

(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2010-527919

(P2010-527919A)

(43) 公表日 平成22年8月19日 (2010.8.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C O 7 K 14/54 Z N A	4 B O 2 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 7
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-507463 (P2010-507463)
 (86) (22) 出願日 平成20年5月9日 (2008.5.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年1月12日 (2010.1.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/005918
 (87) 国際公開番号 W02008/143794
 (87) 国際公開日 平成20年11月27日 (2008.11.27)
 (31) 優先権主張番号 60/928, 900
 (32) 優先日 平成19年5月11日 (2007.5.11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504090190
 アルター・バイオサイエンス・コーポレー
 ション
 アメリカ合衆国 フロリダ州 33025
 ミラマー ノース・コマー・パークウ
 ェイ 2810号
 (74) 代理人 100102668
 弁理士 佐伯 憲生
 (72) 発明者 ヒン シー ウォン
 アメリカ合衆国 フロリダ州 33332
 ウェストン ウェントワース 2966
 (72) 発明者 ピーター ロード
 アメリカ合衆国 フロリダ州 33025
 ミラマー ノース・コマー・パークウ
 ェイ 2810

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 融合分子及び I L - 1 5 変異体

(57) 【要約】

本発明は、治療的及び診断的用途を有する可溶性融合タンパク質複合体及び I L - 1 5 変異体、並びにそのようなタンパク質を作製する方法を提供する。本発明は、さらに、本発明に係る融合タンパク質複合体及び I L - 1 5 変異体を用いて、哺乳動物における免疫応答を促進又は抑制する方法も提供する。

【選択図】 図 1 A

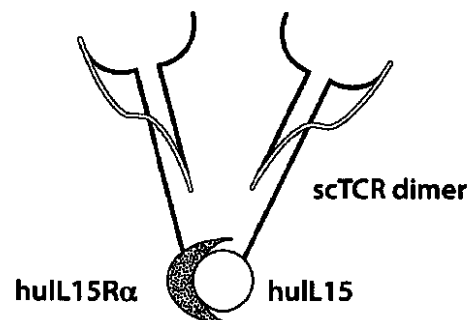


Fig. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも二つの可溶性融合タンパク質を含有する可溶性融合タンパク質複合体であって、

第一の融合タンパク質が、(a) 第一の生物活性ポリペプチドであって、(b) インターロイキン 15 (IL-15) ポリペプチド又はその機能的断片に共有結合しているポリペプチドを含有してなり、

第二の融合タンパク質が、(c) 第二の生物活性ポリペプチドであって、(d) 可溶性インターロイキン 15 受容体 α 鎖 (IL-15 R α) ポリペプチド又はその機能的断片に共有結合しているポリペプチドを含有してなり、

第一の融合タンパク質の IL-15 ドメインが、第二の融合タンパク質の可溶性 IL-15 R α ドメインに結合して可溶性の融合タンパク質複合体を形成している、可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2】

第一及び第二の生物活性ポリペプチドのうち一つが、第一の可溶性 T 細胞受容体 (TCR) 又はその機能的断片を含有してなる、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 3】

別の生物活性ポリペプチドが、請求項 2 に記載の第一の可溶性 TCR 又はその機能的断片を含有してなり、それによって、結合活性が増大した多価の TCR 融合タンパク質複合体が産生される、請求項 2 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 4】

別の生物活性ポリペプチドが、第一の可溶性 TCR とは異なる、第二の可溶性 TCR 又はその機能的断片を含有してなる、請求項 2 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 5】

TCR が特定の抗原の認識について特異的である、請求項 2 ～ 4 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 6】

TCR が、TCR の α 鎖及び β 鎖を含有してなるヘテロ二量体である、請求項 2 ～ 4 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 7】

TCR が単鎖 TCR ポリペプチドを含有してなる、請求項 2 ～ 4 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 8】

単鎖 TCR が、ペプチドリンカー配列によって、TCR の V- β 鎖に共有結合している TCR V- α 鎖を含有してなる、請求項 7 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 9】

単鎖 TCR が、TCR の V- β 鎖に共有結合している可溶性 TCR C β 鎖断片をさらに含有してなる、請求項 8 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 10】

単鎖 TCR が、TCR の V- α 鎖に共有結合している可溶性 TCR C α 鎖断片をさらに含有してなる、請求項 8 又は 9 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 11】

第一及び第二の生物活性ポリペプチドの一方又は両方が、抗体又はその機能的断片を含有してなる、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 12】

抗体が、特定の抗原の認識について特異的である、請求項 11 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 13】

抗体が単鎖抗体又は単鎖 Fv である、請求項 11 又は 12 に記載の可溶性融合タンパク

10

20

30

40

50

質複合体。

【請求項 14】

単鎖抗体が、ポリペプチドリinker配列によって、免疫グロブリン重鎖可変ドメインに共有結合している免疫グロブリン軽鎖可変ドメインを含有してなる、請求項 13 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 15】

IL-15 ポリペプチドが、天然型 IL-15 ポリペプチドとは異なったアミノ酸配列を含有してなる IL-15 変異体である、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 16】

IL-15 変異体が、IL-15 のアゴニスト又はアンタゴニストとして機能する、請求項 15 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 17】

IL-15 変異体が、天然型 IL-15 ポリペプチドと比較して、IL-15 R β γ C 受容体に対し増加した結合活性を有するか、又は低下した結合活性を有する、請求項 15 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 18】

IL-15 変異体の配列が、天然型 IL-15 配列と比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸の変化を有している、請求項 15 ～ 17 のいずれか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 19】

アミノ酸の変化が、IL-15 R β 及び／又は γ C と相互作用する IL-15 のドメインにおけるアミノ酸の置換又は欠失である、請求項 18 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 20】

アミノ酸の変化が、成熟型ヒト IL-15 配列（配列番号：1）の 8 位、61 位、65 位、72 位、92 位、101 位、108 位、又は 111 位における 1 個又はそれ以上のアミノ酸の置換又は欠失である、請求項 18 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 21】

アミノ酸の変化が、成熟型ヒト IL-15 配列の 8 位における D から N 又は A への置換、61 位における D から A への置換、65 位における N から A への置換、72 位における N から R への置換、又は 108 位における Q から A への置換、又はこれらの置換を組み合わせたものである、請求項 18 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 22】

アミノ酸の変化が、IL-15 アンタゴニスト活性を有するか、天然型 IL-15 ポリペプチドと比較して、IL-15 R β γ C 受容体に対する結合活性が低下している IL-15 変異体を生じさせる、請求項 21 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 23】

アミノ酸の変化が、成熟型ヒト IL-15 配列の 72 位における N から D への置換である、請求項 18 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 24】

アミノ酸の変化が、IL-15 アゴニスト活性を有するか、又は天然型 IL-15 ポリペプチドと比較して、IL-15 R β γ C 受容体に対する結合活性が増加している IL-15 変異体を生じさせる、請求項 23 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 25】

第一の生物活性ポリペプチドが、ポリペプチドリinker配列によって、IL-15 ポリペプチド（又はその機能的断片）に共有結合している、請求項 1 ～ 24 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 26】

第二の生物活性ポリペプチドが、ポリペプチドリinker配列によって、IL-15 R α

10

20

30

40

50

ポリペプチド（又はその機能的断片）に共有結合している、請求項 1～25 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 27】

T C R ドメインに対する抗原が、M H C 分子又は H L A 分子の中で提示されるペプチド抗原を含有してなる、請求項 5 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 28】

ペプチド抗原が、腫瘍関連ポリペプチド又はウイルスにコードされたポリペプチドに由来する、請求項 27 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 29】

抗体ドメインに対する抗原が、細胞表面受容体又はリガンドを含有してなる、請求項 12 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

10

【請求項 30】

抗原が、C D 抗原、サイトカイン若しくはケモカインの受容体又はリガンド、増殖因子の受容体又はリガンド、細胞接着分子、M H C / M H C 様分子、F C 受容体、T o l l 様受容体、N K 受容体、T C R、B C R、陽性／陰性共刺激受容体又はリガンド、細胞死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、又はウイルスコード抗原を含有してなる、請求項 12 又は 29 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 31】

I L - 1 5 R a ポリペプチドが、I L - 1 5 ポリペプチドに結合できる、I L - 1 5 受容体アルファの細胞外ドメインを含有してなる、請求項 1～30 及び 73～74 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

20

【請求項 32】

I L - 1 5 R a ポリペプチドが、I L - 1 5 a S u s h i ドメイン或いは I L - 1 5 a Δ E 3 ドメインを含有してなる、請求項 1～31 及び 73～74 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 33】

請求項 1～30 及び 73～74 の何れか一項に記載の第一の融合タンパク質をコードする核酸配列。

【請求項 34】

請求項 1～32 及び 73～74 の何れか一項に記載の第二の融合タンパク質をコードする核酸配列。

30

【請求項 35】

核酸配列が、融合タンパク質をコードする配列に動作可能に連結しているプロモーター、翻訳開始シグナル、及びリーダー配列をさらに含有してなる、請求項 33 又は 34 に記載の核酸配列。

【請求項 36】

請求項 33 に記載の核酸配列を含有してなる D N A ベクター。

【請求項 37】

請求項 34 に記載の核酸配列を含有してなる D N A ベクター。

【請求項 38】

請求項 33 及び 34 に記載の核酸配列を含有してなる D N A ベクター。

40

【請求項 39】

請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法であって、方法が：

a) 第一の融合タンパク質をコードする、請求項 36 に記載の D N A ベクターを第一の宿主細胞に導入すること；

b) 細胞又は培地の中で第一の融合タンパク質を発現させるのに十分な条件下で、培地において第一の宿主細胞を培養すること；

c) 宿主細胞又は培地から第一の融合タンパク質を精製すること；

d) 第二の融合タンパク質をコードする、請求項 37 に記載の D N A ベクターを第二の宿主細胞の中に導入すること；

50

e) 細胞又は培地の中で第二の融合タンパク質を発現させるのに十分な条件下で、培地において第二の宿主細胞を培養すること；

f) 宿主細胞又は培地から第二の融合タンパク質を精製すること；及び

g) 第一の融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと、第二の融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R a ドメインとを結合させて、可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な条件下で、第一の融合タンパク質と第二の融合タンパク質を混合すること；
を含有してなる方法。

【請求項 4 0】

請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法であって、方法が：

a) 第一の融合タンパク質をコードする、請求項 3 6 に記載の D N A ベクター、及び第二の融合タンパク質をコードする、請求項 3 7 に記載の D N A ベクターを、宿主細胞に導入すること；

b) 細胞又は培地の中で融合タンパク質を発現させ、かつ、第一の融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと第二の融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R a ドメインとを結合させて可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な条件下で、宿主細胞を培地内で培養すること；及び

c) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製すること；
を含有してなる方法。

【請求項 4 1】

請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法であって、方法が：

a) 第一及び第二の融合タンパク質をコードする、請求項 3 8 に記載の D N A ベクターを宿主細胞に導入すること；

b) 細胞又は培地の中で融合タンパク質を発現させ、かつ、第一の融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと第二の融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R a ドメインとを結合させて可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な条件下で、培地内で宿主細胞を培養すること；及び

c) 宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製すること；
を含有してなる方法。

【請求項 4 2】

標的細胞を死滅させる方法であって、方法が：

a) 複数の細胞を、請求項 1 ～ 3 2 に記載の可溶性融合タンパク質複合体に接触させることであって、該複数の細胞が、請求項 1 に記載の I L - 1 5 ドメインによって認識される I L - 1 5 R 鎖を産生する免疫細胞、及び請求項 1 に記載の生物活性ポリペプチドの少なくとも一つによって認識される抗原を産生する標的細胞をさらに含有してなること；

b) 標的細胞上の抗原と免疫細胞上の I L - 1 5 R 鎖との間に、免疫細胞に結合して活性化させるのに十分な特異的結合複合体（架橋）を形成させること；及び

c) 結合した活性化免疫細胞によって標的細胞を死滅させること；
を含有してなる方法。

【請求項 4 3】

標的細胞が、腫瘍細胞又はウイルス感染細胞である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

生物活性ポリペプチドが T C R を含有してなる、請求項 4 2 又は 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

標的細胞上の抗原が、M H C 分子又は H L A 分子の中に提示され、T C R によって認識される腫瘍ペプチド抗原又はウイルスにコードされたペプチド抗原を含有してなる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

免疫細胞が、T 細胞、L A K 細胞、又は N K 細胞である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】

疾患細胞が疾患関連抗原を発現している患者における疾患を予防又は治療する方法であ

10

20

30

40

50

って、方法が：

a) 疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含有してなる、請求項 1～3 2 及び 7 3～7 4 のいずれか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体を患者に投与すること；

b) 抗原を発現する疾患細胞と、I L－1 5 Rを発現する免疫細胞との間に特異的結合複合体（架橋）を形成させて、免疫細胞を局在化させること；及び

c) 患者における疾患を予防又は治療するのに十分なほど、疾患細胞を損傷又は死滅させること；

を含有してなる方法。

【請求項 4 8】

疾患細胞が疾患関連抗原を発現する患者における疾患を予防又は治療する方法であって、方法が：

a) I L－1 5 R鎖を有する免疫細胞を、疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含有してなる、請求項 1～2 2 及び 7 3 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体と混合すること；

b) 免疫細胞－融合タンパク質複合体混合物を患者に投与すること；

c) 抗原を発現する疾患細胞と、I L－1 5 Rを発現する免疫細胞との間に免疫細胞を局在化させるのに十分な特異的結合複合体（架橋）を形成させること；及び

d) 患者における疾患を予防又は治療するのに十分なほど、疾患細胞を損傷又は死滅させること；

を含有してなる方法。

【請求項 4 9】

疾患が、癌又はウイルス感染症である、請求項 4 7 又は 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

疾患関連抗原がペプチド／M H C 複合体である、請求項 4 7 又は 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 1】

請求項 1～3 2 及び 7 3～7 4 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体の有効量を哺乳動物に投与することを含有してなる、哺乳動物において免疫応答を刺激する方法。

【請求項 5 2】

請求項 1～3 2 及び 7 3～7 4 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体の有効量を哺乳動物に投与することを含有してなる、哺乳動物において免疫応答を抑制する方法。

【請求項 5 3】

少なくとも一つの可溶性融合タンパク質が、検出可能な標識を含有してなる、請求項 1～3 2 及び 7 3～7 4 の何れか一項に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 5 4】

検出可能な標識が、ビオチン、ストレプトアビジン、酵素若しくはその触媒活性断片、放射性核種、ナノ粒子、常磁性金属イオン、又は蛍光性、リン光性、若しくは化学発光性の分子である、請求項 5 3 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 5 5】

細胞又は組織上に提示された抗原を含有してなる細胞若しくは組織を検出する方法であって、方法が：

a) 抗原と、可溶性融合タンパク質複合体の生物活性ポリペプチドとの間に特異的結合複合体を形成させる条件下で、当該細胞若しくは組織を、少なくとも一つの請求項 5 4 に記載の可溶性融合タンパク質複合体に接触させること；

b) 抗原に結合していない何れかの可溶性融合タンパク質複合体を除去するのに適した条件下で、当該細胞若しくは組織を洗浄すること；及び

c) 抗原を含有してなる細胞若しくは組織の指標である特異的結合複合体を検出すること；

10

20

30

40

50

を含有してなる方法。

【請求項 56】

生物活性ポリペプチドが TCR を含有してなり、抗原が、当該 TCR に認識される MHC 分子又は HLA 分子の中に提示されたペプチド抗原を含有してなる、請求項 55 に記載の方法。

【請求項 57】

天然型の IL-15 ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列であるアミノ酸配列を含有してなる IL-15 変異体であって、当該 IL-15 変異体が、天然型 IL-15 ポリペプチドと比較して、IL-15 R β γ C 受容体に対して増加した、又は低下した結合活性を有する、IL-15 変異体。

10

【請求項 58】

IL-15 変異体が IL-15 のアゴニスト又はアンタゴニストとして機能する、請求項 57 に記載の IL-15 変異体複合体。

【請求項 59】

IL-15 変異体の配列が、天然型 IL-2 配列と比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸の変化を有する、請求項 57 に記載の IL-15 変異体複合体。

【請求項 60】

アミノ酸の変化が、IL-15 R β 及び／又は γ C と相互作用する IL-15 のドメインにおけるアミノ酸の置換又は欠失である、請求項 59 に記載の IL-15 変異体複合体。

20

【請求項 61】

アミノ酸の変化が、成熟ヒト IL-15 の配列の 8 位、61 位、65 位、72 位、92 位、101 位、108 位、又は 111 位における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸の置換又は欠失である、請求項 59 に記載の IL-15 変異体複合体。

【請求項 62】

アミノ酸の変化が、成熟型ヒト IL-15 配列の 8 位における D から N 又は A への置換、61 位における D から A への置換、65 位における N から A への置換、72 位における N から R への置換、又は 108 位における Q から A への置換、又はこれらの置換を組み合わせたものである、請求項 59 に記載の IL-15 変異体複合体。

【請求項 63】

アミノ酸の変化が、IL-15 アンタゴニスト活性を有するか、又は天然型 IL-15 ポリペプチドと比較して、IL-15 R β γ C 受容体に対する結合活性が低下している IL-15 変異体を生じさせる、請求項 62 に記載の IL-15 変異体複合体。

30

【請求項 64】

アミノ酸の変化が、成熟型ヒト IL-15 配列の 72 位における N から D への置換である、請求項 59 に記載の IL-15 変異体複合体。

【請求項 65】

アミノ酸の変化が、IL-15 アゴニスト活性を有するか、又は天然型 IL-15 ポリペプチドと比較して、IL-15 R β γ C 受容体に対する結合活性が増加している IL-15 変異体を生じさせる、請求項 64 に記載の IL-15 変異体複合体。

40

【請求項 66】

請求項 57～65 に記載の IL-15 変異体をコードする核酸配列。

【請求項 67】

請求項 66 に記載の核酸配列を含有してなる DNA ベクター。

【請求項 68】

請求項 67 に記載のベクターを含有してなる宿主細胞。

【請求項 69】

請求項 57 に記載の IL-15 変異体を製造する方法であって、方法が：

b) IL-15 変異体を発現させるのに十分な条件下で、請求項 68 に記載の宿主細胞を培養することを含有して、

50

それによって、I L-15 変異体を製造する方法。

【請求項 70】

さらに、I L-15 変異体を精製することを含有している、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 71】

有効量の請求項 57～65 に記載の I L-15 変異体を哺乳動物に投与することを含有している、哺乳動物における免疫応答を刺激する方法。

【請求項 72】

有効量の請求項 57～65 に記載の I L-15 変異体を哺乳動物に投与することを含有している、哺乳動物における免疫応答を抑制する方法。

【請求項 73】

10

第一の生物活性ポリペプチドが、T C R α ポリペプチド又はその機能的断片を含み、そして第二の生物活性ポリペプチドが、T C R β ポリペプチド又はその機能的断片を含有してなる、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 74】

第一の生物活性ポリペプチドが、抗体重鎖ポリペプチド又はその機能的断片を含み、そして第二の生物活性ポリペプチドが、抗体軽鎖ポリペプチド又はその機能的断片を含有してなる、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

(関連出願)

本出願は、2007年5月11日に出願された米国仮出願第60/928,900号の優先権を主張するものであり、その全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

(政府による支援)

1.1 本出願に対する研究支援は、保健社会福祉省 (the Department of Health and Human Services) 長官によって代表されるアメリカ合衆国によって行われた。

【背景技術】

【0003】

30

T細胞受容体 (T C R) は、治療薬を開発するための基盤として独自の利点を有する、免疫系の主要エフェクターである。抗体治療薬は、血液中及び細胞外空間における病原体、又は細胞表面上にあるタンパク質標的を認識することに限定されるのに対し、T細胞受容体は、細胞表面上にあるMHC分子によって提示される抗原 (細胞内タンパク質に由来する抗原を含有する) を認識することができる。提示された抗原を認識して活性化するT細胞のサブタイプに応じて、T細胞受容体及びT細胞受容体を有するT細胞が、さまざまな免疫応答を調節するのに関与することができる。例えば、T細胞は、B細胞が抗体産生細胞へと分化するのを誘導することによって、液性免疫応答の制御に関与する。また、活性化されたT細胞は、細胞媒介型免疫応答を開始させるよう作用する。このように、T細胞受容体は、抗体では利用することができない別の標的を認識することができる。

【0004】

40

T細胞は、他の型の免疫細胞 (多形核細胞、好酸球、好塩基球、マスト細胞、B細胞、N K細胞) と共に免疫系の細胞成分を構成する細胞のサブグループである。生理的条件下において、T細胞は、免疫監視機能及び外来抗原を排除する機能を有する。しかし、病理的条件下では、T細胞が疾患の原因及び伝達に大きな役割を果たしているという有力な証拠がある。これらの疾患では、中枢又は末梢におけるT細胞免疫寛容破綻が、自己免疫疾患をもたらす基本的な過程である。

【0005】

T C R は、免疫系の発達及び機能において重要な役割を果たすと考えられている。例えば、T C R は、細胞死滅を介して、B細胞の増殖を高め、さらに、癌、アレルギー、ウイルス感染症、及び自己免疫疾患を含有するさまざまな疾患の発症及び重篤度に影響を与え

50

ることが報告されている。

【0006】

そのため、T細胞受容体に基づいた新規の標的薬剤、及びそのような薬剤を治療用及び診断用に製造及び使用する方法を提供することが望ましいであろう。したがって、抗体標的に基づいた従来技術による複合体と比較してある特定の利点を有すると思われる分子を提供することが特に望ましいであろう。

【0007】

さらには、TCRを用いて、さまざまなエフェクター分子を疾患部位に対して標的にして、そこでそれらが、標的としていない活性系に関連した副作用なしで、治療上の恩恵を提供できるようにすることが望ましい。そのようなものの一つが、リンホカインの4つの α -ヘリックスバンドル(helix bundle)ファミリーの一員であるIL-15である。IL-15は、免疫系の発達及び制御において多面的な役割を果たしている。すなわち、IL-15は、CD8+T細胞、NK細胞、キラーT細胞、B細胞、腸管上皮内リンパ球(IEL)、及び抗原提示細胞(APC)の機能、発達、生存、及び増殖に影響を与える。IL-15ノータランスジェニックマウス及びIL-15Raノータランスジェニックマウスの両方が、末梢NK及びキラーT細胞集団、ある特定のIELサブセット、及びほとんどのメモリー表現型CD8+T細胞を有していないことが明らかにされており、IL-15がこれらの細胞型の発達、増殖又は及び生存に関与することを示唆している。IL-15受容体(R)は、型特異的なIL-15R α 鎖(「IL-15R α 」又は「IL-15Ra」)、IL-2/IL-15R β 鎖(「IL-2R β 」又は「IL-15Rb」)及び共通 γ 鎖(多数のサイトカイン受容体に共有されている「 γ C」又は「gC」という3つのポリペプチドから構成される。

【0008】

IL-15のシグナル伝達は、IL-15R α 、IL-2R β 及び γ Cのヘテロ三量体複合体を介して、IL-2R β 及び γ Cのヘテロ二量体複合体を介して生じ得る。新規なIL-15作用の機構は、IL-15及びIL-15R α が抗原提示細胞(単核球及び樹状細胞)によって協調的に発現され、IL-15R α に結合したIL-15が、IL-15R β γ C受容体のみを発現している、隣接したNK細胞又はCD8T細胞にトランスで提示されるというトランス提示(transpresentation)の機構である。免疫学的シナプスで起きる共刺激的(co-stimulatory)事象として、現在IL-15のトランス提示が、インビボにおけるIL-15作用の主要機構であり、腫瘍免疫監視において主要な役割を果たしていると見られている(Waldmann,TA,2006,Nature Rev.Immunol.6:595-601)。エキソソーム3の欠失及びN末端にいわゆる「スシ(sushi)」ドメインを含有するアイソフォームを誘導する可溶性IL-2R α サブユニットが、サイトカイン結合に関与する構造要素のほとんどを有していることが明らかになっている。IL-2R α 単独では、IL-2に対する低親和性受容体である($K_d \sim 10$ nM)であるが、IL-15R α は、高い親和性($K_d \sim 100$ pM)でIL-15に結合する。従って、可溶性のIL-2R α とIL-15は、溶液中で安定したヘテロ二量体複合体を形成することができ、これらの複合体は、中程度又は高い親和性(アフィニティー)を有するIL-15R複合体を介して、免疫応答を制御する(すなわち、刺激する又は阻害する)ことができる(Mortier et al. 2006 . J Biol Chem 281:1612-1619; Stoklasek et al. 2006, J Immunol 177:6072-6080; Rubinstein et al. 2006. Proc Natl Acad Sci USA 103:9166-9171)。

【0009】

免疫系に対するIL-15の既知の効果を踏まえて、宿主にとって有用になるよう免疫系を操作するために、IL-15を利用する多くの方法が研究されてきた。IL-15の投与は、免疫応答を強化するか、免疫系再構築を増強するために用いられてきたが、IL-15活性の阻害によって、自己免疫及びその他の望ましくない免疫応答を抑制することができる(Waldmann, TA, 2006, Nature Rev. Immunol. 6:595-601)。実際には、全身的なIL-15治療に伴う制限の一つは、自己免疫疾患を誘発する可能性があることである。別の制限には、この細胞を標準的な哺乳動物細胞発現系で産生させるのが困難なこと、

及びインビボにおける半減期が非常に短いことなどが含まれる。したがって、より長いインビボ半減期、免疫細胞に結合する活性の増加、又は生物活性促進を示す、IL-15の好適な免疫活性化療法の形態を作出する必要がある。さらに、有効なIL-15アンタゴニストも必要である。理想的には、そのような分子は、選択的に疾患部位を標的にして不要な全身毒性を避けることができ、より効果の高い治療有用性を提供できることが望ましいと考えられる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、治療的用途を有する、多くのIL-15変異体及び可溶性融合複合体、並びにそのようなタンパク質を作製する方法を提供する。本発明は、本発明に係る可溶性融合複合体を用いて、標的細胞を死滅させる方法を提供する。本明細書に記載されているIL-15変異体及び可溶性複合体は、潜在的な治療有用性を有する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

したがって、一つの態様において、本発明は、少なくとも2つの可溶性融合タンパク質を含有する可溶性融合タンパク質複合体であって、第一の融合タンパク質が、インターロイキン15(IL-15)又はその機能的断片に共有結合している第一の生物活性ポリペプチドを含み、かつ、第二の融合タンパク質が、可溶性インターロイキン15受容体 α 鎖(IL-15Ra)ポリペプチド又はその機能的断片に共有結合している第二の生物活性ポリペプチドを含み、第一の融合タンパク質のIL-15ドメインが、第二の融合タンパク質の可溶性IL-15Raドメインに結合して可溶性の融合タンパク質複合体を形成する、可溶性融合タンパク質複合体を提供する。

【0012】

一つの態様では、第一及び第二の生物活性ポリペプチドの一つが、第一の可溶性T細胞受容体(TCR)、又はその機能的断片を含有する。別の態様では、これらの生物活性ポリペプチドの別の一つが、第一の可溶性TCR又はその機能的断片を含み、それによって、結合活性が増加した多価性のTCR融合タンパク質複合体を創出する。さらに別の態様では、もう一方の生物活性ポリペプチドが、第一の可溶性TCRとは異なる第二の可溶性TCR又はその機能的断片を含有する。

【0013】

本態様の別の実施態様では、このTCRは、特定の抗原を認識するのに特異的である。

【0014】

本態様のさらなる実施態様では、このTCRは、TCRの α 鎖及び β 鎖を含有するヘテロ二量体である。

【0015】

本態様のさらに別の実施態様では、このTCRは、単鎖TCRポリペプチドを含有する。さらなる態様では、この単鎖TCRは、ペプチドリンカー配列によってTCRのV β 鎖に共有結合したTCR V α 鎖を含有する。別のさらなる態様では、この単鎖TCRは、さらに、TCRのV β 鎖に共有結合した可溶性TCR C β 鎖断片を含有する。

