) Science 266:2011-5; Prowse and Greider (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:4818-22）。ほとんどのヒト細胞はテロメラーゼを発現せず、細胞分裂のたびにテロメアＤＮＡを失う（Meyerson et al.,(1997) Cell 90:785-95; Nakamura et al.,(1997) Science 277:955-9）。これとは対照的に、ほとんどのヒト腫瘍は強力なテロメラーゼ活性を示し、そのテロメアの長さを維持する（Counter et al.,(1992) Embo J 11:1921-9; Counter et al.,(1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2900-4; Harley et al.,(1994) Cold Spring Harb Symp Quant Biol 59:307-15）。最近の研究では、テロメラーゼ触媒サブニット由来のペプチドを腫瘍細胞によって自然に処理されることが実証され、これらはＨＬＡ－Ａ２拘束的に提示され、抗原特異的ＣＴＬに対する標的としての役割をする（Vonderheide et al.,(1999) Immunity 10:673-9; Minev et al.,(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4796-801）。癌腫、肉腫、メラノーマ、白血病、およびリンパ腫を含めた広く様々な腫瘍からの標的細胞が傷害を受けた（Vonderheide et al.,(1999) Immunity 10:673-9; Minev et al.,(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4796-801; Counter et al.,(1995) Blood 85:2315-20; Arai et al.,(2001) Blood 97:2903-7）。これらの発見は、圧倒的多数のヒト癌においてテロメラーゼ活性が確認されたことと共に、ｈＴＥＲＴが、これまで述べてきたなかで最も広く発現されたＴＡＡであることを示唆している。そこで本発明者等は、２つの異なるｈＴＥＲＴ由来エピトープを提示する組換え操作した単鎖ＭＨＣペプチド複合体に関して大規模な非免疫ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングした（de Haard et al.,(1999) J Biol Chem. 274:18218-30）。

【０３９８】

本発明者等は、特異的ｈＴＥＲＴ由来ペプチドを提示するＨＬＡ－Ａ２複合体に高親和性で結合する、抗原特異的かつＭＨＣ限定的というＴ細胞の特異性を有するヒト抗体のパネルを分離したので、それについて述べる。

【０３９９】

これらの抗体は、抗原提示細胞表面ならびに腫瘍細胞表面の特異的ＨＬＡ－Ａ２／ｈＴＥＲＴエピトープが、フローサイトメトリーによって直接見えるようにするために使用された。

【０４００】

結果

２つのｈＴＥＲＴ由来ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを有する組換え単鎖ＭＨＣペプチド複合体

異なる患者由来のＨＬＡ－Ａ２拘束ＣＴＬによって認識される２つの主要なＴ細胞エピトープがｈＴＥＲＴにおいて確認されているが（Vonderheide et al.,(1999) Immunity 10:673-9; Minev et al.,(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4796-801）、これらはすなわちペプチド５４０（ＩＬＡＫＦＬＨＷＬ；配列番号５）（Ｔ５４０）およびペプチド８６５（ＲＬＶＤＤＦＬＬＶ；配列番号６）（Ｔ８６５）である。２つのｈＴＥＲＴ由来エピトープを提示する組換えＭＨＣペプチド複合体は、既に述べた単鎖ＭＨＣ（ｓｃＭＨＣ）構築体を使用して作製した（Denkberg and Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30:3522-32; Denkberg and Reiter (2001) J Immunol 167, 270-6）。この構築体では、ＨＬＡ－Ａ２の細胞外ドメインが、１５アミノ酸フレキシブルリンカーを使用してβ－２ミクログロブリンと結合されて単鎖分子を形成している。ｓｃＭＨＣペプチド複合体は、ｓｃＭＨＣ

構築体で形質転換された細胞培養物からの封入体のｉｎ　ｖｉｔｒｏリフォールディングによって作製した。リフォールディングは２つのｈＴＥＲＴ由来ペプチドの存在下で行い、その後イオン交換クロマトグラフィーを用いた精製プロトコルを行った。リフォールディングされたｈＴＥＲＴ由来ペプチド－ＭＨＣ複合体は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびサイズ排除クロマトグラフィーでの分析が示すように、非常に純粋で均質でモノマーであった。この方策により生成された組換えｓｃＭＨＣペプチド複合体は、その生化学的、生物物理学的、および生物学的性質が既に詳細に特徴付けられており、正しく折り畳まれて機能性があることがわかっている（Denkberg and Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30:3522-32; Denkberg and Reiter (2001) J Immunol 167, 270-6）。

【０４０１】

ｓｃＭＨＣ複合体が正しく折り畳まれてペプチドを含んでいることを明確に実証するために、本発明者等は質量分析を行った。ＭＨＣペプチド複合体を、α－キシアノ－４－ヒドロキシ桂皮酸との共結晶として金属標的上に堆積し（ペプチド同定のため）、また別にシナピン酸との共結晶として堆積した（タンパク質同定のため）。質量分析は、陽イオンモードでマトリックス支援レーザー脱離飛行時間（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）を使用して行った。ペプチドは容易に検出され、その質量は、予測どおりｓｃＭＨＣペプチド複合体のリフォールディングに用いられたＴ５４０ペプチドの質量に相当する１１４０ダルトンであった。検出されたペプチドはこれのみであり、リフォールディングした複合体は、単一の特定のペプチドを含有する同質な分子の集団であることを示していた。ｓｃＭＨＣタンパク質のプロフィルからは、ｓｃＭＨＣタンパク質の予測される分子量に対応する質量４４．５ｋＤａで単一のピークが生じることが明らかになった。ペプチドに関して示されたように、これは分析されたスペクトルにおいてただ１つ確認されたタンパク質のピークであり、タンパク質が非常に均質な折畳み複合体の集団からなることを示していた。

【０４０２】

ｈＴＥＲＴのＨＬＡ－Ａ２拘束Ｔ細胞エピトープに対してＴＣＲ様の特異性を有する組換え抗体の選択

効率的な選択を可能にするため、前述の部位特異的ビオチニル化に向けてＨＬＡ－Ａ２遺伝子のＣ端末で製作したＢｉｒＡ配列タグを使用し、ｓｃＭＨＣペプチド複合体をビオチニル化した（Altman et al.,(1996) Science 274:94-96; Denkberg and Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30:3522-32）。ファージは、3.7×10^{10}という大規模なヒト組換えＦａｂレパートリーを提示し（de Haard et al.,(1999) J Biol Chem. 274:18218-30）、最初にストレプトアビジンで被覆されたビーズと共にインキュベートして、抗ストレプトアビジン抗体が選択されないようにした。磁場を印加してビーズを沈殿させ、その後、ストレプトアビジン結合体をとり除いたライブラリーを含有した上澄みを使用して、２つのｈＴＥＲＴ由来Ｔ細胞エピトープを含有する可溶性組換えＭＨＣペプチド複合体で溶液中のパニングを行った。ライブラリーと可溶性複合体とをインキュベートした後、ストレプトアビジンで被覆した磁気ビーズを使用して結合ファージを収集し、その後、トリエチルアミンで溶出した。２つの異なるｈＴＥＲＴ由来ペプチド－ＭＨＣ複合体を使用してパニングを３回行った後、ファージ力価が６００～１２００倍に濃縮されたことが観察された（図３４Ａ）。ファージ粒子を用いたＥＬＩＳＡは、ストレプトアビジンで被覆した免疫プレートに固定された、ビオチニル化組換えｓｃＭＨＣペプチド複合体上で行い、それによって抗体特異性を決定した。選択されたファージ抗体の微細特異性は、特定のｈＴＥＲＴ由来ペプチドを含有するｓｃＭＨＣ　ＨＬＡ－Ａ２複合体またはその他のＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有する対照複合体で被覆されたウェル上での分別ＥＬＩＳＡによって決定した。第３回目の選択の後に分析されたファージクローンは、ＭＨＣペプチド複合体に対して２つのタイプの結合パターンを示し、一方のタイプは、様々なＭＨＣペプチド複合体を区別することができない汎ＭＨＣ結合体であり、第２のタイプの抗体は、ペプチド特異的にＭＨＣペプチド複合体に結合する抗体であった。ＥＬＩＳＡのスクリーニングは、第３回目のパニングからランダムに選択されたクローンの６２～６４％がＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体に結合するように見えることを示した。２０パーセント（Ｔ５４０エ

ピトープの場合）および４０％（Ｔ８６５の場合）は試験をした５種類の異なるペプチド／ＭＨＣ複合体のうち４～５種類に結合した。しかし驚くほど高いパーセンテージの抗体が、異なるペプチド／ＭＨＣ複合体上でＥＬＩＳＡでファージ抗体として試験をした場合、選択の際に使用したペプチド／ＭＨＣに対して完全に特異的であった。図３４Ａに示されるように、Ｔ８６５およびＴ５４０エピトープに対するクローンのそれぞれ２２％および４４％が、Ｔ細胞の抗原特異的なＭＨＣ拘束結合特性を示した。これらは特定のＴ５４０またはＴ８６５　ｈＴＥＲＴ由来ペプチドを含有するＭＨＣペプチド複合体にのみ結合し、その他のＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有する対照複合体には結合しなかった。これらの明らかにＭＨＣ／ペプチドに特異的な陽性クローンは、より多くの複合体に関して２次スクリーニングを行った場合も特異的なままであった（試験をしたＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドのリストの材料および方法を参照）。

【０４０３】

本発明者等は、これらそれぞれ２１個と４１個のペプチド特異的クローンの多様性パターンについて、ＤＮＡフィンガープリント法により試験をし、各ｈＴＥＲＴ由来複合体ごとに５～６種類の異なる制限パターン（２回または３回から）があることを見出したが、これは、ＴＣＲ様の特異性を有するいくつかの異なる抗体が選択されることを示している。ＤＮＡ配列決定分析によって、これらの観察結果が確認された。

【０４０４】

図３４Ａ～３４Ｃは、２つの選択のそれぞれについてのＴＣＲ様Ｆａｂクローンの代表的な分析を示す。試験をした５つの異なるＴ５４０特異的クローンは、ｓｃＭＨＣ－Ｔ５４０複合体とだけ反応し、ｈＴＥＲＴ由来Ｔ８６５エピトープまたは２つのメラノーマｇｐ１００由来エピトープ、Ｇ９－２０９およびＧ９－２８０を提示するＭＨＣペプチド複合体とは反応しなかった（図３４Ｂ）。同様の結果は、ｈＴＥＲＴ由来Ｔ８６５エピトープに対する分離された６個のファージクローンの特異性を決定するファージＥＬＩＳＡアッセイでも観察された（図３４Ｃ）。

【０４０５】

ＴＣＲ様特異性を有する組換え可溶性Ｆａｂ抗体の特徴付け

本発明者等は、異なるｈＴＥＲＴ由来ＨＬＡ－Ａ２－エピトープ複合体に対し特異的な結合パターンを示すファージクローンから、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１細胞内で可溶性Ｆａｂ断片を生成した（上記分析したもの、図３４Ｂおよび３４Ｃ）。

【０４０６】

これらを、ＦａｂのＣＨ１ドメインに融合したヘキサヒスチジンタグを用いてペリプラズムから金属アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。親和性精製をした材料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって、Ｆａｂ抗体が期待される分子量を有し、均質で非常に純粋であることがわかった。約０．５～２ｍｇの純粋な材料を、細菌培養物１リットルから得ることができた。

【０４０７】

本発明者等は、ＢＳＡ－ストレプトアビジン被覆ウェルに固定されたビオチニル化ＭＨＣペプチド複合体でのＥＬＩＳＡによって、可溶性分子の微細特異性を決定した。プラスチックに直接結合すると歪む可能性があるので、ＢＳＡ－ストレプトアビジン－ビオチンスペーサーにより、複合体の正しい折畳みが可能になる。結合した複合体の正しい折畳みと結合アッセイ中のその安定性を決定するために、本発明者等は、複合体が正しく折り畳まれペプチドを含有している場合にのみＨＬＡ複合体を認識する高次構造の特異的モノクローナル抗体ｗ６／３２と反応できるかどうかをモニタした。図３５Ａは、ＨＬＡ－Ａ２／Ｔ５４０複合体に対する５つの可溶性Ｆａｂ抗体の代表的な分析を示す。５つの抗体全てはＴ５４０含有ＨＬＡ－Ａ２複合体と特異的に反応するが、Ｔ８６５　ｈＴＥＲＴ由来ＭＨＣペプチド複合体を含有する対照複合体とは反応せず、また２つのメラノーマｇｐ１００由来エピトープのＧ９－２０９およびＧ９－２８０を含有するＨＬＡ－Ａ２複合体とも反応しない。本発明者等は、同様の結果を有する様々なＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを提示する他の５つのＭＨＣペプチド複合体でのこれら抗体の微細特異性を試験した（試験を

したＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドのリストの材料および方法を参照）。同様に、Ｔ８６５エピトープに対して分離された抗体クローンからの可溶性の精製Ｆａｂ断片抗体は、特異的なＨＬＡ－Ａ２／Ｔ８６５複合体に結合したが、対照であるＴ５４０　ｈＴＥＲＴ由来複合体には結合せず、またメラノーマｇｐ１００由来のＨＬＡ－Ａ２／Ｇ９－２０９およびＨＬＡ－Ａ２／Ｇ９－２８０複合体にも結合しなかった（図３５Ｂ）。したがって、これらのペプチド特異的なＭＨＣ拘束Ｆａｂ断片は、ＴＣＲ様分子の結合特性および微細特異性を示す。Ｆａｂ抗体は単独でプレートに固定化されたペプチドを認識せず、またストレプトアビジンもその他のタンパク質抗原（ＢＳＡ、ＩｇＧ、ＲＮＡｓｅ、キモトリプシンなど）も認識しなかった。

【０４０８】

次に本発明者等は、ビオチニル化した複合体をストレプトアビジンで被覆したプレートに結合し、かつそこに量を増やしながらＦａｂ抗体を添加する飽和ＥＬＩＳＡアッセイを使用して、ＴＣＲ様可溶性Ｆａｂのうち２つの親和性結合特性について試験をした。図３６Ａおよび３６Ｂに示すように、２つの特異的なＦａｂ（４Ａ９および３Ｈ２）の結合は、用量依存的で飽和性のものであった。どちらの抗体もその５０％結合シグナルの外挿により、その親和性がナノモルの範囲にあることが明らかにされた。

【０４０９】

最後に本発明者等は、^{125}Ｉ標識Ｆａｂの結合を非標識Ｆａｂ断片の量を増やしながら競合させる競合結合アッセイによって、ＴＣＲ様Ｆａｂ断片の、それと同族のＭＨＣペプチド複合体に対する見掛けの結合親和性を決定した。これらの結合に関する研究（図３６Ｃおよび３６Ｄ）によれば、Ｔ５４０　ｈＴＥＲＴエピトープに特異的な４Ａ９抗体の場合に約５ｎＭであり、Ｔ８６５エピトープに特異的な３Ｇ３抗体の場合に１０～１５ｎＭである見掛けの結合親和性が明らかになった。

【０４１０】

Ｆａｂ断片と、ｈＴＥＲＴ由来エピトープを提示するＡＰＣとの結合

分離したＦａｂ断片が、組換え可溶性形態のＭＨＣペプチド複合体だけではなく細胞表面に発現するような天然形態の特異的ＭＨＣペプチド複合体にも結合できることを実証するために、本発明者等は、単鎖形３８であるヒトＨＬＡ－Ａ２遺伝子をトランスフェクトしたマウスＴＡＰ２欠損ＲＭＡ－Ｓ細胞を使用した（ＨＬＡ－Ａ２．１／Ｄｂ－β２ｍ単鎖）（ＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞）。ｈＴＥＲＴ由来ペプチドおよび対照ペプチドをＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞に取り込ませ、選択されたＦａｂ抗体がペプチド取込み細胞に結合する能力を、ＦＡＣＳによりモニタした。ＴＡＰ２変異ＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞のペプチドで誘導されるＭＨＣの安定化は、ＭＡｂ　ｗ６／３２（ＨＬＡ高次構造依存性）およびＢＢ７．２（ＨＬＡ－Ａ２特異的）がペプチドを取り込んだ細胞とは反応するがペプチドを取り込んでいない細胞とは反応しない性質によって実証された。Ｔ５４０含有ＨＬＡ－Ａ２複合体を認識するＦａｂ　４Ａ９および４Ｇ９は、Ｔ５４０を取り込んだＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞とのみ反応し、ｇｐ１００由来Ｇ９－２０９ペプチドまたはｇｐ１００由来Ｇ９－２８０ペプチドをそれぞれ取り込んだ細胞とは反応しなかった。同様に、Ｔ８６５－ＨＬＡ－Ａ２特異的Ｆａｂ抗体３Ｇ３および３Ｈ２は、Ｔ８６５を取り込んだＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞のみ認識し、ｇｐ１００由来ペプチドを取り込んだ細胞は全く認識しなかった。同様の結果が、他の４つのＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを使用したＦＡＣＳ分析で観察された。

【０４１１】

本発明者等は、ＡＰＣとして、ＴＡＰ＋かつＥＢＶで形質転換したＢリンパ芽球ＨＬＡ－Ａ２＋ＪＹ細胞も使用した。これは通常のＴＡＰを有し、その結果、ペプチドの取込みは、内在性のペプチドと、細胞と所望のペプチドとのインキュベーションによって外部から補われたＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドとの交換によって、促進される。本発明者等は、これらの細胞を最初にＴ８６５テロメラーゼ由来のペプチドＴ５４０、および対照ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドと共にインキュベートし、次いでこれらの細胞を洗浄し、その後、Ｆａｂ抗体４Ａ９および３Ｈ２と共にそれぞれインキュベートした。これらのＦａｂ断片は、

選択された特定のテロメラーゼペプチドと共にインキュベートしたＪＹ細胞のみ認識し、他のテロメラーゼエピトープを含めた対照ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドは認識しない。また本発明者等は、Ｔ５４０およびＴ８６５をそれぞれ取り込んだＪＹ細胞に対するＦａｂ　４Ａ９および３Ｈ２の交差反応性についても試験した。Ｔ５４０を負荷したＪＹ細胞は、Ｆａｂ　４Ａ９のみによって認識され、Ｆａｂ　３Ｈ２によっては認識されず、またメラノーマ由来のｇｐ１００エピトープを認識する対照Ｆａｂによっても認識されなかった。同様に、Ｔ８６５を負荷したＪＹ細胞は、ＨＬＡ－Ａ２との複合体におけるＴ８６５に特異的なＦａｂ　３Ｈ２によって認識されたが、Ｆａｂ　４Ａ９またはその他のｇｐ１００に特異的なＦａｂによっては認識されなかった。対照として、本発明者等は、ペプチドを負荷したＨＬＡ－Ａ２－／ＨＬＡ－Ａ１＋ＡＰＤ　Ｂ細胞を使用した。Ｆａｂ抗体とこれらの細胞との結合は検出されなかった。これらの結果は、Ｆａｂ抗体がＴＣＲ様の微細特異性を示し、対応する天然のＨＬＡ－Ａ２複合体を細胞表面の本来の位置で認識できることを実証している。

【０４１２】

ＴＣＲ様Ｆａｂ抗体とテロメラーゼ発現腫瘍細胞との結合

テロメラーゼに特異的なＴＣＲ様Ｆａｂ抗体が、腫瘍細胞表面で内在性のＭＨＣペプチド複合体と結合できることを確認するために、本発明者等は、ｈＴＥＲＴおよびＨＬＡ－Ａ２を発現する様々な腫瘍細胞に関してフローサイトメトリー分析を実施した。これらの細胞は正常な状態にある、すなわちＭＨＣペプチド複合体は、ペプチドを取り込んだＡＰＣに比べ、細胞表面上に非常に低い密度で腫瘍細胞上に存在することが予測される。Ｔ５４０特異的Ｆａｂ抗体４Ａ９およびＴ８６５特異的Ｆａｂ３Ｈ２は、ＨＬＡ－Ａ２＋ＦＭ３Ｄメラノーマ、ＬｎＣａｐ前立腺癌、およびＨｅＬａ上皮癌腫瘍細胞と反応したが（図３７Ａ～３７Ｃ）、ｈＴＥＲＴを発現するＨＬＡ－Ａ２－前立腺癌ＰＣ３細胞とは反応しなかった（図３７Ｄ）。これらの細胞におけるテロメラーゼ活性を、全細胞抽出物、緩衝対照、およびテロメラーゼ陽性細胞を使用したテロメラーゼ反復増幅プロトコル（ＴＲＡＰ）によって測定した。結果は、熱失活（８５℃で１５分）させたまたはさせない各抽出物１００ｎｇまたは５００ｎｇを使用して得られた。増幅効率および定量分析のために３６ｂｐ内部標準物質を各反応ごとに使用した。反応生成物を、１０％非変性ポリアクリルアミドゲルで分離した。

