

(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2005-521389

(P2005-521389A)

(43) 公表日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B 0 6 3
A 6 1 P 31/12	A 6 1 K 39/395	4 B 0 6 4
A 6 1 P 37/02	A 6 1 K 39/395	4 C 0 8 5
C 0 7 K 7/06	A 6 1 K 39/395	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-567383 (P2003-567383)	(71) 出願人	504127647
(86) (22) 出願日	平成15年2月11日 (2003. 2. 11)		テクニオン リサーチ アンド ディベロ ップメント ファウンデーション リミテ ッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月27日 (2004. 8. 27)		イスラエル国、ハイファ 32000、テ クニオン シティ、 セネート ハウス
(86) 国際出願番号	PCT/IL2003/000105	(74) 代理人	100103816
(87) 国際公開番号	W02003/068201		弁理士 風早 信昭
(87) 国際公開日	平成15年8月21日 (2003. 8. 21)	(74) 代理人	100120927
(31) 優先権主張番号	10/073, 301		弁理士 浅野 典子
(32) 優先日	平成14年2月13日 (2002. 2. 13)	(72) 発明者	レイテル, ヨラム
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イスラエル, 34 790 ハイファ, ハシャーラヴ ストリート 20
		最終頁に続く	

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

(57) 【要約】

H L A拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I と 2 0 ナノモル未満、好ましくは 1 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含み、任意選択的に抗体に抱合する同定可能なまたは治療部分をさらに含む単離分子。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H L A 拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む単離分子。

【請求項 2】

前記 M H C クラス I 分子は、H L A - A 2、H L A - A 1、H L A - A 3、H L A - A 2 4、H L A - A 2 8、H L A - A 3 1、H L A - A 3 3、H L A - A 3 4、H L A - B 7、H L A - B 4 5、および H L A - C w 8 からなる群から選択される請求項 1 記載の単離分子。

【請求項 3】

前記抗体に抱合する同定可能な部分をさらに含む請求項 1 記載の単離分子。

【請求項 4】

前記同定可能部分は、結合対のメンバーおよび標識からなる群から選択される請求項 3 記載の単離分子。

【請求項 5】

前記結合対の前記メンバーが抗原である請求項 3 記載の単離分子。

【請求項 6】

前記標識は、蛍光タンパク質および酵素からなる群から選択される請求項 3 記載の単離分子。

【請求項 7】

前記抗体に抱合する治療部分をさらに含む請求項 1 記載の単離分子。

【請求項 8】

前記治療部分は、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、および二重特異性抗体部分からなる群から選択される請求項 7 記載の単離分子。

【請求項 9】

前記 H L A 拘束性抗原が腫瘍 H L A 拘束性抗原である請求項 1 記載の単離分子。

【請求項 10】

前記 H L A 拘束性抗原がウイルス H L A 拘束性抗原である請求項 1 記載の単離分子。

【請求項 11】

前記 H L A 拘束性抗原が自己免疫 H L A 拘束性抗原である請求項 1 記載の単離分子。

【請求項 12】

H L A 拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む治療有効量の分子を含む薬学的組成物であって、前記分子は前記抗体に抱合する治療部分をさらに含む薬学的組成物。

【請求項 13】

薬学的に許容可能なキャリアをさらに含む請求項 12 記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

前記 M H C クラス I 分子は、H L A - A 2、H L A - A 1、H L A - A 3、H L A - A 2 4、H L A - A 2 8、H L A - A 3 1、H L A - A 3 3、H L A - A 3 4、H L A - B 7、H L A - B 4 5、および H L A - C w 8 からなる群から選択される請求項 12 記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

前記治療部分は、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、および二重特異性抗体部分からなる群から選択される請求項 12 記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記 H L A 拘束性抗原が腫瘍 H L A 拘束性抗原である請求項 12 記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

前記 H L A 拘束性抗原がウイルス H L A 拘束性抗原である請求項 12 記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

前記HLA拘束性抗原が自己免疫HLA拘束性抗原である請求項12記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

HLA拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む分子を含む診断組成物であって、前記分子は前記抗体に抱合した同定可能部分をさらに含む診断組成物。

【請求項 20】

前記MHCクラスI分子は、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45、およびHLA-Cw8からなる群から選択される請求項19記載の診断組成物。 10

【請求項 21】

前記同定可能部分は、結合対のメンバーおよび標識からなる群から選択される請求項19記載の診断組成物。

【請求項 22】

前記結合対の前記メンバーが抗原である請求項19記載の診断組成物。

【請求項 23】

前記標識は、蛍光タンパク質および酵素からなる群から選択される請求項19記載の診断組成物。 20

【請求項 24】

前記HLA拘束性抗原が腫瘍HLA拘束性抗原である請求項19記載の診断組成物。

【請求項 25】

前記HLA拘束性抗原がウイルスHLA拘束性抗原である請求項19記載の診断組成物。

【請求項 26】

前記HLA拘束性抗原が自己免疫HLA拘束性抗原である請求項19記載の診断組成物。

【請求項 27】

HLA拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第1のポリヌクレオチドを含む単離分子。 30

【請求項 28】

前記MHCクラスI分子は、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45、およびHLA-Cw8からなる群から選択される請求項27記載の単離分子。

【請求項 29】

前記第1のポリヌクレオチドに連結し、同定可能部分をコードする第2のポリヌクレオチドをさらに含む請求項27記載の単離分子。 40

【請求項 30】

前記同定可能部分は、結合対のメンバーおよび標識からなる群から選択される請求項29記載の単離分子。

【請求項 31】

前記結合対の前記メンバーが抗原である請求項29記載の単離分子。

【請求項 32】

前記標識は、蛍光タンパク質および酵素からなる群から選択される請求項29記載の単離分子。

【請求項 33】

前記第1のポリヌクレオチドに連結し、治療部分をコードする第2のポリヌクレオチド 50

をさらに含む請求項 27 記載の単離分子。

【請求項 34】

前記治療部分は、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、および二重特異性抗体部分からなる群から選択される請求項 33 記載の単離分子。

【請求項 35】

前記 H L A 拘束性抗原が腫瘍 H L A 拘束性抗原である請求項 27 記載の単離分子。

【請求項 36】

前記 H L A 拘束性抗原がウイルス H L A 拘束性抗原である請求項 27 記載の単離分子。

【請求項 37】

前記 H L A 拘束性抗原が自己免疫 H L A 拘束性抗原である請求項 27 記載の単離分子。 10

【請求項 38】

以下の工程を含む、H L A 拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体の産生方法：

前記ヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I を発現する細胞を有する遺伝子操作された非ヒト哺乳動物を前記 H L A 拘束性抗原と複合体形成された可溶性形態の M H C クラス I 分子で免疫化する工程と、

前記非ヒト哺乳動物の抗体産生細胞から m R N A 分子を単離する工程と、

前記 m R N A 分子によってコードされるタンパク質分子をディスプレイするファージディスプレイライブラリーを産生する工程と、 20

前記ファージディスプレイライブラリーから少なくとも 1 つのファージを単離する工程であって、前記少なくとも 1 つのファージが前記 H L A 拘束性抗原と複合体形成した前記ヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I と 10 ナノモル未満の前記結合親和性で特異的に結合することができる前記抗体をディスプレイする工程。

【請求項 39】

前記非ヒト哺乳動物が自己 M H C クラス I 分子を欠く請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

前記 M H C クラス I 分子は、H L A - A 2、H L A - A 1、H L A - A 3、H L A - A 2 4、H L A - A 2 8、H L A - A 3 1、H L A - A 3 3、H L A - A 3 4、H L A - B 7、H L A - B 4 5、および H L A - C w 8 からなる群から選択される請求項 38 記載の方法。 30

【請求項 41】

前記 H L A 拘束性抗原が腫瘍 H L A 拘束性抗原である請求項 38 記載の方法。

【請求項 42】

前記 H L A 拘束性抗原がウイルス H L A 拘束性抗原である請求項 38 記載の方法。

【請求項 43】

前記 H L A 拘束性抗原が自己免疫 H L A 拘束性抗原である請求項 38 記載の方法。

【請求項 44】

前記可溶性形態の M H C クラス I 分子が、機能的ヒト M H C クラス I 重鎖アミノ酸配列に直接または間接的に共有結合した機能的ヒト β - 2 ミクログロブリンアミノ酸配列を含む単鎖 M H C クラス I ポリペプチドである請求項 38 記載の方法。 40

【請求項 45】

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

【請求項 46】

前記 M H C クラス I 分子は、H L A - A 2、H L A - A 1、H L A - A 3、H L A - A 2 4、H L A - A 2 8、H L A - A 3 1、H L A - A 3 3、H L A - A 3 4、H L A - B 50

7、H L A－B 4 5、およびH L A－C w 8からなる群から選択される請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

前記治療部分は、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、および二重特異性抗体部分からなる群から選択される請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 8】

ウイルス感染の治療方法であって、前記ウイルス感染に起因するウイルスを特徴付けるウイルスH L A拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（M H C）クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む治療有効量の分子を必要とする被験体に投与する工程と、前記分子が抗体に抱合した治療部分をさらに含み、被験体の内因性M H Cクラス I と適合する前記M H Cクラス I 分子が選択されることとを含む、ウイルス感染の治療方法。 10

【請求項 4 9】

前記M H Cクラス I 分子は、H L A－A 2、H L A－A 1、H L A－A 3、H L A－A 2 4、H L A－A 2 8、H L A－A 3 1、H L A－A 3 3、H L A－A 3 4、H L A－B 7、H L A－B 4 5、およびH L A－C w 8からなる群から選択される請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

前記治療部分は、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、および二重特異性抗体部分からなる群から選択される請求項 4 8 記載の方法。 20

【請求項 5 1】

自己免疫疾患の治療方法であって、自己免疫H L A拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（M H C）クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む治療有効量の分子を必要とする被験体に投与する工程と、前記分子が前記抗体に抱合した治療部分をさらに含み、被験体の内因性M H Cクラス I と適合する前記M H Cクラス I 分子が選択されることとを含む、自己免疫疾患の治療方法。