【0016】

別の態様では、この単鎖TCRは、TCR V α 鎖に共有結合した可溶性TCR C α 鎖断片をさらに含有する。

【0017】

さらなる態様では、第一及び第二の生物活性ポリペプチドの一方又は両方は、抗体又はその機能的断片を含有する。

【0018】

さらに別の態様では、抗体は、特定の抗原の認識について特異的である。さらなる態様では、抗体は、単鎖抗体又は単鎖Fvである。別の特定の態様では、単鎖抗体は、ポリペプチドリンカー配列によって、免疫グロブリンの重鎖可変領域に共有結合した免疫グロブ

リン軽鎖可変ドメインを含有する。

【0019】

上記態様の一つの実施態様では、第一の生物活性ポリペプチドは、ポリペプチドリンカー配列によって、I L-15（又はその機能的断片）に共有結合している。

【0020】

上記態様の別の実施態様では、第二の生物活性ポリペプチドは、ポリペプチドリンカー配列によって、I L-15 R a ポリペプチド（又はその機能的断片）に共有結合している。

【0021】

別の態様では、T C R ドメインに対する抗原は、M H C 分子又はH L A 分子に存在するペプチド抗原を含有する。さらなる態様では、ペプチド抗原は、腫瘍関連ポリペプチド又はウイルスにコードされているポリペプチドに由来する。

【0022】

別の態様では、抗体ドメインに対する抗原は、細胞表面の受容体又はリガンドを含有する。

【0023】

さらなる態様では、抗原は、C D 抗原、サイトカインもしくはケモカインの受容体若しくはリガンド、増殖因子の受容体若しくはリガンド、組織因子、細胞接着分子、M H C / M H C 様分子、F C 受容体、T o l l 様受容体、N K 受容体、T C R、B C R、陽性／陰性の共刺激受容体もしくは共刺激リガンド、細胞死受容体もしくは細胞死リガンド、腫瘍関連抗原、又はウイルスにコードされている抗原を含有する。

【0024】

上記態様の別の実施態様では、I L-15 R a ポリペプチドは、I L-15 と結合することができる、I L-15 受容体アルファ（ α 鎖）の細胞外ドメインを含有する。

【0025】

上記態様の別の実施態様では、I L-15 R a ポリペプチドは、I L-15 a のシドメイン（Wei et al. Journal of Immunology, 2001, 167:277-282）又はI L-15 a Δ E 3 ドメイン（Anderson et al. 1995, J. Biol. Chem. 270:29862-29869; Dubois et al. 1999, J. Biol. Chem. 274:26978-26984）を含む。

【0026】

別の態様において、本発明は、天然型の（又は、野生型）I L-15 タンパク質とは異なるアミノ酸配列を有し、I L-15 R a ポリペプチドに結合してI L-15 のアゴニスト又はアンタゴニストとして機能するI L-15 変異体（I L-15 突然変異体とも呼ばれる）を提供する。本発明の態様では、I L-15 変異体は、非融合タンパク質として、又は上記の生物活性ポリペプチドを含有する可溶性融合タンパク質として提供され、該I L-15 変異体が、I L-15 ドメインの代わりに使用される。

【0027】

上記態様の一つの実施態様では、本発明は、本明細書に記載されている態様又は実施態様のいずれかに記載された第一の融合タンパク質をコードする核酸配列を特徴とする。

【0028】

上記態様の一つの実施態様では、本発明は、本明細書に記載されている態様又は実施態様のいずれかに記載された第二の融合タンパク質をコードする核酸配列を特徴とする。

【0029】

上記態様の一つの実施態様では、本発明は、本明細書に記載されている態様又は実施態様のいずれかに記載されたI L-15 変異体をコードする核酸配列を特徴とする。

【0030】

一つの態様では、核酸配列は、さらに、融合タンパク質又はI L-15 変異体をコードする配列に機能可能に結合されたプロモーター、翻訳開始シグナル、及びリーダー配列を含有する。別の態様では、上記の核酸配列の何れかがD N A ベクターに包含されている。

【0031】

10

20

30

40

50

別の態様において、本発明は、上記態様に係る可溶性融合タンパク質複合体を作製する方法を特徴としていて、方法は：上記の態様及び実施形態に記載された、第一の融合タンパク質をコードするDNAベクターを第一の宿主細胞に導入すること、細胞又は培地の中で第一の融合タンパク質を発現させるのに十分な条件下で、培地において第一の宿主細胞を培養すること、第一の融合タンパク質を宿主細胞又は培地から精製すること、第二の融合タンパク質をコードする、上記の態様及び実施形態に係るDNAベクターを、第二の宿主細胞の中に導入すること、細胞又は培地の中で第二の融合タンパク質を発現させるのに十分な条件下で、培地において第二の宿主細胞を培養すること、及び第二の融合タンパク質を宿主細胞又は培地から精製すること、及び、第一の融合タンパク質のIL-15ドメインと、第二の融合タンパク質の可溶性IL-15Rαドメインとを結合させて可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な条件下で、第一の融合タンパク質と第二の融合タンパク質を混合することを含有する。

10

【0032】

別の態様において、本発明は、上記態様に係る可溶性融合タンパク質複合体を作製する方法を特徴としていて、方法は：上記の態様及び実施形態に記載された、第一の融合タンパク質をコードするDNAベクターと、上記の態様及び実施形態に記載されたような、第二の融合タンパク質をコードするDNAベクターとを宿主細胞に導入すること、細胞又は培地の中で融合タンパク質を発現させ、かつ、第一の融合タンパク質のIL-15ドメインと第二の融合タンパク質の可溶性IL-15Rαドメインとを会合させて可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な条件下で、培地において宿主細胞を培養すること、及び、宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製することを含有する。

20

【0033】

さらに別の態様において、本発明は、上記態様に係る可溶性融合タンパク質複合体を作製する方法を特徴としていて、方法は：第一及び第二の融合タンパク質をコードする、請求項28に記載のDNAベクターを宿主細胞に導入すること、細胞又は培地の中で融合タンパク質を発現させ、かつ、第一の融合タンパク質のIL-15ドメインと第二の融合タンパク質の可溶性IL-15Rαドメインとを会合させて可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な条件下で、培地において宿主細胞を培養すること、宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製することを含有する。

30

【0034】

上記方法のさらに別の態様において、IL-15変異体をコードするDNAベクターを、第一の融合タンパク質をコードするDNAベクターの代わりに用いて、該IL-15変異体を発現することができる宿主細胞を作出し、該IL-15変異体を、第二の融合タンパク質のIL-15Rαドメインに会合させて、可溶性融合タンパク質複合体を形成させる。

【0035】

別の態様において、本発明は、上記態様に係るIL-15変異体を作製する方法を特徴としていて、方法は：上記の態様及び実施形態に記載された、IL-15変異体をコードするDNAベクターを宿主細胞に導入すること、細胞又は培地の中でIL-15変異体を発現させるのに十分な条件下で、培地において宿主細胞を培養すること、宿主細胞又は培地からIL-15変異体を精製することを含有する。

40

【0036】

別の態様において、本発明は、標的細胞を死滅させる方法を特徴としていて、方法は：上記態様のIL-15ドメインによって認識されるIL-15R鎖を有する免疫細胞、及び上記態様の生物活性ポリペプチドの少なくとも一つによって認識される抗原を有する標的細胞をさらに含有する複数の細胞を、上記の態様又は実施形態のいずれかに係る可溶性融合タンパク質複合体又はIL-15変異体に接触させること、標的細胞上の抗原と免疫細胞上のIL-15R鎖との間に、免疫細胞に結合して活性化させるのに十分な特異的結合複合体（ブリッジ）を形成させること、及び結合した活性化免疫細胞によって標的細胞を死滅させることを含有する。

50

【0037】

本方法の一つの態様では、標的細胞は、腫瘍細胞又はウイルス感染細胞である。

【0038】

本方法の別の態様では、生物活性ポリペプチドはTCRを含有する。

【0039】

本方法のさらに別の態様では、標的細胞上の抗原は、MHC分子又はHLA分子の中に提示され、TCRによって認識される腫瘍ペプチド抗原又はウイルスにコードされているペプチド抗原を含有する。

【0040】

本方法のさらなる態様では、免疫細胞は、T細胞、LAK細胞、又はNK細胞である。

10

【0041】

別の態様において、本発明は、疾患細胞が疾患関連抗原を発現する患者における疾患を予防又は治療する方法を特徴としていて、方法は：疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含有する、上記の態様及び実施形態のいずれかに記載された可溶性融合タンパク質複合体又はIL-15変異体を患者に投与すること、抗原を発現する疾患細胞と、IL-15Rを発現する免疫細胞との間に特異的結合複合体（ブリッジ）を形成させて、免疫細胞を局在化させること、及び疾患細胞を損傷又は死滅させて、患者における疾患を予防又は治療することを含有する。

【0042】

別の態様において、本発明は、疾患細胞が疾患関連抗原を発現する患者における疾患を予防又は治療する方法を特徴としていて、方法は：IL-15R鎖を有する免疫細胞を、疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含有する、請求項1から22に記載の可溶性融合タンパク質複合体と混合すること、この免疫細胞－融合タンパク質複合体混合物を患者に投与すること、抗原を発現する疾患細胞と、IL-15Rを発現する免疫細胞との間に特異的結合複合体（ブリッジ）を形成させて、免疫細胞を局在化させること、及び疾患細胞を損傷又は死滅させて、患者における疾患を予防又は治療することを含有する。

20

【0043】

別の態様において、本発明は、患者の細胞が疾患関連抗原を発現する患者における疾患を予防又は治療する方法を特徴としていて、方法は：患者の細胞上にある疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含有する、上記の態様又は実施形態のいずれかに記載された可溶性融合タンパク質複合体又はIL-15変異体を患者に投与すること、可溶性融合タンパク質複合体又はIL-15変異体のIL-15ドメインが、IL-15R鎖を有する免疫細胞に結合する可溶性融合タンパク質複合体又はIL-15変異体を、患者の細胞上に局在化させること、及び該免疫細胞の免疫応答を抑制することを含有する。

30

【0044】

本方法の一つの態様では、疾患は、癌又はウイルス感染症である。

【0045】

本方法の別の態様では、疾患は、免疫疾患、自己免疫疾患、又は炎症性疾患である。

【0046】

本方法の別の態様では、疾患関連抗原は、ペプチド/MHC複合体である。

40

【0047】

別の態様では、本発明は、上記の態様及び実施形態のいずれかに記載された可溶性融合タンパク質複合体又はIL-15変異体の有効量を哺乳動物に投与することを含有している、哺乳動物における免疫応答を刺激する方法を特徴とする。

別の態様では、本発明は、上記の態様及び実施形態のいずれかに記載された可溶性融合タンパク質複合体又はIL-15変異体の有効量を哺乳動物に投与することを含有している、哺乳動物における免疫応答を刺激する方法を特徴とする。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1A】図1A及びBは概略図である。図1Aは、単鎖TCRポリペプチドを含有する

50

融合タンパク質複合体の一例を描いた概略図である。

【図1B】図1Bは、融合タンパク質複合体を含有する代表的な融合タンパク質の構成を描いた概略図である。

【図2A】図2A～Cは、3つの分図からなる。図2Aは、pNEF38-c264scTCR/huIL15発現ベクターのマップを示す。

【図2B】図2Bは、c264scTCR/huIL15融合遺伝子の配列を示す。

【図2C】図2Cは、c264scTCR/huIL15融合タンパク質の、リーダー配列を含有する配列を示す。

【図3A】図3A～Cは、3つの分図からなる。図3Aは、pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15発現ベクターのマップを示す。

【図3B】図3Bは、c264scTCR-hinge-huIL15融合遺伝子の配列を示す。

【図3C】図3Cは、c264scTCR-hinge-huIL15融合タンパク質の、リーダー配列を含有する配列を示す。

【図4A】図4A～Cは、3つの分図からなる。図4Aは、pNEF38-c264scTCR/huIL15RaDE3発現ベクターのマップを示す。

【図4B】図4Bは、c264scTCR/huIL15RaΔE3融合遺伝子の配列を示す。

【図4C】図4Cは、c264scTCR/huIL15RaΔE3融合タンパク質の、リーダー配列を含有する配列を示す。

【図5A】図5A～Cは、3つの分図からなる。図5Aは、pNEF38-c264scTCR/huIL15RaSushi発現ベクターのマップを示す。

【図5B】図5Bは、c264scTCR/huIL15RaSushi融合遺伝子の配列を示す。ま

【図5C】図5Cは、c264scTCR/huIL15RaSushi融合タンパク質の、リーダー配列を含有する配列を示す。

【図6A】図6A～Cは、3つの分図からなる。図6Aは、pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15RaSushi発現ベクターを示す。

【図6B】図6Bは、c264scTCR-hinge-huIL15RaSushi融合遺伝子の配列を示す。

【図6C】図6Cは、c264scTCR-hinge-huIL15RaSushi融合タンパク質の、リーダー配列を含有する配列を示す。

【図7】pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaSush発現ベクターのマップである。

【図8】pSun-c264scTCRIL15/c264scTCRIL15RaDE3発現ベクターのマップである。

【図9】図9A及びBは、TCR/IL15Ra融合タンパク質を発現する形質転換細胞の特徴を示す図である。図9Aは、融合タンパク質発現細胞のフローサイトメトリー分析の結果を示す2つのグラフである。図9Bは、融合タンパク質産生についてのTCRを用いたELISAの結果を示すグラフである。

【図10】図10A及びBは、還元SDS-PAGEによるTCR/IL15融合タンパク質及びTCR/IL15Ra融合タンパク質の分析を示す図である。図10Aは、c264scTCR/huIL15又はc264scTCR/huIL15RaSushiを含有する細胞培養上清を示す。図10Bは、c264scTCR/huIL15又はc264scTCR/huIL15RaΔE3を含有する細胞培養上清を示す。

【図11】図11A～Cは、サイズ排除クロマトグラフィーによる、TCR/IL15、TCR/IL15Ra、及び融合タンパク質複合体の分析を示す図である。図11Aは、c264scTCR/huIL15のSECのSECクロマトグラフィープロファイルを示すグラフである。図11Bは、c264scTCR/huIL15RaSushiのSECクロマトグラフィープロファイルを示すグラフである。図11Cは、c264scT

10

20

30

40

50

CR/huIL15+c264scTCR/huIL15RαSushi融合タンパク質複合体のSECクロマトグラフィープロファイルを示すグラフである。

【図12】図12A及びBは、サイズ排除クロマトグラフィーによる、TCR/IL15Rα及び融合タンパク質複合体の分析である。図12Aは、c264scTCR/huIL15RαΔE3のSECクロマトグラフィープロファイルを示すグラフである。図12Bは、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15RαΔE3融合タンパク質複合体のSECクロマトグラフィープロファイルを示すグラフである。

【図13】図13は、フローサイトメトリーで測定して、TCR/IL15、TCR/IL15Rα、及び融合タンパク質複合体が、細胞上に提示されたペプチド/MHC複合体に結合することを示すグラフである。

【図14AB】図14A～Dは、4つの分図からなる。図14Aは、成熟ヒトIL-15タンパク質の配列（配列番号：1）を示し、青色の下線が施された残基は、表1に示すIL-15変異体で置換されている。図14Bは、pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8A発現ベクター及びpNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8N発現ベクターを示す。

【図14C-1】図14Cは、pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8A遺伝子及びpNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8N遺伝子の配列を示す。

【図14C-2】図14Cは、pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8A遺伝子及びpNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8N遺伝子の配列を示す。

【図14D-1】図14Dは、pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8A融合タンパク質及びpNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8N融合タンパク質の、リーダー配列を含有する配列を示す。青色の下線が施されたヌクレオチドを変更して、表示されているIL-15変異体を作成した。

【図14D-2】図14Dは、pNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8A融合タンパク質及びpNEF38-c264scTCR-hinge-huIL15D8N融合タンパク質の、リーダー配列を含有する配列を示す。青色の下線が施されたヌクレオチドを変更して、表示されているIL-15変異体を作成した。

【図15】図15は、IL-15R産生CTL2細胞を、融合タンパク質及び複合体で染色した後、TCR特異的ペプチド/MHC試薬で染色したもののフローサイトメトリー分析の結果を示すグラフである。

【図16】図16は、細胞増殖アッセイ法によって測定すると、融合タンパク質及び融合タンパク質複合体が、IL15R産生細胞の増殖を支持していることを示すグラフである。

【図17AB】図17A～Cは、フローサイトメトリーで測定して、TCR/IL15RαSushi、及びTCR/IL15の二量体の融合タンパク質複合体で、天然型及び変異型のIL-15を含有するものが、ペプチドを負荷された細胞上に提示された同起源のペプチド/MHC複合体に結合することを示すグラフである。ペプチド負荷のない細胞上における二量体融合タンパク質複合体のバックグランド結合も示されている。図17Aは、TCR/IL15RαSushiと、TCR/IL15wt（天然型）又はTCR/IL15D8N変異体又はTCR/IL15D8A変異体の二量体複合体が、細胞上に提示された同起源のペプチド/MHC複合体に結合することを示すグラフである。図17Bは、TCR/IL15RαSushiとTCR/IL15wt（天然型）の二量体複合体が、ペプチド負荷のない細胞に僅かにバックグランド結合することを示すグラフである。TCR/IL15RαSushiとTCR/IL15D8N変異体又はTCR/IL15D8A変異体との二量体複合体による、ペプチド負荷のない細胞へのバックグランド結合は見られなかった。

【図17C】図17Cは、TCR/IL15RαSushi及びTCR/IL15wt（天然型）、又はTCR/IL15N72D変異体、TCR/IL15D8N変異体、又は

10

20

30

40

50

T C R / I L 1 5 D 8 A 変異体の二量体複合体によって染色された、I L - 1 5 R β γ C 産生 3 2 D β 細胞のフローサイトメトリー分析の結果を示すグラフである。T C R / I L 1 5 N 7 2 D を含有する複合体の I L - 1 5 R β γ C への結合が増加し、T C R / I L 1 5 D 8 N 又は T C R / I L 1 5 D 8 A を含有する複合体の I L - 1 5 R β γ C への結合が低下することが観察された。

【図 1 8】図 1 8 A 及び B は、E L I S A によって測定された、同起源のペプチド / M H C 複合体及び I L 1 5 R α に対する、野生型 T C R / I L 1 5 融合タンパク質、アンタゴニスト T C R / I L 1 5 融合タンパク質、及びアゴニスト T C R / I L 1 5 融合タンパク質の結合活性を示すグラフである。図 1 8 A は、同起源のペプチド / M H C 複合体に対する融合タンパク質の結合活性を示す分析結果である。図 1 8 B は、I L 1 5 R α に対する融合タンパク質の結合活性を示す分析結果である。

【図 1 9 A B】図 1 9 A ~ C は、細胞増殖アッセイ法によって測定すると、I L - 1 5 変異体を含有する T C R / I L - 1 5 融合タンパク質が、I L 1 5 R 産生細胞の増殖を抑制又は促進できることを示すグラフである。図 1 9 A は、高親和性 I L 1 5 R (α β γ 受容体複合体) を産生する C T L L - 2 細胞の増殖を阻害する、I L - 1 5 変異体を含有する融合タンパク質の活性を示すグラフである。図 1 9 B は、低親和性 I L 1 5 R (β γ 受容体複合体) を産生する 3 2 D β 細胞の増殖を阻害又は促進する、I L - 1 5 変異体を含有する融合タンパク質の活性を示すグラフである。

【図 1 9 C】図 1 9 C は、高親和性 I L 1 5 R (α β γ 受容体複合体) を産生する C T L L - 2 細胞の T C R / I L 1 5 w t - 刺激による増殖を阻止する、I L - 1 5 変異体を含有する融合タンパク質の活性を示すグラフである。

【図 2 0】図 2 0 は、NK 細胞を、二量体融合タンパク質複合体の T C R / I L 1 5 R α S u s h i 及び T C R / I L 1 5 とともにインビトロでインキュベートした場合の、異種移植腫瘍担持ヌードマウスの生存率に与える影響を示す図である。胸腺欠損ヌードマウスにヒト N S C L C A 5 4 9 - A 2 細胞を注入して、肺転移を確立する。同種異系ドナーマウスの脾臓から単離して精製した NK 細胞を、r h I L - 2、M A R T 1 s c T C R - I L 2、c 2 6 4 s c T C R - I L 2、又は c 2 6 4 s c T C R - I L 1 5 / c 2 6 4 s c T C R - I L 1 5 R α とともにインビトロでインキュベートして、シクロホスファミド (C T X) でプレ処理した腫瘍産生マウスに、図面の説明書きに示すように養子導入した。処理後の生存率をプロットした。

【図 2 1】図 2 1 は、I L - 1 5 変異体におけるアミノ酸置換とそれらの変化が I L - 1 5 活性に及ぼす影響とを表 1 に示したものである。

【図 2 2】図 2 2 A 及び B は、I L - 1 5 (配列番号：1) のアミノ酸配列及び I L - 1 5 の核酸配列 (配列番号：2) をそれぞれ示している。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 9】

I L - 1 5 が I L - 1 5 R α の細胞外ドメインに安定して結合して、得られた複合体が、中程度又は高度の親和性を有する I L - 1 5 R 複合体を介して免疫応答を調節 (すなわち、刺激又は阻害) できることが確認されている (1 - 4)。また、単鎖 T C R 又は抗体ポリペプチドをサイトカイン及びその他の免疫エフェクタードメインに融合させることができ、そのような二重特異性融合分子が両方の融合ドメインの機能活性を保持することが実証されている (5 - 8)。また、多価型の T C R は、それらのリガンドへの結合増強をもたらすことが示されている (9)。

【0 0 5 0】

(定義)

以下の定義は、以下の説明において使用される特定の用語に対するものである。

【0 0 5 1】

本明細書及び特許請求の範囲において、単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈上明らかに別段の記載がないかぎり、複数形への言及を含有する。例えば、「一つの細胞」という用語には、その混合物を含有する、複数の細胞も含まれる。「一つの核酸

分子」という用語は、複数の核酸分子も含有する。

【0052】

本明細書において、「含有する」という用語は、組成物及び方法が、記載された要素を含有するが、それら以外の要素を除外しないことを意味する。「本質的に～からなる」は、組成物及び方法を定義するために用いられる場合、その組み合わせに対して何らかの本質的な意義を有するその他の要素を除外することを意味するものである。すなわち、本明細書に記載された要素から本質的に構成される組成物は、その単離精製法及び薬学的に許容される担体からの微量の混入物、例えば、リン酸塩緩衝食塩水、保存剤などを除外するものではない。「からなる」は、他の成分の微量を超える要素、及び本発明に係る組成物を投与するための実質的な方法工程を除外することを意味するものとする。これら移行部の用語のそれぞれによって定義される実施形態は、本発明の範囲に含まれる。

10

【0053】

「抗体」とは、特異的エピトープを結合する任意の免疫グロブリンであって、抗体及びその断片を含有する。この用語には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、及び単鎖抗体、並びに二重特異性抗体も包含される。

【0054】

本明細書において、「抗原」という用語は、それに対する抗体又は特異的細胞媒介性免疫応答を免疫系に生じさせる任意の物質を意味する。疾患関連抗原とは、任意の病気に関連した任意の物質のことである。

【0055】

本明細書において、「生物活性ポリペプチド」という用語は、本明細書で検討されているような所望の効果を生じることができるタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドなどのアミノ酸配列；糖又は多糖；脂質又は糖脂質、糖タンパク質、又はリボタンパク質を意味するものとし、抗原結合活性を有するTCRもしくは抗体の融合タンパク複合体を含んでいる。

20

【0056】

本明細書において、「細胞」という用語は、任意の原核細胞、真核細胞、初代細胞、又は不老化細胞株を意味し、組織又は器官に存在する細胞などの任意のグループも意味する。好ましくは、細胞は、哺乳類、特にヒト由来の細胞であり、一つ以上の病原体に感染することが可能なものである。本発明に適合する「宿主細胞」は、原核細胞、真核細胞、哺乳類細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、植物細胞、又は細菌細胞など、任意の由来の形質移入、形質転換、形質導入、又は感染した細胞であってもよく、又は本明細書記載の核酸を増殖させるのに用いることができる任意の起源の細胞であってもよい。

30

【0057】

本明細書において、「結合分子」という用語は、TCR分子又は抗体分子、及びエフェクター分子を意味し、通常、化学的方法又はその他の適当な方法によって共有結合（すなわち、融合）した化学分子又は合成分子である。必要ならば、結合分子を、ペプチドリンカー配列又は担体分子を介して一つ又はいくつかの部位で融合させることができる。あるいは、ペプチドリンカー又は担体を用いて、結合分子の構築に役立たせることも可能である。特に好適な結合分子は、結合毒素又は検出可能な標識である。

40

【0058】

本明細書において、「エフェクター分子」という用語は、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドなどのアミノ酸配列；糖又は多糖；脂質又は糖脂質、糖タンパク質、リボタンパク質又は化学物質であって、本明細書で検討されている所望の効果を生じさせることができるものを意味し、IL-15ドメイン、IL-15変異体、又はIL-15R α 、IL-2R β もしくは γ CなどのIL-15受容体、又はこれらの機能的断片を含んでいる。

【0059】

「融合分子」及び「融合タンパク質」という用語は同義的に使用され、通常はTCR又は抗体である生物活性ポリペプチド、及び通常、組み換えの、化学的、又はその他適当な

50

方法によって共有結合（すなわち融合）しているタンパク質又はペプチドの配列であるエフェクター分子を意味することとする。必要ならば、融合分子は、ペプチドリinker配列を介して一つ又はいくつかの部位で融合させることができる。あるいは、ペプチドリinkerを用いて、融合分子の構築に役立てることを可能である。特に好適な融合分子は融合タンパク質である。一般的に、融合分子は、結合分子からなっているもよい。

【0060】

「宿主細胞」という用語は、クローニングベクター又は発現ベクターを含有する任意の原核細胞又は真核細胞を意味することとする。また、この用語には、宿主細胞の染色体もしくはゲノムの中にクローニングされた遺伝子を含有するように遺伝子操作された原核細胞又は真核細胞も含まれる。

10

【0061】

本明細書において、「免疫応答」という用語は、明確な接着段階及び活性化段階を含有する多因子過程を介して、免疫細胞を刺激し、それらを血液からリンパ系組織及び非リンパ系組織に補充する過程を意味するものとする。活性化条件は、サイトカイン、増殖因子、ケモカイン、及びその他の因子を放出させたり、免疫細胞上における接着分子及びその他の活性化分子の発現を上方調節したり、組織を通過する走化性と同時に起きる接着、形態変化、及び／又は溢出を促進したり、細胞増殖及び細胞毒性を増加させたり、抗原提示を刺激したり、また、メモリー細胞型の生成を含有する、他の表現型変化をもたらしたりする。免疫応答は、免疫細胞が、他の免疫細胞の炎症活性又は細胞毒性を抑制又は調節する活性も意味することとする。

20

【0062】

本明細書において、「ポリヌクレオチド」及び「核酸分子」という用語は同義的に使用されており、任意の長さの多量体型のヌクレオチドを意味する。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、及び／又はそれらの類似体を含有することができる。ヌクレオチドは、何らかの三次元構造を有することができ、公知又は未知の機能を果たすことができる。「ポリヌクレオチド」という用語には、例えば、一本鎖分子、二本鎖分子、及び三重らせん分子、遺伝子もしくは遺伝子断片、エキソン、イントロン、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、アンチセンス分子、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分枝ポリヌクレオチド、アプタマー、プラスミド、ベクター、何らかの配列を有する単離DNA、何らかの配列を有する単離RNA、核酸プローブ、及びプライマーなどが含まれる。また、核酸分子は、修飾された核酸分子（例えば、修飾塩基、糖、及び／又はヌクレオチドリinkerを含有するもの）を含有することも可能である。