【０４１３】

ＦＭ３Ｄ、ＬｎＣａｐ、Ｈｅｌａ、およびＰＣ３細胞は、中程度から高度にわたるテロメラーゼ活性を示す。これらの実験で、本発明者等は、細胞集団の大部分において蛍光強度が中程度にシフトしたことを観察した。しかし細胞のサブ集団（２０～３０％）では、染色強度においてかなりのシフトが示され、これはテロメラーゼＴ５４０およびＴ８６５特異的ＭＨＣペプチド複合体の発現が増加したことを示している。これらの観察結果は、腫瘍細胞の表面で生じることが予想されるＭＨＣペプチド複合体の発現レベルにおける抗原性の多様性を表していると考えられる。対照ＨＬＡ－Ａ２＋細胞、すなわちｈＴＥＲＴを発現しないものは、抗体によって染色されなかった。さらに、本発明者等は、Ｆａｂ　４Ａ９および３Ｈ２と、ｈＴＥＲＴをトランスフェクトしたＨＬＡ－Ａ２陽性ヒト包皮線維芽細胞および対照の非トランスフェクト細胞との反応性について試験をした（図３７Ｅおよび３７Ｆ）。テロメラーゼ特異的Ｆａｂは、トランスフェクトされた細胞とだけ反応し、対照である正常な線維芽細胞とは反応しなかった。ＴＲＡＰ活性アッセイによれば、トランスフェクトされた細胞ではテロメラーゼ活性が高いが対照細胞では高くないことが明らかにされた。したがってこれらの結果は、これらの高親和性ＴＣＲ様抗体が、腫瘍細胞表面のＭＨＣペプチド複合体を検出できることを実証している。これは、Ｆａｂ抗体が１価であるにもかかわらず生じている。したがってこのようなＴＣＲ様抗体は、腫瘍細胞、樹状細胞などの抗原提示細胞、および免疫系に対する腫瘍抗原提示に関わるその他の細胞の表面でおそらく見られるような密度で特定のＭＨＣペプチド複合体を発現する細胞に結合することができる。

【０４１４】

考察

この研究は、本発明者等が、ファージ上に提示されたヒトＦａｂ断片の大規模な非免疫レパートリーから、これまで確認されたなかで最も広く発現している腫瘍関連抗原、すなわちヒトテロメラーゼ逆転写酵素の、２つのＨＬＡ－Ａ２拘束Ｔ細胞エピトープに対して抗体のパネルを選択できることを実証している。

【０４１５】

これらの抗体は、高い親和性で、抗原特異的かつＭＨＣ拘束的に、同族のペプチドと複合した可溶性ＨＬＡ－Ａ２分子と結合することができる。

【０４１６】

さらに、細胞表面のペプチド／ＭＨＣ複合体を検出し視覚化することができる。したがってこれらは、Ｔ細胞のＴ細胞抗原受容体様の特異性を有する組換え抗体である。ＴＣＲとＭＨＣペプチド複合体との本来の低親和性とは対照的に、これらの分子は抗体の高親和性結合特性を示し、なおＴＣＲ様の微細特異性を維持する。

【０４１７】

組換えＴＣＲとは異なり、これらの組換え抗体は、細胞表面にある対応する天然のＭＨＣペプチド複合体を認識する。

【０４１８】

本発明者等は、これまで分離された中で最も興味深いＴＡＡの１つ、ヒトテロメラーゼの触媒サブユニットに対する抗原を選択した。最近になって、ｈＴＥＲＴに関するＣＴＬレパートリーは正常な個体で保存され、同様に最も重要なことは、癌患者においても保存されることが示された（Vonderheide et al.,(1999) Immunity 10:673～9; Minev et al.,(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4796-801; Counter et al.,(1995) Blood 85:2315-20; Arai et al.,(2001) Blood 97:2903-7）。２つの観察結果は、提示されたｈＴＥＲＴのＴＡＡとしての重要性をもたらす要因であると考えられ、すなわち（１）テロメラーゼはヒト癌の８５％以上で発現し活性であるが、ほとんどの正常なヒト体細胞ではそうではないこと（McEachern et al.,(2000) Annu Rev Genet 34:331-58; Nakamura and Cech (1998) Cell 92:587-90; Shay et al.,(2001) Hum Mol Genet 10:677-85; Kim et al.,(1994) Science 266:2011-5）、および（２）テロメラーゼ触媒サブユニットに由来するペプチドは、腫瘍細胞によって自然に処理され、ＨＬＡ－Ａ２拘束的に提示されることができ、さらに抗原特異的ＣＴＬに対する標的として働くことができること（Vonderheide et al.,(1999) Immunity 10:673-9; Minev et al.,(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4796-801; Countere et al.,(1995) Blood 85:2315-20; Arai et al.,(2001) Blood 97:2903-7）である。さらに、前立腺癌患者から分離されたテロメラーゼ由来のエピトープに特異的なＣＴＬが、様々なＨＬＡ－Ａ２＋癌細胞、例えば前立腺癌や乳癌、大腸癌、肺癌、メラノーマなどの細胞の効率的な溶解を媒介するという発見は、前代未聞である（Vonderheide et al.,(1999) Immunity 10:673-9; Minev et al.,(2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4796-801）。したがって本発明者等は、これらの癌細胞が、同じ内在性のｈＴＥＲＴペプチドを処理し提示するのに同様に有効であると考える。したがって、類似のｈＴＥＲＴペプチドが発現し、組織学上の種々の出所およびタイプである様々な癌細胞上でＭＨＣクラスＩ分子と複合する。これは、ｈＴＥＲＴがこれまで述べてきた最も広く発現するＴＡＡであり、テロメラーゼ発現腫瘍細胞がＣＴＬによって破壊され易くなることを示唆している。さらに、このことは、ヒトの多種類の癌における原発腫瘍および転移を制御する際にｈＴＥＲＴが持つ潜在的な利点を強調している。したがってｈＴＥＲＴ由来のＭＨＣペプチド複合体は、癌の免疫療法において非常に魅力ある対象になると考えられる。

【０４１９】

本発明者等の研究は、まれに見る独特の微細特異性を有する抗体を選択するためのファージ提示法の力を実証している。これまで、ＴＣＲ様の特異性を有する抗体は、免疫化の様々な方策を用いてマウスＭＨＣペプチド複合体に対して作製されてきた（Andersen et al.,(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93:1820-24; Porgador (1997) Immunity 6:715-26; Day (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:8064-9; Zhong (1997) Proc Natl Acad

Sci USA 1997 94, 13856-61; Dadaglio (1997) Immunity 6, 727-38; Aharoni (1991) Nature. 351:147-50; Krogsgaard et al.,(2000) J Exp Med. 191, 1395-412; Chames and Hoogenboom (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:7969-74）。最近になって、同じファージ提示Ｆａｂライブラリーを使用することにより、ヒトＨＬＡ－Ａ１　ＭＨＣ分子との複合体におけるメラノーマ抗原ＭＡＧＥ－Ａ１を認識する組換えＦａｂ抗体が分離されている。この抗体の親和性は非常に低く（２５０ｎＭ）、したがってこれを使用することにより、１つのファージ上に多数のコピーとぢして提示される場合にのみ、ＨＬＡ－Ａ１－ＭＡＧＥ－Ａ１複合体を検出することができた（Chames and Hoogenboom (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:7969-74）。本研究では、やや困難な抗原を標的とするそのような独自の微細特異性を有する高親和性抗体が容易に得られ、またそのような抗体のナノ分子親和性が場合によっては低いものであるという事実は、提示技術をこの応用分野で利用することができ、同時に選択の際に使用されるヒト非免疫抗体ライブラリーの質が高いことの証拠になることを強調するものである。ＭＨＣペプチド結合抗体の２０～４０％がＴＣＲ様分子の微細特異性を有するという観察結果は、特にそのような抗体がそのような特異性に偏っていないと考えられる非免疫レパートリーから選択されることから、驚くべきことである。さらに最近になって、本発明者等は、他の癌関連ペプチドまたはウイルスＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有した多種類のＭＨＣペプチド複合体に対する組換えＦａｂ抗体を分離することができたが、これはそのような挙動がテロメラーゼペプチドに関係していないことを示している。予期せぬこれら抗体の高い頻度と、それぞれの複合体に対する数種類の異なる抗体を本発明者等が分離できることは、免疫化または天然のファージライブラリーを使用することによって単一の抗体クローンしか得られなかった以前の報告に鑑みれば、さらに驚くべきことである（Andersen and,(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:1820～24; Porgador (1997) Immunity 6:715-26; Chames and Hoogenboom (2000) Proc. Natl. Acad, Sci. U.S.A 97:7969-74）。

【０４２０】

ある特定の抗体ファミリーまたは抗体Ｖ遺伝子セグメントがＨＬＡ－Ａ２分子と結合する性向を有すること、そしてそのような抗体が多数、非免疫ライブラリーに存在したと考えることでこうした高頻度を説明できたかもしれない。しかし、選択されたクローンの配列は、ＣＤＲで認識できるどんな傾向も含まない、多くの異なる抗体ファミリーおよび生殖細胞系セグメント由来である。ここで単離された抗体のいくつかは高頻度で高親和性であることは、これらの分子がファージライブラリーのＢ細胞ドナー由来の抗体レパートリー中に高頻度で存在し得ることを示唆しているが、このような抗体のｉｎ　ｖｉｖｏの役割はまだ明らかでない。

【０４２１】

最終的に、ＭＨＣペプチドに対するこの抗体の高頻度の理由がどのようなものになろうと、多種類にわたるＭＨＣペプチド複合体に対してＴＣＲ様の特異性を有する組換え抗体を分離するために、このファージをベースにした手法を首尾良く適用することができると考えられる。したがって、癌やウイルス感染、自己免疫疾患などの様々な病態における抗原の役割を、ＭＨＣ－四量体を使用したＴ細胞のレベルでだけではなく、本明細書で述べたタイプの抗体を使用するＡＰＣおよび罹患細胞のレベルにおいても分析することができる。

【０４２２】

選択プロセスで使用した抗原の状態および品質は重要であった。特にＨＬＡ－ペプチド複合体としての３分子複合体では、「天然」の高次構造を示すものにこれらの組換え形態を限定することが重要である。本発明者等は、Ｅ　ｃｏｌｉ封入体からのｉｎ　ｖｉｔｒｏリフォールディングによって、様々なペプチドと複合した単鎖ＭＨＣ分子の大量の正しく折り畳まれたタンパク質が得られ、またこれらのリフォールディングされたｓｃＭＨＣ

【０４２３】

ＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体が、Ｔ細胞活性を刺激するというその能力によって実証

されるように実際に機能的であり、メラノーマペプチドに特異的なＣＴＬクローンを表現型的に染色するのにｓｃＭＨＣペプチド四量体の形で使用できることを見出した（Denkberg and Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30:3522-32; Denkberg and Reiter (2001) J Immunol 167, 270-6）。

【０４２４】

したがってこれらの利点は、そのようなペプチド特異的結合体が、最も大きいライブラリーにおいてさえも実にまれなものであると考えられる場合であっても、本発明者等がこれらの高親和性ＴＣＲ様抗体を選択するという能力に極めて重要な役割を果たすと考えられる。

【０４２５】

本発明者等が選択しまた本明細書で特徴付けたようなＴＣＲ様の特異性を有する組換え抗体は、分子免疫学において革新的で価値あるものでもある。これらの抗体は、現在ではフローサイトメトリーおよび免疫組織化学的方法といった標準的な方法によって、特定のＭＨＣ拘束Ｔ細胞エピトープの存在を検出し視覚化するのに使用することができる。したがってこれらの抗体は、腫瘍細胞、転移、抗原提示細胞、およびリンパ球表面での特異的な腫瘍関連ＭＨＣペプチド複合体の発現を決定することによって、腫瘍細胞表面での抗原提示を研究し分析するのに有用である。これらの抗体は、ペプチドまたは腫瘍細胞抽出物を負荷したＡＰＣによるワクチン接種プロトコルあるいは樹状細胞ハイブリッドワクチン接種の前、間、または後に、抗原提示細胞上でのＭＨＣペプチド複合体発現の変化を決定することによって、免疫療法をベースにした手法を分析するのに使用することができる（Offringa and Melief (2000) Curr Opin Immunol 12:576-82; Esche (1999) Curr Opin Mol Ther 1:72-81; Kugler et al.,(2000) Nat. Med. 6:332-36）。免疫療法の応用分野では、この手法は、抗体ベースの免疫療法において標的部分として働く候補としては非常に特異的で独特なものであるヒト腫瘍抗原を認識するこれらの特異的な分子を使用するための、新しい機会を提供する。そのような手法には、組換え免疫毒素（Pastan (1997) Biochim Biophys Acta. 1333、C1-6）、サイトカイン分子との融合（Lode and Reisfeld (2000) Immunol Res. 21:279-88）、２重特異性抗体療法（Withoff (2001) Curr Opin Mol Ther, 3:53-62）、または免疫－遺伝子療法（Willemsen et al.,(2000) Gene Ther. 7:1369）を含めることができる。これは特に、本明細書で述べた分子の場合に重要であるが、その理由はこの分子が、上述のように広く様々な細胞を出所とする癌細胞型上に提示される非常に広く発現したＴＡＡであるｈＴＥＲＴのＴ細胞エピトープを標的とするからである。

【０４２６】

これらの抗体は、ＴＣＲ－ペプチド－ＭＨＣの相互作用に関する構造的および機能的な研究で価値あるものでもある。マウスの系で既に示したように、ＴＣＲ様抗体を使用してＴＣＲ相互作用の微細特異性が明らかになった（Stryhn et al.,(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93:10338-42）。Ｔ細胞の特異性とマウスＴＣＲ様抗体の特異性との著しい類似性が見出され、Ｔ細胞が認識することができるペプチド残基のほとんどは、抗体によっても認識することができた。

【０４２７】

ここで本発明者等は、本発明者等の抗体の一部とテロメラーゼ発現腫瘍細胞との結合について実証し、したがって可溶性のファージライブラリーから得られた抗体で腫瘍細胞表面における特定のＭＨＣペプチド複合体を検出し視覚化するという可能性が初めて示された。ｈＴＥＲＴ拘束Ｔ細胞の特異性を示す、この研究で分離した抗体は、免疫療法用の新しい抗体ベースの標的分子を設計するために使用することができるが、その理由は、抗体が、抗体の高親和特性と併せてＴ細胞の独自の抗原特異的ＭＨＣ拘束特異性を有するからである。これは、ＭＨＣペプチド複合体に対するＴＣＲの本質的に低い親和性とは対照的である。

【０４２８】

標的細胞表面でのこれら特定のエピトープの密度（および代謝回転率）、および抗体の

特異性は、免疫療法および調査の応用分野に影響を与える可能性がある。表面密度に関し、本発明者等はマウスモデルにおいて、ＴＣＲ様免疫毒素分子による効率的な死滅を実現するために、数千の特定のＭＨＣペプチド複合体の密度がＡＰＣの選択的排除のために必要であることを既に示してきた（Reiter and Pastan (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 94:4631-36）。

【０４２９】

試験をした癌細胞上のテロメラーゼ複合体の密度がどの位であるかはこれから決めることである。ＦＡＣ分析における明瞭なシフトは、癌細胞上のテロメラーゼ複合体のＴＡＡの密度が、以前述べたものよりも高いことを示している。考慮すべきその他の重要な問題は、抗体の微細特異性である。この研究で特徴付けられた抗体は、対照として試験をした１０未満のその他の無関係なペプチドパネルを用いた２つの試験、ＥＬＩＳＡおよびフローサイトメトリーにおいて、ＨＬＡ－Ａ２内のその特定のペプチドに特異的であった。ＭＨＣペプチド特異的抗体による構造研究から、ペプチド内に１つまたは２、３の変異を有する関連ペプチドも認識できることが明らかである。したがって、抗体の特異性が、ＭＨＣ内に提示されるペプチドの真の自然のレパートリーに関係あるかどうかはこれから見ることである。Ｔ細胞を再び腫瘍細胞を狙わせるためにそのような抗体を使用することに関する新しいデータは、この点に関して非常に希望を与えるものである。Ｆａｂ　Ｇ８、すなわちＭＡＧＥ－Ａ１と複合したＨＬＡ－Ａ１を標的とする抗体を用いた最近の研究は（Chames and Hoogenboom (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97:7969-74）、トランスフェクトした原発ヒトＴリンパ球表面でＦａｂ遺伝子を発現させることによって、これらの細胞を、同じような特異性を有するＴ細胞受容体と区別できないやり方で、再びＭＡＧＥ－Ａ１発現腫瘍細胞に特異的に向かわせることを示している（Willemsen et al.,(2000) Gene Ther. 7:1369）。

【０４３０】

これらＴＣＲ様抗体分子の標的能力を改善するには、２つの抗体工学手法を用いることができ、すなわち（１）そのＴＣＲ様微細特異性を変化させることなく親和性を成熟させる手法によって親抗体の親和性を増大させること（Chowdhury and Pastan (1999) Nat Biotechnol. 17:568-72）、および（２）これらの組換え１価分子を２価または多価にすることによってその結合活性を増大させることである。このような親和性成熟手法と結合活性工学を組み合わせることによって、第２世代の改善された抗体が十分に得られると考えられるが、これは、最終的な免疫療法としての用途に十分な感受性でＭＨＣペプチド複合体のレベルを認識できるものである。

【実施例４】

【０４３１】

ＭＵＣ１－ＨＬＡ－Ａ２抗体

この研究で、本発明者等は、ムチン１抗原から得られたＴ細胞エピトープに対するヒト組換え抗体を単離することを試みた。

【０４３２】

ムチン１（ＭＵＣ１）は、発生的に制御され、癌腫によっては異常に発現される上皮細胞関連のムチンであり、これは悪性腫瘍における重要なマーカーになる（Mukherjee et al.,(2000) J Immunol. 165:3451-3460）。この分子は、頂端細胞膜から管路の管腔内に突出する大きく延びた杆状体として存在する。ＭＵＣ１は主に、平均で３０～９０回縦列方向に反復される２０アミノ酸配列からなる珍しい構造を有する。この縦列反復（ＴＲ）は、ポリペプチドのコア部を包含するＯ結合オリゴ糖の骨格として働く（Gendler他、(1995) Annu. Rev. Physiol 57:607～634; Spicer他、(1991) J Biol. Chem. 266: 15099～15109）。

【０４３３】

癌では、このタンパク質を腫瘍特異的なものとする発現の相違がある。細胞で発現するムチンの量およびその循環量には大きく増加する。その分布は、もはや管路のおよび腺の頂端表面に制限されず、腫瘍の塊全体および腫瘍細胞の表面に見られる。重要なのは、グ

リコシル化が変化し、オリゴ糖構造が短くなりまた数の上で少なくなることであり、全てのＴＲで、正常な表面ではグリコシル化によって隠されているだろう免疫優性ペプチド配列が顕在化することである。ＭＵＣ１の低グリコシル化により、ＭＨＣ分子に関係して提示され、かつＣＴＬによって認識されるペプチドエピトープが表面に現れて、ＣＴＬはこの形態のＭＵＣ１を発現している腫瘍細胞を死滅させることができる（Barnd et al.,(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:7159-7163）。

【０４３４】

ＣＴＬの標的としてのＭＵＣ１に関する最近の記述によれば、このタンパク質を免疫療法の標的として使用することに関心が高まっている。これは、乳房、肺、胃、膵臓、結腸、前立腺、卵巣、子宮内膜、および子宮頚のほとんどの腺癌により発現するもので、ＭＵＣ１は魅力ある治療標的となる。１９９９年に、ＭＵＣ１を発現した癌は、新しい症例の約７２％を占め、死亡例の６６％を占めた（Greenlee et al.,(2000) CA Cancer J Clin. 50:7-33）。

【０４３５】

しかし、低グリコシル化ＭＵＣ１の発現はＣＴＬの死滅を刺激するのに十分ではない。既に存在する癌腫の９０％がＭＵＣ１を発現し、そのような腫瘍は進行するからである。

【０４３６】

最近になって、Ｃａｒｍｏｎ他が、３つの新しいＨＬＡ－Ａ２．１拘束ＭＵＣ１由来ＣＴＬエピトープを特徴付けた（Carmon et al.,(2000) Int. J Cancer 85:391-397）。これらのペプチドは、細胞外縦列反復アレイ（ＴＲＡ）から推定されたものではなく、乳癌細胞系によって処理され提示されることが示された。さらに、これらのペプチドに対して誘発されたＣＴＬは、正常な乳房由来ペプチドでパルス処理した標的細胞よりも、乳房癌腫由来のペプチド抽出物でパルス処理した標的細胞をより効率的に溶解した。これらのＭＵＣ１エピトープのうち１つは、Ｄ６ペプチド（ＬＬＬＴＶＬＴＶＶ；配列番号４）であり、高いＭＨＣ結合親和性を示し、ＣＴＬアッセイでは優先免疫原性に正に相関していた。