【請求項 5 2】

前記M H Cクラス I 分子は、H L A－A 2、H L A－A 1、H L A－A 3、H L A－A 2 4、H L A－A 2 8、H L A－A 3 1、H L A－A 3 3、H L A－A 3 4、H L A－B 7、H L A－B 4 5、およびH L A－C w 8からなる群から選択される請求項 5 1 記載の方法。 30

【請求項 5 3】

前記治療部分は、細胞傷害性部分、毒性部分、サイトカイン部分、および二重特異性抗体部分からなる群から選択される請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 4】

免疫毒素の作製方法であって、H L A拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（M H C）クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレーションで毒素部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて前記免疫毒素を得る工程とを含む、免疫毒素の作製方法。 40

【請求項 5 5】

前記H L A拘束性抗原は、腫瘍H L A拘束性抗原、ウイルスH L A拘束性抗原、および自己免疫H L A拘束性抗原からなる群から選択される請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

免疫標識の作製方法であって、H L A拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（M H C）クラス I と 2 0 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレーションで同定可能な部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて前記 50

免疫標識を得る工程とを含む、免疫標識の作製方法。

【請求項 57】

前記 H L A 拘束性抗原は、腫瘍 H L A 拘束性抗原、ウイルス H L A 拘束性抗原、および自己免疫 H L A 拘束性抗原からなる群から選択される請求項 56 記載の方法。

【請求項 58】

免疫標識の作製方法であって、H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレーションで同定可能な部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて前記免疫標識を得る工程とを含む、免疫標識の作製方法。

10

【請求項 59】

前記 H L A 拘束性抗原は、腫瘍 H L A 拘束性抗原、ウイルス H L A 拘束性抗原、および自己免疫 H L A 拘束性抗原からなる群から選択される請求項 54 記載の方法。

【請求項 60】

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

前記サンプルの細胞を H L A 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体と相互作用させる工程と、

20

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

【請求項 61】

前記 H L A 拘束性抗原は、腫瘍 H L A 拘束性抗原、ウイルス H L A 拘束性抗原、および自己免疫 H L A 拘束性抗原からなる群から選択される請求項 60 記載の方法。

【請求項 62】

配列番号 8 に記載のポリヌクレオチドを含む単離核酸。

【請求項 63】

配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を含む単離タンパク質。

【請求項 64】

配列番号 9 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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

【背景技術】

【0002】

40

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

【0003】

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

50

ーチが開発されている（7，10，11）。

【0004】

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

【0005】

1つの有望なアプローチは、TCRと同一の特異性を有する癌細胞表面で発現するMHC-ペプチド複合体に結合する組換え抗体を作製することである。その後、これらの固有の抗体を、放射性同位体、細胞傷害薬、または毒素などの細胞傷害性エフェクター部分で武装することができる。例えば、癌細胞をターゲティングする抗体を、植物および細菌の両方由来の強力な毒素と遺伝的に融合し、それにより、組換え免疫毒素と呼ばれる分子を作製した（12）。

【0006】

T細胞のMHC拘束性特異性を有する抗体は稀であり、B細胞は自己MHC拘束性を教育されないので従来のハイブリドーマ技術による作製が困難であった（13～16）。抗体ファージディスプレイテクノロジーの利点により、非常に定義されたエピトープに対する固有且つ稀な抗体のための巨大な抗体レパートリーを選択することも可能となる。ウイルスエピトープと複合体形成したマウスクラスⅠ MHC H-2K^kに対するTCR様拘束性抗体のファージディスプレイによる単離能力によってこれが証明された（17）。明らかに、マウスMHCに指向するこの抗体は、ヒトの治療および診断で役に立たない。今までのところ、このグループによるヒトクラスⅠ MHCに対するTCR様拘束性抗体を開発する試みは失敗に終わっている。より最近では、HLA-A1との複合体における黒色腫抗原MAGE-A1と反応性を示す抗体が単離された；しかし、この抗体の親和性は低く、可溶性抗体としてではなくファージ上の多量体形態で発現した場合のみでこれを使用して抗原提示細胞の表面上で特異的複合体を検出することができる（18）。

【0007】

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

【発明の開示】

【0008】

近年、多数の癌関連、ウイルス、および自己免疫関連MHC拘束性ペプチドが単離され、この高度に拘束された優れた特異性のために、これらは免疫療法および免疫診断における新規のアプローチのための望ましい標的である。T細胞抗原受容体と同一の特異性を有する癌関連、ウイルス、および自己免疫関連MHC-ペプチド複合体を認識することができる抗体は、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、および自己免疫関連細胞による抗原提示の研究、このような細胞上でのMHC-ペプチド複合体の視覚化、ならびに最終的に癌、ウイルス、および自己免疫の免疫療法および免疫診断のための新規のターゲティング薬の開発のための有益な試薬である。

【0009】

本発明の実施およびこのような固有の優れた特異性を有する例示的分子の作製のために、HLA-A2トランスジェニックマウスを、黒色腫分化抗原gp100由来の共通の抗原T細胞HLA-A2拘束性エピトープと複合体形成した可溶性単鎖HLA-A2で免疫化した。ファージディスプレイを使用して、gp100由来エピトープに対して特徴的なTCR様結合特異性を示すが、TCRと異なってナノモル範囲で親和性を示す高親和性組換えscFv抗体を単離した。TCR様抗体は、抗原提示細胞表面上に発現した天然のMHC-ペプチド複合体を認識する。さらに、切断細菌毒素形態の非常に強力な細胞傷害性

10

20

30

40

50

エフェクター分子に融合する場合、ペプチド依存性様式でT C R様特異性を有する抗原提示細胞を特異的に死滅させることができた。これらの結果は、最初に、ヒト癌T細胞エピトープに指向するT細胞の抗原特異的M H C拘束性特異性を有する高親和性ヒト組換え抗体を単離する能力を証明する。選択されたT C R様抗体は、腫瘍細胞表面上の特異的M H C－ペプチド複合体、抗原を提示する他の細胞、およびリンパ様組織の発現のモニタリングおよび視覚化ならびに免疫療法用の新規のターゲティング薬ファミリーの開発に有用である。

【0010】

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

【0011】

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

【0012】

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

【0013】

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

【0014】

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

【0015】

本発明のさらに別の態様によれば、H L A拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体(M H C)クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む分子を含み、前記分子は前記抗体に抱合した同定可能部分をさらに含む診断組成物を提供する。 30

【0016】

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

【0017】

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

【0018】

下記の本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、単離分子は、第1のポリヌクレオチドに連結し、治療部分をコードする第2のポリヌクレオチドをさらに含む。 40

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

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

【0022】

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

【0023】

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

10

【0024】

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

20

【0025】

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

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

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

30

【0029】

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

40

【0030】

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

【0031】

本発明のなおさらなる態様によれば、自己免疫 HLA 拘束性抗原と複合体形成されたヒ

50

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

【0032】

下記の本発明の好ましい実施形態におけるさらなる特徴によれば、MHCクラスⅠ分子は、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45、およびHLA-Cw8からなる群から選択される。

10

【0033】

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

【0034】

本発明の別の態様によれば、HLA拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅠと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第1のポリヌクレオチドをインフレイムで毒素部分をコードする第2のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて免疫毒素を得る工程とを含む、免疫毒素の作製方法を提供する。

20

【0035】

本発明の別の態様によれば、HLA拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅠと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第1のポリヌクレオチドをインフレイムで同定可能な部分をコードする第2のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて免疫標識を得る工程とを含む、免疫標識の作製方法を提供する。

【0036】

本発明の別の態様によれば、サンプルの細胞をHLA拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅠと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体と相互作用させる工程と、相互作用をモニタリングしてHLA拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および／またはレベルを検出する工程とを含む、細胞サンプル中のHLA拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および／またはレベルの検出方法を提供する。

30

【0037】

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

【0038】

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

40

【0039】

図面の簡単な記述

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

50

することができるのかが当業者に明らかとなる。

図面において、

図1 A-Bは組換え s c H L A-A 2-ペプチド複合体に対するポリクローナルファージ E L I S Aを示す棒グラフを示す。プレートに、以下の実施例に記載の表示の s c M H C-ペプチド複合体でコートする。最初のライブラリーのポリクローナルファージ集団 (L) または各パニングラウンド後に溶出したファージ (I-I V) の結合を示す。図1 A-p C A N T A B s c F vライブラリー由来のファージ; 図1 B-s c F v-C B Dライブラリー由来のファージ。ビオチン化 s c M H C-ペプチド複合体を使用した E L I S Aによって結合特異性研究を行った。E L I S Aプレート (F a l c o n) に、B S A-ビオチン (1 μ g/ウェル) で一晩コートし、洗浄し、ストレプトアビジン (1 μ g/ウェル) とインキュベートし (室温で1時間)、再度十分に洗浄し、0.5 μ gのM H C/ペプチド複合体とさらにインキュベートした (室温で1時間)。プレートをP B S/2% ミルクでブロックし (室温で30分間)、ファージクローン (約10⁹ 以下のファージ/ウェル、室温で1時間) または0.5~1 μ gの可溶性 s c F vまたは s c F v-P E 38とインキュベートし、その後1000倍希釈のH R P抱合/抗M 13、抗m y c抗体、または抗P E抗体でそれぞれ洗浄した。特異性研究のために使用したH L A-A 2拘束性ペプチドは、g p 100 (154): K T W G Q Y W Q V (配列番号1); g p 100 (209): I M D Q V P F S V (配列番号2); g p 100 (280): Y L E P G P V T V (配列番号3); M U C 1: L L L T V L T V L (配列番号4); H T L V-1 (T A X): L L F G Y P V Y V (配列番号5); h T E R T (540): I L A K F L H W L (配列番号6); h T E R T (865): R L V D D F L L V (配列番号7)である。

図2 A-Bは s c H L A-A 2/g p 100複合体へのモノクローナルファージクローンの異なる結合を示す棒グラフを示す。g p 100由来エピトープと複合体形成した固定化 s c H L A-A 2への結合についてモノクローナルファージを試験した。図2 A-G 9-209M; 図2 B-G 9-280V。上記図1に記載のようにアッセイを行った。