30

【0063】

「ポリペプチド」という用語は、その大きさにかかわらず、好ましくは、本質的に20種の天然アミノ酸のいずれかからなる任意のポリマーを意味することとする。「タンパク質」という用語は、しばしば、比較的高分子量のタンパク質を言うときに用いられ、「ペプチド」はしばしば、低分子量のポリペプチドを言うときに用いられるが、これらの用語の当該技術分野における使用はしばしば重複する。「ポリペプチド」という用語は、別段の記載がない限り、広く、タンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを意味する。本発明に従った有用なペプチドは、一般的に、遠心分離法又はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの標準的な分子サイズ決定法によって判定すると、約0.1KD~100KD、又はこれよりも大きく、約1000KDの間、好ましくは、約0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、及び50KDの間であろう。

40

【0064】

「予防する」、「予防すること」、「予防」、「予防的治療」などの用語は、病気又は症状を発症してはいないが、発症するリスクがあるか、或いは発症しやすい対象において、病気又は症状を発症する可能性を低下させることを意味することとする。

【0065】

「一本鎖抗体」という用語は、一本鎖構成を基本とする抗体を意味するものとする。一本鎖抗体は、抗体の最小結合サブユニットからなることができる。一本鎖抗体は、安定的

50

に折りたたまれたポリペプチド一本鎖上にある抗体の抗原結合領域のみを組み合わせることができる。そのため、一本鎖抗体は、標準的な免疫グロブリンよりもかなり小さいが、抗体の抗原特異的な結合特性を保持している。一本鎖抗体は、多様なリガンド、例えば、エフェクター分子又は薬物複合体に結合させることができる。

【0066】

本明細書において、「可溶性の」という用語は、水性緩衝液、例えば、細胞培地から、低G遠心（例えば、標準的な遠心分離機で毎分約30,000回転未満）では容易に沈降しない融合分子、特に融合タンパク質を意味する。さらに、融合分子は、約5〜37℃よりも高い温度、かつ陰イオン性又は非イオン性の界面活性剤が低濃度で存在するか、これらが存在しないときの中性又はそれに近いpHにおいて水溶液中に存在したままであれば可溶性である。これらの条件下では、可溶性タンパク質は、しばしば、低沈降値、例えば、約10〜50未満のスベドベリ単位を有するであろう。

【0067】

本明細書に記載されている水溶液は、一般的には、pH、一般的には約5〜9のpH範囲内、及び約2mMから500mMの範囲のイオン強度を確立するために緩衝用化合物を有している。プロテアーゼ阻害剤又は弱い非イオン性界面活性剤が添加される場合もある。また、必要ならば、ウシ血清アルブミン（BSA）のような担体タンパク質を数mg/mlまで加えることもできる。水性緩衝液の例には、標準的なリン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝食塩水、又はその他のよく知られている緩衝液及び細胞培地製剤などがある。

【0068】

「刺激する」又は「刺激」という用語は、免疫応答を増加させること、増幅すること、増強すること、増大させることを意味する。刺激は積極的な改変であってもよい。増加率の例は、例えば、5%、10%、25%、50%、75%、さらには90〜100%であってもよい。増加率のその他の例には、2倍、5倍、10倍、20倍、40倍、さらには100倍などがある。

【0069】

「抑制する」又は「抑制」という用語は、免疫応答を低下させること、弱めること、減少させること、停止させること、又は安定化させることを意味する。抑制は消極的な改変であってもよい。低下率の例は、例えば、5%、10%、25%、50%、75%、さらには90〜100%であってもよい。低下率のその他の例には、2倍、5倍、10倍、20倍、40倍、さらには100倍などがある。

【0070】

「T細胞受容体」（TCR）という用語は、抗原提示に応答してT細胞の活性化に関与する内在性膜タンパク質複合体のポリペプチドを意味するものである。T細胞は、 $\alpha\beta$ ヘテロ二量体T細胞受容体（TCR）を介してMHC産物に結合しているペプチドを認識する。TCRのレパートリーには、抗体の重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子で用いられているのと同じの遺伝子再構成機構によって作られる広範な多様性がある [Tonegawa, S. (1988)

Biosci. Rep. 8:3-26]。多様性の大部分は、 α 鎖及び β 鎖の相補性決定領域3（CDR3）をコードする、可変（V）領域と結合（J）（もしくは多様性（D））領域の連結部で生じる [Davis and Bjorkman (1988) Nature 334:395-402]。しかし、TCRは、抗体が受けるような体細胞点突然変異を受けることなく、おそらく同時発生的にはない。TCRは、抗体と同程度の親和性成熟を受けることもない。自然に存在する場合、TCRは、 $10^5 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有するよう見えるが、一方、抗体は、一般的には $10^5 \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有する [Davis et al. (1998) Annu. Rev. Immunol. 16: 523-544; Eisen et al. (1996) Adv. Protein Chem. 49:1-56]。TCRで体細胞点突然変異が起こらないことは、親和性が低いことに関連している可能性があるが、TCRにはより高い親和性を有する選択上の有利性がないとも主張されている。実際、T細胞活性化の漸次刺激モデル [Valitutti et al. (1995) Nature 375:148-151] 及び動的校正モデル [Rabinowitz et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1401-1405] はいずれも、（より高い親和性に関連した）解離速度の遅さがシグナル伝達過程に有害なものであるこ

10

20

30

40

50

とを示唆している。高親和性 T C R が、T 細胞応答に必要なペプチド特異性を維持できない可能性もある。例えば、M H C 溝内部に結合しているペプチドは、わずかな接触可能表面を提示する [Bjorkman, P.J. (1997) Cell 89:167-170] が、これは、次に、その相互作用で生じ得るエネルギー量を制限する可能性がある。一方、M H C らせんにエネルギーを向けることによって T C R の親和性を高めると、おそらく負の選択過程でチミン欠失が生じると思われる [Bevan, M.J. (1997) Immunity 7:175-178]。「T C R」という用語には、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト化、ヘテロ二量体、及び単鎖の T 細胞受容体又はそれらの機能性断片が包含され、T C R の V α ドメイン及び V β ドメインを含有する分子などがある。また、「T C R」という用語には、例えば、「T CELL RECEPTOR FUSIONS AND CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF」と題する、2008 年 3 月 19 日出願の米国特許仮出願及び米国特許公報 U S 2003 01-44474 A 1 に開示されている T 細胞受容体も包含される。

10

【0071】

「ベクター」という用語は、宿主細胞内で自己複製し、外来 D N A を受け入れることができる核酸分子のことである。ベクターは、自ら複製開始点を有し、外来 D N A を挿入するために用いることができる制限エンドヌクレアーゼに対する固有の認識部位を一つ以上有し、また、通常、抗生物質耐性をコードする遺伝子のような選択可能マーカー、及び、しばしば、挿入 D N A を発現させるための認識配列（例えば、プロモーター）を有する。一般的なベクターには、プラスミドベクター及びファージベクターなどがある。

【0072】

20

T 細胞受容体 (T C R)

T 細胞は、他の免疫細胞型（多形核細胞、好酸球、好塩基球、マスト細胞、B 細胞、N K 細胞）と共に免疫系の細胞成分を構成する細胞のサブグループである。生理条件下で、T 細胞は、免疫監視及び外来抗原の排除において機能を果たす。しかし、病的条件下では、T 細胞が病気の原因及びその伝播において主要な役割を果たしているという有力な証拠が存在する。これらの疾患においては、中枢であろうと末梢であろうと、T 細胞の免疫寛容の崩壊が自己免疫疾患を引き起こす基本的な過程である。

【0073】

T C R は、少なくとも 7 個の膜貫通タンパク質から構成される。ジスルフィド結合した (α 、 β) ヘテロ二量体は、単一型抗原認識単位を形成するが、一方、 ϵ 鎖、 γ 鎖、 δ 鎖、及び ζ 鎖及び η 鎖からなる、C D 3 の不変鎖は、T 細胞の活性化及び細胞性免疫応答の発生をもたらすシグナル経路に結合するリガンドのカップリングに参与する。T C R 鎖の遺伝子の多様性にもかかわらず、2 つの構造特性が公知のサブユニット全部に共通している。第一は、これらが、恐らくは α -ヘリックス型の単一の膜貫通全領域ドメインを有する膜貫通タンパク質であることである。第二は、すべての T C R 鎖は、予想膜貫通ドメイン内部に荷電アミノ酸を有するという珍しい特徴を有することである。不変鎖は、マウスとヒトの間で保存されている単一の負の電荷を有し、また不変鎖は 1 つ (T C R - β) 又は 2 つ (T C R - α) の正電荷を有する。T C R - α の膜貫通配列は、多くの種において高度に保存されており、そのため、系統発生学的には重要な機能的役割を果たしている可能性がある。親水性アミノ酸であるアルギニン及びリジンを含むオクタペプチド配列は、これらの種の間で同一である。

30

40

【0074】

T 細胞応答は、T C R に結合する抗原によって調節されている。一つの型の T C R は、免疫グロブリンの可変 (V) 及び定常 (C) 領域に似た α 鎖及び β 鎖からなる膜結合型ヘテロ二量体である。T C R α 鎖は、共有結合している V - α 鎖及び C - α 鎖を含有するが、 β 鎖は、C - β 鎖に共有結合している V - β 鎖を含有する。V - α 鎖及び V - β 鎖は、主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) (ヒトにおいては H L A 複合体として知られている) と関連して超抗原又は抗原を結合することができるポケット又は間隙を形成する。一般的には、Davis Ann.Rev.of Immunology 3:537(1985); Fundamental Immunology 3rd Ed., W. Paul Ed. Rsen Press LTD.New York (1993) を参照されたい。

50

【0075】

融合タンパク質

本発明に係る可溶性融合タンパク質及び結合分子複合体は、少なくとも2つの可溶性融合タンパク質を含有するが、ここで、第一の融合タンパク質は、インターロイキン15（IL-15）又はその機能的断片に共有結合している第一の生物活性ポリペプチドを含み、かつ、第二の融合タンパク質は、可溶性インターロイキン15受容体α（IL-15Ra）ポリペプチド又はその機能的断片に共有結合している第二の生物活性ポリペプチドを含み、第一の融合タンパク質のIL-15ドメインが、第二の融合タンパク質の可溶性IL-15Raドメインに結合して可溶性の融合タンパク質複合体を形成している。

【0076】

ある特定の例において、生物活性ポリペプチドの一方は、第一の可溶性TCR又はその断片を含有する。他方もしくは第二の生物活性ポリペプチドは、第一の可溶性TCR又はその機能的断片を含有していて、その結果、一価のTCRと比較して同族リガンドに対する結合活性が増大した多価のTCR融合タンパク質複合体を作出する。さらに、他方の生物活性ポリペプチドは、第一の可溶性TCRとは異なる第二の可溶性TCR又はその機能的断片を含有する。ある特定の例において、例えば、天然型TCRと比較して、同族リガンドに対してより高い親和性又は増加した結合親和性を有するTCRが産生される。本明細書に記載されるような本発明に係る可溶性TCRが、そのリガンドに対してより高い親和力(avidity)又は親和性(affinity)を有している場合には、それは、細胞表面結合型抗原のための特異的プローブとして有用である。本発明のある特定の好適な例において、TCRは、特定の抗原を特異的に認識する。

【0077】

例示的な態様では、TCRは、α鎖（本明細書では、α鎖、アルファ鎖、又はa鎖と称す）及びβ鎖（本明細書では、β鎖、ベータ鎖、又はb鎖と称す）を含有するヘテロ二量体である。別の例示的な態様では、TCRは、単鎖TCRポリペプチドを含有する。単鎖TCRは、ペプチドリinker配列によって、TCRのV-β鎖と共有結合したTCR V-α鎖を含有することができる。単鎖TCRは、さらに、TCRのV-β鎖に共有結合した可溶性TCR Cβ鎖断片を含有することができる。単鎖TCRはさらに、TCRのV-α鎖に共有結合した可溶性TCRのCα鎖断片を含有することができる。

【0078】

さらなる態様では、第一及び第二の生物活性ポリペプチドの一方又は両方が、抗体又はその機能的断片を含有している。

【0079】

本明細書において、「生物活性ポリペプチド」又は「エフェクター分子」という用語は、本明細書に記載されるような所望の効果をもたらすことができる、タンパク質、ポリペプチド、又はペプチドなどのアミノ酸配列；糖又は多糖；脂質又は糖脂質、糖タンパク質、若しくはリポタンパク質を意味する。エフェクター分子には、化学物質も含まれる。生物活性があるか又はエフェクターであるタンパク質、ポリペプチド、又はペプチドをコードするエフェクター分子核酸も意図している。従って、適当な分子には、調節因子、酵素、抗体、又は薬物、並びにDNA、RNA、及びオリゴヌクレオチドも含有される。生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子は天然のものであってもよく、又は、例えば、組み換え又は化学合成によって公知の成分から合成することもでき、異種由来の成分を含有することもできる。生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子は、通常、遠心分離法又はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの標準的な分子サイズ決定法によって判定すると、約0.1KD~100KD、又はこれよりも大きく、約1000KDまでの間、好ましくは、約0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、及び50KDの間である。本発明の所望の効果は、例えば、結合活性が増大したTCR融合タンパク質複合体を形成させること、標的細胞を死滅させること（例えば細胞増殖もしくは細胞死を誘導するために）、病気を予防又は治療するときに免疫応答を引き起こすこと、又は診断用の検出分子として作用することを含有するが、これらに限定されない。このような検

出を行うために、アッセイ法、例えば、細胞を培養して増殖させ、この細胞を本発明に係るTCR融合複合体と接触させて、TCR融合複合体が細胞のさらなる発生を抑制できるか否かを評価するという一連の工程を含有するアッセイ法を用いることができよう。

【0080】

本発明に従ってエフェクター分子をTCRペプチドに共有結合させることにより、多くの顕著な利益がもたらされる。公知の構造を有するペプチドなどの単一エフェクター分子を含有する、本発明に係るTCR融合複合体を作製することができる。また、多様なエフェクター分子を同じようなDNAベクター内に作製することができる。すなわち、感染細胞又は異常細胞を提示するために、さまざまなエフェクター分子のライブラリーをTCR分子に結合させることができる。さらに、治療に応用するために、対象にTCR分子を投与するのではなく、エフェクターペプチドに結合するTCR分子をコードするDNA発現ベクターを、TCR融合複合体をインビボで発現させるために投与することができる。このような方法により、一般的には組み換えタンパク質の調製に関連する費用の掛かる精製工程を避けることができ、かつ、従来の方法に関連した抗原の取り込み及び処理の複雑さを回避することができる。

【0081】

上記したように、本明細書に開示した融合タンパク質の成分、例えば、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、タンパク質毒素、免疫グロブリンドメイン若しくはその他の生物活性分子、及び何れかのペプチドリンカーなどのエフェクター分子は、融合タンパク質に意図された機能があるのであれば、ほぼどのような形にも構築することができる。具体的には、融合タンパク質の各成分を、必要ならば少なくとも一つの適当なペプチドリンカー配列によって、別の成分との距離をあけて配置することができる。また、融合タンパク質は、例えば、融合タンパク質の修飾、同定、及び／又は精製を容易にするためにタグを含有することができる。より具体的な融合タンパク質が、下記の実施例に記載されている。

【0082】

リンカー

本発明に係る融合複合体は、好ましくは、IL-15ドメイン又はIL-15R α ドメインと生物活性ポリペプチドとの間に置かれる可動性リンカー配列も含有する。リンカー配列は、IL-15ドメイン又はIL-15R α ドメインに対して生物活性ポリペプチドを効果的に配置して、この両ドメインが機能的に活性を発揮できるようにすることを可能にするはずである。生物活性ポリペプチドがTCRである態様では、リンカー配列は、TCR分子結合溝を、T細胞受容体がMCH-ペプチド複合体の提示を認識して、エフェクター分子を所望の部位に送達できるように配置する。エフェクター分子をうまく提示できると、T細胞を培養して増殖させ、このT細胞を本発明に係るTCR融合複合体と接触させて、TCR融合複合体が細胞のさらなる発生を抑制できるか否かを評価するという一連の工程を含有するインビトロアッセイ法など、下記に開示されているアッセイ法によって測定しながら、T細胞の増殖を誘導又は阻害したり、特定の部位に対する免疫応答を開始又は抑制したりするよう細胞の活性を調節することができる。

【0083】

ある特定の態様では、可溶性融合タンパク質複合体は、第一の生物活性ポリペプチドが、ポリペプチドリンカー配列によってIL-15（又はその機能性断片）に共有結合しているリンカーを有する。

【0084】

別の特定の態様では、本明細書に記載されているような可溶性融合タンパク質複合体は、第二の生物活性ポリペプチドが、ポリペプチドリンカー配列によってIL-15R α ポリペプチド（又はその機能性断片）に共有結合しているリンカーを有する。

【0085】

リンカー配列は、好ましくは、提示抗原を認識するためにTCR分子の結合溝を効果的に配置することができるペプチドを生じさせるヌクレオチド配列によってコードされている。本明細書において、「生物活性ポリペプチドを、IL-15ドメイン又はIL-15

R α ドメインに対して効果的に配置すること」という語句、又はその他同様の語句は、I L-15ドメイン又はI L-15 R α ドメインが互いに相互作用してタンパク質複合体を形成することができるよう、I L-15ドメイン又はI L-15 R α ドメインに結合した生物活性ポリペプチドを配置することを意味するものである。ある特定の態様では、I L-15ドメイン又はI L-15 R α ドメインは、免疫細胞と相互作用して、免疫反応を開始又は阻害するか、細胞発生を阻害又は刺激できるよう効果的に配置されている。

【0086】

リンカー配列は、好ましくは約7～20個のアミノ酸、より好ましくは約8～16個のアミノ酸を含有する。リンカー配列は、好ましくは、生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子を単一の望ましくない立体構造のままにさせないよう可動的である。リンカー配列を用いて、例えば、認識部位を融合分子から距離をあけて配置することができる。具体的には、ペプチドリリンカー配列を生物活性ポリペプチドとエフェクター分子の間に配置して、例えば、それらを化学的に架橋して分子柔軟性をもたらすことができる。リンカーは、好ましくは、柔軟性を与えるために、例えば、グリシン、アラニン、及びセリンなどの低分子側鎖を有するアミノ酸を主に含有する。好ましくは、リンカー配列の約80%又は90%、又はそれ以上がグリシン残基、アラニン残基、又はセリン残基を含み、特にグリシン残基及びセリン残基を含有する。ヘテロ二量体TCRを含有する融合タンパク質複合体では、リンカー配列は、TCR分子のb鎖に適当に結合しているが、リンカー配列は、TCR分子のa鎖に結合していてもよい。あるいは、リンカー配列は、TCR分子のa鎖及びb鎖の両方に結合していてもよい。そのような β ペプチド鎖がa鎖と共に発現されると、図1に概略して描かれているように、TCR-エフェクター結合ペプチドが折りたたまれて、機能的TCR分子となるはずである。一つの適当なリンカー配列は、A S G G G G S G G G (すなわち、A l a S e r G l y G l y G l y G l y S e r G l y G l y G l y)であり、好ましくは、TCRのbドメインの最初のアミノ酸に結合している。抗体の可変領域をうまく連結するために用いられてきた多くの可動性リンカー設計のいずれかを含有する、さまざまなリンカー配列を用いることもできる。Whitlow, M. et al. (1991) *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97-105 を参照されたい。いくつかの例では、エフェクター分子をTCR b鎖分子に共有結合させるためには、リンカーのアミノ配列が、TCR ベータ鎖のC-末端残基からエフェクター分子のN-末端残基までの間に適当な距離を置くことができなければならない。適当なリンカー配列を、経験的に容易に同定することができる。さらに、リンカー配列の適当な大きさ及び配列も、TCR分子の予測される大きさ及び形状に基づいて、従来のコンピューターモデリング技法によって決定することができる。

【0087】

一般的に、本発明に係る融合タンパク質複合体の調製は、本明細書に開示された手順によって、そして、例えば、ポリメラーゼ連鎖増幅反応(PCR)、プラスミドDNAの調製、制限酵素によるDNA切断、オリゴヌクレオチドの調製、DNAライゲーション、mRNAの単離、適当な細胞へのDNA導入、宿主の形質転換又は形質移入、宿主の培養を含有する、広く知られている組み換えDNA技術によって行うことができる。さらに、カオトロピック(chaotropic)剤、並びに公知の電気泳動法、遠心分離法、及びクロマトグラフィー法を用いて、融合タンパク質を単離及び精製することができる。これらの方法に関する開示については、一般的に、Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. (1989)); 及びAusubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York(1989)を参照されたい。

【0088】

本明細書において、本発明に係る生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子には、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子、タンパク質毒素、免疫グロブリンドメインなどの因子、又は、その他の生物活性タンパク質、例えば、酵素などを含有することができる。また、生物活性ポリペプチドには、非タンパク質毒素、細胞傷害剤、化学療法剤、検出可能な標識、放射性物質のような他の化合物との結合体を含有していてもよい。

【0089】

本発明に係るサイトカインは、他の細胞に作用し、細胞性免疫の多くの多重効果のいずれかに関与している細胞によって産生される因子の何れかによって規定される。サイトカインの例には、IL-2ファミリー、インターフェロン（IFN）、IL-10、IL-1、IL-17、TGFサイトカインファミリー及びTNFサイトカインファミリー、並びにIL-1からIL-35まで、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α 、並びにTNF β が含まれるが、これらに限定されない。

【0090】

本発明の一つの態様において、第一の融合タンパク質は、インターロイキン-15（IL-15）ドメイン又はその機能的断片に共有結合している第一の生物活性ポリペプチドを含有する。IL-15は、T細胞の活性化及び増殖に影響するサイトカインである。免疫細胞の活性化及び増殖に作用するときのIL-15の活性は、いくつかの点でIL-2に似ているが、基本的な相違点は、既によく特徴付けられている（Waldmann, TA, 2006, Nature Rev.Immunol.6:595-601）。

【0091】

本発明の別の態様において、第一の融合タンパク質は、IL-15変異体（本明細書においては、IL-15突然変異体とも称す）であるインターロイキン-15（IL-15）ドメインを含有する。IL-15変異体は、好ましくは、天然型（又は野生型）のIL-15タンパク質とは異なるアミノ酸配列を含有する。IL-15変異体は、好ましくは、IL-15Raポリペプチドに結合して、IL-15のアゴニスト又はアンタゴニストとして機能する。好ましくは、アゴニスト活性を有するIL-15変異体は、スーパーアゴニスト活性を有する。いくつかの態様では、IL-15変異体は、IL-15Raとの結合とは無関係に、IL-15のアゴニスト又はアンタゴニストとして機能することができる。IL-15のアゴニストは、野生型IL-15に較べて、それと同等又はそれよりも高い生物活性によって例示される。IL-15のアンタゴニストは、野生型IL-15に較べて低い生物活性によって、又はIL-15を介した応答を阻害できることによって例示される。いくつかの例では、IL-15変異体は、より高い活性又はより低い活性で、IL-15R $\beta\gamma$ C受容体に結合する。いくつかの態様では、IL-15変異体の配列は、天然型IL-2の配列と比較すると、例えば、置換又は欠失など、少なくとも1つのアミノ酸が変化しており、そのような変化が、IL-15のアゴニスト活性又はアンタゴニスト活性をもたらす。好ましくは、アミノ酸の置換／欠失は、IL-15R β 及び／又はIL-15R γ Cと相互作用するIL-15のドメインに存在する。より好ましくは、アミノ酸の置換／欠失は、IL-15Raポリペプチドへの結合にも、IL-15変異体を産生する能力にも影響しない。IL-15変異体を生じさせるのに適したアミノ酸の置換／欠失は、本明細書に記載されるように合理的又はランダムな突然変異誘発、及び機能的アッセイを経て、又は他の経験的な方法を経た後、推定される、又は公知のIL-15構造に基づいて、公知の構造を有するIL-2などの相同分子とIL-15との比較に基づいて同定することができる。さらに適したアミノ酸置換は、保存的な変化であっても非保存的な変化であってもよく、さらなるアミノ酸の挿入であってもよい。好ましくは、本発明に係るIL-15変異体は、成熟ヒトIL-15の配列の8位、61位、65位、72位、92位、101位、108位、又は111位で、1つ又は1つ以上のアミノ酸置換／欠失を含有するが、特に、D8N（「D8」は、天然型成熟ヒトIL-15配列のアミノ酸及び残基の位置を意味し、「N」は、その位置におけるIL-15変異体で置換されているアミノ酸残基を意味する）、D8A、D61A、N65A、N72R又はQ108Aという置換は、アンタゴニスト活性を有するIL-15変異体を生じさせ、N72Dという置換は、アゴニスト活性を有するIL-15変異体をもたらす。

【0092】

本発明の一つの態様において、IL-15変異体は、融合タンパク質複合体の一成分であるが、別の態様においては、IL-15変異体は非融合タンパク質である。好ましくは、非融合型のIL-15変異体は、IL-15のアゴニスト又はアンタゴニストとして機

能する可溶性サイトカインである。いくつかの態様では、非融合型 I L - 1 5 変異体は、I L - 1 5 R a と複合体を形成するが、別の態様では、それは、I L - 1 5 R a とは無関係に作用する。

【0093】

本発明に係るケモカインは、サイトカインと同様、別の細胞に曝露されると、細胞性免疫の多くの多重効果のいずれかに関与する何れかの化学的な因子又は分子と定義されている。適切なケモカインには、C X C、C C、C、及び C X₃ C というケモカインファミリー、並びに C C L - 1 から C C L - 2 8 まで、C X C - 1 から C X C - 1 7 まで、X C L - 1、X C L - 2、C X 3 C L 1、M I P - 1 b、I L - 8、M C P - 1、及び R a n t e s が含まれ得るが、これらに限定されない。

10

【0094】

増殖因子には、特定の細胞に曝露されると、作用を受ける細胞の増殖及び／又は分化を誘導する何れかの分子が含まれる。増殖因子は、タンパク質及び化学分子などであるが、それらの一部は、以下のものを含有する：G M - C S F、G - C S F、ヒト増殖因子、及び幹細胞増殖因子。さらなる増殖因子は、本明細書に記載されている用途にも適している。

【0095】

毒素又は細胞毒性物質には、細胞に曝露されると、致死効果又は増殖阻害効果を有する何れかの物質が含まれる。すなわち、エフェクター分子は、例えば、植物又は細菌に由来する細胞毒素、例えば、ジフテリア毒素 (D T)、志賀毒素 (shiga toxin)、アブリン (abrin)、コレラ毒素、リシン、サポリン、シュードモナス外毒素 (P E)、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、又はゲロニンなどであってよい。このような毒素の生物活性断片が、当該技術分野において公知であり、例えば、D T の A 鎖及びリシン A 鎖などを含んでいる。さらに、この毒素は、細胞表面上で活性を有する物質、例えば、ホスホリパーゼ酵素 (例えば、ホスホリパーゼ C) であってもよい。

20

【0096】

また、エフェクター分子は、例えば、ビンデシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキサート、アドリアマイシン、ブレオマイシン、又はシスプラスチンなどの化学療法薬であってもよい。