【０４３７】

したがって、ＭＵＣ１由来ペプチドを提示する腫瘍細胞を特異的に認識することができる分子を開発することが求められており、そのような分子は、薬物または毒素を腫瘍細胞に向ける標的部分として働くことができるものである。これらの分子は、腫瘍細胞、抗原提示細胞、およびリンパ器官の表面でのＭＵＣ１エピトープの提示を研究するためのツールとして働くこともできる。

【０４３８】

この研究で、本発明者等は、特定のムチン－１　Ｄ６ペプチドを提示する高親和性ＨＬＡ－Ａ２複合体に結合するＴ細胞の、抗原特異的でＭＨＣ拘束性特異性を有するヒト組換え抗体のパネルを分離した。

【０４３９】

これらの抗体は、フローサイトメトリーによって、抗原提示細胞上ならびに腫瘍細胞上で特定のＨＬＡ－Ａ２／ＭＵＣ１－Ｄ６エピトープが直接目に見えるようにするために使用されている。

ムチン由来のＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを有する組換え単鎖ＭＨＣペプチド複合体

【０４４０】

ＨＬＡ－Ａ２トランスジェニックマウス由来のＨＬＡ－Ａ２拘束ＣＴＬによって認識されたＭＵＣ１抗原中に同定された、効力あるＴ細胞エピトープの１つは、ペプチドＤ６（ＬＬＬＴＶＬＴＶＶ；配列番号４）である（Carmon et al.,(2000) Int. J Cancer 85:391-397）。ＭＵＣ１由来のエピトープを提示する組換えＭＨＣペプチド複合体は、前述の単鎖ＭＨＣ（ｓｃＭＨＣ）構築体を使用することにより生成した（Denkberg et al.,(2000) Eur. J Immunol. 30:3522-3532）（Denkberg et al.,(2000) J Immunol. 167:270-276）。この構築体では、ＨＬＡ－Ａ２の細胞外ドメインが、１５アミノ酸フレキシブルリンカーを使用してβ－２ミクログロブリンと結合して単鎖分子を形成している。ｓｃＭＨＣ

ペプチド複合体は、ｓｃＭＨＣ構築体で形質転換された細菌培養物からの封入体のｉｎｖｉｔｒｏリフォールディングによって作製した。リフォールディングは、ＭＵＣ１由来のペプチドの存在下で行い、その後、イオン交換クロマトグラフィーを用いた精製プロトコルを実施した。リフォールディングされたｓｃＨＬＡ－Ａ２／Ｄ６複合体は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびサイズ排除クロマトグラフィーでの分析によって示されるように、非常に純粋であり、均質で単一性があった。この方策により作製された組換えｓｃＭＨＣペプチド複合体は、その生化学的、生物物理学的、および生物学的性質が既に詳細に特徴付けられており、正しく折り畳まれて機能的であることがわかった（Denkberg et al.,(2000) Eur. J Immunol. 30:3522-3532; Denkberg et al.,(2000) J Immunol. 167:270-276）。

ＭＵＣ１のＨＬＡ－Ａ２拘束Ｔ細胞エピトープに対してＴＣＲ様の特異性を有する組換え抗体の選択

【０４４１】

効率的な選択を可能にするために、前述の部位特異的なビオチニル化に向けてＨＬＡ－Ａ２遺伝子のＣ末端で設計製作されたＢｉｒＡ配列タグを使用し、ｓｃＭＨＣペプチド複合体をビオチニル化した（Altman et al.,(1996) Science 274:94～96; Denkberg et al.,(2000) Eur. J Immunol. 30:3522-3532）。３．７×１０^{10}個のヒト組換えＦａｂ断片のファージ提示大型レパートリー(de Haard et al.,(1999) J Biol. Chem. 274:18218-18230)を、最初にストレプトアビジン被覆ビーズと共にインキュベートして、抗ストレプトアビジン抗体が選択されないようにした。磁場を印加してビーズを沈殿させ、ストレプトアビジン結合体を除いたライブラリーを含有した上澄みを使用して、その後、ＭＵＣ１由来Ｔ細胞エピトープを含有する可溶性組換えＭＨＣペプチド複合体での溶液中のパニングを行った。このライブラリーを可溶性複合体と共にインキュベートした後、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズを使用して結合ファージを収集し、その後、トリエチルアミンで溶出した。ＭＵＣ１由来のＤ６ペプチド－ＭＨＣ複合体を使用したパニングを３回行った後、ファージ力価の５８０倍の濃縮が観察された（図３８Ａ）。選択されたファージ抗体の微細特異性は、特定のＭＵＣ１由来Ｄ６ペプチドを含有するビオチニル化ｓｃＭＨＣ　ＨＬＡ－Ａ２複合体またはその他のＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有する対照複合体と共にインキュベートしたストレプトアビジン被覆ウェル上での分別ＥＬＩＳＡによって決定した。３回目の選択を行った後に分析したファージクローンは、ＭＨＣペプチド複合体に向かう２つのタイプの結合パターンを示し、すなわち抗体の１つの種類は、様々なＭＨＣペプチド複合体を区別することができないｐａｎ－ＭＨＣ結合体であり、第２のタイプは、ペプチドに特異的な手法でＭＨＣペプチド複合体に結合する抗体であった。ＥＬＩＳＡスクリーニングによって、第３回目のパニングからランダムに選択されたクローンの８４％がＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体に結合するように見えることが明らかになった。

【０４４２】

しかし、驚くほど高いパーセンテージの抗体が、ファージ抗体として異なるペプチド／ＭＨＣ複合体上でのＥＬＩＳＡで試験をした場合、選択で使用されるペプチド／ＭＨＣ（すなわちｓｃＨＬＡ－Ａ２／Ｄ６複合体）に完全に特異的であった。図４３Ａに示すように、クローンの８０％は、Ｔ細胞の抗原特異的なＭＨＣ拘束結合特性を示した。したがってこれらは、特定のＤ６　ＭＵＣ１由来ペプチドを含有するＭＨＣペプチド複合体にのみ結合し、他のＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有する対照複合体には結合しなかった。これらの見掛けのＭＨＣ／ペプチド特異的陽性クローンは、より多くの複合体に関する２次スクリーニングでも特異的なままであった。図３８Ｂは、５個のＴＣＲ様Ｆａｂクローンに関する代表的な分析を示す。クローンＭ２Ｂ１およびＭ２Ｆ２は、第２回目のパニングからのものであり、クローンＭ３Ａ１およびＭ３Ｂ８は第３回目からのものである。試験をした種々のＭＵＣ１－Ｄ６特異的クローンは、ｓｃＭＨＣ－ＭＵＣ１－Ｄ６複合体とだけ反応し、ＭＵＣ１由来Ａ７エピトープ、メラノーマｇｐ１００由来エピトープ、Ｇ９－１５４およびウイルスＴＡＸ$_{11～19}$エピトープを提示するＭＨＣペプチド複合体とは反応しなかった（図３８Ｂ）。

【０４４３】

本発明者等は、ＤＮＡの２６ペプチド特異的クローン（２回目または３回目からのもの）の多様性パターンについてＤＮＡフィンガープリント法により試験をし、１６の異なる制限パターンを見出したが、これはＴＣＲ様の特異性を有するいくつかの異なる抗体が選択されたことを示す。ＤＮＡ配列決定分析によって、これらの観察結果が確認された。

【０４４４】

ＴＣＲ様の特異性を有する組換え可溶性Ｆａｂ抗体の特徴付け

本発明者等は、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＢＬ２１細胞中で、ＭＵＣ１由来ＨＬＡ－Ａ２ペプチド複合体に対して特異的な結合パターンを示すファージクローン（上記分析したもの）から可溶性Ｆａｂ断片を生成した。

【０４４５】

これらを、ＦａｂのＣＨ１ドメインに融合したヘキサヒスチジンタグを用いてペリプラズムから金属アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。親和性精製されたもののＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって、期待される分子量を有する均質で非常に純粋なＦａｂ抗体が明らかにされた。約０．５～２ｍｇの純粋な材料を、細菌培養物１リットルから得ることができた。

【０４４６】

本発明者等は、ＢＳＡ－ストレプトアビジン被覆ウェルに固定されたビオチニル化ＭＨＣペプチド複合体でのＥＬＩＳＡによって、可溶性分子の微細特性を決定した。ＢＳＡ－ストレプトアビジン－ビオチンスペーサーにより、複合体の正しい折畳みが可能になるが、これはプラスチックに直接結合すると歪む可能性があるものである。結合した複合体の正しい折畳みと結合アッセイ中のその安定性を決定するために、本発明者等は、それらが、正しく折り畳まれた場合とペプチドを含有する場合にのみＨＬＡ複合体を認識する高次構造の特異的モノクローナル抗体ｗ６／３２と反応できるかどうかをモニタした。図４４Ｂは、ＨＬＡ－Ａ２／ＭＵＣ１－Ｄ６複合体に対する５つの可溶性Ｆａｂ抗体の代表的な分析を示す。５つの抗体全てはＤ６含有ＨＬＡ－Ａ２複合体と特異的に反応するが、Ａ７

【０４４７】

ＭＵＣ１由来ＭＨＣペプチド複合体を含有する対照複合体とは反応せず、またメラノーマｇｐ１００由来エピトープのＧ９－１５４、またはウイルスＴＡＸ$_{11\sim19}$エピトープを含有するＨＬＡ－Ａ２複合体とは反応しない。本発明者等は、同様の結果を有する様々なＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを提示する他の５つのＭＨＣペプチド複合体でのこれら抗体の微細特異性を試験した。したがって、これらのペプチド特異的なＭＨＣ拘束Ｆａｂ断片は、ＴＣＲ様分子の結合特性および微細特異性を示す。Ｆａｂ抗体はプレート上に固定されたペプチドを単独で認識せず、またストレプトアビジンもその他のタンパク質抗原（ＢＳＡ、ＩｇＧ、ＲＮＡｓｅ、キモトリプシンなど）も認識しなかった。

【０４４８】

次に本発明者等は、ビオチニル化した複合体をストレプトアビジンで被覆したプレートに結合し、かつそこに量を増しながらＦａｂ抗体を添加する飽和ＥＬＩＳＡアッセイを使用して、ＴＣＲ様可溶性Ｆａｂのうち２つの親和性結合特性について試験をした。図４０Ａおよび４０Ｂに示すように、２つの特異的なＦａｂ（Ｍ３Ａ１およびＭ３Ｂ８）の結合は、用量依存的で飽和性のものであった。どちらの抗体もその５０％結合シグナルの外挿により、その親和性がナノモルの範囲にあることが明らかにされた。

【０４４９】

最後に本発明者等は、^{125}Ｉ標識Ｆａｂの結合を非標識Ｆａｂ断片の濃度を増しながら競合させる競合結合アッセイによって、ＴＣＲ様Ｆａｂ断片の、それと同族のＭＨＣペプチド複合体に対する見掛けの結合親和性を決定した。これらの結合に関する研究によれば、見掛けの結合親和性は、ＭＵＣ１－Ｄ６エピトープに特異的なＭ３Ａ１抗体およびＭ３Ｂ８抗体の場合に１０～１５ｎＭであることが明らかになった。

【０４５０】

Ｆａｂ断片とＭＵＣ１由来エピトープを提示するＡＰＣとの結合

分離したＦａｂ断片が、特異的ＭＨＣペプチド複合体が組換え可溶性形態だけではなく細胞表面に発現するような天然形態であってもそれに結合できることを実証するために、本発明者等は、単鎖フォーマットであるヒトＨＬＡ－Ａ２遺伝子をトランスフェクトしたマウスＴＡＰ２欠損ＲＭＡ－Ｓ細胞を使用した（ＨＬＡ－Ａ２．１／Ｄｂ－β２ｍ単鎖）（ＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞）。ＭＵＣ１由来Ｄ６および対照ペプチドをＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞に取り込み、選択されたＦａｂ抗体がペプチド負荷細胞に結合する能力を、ＦＡＣＳによりモニタした。ＴＡＰ２変異ＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞のペプチド誘導型ＭＨＣ安定化は、ＭＡｂ　ｗ６／３２（ＨＬＡ高次構造依存性）およびＢＢ７．２（ＨＬＡ－Ａ２特異的）がペプチドを取り込んだ細胞とは反応するがペプチドを負荷していない細胞とは反応しない性質によって実証された。Ｆａｂ　Ｍ３Ａ１およびＭ３Ｂ８は、Ｄ６を負荷したＲＭＡ－Ｓ－ＨＨＤ細胞とのみ反応し、ｇｐ１００由来Ｇ９－１５４ペプチドを負荷した細胞とは反応しなかった。同様の結果が、他の４つのＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを使用したＦＡＣＳ分析で観察された。

【０４５１】

本発明者等は、ＡＰＣとして、ＴＡＰ＋でＥＢＶ形質転換したＢリンパ芽球ＨＬＡ－Ａ２＋ＪＹ細胞も使用した。これは通常のＴＡＰを有し、その結果、ペプチドの取込みは、内在性のペプチドと、細胞と所望のペプチドとのインキュベーションによって外部から補われたＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドとの交換によって、促進される。本発明者等は、これらの細胞を最初にＤ６　ＭＵＣ１由来ペプチド、および対照ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドと共にインキュベートし、次いでこれらの細胞を洗浄し、その後、Ｆａｂ抗体Ｍ３Ａ１およびＭ３Ｂ８と共にそれぞれインキュベートした。これらのＦａｂ断片は、選択された特定のムチン１ペプチドと共にインキュベートしたＪＹ細胞のみ認識し、他のＭＵＣ１エピトープを含む対照ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドは認識しない。対照として、本発明者等は、ペプチド負荷ＨＬＡ－Ａ２－／ＨＬＡ－Ａ１＋ＡＰＤ　Ｂ細胞を使用した。Ｆａｂ抗体とこれらの細胞との結合は観察されなかった。

【０４５２】

ＴＣＲ様Ｆａｂ抗体とＭＵＣ１発現腫瘍細胞との結合

ＭＵＣ１に特異的なＴＣＲ様Ｆａｂ抗体が腫瘍細胞表面で内在性のＭＨＣペプチド複合体と結合できることを確認するために、本発明者等は、ＭＵＣ１およびＨＬＡ－Ａ２を発現する様々な腫瘍細胞上でフローサイトメトリーを実施した。

【０４５３】

これら腫瘍細胞上での特定のペプチド－ＨＬＡ複合体の密度は、ペプチドでパルス処理したＡＰＣと比べて低いことが予測されるので、本発明者等は、蛍光プローブで直接標識されたＦａｂ四量体を作製することによって、ＦＡＢ　Ｍ３Ａ１の結合活性を増大させた。この手法は、ペプチド－ＭＨＣ複合体とＴＣＲとの結合活性を増大させるために、または組換え抗体分子の感受性を増大させるために、既に使用されたものである（Cloutier et al.,(2000) Mol. Immunol. 37:1067-1077）。蛍光標識四量体を使用する際の別の利点とは、モノマー非標識Ｆａｂが蛍光標識２次抗体を必要とするのに対し、単一の染色工程しか必要としない点にある。したがって本発明者等は、蛍光標識したストレプトアビジンにより生成された本発明者等のＦａｂ四量体を使用して、ＭＵＣ１発現腫瘍細胞表面でのＭＵＣ１由来Ｄ６ペプチド－ＭＨＣ複合体の発現を測定した。ペプチドを負荷したＪＹ細胞のフローサイトメトリーにより測定された結合強度は、Ｍ３Ａ１　Ｆａｂモノマーでの染色強度に比べて２ｌｏｇも劇的に増大した。次に本発明者等は、Ｆａｂ　Ｍ３Ａ１　四量体が、Ｍｕｃ１由来のＤ６ペプチドでパルス処理した乳癌ＨＬＡ－Ａ２＋腫瘍細胞を染色できるかどうかについて試験をした。図４１Ａに示すように、ペプチドでパルス処理したＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の有意な染色が四量体の場合に観察されたが、Ｆａｂモノマーを使用して細胞を染色した場合には、程度がより低い染色が観察された。異なる濃度のＭＵＣ１由来Ｄ６ペプチドを用いた、ペプチドでパルス処理したＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の滴定によれば、染色強度が、パルス処理に使用されるペプチドの濃度に依存すること、および１０～１５ｎＭ程に低い濃度でのパルス処理が、Ｆａｂ　Ｍ３Ａ１　四量体を使

用した結合の検出に十分であることが実証された（図４１Ｂ）。同様の実験をＭＵＣ１発現ＭＣＦ７乳癌細胞で行ったが、これらの細胞による染色強度はＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞に比べて低かった。このことは、これら細胞表面でのＨＬＡ－Ａ２分子の発現レベルによって説明することができる。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞は、抗ＨＬＡ－Ａ２抗体ＢＢ７．２によってモニタされるように、ＭＣＦ７細胞に比べて著しく高いレベルのＨＬＡ－Ａ２を発現する。

【０４５４】

また本発明者等は、Ｆａｂ　Ｍ３Ａ１　四量体を使用して、事前にペプチドでパルス処理しない状態で、ＭＣＦ７細胞上にＨＬＡ－Ａ２／ムチン１－Ｄ６複合体が自然にできることも検出した。これらの細胞は、ＭＨＣペプチド複合体が、ペプチドを取り込んだＡＰＣまたはペプチドでパルス処理した腫瘍細胞に比べて細胞表面に非常に低い密度で腫瘍細胞上に存在すると予想される、正常な状態を表す。対照として、本発明者等は、濃度１０μＭで、ＭＵＣ１／Ｄ６ペプチドを用い（陽性対照）、またその他のＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを用いて（陰性対照）パルス処理したＭＣＦ７細胞を使用した。ＭＵＣ１／Ｄ６特異的Ｆａｂ　Ｍ３Ａ１　四量体は、対照に比べ、Ｄ６でパルス処理しまた天然の状態のＭＣＦ７細胞に対して特異的に反応しかつ著しい染色強度をもたらしたが（図４２）、非特異的なペプチドでパルス処理した細胞とは反応しなかった。これらの細胞におけるＭＵＣ１発現は、抗ムチン１抗体で染色することにより視覚化した。これらの結果は、これら高親和性ＴＣＲ様抗体が、腫瘍細胞表面のＭＨＣペプチド複合体を検出できることを実証している。

【０４５５】

したがってこれらのＴＣＲ様抗体は、腫瘍細胞、樹状細胞などの抗原提示細胞、および免疫系への腫瘍抗原提示に関わるその他の細胞上でよく見られるような密度で特定のＭＨＣペプチド複合体を発現する細胞に、結合することができる。

－ＴＡＸ－

【０４５６】

上述の方法を使用して、ＴＡＸ－ＭＨＣ複合体に対する抗体を分離した。３つの例示的な抗体は、Ｔ３Ｅ３、Ｔ３Ｆ１、およびＴ３Ｆ２である。

その他の実施形態は、特許請求の範囲内および要旨に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【０４５７】

【図１Ａ】抗体１Ａ１１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図１Ｂ】抗体１Ａ１１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図２Ａ】抗体１Ａ７の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図２Ｂ】抗体１Ａ７の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図３Ａ】抗体１Ａ９の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図３Ｂ】抗体１Ａ９の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図４Ａ】抗体１Ｃ８の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図４Ｂ】抗体１Ｃ８の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図５Ａ】抗体１Ｄ７の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。

【図５Ｂ】抗体１Ｄ７の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミ

ノ酸配列のリストである。
【図６Ａ】抗体１Ｇ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図６Ｂ】抗体１Ｇ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図７Ａ】抗体２Ｂ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図７Ｂ】抗体２Ｂ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図８Ａ】抗体２Ｃ５の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図８Ｂ】抗体２Ｃ５の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図９Ａ】抗体２Ｄ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図９Ｂ】抗体２Ｄ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１０Ａ】抗体２Ｆ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１０Ｂ】抗体２Ｆ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１１Ａ】抗体Ｇ２Ｄ１２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１１Ｂ】抗体Ｇ２Ｄ１２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１２Ａ】抗体Ｇ３Ｆ１２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１２Ｂ】抗体Ｇ３Ｆ１２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１３Ａ】抗体Ｇ３Ｆ３の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１３Ｂ】抗体Ｇ３Ｆ３の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１４Ａ】抗体Ｇ３Ｇ４の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１４Ｂ】抗体Ｇ３Ｇ４の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１５Ａ】抗体Ｍ３Ａ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１５Ｂ】抗体Ｍ３Ａ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１６Ａ】抗体Ｍ３Ｂ８の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１６Ｂ】抗体Ｍ３Ｂ８の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１７Ａ】抗体Ｔ３Ｅ３の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１７Ｂ】抗体Ｔ３Ｅ３の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１８Ａ】抗体Ｔ３Ｆ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測