図3 Aは抗体G 1 s c F vの核酸配列 (配列番号8) およびアミノ酸配列 (配列番号9) を示す。C D Rを太字で示し、V HおよびV Lドメインに連結したペプチドリンカーに下線を引いている。

図3 B-Cは精製G 1 s c F vおよびG 1 s c F v-P E 38のS D S-P A G Eを示す。G 1 s c F v遺伝子を、P C Rによってファージクローンからレスキューし、S f i I-N o t Iクローニング部位を介してファージミドベクターp C A N T A B 6にサブクローニングした。M y cおよびヘキサヒスチジンタグを、s c F v遺伝子のC末端に融合した。以前に記載のように (29) B L 21 λ D E 3細胞中でs c F v抗体を発現させ、金属イオンアフィニティクロマトグラフィによってペリプラズム画分から精製した。G 1 s c F v-P E 38融合タンパク質の発現のために、s c F v遺伝子をN c o I-N o t IフラグメントとしてP Eの転位およびA D P-リボシル化ドメイン (P E 38) をコードするプラスミドp I B-N Nにサブクローニングした。B L 21 λ D E 3細胞での発現、封入体からの再折りたたみ、およびG 1 s c F v-P E 38の精製を、以前に記載のように行った (30)。

図4はG 1 s c F v-P E 38の結合特異性を示す棒グラフである。免疫プレートに、記載のように種々の表示の s c H L A-A 2-ペプチド複合体でコートし、固定化複合体へのG 1 s c F v-P E 38の結合を、抗P E抗体を使用して検出した。

図5 A-BはT C R様G 1 s c F vの結合特性を証明するプロットを示す。5 A-精製された可溶性G 1 s c F vの滴定E L I S A。ウェルに以下の1実施例に記載のM H C-ペプチド複合体をコートした。5 B-精製されたG 1 s c F v-P E 38のH L A-A 2/G 9-209M複合体への125I標識G 1 s c F v-P E 38の結合を阻害する能力の競合結合分析。組換え s c F vの見かけ上の結合親和性を、¹²⁵I標識トレースの結合の50%阻害に必要な競合物質 (可溶性精製G 1 s c F v-P E 38) の濃度として決定した。可撓性E L I S AプレートにB S A-ビオチンをコートし、s c M H C-ペプチド複合体 (100 μ l中10 μ g) を以前に記載のように固定した。組換えG

1 s c F v - P E 3 8 を、B o l t o n - H u n t e r 試薬を使用して $[^{125}\text{I}]$ で標識した。標識タンパク質を、競合物質として漸増濃度の冷 G 1 s c F v - P E 3 8 の存在下でトレーサーとしてウェルに添加し ($3 \sim 5 \times 10^5$ C P M / ウェル)、P B S 中にて室温で1時間インキュベートした。プレートを P B S で完全に洗浄し、結合放射能を γ カウンターで決定した。G 1 s c F v - P E 3 8 の見かけ上の親和性を、固定 s c M H C - ペプチド複合体への $[^{125}\text{I}]$ 標識 G 1 s c F v - P E 3 8 結合の 50 % 阻害の達成に必要な競合物質濃度の推定によって決定した。非特異的結合を、20 ~ 40 倍過剰の非標識 F a b の添加によって決定した。

図 6 A - C は G 1 s c F v の A P C への結合を証明するプロットを示す。R M A S - H H D または J Y 細胞を、表示の H L A - 2 A 拘束性ペプチドと共に負荷した。次いで、ペプチド負荷細胞を、可溶性精製 G 1 s c F v 抗体とインキュベートした。F I T C 標識抗 M y c を使用して結合を検出した。P M A S - H H D 細胞を G 9 - 2 0 9 および G 9 - 2 8 0 ペプチドと共に負荷し、コントロール非負荷細胞である抗 H L A 抗体 w 6 / 3 2 (6 A) または抗 H L A - A 2 抗体 B B 7 . 2 (6 B) と共に染色して、負荷したペプチド表面で H L A - A 2 複合体の安定化 / 発現が証明されたが、ペプチド非負荷細胞では証明されなかった。G 9 - 2 0 9 または G 9 - 2 0 8 ペプチド負荷細胞を G 1 s c F v で染色し、分染を示す (6 C) 。単鎖 β 2 M - H L A - A 2 遺伝子 (2 6) または E B V 形質転換 B リンパ芽球 J Y 細胞 (10^6 細胞) でトランスフェクトした B 細胞株 R M A S - H H D を無血清 R P M I で 2 回洗浄し、 $100 \mu\text{M}$ のペプチドを含む培地中にて 26°C または 37°C でそれぞれ一晚インキュベートした。その後、A P C を 37°C で 2 ~ 3 時間インキュベートして M H C - ペプチド複合体の細胞表面発現を安定化し、その後 $100 \mu\text{l}$ の組換え s c F v ($10 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $60 \sim 90$ 分間、 4°C) とインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、F I T C 標識抗 M y c 抗体とインキュベートし ($30 \sim 45$ 分間、 4°C)、最後に洗浄して F A C S t a r フローサイトメーター (B e c t o n D i c k i n s o n) で分析した。黒色腫細胞に、 37°C で $1 \sim 10 \mu\text{M}$ のペプチドをパルスし、本明細書中に記載のように s c F v で染色した。

図 7 A - C はペプチド負荷 A P C に対する G 1 s c F v - P E 3 8 の細胞傷害活性を証明するプロットおよび棒グラフである。R M A S - H H D (7 A) または J Y (7 B) 細胞を、表示の H L A - A 2 拘束性ペプチドと共に負荷し、その後漸増濃度の G 1 s c F v - P E 3 8 とインキュベートした。細胞タンパク質への ^3H -ロイシン取り込みによってタンパク質合成を決定した。(7 C) では、過剰 ($0.15 \sim 0.25 \text{ mg}/\text{ml}$) の表示の s c H L A - A 2 - ペプチド複合体をウェルに添加し、その後 G 1 s c F v - P E 3 8 ($25 \sim 50 \text{ ng}/\text{ml}$) を添加した。上記のように、R M A S - H H D および J Y A P C を G 9 - 2 0 9 ペプチドおよびコントロールペプチドと共に負荷した。その後、ペプチド負荷細胞を漸増濃度の G 1 s c F v - P E 3 8 とインキュベートし、以前に記載のように (3 0) 細胞タンパク質の ^3H -ロイシン取り込みの測定によってタンパク質合成阻害を決定した。タンパク質合成の 50 % 阻害に必要な G 1 s c F v - P E 3 8 濃度として IC_{50} を決定した。競合アッセイでは、過剰の特異的および非特異的 H L A - A 2 - ペプチド複合体 ($35 \sim 50 \mu\text{g}/\text{ウェル}$) を 15 分間ウェルに添加し、その後 G 1 s c F v - P E 3 8 を添加した。

【発明を実施するための最良の形態】

【0040】

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

【0041】

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

10

20

30

40

50

【0042】

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

【0043】

免疫系は、ペプチド／主要組織適合性複合体（MHC）分子を特異的に認識するT細胞受容体（TCR）によって調節および制御される。

【0044】

組換えクラスI MHC-ペプチド複合体およびその四量体アレイの適用の出現により、現在、抗原特異的T細胞の稀な集団を検出および研究することができる（25, 35, 36）。しかし、抗原（MHC-ペプチド）提示の表現型（別の見方では、MHC-ペプチド-TCR相互作用）の分析が可能な試薬の欠如のために、一般的な免疫学における基本的問題および抗原提示に関する特定の腫瘍免疫学における問題は未解決である。このような試薬を作製する1つの方法は、TCR様抗体の作製によるが、ハイブリドーマテクノロジーなどの従来手段による自己MHC拘束性抗体の作製に関する刊行物はほんの僅かしか報告されていない（13-16）。これらの過去の困難の主な理由を、MHC-ペプチド複合体の分子の性質および解析された構造において見出すことができる。より詳細には、ペプチドはMHC結合溝内に深く埋もれ、それによりMHC残基と混ざりあったペプチド残基の広範なモザイクとして現れている。100~300 Å²しか外側に面していないクラスI MHC結合ペプチドを直接認識に利用可能であり、抗体認識タンパク質分子は約800 Å²のそのリガンドと結合する（17）。したがって、TCR様抗体を作製する場合、これらの分子はおそらくペプチドを認識するが、MHCにも支配されなければならない。

【0045】

これまで、種々の免疫化ストラテジーを使用してマウスMHC-ペプチド複合体に対してTCR様特異性を有する抗体が作製されている（17）。最近、巨大なヒト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（18）。TCR様特異性を示すが250 nMの比較的低い親和性を示す1つの特異的クローンであるG8が選択された。

【0046】

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

【0047】

本発明の態様によれば、HLA拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体の産生方法を提供する。本発明のこの態様による方法を、（i）ヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスIを発現する細胞を有する遺伝子操作された非ヒト哺乳動物をHLA拘束性抗原と複合体形成された可溶性形態のMHCクラスI分子で免疫化することと、（ii）非ヒト哺乳動物の抗体産生細胞（脾臓細胞など）からmRNA分子を単離することと、（iii）前記mRNA分子によってコードされるタンパク質分子をディスプレイするファージディスプレイライブラリーを産生することと、（iv）前記ファージディスプレイライブラリーから少なくとも1つのファージを単離することと、少なくとも1つの前記ファージがHLA拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体（MHC）クラスIと10ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をディスプレイすることとによって行う。次いで、本明細書中の以下にさらに記載のように、ファージ単離物の遺伝物質を使用して単鎖抗体または他の抗体形態を調製した。以下にさらに記載のようにファージ単離物の遺伝物質を使用して単鎖抗体または他の抗体形態を調製し、認識可能部分または治療部分に抱合する。好ましくは、非ヒト哺乳動物は、自己MHC

10

20

30

40

50

クラス I 分子を欠く。さらに好ましくは、MHC I 分子の可溶性形態は、機能的ヒト MHC クラス I 重鎖アミノ酸配列に直接または間接的に共有結合した機能的ヒト β -2 ミクログロブリンアミノ酸配列を含む単鎖 MHC クラス I ポリペプチドである。