【0097】

さらに、エフェクター分子は、診断検査又は画像検査に適した検出可能に標識された分子であってもよい。そのような標識には、ビオチン若しくはストレプトアビジン／アビジン、検出可能なナノ粒子若しくは結晶、酵素若しくはその触媒活性断片、緑色蛍光タンパク質、F I T C、フィコエリトリン、サイクローム、テキサスレッド、若しくは量子ドットなどの蛍光標識；放射性核種、例えば、ヨウ素 - 1 3 1、イットリウム (yttrium) - 9 0、レニウム - 1 8 8 若しくはビスマス (bismuth) - 2 1 2；リン光分子若しくは化学発光分子、又は G d に基づく若しくは常磁性金属イオンに基づく造影剤など、P E T、超音波、若しくは M R I によって検出可能な標識が含まれる。エフェクター又はタグを含有するタンパク質の作製及び使用に関する開示については、例えば、Moskaug et al. J. Biol. Chem. 264, 15709 (1989); Pastan, I, et al. Cell 47, 641, 1986; Pastan et al. Recombinant Toxins as Novel Therapeutic Agents, Ann. Rev. Biochem. 61, 331, (1992); "Chimeric Toxins" Olsnes and Phil, Pharmac. Ther., 25, 355 (1982); 公開 PCT 出願第 W O 9 4 / 2 9 3 5 0 号公報；公開 PCT 出願第 W O 9 4 / 0 4 6 8 9 号公報；公開 P C T 出願第 W O 2 0 0 5 / 0 4 6 4 4 9 号公報、及び米国特許第 5, 6 2 0, 9 3 9 号を参照されたい。

30

40

【0098】

共有結合した I L - 1 5 ドメイン及び I L - 1 5 R a ドメインを含有するタンパク質融合体又は結合複合体は、いくつかの重要な用途を有する。例えば、T C R を含有するタンパク質融合体又は結合複合体を用いて、T C R に特異的に結合できる一定の細胞に I L - 1 5 / I L - 1 5 R a 複合体を送達することができる。その結果、このタンパク質融合体

50

又は結合複合体は、リガンドを含有する細胞を選択的に損傷したり、死滅させたりする手段を提供する。T C Rを含有するタンパク質融合体又は結合複合体によって損傷又は死滅させることが可能な細胞又は組織の例は、T C Rが特異的に結合することができる一つ又はそれ以上のリガンドを発現している腫瘍及びウイルス感染細胞若しくは細菌感染細胞などである。損傷又は死滅させられやすい細胞又は組織は、本明細書に開示される方法によって簡単に分析することができる。

【0099】

本発明に係るI L-15ポリペプチド及びI L-15 R aポリペプチドは、アミノ酸配列が、天然のI L-15分子及びI L-15 R a分子、例えば、ヒト、マウス若しくはその他の齧歯類、又はその他の哺乳動物のI L-15分子及びI L-15 R a分子に適切に対応する。

【0100】

場合によっては、例えば、S c-T C Rの価数を増加させるために、本発明に係るタンパク質融合体又は結合複合体を多価にすることが有用である可能性がある。特に、融合タンパク質複合体のI L-15ドメインとI L-15 R aドメインの間の相互作用は、多価性複合体を作出する手段を提供する。また、例えば、標準的なビオチン-スト렙トアビジン標識技術を用いて、又はラテックスビーズなどの適切な固体支持体に結合させて、1つのタンパク質と4つのタンパク質（異同を問わない）の間を共有結合的又は非共有結合的に連結することにより、多価の融合タンパク質を作製することができる。化学的架橋タンパク質（例えば、デンドリマーへの架橋）も、適当な多価の種である。例えば、タンパク質は、ビオチン化B i r Aタグのように修飾可能なタグ配列や、C y s又はH i sなどの化学反応性の高い側鎖を有するアミノ酸残基をコードする配列を含有することによって改変することができる。このようなアミノ酸タグ又は化学反応性アミノ酸を、融合タンパク質内のさまざまな位置、好ましくは、生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子の活性部位から離れた位置に配置することができる。例えば、可溶性融合タンパク質のC末端を、タグ、又はそのような反応性アミノ酸を含有する他の融合タンパク質に共有結合させることも可能である。2つ又はそれ以上の融合タンパク質を適当なデンドリマー又は他のナノ粒子に化学的に結合させて多価性分子を得るために、適当な側鎖を含めることも可能である。デンドリマーは、その表面の数あるさまざまな官能基の何れかを有することができる合成化学ポリマーである（D. Tomalia, Aldrichimica Acta, 26:91:101 (1993)）。本発明に従って使用できるデンドリマーの例には、例えば、E 9 スターバースト（starburst）ポリアミンデンドリマー、及びE 9 コンバースト（combust）ポリアミンデンドリマーなどがあるが、これらは、システイン残基を結合することができる。

【0101】

（核酸及びベクター）

核酸

本発明は、さらに、本発明の融合タンパク質をコードする核酸配列、特にD N A配列を提供する。好ましくは、D N A配列は、ファージ、ウイルス、プラスミド、ファージミド、コスミド、Y A C、又はエピソームのような、染色体外での複製に適したベクターによって担持されている。特に、所望の融合タンパク質をコードするD N Aベクターを用いて、本明細書に記載される調製法を促進させることができ、また、有意な量の融合タンパク質を得ることができる。このD N A配列は、適当な発現ベクター、すなわち、挿入されたタンパク質コード配列の転写及び翻訳に必要な要素を含有するベクターの中に挿入することができる。さまざまな宿主-ベクター系を利用して、タンパク質コード配列を発現させることができる。これらは、ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなど）に感染した哺乳動物細胞系；ウイルス（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；酵母ベクターを含有する酵母などの微生物、又は、バクテリオファージD N A、プラスミドD N A、又はコスミドD N Aで形質転換された細菌などである。利用する宿主-ベクター系に応じて、数ある適当な転写因子及び翻訳因子のいずれかを使用することができる。一般に、Sambrook et al., supra、及びAusubel et al., supra を参照されたい

。

【0102】

本発明は、可溶性融合タンパク質複合体を作製する方法を包含していて、方法は：本明細書に記載されるように、第一及び第二の融合タンパク質をコードするDNAベクターを宿主細胞に導入すること、融合タンパク質を細胞又は培地の中で発現させ、第一の融合タンパク質のIL-15ドメインと、第二の融合タンパク質の可溶性IL-15Raドメインとを会合させて、可溶性融合タンパク質複合体を形成させるのに十分な条件下で、宿主細胞を培地中で培養すること、宿主細胞又は培地から可溶性融合タンパク質複合体を精製することを含有する。

【0103】

一般的に、本発明に従った好適なDNAベクターは、エフェクター分子をコードする配列に動作可能に連結した、TCR鎖をコードする第一のヌクレオチド配列を導入するための第一のクロニング部位を5'から3'方向に含有する、ホスホジエステル結合によって連結されているヌクレオチド配列を含有する。

【0104】

DNAベクターによってコードされる融合タンパク質成分は、カセットという形で提供することも可能である。「カセット」という用語は、標準的な組換え法によって、各成分を別の成分に簡単に置換することができることを意味する。特に、コードされた融合複合体を、血清型 (serotypes) を必然的に生じさせるか、又は生じさせる能力を有する可能性がある病原体に対して使用する場合には、カセット形式で構成されているDNAベクターが特に望ましい。

【0105】

TCR融合複合体をコードするベクターを作製するには、適当なリガーゼを用いて、TCR分子をコードする配列を、エフェクターペプチドをコードする配列に連結させる。適当な細胞株など、天然の由来源からDNAを単離するか、公知の合成法、例えば、リン酸トリエステル法によって、提示ペプチドをコードするDNAを得ることができる。例えば、Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M.J. Gait ed., 1984) を参照されたい。合成オリゴヌクレオチドは、市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置を用いて調製することもできる。TCR分子をコードする遺伝子は、一旦単離されると、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 又は当該技術分野において公知の別法によって増幅することができる。TCRペプチド遺伝子を増幅するための適当なPCRプライマーによって、PCR産物に制限酵素認識部位を付加することができる。好ましくは、PCR産物は、エフェクターペプチドのスプライス部位、及びTCR-エフェクター融合複合体を適正に発現する及び分泌するのに必要なリーダー配列を含んでいる。また、好ましくは、PCR産物は、リンカー配列をコードする配列、又はこのような配列をライゲーションするための制限酵素部位も含んでいる。

【0106】

好ましくは、本明細書に記載される融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術によって製造される。例えば、TCRタンパク質をコードするDNA分子を単離すると、配列を、エフェクターポリペプチドをコードする別のDNA分子にライゲーションすることができる。TCR分子をコードするヌクレオチド配列を、エフェクターペプチドをコードするDNA配列に直接連結することができ、又は、より一般的には、本明細書に記載されるようなリンカー配列をコードするDNA配列を、TCR分子をコードする配列と、エフェクターペプチドをコードする配列の間に配置して、適当なリガーゼを用いて連結することができる。得られたハイブリッドDNA分子を適当な宿主細胞の中で発現させて、TCR融合複合体を産生させることができる。DNA分子は、ライゲーション後に、コードされたポリペプチドの翻訳フレームが変わらないよう (すなわち、DNA分子を互いにインフレームでライゲーションするよう)、互いに5'から3'の方向にライゲーションする。得られたDNA分子は、インフレームで融合タンパク質をコードしている。

【0107】

別のヌクレオチド配列を遺伝子構築物に含ませることも可能である。例えば、エフェクターペプチドに融合したTCRペプチドをコードする配列の発現を調節するプロモーター配列、又はTCR融合複合体を細胞表面又は培養培地に方向づけるリーダー配列を、構築物に含ませるか、又は、構築物を挿入する発現ベクターの中に存在させることも可能である。免疫グロブリンプロモーター又はCMVプロモーターが特に好適である。

【0108】

変異体TCRをコードする配列を得るにあたって、当業者は、TCRに由来するタンパク質を、ある種のアミノ酸置換、付加、欠失、及び翻訳後修飾によって、生物活性を失ったり、低下させたりすることなく改変できることを認識されているだろう。特に、保存的アミノ酸置換、即ち、あるアミノ酸を、同じような大きさ、電荷、極性、及び立体構造を有する別のアミノ酸と置換することによって、タンパク質の機能が顕著に変わる可能性が低いことは周知である。タンパク質の構成成分である20種の標準的アミノ酸は、大きく4つの保存的アミノ酸のグループに分類できる：非極性（疎水性）グループは、アラニン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、及びバリンを含み；極性（非荷電、中性）グループは、アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、セリン、スレオニン、及びチロシンを含み；正に荷電した（塩基性）グループは、アルギニン、ヒスチジン、及びリジンを含み；負に荷電した（酸性）グループは、アスパラギン酸及びグルタミン酸を含んでいる。タンパク質における1個のアミノ酸で、同じグループ内の別のアミノ酸を置換することが、そのタンパク質の生物活性に有害な影響を及ぼす可能性は低い。

【0109】

ヌクレオチド配列間の相同性は、DNAハイブリダイゼーション分析法によって確認することができるが、二本鎖DNAハイブリッドの安定性は、生じる塩基対合の程度に依存する。高い温度及び／又は低い塩濃度という条件では、ハイブリッドの安定性が低下するので、選択した程度よりも低い相同性を有する配列のアニーリングが阻止されるよう条件を変えることができる。例えば、約55%のG-C含量を有する配列について、40～50℃、6×SSC（塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム緩衝液）、及び0.1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）という、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件では、約60～70%の相同性が示され、50～65℃、1×SSC、及び0.1%SDSという、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件では、約82～97%の相同性が示され、52℃、0.1×SSC、及び0.1%SDSという、ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件では、約99～100%の相同性が示される。ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を比較（及び相同性の程度を測定）するために、広範なコンピュータプログラムも利用することができるが、市販及び無料のソフトウェア供給源のリストが、Ausubel et al. (1999)に記載されている。容易に利用できる配列比較及び複数配列アラインメントのアルゴリズムは、それぞれ、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997)及びClustal Wプログラムである。BLASTプログラムは、ワールドワイドウェブ上(ncbi.nlm.nih.gov)で利用することができ、Clustal Wの一つのバージョンを、2.ebi.ac.uk.で利用することができる。

【0110】

融合タンパク質の成分は、それぞれが、目的とする機能を果たすことができるならば、ほとんど何れの順序にも並べることができる。例えば、一つの態様では、TCRを、エフェクター分子のC末端かN末端に配置する。

【0111】

本発明に係る好適なエフェクター分子は、それらのドメインが意図している機能に役立つ大きさを有するであろう。本発明に係るエフェクター分子は、周知の化学的架橋法など、さまざまな方法によって作製して、TCRに融合させることができる。例えば、Means, G.E. and Feeney, R.E. (1974) in Chemical Modification of Proteins, Holden-Dayを参照されたい。また、S.S. Wong (1991) in Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Pressを参照されたい。ただし、一般的には、組換え操作法を用いてイ

ンフレームの融合タンパク質を作製することが好適である。

【0112】

上記のように、本発明に係る融合分子又は結合分子は、いくつかの態様に組織化することができる。構造の一例として、TCRのC末端を、エフェクター分子のN末端に動作可能に連結する。このような連結は、必要であれば、組換え法によって行うことができる。しかし、別の構造では、TCRのN末端を、エフェクター分子のC末端に連結する。

【0113】

あるいは、又はさらに、必要に応じて、1つ又はそれ以上のさらなるエフェクター分子を、TCR融合複合体又は結合複合体に挿入することができる。

【0114】

ベクター及び発現

多くの方策を用いて、本発明に係るタンパク質融合複合体を発現させることができる。例えば、制限酵素を使用して、構築物を挿入するための切れ目をベクターに入れて、その後ライゲーションするなど、公知の方法によって、上記のTCR遺伝子融合構築物を適当なベクターに組み込むことができる。そして、TCR融合ペプチドを発現させるために、遺伝子構築物を含有するベクターを適当な宿主に導入する。一般に、Sambrook et al., supraを参照されたい。適当なベクターの選択は、クローニング手順に関係した因子に基づいて、経験的に行うことができる。例えば、ベクターは、使用されている宿主に適合し、その宿主にとって適正なレプリコンを有する必要がある。さらに、ベクターは、発現させようとするTCR融合複合体をコードするDNA配列を収容できるものでなければならない。適当な宿主細胞には、真核細胞及び原核細胞が含まれるが、好ましくは、簡単に形質転換することができ、かつ培養培地の中で迅速な増殖を示す細胞である。特に好適な宿主細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などの原核生物、及び動物細胞及び酵母菌系などの真核生物、例えば、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) などである。哺乳動物細胞が一般的には好適であり、特に、J558、NSO、SP2-O、又はCHOが好適である。その他の適当な宿主には、例えば、Sf9などの昆虫細胞が含まれる。通常の培養条件を用いる。Sambrook et al., supraを参照されたい。そして、安定した形質転換細胞株又は形質移入細胞株を選択することができる。公知の方法によって、本発明に係るTCR融合複合体を発現する細胞を決定することができる。例えば、免疫グロブリンに結合したTCR融合複合体の発現は、結合している免疫グロブリンに特異的なELISAによって、及び／又は免疫ブロッティングによって確認することができる。IL-15ドメイン又はIL-15Raドメインに結合したTCRを含有する融合タンパク質の発現を検出する別の方法が、実施例に開示されている。

【0115】

上記で概説されるように、宿主細胞は、所望の融合タンパク質をコードする核酸を増殖させるため、調製目的で使用するすることができる。すなわち、宿主細胞は、特に融合タンパク質の産生を目的とする原核細胞又は真核細胞を含有してもよい。従って、宿主細胞は、酵母、ハエ、虫、植物、カエル、哺乳動物の細胞、及び融合タンパク質をコードする核酸を増殖させることができる器官を特に含有する。使用することができる哺乳動物細胞株の限定ではない例は、CHO dhfr⁻細胞 (Urlaub and Chasm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))、293細胞 (Graham et al., J Gen. Virol., 36:59(1977))、又はSP2又はNSOなどの骨髓腫細胞 (Galfre and Milstein, Meth. Enzymol., 73(B):3(1981)) などである。

【0116】

所望の融合タンパク質をコードする核酸を増殖させることができる宿主細胞は、非哺乳動物真核細胞も包含し、昆虫 (例えば、ヨトウガ (*Sp. frugiperda*))、酵母 (例えば、Fleer R., Current Opinion in Biotechnology, 3(5):486496(1992)に概説されているような、出芽酵母 (*S. Cerevisiae*)、分裂酵母 (*S. pombe*)、P. パストリス (*P. pastoris*)、K. ラクチス (*K. lactis*)、H. ポリモルファ (*H. polymorpha*))、真菌細胞、及び植物細胞などを包含する。大腸菌及びバチラス菌など、ある種の原核生物も意図される

。

【0117】

所望の融合タンパク質をコードする核酸は、細胞を形質移入させるための標準的な技術によって宿主細胞の中に導入することができる。「形質移入する」又は「形質移入」という用語は、宿主細胞の中に核酸を導入するための従来技術のすべてを包含するものであり、カルシウムリン酸共沈殿法、DEAE-デキストランによる形質移入法、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ウイルス形質導入法、及び／又は組み込みを包含する。宿主細胞に形質移入するのに適した方法は、Sambrook et al., supra 及びその他の実験用教科書に記載されている。

【0118】

本発明に従って、さまざまなプロモーター（転写開始調節領域）を用いることができる。適当なプロモーターの選択は、提案された発現宿主に応じて決まる。異種由来のプロモーターは、選択した宿主の中で機能すれば使用することができる。

【0119】

また、プロモーターの選択は、ペプチド産生又はタンパク質産生の所望の効率及びレベルに依存する。大腸菌におけるタンパク質の発現レベルを劇的に増加させるためには、しばしばtacのような誘導型プロモーターを用いる。タンパク質の過剰発現は、宿主細胞にとって有害である。その結果、宿主細胞の増殖が制限される可能性がある。誘導型プロモーター系を使用すると、遺伝子発現を誘導する前に許容できる濃度までに宿主細胞を培養することができ、それによって、より高い産物収率を得やすくする。

【0120】

本発明に従って、さまざまなシグナル配列を用いることができる。TCRコード配列に相同なシグナル配列を用いることができる。あるいは、発現宿主における効率的な分泌及び処理のために選択された又は設計されたシグナル配列を用いることもできる。例えば、適当なシグナル配列／宿主の組み合わせには、枯草菌において分泌させるための枯草菌SacBシグナル配列、及び出芽酵母のα-接合因子、又はP. パストリスによる分泌を行わせるためのP. パストリスの酸性ホスファターゼphoIシグナル配列を含む。シグナル配列は、シグナルペプチダーゼ切断部位をコードする配列を介して、又は、通常10コドンよりも数個少ないコドンからなる短いヌクレオチド架橋であって、下流にあるTCR配列の正しい読み枠を担保する架橋を介して、タンパク質コード配列に直接連結することができる。

【0121】

転写及び翻訳を促進する要素が、真核生物のタンパク質発現系で同定されている。例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)プロモーターの1000bpを異種プロモーターの両側に配置すると、植物細胞における転写レベルを10倍～400倍上昇させることができる。発現構築物には、適当な翻訳開始配列も含まなければならない。発現構築物を改変して、適正な翻訳開始を行わせるためのKozakコンセンサス配列を含有するようにすると、翻訳のレベルを10倍増加させることができる。

【0122】

選択用マーカーがしばしば用いられるが、これは、発現構築物の一部であってもよいし、それとは別になっていて、マーカーが目的遺伝子とは別の部位に組み込まれるようになっていてもよい（例えば、発現ベクターに担持されている）。例としては、抗生物質に対する耐性を付与するマーカー（例えば、blaは、大腸菌宿主細胞にアンピシリンに対する耐性を付与し、nptIIは、広範な原核細胞又は真核細胞にカナマイシン耐性を付与する）、又は、宿主が最少培地で増殖できるようにするマーカー（例えば、HIS4は、P. パストリス又はHis. sup. -出芽酵母を、ヒスチジンがなくても増殖できるようにする）が含まれる。選択可能マーカーは、マーカーが独立して発現できるよう、独自の転写及び翻訳の開始及び終結を調節する領域を有する。抗生物質耐性をマーカーとして利用する場合、選択のための抗生物質濃度は抗生物質によって変わるが、通常、培地1mLあたり抗生物質10～600μgの範囲である。

10

20

30

40

50

【0123】

発現構築物は、公知の組換えDNA技術を用いて組み立てられる（Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999）。制限酵素消化及びライゲーションが、2つのDNA断片を連結するために用いられる基本的な工程である。ライゲーションする前にDNA断片の末端を修飾する必要があるが、これは、突出末端を充填したり、断片の末端部分をヌクレアーゼ（例えば、ExoIII）で削除したり、部位特異的変異処理(site-directed mutagenesis)したり、又はPCRによって新しい塩基対を付加したりして行うことができる。ポリリンカー及びアダプタを用いて、選択した断片の連結を促進することができる。発現構築物は、一般的には、制限酵素消化、ライゲーション、及び大腸菌の形質転換という一連の段階を用いる工程で組み立てられる。発現構築物を構築するのに適した数多くのクローニングベクターが、当該技術分野において知られており（λZAP及びpBLUESCRIPT SK-1, Stratagene, LaJolla, Calif. pET, Novagen Inc., Madison, Wis., Ausubel et al., 1999に引用されている）、具体的に何を選択するかは、本発明において重要ではない。クローニングベクターの選択は、発現構築物を宿主細胞に導入するために選択した遺伝子移入系によって影響される。各工程の終わりに、得られた構築物を制限酵素消化、DNA塩基配列決定法、ハイブリダイゼーション、及びPCR分析によって分析することができる。

10

【0124】

発現構築物は、線状であっても環状であっても、クローニングベクターの構築物として宿主に形質転換させることができ、あるいは、クローニングベクターから取り除き、送達ベクターとして使用するか、又は送達ベクター上に導入することができる。送達ベクターは、選択された宿主細胞型の中に発現構築物を導入して維持することを促進する。多くの公知の遺伝子導入系（例えば、自然受容能、化学物質による形質転換、プロトプラスト(protooplast)形質転換、エレクトロポレーション、バイオリスティック(biolistic)形質転換、形質移入、又は接合)のいずれかによって、発現構築物を宿主細胞の中に導入する（Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989）。選択される遺伝子導入系は、使用される宿主細胞及びベクター系に応じて変わる。

20

【0125】

例えば、プロトプラスト形質転換又はエレクトロポレーションによって、発現構築物を出芽酵母細胞の中に導入することができる。出芽酵母のエレクトロポレーションは簡単に行うことができ、スフェロプラスト(spheroplast)形質転換と同等の形質転換効率が得られる。

30

【0126】

本発明は、さらに、目的とする融合タンパク質を単離するための生産工程を提供する。この工程では、調節配列に動作可能に連結した、目的とするタンパク質をコードする核酸が既に導入されている宿主細胞（例えば、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、細菌細胞、又は動物細胞）を、目的の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の転写を促進するための融合タンパク質が存在する培養培地において実生産スケールで増殖させる。その後、目的とする融合タンパク質を、回収した宿主細胞から、又は培養培地から単離する。標準的なタンパク質精製技術を用いて、目的とするタンパク質を、培地から、又は回収した細胞から単離することができる。具体的には、精製技術を用いて、ローラーボトル、スピナーフラスコ、組織培養皿、バイオリアクター、又は発酵槽を含む、さまざまな実施形態から、所望の融合タンパク質を大規模に（すなわち、少なくともミリグラム量で）発現及び精製することができる。

40

【0127】

発現したタンパク質融合複合体は、公知の方法によって単離及び精製することができる。一般的には、培養培地を遠心分離し、次いで、上清を、親和性クロマトグラフィー又は免疫親和性クロマトグラフィーによって、例えば、プロテインA若しくはプロテインGの親和性クロマトグラフィー、又は発現された融合複合体に、例えば、連結されたTCR又はその免疫グロブリン領域に結合するモノクローナル抗体の使用を含有する免疫親和性手

50

順によって精製する。本発明に係る融合タンパク質は、公知の技術を適当に組み合わせて分離及び精製することができる。これらの方法には、例えば、塩沈殿及び溶媒沈殿のように、溶解度を利用する方法、透析、限界濾過、ゲル濾過、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のように、分子量の違いを利用する方法、イオン交換カラムクロマトグラフィーのように、電荷の違いを利用する方法、親和性クロマトグラフィーのように、特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーのように疎水性の違いを利用する方法、及び等電点電気泳動のように、等電点の違いを利用する方法、Ni-NTAなどの金属親和性カラムを包含する。これらの方法に関する開示について、一般に、Sambrook et al. 及び Ausubel et al. を参照されたい。

【0128】

10

本発明に係る融合タンパク質は実質的に純粋であることが好ましい。すなわち、融合タンパク質が、好ましくは、少なくとも80%又は90%~95%の均質度(w/w)で存在するよう、融合タンパク質を、それを本来伴う細胞置換成分から単離する。多くの医薬、臨床、及び研究への適用場面では、少なくとも98~99%の均質度(w/w)を有する融合タンパク質が最も好適である。実質的に精製されると、融合タンパク質は、治療への応用にとって汚染物質となるものを含まないはずである。可溶性融合タンパク質は、部分的に、又は実質的に純粋になるまで精製されると治療に用いることができ、又は、本明細書に開示されるようなインビトロアッセイ法又はインビボアッセイ法を行うときに使用することができる。実質的な純度は、クロマトグラフィー及びゲル電気泳動など、さまざまな標準的技術によって確認することができる。

20

【0129】

本発明に係る切断型TCR融合複合体は、TCR融合複合体が、発現後に培養培地中に分泌されるようになるまで十分に切断されているTCR分子を含有している。したがって、切断型TCR融合複合体は、疎水性残基に富む領域、一般的には、TCR分子の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを含まない。したがって、例えば、本発明に係る好適な切断型DR1 TCR分子では、好ましくは、TCR分子のb鎖の約199番目~237番目の残基、及びTCR分子のa鎖の約193番目~230番目の残基が、切断型TCR融合複合体には含まれていない。

【0130】

本発明のTCR融合複合体及び結合体複合体は、1つ又はそれ以上の病気に感染した多様な細胞又は感染する可能性のある多様な細胞とともに、インビトロ又はインビボで使用するのに適している。

30

【0131】

(方法)

治療法

本発明は、患者において、疾患細胞が病気関連抗原を発現する病気を予防又は治療する方法を包含していて、方法は：病気関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含有する可溶性融合タンパク質複合体を患者に投与すること、抗原を発現する病気細胞と、IL-15Rを発現する免疫細胞の間に、免疫細胞を局在化させるのに十分な特異的結合複合体(架橋)を形成させること、及び疾患細胞を損傷又は死滅させて、患者の病気を予防又は治療することを含有する。

40

【0132】

患者において、疾患細胞が病気関連抗原を発現する病気を予防又は治療する方法を含んでいて、方法は：IL-15R鎖を産生する免疫細胞を、病気関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを含有する可溶性融合タンパク質複合体、例えば、ペプチド/MHC複合体と混合すること、免疫細胞-融合タンパク質複合体の混合物を患者に投与すること、抗原を発現する病気細胞と、IL-15Rを発現する免疫細胞の間に、免疫細胞を局在化させるのに十分な特異的結合複合体(架橋)を形成させること、及び疾患細胞を損傷又は死滅させて、患者の病気を予防又は治療することを含有する。

【0133】

50

また、本発明には、標的細胞を死滅させる方法が含まれていて、方法は：請求項１に記載のＩＬ－１５ドメインによって認識されるＩＬ－１５Ｒ鎖を産生する免疫細胞を含み、可溶性融合タンパク質複合体を有する複数の細胞を、本明細書に記載されるような生物活性ポリペプチドの少なくとも１つによって認識される抗原を産生する標的細胞と接触させること、標的細胞上の抗原と免疫細胞上のＩＬ－１５Ｒ鎖の間に、免疫細胞に結合して活性化させるのに十分な特異的結合複合体（架橋）を形成させること、及び結合した活性化免疫細胞によって標的細胞を死滅させることを含有する。

【０１３４】

また、本発明には、可溶性融合タンパク質複合体の生成によって、ＩＬ－１５のインビボにおける半減期を増加し、そして／又は、それが免疫細胞に安定して結合する能力を促進する（例えば、細胞表面に滞留する時間を長くする）ための方法も含まれる。例えば、本明細書に記載したように、融合タンパク質複合体の薬物動態パラメータ及び細胞表面滞留時間の評価を行い、ＩＬ－１５と比較する。治療有用性の向上に基づくと、長い血中半減期か又は細胞表面滞留時間を有する融合タンパク質複合体が好ましい。