アミノ酸配列のリストである。
【図１８Ｂ】抗体Ｔ３Ｆ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１９Ａ】抗体Ｔ３Ｆ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図１９Ｂ】抗体Ｔ３Ｆ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２０Ａ】抗体４Ａ９の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２０Ｂ】抗体４Ａ９の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２１Ａ】抗体４Ｂ４の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２１Ｂ】抗体４Ｂ４の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２２Ａ】抗体４Ｃ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２２Ｂ】抗体４Ｃ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２３Ａ】抗体４Ｇ９の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２３Ｂ】抗体４Ｇ９の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２４Ａ】抗体３Ａ１２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２４Ｂ】抗体３Ａ１２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２５Ａ】抗体３Ｂ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２５Ｂ】抗体３Ｂ１の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２６Ａ】抗体３Ｆ５の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２６Ｂ】抗体３Ｆ５の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２７Ａ】抗体３Ｇ３の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２７Ｂ】抗体３Ｇ３の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２８Ａ】抗体３Ｈ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２８Ｂ】抗体３Ｈ２の軽鎖可変領域および重鎖可変領域の、コード核酸および予測アミノ酸配列のリストである。
【図２９】組換えｓｃＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体の機能的な特徴付けである。（Ａ～Ｄ）ｓｃＨＬＡ－Ａ２／ｇｐ１００由来の複合体の機能分析であり、四量体が、ＨＬＡ－Ａ２と複合したｇｐ１００由来ペプチドＧ９－２０９（Ａ）に特異的なＣＴＬクローン、Ｒ６Ｃ１２を染色する能力を示す。ＣＴＬを染色しないＧ９－２８０ｇｐ１００由来ペプチド（Ｂ）およびＴＡＸ由来ペプチド（Ｃ）を含有する対照の四量体に比べ、細胞集団の７０％を超えた染色が観察される。これらの細胞は、ＰＥ標識四量体（ｙ軸）およびＦＩＴＣ標識抗ＣＤ８抗体（ｘ軸）で二重に染色されている。（Ｄ）では、Ａ～Ｃでの四量体

染色のヒストグラムの重なりが、組換えＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体の特異性パターンを実証することを示している。

【図３０】ｇｐ１００由来ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドについて選択されたファージクローンの特異性分析。ｇｐ１００由来ペプチドＧ９－１５４（Ａ）、Ｇ９－２０９（Ｂ）、およびＧ９－２８０（Ｃ）上で主に第３回目の選択から得られたファージクローン（10^8ファージ粒子／ウェル）を、図示されるような様々な固定化ｓｃＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体にたいする結合特異性に関して試験した。クローン１Ｇ２（ＩＩ）および２Ｄ１（ＩＩ）は、第２回目のパニング（選択）からのものである。ファージクローンは、それぞれが選択されたＭＨＣペプチド複合体とは特異的に反応するが、異なるｇｐ１００由来エピトープまたはその他の対照ＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有する対照ＭＨＣペプチド複合体とは反応しないことが示されている。

【図３１Ａ】可溶性精製Ｆａｂと組換えｓｃＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体とのＥＬＩＳＡにおける結合。ｇｐ１００由来エピトープＧ９－１５４（Ａ）、Ｇ９－２０９（Ｂ）、およびＧ９－２８０（Ｃ）に特異的な可溶性精製Ｆａｂクローンと図示されるような固定化ｓｃＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体との結合。いくつかのＦａｂクローンについて、それぞれが選択されたｇｐ１００由来エピトープに特異的であるが、その他のｇｐ１００およびテロメラーゼ由来ＨＬＡ－Ａ２拘束エピトープを含有する図示される対照ＭＨＣペプチド複合体には特異的でないことが示されている。（Ｄ）ＥＬＩＳＡ結合特異性の結果は、特異的また対照の可溶性ｓｃＭＨＣペプチド複合体を溶液中に過度に存在させて、固定された複合体との結合を競合させる、競合実験で確認された。競合は、特定のＭＨＣペプチド複合体で観察されるが、対照の複合体では観察されなかった。このタイプのアッセイの例を図３１Ｄに示すが、可溶性のＧ９２８０含有ＨＬＡ－Ａ２は競合し、Ｆａｂ　２Ｆ１と固定化したＧ９２８０／ＨＬＡ－Ａ２複合体との結合を阻害しているが、Ｇ９１５４／ＨＬＡ－Ａ２複合体は競合しなかった。

【図３１Ｂ】可溶性精製Ｆａｂと組換えｓｃＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体とのＥＬＩＳＡにおける結合。ｇｐ１００由来エピトープＧ９－１５４（Ａ）、Ｇ９－２０９（Ｂ）、およびＧ９－２８０（Ｃ）に特異的な可溶性精製Ｆａｂクローンと図示されるような固定化ｓｃＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体との結合。いくつかのＦａｂクローンについて、それぞれが選択されたｇｐ１００由来エピトープに特異的であるが、その他のｇｐ１００およびテロメラーゼ由来ＨＬＡ－Ａ２拘束エピトープを含有する図示される対照ＭＨＣペプチド複合体には特異的でないことが示されている。（Ｄ）ＥＬＩＳＡ結合特異性の結果は、特異的また対照の可溶性ｓｃＭＨＣペプチド複合体を溶液中に過度に存在させて、固定された複合体との結合を競合させる、競合実験で確認された。競合は、特定のＭＨＣペプチド複合体で観察されるが、対照の複合体では観察されなかった。このタイプのアッセイの例を図３１Ｄに示すが、可溶性のＧ９２８０含有ＨＬＡ－Ａ２は競合し、Ｆａｂ　２Ｆ１と固定化したＧ９２８０／ＨＬＡ－Ａ２複合体との結合を阻害しているが、Ｇ９１５４／ＨＬＡ－Ａ２複合体は競合しなかった。

【図３１Ｃ】可溶性精製Ｆａｂと組換えｓｃＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体とのＥＬＩＳＡにおける結合。ｇｐ１００由来エピトープＧ９－１５４（Ａ）、Ｇ９－２０９（Ｂ）、およびＧ９－２８０（Ｃ）に特異的な可溶性精製Ｆａｂクローンと図示されるような固定化ｓｃＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体との結合。いくつかのＦａｂクローンについて、それぞれが選択されたｇｐ１００由来エピトープに特異的であるが、その他のｇｐ１００およびテロメラーゼ由来ＨＬＡ－Ａ２拘束エピトープを含有する図示される対照ＭＨＣペプチド複合体には特異的でないことが示されている。（Ｄ）ＥＬＩＳＡ結合特異性の結果は、特異的また対照の可溶性ｓｃＭＨＣペプチド複合体を溶液中に過度に存在させて、固定された複合体との結合を競合させる、競合実験で確認された。競合は、特定のＭＨＣペプチド複合体で観察されるが、対照の複合体では観察されなかった。このタイプのアッセイの例を図３１Ｄに示すが、可溶性のＧ９２８０含有ＨＬＡ－Ａ２は競合し、Ｆａｂ　２Ｆ１と固定化したＧ９２８０／ＨＬＡ－Ａ２複合体との結合を阻害しているが、Ｇ９１５４／ＨＬＡ－Ａ２複合体は競合しなかった。

【図３１Ｄ】可溶性精製Ｆａｂと組換えｓｃＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体とのＥＬＩＳＡにおける結合。ｇｐ１００由来エピトープＧ９－１５４（Ａ）、Ｇ９－２０９（Ｂ）、およびＧ９－２８０（Ｃ）に特異的な可溶性精製Ｆａｂクローンと図示されるような固定化ｓｃＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体との結合。いくつかのＦａｂクローンについて、それぞれが選択されたｇｐ１００由来エピトープに特異的であるが、その他のｇｐ１００およびテロメラーゼ由来ＨＬＡ－Ａ２拘束エピトープを含有する図示される対照ＭＨＣペプチド複合体には特異的でないことが示されている。（Ｄ）ＥＬＩＳＡ結合特異性の結果は、特異的また対照の可溶性ｓｃＭＨＣペプチド複合体を溶液中に過度に存在させて、固定された複合体との結合を競合させる、競合実験で確認された。競合は、特定のＭＨＣペプチド複合体で観察されるが、対照の複合体では観察されなかった。このタイプのアッセイの例を図３１Ｄに示すが、可溶性のＧ９２８０含有ＨＬＡ－Ａ２は競合し、Ｆａｂ　２Ｆ１と固定化したＧ９２８０／ＨＬＡ－Ａ２複合体との結合を阻害しているが、Ｇ９１５４／ＨＬＡ－Ａ２複合体は競合しなかった。

【図３２】３個のＴＣＲ様Ｆａｂの結合特性。（Ａ～Ｃ）それぞれ、Ｇ９－１５４、Ｇ９－２０９、およびＧ９－２８０ペプチドを含有するｓａＨＬＡ－Ａ２に対する、精製した可溶性Ｆａｂ抗体Ｇ２Ｄ１２（Ａ）、１Ａ９（Ｂ）、および２Ｆ１（Ｃ）の滴定ＥＬＩＳＡ。ウェルは、材料及び方法で述べたように、対応するＭＨＣペプチド複合体で被覆した。（Ｄ～Ｆ）それぞれＧ９－１５４、Ｇ９－２０９、およびＧ９－２８０　ｇ１００由来のペプチドを含有するｓｃＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体に対して精製されたＦａｂ　Ｇ２Ｄ１２（Ｄ）、１Ａ９（Ｅ）、および２Ｆ１（Ｆ）が、^{125}Ｉ標識したＧ２Ｄ１２、１Ａ９、または２Ｆ１とこれらに対応するＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体との結合を阻害するかどうかに関する競合結合分析。組換えＦａｂの見掛けの結合親和性は、^{125}Ｉ標識トレーサーの結合を５０％阻害するのに必要とされる競合物質（可溶性精製Ｆａｂ）の濃度として求めた。

【図３３】腫瘍細胞表面のＭＨＣペプチド複合体の検出。ＭＡｂ　ＢＢ７．２との反応性によって決定される、ＨＬＡ－Ａ２を発現する（ＢおよびＤ）メラノーマＦＭ３Ｄ（Ａ）およびＹＵ　ＺＡＺ６（Ｃ）を、メラノーマｇｐ１００由来のＧ９－１５４エピトープに特異的な５、１０、および２０μｇのＦａｂ　Ｇ２Ｄ１２で、またはウイルスエピトープＴＡＸに特異的なＦａｂ　ＴＣＲ様抗体で染色した。結合は、ＦＩＴＣ標識した抗ヒトＦａｂの場合に検出された。メラノーマＨＬＡ－Ａ２－ＭＺ２－ＭＥＬ３．０細胞は、Ｇ２Ｄ１２（Ｅ）またはＢＢ７．２（Ｆ）（ＨＬＡ－Ａ２に関する指標）では染色されなかった。ＭＣＦ７　ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$乳癌細胞はＢＢ７．２で染色されたが（Ｈ）、Ｆａｂ　Ｇ２Ｄ１２またはＴＡＸ特異的Ｆａｂでは染色されなかった（Ｇ）。対照細胞は、ＦＩＴＣ標識２次抗体と共にインキュベートした細胞である。

【図３４】テロメラーゼ由来のＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドについて選択された組換えＦａｂ抗体の頻度（Ａ）および特異性（Ｂ、Ｃ）。ファージ粒子によるＥＬＩＳＡを、材料および方法で述べたように、固定したｓｃＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体上で行った。（Ａ）ｓｃＨＬＡ－Ａ２と複合したｈＴＥＲＴのＴ細胞エピトープであるＴ５４０およびＴ８６５に対するパニングの概要。（Ｂ）ｓｃＨＬＡ－Ａ２／Ｔ５４０複合体に対して選択されたクローンのファージＥＬＩＳＡ（クローン４Ｃ２（ＩＩ）、４Ｂ４（ＩＩ）、および４Ｅ７（ＩＩ）は第２回目のパニングからのものであり、クローン４Ａ９および４Ｇ９は、第３回目からのものである）。（Ｃ）ｓｃＨＬＡ－Ａ２／Ｔ８６５に対して選択されたクローンのファージＥＬＩＳＡ（クローン３Ｆ５（ＩＩ）、３Ｂ１（ＩＩ）、および３Ｃ１０（ＩＩ）は第２回目のパニングからのものであり、クローン３Ｈ２、３Ｇ３、および３Ａ１２は第３回目からのものである）。

【図３５】ＥＬＩＳＡにおけるＴＣＲ様特異性を有する可溶性精製Ｆａｂ抗体の結合。（Ａ＋Ｂ）可溶性Ｆａｂと、様々なＨＬＡ－Ａ２拘束ペプチドを含有する固定したＭＨＣペプチド複合体との結合。（Ａ）は、ｓｃＨＬＡ－Ａ２／Ｔ５４０複合体に対して選択されたＦａｂ；（Ｂ）は、ｓｃＨＬＡ－Ａ２／Ｔ８６５複合体に対して選択されたＦａｂクローン。

【図３６】２つの組換えＴＣＲ様Ｆａｂ抗体の結合特性。（Ａ＋Ｂ）それぞれｓｃＨＬＡ－Ａ２／Ｔ５４０およびｓｃＨＬＡ－Ａ２／Ｔ８６５に対する精製可溶性Ｆａｂ抗体４Ａ９（Ａ）および３Ｈ２（Ｂ）の滴定ＥＬＩＳＡ。ウェルは、材料と方法で述べたように、対応するＭＨＣペプチド複合体で被覆した。（Ｃ＋Ｄ）精製したＦａｂ　４Ｇ９（Ｃ）または３Ｇ３（Ｄ）が、^{125}Ｉ標識したＦａｂとこれに対応するＨＬＡ－Ａ２－ペプチド複合体との結合を阻害するかどうかに関する競合結合分析。組換えＦａｂの見掛けの結合親和性は、^{125}Ｉ標識トレーサーの結合を５０％阻害するのに必要とされる競合物質（可溶性精製Ｆａｂ）の濃度として求めた。

【図３７】腫瘍細胞上のＨＬＡ－Ａ２／テロメラーゼ由来ペプチド複合体の検出。ＨＬＡ－Ａ２陽性ＦＭ３Ｄメラノーマ、ＬｎＣａｐ前立腺癌腫、ＨｅＬａ上皮癌腫細胞、またはｈＴＥＲＴトランスフェクトヒト包皮線維芽細胞と、対照としての非トランスフェクト細胞（10^{6}）であって、テロメラーゼを発現するものを、ＨＬＡ－Ａ２／Ｔ５４０およびＨＬＡ－Ａ２／Ｔ８６５複合体にそれぞれ特異的なＦａｂ抗体４Ａ９および３Ｈ２と共にインキュベートした。結合は、ＦＩＴＣ標識した抗ヒトＦａｂを使用して検出した。ＨＬＡ－Ａ２陰性であるがｈＴＥＲＴ陽性である前立腺癌腫ＰＣ３細胞を対照として使用した。ＦＭ３Ｄ細胞は、４Ａ９、３Ｈ２、および対照Ｆａｂ（ＨＬＡ－Ａ２と複合したムチンペプチドに対するもの）で染色した。ＦＩＴＣ標識二次抗ヒトＦａｂで染色した細胞は、全体を通して黒色であった。ＬｎＣａｐ細胞は４Ａ９または３Ｈ２で染色し；ＨｅＬａ細胞は、３Ｈ２、または対照Ｆａｂ（ＨＬＡ－Ａ２と複合したメラノーマｇｐ１００由来ペプチドに対するもの）で染色し；ＰＣ３は４Ａ９または３Ｈ２で染色し；ＨＴＥＲＴトランスフェクトヒト線維芽細胞は、４Ａ９、３Ｈ２、または対照メラノーマ特異的Ｆａｃで染色し；対照である非トランスフェクト線維芽細胞は４Ａ９、３Ｈ２、または対照Ｆａｂで染色した。

【図３８】ＨＬＡ－Ａ２／ＭＵＣ１－Ｄ６複合体で選択された組換えＦａｂ抗体の頻度（Ａ）および特異性（Ｂ）。（Ａ）ｓｃＨＬＡ－Ａ２と複合したＭＵＣ１－Ｄ６Ｔ細胞エピトープに対するパニングの概要。ファージ粒子によるＥＬＩＳＡを、材料および方法で述べたように、固定したｓｃＨＬＡ－Ａ２／ペプチド複合体上で行った。（Ｂ）ｓｃＨＬＡ－Ａ２／ＭＵＣ１－Ｄ６複合体に対して選択されたクローンのファージＥＬＩＳＡ（クローンＭ２Ｂ１、Ｍ２Ｆ５は、第２回目のパニングからのものであり、クローンＭ３Ａ１、Ｍ３Ｂ８、Ｍ３Ｃ８は、第３回目からのものである）。

【図３９】ＴＣＲ様特異性を有する可溶性精製Ｆａｂ抗体と、ＥＬＩＳＡにおいて固定されたＭＨＣ／ＭＵＣ２－Ｄ６複合体との結合を示す図である。

【図４０】２つの組換えＴＣＲ様Ｆａｂ抗体の結合特性。（Ａ＋Ｂ）ｓｃＨＬＡ－Ａ２／ＭＵＣ１－Ｄ６に対する精製した可溶性Ｆａｂ抗体Ｍ３Ａ１（Ａ）およびＭ３Ｂ８（Ｂ）の滴定ＥＬＩＳＡ．ウェルは、材料と方法で述べたように対応するＭＨＣペプチド複合体で被覆した。

【図４１】腫瘍細胞表面のＭＨＣペプチド複合体の検出。（Ａ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞にＭＵＣ１－Ｄ６ペプチドを負荷した。次いでペプチドを負荷した細胞を、ＨＬＡ－Ａ２／ＭＵＣ１－Ｄ６特異的リフォールディングＭ３Ａ１四量体または単量体と共にインキュベートした。単量体染色細胞に比べて四量体染色細胞の平均蛍光強度が高いことが示されている。Ｍ３Ａ１四量体で染色した、何も負荷していない対照細胞についても示されている。（Ｂ）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞に、ＭＵＣ１－Ｄ６ペプチドを異なる濃度で、すなわち３０μＭ、１０μＭ、５μＭ、および１μＭで負荷した。次いでペプチドが負荷された細胞を、ＨＬＡ－Ａ２／ＭＵＣ１－Ｄ６特異的リフォールディングＭ３Ａ１四量体と共にインキュベートした。染色の強度とペプチドの濃度の関係が示されている。Ｍ３Ａ１四量体で染色した、何も負荷していない対照細胞についても示されている（０μＭ）。

【図４２】腫瘍細胞上のＨＬＡ－Ａ２／ＭＵＣ１由来ペプチド複合体の検出。ＭＣＦ７細胞をペプチドでパルス処理した状態でまたはパルス処理しない状態で、特異的Ｄ６　Ｍ３Ａ１　四量体で染色した。対照は、ＨＬＡ－Ａ２拘束メラノーマ特異的ｇｐ１００由来ペプチドでパルス処理したＭＣＦ７細胞である。５つの代表的な実験の平均蛍光結果が示さ

れている。
【０４５８】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Dyax Corporation, et al

<120> MHC-PEPTIDE COMPLEX BINDING LIGANDS

<130> 10280-034WO1

<150> US 60/358,994
<151> 2002-02-20

<160> 121

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Val
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val
 1   5

<210> 7
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc acctatttaa attggtatca acacagacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattct gcatccagtt tgcagagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctccaacct 240
gaagattttg caacctacta ctgtcagcag agtgacatta tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa ccga 324

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
            20   25   30
Leu Asn Trp Tyr Gln His Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ile Ile Pro Leu
                85   90   95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Asn Arg
            100   105

<210> 9
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgcgcca tctccgggga cagtatctct agtaacagtg ttgtttggaa ctggatcagg 120
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actataggtc caagtggtat 180
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcaactgaa ctctgtgact cccgacgaca cggctctcta ttactgtgca 300
agagcatcat ttgggaccag cggcaaattc gacgactggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcaagc 369