【0048】

したがって、本発明の別の態様によれば、HLA 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体を含む単離分子を提供する。このような抗体は、なおさらに高い T 細胞受容体特異性を有する。1 つの非限定的な例では、抗体は、例えば、配列番号 8 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有する単鎖抗体である。

10

【0049】

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

【0050】

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

20

【0051】

したがって、本発明の別の態様によれば、HLA 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第 1 のポリヌクレオチドをインフレイムで同定可能な部分をコードする第 2 のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて免疫標識を得る工程とを含む、免疫標識の作製方法を提供する。

30

【0052】

さらに、本発明のさらに別の態様によれば、サンプルの細胞を HLA 拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体 (MHC) クラス I と 20 ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体と相互作用させる工程と、相互作用をモニタリングして HLA 拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および／またはレベルを検出する工程とを含む、細胞サンプル中の HLA 拘束性抗原を提示する抗原提示細胞の存在および／またはレベルの検出方法を提供する。

【0053】

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

40

【0054】

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

【0055】

同定可能な部分は、さらなる結合対のメンバーとのその相互作用を介して同定可能な結合対のメンバーおよび直接視覚化される標識であり得る。1 つの例では、結合対のメンバーは、対応する標識化抗体によって同定される抗原である。1 つの例では、標識は、蛍光タ

50

ンパク質または比色反応を示す酵素である。

【0056】

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

【0057】

したがって、本発明の別の態様によれば、HLA拘束性抗原と複合体形成されたヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIと20ナノモル未満の結合親和性で特異的に結合することができる抗体をコードする第1のポリヌクレオチドをインフレイムで毒素部分をコードする第2のポリヌクレオチドとライゲーションしてライゲーションされたポリヌクレオチドを得る工程と、ライゲーションした前記ポリヌクレオチドを発現系で発現させて免疫毒素を得る工程とを含む、免疫毒素の作製方法を提供する。

10

【0058】

免疫毒素を以下の治療プロトコールの任意の1つで使用する事ができる。

【0059】

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

20

【0060】

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

【0061】

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

30

【0062】

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

40

【0063】

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

【0064】

全ての適用では、MHCクラスIは、例えば、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45、およびHLA-Cw8であり得る。

【0065】

以下の節は、本明細書中に記載の本発明のそれぞれの種々の態様についての特定の例および代替物を提供する。本発明を類似の、さらにいくらか異なる方法で実施することがで

50

きるので、これらの例および代替物は、決して制限と見なすべきではない。しかし、これらの例は、当業者に本発明の種々の変更形態および実施形態をどのようにして実施するかを教示する。

【0066】

抗体：本発明を説明するために使用される、用語「抗体」には、インタクトな分子ならびにHLA拘束性抗原と複合体形成したヒト主要組織適合性複合体(MHC)クラスIに特異的且つ高親和性で結合することができるその機能的フラグメント(Fab、F(ab')₂、Fv、およびscFvなど)が含まれる。これらの機能的抗体フラグメントは、以下のように定義される：(i) Fab (抗体分子の1価の抗原結合フラグメントを含み、全抗原の酵素パパインでの消化によってインタクトな軽鎖および1つの重鎖の一部を得ることができるフラグメント)；(ii) Fab' (ペプシンでの全抗体の処理によって得ることができ、その後還元によってインタクトな軽鎖および重鎖の一部が得られる抗体分子のフラグメント)；(iii) F(ab')₂ (全抗体を酵素ペプシンで処置しその後還元しないで得ることができる抗体のフラグメント)；F(ab')₂ は2つのジスルフィド結合によって互いに保持された2つのFab'フラグメントの二量体である；(iv) Fv (2つの鎖として発現した軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝子操作されたフラグメントとして定義される)；および(c) scFvまたは「単鎖抗体」(「SCA」)(遺伝的に融合された単鎖分子として適切なポリペプチドリンカーによって連結された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む遺伝子操作された分子)。

10

【0067】

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

20

【0068】

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

【0069】

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

30

【0070】

Fvフラグメントは、V_H鎖とV_L鎖との結合を含む。Inbar et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 69:2659-62, 1972に記載のように、この結合は非共有結合であり得る。あるいは、グルタルアルデヒドなどの化学物質による分子間ジスルフィド結合または架橋によって可変鎖を連結することができる。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリンカーによって連結されたV_H鎖および

40

50

V_L鎖を含む。これらの単鎖抗原結合タンパク質(sFv)を、オリゴヌクレオチドによって連結したV_HおよびV_LドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子の構築によって調製する。構造遺伝子を発現ベクターに挿入し、その後E. coliなどの宿主細胞に移入する。組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを含む1つのポリペプチド鎖を合成する。sFvの産生方法は、例えば、Whitlow and Filpula, Methods, 2:97-105, 1991; Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77, 1993; および Ladner et al. に付与された米国特許第4946778号(その全体が本明細書中で参考として援用される)に記載されている。

10

【0071】

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

【0072】

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

20

30

【0073】

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

【0074】

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

40

50

【0075】

当該分野で公知の種々の技術（ファージディスプレイライブラリーを含む）を使用してヒト抗体を産生することもできる [Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]。ヒトモノクローナル抗体の調製のための Cole et al. and Boerner et al. の技術も利用可能である (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) および Boerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)]。同様に、トランスジェニック動物（例えば、外因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されているマウス）へのヒト免疫グロブリン遺伝子座の移入によってヒトを作製することができる。攻撃誘発時に、遺伝子の再配置、構築、および抗体レパートリーを含むあらゆる点でヒトで認められる非常に類似しているヒト抗体産生が認められている。このアプローチは、例えば、米国特許第 5545807 号、同第 5545806 号、同第 5569825 号、同第 5625126 号、同第 5633425 号、同第 5661016 号、および以下の科学刊行物：Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995) に記載されている。

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

クラス I MHC 分子に結合するペプチド；HLA 拘束性抗原：典型的には 8～10 アミノ酸長のクラス I MHC 拘束性ペプチド（本明細書中で交換可能に HLA 拘束性抗原、HLA 拘束性ペプチド、MHC 拘束性抗原ともいう）は、MHC 分子中の対応する結合

ポケットと相互作用する2つまたは3つのアンカー残基を介して重鎖 $\alpha 1 - \alpha 2$ 溝に結合する。 $\beta - 2$ ミクロglobulin鎖は、MHCクラスI細胞内輸送、ペプチド結合、および高次構造の安定性において重要な役割を果たす。ほとんどのクラスI分子について、MHCクラスI重鎖、ペプチド（自己または抗原）、および $\beta - 2$ ミクロglobulinからなるヘテロ二量体の形成は、生合成の成熟および細胞表面発現に必要である。

【0080】

クラスI MHC分子へのペプチドの結合における研究により、潜在的に免疫原性のウイルス、腫瘍、および自己抗原由来のペプチドのディスプレイで機能的な特異的MHCモチーフを定義することができ、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）からの特異的応答を誘発することができる。

10

【0081】

本明細書中で使用される、用語「ペプチド」は、天然のペプチド（分解産物または合成ペプチドのいずれか）、さらに、例えば、ペプチドをより安定にする一方で体内ではより高い免疫原性を示す改変を有し得るペプチドアナログであるペプトイドおよびセミペプトイドなどのペプチド模倣物をいう。このような改変には、環状化、N末端修飾、C末端修飾、ペプチド結合修飾（ $\text{CH}_2 - \text{NH}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{S}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{S} = \text{O}$ 、 $\text{O} = \text{C} - \text{NH}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{O}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$ 、 $\text{S} = \text{C} - \text{NH}$ 、 $\text{CH} = \text{CH}$ 、または $\text{CF} = \text{CH}$ が含まれるが、これらに限定されない）、骨格修飾、および残基修飾が含まれるが、これらに限定されない。ペプチド模倣物の調製方法は当該分野で周知であり、Quantitative Drug Design, C. A. Ramsden Gd., Chapter 17. 2、F. Choplin Pergamon Press (1992)（本明細書中に完全に記載されているように参考として援用される）に記載されている。これに関するさらなる詳細を以下に示す。

20

【0082】

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

30

【0083】

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

【0084】

HLA-A2結合ペプチドに関して、9量体ペプチド中以下の位置を仮定する：

P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8-P9。

40

【0085】

P2およびP2の位置は、MHC分子への結合に関与する主な残基であるアンカー残基を含む。P2位およびP9位で結合するアミノ酸残基は、親水性脂肪族非電荷天然アミノ酸（例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Gln、Thr、Ser、Cys、好ましくはValおよびLeu）または非天然親水性脂肪族非電荷アミノ酸（例えば、ノルロイシン（Nle）、ノルバリン（Nva）、 α -アミノ酪酸）である。P1位およびP3位は、MHC分子への結合に関与するか補助するアミノ酸残基を含むことも公知であるが、これらの位置は、天然または非天然のアミノ酸を含むことができる。他の位置は、典型的には、結合に関与しないアミノ酸残基によって結合され、むしろこれらの残基は免疫細胞に提示される。MHC分子へのペプチドの結合に関するさらなる詳細を、Parker

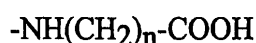
50

, K. C., Bednarek, M. A., Coligan, J. E., Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. J Immunol. 152, 163-175, 1994 (とくに、表Vを参照のこと)に見出すことができる。したがって、http://www.bimas.dcr.t.nih.gov/molbio/hla_bind/index.htmlのワールドワイドウェブインターフェースからアプローチ可能なHLAペプチド結合推定ソフトウェアを使用してHLA-A2.1結合ペプチドをスコアリングすることができる。このソフトウェアは、ペプチド中の全アミノ酸の寄与によるMHC HLA-A2.1への結合可能性についての分析タンパク質中の全ての可能なペプチドの蓄積データおよびスコアに基づく。理論的結合スコアは、HLA-A2.1-ペプチド複合体の計算された半減期を示す。

10

【0086】

P2およびP9での親水性脂肪族天然アミノ酸を、合成アミノ酸（好ましくは、Nleu、Nval、および／またはα-アミノ酪酸）に置換することができる。P9を、一般式 $\text{-NH(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$ （式中、 $n=3\sim 5$ ）の脂肪族アミノ酸ならびにその分岐誘導体（