【０１３５】

治療可能な病気の例には、癌などの新生物形成症、又はウイルス感染症が含まれるが、これらに限定されない。「新生物形成症」は、不適切に高いレベルの細胞分裂、不適切に低いレベルのアポトーシス、若しくはその両方が原因となるか、又はそれらを生じさせる何れかの病気を意味する。例えば、癌が、新生物形成症の一例である。癌の例には、これらに限定されないが、白血病（例えば、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病など）、真性多血症、リンパ腫（ホジキン病、非ホジキン病）、ワルデンストローム・マクログロブリン血症、重鎖病、及び肉腫及び癌腫などの固形腫瘍（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、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、結腸癌、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、脂腺癌、乳頭癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫瘍、乏突起膠腫、神経鞘腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、及び網膜芽細胞腫）が含まれる。リンパ球増殖性疾患も、増殖性疾患と見なされる。

【０１３６】

哺乳動物における免疫応答を刺激する方法であって、有効量の可溶性融合タンパク質複合体、又は本明細書に記載されるようなＩＬ－１５変異体を哺乳動物に投与することを包含する方法も含まれる。哺乳動物における免疫応答を抑制する方法であって、有効量の可溶性融合タンパク質複合体、又は本明細書に記載されるようなＩＬ－１５変異体を哺乳動物に投与することを包含する方法も含まれる。免疫抑制の場合には、ＩＬ－１５βγ複合体に結合する能力を有しないＩＬ－１５アンタゴニスト又はＩＬ－１５ドメインを含有する、融合タンパク質複合体又はＩＬ－１５変異体が特に有益である。

【０１３７】

融合タンパク質複合体治療薬の用途の具体例として、培養細胞に単一の血清型の病原体を感染させることができる。そして、感染細胞を、インビトロにおいて特定の融合タンパク質複合体に接触させる。前述したように、融合タンパク質複合体は、ＴＣＲと結合することによって、感染細胞に毒性ドメインが提示されるように構成されている。生物活性分子を細胞に導入した（通常、約３０分間未満）後、約２～２４時間までの間、一般的には、約１８時間、細胞に所望の効果を生じさせる。この時間の後、細胞を適当な緩衝液又は細胞用培地で洗浄し、その後、生存力を評価する。融合タンパク質複合体による細胞の殺傷に充てる時間は、選択された具体的なエフェクター分子によって変わる。ただし生存力は、しばしば、約２～６時間後～約２４時間までに測定することができる。より詳しくは

後述するが、細胞の生存力は、ある種の公知の色素（例えば、トリパンブルー）又は蛍光の取り込みを観測することによって、容易に測定及び定量を行うことができる。

【0138】

本発明に係る融合タンパク質複合体とともにインキュベートされた細胞の生存力を、標準的な方法によって分析することができる。一つの例示的な方法では、インキュベーションした後又はその間にDNA複製を測定することにより、細胞の生存力を容易に分析することができる。例えば、好適なアッセイ法は、放射性標識チミジンなど、1つ又はそれ以上の検出可能に標識されたヌクレオシドの細胞への取り込みを含有する。この取り込みは、トリクロロ酢酸（TCA）沈殿の後にシンチレーション測定を行うなど、いくつかの従来法によって簡便に測定することが可能である。他の細胞生存力測定法には、周知のトリ

10

【0139】

本発明に係る融合複合体のTCR分子は、アミノ酸配列が、天然のTCR分子、例えば、ヒト、マウス若しくは他の齧歯類、又は他の哺乳動物のTCR分子に適切に対応する。

【0140】

従って、自己免疫応答又は炎症応答を抑制するための本発明に係る一つの治療法は、病気関連抗原に対して結合特異性を有するT細胞受容体又は抗体を包含している融合タンパク質複合体を含有するであろう。好ましくは、「切断型」の可溶性TCR複合体が投与される。すなわち、TCR複合体は膜貫通部分を含まない。また、この融合タンパク質複合体は、不要な免疫応答を抑制するために、IL-15のアンタゴニストとして機能するIL-15変異体も含有する。投与後、TCRドメイン又は抗体ドメインは、融合タンパク質複合体を、IL-15アンタゴニストが自己免疫応答又は炎症応答を抑制する疾患部位を標的とする。このような融合タンパク質複合体は、アレルギー、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、及び関節リウマチ、又は移植片拒絶の治療に特に有用であり得る。アンタゴニストであるIL-15変異体を非融合タンパク質として用いて、同じような非標的化法を実施することもできる。

20

【0141】

免疫応答を誘導するための本発明に係る別の治療法は、サイトカインなどの何れかの共刺激エフェクター分子存在下で、有効量の本発明のタンパク質融合複合体を投与して、生物活性ポリペプチドに結合する提示抗原の存在する場所での所望の免疫応答の誘導を提供

30

【0142】

また、本発明に係るさまざまな療法を、抗炎症薬など、別の公知の療法剤と組み合わせて使用して、疾患のより有効な治療法を提供することも可能である。例えば、免疫抑制用タンパク質融合複合体又はIL-15変異体は、自己免疫疾患及びアレルギーを治療するために、副腎皮質ステロイド剤及び非ステロイド剤などの抗炎症薬と組み合わせて用いることができる。

【0143】

本発明に係る化合物は、悪性の病気、疾患、又は症状を有するか、又は有する疑いのあるヒト患者にとって特に有用である。本発明に係る化合物は、ヒト患者における特定の腫瘍抗原を標的とするのに特に有用である。本発明によって治療可能な病気の具体例には、癌、例えば、乳癌、前立腺癌など、ウイルス感染症、例えば、HCV、HIVなど、及び本明細書に記載される他の具体的疾患又は症状が含まれる。

40

【0144】

理論に縛られることなしに、本発明に係る複数の及び明確な共有結合化合物（即ち、少なくとも1つのTCRと組み合わせた少なくともIL-15）は、例えば、対象となる個体内の抗原を標的とするためにIL-15の標的化を増大することによって、IL-15の有効性を顕著に高めることができると考えられている。

【0145】

更に（その上）、共有結合を理由として、本発明に係る結合体は、対象細胞に対し、I

50

IL-15とTCRを実質的に同時に提示するものであり、これは、化合物を共有結合させることなしには、同じ化合物を薬剤「カクテル」処方で投与することによって簡単に達成することができない効果である。

【0146】

また、一つの薬剤による治療が、次々に患者を別の薬剤に対して感作できることも報告されている。従って、本発明に係る結合体によって対象細胞に対してIL-15とTCRを実質的に同時に提示できることは、例えば、相乗効果をもたらすことによって、及び／又は免疫応答の発生を促進することによって、薬剤の活性を増大させることができる。

【0147】

診断方法

特定のpMHCリガンドに特異的な高親和性又は多価のTCRタンパク質は、その特定のpMHCに関連した病気を患っていると考えられるヒトなどの動物を診断するのに有用である。本発明に係る融合タンパク質複合体は、新生物形成症、異常タンパク質、自己免疫疾患、又は細菌、真菌、ウイルス、原生生物、酵母、線虫、もしくはその他の寄生物による感染又は侵入に関連した抗原を含有するが、これらに限定されない、本質的にはあらゆる抗原を検出するのに有用である。

【0148】

このように、対象における腫瘍細胞若しくはウイルス感染細胞又は組織であって、MHC複合体と関連して細胞又は組織の上に提示される、腫瘍又はウイルスに関連したペプチド抗原を含有する細胞又は組織を検出する方法は、a) 可溶性TCRを含有する、本発明に係る融合タンパク質複合体を、提示されたペプチド抗原とTCRとの間に特異的結合複合体を形成させる条件下で対象に投与すること；及びb) 提示された腫瘍関連又はウイルス関連のペプチド抗原を含有する腫瘍細胞もしくはウイルス感染細胞もしくは組織が存在することの指標として特異的結合複合体を検出することを含有する。

【0149】

また、融合タンパク質複合体は、産生された異常タンパク質が存在するある特定の遺伝疾患の診断にも用いることができる。融合タンパク質複合体の適用例は、公知のpMHCが存在する自己免疫疾患の診断及び治療である。I型糖尿病は、免疫破壊を誘発する自己抗原について比較的よく特徴が調べられている。多発性硬化症、セリアック病、炎症性腸疾患、クローン病、及び関節リウマチが、そのような適用に対するさらなる候補疾患である。

【0150】

IL-15変異体ポリペプチドを含有する、本発明に係る融合タンパク質複合体は、これらの適用において特に有用であり得る。例えば、TCR分子を含有する融合タンパク質複合体では、本明細書に開示されるように、IL-15変異体ドメインとIL-15Raポリペプチドとの相互作用によって、増強された抗原結合活性を有する多価のTCR分子が生成される。さらに、このIL-15変異体は、IL-15RβγC受容体を産生する細胞への結合を失わせる可能性があるアミノ酸化を含み、それによって、免疫細胞への非特異的結合又は非標的結合を低下させる。その結果、このような融合タンパク質複合体によって、TCR特異的抗原の検出を向上させることができる。また、本明細書に開示されるように、ペプチドタグ配列又は検出可能標識への結合によって、本発明に係る融合タンパク質複合体を、さらに多量体化することもできる。

【0151】

用量及び投与

本発明に係る化合物の投与は、経口、局所（経皮、頬側、舌下など）、経鼻、及び非経口（腹腔内注射、皮下注射、静脈注射、皮内注射、又は筋肉内注射など）など、さまざまな適当な経路で行うことができるが、経口又は非経口が、通常は好適である。また、当然ながら、好適な投与方法及び投薬量は、例えば、服用者の状態及び年齢によって異なる可能性がある。

【0152】

本発明に係る化合物は、単独で、又は公知の薬理学的活性を有する別の薬剤と組み合わせ、所望の適応症を治療するために使用することができる。薬剤の例には、手術、放射線照射、化学療法、及びその他の形態の免疫療法（例えば、ワクチン、抗体療法など）などの公知の治療薬が含まれる。本発明に係る化合物は、必要に応じて、そのような療法の前後や治療中に投与することができる。

【0153】

本発明に係る一つ又はそれ以上の化合物を単独で投与することができるが、それらは、従来の賦形剤、すなわち、非経口、経口、又はその他の所望の投与法に適し、かつ、活性化合物と有害な反応を起こすことなく、その服用者にも有害でない、薬学的に許容される有機担体物質又は無機担体物質と混合して、薬学的組成物の一部として存在することも可能である。本発明に係る薬学的組成物は、通常、本発明の一つ又はそれ以上の融合タンパク質複合体又はIL-15変異体、又はそのような化合物をコードするDNA構築物を、一つ又はそれ以上の許容される担体とともに含有する。担体は、処方剤の他の成分に適し、その服用者に害を与えないという意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される適当な担体は、水、塩溶液、アルコール、植物油、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸モノグリセリド及び脂肪酸ジグリセリド、ペトロエトラル (petroethral) 脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどを含有するが、これらに限定されない。医薬製剤は、滅菌することができ、必要があれば、活性化合物と有害な反応を起こさない補助剤、例えば、潤滑剤、保存剤、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩類、緩衝剤、着色剤、風味剤、及び／又は香料物質などと混合することができる。

【0154】

非経口適用に特に適しているのは、溶液、好ましくは、油性又は水性の溶液、及び懸濁液、エマルジョン、又は坐薬などの植込錠である。アンプルは、便利な単位用量である。

【0155】

腸内への適用に特に適しているのは、担体が、好ましくはラクトース及び／又はコーンスターチ及び／又はポテトスターチである、タルク及び／又は炭水化物の担体結合剤などを有する錠剤、糖衣錠、又はカプセル剤である。甘味付けされた賦形剤が用いられているシロップ、エリキシルなどを使用することができる。活性成分が、例えば、マイクロカプセル化、多段被覆などによって、分解性が異なる被覆剤で保護されている組成物などの徐放性組成物を処方することも可能である。

【0156】

また、本発明に係る治療用化合物は、リポソームに取り込ませることもできる。この取り込みは、例えば、超音波処理及び押し出し成形処理など、公知のリポソーム調製法によって行うことができる。リポソーム調製に適した常法が、例えば、A.D. Bangham et al., J. Mol. Biol., 23:238-252 (1965); F.Olson et al., Biochim. Biophys. Acta, 557:9-23(1979); F.Szoka et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 75:4194-4198(1978); S. Kim et al., Biochim. Biophys. Acta, 728:339-348(1983); 及び Mayer et al., Biochim. Biophys. Acta, 858:161-168(1986) にも開示されている。

【0157】

また、本発明は、感染体や癌などの標的疾患に対して、ヒトなどの哺乳動物にワクチンを接種するなど、ヒトなどの哺乳動物において免疫応答を誘起する方法も提供する。

【0158】

これらの方法は、本発明に係る融合タンパク質複合体又はIL-15変異体をコードするDNAベクターを含有するDNA配列の有効量を哺乳動物に投与することを含有する。融合タンパク質複合体及びIL-15変異体の発現ベクターを調製する方法については、上記又は後述の実施例に記載されている。プラスミドDNAを投与する方法、そのDNAを、投与を受ける対象者の細胞に取り込ませる方法、及びタンパク質を発現させる方法が報告されている。Ulmer, J.B et al., Science (1993) 259:1745-1749 を参照されたい。

【0159】

本発明に係る融合タンパク質複合体及びIL-15変異体をコードするDNAベクターは、好ましくは、筋肉内注射によって、ヒトなどの哺乳動物に適当に投与することができる。哺乳動物の骨格筋にcDNAを投与し、その後、投与された発現ベクターが筋細胞によって取り込まれ、DNAによってコードされたタンパク質が発現することが、Ulmer et al., に記載されており、模範的な手順となっている [Ulmer, J.B. et al., Science 259:1745-1749]。所定の治療的適用に関する最適な用量は、従来の手段で決定することができる。

【0160】

ヒトの疾患を治療する以外に、本発明に係る融合タンパク質複合体及びIL-15変異体、並びにそのような分子をコードする本発明に係るDNA構築物(コンストラクト)は、例えば、ウシやヒツジなどの家畜、及びイヌやネコなどのペットの疾患の治療など、獣医学に適用するためにも大いに有用であるだろう。

【0161】

当然ながら、所定の療法において使用される、本発明に係る所定の融合タンパク質複合体及びIL-15変異体、又はそれらをコードする本発明に係るDNA構築物の実際の最適な量は、具体的な活性化合物又は利用される化合物、処方された具体的な組成物、適用する方法、具体的な投与部位、患者の体重、一般的な健康状態、性別など、治療を受けている具体的な適応症など、並びに、担当の医師や獣医など当業者が認識しているその他の因子に応じて変わるであろう。所定の投与手順に対する最適な投与速度は、例えば、前記したガイドライン及び本明細書に開示されるアッセイ法に関して実施される従来の用量決定試験を用いて、当業者が容易に決定することができる。

【0162】

(実施例)

当然のことながら、本発明は、以下に記載する実施例に限定されるものと解されるべきではなく、本明細書に記載されたあらゆる適用、及び当業者が適宜なし得る等価な改変もすべて含有するものと解されるべきである。

【実施例1】

【0163】

—scTCR/huIL15及びscTCR/huIL15R α 融合タンパク質を含有する融合タンパク質複合体の設計

IL-15は、IL-15R α の細胞外ドメインに安定的に結合し、その結果生じた複合体は、中程度の親和性又は高親和性のIL-15R複合体を介して免疫応答を調節(すなわち、刺激又は阻止)することができるということが確認されている(1~4)。また、単鎖TCR又は抗体ポリペプチドが、サイトカイン及び他の免疫エフェクタードメインと融合することができ、そのような二重特異性分子が、両方の融合ドメインの機能活性を保持していることが明らかにされている(5~8)。さらに、多価型のTCRは、それらのリガンドへの結合を促進できることが示されている(9)。従って、本発明の特性は、第一のTCRポリペプチドがIL-15に融合している、少なくとも1つの融合タンパク質と、第二のTCRポリペプチドがIL-15R α の細胞外ドメインに融合している、少なくとも1つの融合体とが、IL-15ドメインとIL-15R α ドメインの間の結合相互作用によって複合体を形成している、2つの融合タンパク質を含有する融合タンパク質複合体を提供する。このような融合タンパク質複合体において、TCRポリペプチドは、同じものであっても、異なったものであってもよく、また、単鎖であってもヘテロ二量体の形であってもよい。

【0164】

単鎖TCRポリペプチドを含有する融合タンパク質複合体の一例が、図1Aに概略図として示されている。この融合タンパク質複合体では、多価のTCRドメインが、それらのリガンドに対して高い結合親和力/親和性をもたらす。典型的なリガンドの例はペプチド/MHC複合体であるが、これに限定されない。IL-15/IL-15R α ドメインは

、免疫調節活性をもたらす。融合タンパク質複合体を含有する代表的な融合タンパク質の構成を、図1Bに概略的に示す。これらの構成では、TCRポリペプチドは、ペプチドリンカー配列（ $(G_4S)_4$ ）によって連結されているTCR-V α ドメイン及びTCR-V β -C β ドメインからなる単鎖TCR（264scTCR）である。このscTCRポリペプチドを、直接、又はペプチドリンカー配列を介して、IL-15ドメイン又はIL-15R α ドメインに融合させる。scTCRポリペプチドの前には、可溶性発現を可能にするシグナルペプチド（又はリーダーペプチド）配列が存在する。シグナルペプチドは、その後タンパク質の輸送過程で切断されて、成熟融合タンパク質が生成される。融合タンパク質複合体の別の例では、図1A及び1Bで図示したTCRドメインを抗体ドメインで置き換えることができる。このような抗体は、単鎖形式であっても、ヘテロ多量体形式であってもよい。上記の融合タンパク質複合体のいずれについても、配列は、ヒトの配列であっても、ヒト以外の配列、例えば、限定されるわけではないが、マウスの配列であってもよい。これらの配列を、融合タンパク質ドメインの一部又は全てについて用いることができる。また、ドメインの配列は、融合タンパク質が可溶性かつ機能的であるかぎり、どのように変えてもよい。

【実施例2】

【0165】

一発現ベクターにおけるc264scTCR/huIL15遺伝子融合体の構築

p53（aa264-272）-特異的TCRに関するTCR遺伝子の単離及び特徴については既に記載されている（5～7）。ヒトのIL-15遺伝子及びIL-15R α 遺伝子を得るために、ドナー（ロット番号：2238789、Community Blood Bank, Miami, FL）の200mLの血液から、HISTOPAGUE-1077（Sigma）を用いてヒトのPBMCを単離した。細胞（ 1.5×10^7 ）を、10%FBSを含有するIMDM中30ng/mLのPMA（Sigma）、200ng/mLのイオノマイシン、及び220ng/mLの組換えヒトIL2によって、CO₂インキュベータ内にて10日間活性化した。活性化した細胞（ 1×10^7 /mL）を、さらなる使用に備えて-70℃で凍結した。活性化PBMCから全RNAを精製するために、RNEASY PLUS MINI（Qiagen）を製造業者の手順に従って使用した。この全RNAから、前方プライマーとして、

5'-CACCTTGCCATAGCCAGCTCTTC-3'を、
また、後方プライマーとして、

5'-GTCTAAGCAGCAGAGTGATGTTTG-3'を用いて、SUPERSCRIPT II IワンステップRT-PCRプラチナタグHiFi（Invitrogen）によって、以下の条件に従って、コーディング領域、並びに5'側及び3'側の隣接領域の一部を含有するヒトIL-15遺伝子を増幅した：RTには、55℃にて30分間；94℃にて2分間；cDNA増幅には、94℃にて30秒間；53℃にて30秒間；68℃にて1分間；×40サイクル；68℃にて5分間。600bpのヒトIL-15のPCR-cDNA産物を、1%アガロースゲル上で電気泳動によって分離し、単離した。このcDNA産物を、Qiaquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いてアガロースから精製した。この600bpのヒトIL-15のcDNAから、前方プライマーとして、

5'-TGGTTAACAACCTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'を、
また、後方プライマーとして、

5'-ACGCGTTTATCAAGAAAGTGTTGATGAACATTTGGAC-3'を用いて、PfuUltra（Stratagene）によって、以下のPCR条件下で成熟ヒトIL-15タンパク質の遺伝子を増幅した：94℃にて1分間；63℃にて1分間；72℃にて1分間；×35サイクル；72℃にて10分間。成熟ヒトIL-15タンパク質の遺伝子をゲル精製してから、製造業者の手順に従いTOPO反応によって、シャトルベクターであるpcDNA3.1 Directional TOPO発現ベクター（Invitrogen）にクローニングした。前方プライマーとして、

5'-TGGTTAACAACCTGGGTGAATGTAATAAGTG-3'を、

また、後方プライマーとして、

5' - A C G C G T T T A T C A A G A A G T G T T G A T G A A C A T T T G G A C
- 3' を用いた診断 PCR に基づき、Red Tag (Sigma) によって、以下の条件下で、
成熟ヒト IL-15 タンパク質遺伝子である挿入配列を含有するクローンを同定した：
94℃にて1分間；63℃にて1分間；72℃にて1分間；×35 サイクル；72℃にて
10分間。製造業者の手順に従って、QUICK START KIT (Beckman Coulter)
を用いた Genome Lab Dye Termination Cycle Sequencing による DNA 塩基配列決定法によって、正しいクローンの配列を確認した。HpaI 及び MluI で消化して、シャトルベクターから成熟ヒト IL-15 タンパク質遺伝子を取り出して、HpaI 及び MluI で消化しておいた発現ベクター pNEF38-c264scTCR にライゲーションした。pNEF38-c264scTCR 発現ベクターは、p53 (aa264-272) ペプチド特異的な可溶性キメラ単鎖 TCR タンパク質 (c264scTCR) に連結した免疫グロブリン軽鎖リーダー (又は分泌シグナル) 配列をコードする遺伝子断片を含んでいる (5)。また、このベクターは、5' 調節/エンハンサー領域、転写調節領域及びプロモーター領域、Kozak コンセンサス配列及びポリ-A 終結領域を含有する翻訳調節/開始/終結配列、並びに推定マトリックス結合調節因子を有する 3' 調節領域も含んでいる。このベクターは、哺乳動物細胞 (SV40 プロモーター/neor 遺伝子/ポリ-A) 及びバクテリア (ori/amp 遺伝子) の中での選択的な増殖を可能にする DNA 配列も含んでいる。成熟ヒト IL-15 タンパク質をコードする DNA 断片を、pNEF38-c264scTCR ベクターの中にクローニングしたところ、以下の配列を含有する c264scTCR/huIL15 融合遺伝子が得られた：3' - 免疫グロブリン軽鎖リーダー-264 TCR V-α-ペプチドリンカー-264 TCR V-β-ヒト TCR C-β-ヒト IL-15。得られたベクター (pNEF38-c264scTCR/huIL15) が図 2A に示されているが、これは、診断 PCR に基づいて同定され、DNA 塩基配列決定法によって再確認されたものである。c264scTCR/huIL15 融合遺伝子及びそのタンパク質の配列 (リーダー配列を含有する) をそれぞれ図 2B と図 2C に示す。

【実施例 3】

【0166】

変異ヒト IgG1 ヒンジ領域を含有する c264scTCR/huIL15 遺伝子融合体の発現ベクターにおける構築

pNEF38-c264scTCR/huIL15 ベクターの構築は、実施例 2 で説明されている。3 個のシステイン残基が 3 個のセリン残基で置換されている、ヒト IgG1 の H 鎖に由来する変異型ヒンジ領域を用いて、c264scTCR と huIL15 を連結させた。このヒンジ領域を、既述の 264scTCR/IgG1 遺伝子 (7) から、前方プライマーとして、

5' - T G G T G G G T T A A C G A G C C C A A A T C T T C T G - 3' を、
また、後方プライマーとして、

5' - A T T A T T A C G C G T T G G A G A C G G T G G A G A T G - 3' を用いて、
PfuUltra (Stratagene) によって、以下の PCR 条件下で変異及び増幅させた：
94℃にて30秒間；65℃にて30秒間；70℃にて1分間；×35 サイクル；72℃にて10分間。この70bpの変異型ヒト IgG1 ヒンジの PCR-cDNA 産物を1% アガロースゲル上で電気泳動によって分離し、単離した。この cDNA 産物を、Qiagquick ゲル抽出キット (Qiagen) を用いてアガロースから精製した。この変異型ヒンジ領域遺伝子を HpaI 及び MluI で消化し、HpaI 及び MluI で消化しておいた pNEF38-c264scTCR にライゲーションした。この変異型ヒンジ領域遺伝子である挿入配列を含有するクローンを、前方プライマーとして、

5' - T G A G T G A T C G A T A C C A C C A T G G A G A C A G A C A C - 3' を、
また、後方プライマーとして、

5' - A T T A T T A C G C G T T G G A G A C G G T G G A G A T G - 3' を用いた診断PCRに基づき、Red Tag (Sigma) によって、以下の条件下で同定した：94℃にて30秒間；64℃にて30秒間；70℃にて1分間；×35サイクル；72℃にて10分間。前方プライマーとして、

5' - T G G T G G A C G C G T A A C T G G G T G A A T G - 3' を、
また、後方プライマーとして、

5' - T G G T G G T C T A G A A T T A T C A A G A A G T G T T G A T G - 3' を用いて、PfuUltra (Stratagene) によって、以下のPCR条件下で、実施例2に記載されたpNEF38-c264scTCR/huIL15ベクターからhuIL-15を増幅した：94℃にて30秒間；65℃にて30秒間；70℃にて1分間；×35サイクル；72℃にて10分間。この380bpのhuIL-15のPCR-cDNA産物を1%アガロースゲル上で電気泳動によって分離し、単離した。このcDNA産物を、Qiagquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてアガロースから精製した。このhuIL15遺伝子をMluI及びXbaIで消化し、MluI及びXbaIで消化しておいた、変異型ヒンジ遺伝子を含むpNEF38-c264scTCRにライゲーションした。huIL-15遺伝子である挿入配列を含むクローンを、前方プライマーとして、

5' - T G A G T G A T C G A T A C C A C C A T G G A G A C A G A C A C - 3' を、
また、後方プライマーとして、

5' - T G G T G G T C T A G A A T T A T C A A G A A G T G T T G A T G - 3' を用いた診断PCRに基づき、Red Tag (Sigma) によって、以下の条件下で同定した：94℃にて30秒間；64℃にて2分間；70℃にて2分間；×35サイクル；72℃にて10分間。製造業者の手順に従って、QUICK START KIT (Beckman Coulter) を用いたGenomeLab Dye Termination Cycle SequencingによるDNA塩基配列決定法によって正しいクローンの配列を確認した。pNEF38-c264scTCR発現ベクターは、上記実施例2に記載されている。変異型ヒトIgG1ヒンジ領域及び成熟ヒトIL-15タンパク質をコードするDNA断片をpNEF38-c264scTCRベクターの中にクローニングしたところ、以下の配列を含むc264scTCR-hmt-huIL15融合遺伝子が得られた：3' - 免疫グロブリン軽鎖リーダー-264TCRV- α -ペプチドリンカー-264TCRV- β -ヒトTCRC- β -変異型ヒトIgG1ヒンジ-ヒトIL-15。得られたベクター (pNEF38-c264scTCR-hmt-huIL15) が図3Aに示されているが、これは、診断PCRに基づいて同定され、DNA塩基配列決定法によって再確認されたものである。c264scTCR-hmt-huIL15融合遺伝子及びそのタンパク質の配列 (リーダー配列を含む) をそれぞれ図3Bと図3Cに示す。