<210> 10
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30
Ser Val Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Asp Asp Thr Ala Leu
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Gly Thr Ser Gly Lys Phe Asp Asp
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
cagtctgtcg tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtgcccta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 12
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Ala Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 13
<211> 381
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
caggtacagc tgcagcagtc aggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acttgcactg tctctggtgg ctccatcaga aattactact ggagctggat ccggcagccc 120

```
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atgtattaca gtgggggagc caattacaac     180
ccctccctca acagtcgagt caccatatca ctagacacgt ccaagaacca gttctccctg     240
aaactgacct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcgag aattcccaac     300
tactatgata gaagtggtta ttatcccggt tactggtact tcgatctctg gggccgtgga     360
accctggtca ccgtctcaag c                                               381

<210> 14
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1               5                  10                  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Tyr
            20                  25                  30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Met Tyr Tyr Ser Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Asn
    50                  55                  60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65                  70                  75                  80
Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Ile Pro Asn Tyr Tyr Asp Arg Ser Gly Tyr Tyr Pro Gly Tyr Trp
            100                 105                 110
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125

<210> 15
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc      60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg cacagtaatg gatacaagta tgtgaattgg     120
tacctgcaga agccggggca gtctccacag ctcctgatct atttcggttc ttatcgggcc     180
tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc     240
agcagagtgg aggctgagga tgttgggatt tattactgca tgcaagctac acactggccg     300
tacacttttg gccaggggac caggctggag atcaaacga                            339

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30
Asn Gly Tyr Lys Tyr Val Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Phe Gly Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                  90                  95
Thr His Trp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
```

100 105 110
Arg

<210> 17
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 17
caggtgcagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagattac 300
tacggtgact acgctttgct tgactactgg ggccagggca ccctggtcac cgtctcaagc 360

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Asp Tyr Ala Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 19
gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc acctatttaa attggtatca acacagacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattct gcatccagtt tgcagagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctccaacct 240
gaagattttg caacctacta ctgtcagcag agtgacatta tccctctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa ccga 324

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln His Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ile Ile Pro Leu
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Asn Arg
            100                 105
```

<210> 21
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgcgcca tctccgggga cagtatctct agtaacagtg ttgtttggaa ctggatcagg 120
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actataggtc caagtggtat 180
aatgattatg cagtatctgt gaaaagtcga ataaccatca acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcaactgaa ctctgtgact cccgacgaca cggctctcta ttactgtgca 300
agagcatcat ttgggaccag cggcaaattc gacgactggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcaagc 369

<210> 22
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22
```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1               5                  10                  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Ile Ser Ser Asn
            20                  25                  30
Ser Val Val Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
        35                  40                  45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
    50                  55                  60
Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80
Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Asp Asp Thr Ala Leu
                85                  90                  95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Ser Phe Gly Thr Ser Gly Lys Phe Asp Asp
            100                 105                 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 23
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 23
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggaga gagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtcg gtatattaac gccaacttct tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca cccgggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag caggctggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcg gacgttcggc 300

caggggacca aggtggaaat caaacga 327

<210> 24
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Tyr Ile Asn Ala Asn
20 25 30
Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 25
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 25
caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagattcc 300
agcagtggct ggctctatga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcaagc 366

<210> 26
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Ser Ser Ser Gly Trp Leu Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 27
gaaattgtgc tgactcagtc tccagacacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc cacagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatttat gatacatcca gcagggccac tgacatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagattggag 240
cctgaagatt ctgcagtgta ttactgtcag cagtatgtta gctcacctct cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaacga 327

<210> 28
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser His Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Thr Ser Ser Arg Ala Thr Asp Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Ser Ser Pro
85 90 95
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 29
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 29
caggtccagc tggtacagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatggct tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcattt atatcatatg atggaagtaa taaatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acggcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaagactgtg 300
ggtgtcacgt ttgtctcgga tgcttttgat atatggggcc aagggacaat ggtcaccgtc 360
tcaagc 366

<210> 30
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Gly Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Thr Val Gly Val Thr Phe Val Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp
            100                 105                 110
Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 31
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
gatgttgtga tgactcagtc tccaggcacc ctgtctgtgt ctccggggga tagcgccacc 60
ctctcctgct gggccagtca gagtcttagt gacagctacg tgtcctggta ccaacagaag 120
cctggccagg ctcccaggct cctaatacat agcgcgtcca tcagggcccc tggcatcccg 180
gacaggttca gtggcagtgt gtctggcacg gagttcactc tgaccatcag cggactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttcctgtcac cagtatggtt tcttaccttg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggagat cagacga 327

<210> 32
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15
Asp Ser Ala Thr Leu Ser Cys Trp Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asp Ser
            20                  25                  30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45
Ile His Ser Ala Ser Ile Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60
Gly Ser Val Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Glu
65                  70                  75                  80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Ser Cys His Gln Tyr Gly Phe Leu Pro
                85                  90                  95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg
            100                 105
```

<210> 33
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33
caggtccagc tggtacagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggtta cacctttacc aggtatggta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcagctctt ccaatggtta cacaaagtat 180
gcacagaatc tccagggcag actcaccctg accacagaca catccacggg cacagcctac 240
atggaactga ggagcctgag atctgaggac acggcccttt attactgtgc gagatatgat 300
attagtggcc tagatggttt tgatatttgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcaagc 360

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Ser Ser Ser Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Ala Gln Asn Leu
50 55 60
Gln Gly Arg Leu Thr Leu Thr Thr Asp Thr Ser Thr Gly Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Asp Ile Ser Gly Leu Asp Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 35
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gctgcttcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggtt cctcacgcag ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acga 324

<210> 36
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Arg
85 90 95
Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 37
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc ctggtcaagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatagca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attagtagta gtggtagtac catatactac 180

```
gcagactctg tgaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat     240
ctccaaatga acagtctgag agccgaggac acagctgttt attactgtgt aagaggtgat     300
ccttacttct actactacgg tatggacatc tggggccaag ggaccacggt caccgtctca     360
agc                                                                   363

<210> 38
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Val Arg Gly Asp Pro Tyr Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Ile Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120

<210> 39
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 39
gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgctt ctgtaggaga cagagtcatc      60
atcacttgcc gggcaactca gagcattagc acccacttaa attggtatca gcagaagcca     120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattct gcatccagtt tacaaagtgg ggtcccatct     180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct     240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtt ccccccgat caccttcggc      300
caagggacac gactggagat taaacga                                         327

<210> 40
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Ser Ile Ser Thr His
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Pro
                85                  90                  95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 41
<211> 360
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 41
caggtgcagc tgcaggagtc cggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agtaacatgt actactgggg ctgggtccgc 120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatcg attatagtgg gagcacctac 180
tacaatccgt ccctcaggag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaagcagttc 240
tccctgaaga tgacctctgt gaccgctgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
tccgggtccc catactactt tgactactgg ggccagggca ccctggtcac cgtctcaagc 360

<210> 42
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asn
20 25 30
Met Tyr Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Ser Ile Asp Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Arg Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Met Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Glu Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 43
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagac agtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aggaattatg tctcgtggtt ccaacaagtc 120
ccagggagag cccccaaact cctcatttat gacaataatc agcgaccgtc agggattcct 180
ggccgattct cagcctccaa gtctgacacc tcagccaccc tggacatcac cggactccag 240
agtggggacg aggccgttta ttactgcgga acatgggatt ccaccctgga cctttatgtc 300
ttcggcggtg ggacccatgt ccccgtccta 330

<210> 44
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Phe Gln Gln Val Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu

```
        35                  40                  45
Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser
    50                  55                  60
Ala Ser Lys Ser Asp Thr Ser Ala Thr Leu Asp Ile Thr Gly Leu Gln
65                  70                  75                  80
Ser Gly Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Thr Leu
                85                  90                  95
Asp Leu Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr His Val Pro Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 45
<211> 384
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 45
gaggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag gtcttgagtg gatgggagca atcaacccga gtggtggtag cacaccctac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatggg 300
acctatggtt cggggagtta tccctactac tactactacg gtatggacgt ctggggccaa 360
gggaccacgg tcaccgtctc aagc 384

<210> 46
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46
```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
Gly Ala Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Pro Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Asp Gly Thr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 47
<211> 336
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 47
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cgggaaagac ggtaaccatc 60
tcctgcaccg gcagcggtgg cagcattgac aacaattatg tccactggta ccaacagcgc 120
ccgggcagtg cccccaccac tgtgatgttt gaagataacc aaagaccctc tggggtccct 180
gatcggttct ctggctccat tgacagctcc tccaactctg cctccctcgt catctctgga 240
ctgaagactg aggacgaggg tgactactac tgtcagtctt ctgatggaag taaagtggtc 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcag 336

<210> 48

<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Gly Ser Ile Asp Asn Asn
20 25 30
Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
35 40 45
Met Phe Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly
65 70 75 80
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Asp Gly
85 90 95
Ser Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 49
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 49
gaggtccagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgacactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag aactgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaaccctg 300
tccgcggggg agtggattgg agggggagct tttgatatct ggggccatgg gacaatggtc 360
accgtctcaa gc 372

<210> 50
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Thr Leu Ser Ala Gly Glu Trp Ile Gly Gly Gly Ala Phe Asp
100 105 110
Ile Trp Gly His Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 51
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagcatgata gctcaccacg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacga 327

<210> 52
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Ser Ser Pro
85 90 95
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 53
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 53
caggtccagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcattt atatcatatg atggaagtga taagaacttt 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctatat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagattcc 300
tactatgata atagtgcttt tcaggcagac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca 360
agc 363

<210> 54
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asn Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```
                85                  90                  95
Ala Lys Asp Ser Tyr Tyr Asp Asn Ser Ala Phe Gln Ala Asp Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 55
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 55
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cgggaaagac ggtaaccatc 60
tcctgcaccg gcagcggtgg cagcattgac aacaattatg tccactggta ccaacagcgc 120
ccgggcagtg cccccaccac tgtgatgttt gaagataacc aaagaccctc tggggtccct 180
gatcggttct ctggctccat tgacagctcc tccaactctg cctccctcgt catctctgga 240
ctgaagactg aggacgaggg tgactactac tgtcagtctt ctgatggaag taaagtggtc 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 56
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
```
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1               5                  10                  15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Gly Ser Ile Asp Asn Asn
            20                  25                  30
Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
        35                  40                  45
Met Phe Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Val Ile Ser Gly
65                  70                  75                  80
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Asp Gly
                85                  90                  95
Ser Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105                 110
```

<210> 57
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 57
gaggtccagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgacactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgtcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag aactgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaaaccctg 300
tccgcggggg agtggattgg agggggagct tttgatatct ggggccatgg gacaatggtc 360
accgtctcaa gc 372

<210> 58
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
```

```
 1               5                  10                  15
Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Thr Leu Ser Ala Gly Glu Trp Ile Gly Gly Gly Ala Phe Asp
            100                 105                 110
Ile Trp Gly His Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 59
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 59
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagcatgata gctcaccacg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacga 327

<210> 60
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
```
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
            20                  25                  30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50                  55                  60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                  70                  75                  80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asp Ser Ser Pro
                85                  90                  95
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 61
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 61
caggtccagc tggtgcagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcattt atatcatatg atggaagtga taagaacttt 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cactctatat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gaaagattcc 300

tactatgata atagtgcttt tcaggcagac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca 360
agc 363

<210> 62
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asn Phe Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ser Tyr Tyr Asp Asn Ser Ala Phe Gln Ala Asp Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 63
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcg aacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacga 327

<210> 64
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 65

<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 65
gaggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggtcca 300
gaatattgta ttaatggtgt atgctctctg gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcaagc 369

<210> 66
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Pro Glu Tyr Cys Ile Asn Gly Val Cys Ser Leu Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 67
gaaattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtgtatta ctgtcaccaa tatggtagct cacctcaaac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acga 324

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

```
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 69
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 69
gaggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc ggtccactac 300
ggtgactacg ttttctcctc tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctca 360
agc 363

<210> 70
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70
```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Val His Tyr Gly Asp Tyr Val Phe Ser Ser Met Asp Val Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 71
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 71
gaaattgtgc tgactcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc agctacttag cctggtacca acagaagcct 120
ggctaggctc ccagactcct catctatgat gcatcccaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgat gtacactttt 300
ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga 330

<210> 72
<211> 109

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Ala Ser His Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Met
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 73
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 73
gaggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatacta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gggggatacg 300
gatagtagtg gttattacgg cgcggttgac tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
tcaagc 366

<210> 74
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Gly Asp Thr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Ala Val Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 75
gaaattgtgc tgactcagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc agctacttag cctggtacca acagaagcct 120
ggctaggctc ccagactcct catctatgat gcatcccaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgat gtacactttt 300
ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga 330

<210> 76
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Ala Ser His Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Met
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 77
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 77
gaggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatacta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gggggatacg 300
gatagtagtg gttattacgg cgcggttgac tactggggcc agggcaccct ggtcaccgtc 360
tcaagc 366

<210> 78
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```
Ala Gly Asp Thr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Ala Val Asp Tyr Trp
            100                 105                 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 79
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 79
gaaattgtgc tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca gagcctcctg catagtaatg gatacaacta tttggattgg 120
tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctcctgatct atttgggttc taatcgggcc 180
tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaagctct acaaactcct 300
cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaacga 339

<210> 80
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80
```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
                85                  90                  95
Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
Arg
```

<210> 81
<211> 372
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 81
caggtgcagc tggtgcaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacttt 300
gactacggtg actcatacta ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcaa gc 372

<210> 82
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 82

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Asp Phe Asp Tyr Gly Asp Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
            100                 105                 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 83
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 83
gacatccaga tgacccagtc tccttccatc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagatttggt gattacttgg cctggtatca gcagaagcca 120
gggcaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccactt tgcagagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggctc tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccccatcac cttcggcaaa 300
gggacacggc tggacatcag acga 324

<210> 84
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84
```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Phe Gly Asp Tyr
            20                  25                  30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Asp Ile Arg Arg
            100                 105
```

<210> 85
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 85
caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgttg gcaatggtaa cgcaatatat 180
tcacagaagt tccagggcag agtcaccatt accagggaca tccgcgac cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagagacggg 300
gagagagcct gggaccttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcaagc 357

<210> 86
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Val Gly Asn Gly Asn Ala Ile Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Glu Arg Ala Trp Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 87
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 87
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac cgtaaccatc 60
tcctgcaccg gcagcggtgg cagcattgcc accaactatg tgcagtggta ccagcagcgc 120
ccgggcagtg cccccgccac tgtgatctat gaggatgacc aaagaccctc tggggtccct 180
gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtctt atgatagcag caatcaggta 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 88
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Gly Gly Ser Ile Ala Thr Asn
20 25 30
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Ala Thr Val
35 40 45
Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
85 90 95
Ser Asn Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 89

<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 89
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag gatggtacgt 300
tactactacg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc aagc 354

<210> 90
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Met Val Arg Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 91
tcctatgtgc tgactcagcc accctcagtg tcagaggccc caggaaagac ggccaggatt 60
acctgtgagg gcatcacgat tggaaggaag agtgtgcatt ggtaccagca gaagccaggc 120
caggcccctg tgttggtcgt ctatgatgat actgtccggc cctcaggggt ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgatca tcagcggagt cgaagccggg 240
gatgaggccg actattactg ccaggtgtgg gatagtagca ctgatcccca agtggtcttc 300
ggcggaggga ccaaggtgac cgtcctg 327

<210> 92
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Ala Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Glu Gly Ile Thr Ile Gly Arg Lys Ser Val
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45
Asp Asp Thr Val Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

```
    50                  55                  60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Ile Ile Ser Gly Val Glu Ala Gly
65                  70                  75                  80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Asp Pro
                85                  90                  95
Gln Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
            100                 105
```

<210> 93
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 93
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaagaatt cttcttggaa ctggatcagg 120
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg gggaggacat actacaggtc caagtggtat 180
tatgattatg cagtctctgt gaaaggtcga ataaccttca ccccagacac atccaagaac 240
caggtctccc tgcacctgaa cgctgtgact cccgaggaca cggctatgta ttactgtgta 300
aggggcagta tttttgatgt gtggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagc 354

<210> 94
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94
```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1               5                  10                  15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Lys
            20                  25                  30
Asn Ser Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
        35                  40                  45
Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ala
    50                  55                  60
Val Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Phe Thr Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80
Gln Val Ser Leu His Leu Asn Ala Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Met
                85                  90                  95
Tyr Tyr Cys Val Arg Gly Ser Ile Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Met Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 95
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 95
gacatccaga tgacccagtc tccttccatc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagatttggt gattacttgg cctggtatca gcagaagcca 120
gggcaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatccactt tgcagagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggctc tgggacagag ttcactctca ccatcagcgg cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcagcag gctaacagtt tccccatcac cttcggcaaa 300
gggacacggc tggacatcag acga 324

<210> 96
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Phe Gly Asp Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Asp Ile Arg Arg
100 105

<210> 97
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 97
caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgttg gcaatggtaa cgcaatatat 180
tcacagaagt tccagggcag agtcaccatt accagggaca catccgcgac cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaagac acggctgtgt attactgtgc gagagacggg 300
gagagagcct gggaccttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcaagc 357

<210> 98
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Val Gly Asn Gly Asn Ala Ile Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Glu Arg Ala Trp Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 99
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 99
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcaggtact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaaacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acga 324

<210> 100
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Asn
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 101
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 101
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct attatagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagatcc 300
aggagtggga gctacctcaa tgatgctttt gatatctggg gccaagggac aatggtcacc 360
gtctcaagc 369

<210> 102
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Arg Ser Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 103
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 103
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcatcggg gacgttcggc 300
caagggacca aggtggaaat caaacga 327

<210> 104
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 104
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ser
85 90 95
Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 105
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 105
caggtacagc tgcagcagtc aggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggtttc 300
cgtccgtact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctca 360
agc 363

<210> 106
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 106
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

```
        35                  40                  45
Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Gly Phe Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
            100                 105                 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 107
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 107
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttggc agcaacttag cctggtacca gcagagacct 120
ggccaggctc ccagcctcct catctatggt gcatccagca gggccactgg cgtcccagac 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct 240
gaagattttg ctgtatatta ctgtcagcag tatggtgact cacctcgctt gtacactttt 300
ggccagggga ccaagctgga gatcaaacga 330

<210> 108
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 108
```
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Asn
            20                  25                  30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asp Ser Pro Arg
                85                  90                  95
Leu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110
```

<210> 109
<211> 375
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 109
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac caactacaac 180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agtggcttac 300
tatgatagta gtggttatta cccctatgat gcttttgata tctggggcca agggacaatg 360
gtcaccgtct caagc 375

<210> 110

<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 110
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Val Ala Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Pro Tyr Asp Ala Phe
100 105 110
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 111
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 111
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctctgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgta cacttttggc 300
caggggacca agctggagat caaacga 327

<210> 112
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 113
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 113
caggtgcagc tggtgcaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaatta 300
cgatttttgg agtggtcctc cgatgctttt gatatctggg gccaagggac aatggtcacc 360
gtctcaagc 369

<210> 114
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 114
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 115
<211> 330
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 115
gaaacgacac tcacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctatt tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca ccagggccac tggcgtccca 180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcaa cagtacggta cctcacttac gtggacgttc 300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacga 330

<210> 116
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Leu
85 90 95
Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 117
<211> 375
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 117
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagtt actactgggc ctggatccgc 120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt ggggaaatca atcatagtgg aagcaccaac 180
tacaacccgt ccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaatc tgaactctgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagagta 300
gtagcagcag ctggtcacta ctactactac tacatggacg tctggggcaa agggaccacg 360
gtcaccgtct caagc 375

<210> 118
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Val Val Ala Ala Ala Gly His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met
100 105 110
Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 119
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 119
agcggataac aatttcacac agg 23

<210> 120
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 120
tttgtcgtct ttccagacgt tagt 24

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121
Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val
1 5

【図１Ａ】

抗体クローン1A11の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
1      D  I  Q  L  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T
                        CDR1
61    ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCACCTATTTAAATTGGTATCAACACAGACCA
21     I  T  C  R  A  S  Q  S  I  S  T  Y  L  N  W  Y  Q  H  R  P
                              CDR2
121   GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCAGTTTGCAGAGTGGGGTCCCATCA
41     G  K  A  P  K  L  L  I  Y  S  A  S  S  L  Q  S  G  V  P  S

181   AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTCCAACCT
61     R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P
                                    CDR3
241   GAAGATTTTGCAACCTACTACTGTCAGCAGAGTGACATTATCCCTCTCACTTTCGGCGGA
81     E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  S  D  I  I  P  L  T  F  G  G

301   GGGACCAAGGTGGAGATCAACCGA (SEQ ID NO:7)
101    G  T  K  V  E  I  N  R  (SEQ ID NO:8)
```

【図１Ｂ】

抗体クローン1A11の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTC
1      Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  P  G  L  V  K  P  S  Q  T  L  S  L
                              CDR1
61    ACCTGCGCCATCTCCGGGGACAGTATCTCTAGTAACAGTGTTGTTTGGAACTGGATCAGG
21     T  C  A  I  S  G  D  S  I  S  S  N  S  V  V  W  N  W  I  R
                                    CDR2
121   CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATAGGTCCAAGTGGTAT
41     Q  S  P  S  R  G  L  E  W  L  G  R  T  Y  Y  R  S  K  W  Y

181   AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
61     N  D  Y  A  V  S  V  K  S  R  I  T  I  N  P  D  T  S  K  N