20

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

【0087】

アミノ末端残基（P1位）を、正電荷の脂肪族カルボン酸（ $\text{H}_2\text{N(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$ （式中、 $n=2\sim 4$ ）および $\text{H}_2\text{N-C(NH)-NH(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$ （式中、 $n=2\sim 3$ ）などであるが、これらに限定されない）ならびにヒドロキシリジン、N-メチルリジン、またはオルニチン（Orn）に置換することができる。さらに、アミノ末端残基を、拡大した芳香族残基（ $\text{H}_2\text{N-(C}_6\text{H}_6\text{)-CH}_2\text{-COOH}$ 、p-アミノフェニルアラニン、 $\text{H}_2\text{N-F(NH)-NH-(C}_6\text{H}_6\text{)-CH}_2\text{-COOH}$ 、p-グアニジノフェニルアラニン、またはピリジノアラニン（Pal）などであるが、これらに限定されない）に置換することができる。これらの後者の残基は、MHC-1 N末端結合ポケットでチロシン残基の OH^- 部分と水素結合を形成すると同時に芳香族-芳香族相互作用を得ることができる。

30

【0088】

P4-P8位でのアミノ酸残基の誘導により、これらの残基（Ser、Tyr、Lys、CysまたはOrnなど）は、OH、SH、または NH_2 などの側鎖を有するはずであり、アルキル、アリール、アルカノイル、またはアロイルにより得る。さらに、これらの位置でのOH基もまた、リン酸化および／またはグリコシル化によって誘導することができる。これらの誘導は、いくつかの場合、T細胞受容体への結合を増強することが示されている。

40

【0089】

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

【0090】

環状アミノ酸誘導体は、P4位～P8位、好ましくはP6位およびP7位で結合することができる。例えば、鎖中の種々の位置でのGlu、Asp、Lys、Orn、ジアミノ

50

酪酸 (D a b)、ジアミノプロピオン酸 (D a p) の組み込みによるアミド結合 ($-CO-NH$ 結合または $-NH-CO$ 結合) の形成によって環状化することができる。式 $H-N((CH_2)_n-COOH)-C(R)H-COOH$ または $H-N((CH_2)_n-COOH)-C(R)H-NH_2$ ($n=1\sim 4$ 、さらに、R はアミノ酸の任意の天然または非天然側鎖である) の修飾アミノ酸の組み込みによって、骨格-骨格環状化を得ることもできる。

【0091】

2つの C y s 残基の組み込みによる S-S 結合形成を介した環状化も可能である。例えば、C y s またはホモ C y s の組み込みおよび例えばプロモアセチル化 L y s、O r n、D a b、または D a p とのその遊離 S H 基の反応による式 $-(CH_2)_n-S-CH_2-C-$ (式中、 $n=1$ または 2) の相互作用結合の形成によって側鎖環状化にさらなる側鎖を得ることができる。

10

【0092】

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

20

【0093】

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

【0094】

天然の芳香族アミノ酸 (T r p、T y r、および P h e) を、T I C、ナフチルアミン (N o l)、P h e の環メチル化誘導体、P h e のハロゲン化誘導体、または o-メチル-T y r などの合成非天然酸に置換することができる。

【0095】

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

30

【0096】

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

10

20

30

【0097】

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

【0098】

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

10

20

【0099】

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

【0100】

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

30

40

【0101】

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

50

u. edu / の k a b b a t データベースで提供される配列情報、(i i) 例えば、“Molecular Cloning: A laboratory Manual” Sambrook et al., (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren et al., (eds) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) に記載の従来の構築物調製技術、および (i i i) 例えば、米国特許第 5 4 8 7 9 9 2 号、同第 5 4 6 4 7 6 4 号、同第 5 3 8 7 7 4 2 号、同第 5 3 6 0 7 3 5 号、同第 5 3 4 7 0 7 5 号、同第 5 2 9 8 4 2 2 号、同第 5 2 8 8 8 4 6 号、同第 5 2 2 1 7 7 8 号、同第 5 1 7 5 3 8 5 号、同第 5 1 7 5 3 8 4 号、同第 5 1 7 5 3 8 3 号、同第 4 7 3 6 8 6 6 号、国際公開 WO 9 4 / 2 3 0 4 9 号、WO 9 3 / 1 4 2 0 0 号、WO 9 4 / 0 6 9 0 8 号、および WO 9 4 / 2 8 1 2 3 号、ならびに Burke and Olson, Methods in Enzymology, 194: 251-270, 1991; Capecchi, Science 244: 1288-1292, 1989; Davies et al., Nucleic Acids Research, 20 (11) 2693-2698, 1992; Dickinson et al., Human Molecular Genetics, 2 (8): 1299-1302, 1993; Duff and Lincoln, “Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells”, Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, 1995; Huxley et al., Genomics, 9: 742-750 1991; Jakobovits et al., Nature, 362: 255-261, 1993; Lamb et al., Nature Genetics, 5: 22-29, 1993; Pearson and Choi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90: 10578-82; Rothstein, Methods in Enzymology, 194: 281-301, 1991; Schedl et al., Nature, 362: 258-261, 1993; Strauss et al., Science, 259: 1904-1907, 1993 (その全てが本明細書中で参考として援用される) に記載の従来の遺伝子ノックイン／ノックアウト技術。ヒト HLA-A 2. 1、H 2 Db、および HHD MHC クラス I 分子を発現し、且つマウス MHC クラス I を欠くマウスの調製を記載した J. Exp. Med. 185: 2043-2051, 1997 で発表された Pacollo et al. の論文が特に興味深い。

【0102】

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

【0103】

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

10

【0104】

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

20

【0105】

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

30

【0106】

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

40

【0107】

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

【0108】

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

50

t h o d s o f E n z y m o l o g y 1 1 2 : 2 0 7 - 2 2 4) を使用する。

【0109】

同定可能部分または治療部分などのペプチド (1. 7 m g / m l) を、10 倍過剰の S P D P (50 m M のエタノール溶液) と混合し、抗体を 25 倍過剰の S P D P の 20 m M リン酸ナトリウム溶液 (0. 10 M N a C l を含む、p H 7. 2) と混合し、各反応物を例えば、室温で 3 時間インキュベートした。次いで、反応物を、P B S に対して透析する。

【0110】

ペプチドを、例えば、50 m M D T T にて室温で 1 時間還元する。還元ペプチドを、50 m M K H ₂ P O ₄ (p H 6. 5) を使用した G - 25 カラム (5 % までのサンプル / カラム体積) での平衡化によって脱塩する。還元ペプチドを、1 : 10 の抗体 : ペプチドのモル比で S P D P - 抗体と合わせ、4 °C で一晩インキュベートしてペプチド - 抗体抱合体を形成させる。

【0111】

グルタルアルデヒド抱合体：グルタルアルデヒドを使用した当業者に公知の方法によって、ペプチド (例えば、同定可能部分または治療部分) を抗体と抱合することができる。例えば、1 つの例示的实施形態では、下記の G. T. H e r m a n s o n による抱合方法 (1996, " A n t i b o d y M o d i f i c a t i o n a n d C o n j u g a t i o n , i n B i o c o n j u g a t e T e c h n i q u e s , A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o ") を使用する。

【0112】

抗体およびペプチド (1. 1 m g / m l) を 10 倍過剰の 0. 05 % グルタルアルデヒドの 0. 1 M リン酸塩溶液 (0. 15 M N a C l を含む、p H 6. 8) と混合し、室温で 2 時間反応させた。0. 01 M のリジンを添加して、過剰部位をブロックすることができる。反応後、P B S (10 % v / v サンプル / カラム体積) で平衡化した G - 25 カラムを使用して、過剰なグルタルアルデヒドを除去した。

【0113】

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

【0114】

同様に、カルボジイミド結合を使用して、抗体の炭素基とペプチドの水酸基、アミノ基、またはスルフヒドリル基との間に類似の共有結合を形成することができる。一般に、J. M a r c h , A d v a n c e d O r g a n i c C h e m i s t r y : R e a c t i o n ' s , M e c h a n i s m , a n d S t r u c t u r e , p p . 349 - 50 & 372 - 74 (3 d e d .) , 1985 を参照のこと。例示として、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどのカルボジイミドを使用した共有結合を介してペプチドを抗体に抱合するが、これに制限されない。一般に、B. N e i s e s e t a l . (1978, A n g e w C h e m . , I n t . E d . E n g l . 17 : 522) ; A. H a s s n e r e t a l . (1978, T e t r a h e d r o n L e t t . 4475) ; E. P. B o d e n e t a l . (1986, J. O r g . C h e m . 50 : 2394) 、および L. J. M a t h i a s (1979, S y n t h e s i s 561) による抱合方法を参照のこと。

【0115】

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

【0116】

実施例

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

【0117】

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

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

【0118】

(材料と実験方法) ビオチン化 s c M H C / ペプチド複合体の産生：以前に記載のように (23、24、米国特許出願 09 / 534966 号および P C T / I L 01 / 00260 号 (W O 01 / 72768 として公開))、E . c o l i 中に産生した封入体の i n v i t r o での再折りたたみによって単鎖 M H C / ペプチド複合体を産生した。以前に記載のように (25)、B i r A 酵素 (A v i d i t y, D e n v e r, C O) を使用して

10

【0119】

マウスの免疫化：以前に記載のように (17)、組換え H L A - A 2 . 1 / D ^b - β 2 ミクログロブリン短鎖にトランスジェニックな D ^b - / - X β 2 ミクログロブリン (β 2 m) ヌルマウス (H H D マウス) (26) を、H L A - A 2 / G 9 - 209 複合体に共有結合したツベルクリン (P P D) の精製タンパク質由来ペプチドを含む乳濁液で免疫化した。簡単に述べれば、マウスを、20 ~ 30 μ g / マウスの抗原性混合物を含むフロイント不完全アジュバントで最初に皮下に免疫化し、その後 3 ~ 5 ヶ月間 2 週間間隔で皮下に免疫化した。最後の免疫化から 2 週間後に脾臓を採取した。