【実施例4】

【0167】

発現ベクターにおけるc264scTCR/huIL-15R α Δ E3遺伝子融合体の構築

PBMCの全RNAを上記のように調製した。このPBMCの全RNAから、前方プライマーとして、

5' - A G T C C A G C G G T G T C C T G T G G - 3' を、
また、後方プライマーとして、

5' - T G A C G C G T T T A A G T G G T G T C G C T G T G C C C T G - 3' を用いて、SUPERSCRIPT III ワンステップRT-PCRプラチナタグHiFi (Invitrogen) によって、以下の条件に従って、コーディング領域、並びに5'側及び3'側の隣接領域の一部を含むヒトIL-15R α 遺伝子を増幅した：RTには、55℃にて30分間；94℃にて2分間；cDNA増幅には、94℃にて1分間；66℃にて1分間；72℃にて1分間；×35サイクル；72℃にて5分間。970bpのヒトIL

－15RαのPCR-cDNA産物を、1%アガロースゲル上で電気泳動によって分離し、単離した。このcDNAを、Qiaquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてアガロースから精製した。この970bpのヒトIL-15RαのcDNAから、前方プライマーとして、

5'-TGGTTAACAATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'を、
また、後方プライマーとして、

5'-TGACGCGTTTAAAGTGGTGTGCTGTGCCCTG-3'を用いて、PfuUltra (Stratagene) によって、以下のPCR条件下でヒトIL-15Rαの細胞外ドメイン遺伝子を増幅した：94℃にて1分間；72℃にて2分間；×35サイクル；72℃にて10分間。ヒトIL-15Rαの細胞外ドメイン遺伝子をゲル精製してから、製造業者の手順に従い、TOPO反応によって、シャトルベクターであるpcDNA3.1 Directional TOPO発現ベクター (Invitrogen) にクローニングした。正しいヒトIL-15Rα細胞外ドメイン遺伝子である挿入配列を含有するクローンを、診断PCRに基づいて選び出し、製造業者の手順に従った、QUICK START KITを用いたGenomeLab Dye Termination Cycle SequencingによるDNA塩基配列決定法によって再確認した。この遺伝子は、

ヒトIL-15RαΔE3細胞外ドメイン遺伝子であると判定された。HpaI及びMluIで消化して、シャトルベクターからヒトIL-15RαΔE3細胞外ドメイン遺伝子を取り出して、HpaI及びMluIで消化しておいたpNEF38-c264scTCRにライゲーションした。ヒトIL-15RαΔE3細胞外ドメインをコードするDNA断片を、pNEF38-c264scTCRベクターの中にクローニングしたところ、以下の配列を含有するc264scTCR/huIL-15Rα融合遺伝子が得られた：3'-免疫グロブリン軽鎖リーダー-264 TCR V-α-ペプチドリンカー-264 TCR V-β-ヒトTCR C-β-IL-15RαΔE3細胞外ドメイン。得られたベクター (pNEF38-c264scTCR/huIL-15RαΔE3) は、図4Aに示されており、正しいIL-15RαΔE3細胞外ドメイン遺伝子である挿入配列を含んでいることを、診断PCRに基づいて同定して、DNA塩基配列決定法によって再確認した。c264scTCR/huIL-15RαΔE3遺伝子及びそのタンパク質の配列を、それぞれ図4Bと図4Cに示す。

【実施例5】

【0168】

－発現ベクターにおけるc264scTCR/huIL-15RαSushi遺伝子融合体の構築

PBMCの全RNAを上記のように調製した。970bpのヒトIL-15RαのcDNA (実施例3を参照されたい) から、前方プライマーとして、

5'-TGGTTAACAATCACGTGCCCTCCCCCATG-3'を、
また、後方プライマーとして、

5'-TTGTTGACGCGTTTATCTAATGCATTTGAGACTGG3'を用いて、PfuUltra (Stratagene) によって、以下のPCR条件下でヒトIL-15RαSushi遺伝子を増幅した：94℃にて1分間；66℃にて1分間；70℃にて1分間；×35サイクル；72℃にて10分間。ヒトIL-15RαSushi遺伝子のPCR産物をゲル精製して、HpaI及びMluIで消化した。この遺伝子を、HpaI及びMluIで消化しておいたpNEF38-c264scTCRにライゲーションした。ヒトIL-15RαSushiドメインをコードするDNA断片を、pNEF38-c264scTCRベクターの中にクローニングしたところ、以下の配列を含有するc264scTCR/huIL-15Rα融合遺伝子が得られた：3'-免疫グロブリン軽鎖リーダー-264 TCR V-α-ペプチドリンカー-264 TCR V-β-ヒトTCR C-β-ヒトIL-15RαSushi。得られたベクターは、図5Aに示されており、正しいヒトIL-15RαSushi遺伝子である挿入配列を含んでいることを、診断PCRに基づいて同定して、DNA塩基配列決定法によって再確認した。c264s

c T C R / h u I L - 1 5 R α S u s h i 遺伝子及びそのタンパク質の配列を、それぞれ図 5 B と図 5 C に示す。

【実施例 6】

【0169】

一変異型ヒト I g G 1 ヒンジ領域を含有する c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 R α S u s h i 遺伝子融合体の発現ベクターにおける構築

p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i ベクターの構築は上述されている。3 個のシステイン残基が 3 個のセリン残基で置換されている、ヒト I g G 1 の H 鎖に由来する変異型ヒンジ領域を用いて、c 2 6 4 s c T C R と h u I L 1 5 R α S u s h i を連結させた。ヒンジ領域は、上記したようにして変異、増幅、ライゲーション、及び確認を行った。前方プライマーとして、

5' - T A A T A A A C G C G T A T C A C G T G C C C T C - 3' を、
また、後方プライマーとして、

5' - T G G T G G T C T A G A T T A T C A T C T A A T G C A T T T G - 3' を用いて、P f u U l t r a (Stratagene) によって、以下の P C R 条件下で、上記の p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i ベクターから h u I L 1 5 R α S u s h i を増幅した：94℃にて30秒間；65℃にて30秒間；70℃にて1分間；×35サイクル；72℃にて10分間。この250bpのh u I L 1 5 R α S u s h i のP C R - c D N A 産物を1%アガロースゲル上で電気泳動によって分離し、単離した。このc D N A 産物を、Q i a q u i c k ゲル抽出キット (Qiagen) を用いてアガロースから精製した。このh u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子をM l u I 及びX b a I で消化し、M l u I 及びX b a I で消化しておいた、変異型ヒンジ遺伝子を含有するp N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R にライゲーションした。前方プライマーとして、

5' - T G G T G G G T T A A C G A G C C C A A A T C T T T C T G - 3' を、
また、後方プライマーとして、

5' - T G G T G G T C T A G A T T A T C A T C T A A T G C A T T T G - 3' を用いて、以下の条件下で、R e d T a g (Sigma) によって、診断P C Rに基づき、h u I L - 1 5 遺伝子である挿入配列を含有するクローンを同定した：94℃にて30秒間；65℃にて1分間；70℃にて1分間；×35サイクル；72℃にて10分間。製造業者の手順に従って、Q U I C K S T A R T K I T (Beckman Coulter) を用いたG e n o m e L a b D y e T e r m i n a t i o n C y c l e S e q u e n c i n g によるD N A 塩基配列決定法によって正しいクローンの配列を確認した。p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R 発現ベクターは、上記されている。変異型ヒト I g G 1 ヒンジ領域及びヒト I L - 1 5 R α S u s h i タンパク質をコードするD N A 断片をp N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R ベクターの中にクローニングしたところ、以下の配列を含有するc 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 R α S u s h i 融合遺伝子が得られた：3' - 免疫グロブリン軽鎖リーダー - 2 6 4 T C R V - α - ペプチドリンカー - 2 6 4 T C R V - β - ヒト T C R C - β - 変異型ヒト I g G 1 ヒンジ - ヒト I L - 1 5 R α S u s h i 。得られたベクター (p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 R α S u s h i) が図 6 A に示されており、診断P C Rに基づいて同定して、D N A 塩基配列決定法によって再確認した。c 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 R α S u s h i 融合遺伝子及びそのタンパク質の配列 (リーダー配列を含む) が、それぞれ図 6 B と図 6 C に示されている。

【実施例 7】

【0170】

一単一の発現ベクターにおけるc 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子及びc 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 遺伝子の構築

本発明に係る2つの融合タンパク質を単一の宿主細胞の中で発現させるために、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 及びc 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 をコードする遺伝子を、単一の発現ベクターにクローニングした。c 2 6 4 s c T C R / h u

I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子は、前方プライマーとして、

5' - T G A G T G T C C G G A A C C A C C A T G G A G A C A G A C A C - 3' を

、

また、後方プライマーとして、

5' - T T G T T G G C G G C C G C T T A T C A T C T A A T G C A T T T G A G -

3' を用いて、以下の条件下で、P f u U l t r a (Stratagene) によって、実施例 5 に

記載された鋳型から増幅した：94℃にて1分間；68℃にて1分間；72℃にて2分間；

×35サイクル；72℃にて10分間。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s

h i 遺伝子の P C R 産物をゲル精製し、B s p E I 及び N o t I で消化し、B s p E I 及

び N o t I で消化しておいた p S U N 3 4 R 1 発現ベクターにライゲーションした。p S

U N 3 4 R 1 発現ベクターは、目的とする遺伝子をクローニングするため、また、5' 調

節／エンハンサー領域、転写調節領域及びプロモーター領域、K o z a k コンセンサス配

列及びポリ-A 終結領域を含有する翻訳調節／開始／終結配列、並びに調節因子を有する

イントロン及び3' 領域をクローニングするための2つの部位を含んでいる。また、この

ベクターは、哺乳動物細胞 (S V 4 0 プロモーター／n e o R 遺伝子／ポリ-A) 及びバ

クテリア (o r i / a m p 遺伝子) の中での選択的な増殖を可能にする DNA 配列も含ん

でいる。正しい c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子である挿入配列

を含有するベクターを、診断 P C R に基づいて同定し、DNA 塩基配列決定法によって再

確認した。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 遺伝子は、前方プライマーとして、

5' - T G A G T G A T C G A T A C C A C C A T G G A G A C A G A C A C - 3' を

、

また、後方プライマーとして、

5' - T G A G T G T T C G A A T T A T C A A G A A G T G T T G A T G A A C - 3

' を用いて、以下の条件下で、P f u U l t r a (Stratagene) によって、実施例 2 に記

載された鋳型から増幅した：94℃にて1分間；65℃にて1分間；72℃にて2分間；

×35サイクル；72℃にて10分間。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 遺伝子の P C

R 産物をゲル精製し、C l a I 及び C s p 4 5 I で消化し、C l a I 及び C s p 4 5 I で

消化しておいた p S U N 3 4 R 1 - c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 発

現ベクターにライゲーションした。得られたベクター (p S u n - c 2 6 4 s c T C R I

L 1 5 / c 2 6 4 s c T C R I L 1 5 R α S u s h i) は図 7 に示されており、正しい c

2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 遺伝子である挿入配列を含んでいることを、診断 P C R

に基づいて同定して、DNA 塩基配列決定法によって再確認した。このベクターは、c 2

6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L

1 5 遺伝子の両方を含んでいる。

【実施例 8】

【0171】

一単一の発現ベクターにおける c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α Δ E 3 遺伝子及び

c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 遺伝子の構築

c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α Δ E 3 融合遺伝子は、前方プライマーとして、

5' - T G A G T G T C C G G A A C C A C C A T G G A G A C A G A C A C - 3' を

、

また、後方プライマーとして、

5' - T T G T T G G C G G C C G C T T A T C A A G T G G T G T C G C T G - 3'

を用いて、以下の条件下で、P f u U l t r a (Stratagene) によって、実施例 4 に記載

された鋳型から増幅した：94℃にて1分間；68℃にて1分間；72℃にて2分間；×

35サイクル；72℃にて10分間。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α Δ E 3 遺伝

子の P C R 産物をゲル精製し、B s p E I 及び N o t I で消化して、B s p E I 及び N o

t I で消化しておいた発現ベクター p S U N 3 4 R 1 にライゲーションした。正しい c 2

6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α Δ E 3 遺伝子である挿入配列を含有するベクターを、

診断 P C R に基づいて同定し、DNA 塩基配列決定法によって再確認した。実施例 7 に記

10

20

30

40

50

載されたようにして、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 遺伝子を増幅し、発現ベクターにクローニングした。得られたベクター (p S u n - c 2 6 4 s c T C R I L 1 5 / c 2 6 4 s c T C R I L 1 5 R a D E 3) は図 8 に示されており、正しい c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 遺伝子である挿入配列を含んでいることを、診断 P C R に基づいて同定して、D N A 塩基配列決定法によって再確認した。このベクターは、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R a D E 3 遺伝子及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 遺伝子の両方を含んでいる。

【実施例 9】

【0172】

一融合タンパク質を産生する、形質移入された宿主細胞株の作製

いくつかの異なった形質転換法、形質移入法、又は形質導入法によって、発現ベクターをさまざまな宿主細胞株に導入することができる。このような方法の一つでは、C H O - K 1 細胞 (5×10^4) を 6 ウェルプレートに播種して、C O ₂ インキュベータ内で一晚培養した。この細胞に、T C R / I L 1 5 融合遺伝子及び/又は T C R / I L 1 5 R a 融合遺伝子を含む 5 μ g の発現ベクターを、10 μ L の M i r u s T r a n s I T - L T 1 試薬 (Mirus) を製造業者の手順に従って使用して形質移入した。形質移入した 1 日後に、4 m g / m L の G 4 1 8 (Invitrogen) で細胞を選択した。G 4 1 8 耐性細胞を増大させ、後述するように M A C S 選択を 3 ~ 5 回行うことによって、T C R 融合タンパク質発現細胞を濃縮した。細胞を 10 m M の E D T A で剥離し、10 % F B S 含有 I M D M で 1 回洗浄した。細胞を再懸濁 (100 μ L 中 10^7 細胞) し、5 μ g の R - フィコエリトリン (P E) を結合した p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) / H L A - A 2 テトラマー試薬とともに 4 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。細胞を 1 回洗浄し、抗 P E 抗体結合磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) とともに 4 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。細胞を磁気カラム (磁場内にある) に負荷し、結合しなかった細胞を洗浄用緩衝液 (0.5 % B S A 含有 P B S) で除去した。カラムを磁場から引き離した後、カラムに結合した細胞を 10 % F B S 含有 I M D M で溶出した。この方法は、産生/分泌過程での細胞表面上における可溶性融合タンパク質の一過性の提示に基づいて、融合タンパク質発現細胞の濃縮を可能にする。各濃縮工程の後に、細胞表面への融合タンパク質の結合を観測した。フローサイトメトリーによって測定した、細胞表面に結合した融合タンパク質のレベルを、E L I S A にによって測定した、細胞培養培地中に存在する可溶性融合タンパク質のレベルと比較した。比較の一例を図 9 A 及び 9 B に示す。この例では、p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R a S u s h i を遺伝子移入した C H O - K 1 細胞を、M A C S によって 1 ~ 5 回濃縮して、6 ウェルプレート上に播種した (1×10^6 細胞/ウェル)。そして、24 時間後、細胞を 10 m M の E D T A で剥離し、I M D M + 10 % F B S で 1 回洗浄し、0.6 μ g の P E 結合 p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) / H L A - A 2 四量体、又は同量の対照 P E 結合 C M V p p 6 5 (a a 4 9 5 - 5 0 3) / H L A - A 2 四量体とともに 4 $^{\circ}$ C で 30 分間染色した (2×10^5 細胞/100 μ L の I M D M + 10 % F B S)。細胞を 1 回洗浄し、図 9 A に示したように、細胞表面に結合した可溶性融合タンパク質のレベルをフローサイトメトリーによって分析した。また、図 9 B に示したように、細胞培養培地の中に分泌される可溶性融合タンパク質のレベルも、捕捉用抗体である抗ヒト T C R C β 抗体 (B F 1)、及び検出用抗体である、既述 (5) のビオチン化抗ヒト T C R C β 抗体 (W 4 F) を用いた T C R 特異的 E L I S A にによって測定した。その結果、磁気ビーズによる濃縮工程によって、より高レベルの可溶性融合タンパク質を産生する形質転換体が得られたことが示された。そして、濃縮された形質転換細胞を、限界希釈法によって 3 回サブクローニングし、培養培地に分泌される可溶性融合タンパク質のレベルに基づいて (上記した E L I S A にによって測定する)、産生細胞株をスクリーニングした。産生細胞株を、I M D M + 10 % F B S 培地又は無血清培地内において、可溶性融合タンパク質を生成させるのに適した条件下 (すなわち、フラスコ、スピナー、発酵器、バッグ、ビン) で拡張及び増殖させた。

【0173】

場合によっては、さまざまな発現ベクターによって宿主細胞を同時形質移入して、複数の融合タンパク質を発現できる形質転換体を作出した。また、ある融合タンパク質を発現する形質転換体を、1つ又はそれ以上の発現ベクターで再形質移入して、複数の融合タンパク質を発現する形質転換体を作出することもできた。また、実施例7及び8に例示されるように、2つ以上の融合タンパク質遺伝子を含む発現ベクターによって細胞に形質移入して、複数の融合タンパク質を発現する形質転換体を作出した。得られた細胞を用いて、本発明の多成分融合タンパク質複合体を可溶性分子として細胞培養培地の中に産生させることができた。

【0174】

また、高いレベルの融合タンパク質又は融合タンパク質複合体の産生も、米国特許出願第09/204,979号に記載された細胞形質移入法及び選択法によって行うことが可能である。

【実施例10】

【0175】

—TCR/IL15融合タンパク質及びTCR/IL15R α 融合タンパク質、又は融合タンパク質複合体の精製

本発明に係る可溶性融合タンパク質又は融合タンパク質複合体は、さまざまな方法を用いて、例えば、溶媒中における選択的な分配又は可溶性によって、又は、電荷、疎水性、親水性、サイズ、及び/若しくはリガンドに対する選択的若しくは半選択的な結合に基づく分離（すなわち、クロマトグラフィー）によって、宿主細胞又は細胞培養培地から精製することができる。可溶性の融合タンパク質又は融合タンパク質複合体は、適当なタンパク質折り畳み条件を用いることで、不溶性物質から作出することができる。一例では、ヒトTCR-C β ドメインを認識する抗体（BF1）を用いた親和性クロマトグラフィーによって、c264scTCR/IL15融合タンパク質を細胞培養培地から精製した。一般的には、まず、pH8.0の20mM Tris-HCl（ローディング緩衝液でBF1結合セファロース（Sepharese）を含むカラムを平衡化し、c264scTCR/IL15融合タンパク質を含むpH調整細胞培養培地を、2ml/分で負荷した。そして、このカラムを、5倍カラム量のローディング緩衝液で洗浄して、未結合のタンパク質を除去し、4倍カラム量の0.5Mクエン酸ナトリウム、pH4で、c264scTCR/IL15融合タンパク質を溶出した。回収した後、pH8.0の2M Tris-HClで溶出液を調整した。精製したタンパク質をPBSに入れて緩衝液を交換して、0.22 μ mフィルターを用いて濾過した。BF1カラムを、pH3.0の50mMグリシンHClで処理して、4℃の20%エタノール中で次の使用時まで保存した。この融合タンパク質は、イオン交換クロマトグラフィー及び/又はサイズ排除クロマトグラフィーによって、さらに精製することができた。c264scTCR/IL15融合タンパク質、c264scTCR/IL15R α Sushi融合タンパク質、及びc264scTCR/IL15R α Δ E3融合タンパク質を含む細胞培養上清を、上記の方法で精製し、精製した融合タンパク質のサンプルを、還元的条件下でSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動して、その後、クマシーブリリアントブルーで染色して分析を行った。このようなゲルの例を図10に示す。主要なタンパク質バンドは、融合タンパク質の配列から予測された正確な分子量に相当している。

【実施例11】

【0176】

—TCR/IL15融合タンパク質及びTCR/IL15R α 融合タンパク質の融合タンパク質複合体の生成

IL-15は、細胞外IL-15R α ドメインに高い親和性で特異的に結合する(4)。従って、IL-15ドメイン及びIL-15R α ドメインを有する融合タンパク質の複合体を、発現細胞内、又は細胞外で未精製若しくは精製後の融合タンパク質によることを含む、さまざまな条件下で形成させることができる。一例では、等モル量の精製融合タンパク質を適当な条件下（すなわち、室温にて10分間）で混合して、融合タンパク質複合体

を形成させることができる。複合体形成は、直接的結合アッセイ法、競合的結合アッセイ法、免疫沈殿法、表面プラズマ共鳴法、又は、複合体の大きさ、活性、若しくはその他の性質に基づく分析法など、さまざまな技術を用いて観測することができる。例えば、図11に示すように、サイズ排除クロマトグラフィーによって、分子量に基づいて、c264scTCR/huIL15融合タンパク質及びc264scTCR/huIL15RαSushi融合タンパク質を含有する複合体の形成を観測することができる。この検討では、分析を行うために、約100μgのc264scTCR/huIL15(0.5mg/ml)をSuperdex200HR10/30カラムに負荷した。c264scTCR/huIL15について計算された分子量は約57kDである。SECプロファイル(図11A)に基づく、推定分子量は約98kDであり、この融合タンパク質が単量体である可能性が高いことを示唆している。同様に、約60μgのTCR/huIL15RαSushi融合タンパク質(0.3mg/ml)をSuperdexカラムに負荷した。c264scTCR/huIL15RαSushiについて計算された分子量は約52kDである。SECプロファイル(図11B)に基づく、融合タンパク質の推定分子量は約81kDであり、ここでも、この融合タンパク質が単量体である可能性が高いことを示唆している。別のTCRによる融合タンパク質の以前のSEC分析でも、グリコシル化された融合タンパク質の単量体の計算された分子量と推定分子量との間には同様の差異が示された。c264scTCR/huIL15融合タンパク質とc264scTCR/huIL15RαSushi融合タンパク質を等モル量で混合して、約126μgの混合タンパク質(0.63mg/ml)をカラムに負荷したところ、図11Cに示したプロファイルが得られた。2つの主要ピークの分子量を推定したところ、1つは約170kDで、2つの融合タンパク質のヘテロ二量体であり、もう1つは約91kDで、これらの融合タンパク質の単量体が混合したものである可能性が高い。従って、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15RαSushi融合タンパク質の混合調製物に170kDの分子種が出現することが、本発明に係る融合タンパク質複合体を生成できることの証しである。

【0177】

c264scTCR/huIL15融合タンパク質及びc264scTCR/huIL15RαΔE3融合タンパク質を含有する融合タンパク質複合体の分析も行った。約100μgのc264scTCR/huIL15RαΔE3融合タンパク質(0.5mg/ml)をSuperdexカラムに負荷した。c264scTCR/huIL15RαΔE3について計算された分子量は約60kDである。SECプロファイル(図12A)に基づく、このタンパク質の推定分子量は約173kDであり、このタンパク質がホモ二量体として存在することを示唆している。c264scTCR/huIL15融合タンパク質とc264scTCR/huIL15RαΔE3融合タンパク質を等モル量で混合して、約118μgの混合タンパク質(0.59mg/ml)をカラムに負荷したところ、図12Bに示したプロファイルが得られた。2つの主要ピークの分子量を推定したところ、1つは>210kDで、2つのヘテロ二量体から構成される四量体である可能性が高く、もう1つは約93kDで、c264scTCR/huIL15の単量体である可能性が高い。したがって、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15RαΔE3融合タンパク質の混合調製物に170kDの分子種が出現することが、本発明に係る融合タンパク質複合体を生成できることの証しである。

【実施例12】

【0178】

—TCR/IL15融合タンパク質及びTCR/IL15Rα融合タンパク質の融合タンパク質複合体は、ペプチド/MHC複合体への増大した結合を示す。

上記のようにして作出された融合タンパク質複合体が、TCR特異的抗原であるp53(aa264-272)/HLA-A2.1に結合する能力について、その特徴を調べた。この抗原を提示する細胞を作出するために、HLA-A2.1陽性T2細胞に、26℃で一晩、p53(aa264-272)ペプチドを負荷してから、 5×10^6 細胞/mL

を液体窒素中で保存した。ペプチドとともにインキュベートしなかったT2細胞を対照として用いる。p53ペプチド負荷T2細胞又は対照用T2細胞を融解して、1mLのIMDM+10%FBSに再懸濁した。そして、細胞($5 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$)を、0.5 μg の以下の融合タンパク質で室温にて30分間染色した：c264scTCR/huIL15、c264scTCR/huIL15R α Sushi、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi複合体。細胞を、洗浄用緩衝液(0.5%BSA及び0.05%アジ化ナトリウムを含有するPBS)で1回洗浄し、100 μL の洗浄用緩衝液中0.1 μg のビオチン化マウスモノクローナル抗ヒトTCR β 抗体(BF1)によって、室温にて30分間染色した。細胞を1回洗浄してから、100 μL の洗浄用緩衝液中0.5 μg のR-フィコエリトリンを結合したストレプトアビジンによって、室温にて30分間染色した。フローサイトメトリーによって分析するために細胞を洗浄及び再懸濁した。図13に示すように、各々の融合タンパク質は、p53ペプチド負荷細胞を特異的に染色することができた。また、発現したc264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi融合タンパク質複合体は、T2細胞上に発現したp53(aa264-272)/HLA-A2.1複合体への多価c264scTCRドメインを介した特異的結合を増強した。特に、二量体融合タンパク質複合体は、c264scTCR/huIL15融合タンパク質又はc264scTCR/huIL15R α Sushi融合タンパク質の単量体よりも、p53ペプチド負荷T2細胞を良好に染色した。これらのデータは、多量体融合タンパク質複合体の方が、これらの融合タンパク質の単量体型よりも良好な抗原認識特性をもたらすことを示唆している。

【実施例13】

【0179】

—huIL-15変異遺伝子の作出及びc264scTCR-hmt-huIL15変異遺伝子発現ベクターの構築

上記したように、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushiポリペプチドは、IL-15ドメインとIL-15R α ドメインの相互作用によって複合体を形成することができ、多価の融合タンパク質複合体は、ペプチド/MHC複合体に対して増強された結合を示す。このような融合タンパク質複合体には、増強された結合活性に基づいた、抗原特異的な、又は抗原を標的とする、研究用、診断用、及び治療用の薬剤としての利点がある。融合タンパク質のIL-15/IL-15R α ドメインが、IL-15受容体を発現する細胞に結合できることも、本明細書に示されるように望ましい特性である。しかし、IL-15/IL-15R α ドメインが、IL-15受容体を発現する細胞の応答と相互作用し、及び/又はそれをもたらす能力を低下又は上昇させることが有利である適用場面がある。例えば、主要な目的が、ペプチド/MHC複合体を特異的に検出するために融合タンパク質複合体を使用することである適用場面(すなわち、研究用途及び診断用途)では、この相互作用を低下させることが望ましい可能性がある。また、治療への適用場面では、IL-15が介在する応答を低下又は上昇させることができるIL-15ドメインを含有する融合タンパク質複合体を作出することも望ましい可能性がある。この問題に取り組むために、変異解析を行って、IL-15R α との相互作用をもたらすことなく、IL-2/15R $\beta\gamma$ c複合体への結合を生じさせるIL-15の残基を同定した。得られた変異体から、アンタゴニスト又はアゴニストを含有するIL-15変異体を作成することができる。本発明に係る融合タンパク質に使用するだけでなく、得られたIL-15のアンタゴニスト及びアゴニストは、研究、診断、又は治療に利用するための可溶性サイトカイン(すなわち、非融合タンパク質)として、又はIL-15R α ドメインとの複合体としての有用性も有する可能性がある。例えば、IL-15アンタゴニストは、不要な免疫応答を抑制するのに有用である可能性がある。一方では、さまざまな病気を治療するための治療法においてIL-15アゴニストを用いて、免疫応答を刺激することができる。