241   CAGTTCTCCCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGACGACACGGCTCTCTATTACTGTGCA
81     Q  F  S  L  Q  L  N  S  V  T  P  D  D  T  A  L  Y  Y  C  A
                        CDR3
301   AGAGCATCATTTGGGACCAGCGGCAAATTCGACGACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
101    R  A  S  F  G  T  S  G  K  F  D  D  W  G  Q  G  T  L  V  T

361   GTCTCAAGC (SEQ ID NO:9)
121    V  S  S  (SEQ ID NO:10)
```

【図２Ａ】

抗体クローン1A7の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGTCTGTCGTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGGGTCACCATC
1      Q  S  V  V  T  Q  P  P  S  V  S  G  A  P  G  Q  R  V  T  I
                        CDR1
61    TCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTACCAGCAG
21     S  C  T  G  S  S  S  N  I  G  A  G  Y  D  V  H  W  Y  Q  Q
                              CDR2
121   CTTCCAGGAACAGCCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTC
41     L  P  G  T  A  P  K  L  L  I  Y  G  N  S  N  R  P  S  G  V

181   CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTC
61     P  D  R  F  S  G  S  K  S  G  T  S  A  S  L  A  I  T  G  L
                                    CDR3
241   CAGGCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGCAGCCTGAGTGCCCTA
81     Q  A  E  D  E  A  D  Y  Y  C  Q  S  Y  D  S  S  L  S  A  L

301   TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:11)
101    F  G  G  G  T  K  L  T  V  L  (SEQ ID NO:12)
```

【図２Ｂ】

抗体クローン1A7の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
1      Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L
                              CDR1
61    ACTTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAAATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCC
21     T  C  T  V  S  G  G  S  I  R  N  Y  Y  W  S  W  I  R  Q  P
                                    CDR2
121   CCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGTATATGTATTACAGTGGGGGAGCCAATTACAAC
41     P  G  K  G  L  E  W  I  G  Y  M  Y  Y  S  G  G  A  N  Y  N

181   CCCTCCCTCAACAGTCGAGTCACCATATCACTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
61     P  S  L  N  S  R  V  T  I  S  L  D  T  S  K  N  Q  F  S  L

241   AAACTGACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGAGAATTCCCAAC
81     K  L  T  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  I  P  N
                        CDR3
301   TACTATGATAGAAGTGGTTATTATCCCGGTTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGA
101    Y  Y  D  R  S  G  Y  Y  P  G  Y  W  Y  F  D  L  W  G  R  G

361   ACCCTGGTCACCGTCTCAAGC (SEQ ID NO:13)
121    T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:14)
```

【図３Ａ】

抗体クローン1A9の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCC
1      D  V  V  M  T  Q  S  P  L  S  L  P  V  T  P  G  E  P  A  S

                                  CDR1
61    ATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCACAGTAATGGATACAAGTATGTGAATTGG
21     I  S  C  R  S  S  Q  S  L  L  H  S  N  G  Y  K  Y  V  N  W

                                                  CDR2
121   TACCTGCAGAAGCCGGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTCGGTTCTTATCGGGCC
41     Y  L  Q  K  P  G  Q  S  P  Q  L  L  I  Y  F  G  S  Y  R  A

181   TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC
61     S  G  V  P  D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  K  I

                                                  CDR3
241   AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATGCAAGCTACACACTGGCCG
81     S  R  V  E  A  E  D  V  G  I  Y  Y  C  M  Q  A  T  H  W  P

301   TACACTTTTGGCCAGGGGACCAGGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO:15)
101    Y  T  F  G  Q  G  T  R  L  E  I  K  R (SEQ ID NO:16)
```

【図３Ｂ】

抗体クローン1A9の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L

                                  CDR1
61    TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
21     S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  G  M  H  W  V  R  Q  A

                                                  CDR2
121   CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT
41     P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  S  Y  D  G  S  N  K  Y  Y

181   GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
61     A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y

                                                              1
241   CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATTAC
81     L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  Y

                  CDR3
301   TACGGTGACTACGCTTTGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCAAGC (SEQ
ID NO:17)
101    Y  G  D  Y  A  L  L  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ
ID NO:18)
```

【図４Ａ】

抗体クローン1C8の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
1      D  I  Q  L  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T

                                  CDR1
61    ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCACCTATTTAAATTGGTATCAACAGACCA
21     I  T  C  R  A  S  Q  S  I  S  T  Y  L  N  W  Y  Q  H  R  P

                                                  CDR2
121   GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCAGTTTGCAGAGTGGGGTCCCATCA
41     G  K  A  P  K  L  L  I  Y  S  A  S  S  L  Q  S  G  V  P  S

181   AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTCCAACCT
61     R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P

                                                  CDR3
241   GAAGATTTTGCAACCTACTACTGTCAGCAGAGTGACATTATCCCTCTCACTTTCGGCGGA
81     E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  S  D  I  I  P  L  T  F  G  G

301   GGGACCAAGGTGGAGATCAACCGA (SEQ ID NO:19)
101    G  T  K  V  E  I  N  R (SEQ ID NO:20)
```

【図４Ｂ】

抗体クローン1C8の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTC
1      Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  P  G  L  V  K  P  S  Q  T  L  S  L

                                  CDR1
61    ACCTGCGCCATCTCCGGGGACAGTATCTCTAGTAACAGTGTTGTTTGGAACTGGATCAGG
21     T  C  A  I  S  G  D  S  I  S  S  N  S  V  V  W  N  W  I  R

                                                              CDR2
121   CAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTATAGGTCCAAGTGGTAT
41     Q  S  P  S  R  G  L  E  W  L  G  R  T  Y  Y  R  S  K  W  Y

181   AATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAAC
61     N  D  Y  A  V  S  V  K  S  R  I  T  I  N  P  D  T  S  K  N

241   CAGTTCTCCCTGCAACTGAACTCTGTGACTCCCGACGACACGGCTCTCTATTACTGTGCA
81     Q  F  S  L  Q  L  N  S  V  T  P  D  D  T  A  L  Y  Y  C  A

                  CDR3
301   AGAGCATCATTTGGGACCAGCGGCAAATTCGACGACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
101    R  A  S  F  G  T  S  G  K  F  D  D  W  G  Q  G  T  L  V  T

361   GTCTCAAGC (SEQ ID NO:21)
121    V  S  S (SEQ ID NO:22)
```

【図５Ａ】

抗体クローン1D7の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGAGAGAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                                  CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCGGTATATTAACGCCAACTTCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  R  Y  I  N  A  N  F  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                                  CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCACCCGGGCCACTGGCATCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  D  A  S  T  R  A  T  G  I  P

181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGGCTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                                  CDR3
241   CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCGGACGTTCGGC
81     P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  G  S  S  P  R  T  F  G

301   CAGGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:23)
101    Q  G  T  K  V  E  I  K  R (SEQ ID NO:24)
```

【図５Ｂ】

抗体クローン1D7の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTC
1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V

                                  CDR1
61    TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
21     S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  A  I  S  W  V  R  Q  A

                                                  CDR2
121   CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC
41     P  G  Q  G  L  E  W  M  G  G  I  I  P  I  F  G  T  A  N  Y

181   GCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC
61     A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A  D  E  S  T  S  T  A  Y

241   ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTCC
81     M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  S

                  CDR3
301   AGCAGTGGCTGGCTCTATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTC
101    S  S  G  W  L  Y  D  A  F  D  I  W  G  Q  G  T  M  V  T  V

361   TCAAGC (SEQ ID NO:25)
121    S  S (SEQ ID NO:26)
```

【図６Ａ】

抗体クローン1G2の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  I  V  L  T  Q  S  P  D  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                                  CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCACAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  H  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                                  CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATTTATGATACATCCAGCAGGGCCACTGACATCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  D  T  S  S  R  A  T  D  I  P

181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGATTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                                  CDR3
241   CCTGAAGATTCTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGTTAGCTCACCTCTCACTTTTGGC
81     P  E  D  S  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  V  S  S  P  L  T  F  G

301   CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO:27)
101    Q  G  T  K  L  E  I  K  R (SEQ ID NO:28)
```

【図６Ｂ】

抗体クローン1G2の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L

                                  CDR1
61    TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACCTATGGCTTGCACTGGGTCCGCCAGGCT
21     S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  T  Y  G  L  H  W  V  R  Q  A

                                                              CDR2
121   CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAC
41     P  G  K  G  L  E  W  V  A  F  I  S  Y  D  G  S  N  K  Y  Y

181   GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
61     A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y

241   CTGCAAATGAACGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGACTGTG
81     L  Q  M  N  G  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  T  V

                  CDR3
301   GGTGTCACGTTTGTCTCGGATGCTTTTGATATAGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTC
101    G  V  T  F  V  S  D  A  F  D  I  W  G  Q  G  T  M  V  T  V

361   TCAAGC (SEQ ID NO:29)
121    S  S (SEQ ID NO:30)
```

【図７Ａ】

抗体クローン2B2の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1       GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTGTGTCTCCGGGGGATAGCGCCACC
1        D  V  V  M  T  Q  S  P  G  T  L  S  V  S  P  G  D  S  A  T

                                CDR1
61      CTCTCCTGCTGGGCCAGTCAGAGTCTTAGTGACAGCTACGTGTCCTGGTACCAACAGAAG
21       L  S  C  W  A  S  Q  S  L  S  D  S  Y  V  S  W  Y  Q  Q  K

                                                CDR2
121     CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTAATACATAGCGCGTCCATCAGGGCCCCTGGCATCCCG
41       P  G  Q  A  P  R  L  L  I  H  S  A  S  I  R  A  P  G  I  P

181     GACAGGTTCAGTGGCAGTGTGTCTGGCACGGAGTTCACTCTGACCATCAGCGGACTGGAG
61       D  R  F  S  G  S  V  S  G  T  E  F  T  L  T  I  S  G  L  E

                                                CDR3
241     CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTCCTGTCACCAGTATGGTTTCTTACCTTGGACGTTCGGC
81       P  E  D  F  A  V  Y  S  C  H  Q  Y  G  F  L  P  W  T  F  G

301     CAAGGGACCAAGGTGGAGATCAGACGA (SEQ ID NO:31)
101      Q  G  T  K  V  E  I  R  R  (SEQ ID NO:32)
```

【図７Ｂ】

抗体クローン2B2の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1       CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
1        Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S  V  K  V

                                CDR1
61      TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGGTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
21       S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  R  Y  G  I  S  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121     CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCTCTTCCAATGGTTACACAAAGTAT
41       P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  S  S  S  N  G  Y  T  K  Y

181     GCACAGAATCTCCAGGGCAGACTCACCCTGACCACAGACACATCCACGGGCACAGCCTAC
61       A  Q  N  L  Q  G  R  L  T  L  T  T  D  T  S  T  G  T  A  Y

241     ATGGAACTGAGGAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCTTTATTACTGTGCGAGATATGAT
81       M  E  L  R  S  L  R  S  E  D  T  A  L  Y  Y  C  A  R  Y  D

                CDR3
301     ATTAGTGGCCTAGATGGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGC(SEQ ID
NO:33)
101      I  S  G  L  D  G  F  D  I  W  G  Q  G  T  M  V  T  V  S  S  (SEQ
ID NO:34)
```

【図８Ａ】

抗体クローン2C5の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1       GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1        E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                                CDR1
61      CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21       L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  N  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                                CDR2
121     CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTGCTTCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
41       P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  A  A  S  S  R  A  T  G  I  P

181     GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
61       D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                                CDR3
241     CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTTCCTCACGCAGTTTTGGCCAG
81       P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  G  S  S  R  S  F  G  Q

301     GGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO:35)
101      G  T  K  L  E  I  K  R  (SEQ ID NO:36)
```

【図８Ｂ】

抗体クローン2C5の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1       CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
1        Q  V  Q  L  Q  E  S  G  G  G  L  V  K  P  G  G  S  L  R  L

                                CDR1
61      TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT
21       S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  S  M  N  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121     CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATATACTAC
41       P  G  K  G  L  E  W  V  S  Y  I  S  S  S  G  S  T  I  Y  Y

181     GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTAT
61       A  D  S  V  R  G  R  F  T  I  S  R  D  N  A  K  N  T  L  Y

241     CTCCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACAGCTGTTTATTACTGTGTAAGAGGTGAT
81       L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  V  R  G  D

                CDR3
301     CCTTACTTCTACTACTACGGTATGGACATCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCA
101      P  Y  F  Y  Y  Y  G  M  D  I  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S

361     AGC (SEQ ID NO:37)
121      S  (SEQ ID NO:38)
```

【図９Ａ】

抗体クローン2D1の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1       GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTTCTGTAGGAGACAGAGTCATC
1        D  I  Q  L  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  I

                                CDR1
61      ATCACTTGCCGGGCAACTCAGAGCATTAGCACCCACTTAAATTGGTATCAGCAGAAGCCA
21       I  T  C  R  A  T  Q  S  I  S  T  H  L  N  W  Y  Q  Q  K  P

                                                CDR2
121     GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCAGTTTACAAAGTGGGGTCCCATCT
41       G  K  A  P  K  L  L  I  Y  S  A  S  S  L  Q  S  G  V  P  S

181     AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
61       R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P

                                                CDR3
241     GAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTCCCCCCGATCACCTTCGGC
81       E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  S  Y  S  S  P  P  I  T  F  G

301     CAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGA (SEQ ID NO:39)
101      Q  G  T  R  L  E  I  K  R  (SEQ ID NO:40)
```

【図９Ｂ】

抗体クローン2D1の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1       CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
1        Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L

                                CDR1
61      ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTAACATGTACTACTGGGGCTGGGTCCGC
21       T  C  T  V  S  G  G  S  I  S  S  N  M  Y  Y  W  G  W  V  R

                                                CDR2
121     CAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCGATTATAGTGGGAGCACCTAC
41       Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  S  I  D  Y  S  G  S  T  Y

181     TACAATCCGTCCCTCAGGAGTCGAGTCACCATGTCCGTAGACACGTCCAAGAAGCAGTTC
61       Y  N  P  S  L  R  S  R  V  T  M  S  V  D  T  S  K  K  Q  F

241     TCCCTGAAGATGACCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAA
81       S  L  K  M  T  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  E

                CDR3
301     TCCGGGTCCCCATACTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCAAGC (SEQ
ID NO:41)
101      S  G  S  P  Y  Y  F  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ
ID NO:42)
```

【図１０Ａ】

抗体クローン2F1の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1       CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGACAGTCACCATC
1        Q  S  V  L  T  Q  P  P  S  V  S  A  A  P  G  Q  T  V  T  I

                                CDR1
61      TCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAGGAATTATGTCTCGTGGTTCCAACAAGTC
21       S  C  S  G  S  S  S  N  I  G  R  N  Y  V  S  W  F  Q  Q  V

                                                CDR2
121     CCAGGGAGAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGACAATAATCAGCGACCGTCAGGGATTCCT
41       P  G  R  A  P  K  L  L  I  Y  D  N  N  Q  R  P  S  G  I  P

181     GGCCGATTCTCAGCCTCCAAGTCTGACACCTCAGCCACCCTGGACATCACCGGACTCCAG
61       G  R  F  S  A  S  K  S  D  T  S  A  T  L  D  I  T  G  L  Q

                                                CDR3
241     AGTGGGGACGAGGCCGTTTATTACTGCGGAACATGGGATTCCACCCTGGACCTTTATGTC
81       S  G  D  E  A  V  Y  Y  C  G  T  W  D  S  T  L  D  L  Y  V

301     TTCGGCGGTGGGACCCATGTCCCCGTCCTA (SEQ ID NO:43)
101      F  G  G  G  T  H  V  P  V  L  (SEQ ID NO:44)
```

【図１０Ｂ】

抗体クローン2F1の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1       GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTT
1        E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S  V  K  V

                                CDR1
61      TCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAGCTACTATATCCACTGGGTGCGACAGGCC
21       S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  Y  I  H  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121     CCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAGCAATCAACCCGAGTGGTGGTAGCACACCCTAC
41       P  G  Q  G  L  E  W  M  G  A  I  N  P  S  G  G  S  T  P  Y

181     GCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTAC
61       A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  M  T  R  D  T  S  T  S  T  V  Y

241     ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGG
81       M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  G

                CDR3
301     ACCTATGGTTCGGGGAGTTATCCCTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAA
101      T  Y  G  S  G  S  Y  P  Y  Y  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q

361     GGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC (SEQ ID NO:45)
121      G  T  T  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:46)
```

【図１１Ａ】

抗体クローンG2D12の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAAGACGGTAACCATC
1      N  F  M  L  T  Q  P  H  S  V  S  E  S  P  G  K  T  V  T  I

                          CDR1
61    TCCTGCACCGGCAGCGGTGGCAGCATTGACAACAATTATGTCCACTGGTACCAACAGCGC
21     S  C  T  G  S  G  G  S  I  D  N  N  Y  V  H  W  Y  Q  Q  R

                                                CDR2
121   CCGGGCAGTGCCCCCACCACTGTGATGTTTGAAGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCT
41     P  G  S  A  P  T  T  V  M  F  E  D  N  Q  R  P  S  G  V  P

181   GATCGGTTCTCTGGCTCCATTGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCGTCATCTCTGGA
61     D  R  F  S  G  S  I  D  S  S  S  N  S  A  S  L  V  I  S  G

                                                      CDR3
241   CTGAAGACTGAGGACGAGGGTGACTACTACTGTCAGTCTTCTGATGGAAGTAAAGTGGTC
81     L  K  T  E  D  E  G  D  Y  Y  C  Q  S  S  D  G  S  K  V  V

301   TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAG (SEQ ID NO:47)
101    F  G  G  G  T  K  L  T  V  L  G  Q  (SEQ ID NO:48)
```

【図１１Ｂ】

抗体クローンG2D12の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGACACTC
1      E  V  Q  L  V  Q  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  T  L

                          CDR1
61    TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
21     S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  G  M  H  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121   CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT
41     P  G  K  G  L  E  W  V  S  V  I  S  Y  D  G  S  N  K  Y  Y

181   GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
61     A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y

241   CTGCAAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAACCCTG
81     L  Q  M  N  S  L  R  T  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  T  L

                    CDR3
301   TCCGCGGGGGAGTGGATTGGAGGGGGAGCTTTTGATATCTGGGGCCATGGGACAATGGTC
101    S  A  G  E  W  I  G  G  G  A  F  D  I  W  G  H  G  T  M  V

361   ACCGTCTCAAGC (SEQ ID NO:49)
121    T  V  S  S  (SEQ ID NO:50)
```

【図１２Ａ】

抗体クローンG3F12の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                          CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                                CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  G  A  S  S  R  A  T  G  I  P

181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                                      CDR3
241   CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCATGATAGCTCACCACGGACGTTCGGC
81     P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  H  D  S  S  P  R  T  F  G

301   CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:51)
101    Q  G  T  K  V  E  I  K  R  (SEQ ID NO:52)
```

【図１２Ｂ】

抗体クローンG3F12の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L

                          CDR1
61    TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
21     S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  G  M  H  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121   CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATATCATATGATGGAAGTGATAAGAACTTT
41     P  G  K  G  L  E  W  V  A  F  I  S  Y  D  G  S  D  K  N  F

181   GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTATAT
61     A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y

241   CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATTCC
81     L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  D  S

                    CDR3
301   TACTATGATAATAGTGCTTTTCAGGCAGACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCA
101    Y  Y  D  N  S  A  F  Q  A  D  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S

361   AGC (SEQ ID NO:53)
121    S  (SEQ ID NO:54)
```

【図１３Ａ】

抗体クローンG3F3の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGAAAGACGGTAACCATC
1      N  F  M  L  T  Q  P  H  S  V  S  E  S  P  G  K  T  V  T  I

                          CDR1
61    TCCTGCACCGGCAGCGGTGGCAGCATTGACAACAATTATGTCCACTGGTACCAACAGCGC
21     S  C  T  G  S  G  G  S  I  D  N  N  Y  V  H  W  Y  Q  Q  R

                                                CDR2
121   CCGGGCAGTGCCCCCACCACTGTGATGTTTGAAGATAACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCT
41     P  G  S  A  P  T  T  V  M  F  E  D  N  Q  R  P  S  G  V  P

181   GATCGGTTCTCTGGCTCCATTGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCGTCATCTCTGGA
61     D  R  F  S  G  S  I  D  S  S  S  N  S  A  S  L  V  I  S  G

                                                      CDR3
241   CTGAAGACTGAGGACGAGGGTGACTACTACTGTCAGTCTTCTGATGGAAGTAAAGTGGTC
81     L  K  T  E  D  E  G  D  Y  Y  C  Q  S  S  D  G  S  K  V  V

301   TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ ID NO:55)
101    F  G  G  G  T  K  L  T  V  L  (SEQ ID NO:56)
```

【図１３Ｂ】

抗体クローンG3F3の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGACACTC
1      E  V  Q  L  V  Q  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  T  L