【0120】

ビオチン化複合体に対するファージ抗体のライブラリー構築および選択：記載のように (27) 免疫化マウスから全 R N A を単離し、抗体 s c F v ライブラリーを室温の P C R によって m R N A から構築した。S f i I - N o t I フラグメントとして s c F v レパートリーを p C A N T A B 5 E または p C C - C B D ファージミドベクターにクローン化した (28)。両ライブラリーの複雑度は、1 × 10⁸ 独立クローンであった。パニングのために、ビオチン化 s c H L A - A 2 / G 9 - 209 M 複合体 (20 μ g) をストレプトアビジン被覆磁性ビーズ (2 × 10⁸) とインキュベートし、洗浄し、10¹¹ c f u のライブラリーとインキュベートした (室温で 1 時間)。第 2 ラウンドから開始し、過剰量 (5 μ g) の s c H L A - A 2 / G 9 - 280 V 複合体の存在下でパニングを行った。2 % M P B S + 0 . 1 % T W E E N 20 で 10 ~ 12 回ビーズを十分に洗浄した。室温で 5 分間の 1 m l のトリエチルアミン (100 m M, p H 12) の使用によって結合したファージを溶出し、その後 0 . 1 m l の 1 M T r i s - H C l (p H 7 . 4) で中和した。記載のように (28)、溶出ファージを、E . c o l i T G 1 細胞の指数関数的成長において拡大し、その後 M 13 K O 7 ヘルパーファージで重感染させた。

20

30

【0121】

可溶性組換え s c F v および s c F v - P 38 融合タンパク質の発現および精製：P C R によって G 1 s c F v 遺伝子をファージクローンからレスキューし、S f i I - N o t I クローニング部位の使用によってファージミドベクター p C A N T A B 6 にサブクローン化した。M y c およびヘキサヒスチジンタグを s c F v 遺伝子の C 末端に融合した。以前に記載のように (29) s c F v 抗体を B L 21 λ D E 3 細胞で発現させ、金属イオンアフィニティクロマトグラフィによってペリプラズム画分から精製した。G 1 s c F v - P E 38 融合タンパク質の発現のために、s c F v 遺伝子を N c o I - N o t I フラグメントとして P E の転座および A D P - リボシル化ドメイン (P E 38) をコードするプラスミド p I B - N N にサブクローン化した。封入体から再折りたたみされた B L 21 λ D E 3 細胞の発現および G 1 s c F v - P E 38 の精製を以前に記載のように行った (30)。

40

【0122】

ファージクローンおよび精製 s v F v または s c F v - P E 38 を使用した E L I S A : ビオチン化 s c M H C - ペプチド複合体を使用した E L I S A によって結合特異性研究を行った。簡単に述べれば、E L I S A プレート (F a l c o n) に、B S A - ビオチン

50

(1 μ g/ウェル)を一晩コートし、洗浄し、ストレプトアビジン(1 μ g/ウェル)とインキュベートし(室温で1時間)、再度十分に洗浄し、さらに0.5 μ gのMHC/ペプチド複合体とインキュベートした(室温で1時間)。プレートをPBS/2%ミルクでブロックし(室温で30分間)、ファージクローン(約 10^9 ファージ/ウェル、室温で1時間)または0.5~1 μ gの可溶性scFvまたはscFv-PE38とインキュベートし、その後1000倍希釈のHRP抱合/抗M13、抗myc抗体、または抗PE抗体でそれぞれ洗浄した。特異性研究のために使用したHLA-A2拘束性ペプチドは、gp100(154):KTWGGQYWQV(配列番号1);gp100(209):IMDQVPFSV(配列番号2);gp100(280):YLEPGPVTV(配列番号3);MUC1:LLLTVLTVL(配列番号4);HTLV-1(TAX):LLFGYPVYV(配列番号5);hTERT(540):ILAKFLHWL(配列番号6);hTERT(865):RLVDDFLLV(配列番号7)である。

【0123】

フローサイトメトリー:単鎖 β 2M-HLA-A2遺伝子(26)でトランスフェクトしたB細胞株RAMS-HHDまたはEBV形質転換Bリンパ芽球JY細胞(10^6 細胞)を、無血清RPMIで2回洗浄し、100 μ Mのペプチドを含む培地中で26℃または37℃でそれぞれ一晩インキュベートした。その後、APCを37℃で2~3時間インキュベートしてMHC-ペプチド複合体の細胞表面発現を安定化し、その後100 μ lの組換えscFv(10~50 μ g/ml、60~90分間、4℃)とインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、FITC標識抗MyC抗体とインキュベートし(4℃で30~45分間)、最後に洗浄し、FACSstarフローサイトメーター(Becton Dickinson)で分析した。

【0124】

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

【0125】

細胞傷害性アッセイ:前に記載のように、PMAS-HHDまたはJY APCを、G9-209ペプチドおよびコントロールペプチドと共に負荷した。次いで、以前に記載のように(30)、ペプチド負荷細胞を漸増濃度のG1scFv-PE38とインキュベートし、細胞タンパク質への ^3H -ロイシンの取り込みの測定によってタンパク質合成阻害を決定した。タンパク質合成を50%阻害するために必要なG1scFv-PE38の濃度としてIC₅₀を決定した。競合アッセイでは、過剰量の特異的および非特異的HLA-A2-ペプチド複合体(35~50 μ g/ウェル)をウェルに15分間添加し、その後G1scFv-PE38を添加した。

【0126】

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

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

10

20

30

40

50

【0127】

抗体scFvファージライブラリーの構築およびTCR様特異性を有するHLA-A2/G9-209M複合体に結合するファージの選択：免疫化のためにPPDを精製複合体に結合させ、組換えHLA-A2.1/D^b-β2ミクロglobulin短鎖にトランスジェニックなD^b-β2ミクロglobulin (β2m)ヌルマウス (HHDMouse) (26)を、これで免疫化した。これらのマウスは、古典的HLA遺伝子導入にマウスクラスI H-2を選択的破壊が組み合わされている。したがって、古典的HLAトランスジェニックと異なり、これらのマウスはインタクトなウイルスなどの多エピトープタンパク質とのHLA-A2.1拘束性応答しか示さなかった。さらに、これらのマウスはB細胞免疫原としてHLA-A2に広範な耐性を示すはずであり、それによりHLA-A2 (特異的腫瘍関連ペプチド) と複合体形成した場合にMHC拘束性エピトープに指向する抗体応答の発生を優先することができるので、HLA-A2-ペプチド複合体での免疫化のための有用なツールであると推測される。反応性の高いT細胞免疫原であるので、PPDを結合に使用した (17)。

【0128】

免疫化マウスから総脾臓mRNAを単離し、cDNAに逆転写した。縮重プライマーの特定の組を使用して、免疫globulinの重鎖および軽鎖可変ドメインに対応するcDNAセグメントをPCR増幅した (27)。VHおよびVLのPCRプールを、PCR重複伸長反応によってscFvレパートリーに構築し、その後インフレームでのセルロース結合ドメイン (CBD) との融合タンパク質としてscFvを発現するpCANTAB5EファージミドベクターまたはファージミドベクターpCC-Gal6 (Fv) にクローン化した (28)。得られたライブラリーを、エレクトロポレーションによってE. coli TG1細胞に形質導入し、ヘルパーファージでのレスキュー後に小ファージ被覆タンパク質p111との融合物として発現させた。両ベクター型を使用したライブラリーの複雑度は、 1×10^8 独立クローンからなった。

【0129】

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

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

【0130】

【表1】

表1: *scHLA-A2/G9-209M* 複合体に対するファージ選択

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

10

A 4ラウンドの選択により、ラウンド3で見出されたものと類似の富化を示した

20

【0131】

B SA-ビオチン-ストレプトアビジン被覆免疫プレートに固定したビオチン化組換え s c M H C -ペプチド複合体に対するファージ特異性を決定するために、ポリクローナルファージELISAを行った。B SA-ビオチン-ストレプトアビジンスペーサーは、プラスチックへの直接結合によって歪曲され得る複合体の提示を修正することができる。パニングの第2ラウンド後にファージは既に分析されるが、より劇的には、第3ラウンド後、特異的G9-209M含有HLA-A2複合体にのみ指向する固有の特性パターンを示した(図1A～B)。gp100由来のエピトープ、G9-280V、またはテロメラーゼ由来エピトープ654をディスプレイするコントロールHLA-A2複合体を使用した場合、結合は認められなかった。

30

【0132】

各モノクローナルファージクローンを、最終ラウンドのパニング由来のファージ集団から単離し(第4ラウンド後にさらなる富化は認められなかった)、ファージELISAによって特異性を再スクリーニングした(図2A～B)。試験した93クローンのうち、85個(91%)のクローンが、HLA-A2/G9-209M複合体と反応した(図2A)。85個の反応性クローンうちの77個(90%)が特異的HLA-A2/G9-209M複合体と特異的に反応したが、コントロールG9-280V含有複合体とは反応しなかった(図2B)。ほんの少しのクローン(5/93、5%)のみがペプチド特異性を示さなかった(図2B)。したがって、パニング手順により、HLA-A2/G9-209M複合体に対してTCR様特異性を有するファージ抗体を首尾よく富化することができた。多切断制限酵素消化によるフィンガープリント分析により、50個の陽性HLA-A2/G9-209M特異的クローンが類似の消化パターンを有し、全てが類似することを示すことが明らかとなった(データ示さず)。2つのライブラリーを使用して、類似の結果が得られた。これらを同一の遺伝物質(mRNAの同一プール)から構築したので、pCANTAB5E scFvライブラリー由来のファージクローンのみをさらに特徴付けた。