【0180】

I L-15のアミノ酸配列と構造をI L-2と比較して、I L-15と、I L-15 R α 、I L-15 R β 、及び／又は γ Cとの相互作用をもたらす可能性がありそうなアミノ酸をいくつか同定した。表1及び図14Aに示すように、成熟ヒトI L-15タンパク質がI L-15 R β γ c受容体に結合する部位である可能性がある8位、61位、65位、72位、及び108位にあるアミノ酸（番号付けは、天然型の成熟ヒトI L-15の配列に基づく）が、それぞれ置換されているか、又は2つ又はそれ以上の別の置換と併存しているI L-15変異体が作出された。8位のアスパラギン酸が、アラニン又はアスパラギンで置換された。61位のアスパラギン酸は、アラニンで置換された。65位のアスパラギンは、アラニン又はアスパラギン酸で置換された。72位のアスパラギンは、アルギニン又はアスパラギン酸で置換された。108位のグルタミンは、アラニンで置換された。8位のA s p及び108位のG l nは、それぞれアラニンで置換された。8位のA s p及び65位のA s nは、それぞれアスパラギン又はアラニンで置換された。8位のA s p及び65位のA s nは、それぞれセリン又はアルギニンで置換された。I L-15変異体を作成するために、オーバーラップPCRを用いた。

10

【0181】

例えば、8位のA s pをアラニン残基又はアスパラギン残基で置換したものを作出するためには、p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5ベクターを鋳型に用いて、2つの重複するc D N A断片を、断片1に対する前方プライマーとして、

5' - T G G T G G A C G C G T A A C T G G G T G A A T G - 3' を、
また、断片1に対する後方プライマーとして、

20

5' - A G A T C T T C A A T T T T T T T C A A M K H A C T T A T T A C A T T C A C C C A G - 3' を用い、

断片2に対する前方プライマーとして、

5' - A C T G G G T G A A T G T A A T A A G T D M K T T G A A A A A A A T T G A A G A T C - 3' を、

また、断片2に対する後方プライマーとして、

5' - T G G T G G T C T A G A T T A T C A A G A A G T G T T G A T G - 3' を用いて、P f u U l t r a (Stratagene)によって、以下のPCR条件下で増幅した：94℃にて1分間；66℃にて1.5分間；72℃にて1.5分間；×35サイクル；72℃にて10分間。断片1及び2のPCR-c D N A産物を1%アガロースゲル上で電気泳動によって分離し、単離した。このc D N A産物を、Q i a q u i c kゲル抽出キット (Qiagen)を用いてアガロースから精製した。断片1及び2のPCR-c D N A産物を、P f u U l t r a (Stratagene)によって、以下のPCR条件下で一つに融合した：94℃にて1分間；66℃にて1.5分間；72℃にて1.5分間；×10サイクル。この重複したPCR-c D N A断片は、前方プライマーとして、

30

5' - T G G T G G A C G C G T A A C T G G G T G A A T G - 3' を、
また、後方プライマーとして、

5' - T G G T G G T C T A G A T T A T C A A G A A G T G T T G A T G - 3' を用いて、P f u U l t r a (Stratagene)によって、以下のPCR条件下で増幅した：94℃にて1分間；64℃にて1.5分間；69℃にて1.5分間；×30サイクル；72℃にて10分間。このh u I L - 1 5変異体のPCR-c D N A産物を1%アガロースゲル上で電気泳動によって分離して、単離した。このc D N A産物を、Q i a q u i c kゲル抽出キット (Qiagen)を用いてアガロースから精製した。このh u I L 1 5変異遺伝子をM l u I及びX b a Iで消化し、M l u I及びX b a Iで消化しておいたp N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R - h m tにライゲーションした。製造業者の手順に従って、Q U I C K S T A R T K I T (Beckman Coulter)を用いたG e n o m e L a b D y e T e r m i n a t i o n C y c l e S e q u e n c i n gによるDNA塩基配列決定法によって、8位にアラニン又はアスパラギンによる置換を有するh u I L - 1 5遺伝子を含むクローンを確認した。p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R発現ベクターについては上記されている。変異型ヒトI L-15タンパク質をコードするDNA断片をp N E F 3 8 -

40

50

c 2 6 4 s c T C R ベクターの中にクローニングしたところ、以下の配列を含有する c 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 D 8 A 融合遺伝子又は c 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 D 8 N 融合遺伝子が得られた：3' - 免疫グロブリン軽鎖リーダー - 2 6 4 T C R V - α - ペプチドリンカー - 2 6 4 T C R V - β - ヒト T C R C - β - 変異型ヒト I g G 1 ヒンジャー - ヒト I L - 1 5 D 8 A 又はヒト I L - 1 5 D 8 N。得られたベクター（p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 D 8 A 又は p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 D 8 N）が図 1 4 B に示されているが、これは、DNA 塩基配列決定法によって確認されたものである。p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 D 8 A 融合遺伝子又は p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R - h m t - h u I L 1 5 D 8 N 融合遺伝子及びそのタンパク質の配列（リーダー配列を含有する）をそれぞれ図 1 4 C と図 1 4 D に示す。

10

【0182】

別の変異も同様の方法で導入し、発現ベクターを上記したように構築した。発現ベクターを CHO、K1 細胞に導入して、実施例 9 に記載されるようにして、安定した形質転換体を作製した。T C R / I L 1 5 融合タンパク質、及び I L - 1 5 変異体を含有する融合タンパク質複合体の作製及び精製は、実施例 10 及び 11 に記載したのと同様の方法を用いて行った。I L - 1 5 変異体を可溶性サイトカインとして作製することは、原核生物発現系及び真核生物発現系における産生など、当該技術分野において公知のさまざまな方法によって行うことができる（例えば、国際公開公報第 9 5 2 7 7 2 2 号；Hsu et al., J. Immunol. 175:7226 を参照されたい）。

20

【実施例 14】

【0183】

- T C R / I L 1 5 融合タンパク質及び T C R / I L 1 5 R α 融合タンパク質、並びに融合タンパク質複合体の機能的特徴

実施例 9 に記載した E L I S A 及び p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) / H L A - A 2 . 1 試薬を用いる細胞染色法、及び実施例 12 に記載した抗原提示細胞染色法によって、融合タンパク質の T C R ドメインの機能的結合が証明された。融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと I L - 1 5 R α ドメインが相互作用できることが、実施例 11 に記載されるように証明された。さらに、I L - 2 / 1 5 R $\beta \gamma$ c 受容体への結合、又は I L - 1 5 受容体を産生する免疫細胞の活性を調節することを含む、さまざまな方法によって、I L 1 5 ドメイン及び I L 1 5 R α ドメインの機能活性を評価することができる。一つの例では、ヘテロ三量体 I L - 1 5 R ($\alpha \beta \gamma$ c 鎖) を発現する C T L L - 2 細胞を、0.5 μ g の以下の各融合タンパク質とともに室温にて 30 分間インキュベートした：c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5、2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i、又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 + c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 複合体。細胞を洗浄用緩衝液（0.5% B S A 及び 0.05% アジ化ナトリウムを含有する P B S）で 1 回洗浄し、0.5 μ g の R - フィコエリトリン（P E）結合 p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) / H L A - A 2 四量体によって、室温にて 30 分間染色した。フローサイトメトリーによって分析するために細胞を洗浄及び再懸濁した。図 15 に示すように、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 融合タンパク質及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 + c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 複合体が、それらの h u I L - 1 5 ドメインを介して、C T L L - 2 細胞上の I L - 1 5 受容体と結合することが、結合した融合タンパク質の c 2 6 4 s c T C R ドメインを認識する P E 結合 p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) / H L A - A 2 四量体を用いて検出することができる。これらの結果は、融合タンパク質 / 融合タンパク質複合体の I L - 1 5 ドメイン及び T C R ドメインが、それらの同族リガンドと機能的に相互作用できることを示している。

30

40

【0184】

また、C T L L - 2 細胞は、増殖をサイトカインに依存していて、そして組換えヒト I L - 1 5 に応答することができる。融合タンパク質及び融合タンパク質複合体の I L - 1 5 生物活性を評価するために、C T L L - 2 細胞を用いる、細胞に基づいた W S T - 1 細

50

胞増殖アッセイ法を開発した。WST-1 (Roche) は、代謝的に活性な細胞に存在する脱水素酵素によってホルマザン (formazan) に変換することができる試薬である。WST-1 アッセイ法では、440～450 nmにおける吸光度で測定される、培養培地中のホルマザンの量は、培養中の生細胞数に正比例する。CTL-2細胞 ($2 \times 10^4 / 200 \mu\text{L}$) を、CO₂ インキュベータ内で、37℃にて3日間、96ウェルプレート中で表示濃度の以下の融合タンパク質 (0～28 ng/mL) とともにインキュベートした：c264scTCR/huIL15、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi複合体、又はc264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Δ E3複合体。マイクロタイタープレート・リーダーによって、440～450 nmにおける吸光度を測定するために100 μL の培養培地を回収する前に、細胞を10 μL のWST-1とともに4時間インキュベートした。図16に示すように、c264scTCR/huIL15融合タンパク質は、1.8 ng/mL ($\sim 31.25 \text{ pM}$) という低濃度で、CTL-2細胞の増殖を支持することができるが、このことは、高親和性IL-15受容体を介して、CTL-2細胞が、c264scTCR/huIL15融合タンパク質によって活性化されることを示唆している。興味深いことに、融合タンパク質複合体も、より低い度合いではあるが、CTL-2細胞の増殖を支持して、c264scTCR/huIL15の刺激活性が、c264scTCR/huIL15R α Sushi又はc264scTCR/huIL15R α Δ E3との複合体形成の後に (それぞれ、1倍又は4倍) 抑制されたことを示している。このことは、高親和性IL-15受容体へのc264scTCR/huIL15の結合が、c264scTCR/huIL15R α Sushi融合タンパク質又はc264scTCR/huIL15R α Δ E3融合タンパク質によって阻害されることを示唆している。これらの結果は、融合タンパク質及び融合タンパク質複合体が、さまざまな条件下で、免疫細胞の応答を活性化又は抑制できることの証拠を提示している。

【0185】

32D β 細胞株 (下記参照) などの中度親和性IL-15 $\beta\gamma_c$ 受容体だけを発現する細胞株を用いて、同様のアッセイを行った。場合によっては、IL-15R産生細胞の増殖を刺激する際のIL-15の生物活性が、IL-15R α ドメインと複合体になっているときに増強されるという可能性もある (1～3)。c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi複合体又はc264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Δ E3複合体による細胞増殖刺激を評価すれば、融合タンパク質複合体が、免疫細胞の免疫応答を刺激又は活性化し得ることのさらなる証拠を提供できるだろう。

【実施例15】

【0186】

—TCR/IL15 α SushiとTCR/IL-15変異体の二量体融合タンパク質複合体は、ペプチド/MHC複合体に対してTCR特異的結合を示すが、IL-15R $\beta\gamma_c$ 受容体に対しては、より低い結合を示す。

TCR特異的抗原であるp53 (aa264-272) /HLA-A2.1に結合する能力について、上記したようなIL-15変異体を含有する融合タンパク質複合体の特徴を調べた。p53 (aa264-272) /HLA-A2.1を提示する細胞を作り出すために、1 $\times$ PLE (Altor Bioscience) の存在下、37℃にて、2～3時間、HLA-A2.1陽性T2細胞 ($2 \times 10^6 / \text{mL}$) に20 μM のp53 (aa264-272) ペプチドによる負荷をかけた。ペプチドとインキュベートしなかったT2細胞、及びIL-2/15R $\beta\gamma_c$ を発現する32D β 細胞を対照として用いる。そして、p53ペプチドを負荷されたT2細胞、対照T2細胞、又は32D β 細胞 ($2 \times 10^5 / 100 \mu\text{L}$) を、320 nMの以下の二量体融合タンパク質複合体とともに、4℃にて30分間インキュベートした：1) c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15R α Sushi、2) c264scTCR/huIL15D8A+c264scTCR/huIL15R α Sushi、及び3) c264scTCR/huIL15D8N+

c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i。これらの複合体は、1 6 0 n M の精製 c 2 6 4 s c T C R h u I L 1 5 融合タンパク質と、1 6 0 n M の精製 c 2 6 4 s c T C R h u I L 1 5 R α S u s h i 融合タンパク質を 4 ° C にて 3 時間インキュベートすることによって生成した。染色後、洗浄用緩衝液 (0 . 5 % B S A 及び 0 . 0 5 % アジ化ナトリウムを含有する P B S) で細胞を 1 回洗浄し、1 0 0 μ L の洗浄用緩衝液中 0 . 5 μ g のビオチン化マウスモノクローナル抗ヒト T C R C β 抗体 (B F 1) によって、4 ° C にて 3 0 分間染色した。細胞を 1 回洗浄してから、1 0 0 μ L の洗浄用緩衝液中で 0 . 5 μ g の R - フィコエリトリン結合ストレプトアビジンによって、4 ° C にて 3 0 分間染色した。フローサイトメトリーによって分析するために細胞を洗浄及び再懸濁した。図 1 7 A に示すように、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 D 8 A + c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 複合体及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 D 8 N + c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 複合体は、p 5 3 ペプチド負荷 T 2 細胞の特異的染色について、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 + c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i 複合体と同等の活性を示した。これらの結果は、多価の s c T C R ドメインが、これらの融合複体のそれぞれにおいて、完全に機能していることを示している。しかし、図 1 7 B 及び図 1 7 C に示されるように、変異型 c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 融合タンパク質複合体は、対照である T 2 細胞 (図 1 7 B) 及び I L - 1 5 R β γ c 陽性 3 2 D β 細胞 (図 1 7 C) に対して、野生型 c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 融合タンパク質複合体よりも低いバックグランド染色を示した。すなわち、これら I L - 1 5 変異体 (D 8 A 及び D 8 N) を含有する融合タンパク質複合体は、3 2 D β 細胞上に存在する I L - 1 5 R β γ c 受容体に対する結合活性を示さない。I L - 1 5 R β γ c 受容体への結合についての同様の検討を、I L - 1 5 変異体を含有する別の融合タンパク質を用いて行って、表 1 にまとめた。その結果、I L - 1 5 変異体を含有する本発明に係る融合タンパク質及び融合タンパク質複合体は、ペプチド / M H C 複合体を認識する活性を保持しており、I L - 1 5 R β γ c 受容体に対して、増加したか又は低下した結合活性を示すことが示唆された。

【 0 1 8 7 】

上記融合タンパク質の機能的 T C R ドメイン及び I L - 1 5 ドメインを確認するために、ペプチド / M H C 及び I L - 1 5 R α の結合活性を E L I S A 分析によって測定した。9 6 ウェルマイクロタイタープレートを、p H 9 . 1 の炭酸緩衝液 (3 5 m M 重炭酸ナトリウム、1 7 . 5 m M の N a 2 C O 3 、5 0 m M の N a C l) 内で 4 ° C にて 3 時間、2 0 n M の B F 1 、抗 T C R C β 抗体、又は 2 0 n M の T C R / I L 1 5 R α S u s h i で予め被覆した。プレートを洗浄用緩衝液 (4 0 m M イミダゾール、1 5 0 m M の N a C l) で 4 回洗浄し、1 % B S A - P B S で 1 0 分間ブロッキングした。0 . 0 3 ~ 4 n M の濃度の表示された融合タンパク質をプレートに添加し、室温にて 3 0 分間インキュベートした。プレートを 4 回洗浄した。B F 1 に捕捉された融合タンパク質を、1 μ g / m L の H R P 結合 p 5 3 / H L A - A 2 . 1 四量体とともに室温にて 4 5 分間インキュベートし、T C R / I L 1 5 R α S u s h i に捕捉された融合タンパク質を、5 0 n g / m L のビオチン化マウス抗ヒト I L - 1 5 とともに室温にて 3 0 分間インキュベートした。4 回洗浄した後、ビオチン化マウス抗ヒト I L - 1 5 とともにインキュベートされたプレートを、0 . 2 5 μ L / m L の H R P - ストレプトアビジンとともに 1 5 分間インキュベートした。プレートを 4 回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質である A B T とともに 1 ~ 1 0 分間インキュベートし、マイクロタイタープレート・リーダーによって 4 0 5 n m における吸光度を測定するために発色させた。図 1 8 A 及び図 1 8 B に示されるように、融合タンパク質は、p 5 3 / H L A - A 2 四量体に対して、類似した T C R 特異的結合活性を有し、I L - 1 5 R α S u s h i に対しては同等の I L - 1 5 結合活性を有する。I L - 1 5 R α への結合についての同様の検討を、I L - 1 5 変異体を含有する別の融合タンパク質を用いて行い、表 1 にまとめた。その結果、I L - 1 5 変異体を含有する本発明に係る融合タンパク質及び融合タンパク質複合体は、ペプチド / M H C 複合体及び I L - 1 5 R α 受容体を認識する活性を保持していることが示された。

10

20

30

40

50

【実施例 16】

【0188】

—TCR／IL15 変異体の融合タンパク質及び融合タンパク質複合体の機能的特徴

上記したように、IL-15 のアンタゴニスト又はアゴニストを含有する融合タンパク質は、病気部位における IL-15 が介在する応答（すなわち、T 細胞又は NK 細胞の活性）を阻害又は刺激する標的薬剤として有用である可能性がある。免疫応答をもたらす、これらの融合タンパク質の IL-15 生物活性を測定するために、高親和性 IL-15 R（ $\alpha\beta\gamma_c$ 鎖）を発現する CTL-2 細胞、及び中度 IL-15 R（ $\beta\gamma_c$ 鎖）を発現する 32D β 細胞を用いて、細胞増殖試験を行った。細胞（ $2 \times 10^4 / 200 \mu\text{L}$ ）を、CO₂ インキュベータ内で、37℃にて3日間、96 ウェルプレート中で 0.4～40 nM の上記 TCR／IL15 融合タンパク質とともにインキュベートした。マイクロタイタープレート・リーダーによって、440 nm における吸光度を測定するために 150 μL の培養培地を回収する前に、細胞を 10 μL の WST-1 とともに4時間インキュベートした。図19A及び図19Bに示すように、野生型 IL-15 ドメインを含有する c264scTCR／huIL15 融合タンパク質は、CTL-2 細胞及び 32D β 細胞の増殖を、それぞれ 40 pM 又は 1 nM という低い濃度で支持することができる。興味深いことに、72 位のアミノ酸にアスパラギンからアスパラギン酸への置換を有する IL-15 変異体を含有する融合タンパク質（c264scTCR／huIL15N72D）は、32D β 細胞株の増殖を支持するという点で、野生型 IL-15 ドメインを含有する融合タンパク質よりも活性がずっと高く、80 pM という低濃度で生物活性を示した（図19B）。これに関して、IL-15 変異体を含有する融合タンパク質（huIL15N72D）は、スーパーアゴニスト活性を示した。1：1 の比の c264scTCR／IL15R α Sushi との複合体では、c264scTCR／huIL15N72D は、T2 細胞上の p53／HLA-A2.1 複合体に対して、c264scTCR／huIL15wt と同じような結合能力を有していた（図17A）が、32D β 細胞上の IL-15R $\beta\gamma_c$ 受容体に対しては、より高い結合能力を示した（図17C）。これに対し、8 位における置換（c264scTCR／huIL15D8N 又は c264scTCR／huIL15D8A）、65 位における置換（c264scTCR／huIL15N65A）、108 位における置換（c264scTCR／huIL15Q108A）、又は 72 位における異なった置換（c264scTCR／huIL15N72R）を有する IL-15 変異体を含有する融合タンパク質は、CTL-2 細胞及び 32D β 細胞の増殖を支持するという点では、c264scTCR／huIL15wt 融合タンパク質と比較して活性が低かった（図19A及び図19B）。IL-15 変異体を含有する別の融合タンパク質を用いて、IL-15 依存性増殖活性について同様の検討を行い、表1にまとめた。これらのデータは、IL-15 タンパク質の 8 位、61 位、65 位、72 位、及び 108 位における変異は、IL-15 R に対する結合を減少させて、かつ、免疫応答を刺激する活性がほとんどないか又は全くない IL-15 アンタゴニストをもたらすことができるとの仮説を裏付けている。1 つの変異体（c264scTCR／huIL15N72R）が、IL-15 アンタゴニストとして作用する一方で、別の変異体（c264scTCR／huIL15N72D）が、IL-15 R に対する増強された結合と、免疫応答を刺激する活性が高められたことを考えると、72 位における置換による結果は予想外であった。

【0189】

一般的な状況では、IL-15 は、細胞の生存を支持して、免疫応答を刺激するために、IL-15 R α によって、樹状細胞の表面上で、メモリー T 細胞、NK T 細胞、又は NK 細胞上の IL-15 R $\beta\gamma_c$ 受容体に対してトランス提示される。アンタゴニストは、IL-15 のトランス提示を IL-15 R α に結合することによって阻止しなければならない。アンタゴニスト融合タンパク質が、c264scTCR／huIL15wt と競合して、CTL-2 細胞の増殖を支持する活性を阻止できるか否かを評価するために、 4×10^4 個の CTL-2 細胞を、50 nM（100 倍モル過剰量）のさまざまな c264scTCR／huIL15 変異体融合タンパク質の存在下又は不在下で、0.5 nM の

c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 w t とともに、C O₂ インキュベータ内で 3 7 °C にて 2 4 時間 インキュベートした。マイクロタイタープレート・リーダーによって、4 4 0 n m における吸光度を測定するために 1 5 0 μ L の培養培地を回収する前に、細胞を 1 0 μ L の W S T - 1 細胞とともに 4 時間 インキュベートした。図 1 9 C に示されるように、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 w t が、C T L L - 2 細胞の増殖を支持する能力は、1 0 0 倍多い c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 D 8 N、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 D 8 A、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 D 8 A / Q 1 0 8 A、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 Q 1 0 8 A、又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 D 8 N / N 6 5 A が存在する場合には完全に阻止され、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 R 融合タンパク質が存在する場合には 6 2 % 低下した。このことは、これらの融合タンパク質が、c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 融合タンパク質に対するアンタゴニストであることを示唆している。このデータは、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 変異体融合タンパク質が、これらのタンパク質が I L - 1 5 R α には結合できるが、I L - 1 5 R β γ_c 受容体に対しては結合できないということから予想されたように、I L - 1 5 活性の機能的アンタゴニストであったことを示している。

【0190】

本明細書に記載された別の T C R / I L - 1 5 融合タンパク質及び I L - 1 5 変異体を用いて、I L - 1 5 のアンタゴニスト及びアゴニストの活性を明らかにするために同様の検討を行うことができる。表 1 にまとめられているように、I L - 1 5 の 8 位、6 1 位、6 5 位、7 2 位、及び 1 0 8 位における置換は、I L - 1 5 の I L - 1 5 R (β γ_c 鎖) に対する結合に影響を与える可能性を示している。I L - 1 5 の 9 2 位、1 0 1 位、及び 1 1 1 位における別の置換も、I L - 1 5 R 相互作用の可能な結合部位であると評価されるはずである。また、これらの残基の全て又はいくつかにおける置換を含む、変化を組み合わせると、I L - 1 5 の効果的なアンタゴニスト又はアゴニストを作り出すことができる。上記の分子を含む、評価される I L - 1 5 変異体は、以下の変化を有するものを含有する：8 位における、アラニン、アスパラギン、セリン、リジン、スレオニン、又はチロシンへの変化；6 1 位における、アラニン、アスパラギン、セリン、リジン、スレオニン、又はチロシンへの変化；6 5 位における、アラニン、アスパラギン酸、又はアルギニンへの変化；7 2 位における、アラニン、アスパラギン酸、又はアルギニンへの変化；及び 9 2 位、1 0 1 位、1 0 8 位、又は 1 1 1 位における、アラニン又はセリンへの変化。

【実施例 17】

【0191】

- T C R / I L 1 5 融合タンパク質及び T C R / I L 1 5 R α 融合タンパク質、並びに融合タンパク質複合体による細胞間結合及び免疫細胞再標的化

融合タンパク質又は融合タンパク質複合体が、I L - 1 5 受容体産生細胞とペプチド / M H C 産生標的細胞とを架橋できることを証明するために、T 2 細胞に、p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチドか、対照の C M V p p 6 5 (a a 4 9 5 - 5 0 3) ペプチドを負荷してから、ジヒドロエチジウムで標識化する。C T L L - 2 細胞をカルセイン A M で標識化して、2 つの標識細胞集団を混合して、融合タンパク質又は融合タンパク質複合体の存在下又は不在下でインキュベートする。融合タンパク質複合体が存在しないか、又は T 2 細胞に対照ペプチドを負荷したときには、フローサイトメトリーによって評価すると、細胞は 2 つの別々の集団のままであると予測される。しかし、T 2 細胞に p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) を負荷して、融合タンパク質又は複合体の存在下で C T L L - 2 細胞とともにインキュベートすると、細胞の二重染色集団の出現が、T 2 細胞が C T L L - 2 細胞に融合タンパク質又は融合タンパク質複合体を介して結合したことの指標となる。

【0192】

同様に、融合タンパク質複合体が、I L - 1 5 受容体産生免疫細胞とペプチド / M H C 産生標的細胞とを架橋して、標的細胞に対する免疫細胞毒性を指向できることを証明するために検討することができる。例えば、p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチドか、対照の C M V p p 6 5 (a a 4 9 5 - 5 0 3) ペプチドを T 2 細胞に負荷してからカルセイン

AMで標識化する。IL-15受容体を有する免疫エフェクター細胞（すなわち、活性化されたNK細胞又はT細胞）をさまざまな比率で混合して、融合タンパク質複合体の存在下又は不在下、適当な条件（すなわち、37℃にて2～4時間）でインキュベートする。細胞毒性は、T2標的細胞から培養培地の中に放出されるカルセインに基づいて、標準的な方法によって評価することができる。カルセイン-AMの特異的放出を測定するか、又は非特異的対照である自然放出されたカルセイン-AMと比較する。融合タンパク質複合体が存在しないか、又はT2細胞に対照用ペプチドを負荷した場合には、標的細胞の細胞毒性が低レベルであると予測される。しかし、T2細胞にp53（aa264-272）を負荷して、融合タンパク質複合体の存在下で免疫エフェクター細胞とともにインキュベートしたときに、T2細胞の特異的溶出が起こるのは、免疫エフェクター細胞が、融合タンパク質複合体を介して、p53ペプチド提示細胞に対して再標的化されていることを示すものであると考えられる。p53（aa264-272）/HLA-A2.1複合体を標的細胞として提示する腫瘍細胞株を用いて、同様の検討を行うことができる。

10

【実施例18】

【0193】

IL-15変異体アンタゴニスト、TCR/IL15融合タンパク質、及び融合タンパク質複合体の抗腫瘍作用のインビボにおける証明

融合タンパク質複合体又はIL-15変異体アンタゴニストが、インビボにおいて抗腫瘍活性を有するか否かを判定するために、実験用異種移植腫瘍モデルを用いることができる。A375黒色腫、MDA-MB-231乳癌、PANC1膵臓癌など、p53（aa264-272）/HLA-A2.1複合体を発現するヒト腫瘍細胞株が、別のTCRに基づく融合タンパク質を用いた同様の効能の検討で用いられてきた（5～7）。例えば、A375ヒト黒色腫細胞をヌードマウスの側腹に皮下注射すると、腫瘍を3日間で確立できる。担癌マウスに、c264scTCR/huIL15+℃264scTCR/huIL15RαSushi複合体若しくはIL-15変異体アゴニスト（用量範囲：0.1～2mg/kg）、又は用量と均等量のPBSを、4日間又はそれ以上毎日静脈内注射する。この検討の間、腫瘍サイズを測定し、腫瘍体積を計算する。PBSで処理されたすべてのマウスは、腫瘍を発生すると予測される。融合タンパク質複合体又はIL-15変異体アゴニストで処理されたマウスの一部又は全てで腫瘍増殖の抑制又は完全な腫瘍退縮が起これば、その処理の抗腫瘍効果を示すことになるであろう。マルチサイクル投与を含む、別の投与計画も、融合タンパク質又はIL-15変異体アゴニストの抗腫瘍効果を証明することができる。p53（aa264-272）/HLA-A2.1複合体を有しない腫瘍細胞株（HT-29又はAsPC-1（5, 9））は、融合タンパク質複合体のc264scTCRドメインによる抗原特異的認識についての対照として使用できる。別のTCRドメイン（すなわち、CMVpp65（aa495-503）ペプチド（9）に特異的である）を含有する別の融合タンパク質複合体を非腫瘍標的対照として使用できる。