                          CDR1
61    TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
21     S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  G  M  H  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121   CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT
41     P  G  K  G  L  E  W  V  S  V  I  S  Y  D  G  S  N  K  Y  Y

181   GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
61     A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y

241   CTGCAAATGAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAACCCTG
81     L  Q  M  N  S  L  R  T  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  T  L

                    CDR3
301   TCCGCGGGGGAGTGGATTGGAGGGGGAGCTTTTGATATCTGGGGCCATGGGACAATGGTC
101    S  A  G  E  W  I  G  G  G  A  F  D  I  W  G  H  G  T  M  V

361   ACCGTCTCAAGC (SEQ ID NO:57)
121    T  V  S  S  (SEQ ID NO:58)
```

【図１４Ａ】

抗体クローンG3G4の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                          CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                                CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  G  A  S  S  R  A  T  G  I  P

181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                                      CDR3
241   CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGCATGATAGCTCACCACGGACGTTCGGC
81     P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  H  D  S  S  P  R  T  F  G

301   CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:59)
101    Q  G  T  K  V  E  I  K  R  (SEQ ID NO:60)
```

【図１４Ｂ】

抗体クローンG3G4の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L

                          CDR1
61    TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
21     S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  G  M  H  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121   CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATTTATATCATATGATGGAAGTGATAAGAACTTT
41     P  G  K  G  L  E  W  V  A  F  I  S  Y  D  G  S  D  K  N  F

181   GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTCTATAT
61     A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y

241   CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATTCC
81     L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K  D  S

                    CDR3
301   TACTATGATAATAGTGCTTTTCAGGCAGACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCA
101    Y  Y  D  N  S  A  F  Q  A  D  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S

361   AGC (SEQ ID NO:61)
121    S  (SEQ ID NO:62)
```

【図１５Ａ】

抗体クローンM3A1の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                                CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                                CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  G  A  S  S  R  A  T  G  I  P

181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                                CDR3
241   CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTCGAACGTTCGGC
81     P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  G  S  S  P  R  T  F  G

301   CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:63)
101    Q  G  T  K  V  E  I  K  R  (SEQ ID NO:64)
```

【図１５Ｂ】

抗体クローンM3A1の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTC
1      E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V

                                CDR1
61    TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
21     S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  A  I  S  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121   CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC
41     P  G  Q  G  L  E  W  M  G  G  I  I  P  I  F  G  T  A  N  Y

181   GCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC
61     A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A  D  E  S  T  S  T  A  Y

241   ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGTCCA
81     M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G  P

                        CDR3
301   GAATATTGTATTAATGGTGTATGCTCTCTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
101    E  Y  C  I  N  G  V  C  S  L  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T

361   GTCTCAAGC (SEQ ID NO:65)
121    V  S  S  (SEQ ID NO:66)
```

【図１６Ａ】

抗体クローンM3B8の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  I  V  M  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                                CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K  P

                                                CDR2
121   GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC
41     G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  D  A  S  N  R  A  T  G  I  P  A

181   AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
61     R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E  P

                                                CDR3
241   GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCACCAATATGGTAGCTCACCTCAAACGTTCGGCCAA
81     E  D  F  A  V  Y  Y  C  H  Q  Y  G  S  S  P  Q  T  F  G  Q

301   GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:67)
101    G  T  K  V  E  I  K  R  (SEQ ID NO:68)
```

【図１６Ｂ】

抗体クローンM3B8の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTC
1      E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V

                                CDR1
61    TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
21     S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  A  I  S  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121   CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC
41     P  G  Q  G  L  E  W  M  G  G  I  I  P  I  F  G  T  A  N  Y

181   GCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTAC
61     A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A  D  E  S  T  S  T  A  Y

241   ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGTCCACTAC
81     M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  V  H  Y

                        CDR3
301   GGTGACTACGTTTTCTCCTCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCA
101    G  D  Y  V  F  S  S  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S

361   AGC (SEQ ID NO:69)
121    S  (SEQ ID NO:70)
```

【図１７Ａ】

抗体クローンT3E3の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                                CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCT
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  G  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K  P

                                                CDR2
121   GGCTAGGCTCCCAGACTCCTCATCTATGATGCATCCCACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC
41     G  *  A  P  R  L  L  I  Y  D  A  S  H  R  A  T  G  I  P  A

181   AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
61     R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E  P

                                                CDR3
241   GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGATGTACACTTTT
81     E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  R  S  N  W  P  P  M  Y  T  F

301   GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO:71)
101    G  Q  G  T  K  L  E  I  K  R  (SEQ ID NO:72)
```

【図１７Ｂ】

抗体クローンT3E3の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTC
1      E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V

                                CDR1
61    TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATACTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
21     S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  T  I  S  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121   CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC
41     P  G  Q  G  L  E  W  M  G  G  I  I  P  I  F  G  T  A  N  Y

181   GCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
61     A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y

241   ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGGGGATACG
81     M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  G  D  T

                        CDR3
301   GATAGTAGTGGTTATTACGGCGCGGTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTC
101    D  S  S  G  Y  Y  G  A  V  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V

361   TCAAGC (SEQ ID NO:73)
121    S  S  (SEQ ID NO:74)
```

【図１８Ａ】

抗体クローンT3F1の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                                CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCT
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  G  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K  P

                                                CDR2
121   GGCTAGGCTCCCAGACTCCTCATCTATGATGCATCCCACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC
41     G  *  A  P  R  L  L  I  Y  D  A  S  H  R  A  T  G  I  P  A

181   AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
61     R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E  P

                                                CDR3
241   GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGATGTACACTTTT
81     E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  R  S  N  W  P  P  M  Y  T  F

301   GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO:75)
101    G  Q  G  T  K  L  E  I  K  R  (SEQ ID NO:76)
```

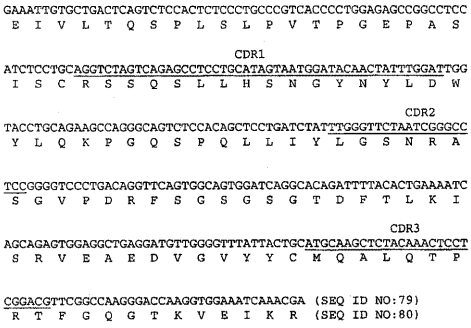
【図１８Ｂ】

抗体クローンT3F1の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTC
1      E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V

                                CDR1
61    TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATACTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
21     S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  T  I  S  W  V  R  Q  A

                                                CDR2
121   CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTAC
41     P  G  Q  G  L  E  W  M  G  G  I  I  P  I  F  G  T  A  N  Y

181   GCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
61     A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y

241   ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGGGGGATACG
81     M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  G  D  T

                        CDR3
301   GATAGTAGTGGTTATTACGGCGCGGTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTC
101    D  S  S  G  Y  Y  G  A  V  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V

361   TCAAGC (SEQ ID NO:77)
121    S  S  (SEQ ID NO:78)
```

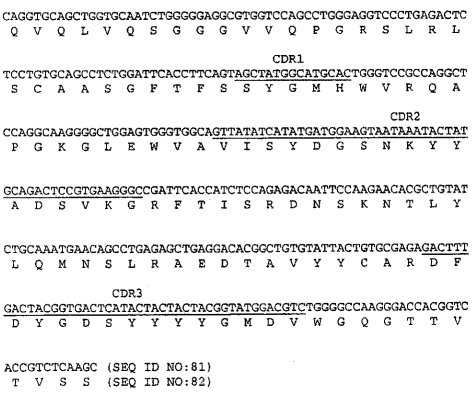
【図１９Ａ】

抗体クローンT3F2の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列



【図１９Ｂ】

抗体クローンT3F2の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

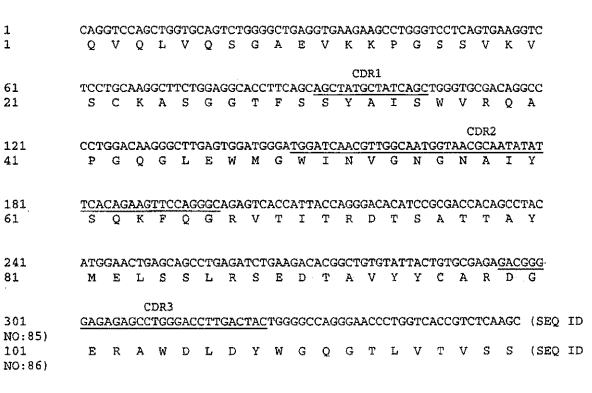


【図２０Ａ】

抗体クローン4A9の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

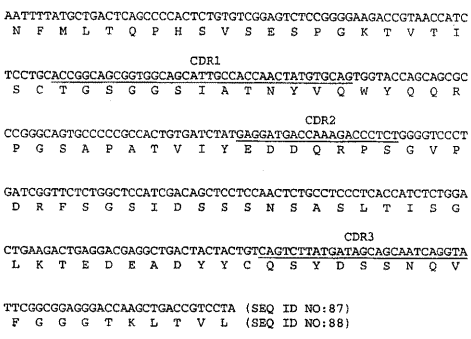
【図２０Ｂ】

抗体クローン4A9の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列



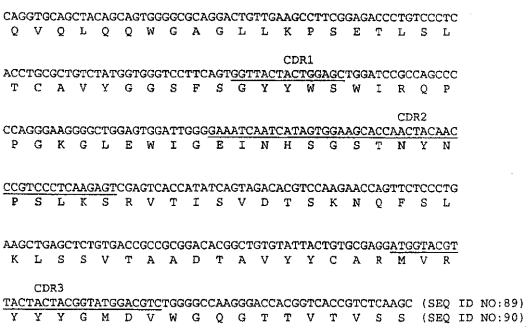
【図２１Ａ】

抗体クローン4B4の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列



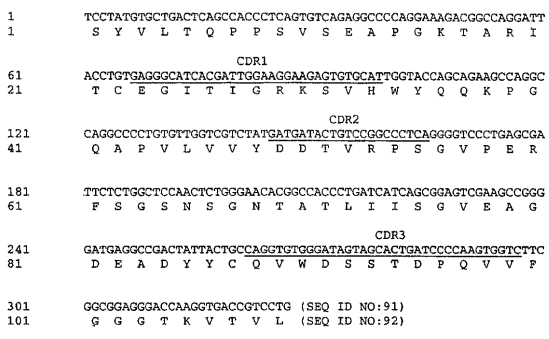
【図２１Ｂ】

抗体クローン4B4の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列



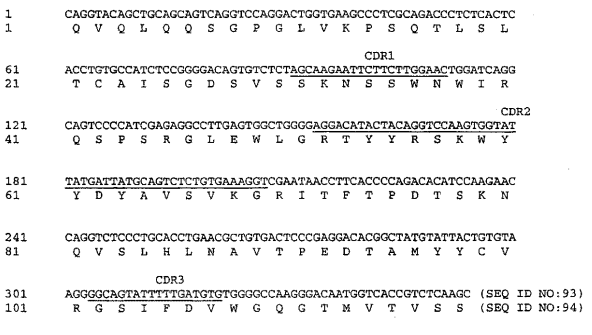
【図２２Ａ】

抗体クローン4C2の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列



【図２２Ｂ】

抗体クローン4C2の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列



【図２３Ａ】

抗体クローン4G9の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCATCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
1      D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  I  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T

                                CDR1
61    ATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGATTTGGTGATTACTTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCA
21     I  T  C  R  A  S  Q  R  F  G  D  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K  P

                                          CDR2
121   GGGCAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTTTGCAGAGTGGGGTCCCATCA
41     G  Q  A  P  K  L  L  I  Y  G  A  S  T  L  Q  S  G  V  P  S

181   AGGTTCAGCGGCAGTGGCTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGGCCTGCAGCCT
61     R  F  S  G  S  G  S  G  T  E  F  T  L  T  I  S  G  L  Q  P

                                          CDR3
241   GAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAGCAGGCTAACAGTTTCCCCATCACCTTCGGCAAA
81     E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  A  N  S  F  P  I  T  F  G  K

301   GGGACACGGCTGGACATCAGACGA (SEQ ID NO:95)
101    G  T  R  L  D  I  R  R  (SEQ ID NO:96)
```

【図２３Ｂ】

抗体クローン4G9の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGGTC
1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V

                                CDR1
61    TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
21     S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  A  I  S  W  V  R  Q  A

                                          CDR2
121   CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACGTTGGCAATGGTAACGCAATATAT
41     P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  N  V  G  N  G  N  A  I  Y

181   TCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGACCACAGCCTAC
61     S  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  R  D  T  S  A  T  T  A  Y

241   ATGGAACTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACGGG
81     M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  G

                CDR3
301   GAGAGAGCCTGGGACCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCAAGC (SEQ ID
NO:97)
101    E  R  A  W  D  L  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID
NO:98)
```

【図２４Ａ】

抗体クローン3A12の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                          CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  R  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                    CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  G  A  S  S  R  A  T  G  I  P

181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                    CDR3
241   CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCAAACACTTTTGGCCAG
81     P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  G  S  S  N  T  F  G  Q

301   GGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO:99)
101    G  T  K  L  E  I  K  R  (SEQ ID NO:100)
```

【図２４Ｂ】

抗体クローン3A12の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
1      Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L

                                CDR1
61    ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGC
21     T  C  T  V  S  G  G  S  I  S  S  S  S  Y  Y  W  G  W  I  R

                                              CDR2
121   CAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGTGGGAGCACCTAC
41     Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  S  I  Y  Y  S  G  S  T  Y

181   TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC
61     Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T  S  K  N  Q  F

241   TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGATCC
81     S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  S

                CDR3
301   AGGAGTGGGAGCTACCTCAATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
101    R  S  G  S  Y  L  N  D  A  F  D  I  W  G  Q  G  T  M  V  T

361   GTCTCAAGC (SEQ ID NO:101)
121    V  S  S  (SEQ ID NO:102)
```

【図２５Ａ】

抗体クローン3B1の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                          CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                    CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  G  A  S  S  R  A  T  G  I  P

181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                    CDR3
241   CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCATCGGGGACGTTCGGC
81     P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  G  S  S  S  G  T  F  G

301   CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:103)
101    Q  G  T  K  V  E  I  K  R  (SEQ ID NO:104)
```

【図２５Ｂ】

抗体クローン3B1の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTC
1      Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  S  S  V  K  V

                                CDR1
61    TCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCC
21     S  C  K  A  S  G  G  T  F  S  S  Y  A  I  S  W  V  R  Q  A

                                          CDR2
121   CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACTAC
41     P  G  Q  G  L  E  W  M  G  R  I  I  P  I  L  G  I  A  N  Y

181   GCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
61     A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y

241   ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGTTTC
81     M  E  L  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  G  F

                CDR3
301   CGTCCGTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCA
101    R  P  Y  Y  Y  Y  G  M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S

361   AGC (SEQ ID NO:105)
121    S  (SEQ ID NO:106)
```

【図２６Ａ】

抗体クローン3F5の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                          CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAGACCT
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  G  S  N  L  A  W  Y  Q  Q  R  P

                                    CDR2
121   GGCCAGGCTCCCAGCCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCGTCCCAGAC
41     G  Q  A  P  S  L  L  I  Y  G  A  S  S  R  A  T  G  V  P  D

181   AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT
61     R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E  P

                                    CDR3
241   GAAGATTTTGCTGTATATTACTGTCAGCAGTATGGTGACTCACCTCGCTTGTACACTTTT
81     E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  G  D  S  P  R  L  Y  T  F

301   GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO:107)
101    G  Q  G  T  K  L  E  I  K  R  (SEQ ID NO:108)
```

【図２６Ｂ】

抗体クローン3F5の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
1      Q  V  Q  L  Q  Q  W  G  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L  S  L

                          CDR1
61    ACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCC
21     T  C  A  V  Y  G  G  S  F  S  G  Y  Y  W  S  W  I  R  Q  P

                                              CDR2
121   CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAAC
41     P  G  K  G  L  E  W  I  G  E  I  N  H  S  G  S  T  N  Y  N

181   CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
61     P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T  S  K  N  Q  F  S  L

241   AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTGGCTTAC
81     K  L  S  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  V  A  Y

                CDR3
301   TATGATAGTAGTGGTTATTACCCCTATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG
101    Y  D  S  S  G  Y  Y  P  Y  D  A  F  D  I  W  G  Q  G  T  M

361   GTCACCGTCTCAAGC (SEQ ID NO:109)
121    V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:110)
```

【図２７Ａ】

抗体クローン3G3の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                          CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                    CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  G  A  S  S  R  A  T  G  I  P


181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                    CDR3
241   CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTACACTTTTGGC
81     P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  G  S  S  P  Y  T  F  G


301   CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO:111)
101    Q  G  T  K  L  E  I  K  R  (SEQ ID NO:112)
```

【図２７Ｂ】

抗体クローン3G3の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC
1      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  G  G  V  V  Q  P  G  R  S  L  R  L

                          CDR1
61    TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
21     S  C  A  A  S  G  F  T  F  S  S  Y  A  M  H  W  V  R  Q  A

                                    CDR2
121   CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT
41     P  G  K  G  L  E  W  V  A  V  I  S  Y  D  G  S  N  K  Y  Y


181   GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
61     A  D  S  V  K  G  R  F  T  I  S  R  D  N  S  K  N  T  L  Y


241   CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAATTA
81     L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  E  L

                          CDR3
301   CGATTTTTGGAGTGGTCCTCCGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
101    R  F  L  E  W  S  S  D  A  F  D  I  W  G  Q  G  T  M  V  T


361   GTCTCAAGC (SEQ ID NO:113)
121    V  S  S  (SEQ ID NO:114)
```

【図２８Ａ】

抗体クローン3H2の軽鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

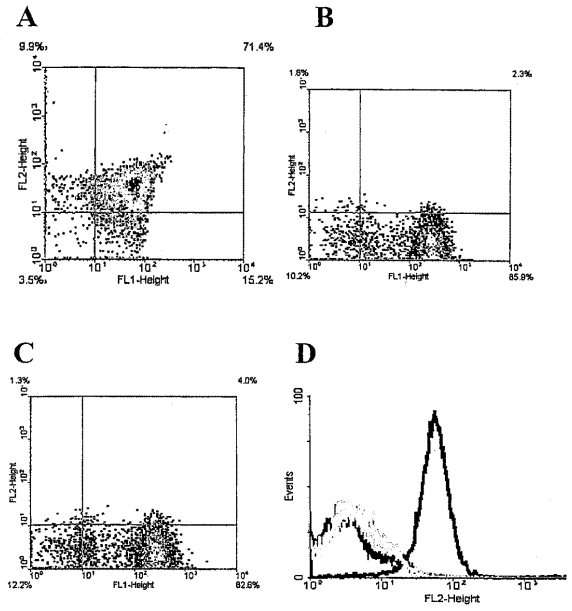
```
1     GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
1      E  T  T  L  T  Q  S  P  G  T  L  S  L  S  P  G  E  R  A  T

                          CDR1
61    CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTATTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA
21     L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K

                                    CDR2
121   CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGCGTCCCA
41     P  G  Q  A  P  R  L  L  I  Y  G  A  S  T  R  A  T  G  V  P


181   GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
61     D  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  R  L  E

                                    CDR3
241   CCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTACGGTACCTCACTTACGTGGACGTTC
81     P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  Q  Y  G  T  S  L  T  W  T  F


301   GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGA (SEQ ID NO:115)
101    G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R  (SEQ ID NO:116)
```

【図２８Ｂ】

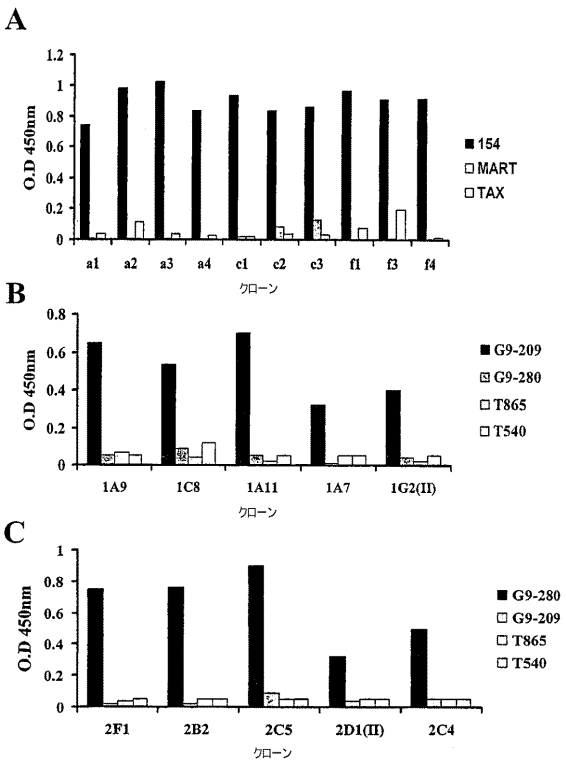
抗体クローン3H2の重鎖可変領域のヌクレオチド(上段)およびアミノ酸(下段)配列