40

【0133】

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

50

H/V L組み合わせ事象に由来することが示唆された。

【0134】

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

【0135】

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

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

【0136】

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

【0137】

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

【0138】

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

【0139】

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

10

20

30

40

50

を負荷した。抗H L A－A 2抗体を使用したF A C S分析により、G 9－2 0 9 M、G 9－2 8 0 V、および他のコントロールペプチドを負荷した細胞を有するH L A－A 2分子の類似の発現パターンが明らかとなった（図6 B）。図7 Aに示すように、G 9－2 0 9ペプチドを負荷したR M A S－H H D細胞のみでI C₅₀が1 0～2 0 n g／m lのG 1 s c F v－P 3 8による細胞傷害性が認められた。g p 1 0 0由来G 9－2 8 0 Vエピトープまたは他のコントロールH L A－A 2拘束性ペプチドを負荷したR M A S－H H D細胞やペプチド負荷していない細胞で細胞傷害活性は認められなかった。抗ヒトルイスY s c F v抗体をP E 3 8に融合させた無関係の免疫毒素（B 3（F v）－P E 3 8）を使用してもG 9－2 0 9 M負荷R M A S－H H D細胞は死滅しなかった（図7 A）。正常なT A Pを発現するE B V形質転換J Y細胞では、外因的に供給したペプチドのディスプレイは、ペプチド交換によって容易になる。このストラテジーを使用して、G 1 s c F v－P E 3 8がG 9－2 0 9 Mペプチドを負荷した細胞のみを死滅させる類似の特異的活性が認められた（図7 B）。G 1 s c F v－P E 3 8によって結合を競合して細胞傷害性を阻害させるために、過剰な特異的およびコントロールの可溶性s c H L A－A 2－ペプチド複合体が溶液中に存在する競合実験において特異性についてのさらなる証拠を証明した。過剰な可溶性G 9－2 0 9 M含有H L A－A 2ではG 9－2 0 9 M負荷J Y細胞に対してG 1 s c F v－P E 3 8と競合して細胞傷害活性を阻害するが、G 9－2 8 0 V／H L A－A 2複合体では認められないこのアッセイ型の例を図7 Cに示す。これらの結果は、G 1 s c F v抗体の優れた固有の特異性およびヒト腫瘍T細胞エピトープに指向するT細胞の抗原（ペプチド）特異的M H C拘束性特異性を有する細胞傷害性エフェクター細胞を送達するターゲティング部分として作用するその能力をさらに証明する。

【0 1 4 0】

（結果の考察）この実施例では、マウスs c F vフラグメントの免疫レパートリーから癌抗原（黒色腫関連抗原g p 1 0 0）由来のヒトT細胞エピトープに指向する高親和性抗体（本明細書中ではG 1 s c F vという）を選択する能力を証明した。

【0 1 4 1】

G 1 s c F vは、非常に特異的且つ特別な結合パターンを示す；これは、ペプチド特異的様式でH L A－A 2複合体に結合することができる。したがって、これは、T細胞抗原受容体様特異性を有する組換え抗体である。本来の低親和性T C Rと対照的に、この分子は抗体の高親和性結合特性を示しながらT C R特異性を保持する。

【0 1 4 2】

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

【0 1 4 3】

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

【0 1 4 4】

1つは、ファージディスプレイで使用される種々の選択ストラテジーの能力と組み合わせたトランスジェニック動物の免疫化を含む免疫化および選択様式である。新規の外来ペプチドが複合体上に存在しない限り、H L A複合体に通常耐性を示すので、H L A－A 2トランスジェニックマウスなどのH L Aトランスジェニックマウスの使用は有利であると考えられる。T C R様抗体分子を単離する能力は、H L A－A 2に耐性を示すリンパ球が本明細書中に示す実施例ではH L A－A 2上に提示された黒色腫g p 1 0 0由来ペプチドによって寄与される新規のピトープにそのとき曝露される状況を示し得る。過剰な非特異的複合体を含む溶液を組み合わせたパニング手順は、選択プロセスに有意に寄与し、稀な抗体クローン（1 0⁸個のうちの1個）が単離される。

【0 1 4 5】

別の重要な問題は、選択プロセスで使用する抗原の状態に関する。抗原の高次構造は、特に組換え形態で産生される場合、できるだけ「天然」でなければならない。引例2 3お

10

20

30

40

50

よび24ならびに米国特許出願09/534966号およびPCT/IL01/00260号(WO01/72768号として公開)に記載のように、種々のペプチドと複合体形成した単鎖MHC分子のE. coliで産生された封入体からのin vitro再折りたたみにより大量の正確に折りたたまれた機能的タンパク質が得られることが見出された。約 10^8 クローンの比較的小さなライブラリーから例示的抗体G1scFvが単離され、さらにナノモル範囲での親和性で非常に特異的であるという事実は、免疫化に使用したHLA-A2トランスジェニックマウスにより実際にHLA-A2/G9-209複合体に対する高親和性抗体が開発されることを強く示す。たった1つの抗HLA-A2/G9-209抗体が単離されたという所見は、たった1つのこのような特異性を示すか、このような応答をHLA-A2トランスジェニックマウスは容易に作製および寛容することができないので、免疫応答時に他の特異性が得られないことを反映し得る。ファージディスプレイを使用して、インフルエンザ血球凝集素ペプチドHa₂₅₅₋₂₆₂との複合体形成においてクラスIマウスH-2K^k分子に指向する組換えTCR様抗体が単離されたマウスMHC-ペプチド系について類似の結果が過去に報告されたという事実は非常に驚くべき事実である(17)。本明細書中に示した結果と同様に、試験した50個のクローンのうち、7個のクローンがH-2K^k/Ha₂₅₅₋₂₆₂複合体のみと特異的に反応するが、他のH-2K^k/ペプチド複合体とは反応しなかった。興味深いことに、これらの特異的クローンのDNA配列を決定したところ、同一であることが見出された(17)。しかし、これらの抗H-2K^k/Ha₂₅₅₋₂₆₂複合体抗体を使用して抗原提示をモニターすることやヒト起源の抗原提示細胞を死滅させることはできない。

10

20

【0146】

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

【0147】

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

30

【0148】

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

40

50

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

【0149】

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

10

【0150】

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

20

【0151】

参考文献

(追加の文献は本文中に引用されている)

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

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

10

20

30

40

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

10

20

30

40

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

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

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

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

10

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

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

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

20

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

【図面の簡単な説明】

【0152】

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

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

30

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

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

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

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

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

40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50

するプロットおよび棒グラフである。

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

【配列表フリーテキスト】

【0153】

配列番号1はH L A - A 2拘束性ペプチドg p 1 0 0 (1 5 4)の配列である。

配列番号2はH L A - A 2拘束性ペプチドg p 1 0 0 (2 0 9)の配列である。

配列番号3はH L A - A 2拘束性ペプチドg p 1 0 0 (2 8 0)の配列である。

配列番号4はH L A - A 2拘束性ペプチドM U C 1の配列である。

配列番号5はH L A - A 2拘束性ペプチドH T L V - 1 (T A X)の配列である。

10

配列番号6はH L A - A 2拘束性ペプチドh T E r o o m t e m p e r a t u r e (5 4 0)の配列である。

配列番号7はH L A - A 2拘束性ペプチドh T E r o o m t e m p e r a t u r e (8 6 5)の配列である。

配列番号8はG 1一本鎖F v組換え抗体D N Aの配列である。

配列番号9はG 1一本鎖F v組換え抗体タンパク質の配列である。

配列番号10はインフルエンザ由来のH L A拘束性ペプチドの配列である。

配列番号11はB型肝炎由来のH L A拘束性ペプチドの配列である。

【配列表】

20

SEQUENCE LISTING

<110> Reiter , Yoram
Denkberg, Galit

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

<130> 25595

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

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

<400> 1

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

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

<400> 2

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

10

20

30

<220>

<223> HLA-A2-restricted peptide, gp100 (280)

<400> 3

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Val
 1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

10

<220>

<223> HLA-A2-restricted peptide, MUC1

<400> 4

Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Leu
 1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

20

<220>

<223> HLA-A2-restricted peptide, HTLV-1 (TAX)

<400> 5

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val
 1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

30

<220>

<223> HLA-A2-restricted peptide, hTEroom temperature (540)

<400> 6

Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu

40

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> HLA-A2-restricted peptide, hTEroom temperature (865)

10

<400> 7

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val
 1 5

<210> 8

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial sequence

20

<220>

<223> G1 Single chain Fv-recombinant antibody DNA sequence

<400> 8

cagggtgaaac tgcaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta cacctactat 180
 ccagacagtg tgaaggggog attcaaccatc tccagagaca atgcccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagaggtaac 300
 tgggaaggat ggtacttoga tgtctgggga caagggaaca cggtcacogt ctctcaggt 360
 ggaggcggtt caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cgaacatoga gctcactcag 420
 tctccagcaa tcatgtctgc atctocaggg gagagggtca ccatgacctg cagtgccagc 480
 tcaagtatac gttacatata ttggtaccaa cagaagcctg gatcctcccc cagactcctg 540
 atttatgaca catccaaagt ggctcctgga gtcccttttc gottcagtg cagtgggtot 600
 gggacotctt attctctcag aatcaaccga atggaggctg aggatgotgc cacttattac 660
 tggcaggagt ggagtggta tccgtacacg ttggaggagg ggacaaagtt g 711

30

<210> 9

<211> 237

40

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> G1 single chain Fv- recombinant antibody protein sequence

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

40

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

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Influenza derived HLA-restricted peptide