```
1     CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
1      Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  V  K  P  S  E  T  L  S  L

                          CDR1
61    ACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGCCTGGATCCGC
21     T  C  T  V  S  G  G  S  I  S  S  S  S  Y  Y  W  A  W  I  R

                                    CDR2
121   CAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAAC
41     Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  E  I  N  H  S  G  S  T  N


181   TACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTC
61     Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D  T  S  K  N  Q  F


241   TCCCTGAATCTGAACTCTGTGACCGCCGCGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGTA
81     S  L  N  L  N  S  V  T  A  A  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  V

                          CDR3
301   GTAGCAGCAGCTGGTCACTACTACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACG
101    V  A  A  A  G  H  Y  Y  Y  Y  Y  M  D  V  W  G  K  G  T  T


361   GTCACCGTCTCAAGC (SEQ ID NO:117)
121    V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:118)
```

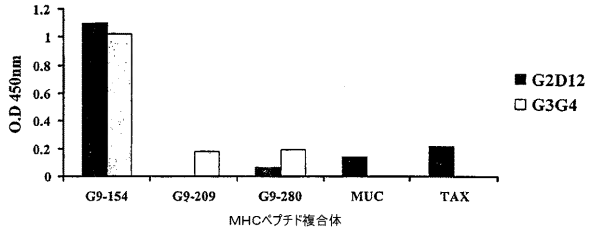
【図２９】



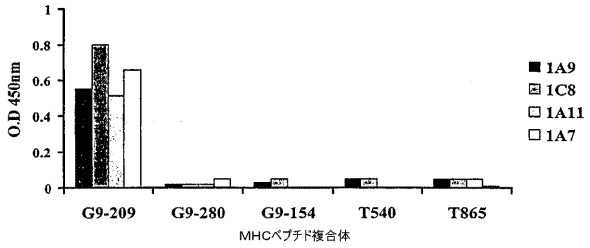
【図３０】



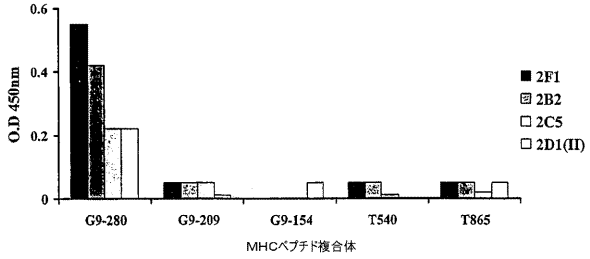
【図３１Ａ】



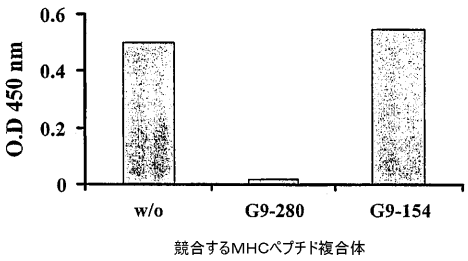
【図３１Ｂ】



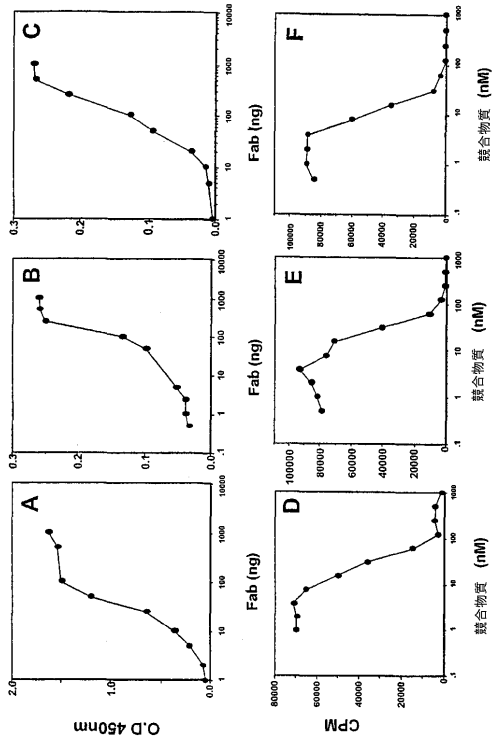
【図３１Ｃ】



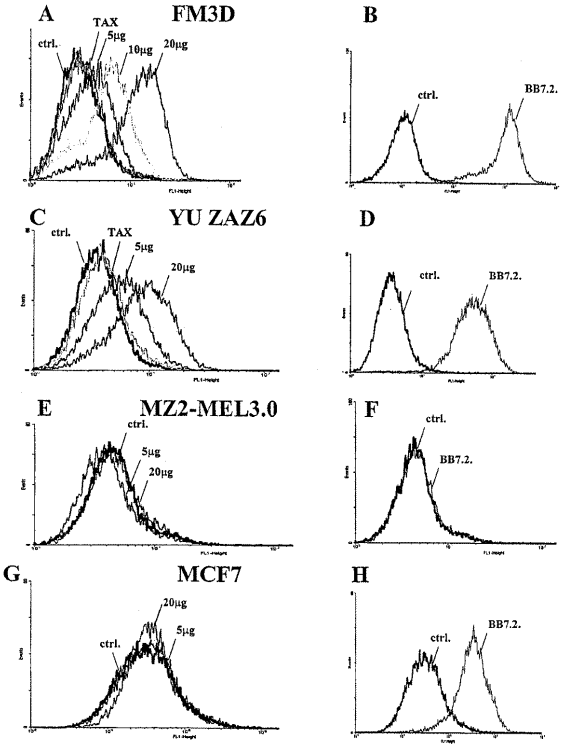
【図３１Ｄ】



【図３２】



【図３３】



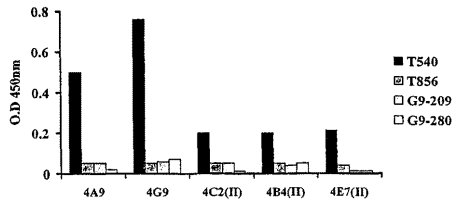
【図３４】

A

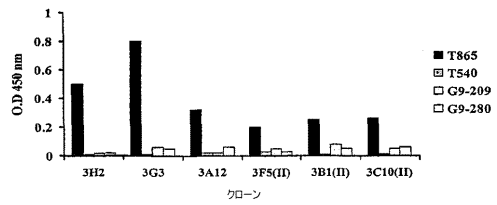
TCR様特異性を有する組換えFab抗体の選択

サイクル NO.	ファージ 入力	ファージ 出力	比(O/I)	濃縮	MHCペプチド結合剤	TCR様結合体	フィンガーパターン
A. T540							
1	$6x10^{13}$	$1x10^{7}$	$2x10^{7}$				
2	$5x10^{12}$	$1x10^{7}$	$3x10^{6}$		23/94 (24%)	13/94 (14%)	2
3	$1x10^{13}$	$1x10^{10}$	$9x10^{4}$	1200	60/94 (64%)	41/94 (44%)	3
B. T865							
1	$6x10^{13}$	$2x10^{7}$	$3x10^{7}$				
2	$8x10^{12}$	$1x10^{7}$	$2x10^{6}$		17/94 (18%)	5/94 (5%)	3
3	$4x10^{12}$	$6x10^{9}$	$2x10^{3}$	600	58/94 (62%)	21/94 (22%)	3

B

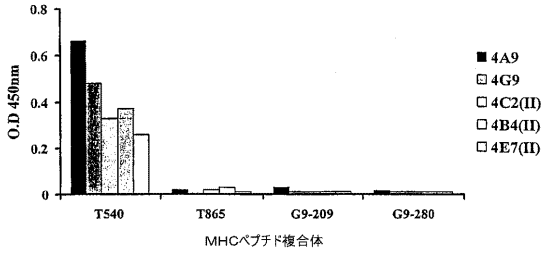


C

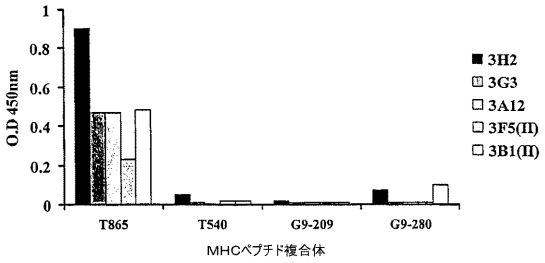


【図３５】

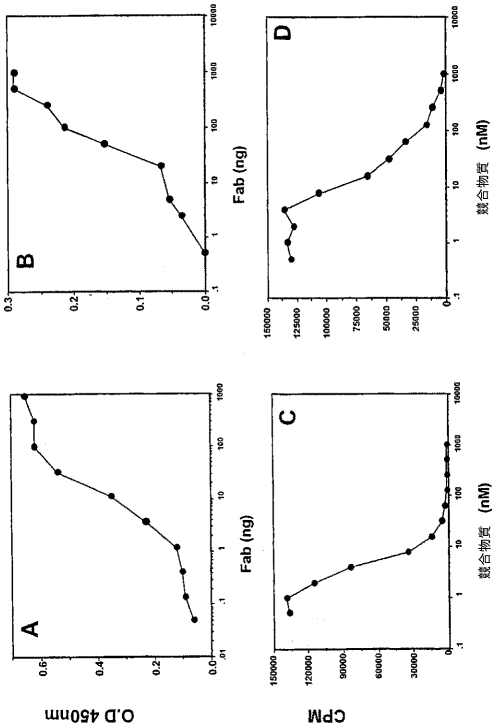
A



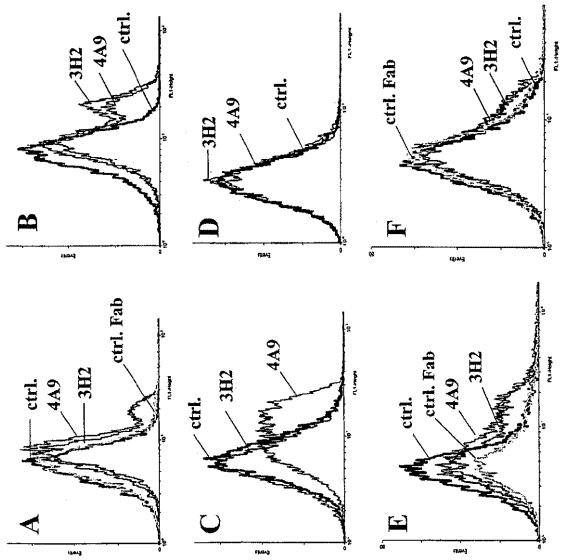
B



【図３６】



【図３７】

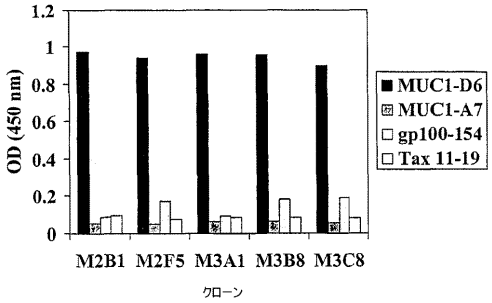


【図３８】

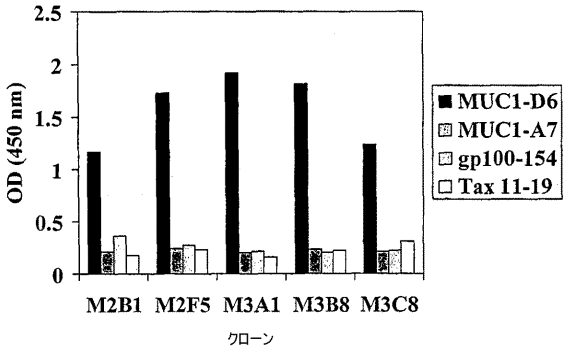
A. MUC1－D6ペプチドに対してTCR様特異性を有する組換えFab抗体の選択

パニング サイクル	ファージ 入力	ファージ 出力	比(O／I)	濃縮	MHCペプチド 結合体	TCR 様結合体	フィンガー パターン
1	$7.2x10^{12}$	$5.4x10^{5}$	$7.5\ 10^{-8}$	-	-	-	-
2	$5x10^{13}$	$3x10^{7}$	$6x10^{-7}$	55	46/90 (51%)	41/90 (45%)	8
3	$4.9x10^{13}$	$1.7x10^{10}$	$3.5x10^{-4}$	580	76/90 (84 %)	72/90 (80%)	16

B.

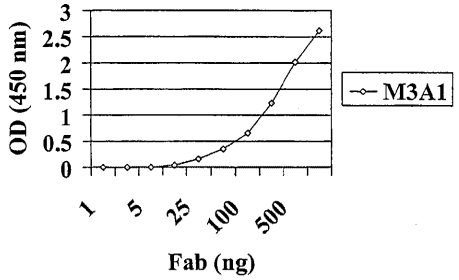


【図３９】

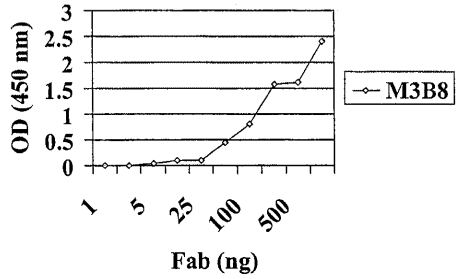


【図４０】

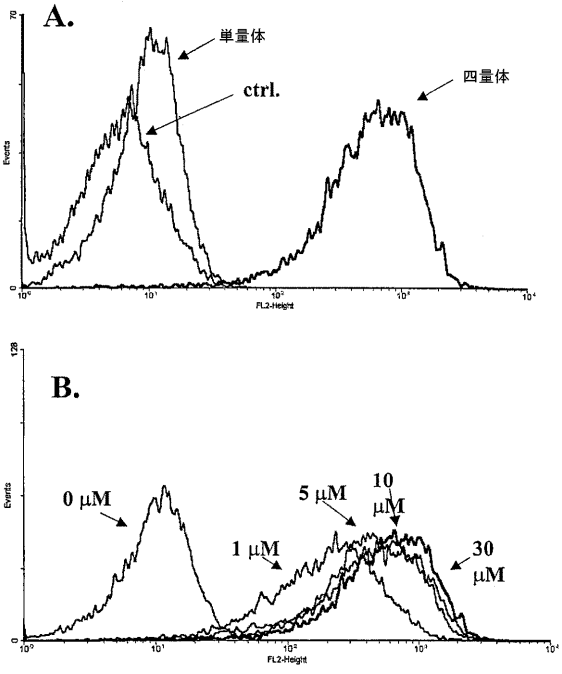
A.



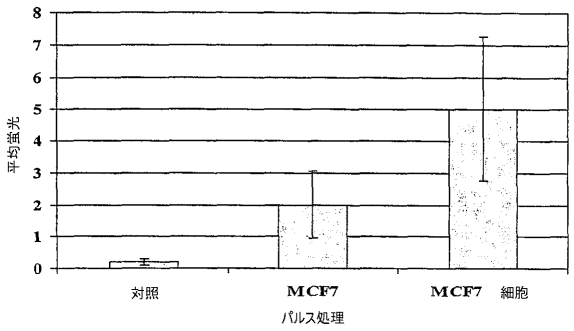
B.



【図４１】



【図４２】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/05128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 31/00, 39/00, 39/395; G01N 33/53; C07K 16/00, 17/00; C12P 21/00, 21/08; A01K 67/00
US CL : 424/130.1, 141.1, 178.1; 435/7.1, 70.21, 243, 325; 514/2; 530/387.1, 388.1, 391.3; 536/23, 53; 800/8
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)
U.S. : 424/130.1, 141.1, 178.1; 435/7.1, 70.21, 243, 325; 514/2; 530/387.1, 388.1, 391.3; 536/23, 53; 800/8

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
SEQ ID NO: 1-5 and 121 against protein databases A_Geneseq_101002, PIR_73, Swiss Prot_40

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REITER et al. Peptide-specific killing of antigen-presenting cells by a recombinant antibody-toxin fusion protein targeted to major histocompatibility complex/peptide class I complexes with T cell receptor-like specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. April 1997, Vol. 94, pages 4631-4636, entire article, especially abstract.	1-60
Y	WO 97/02342 A1 (KOBEN-HAVENS UNIVERSITET) 23 January 1997 (23.01.1997), entire document.	1-60
Y	LEV et al. Isolation and Characterization of Human Recombinant Antibodies Endowed with the Antigen-specific, Major Histocompatibility Complex-restricted Specificity of T Cells Directed toward the Widely Expressed Tumor T-cell Epitopes of the Telomerase Catalytic Subunit. CANCER RESEARCH. 01 June 2002, Vol. 62, pages 3184-3194, entire article, especially abstract.	1-60

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family 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 application or patent 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
23 June 2003 (23.06.2003)

Date of mailing of the international search report
24 FEB 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer
Marianne DiBrino, Ph.D.

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/05128

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN(EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, SCISEARCH, USPATFUL)
search terms: Inventor's names, mhc-peptide specific, antibodies, hla, mhc, peptide, the mAb names in Tables 2, 3 and 4 of the description, G9-209, G9-208, G9-154, T540, T865.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 37/04	Ａ６１Ｐ 37/04		
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ｃ０７Ｋ 14/47		
Ｃ０７Ｋ 16/46	Ｃ０７Ｋ 16/46		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ａ６１Ｋ 49/02	Ａ	
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｂ	
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,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,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100085176
弁理士 加藤 伸晃
(74)代理人 100106703
弁理士 産形 和央
(74)代理人 100096943
弁理士 臼井 伸一
(74)代理人 100091889
弁理士 藤野 育男
(74)代理人 100101498
弁理士 越智 隆夫
(74)代理人 100096688
弁理士 本宮 照久
(74)代理人 100102808
弁理士 高梨 憲通
(74)代理人 100128646
弁理士 小林 恒夫
(74)代理人 100128668
弁理士 齋藤 正巳
(72)発明者 ホーゲンブーム， ヘンリカス， レネラス， ヤコブス， マテュー
オランダ エヌエル－６２１４ アエ マースリヒト，ヘルトグシンゲル ４６
(72)発明者 レイター，ヨラム
イスラエル ３４７９０ ハイファ，ハサークラヴ ストリート ２０

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA03 CA05 DA03 DA06 EA03 HA17
4B064 AG01 CA19 CC24 CE06 DA01 DA13
4B065 AA26X AA94Y AB01 BA02 CA24 CA44
4C085 AA34 AA35 BB01 BB41 BB42 CC22 CC24 DD62 HH03 HH07
HH11 KA05 KA27 KA28 KA29 KB82 LL18

4H045 AA10 AA30 BA10 CA42 DA75 EA20 FA74

专利名称(译)	MHC-肽复合物结合配体		
公开(公告)号	JP2005533486A	公开(公告)日	2005-11-10
申请号	JP2003569659	申请日	2003-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	戴埃克斯有限公司 Technion工业的研究和开发公约下降彪基金有限公司		
申请(专利权)人(译)	模具斧，合作社 Technion工业研究＆D公约下降彪基金有限公司		
[标]发明人	ホーゲンブームヘンリカスレネラスヤコブスマテュー レイターヨラム		
发明人	ホーゲンブーム, ヘンリカス, レネラス, ヤコブス, マテュー レイター,ヨラム		
IPC分类号	A01K67/027 A61K39/395 A61K49/00 A61K51/00 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/47 C07K16/28 C07K16/40 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/2896 A61K2039/505 C07K16/2833 C07K16/40 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/55		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/395.Y A61K49/00.A A61K49/00.C A61P35/00 A61P37/04 C07K14/47 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D A61K49/02.A C12N5/00.B C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA05 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/HA17 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE06 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4C085/AA34 4C085/AA35 4C085/BB01 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/CC22 4C085/CC24 4C085/DD62 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/KA05 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	臼井伸一 藤野郁夫 小林恒夫		
优先权	60/358994 2002-02-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

包含免疫球蛋白重链可变区（VH）和免疫球蛋白轻链可变区（VL）的蛋白质配体，其中蛋白质基本上在不存在结合肽的情况下与包含MHC和肽的复合物结合。公开了蛋白质配体，其不与MHC结合并且在不存在MHC的情况下基本上不与肽结合，该肽是gp100，MUC1，TAX或hTERT的肽片段。还公开了使用这种配体的方法，鉴定方法。

表3

抗体名	認識されたMHC結合ペプチド	核酸配列 SEQ ID NO:		アミノ酸配列 SEQ ID NO:	
		軽鎖	重鎖	軽鎖	重鎖
4A9	T540	83	85	84	86
4B4	T540	87	89	88	90
4C2	T540	91	93	92	94
4G9	T540	95	97	96	98
3A12	T865	99	101	100	102
3B1	T865	103	105	104	106
3F5	T865	107	109	108	110
3G3	T865	111	113	112	114
3H2	T865	115	117	116	118