10

<400> 10

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial sequence

20

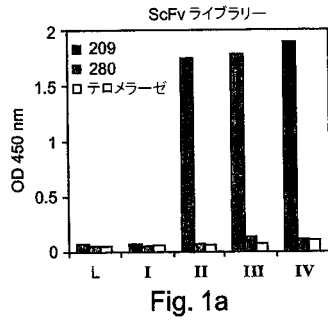
<220>

<223> Hepatitis B derived HLA-restricted peptide

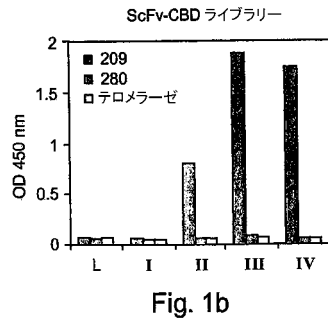
<400> 11

Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln
1 5

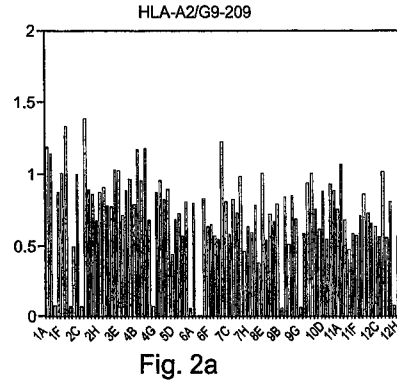
【図 1 a】



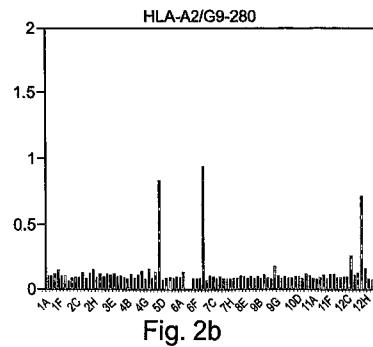
【図 1 b】



【図 2 a】



【図 2 b】



【図 3 a】

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62
GAG ACA TCC AAC CTG GGT CCT GGA GTC CCT TTT GGC TTC AGT
asp thr ser asn val ala pro gly val pro phe arg phe ser

```

Fig. 3a

【図 3 a (Cont.)】

```

53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66
GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC AAC CGA
gly ser gly ser gly thr ser tyr ser leu thr ile asn arg

67 68 69 70 71 72 73 74 75 76
ATG GAG GCT GAG GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG GAG TGG
met glu ala glu asp ala ala thr tyr tyr cys gln glu trp

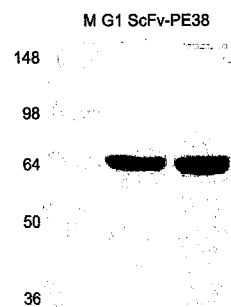
77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90
ATG GAG GCT GAG GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG GAG TGG
met glu ala glu asp ala ala thr tyr tyr cys gln glu trp

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

```

Fig. 3a (続き)

【図 3 b】



【図 3 c】

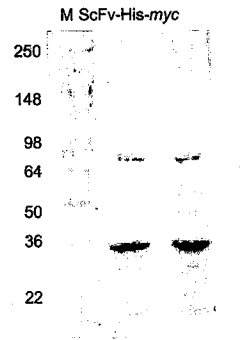


Fig. 3c

【図 4】

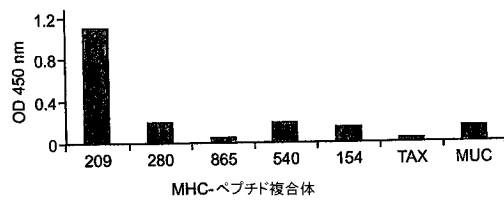


Fig. 4

【図 5 a】

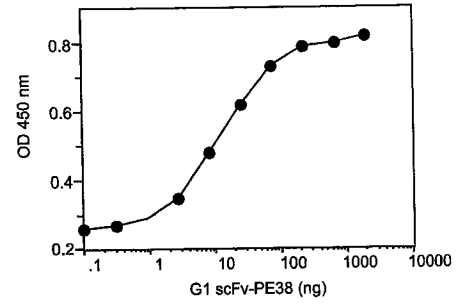


Fig. 5a

【図 5 b】

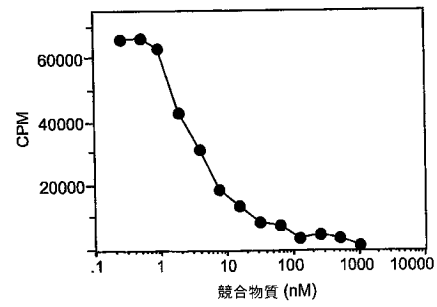
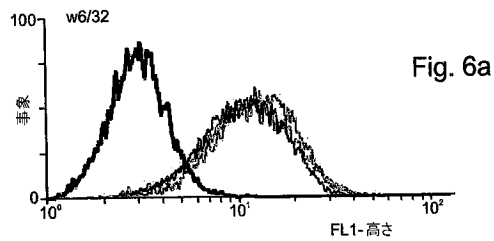
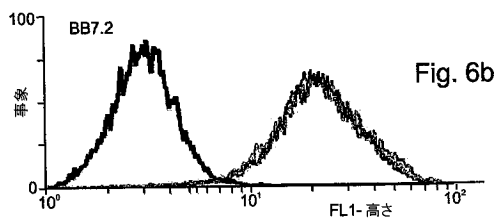


Fig. 5b

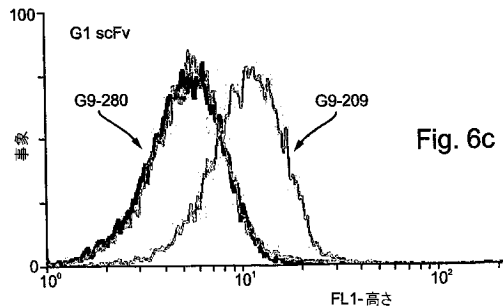
【図 6 a】



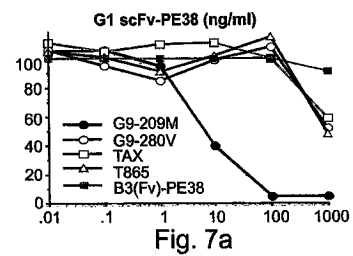
【図 6 b】



【図 6 c】



【図 7 a】



【図 7 b】

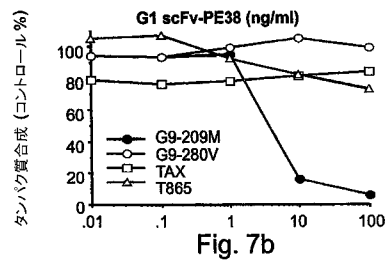


Fig. 7b

【図 7 c】

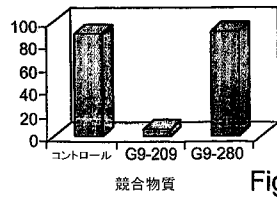


Fig. 7c

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL03/00105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 31/00, 39/00, 39/395; C07K 16/00, 17/00; C12P 21/00, 21/08
 US CL : 424/130.1, 136.1, 141.1, 178.1; 514/2; 530/387.1, 388.1, 391.3, 391.7; 536/25.53; 800/4
 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, 136.1, 141.1, 178.1; 514/2; 530/387.1, 388.1, 391.3, 391.7; 536/25.53; 800/4

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Please See Continuation Sheet

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, P	COHEN et al. Direct Detection and Quantitation of a Distinct T-Cell Epitope Derived from Tumor-specific Epithelial Cell-associated Mucin Using Human Recombinant Antibodies Endowed with the Antigen-specific, Major Histocompatibility Complex-restricted Specificity of T cells. CANCER RESEARCH. October 15, 2002, Vol. 62, pages 3835-3844, entire article, especially abstract.	1-61
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.	1-61
Y	CHAMES et al. Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-MAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library. PNAS, Vol. 97, No. 14, pages 7969-7974, entire article, especially abstract.	1-61
Y	WO 97/02342 A1 (KOBEN-HAVNS UNIVERSITET [DK/DK]) 23 January 1997 (23.01.97), entire document.	1-61

☐ 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	"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
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

23 June 2003 (23.06.2003)

Date of mailing of the international search report

23 JUL 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Mell Stop PCT, Attn: ISA/US
 Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. (703)305-3230

Authorized Officer

Marilene DiBriano, Ph.D.
 Marilene DiBriano, Ph.D.

Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IL03/00105

Continuation of Item 4 of the first sheet:

The title is over 17 words in length.

HIGH AFFINITY ANTIBODY HAVING A TCR-LIKE SPECIFICITY AND USE IN DETECTION AND TREATMENT

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 2:

SEQ ID NO: 8 against nucleic acid databases (BenEmbl, EST, N_Geneseq_101002)

SEQ ID NO: 9 against protein databases (PIR_73, Swiss Prot_40, SPTREMBL_21, A_Geneseq_101002)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST 2.1, STN (EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, SCISEARCH)

search terms: inventor's names, antiOMHC antibodies, class I mhc peptide complexes, conformational determinants, single chain, peptides, glscfv, mrna, phage display library, transgenic

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18	A 6 1 P 31/12	
C 1 2 P 21/02	A 6 1 P 37/02	
C 1 2 Q 1/02	C 0 7 K 7/06	
G 0 1 N 33/53	C 0 7 K 16/18	
G 0 1 N 33/569	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/574	C 1 2 Q 1/02	
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/569	L
	G 0 1 N 33/574	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,M X,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

(72)発明者 デンクベルグ, ガリト

イスラエル, 3 6 0 0 1 ノフィット, ジルボア 6 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA04 CA12 CA20 DA02 EA03 EA04
FA10 GA11 HA01 HA17
4B063 QA01 QA07 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS03 QS25 QX02
4B064 AG26 CA19 CC24 DA01 DA13
4C085 AA13 AA14 AA22 AA26 AA27 BB17 DD62
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA01 DA75 DA83 EA20
EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005521389A5	公开(公告)日	2006-02-09
申请号	JP2003567383	申请日	2003-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	技术研究及发展基金有限公司		
申请(专利权)人(译)	Technion工业研究与发展基金有限公司		
[标]发明人	レイテルヨラム デンクベルグガリト		
发明人	レイテル, ヨラム デンクベルグ, ガリト		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P31/12 A61P37/02 C07K7/06 C07K16/18 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/2833 A61K47/6849 A61K2039/505 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.C A61K39/395.D A61K39/395.L A61K39/395.S A61P31/12 A61P37/02 C07K7/06 C07K16/18 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/569.L G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QX02 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA22 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB17 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/DA83 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	10/073301 2002-02-13 US		
其他公开文献	JP4272535B2 JP2005521389A		

摘要(译)

一种分离的分子，其包含与低于20纳摩尔，优选低于10纳摩尔的结合亲和力和特异性结合的抗体，其与人类主要组织相容性复合物 (MHC) I类与HLA限制性抗原复合并且任选地还包含可识别或治疗部分与抗体偶联。