20

30

【0194】

また、異種移植腫瘍担持マウスで、養子細胞移入の検討を行う。例えば、未処理の又は活性化された（又はメモリー）脾細胞、NK細胞、又はT細胞など、IL-15受容体を産生する免疫細胞をマウスから単離し、その細胞に結合できる条件下で、c264scTCR/huIL15+c264scTCR/huIL15RαSushi複合体又はアンタゴニストであるIL-15変異体とともにインキュベートする。場合によっては、融合タンパク質複合体又はアンタゴニストIL-15変異体を用いて、免疫細胞を活性化することができる。そして、IL-15変異体が活性化された細胞、又は融合タンパク質複合体でコートされた細胞を、A375腫瘍を担持するヌードマウスに移入する。対照は、未処理の免疫細胞、融合タンパク質複合体単独、及びPBSの移入を含んでいる。腫瘍の増殖を観測して、PBSで処理した全てのマウスが腫瘍を発症することが予測される。IL-15変異体活性化細胞又は融合タンパク質複合体被覆細胞で処理された一部又は全てのマウスにおける腫瘍抑制又は完全な腫瘍退縮が、この治療法に抗腫瘍効果があることを示すものとなるであろう。或いは、IL-15変異体又は融合タンパク質複合体、及び

40

50

免疫細胞を同時に投与するか、又は同時に若しくは異なる時に分けて投与する。免疫細胞は、腫瘍産生宿主にとって自己由来であっても同種異系であってもよい。移入される細胞数及び投与計画は、抗腫瘍効果を評価し最適化するために変化するであろう。上記したように、観察された抗腫瘍活性における抗原標的化の役割を確認するために、別の腫瘍株又は融合タンパク質複合体を用いるであろう。

【実施例 19】

【0195】

—TCR/IL15: TCR/IL-15R α 融合タンパク質複合体による免疫細胞のインビトロ処理と、その後の養子細胞移入は、異種移植腫瘍動物モデルにおける生存率の向上をもたらす

TCR/IL15: TCR/IL-15R α 融合タンパク質複合体と予めインキュベートした濃縮された同種異系マウスNK細胞の腫瘍増殖に対する抗腫瘍効果を明らかにするために、ヌードマウスの実験用転移モデルにおいてヒトNSCLC A549A2腫瘍細胞を用いて、以下の検討を行った。

【0196】

無胸腺ヌードマウス（グループ当たりn=4、メス、5~6週齢）の尾静脈側部から、ヒトNSCLC腫瘍細胞株A549-A2を 5×10^6 細胞/マウスで静脈内（IV）注射した。A549-A2細胞株は、ヒトHLA-A2.1 cDNAを発現するベクターを担持するp53陽性A549親株の形質移入体に相当する。

【0197】

A2マウス（B6バックグランド）の脾臓を回収し、Miltenyi Biotech Inc.のNK細胞単離用キットを製造業者の指示に従って用いてNK細胞を単離した。要するに、HBS中で金属製ふるい（60メッシュ）に通して、脾臓をホモジナイズして脾細胞の単一細胞懸濁液を調製した。赤血球をACK赤血球溶解緩衝液に溶解した。細胞を、ビオチン抗体カクテル（ 10^7 細胞あたり $10 \mu\text{L}$ ）とともに4~8℃にて10分間インキュベートする。白血球の数を測定し、 10^7 細胞あたり $30 \mu\text{L}$ の緩衝液（PBS、pH 7.2、0.5% BSA及び2 mM EDTA）及び $20 \mu\text{L}$ の抗ビオチンマイクロビーズを加えて、混合液を4~8℃にて15分間インキュベートした。細胞を2 mLの緩衝液で洗浄し、 $300 \times g$ にて10分間遠心分離した。この細胞を $500 \mu\text{L}$ の緩衝液に再懸濁して、MACAカラムに負荷した。流入物を回収して、FACSscan分析によってNK細胞の純度を測定した。

【0198】

細胞を活性化させるために、c264sc TCR/IL15: c264sc TCR/IL15R α 融合タンパク質複合体、TCR-IL2融合タンパク質、又はrhIL-2の存在下又は不在下、T25フラスコ中10 mLの10% FBS添加RPMI 1640の中でNK細胞（ 5×10^6 ）を37℃にて一晩培養した。c264sc TCR/IL15: c264sc TCR/IL15R α 融合タンパク質複合体及びTCR-IL2融合タンパク質は $0.8 \mu\text{g/mL}$ の濃度で加え、rhIL-2は、 $0.2 \mu\text{g/mL}$ で加えた。一晩インキュベートした後、細胞を回収して、 $100 \mu\text{L}$ 中 0.5 mg/mL のc264sc TCR/IL15: c264sc TCR/IL15R α 融合タンパク質複合体もしくはTCR-IL2融合タンパク質、又は 0.125 mg/mL のrhIL-2とともに氷上にて30分間プレインキュベートした。PBS（1 mL）で洗浄した後、養子細胞移入を行うために細胞をPBSに再懸濁して $10^6/\text{mL}$ とした。

【0199】

一日目に、マウスにA549A2腫瘍細胞（ 5×10^6 ）を尾静脈から静脈内注射して肺腫瘍を確立した。腫瘍細胞を注射してから14日後にマウスを無作為化して、5つのグループ（n=4）に分けた。14日目と21日目に、 200 mg/kg の用量の腹腔内注射によって、マウスをシクロホスファミド（CTX）で治療した。16日目及び22日目に、予め異なった融合タンパク質又はrhIL-2でインキュベートしておいたNK細胞（ $5 \times 10^6/\text{マウス}$ ）を静脈内注射し、PBSを注射したマウスを対照として用いた。

治療計画の概要は以下の通りである。

【0200】

【表1】

グループ	CTX		NK 細胞	
	用量 (mg/kg)	注射(腹腔内)	用量 ($\times 10^6$)	注射(静脈内)
CTX	200	14日目、21日目	0	16日目、22日目
CTX+NK/rhIL2	200	14日目、21日目	1	16日目、22日目
CTX+NK/MART-1scTCR-IL2	200	14日目、21日目	1	16日目、22日目
CTX+NK/c264scTCR-IL2	200	14日目、21日目	1	16日目、22日目
CTX+NK/c264scTCR/IL15: c264scTCR/ IL15R α 融合タンパク質複合体	200	14日目、21日目	1	16日目、22日目

10

【0201】

腫瘍産生マウスの生存を毎日監視した。瀕死状態になったマウスは殺生して、死亡例に算入した。腫瘍注射後100日以上生存したマウスを治癒例とみなした。

【0202】

CTX処理群、CTX+NK/rhIL-2処理群、CTX+NK/MART1scTCR-IL2処理群、CTX+NK/c264scTCR-IL2処理群、及びc264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 融合タンパク質複合体処理群におけるマウスの生存期間の中央値は、それぞれ52日、67.5日、64.5日、85.5日、及び80日である(図20)。このように、c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α 活性化NK細胞の養子細胞移入によって、化学療法のみで、又は非標的化MARTscTCR-IL2若しくはrhIL-2で処理された腫瘍産生動物で観察されるよりも長い平均生存期間がもたらされた。このパイロット実験で得られた結果は、c264scTCR/IL15:c264scTCR/IL15R α によって活性化及び標的化されたマウスNK細胞が、増強された抗腫瘍活性を提供できることを示している。

20

【実施例20】

【0203】

ー延長された細胞表面の滞留時間から明らかな、TCR/IL15:TCR/IL-15R α 融合タンパク質複合体のIL-15R産生免疫細胞との結合の増強

融合タンパク質複合体がIL-15R産生細胞の細胞表面に滞留する時間は、エフェクター細胞をTCR特異的な腫瘍細胞に標的させるか、架橋する融合タンパク質の能力に影響を与える可能性がある。これを調べるために、IL-15R α $\beta\gamma$ C受容体産生CTL-2細胞及びIL-15R $\beta\gamma$ C受容体産生CTL-2細胞32D β 細胞に対するscTCR/IL-15融合タンパク質、TCR/IL15:TCR/IL15R α 融合タンパク質複合体、及び組換えIL-15の結合を、フローサイトメトリーによって直接比較する。さまざまなタンパク質とインキュベートした後、細胞を洗浄し、37℃にて最長180分間まで培地中でインキュベートしてから、細胞表面に残存しているタンパク質のレベルをPE標識化抗IL-15mAbで検出した。開始時間0における染色とその後の時間とを比較すれば、IL-15Rに対する各タンパク質の結合の細胞表面滞留時間を測定することができる。IL-15と比較してscTCR/IL-15融合タンパク質又はTCR/IL15:TCR/IL15R α 融合タンパク質複合体の細胞表面滞留時間が増加することが、より高くより安定した受容体結合活性を表すことになるであろう。

40

【実施例21】

【0204】

ーマウスにおけるIL-15と比較した場合のTCR/IL-15融合タンパク質及びTCR/IL15:TCR/IL15R α 融合タンパク質複合体のインビボにおける半減期の増大

50

c 2 6 4 s c T C R / I L - 1 5、c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 : c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 R α 複合体、組換え I L - 1 5、又は可溶性 I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体の薬物動態パラメータを、H L A - A 2 . 1 / K b トランスジェニックマウス系統で評価する。c 2 6 4 s c T C R / I L - 2 が限定されている H L A - A 2 . 1 ドメインの存在は、この融合タンパク質の薬物動態に影響を与える可能性があり、他のマウス系統よりも薬物動態の「ヒト化」的側面により高い関連性をもたらすはずである。等モル量の c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5、c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 : c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 R α 複合体、組換え I L - 1 5、又は可溶性 I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体をマウスに静脈内注射して、注射後 5 分後～2 週間後までさまざまな時点で血液を採集する。上記される E L I S A 法を用いて融合タンパク質の血清中濃度を評価する。標準的な I L - 1 5 特異的 E L I S A によって I L - 1 5 の濃度を検出した。

10

【0205】

曲線適合ソフトウェア（例えば、WinNonlin）を用いて、c 2 6 4 s c T C R / I L - 1 5、c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 : c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 R α 複合体、組換え I L - 1 5、又は可溶性 I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体のインビボにおける薬物動態パラメータを測定する。組換え I L - 1 5 又は可溶性 I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体と比較したときに、c 2 6 4 s c T C R / I L - 1 5、又は c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 : c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 R α 複合体についての、C m a x 値の上昇、血清中半減期の延長、又はクリアランスの低下は、T C R - I L - 1 5 融合体又は T C R / I L 1 5 : T C R / I L 1 5 R α 複合体の生成によって、I L - 1 5 単独で観察されるより好適な薬理動態がもたらされたことを示唆している。

20

【実施例 22】

【0206】

- I L - 1 5 変異体アンタゴニスト、T C R / I L - 1 5 融合タンパク質、及び融合タンパク質複合体の免疫抑制効果のインビボにおける立証

融合タンパク質複合体又は I L - 1 5 変異体アンタゴニストが、インビボにおいて免疫抑制活性を有するか否かを判定するために、自己免疫性関節炎実験モデルを用いる。H L A - D R 4 トランスジェニックマウスにおいて、I I 型コラーゲン（C I I）を投与した後に自己免疫性関節炎が誘導されるということが明らかにされている（Rosloniec et al. 1998、J Immunol. 160:2573-8）。また、この病気の病理に関係する C I I 特異的 T 細胞の特徴も調べられている。これらの T 細胞に由来する T C R 遺伝子を用いて、適当な発現ベクターと宿主細胞株を構築して、上記実施例に記載されるように、I L - 1 5 変異体アンタゴニストを含有する C I I s c T C R / I L 1 5 と、C I I s c T C R / I L 1 5 R α S u s h i 融合タンパク質を作製する。C I I を投与して関節炎を誘導した後、H L A - D R 4 トランスジェニックマウスに C I I s c T C R / I L 1 5 アンタゴニスト + C I I s c T C R / I L 1 5 R α S u s h i 複合体、又は I L - 1 5 変異体アンタゴニスト（用量範囲：0.1～2 m g / k g）、あるいは用量と均等量の P B S を、4 日間又はそれ以上毎日静脈内注射する。この検討の間、マウスの足の関節を調べて、炎症の程度を 0～4 の尺度で採点する。P B S で処理した全てのマウスが関節炎を発症すると期待される。融合タンパク質複合体又は I L - 1 5 変異体によって処理されたマウスの一部又は全てで、関節炎が抑制されれば（例えば、発症率又は臨床スコアが低下すれば）、その治療法に免疫抑制効果があることが示唆される。マルチサイクル投与を含む、別の投与計画によっても、融合タンパク質又は I L - 1 5 変異体の免疫抑制効果を立証できる。別の（すなわち、p 5 3 ペプチドに特異的な）T C R ドメインを含有する別の融合タンパク質複合体も、非疾患標的化対照として用いることができ、標的化 T C R 融合タンパク質の、疾患部位に対する免疫抑制活性を指向する特異的能力を立証できるであろう。

30

40

【0207】

（参考文献の援用）

本出願を通して引用されている全ての参考文献、特許、係属中の特許出願、及び公開特許の内容は、参照により明確に本明細書に組み込まれている。

50

【0208】

(均等物)

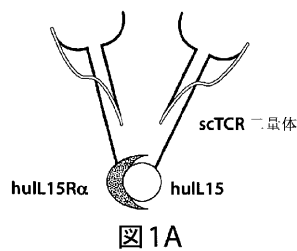
当業者は、本明細書に記載されている発明の特定の態様に対する多くの均等物を認識し、又は通常の実験のみによって確認することができるであろう。そのような均等物は、添付の特許請求の範囲に包含されるものである。

【0209】

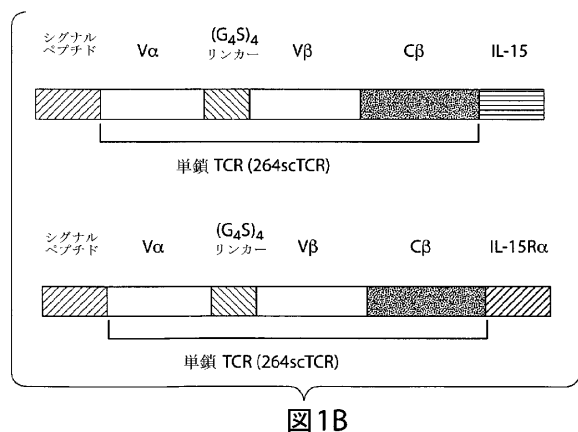
(参考文献)

1. Mortier, E., A. Quemener, P. Vusio, I. Lorenzen, Y. Boublik, J. Grotzinger, A. Plet, and Y. Jacques. 2006. Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. J Biol Chem 281: 1612-1619. 10
2. Stoklasek, T. A., K. S. Schluns, and L. Lefrancois. 2006. Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. J Immunol 177: 6072-6080.
3. Rubinstein, M. P., M. Kovar, J. F. Purton, J. H. Cho, O. Boyman, C. D. Surh, and J. Sprent. 2006. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 9166-9171. 20
4. Waldmann, T. A. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. Nat Rev Immunol 6: 595-601.
5. Belmont, H. J., S. Price-Schiavi, B. Liu, K. F. Card, H. I. Lee, K. P. Han, J. Wen, S. Tang, X. Zhu, J. Merrill, P. A. Chavillaz, J. L. Wong, P. R. Rhode, and H. C. Wong. 2006. Potent antitumor activity of a tumor-specific soluble TCR/IL-2 fusion protein. Clin Immunol 121: 29-39.
6. Card, K. F., S. A. Price-Schiavi, B. Liu, E. Thomson, E. Nieves, H. Belmont, J. Builes, J. A. Jiao, J. Hernandez, J. Weidanz, L. Sherman, J. L. Francis, A. Amirkhosravi, and H. C. Wong. 2004. A soluble single-chain T-cell receptor IL-2 fusion protein retains MHC-restricted peptide specificity and IL-2 bioactivity. Cancer Immunol Immunother 53: 345-357. 30
7. Mosquera, L. A., K. F. Card, S. A. Price-Schiavi, H. J. Belmont, B. Liu, J. Builes, X. Zhu, P. A. Chavillaz, H. I. Lee, J. A. Jiao, J. L. Francis, A. Amirkhosravi, R. L. Wong, and H. C. Wong. 2005. In Vitro and In Vivo Characterization of a Novel Antibody-Like Single-Chain TCR Human IgG1 Fusion Protein. J Immunol 174: 4381-4388. 40
8. Penichet, M. L., E. T. Harvill, and S. L. Morrison. 1997. Antibody-IL-2 fusion proteins: a novel strategy for immune protection. Hum Antibodies 8: 106-118.
9. Zhu, X., H. J. Belmont, S. Price-Schiavi, B. Liu, H. I. Lee, M. Fernandez, R. L. Wong, J. Builes, P. R. Rhode, and H. C. Wong. 2006. Visualization of p53264-272/HLA-A*0201 Complexes Naturally Presented on Tumor Cell Surface by a Multimeric Soluble Single-Chain T Cell Receptor. J Immunol 176: 3223-3232.

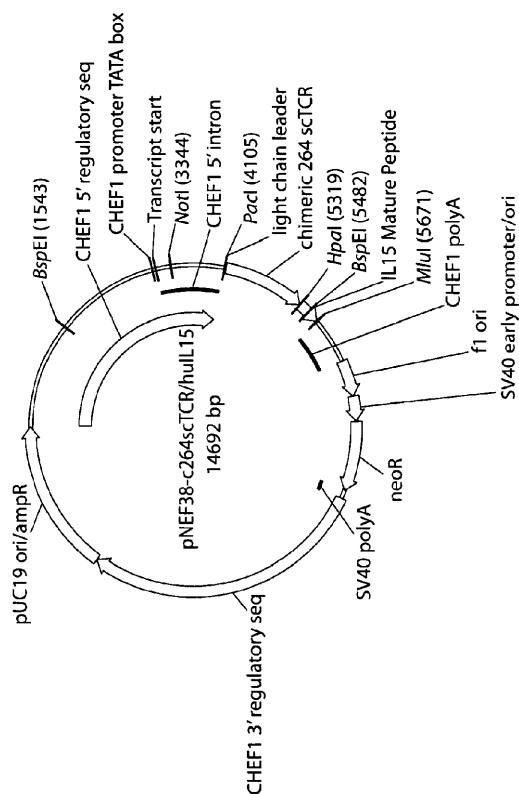
【図 1 A】



【図 1 B】



【図 2 A】



2A

【図 2 B】

5 - ACCACCATGGAGACAGACACACTCTGTGTATAGGTACTGTCTGCTCTGGGGTTCAGGTTCACACCGGTCAGT
CAGTGAACGACCGGATGCTCGCTCACTGCTCTGAAAGAGCCCTCTCTCAGCTGAGATGCAAGATGATTTC
TACTTCTGGAGACACCTTATCTGTCTTGGTATGTCACGTAACCCGAGGCGGTGACGCTGCTCTCTCAAG
CTTCTTACCTCGGAAAGCCCTCTGTGCATCGAGCGACTCTCTGCTGTATCTTCTGTGTCTTTCAGCGAAG
TAGCAACTATCAGTTGTATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTATATTAAGCCAGNACATACTAGTGGTGGCGGT
GAGCGCGGGTGTCTGGGTGCGGCTGCTGGCTGGCGGGTCTCTCAGAGCAATCTCAAAAGATCA
TTACAGATCCAGATATCTGGTGAAGGCGAAGGATCAAGCAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGGAAGAAGG
ACATCAGCTGTGATCTCTGGTATCAACAAATAGCAAACTAGATTTAAATTTGATTAATCTTTCAGAAAT
CAAGAAGTTCTCTCAGCAAAATAGACATGACTGAAATAACGATTTCTCTGCTGAGTGTCTTCTTCAAACTCACCTT
GCAGCCTAGAAATTTCAGTCTCTTGAGCGAGGACTCAGCACTGTATCTTCTGTGCCAGCAGCTGTCTGCAGG
GGGCGGCACAGAGTGTCTTTTGGTAAGGAACCAAGACTCAGATCTGTATGAGAGGCTGTGAACAAGGTGTTCT
CCACCGAGGTGCTGTCTTTGAGCCATCAGACAGCAGAGATCTCCCAACGCAAAAAGCCCACTAGGTGT
GCTTGGCCACAGGTTCTTCTCTGACCTGAGCTGAGCTGTGTGGTGTGAATGGGAAGAGGTCGACAGC
TGGGTTCAGCACGACCGCGAGCCCTCTAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGTCGCTGAGC
AGCCGCTGAGGGTCTCGGCACCTTCTTGCGAGAACCCCGCAACCACTCTCGGTGTCAAGTCCAGTCTCT
ACGGGCTCTGGAGAAATGACGAGTGAACCGACAGATGAGGGCCAAAACCCGTCAACCGACATGCTCAGCGCCGA
GGCCTGGGGTGAAGCAGACTTAACTGGGTGAACTTGAATGAGTATTGAAAAAATTTGAAGATCTT
ATTCAATCTATGCATATGATGCTACTTTTATATACGGAAGAAGTGATGTTTCAACCCCGAGTTGCAAGATACAG
CAATGAAGTCTTCTCTTGGAGTTACAGTATTATTCATCTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGTATAC
AGTAGAAATCTGTGATGCTTGAACCAACACAGATTTGTCTTCTTAATGGGAATGTAAACAGAAATCTGGATGC
AAAGATGTGAGGAACTCGGAGGAAAAAAATATTAAGAAATTTTTCGACAGGTTTGTGTACATATTGTCCTCAA
TGTTTCATCACACTCTTGTATAA - 3'

2B

【図 2 C】

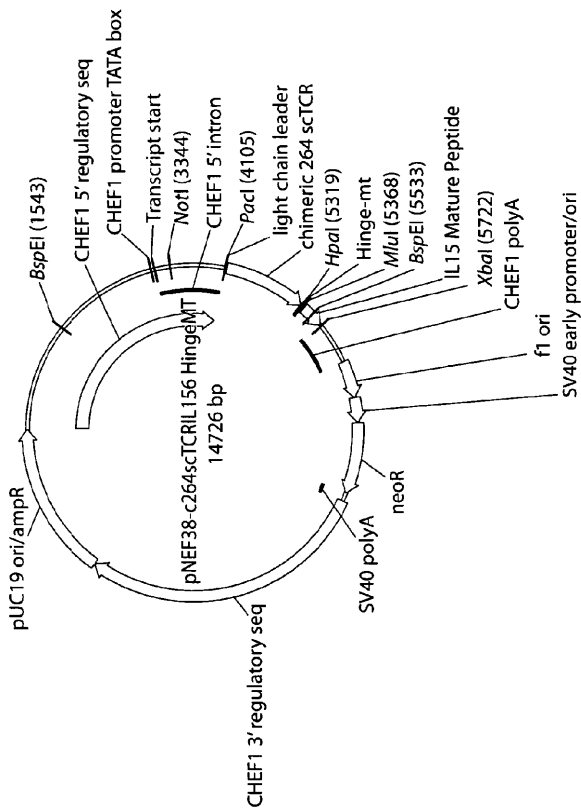
```

metdtdllllwllwpvgstgsvtqpdarvtvsegasqlrckysysgtpylfwvqyprqglqlllkyyys
TCR Va
TCR Vb
TCR Vc
TCR Vd
TCR Ve
TCR Vf
TCR Vg
TCR Vh
TCR Vi
TCR Vj
TCR Vk
TCR Vl
TCR Vm
TCR Vn
TCR Vo
TCR Vp
TCR Vq
TCR Vr
TCR Vs
TCR Vt
TCR Vu
TCR Vv
TCR Vw
TCR Vx
TCR Vy
TCR Vz
TCR V1
TCR V2
TCR V3
TCR V4
TCR V5
TCR V6
TCR V7
TCR V8
TCR V9
TCR V10
TCR V11
TCR V12
TCR V13
TCR V14
TCR V15
TCR V16
TCR V17
TCR V18
TCR V19
TCR V20
TCR V21
TCR V22
TCR V23
TCR V24
TCR V25
TCR V26
TCR V27
TCR V28
TCR V29
TCR V30
TCR V31
TCR V32
TCR V33
TCR V34
TCR V35
TCR V36
TCR V37
TCR V38
TCR V39
TCR V40
TCR V41
TCR V42
TCR V43
TCR V44
TCR V45
TCR V46
TCR V47
TCR V48
TCR V49
TCR V50
TCR V51
TCR V52
TCR V53
TCR V54
TCR V55
TCR V56
TCR V57
TCR V58
TCR V59
TCR V60
TCR V61
TCR V62
TCR V63
TCR V64
TCR V65
TCR V66
TCR V67
TCR V68
TCR V69
TCR V70
TCR V71
TCR V72
TCR V73
TCR V74
TCR V75
TCR V76
TCR V77
TCR V78
TCR V79
TCR V80
TCR V81
TCR V82
TCR V83
TCR V84
TCR V85
TCR V86
TCR V87
TCR V88
TCR V89
TCR V90
TCR V91
TCR V92
TCR V93
TCR V94
TCR V95
TCR V96
TCR V97
TCR V98
TCR V99
TCR V100
TCR V101
TCR V102
TCR V103
TCR V104
TCR V105
TCR V106
TCR V107
TCR V108
TCR V109
TCR V110
TCR V111
TCR V112
TCR V113
TCR V114
TCR V115
TCR V116
TCR V117
TCR V118
TCR V119
TCR V120
TCR V121
TCR V122
TCR V123
TCR V124
TCR V125
TCR V126
TCR V127
TCR V128
TCR V129
TCR V130
TCR V131
TCR V132
TCR V133
TCR V134
TCR V135
TCR V136
TCR V137
TCR V138
TCR V139
TCR V140
TCR V141
TCR V142
TCR V143
TCR V144
TCR V145
TCR V146
TCR V147
TCR V148
TCR V149
TCR V150
TCR V151
TCR V152
TCR V153
TCR V154
TCR V155
TCR V156
TCR V157
TCR V158
TCR V159
TCR V160
TCR V161
TCR V162
TCR V163
TCR V164
TCR V165
TCR V166
TCR V167
TCR V168
TCR V169
TCR V170
TCR V171
TCR V172
TCR V173
TCR V174
TCR V175
TCR V176
TCR V177
TCR V178
TCR V179
TCR V180
TCR V181
TCR V182
TCR V183
TCR V184
TCR V185
TCR V186
TCR V187
TCR V188
TCR V189
TCR V190
TCR V191
TCR V192
TCR V193
TCR V194
TCR V195
TCR V196
TCR V197
TCR V198
TCR V199
TCR V200
TCR V201
TCR V202
TCR V203
TCR V204
TCR V205
TCR V206
TCR V207
TCR V208
TCR V209
TCR V210
TCR V211
TCR V212
TCR V213
TCR V214
TCR V215
TCR V216
TCR V217
TCR V218
TCR V219
TCR V220
TCR V221
TCR V222
TCR V223
TCR V224
TCR V225
TCR V226
TCR V227
TCR V228
TCR V229
TCR V230
TCR V231
TCR V232
TCR V233
TCR V234
TCR V235
TCR V236
TCR V237
TCR V238
TCR V239
TCR V240
TCR V241
TCR V242
TCR V243
TCR V244
TCR V245
TCR V246
TCR V247
TCR V248
TCR V249
TCR V250
TCR V251
TCR V252
TCR V253
TCR V254
TCR V255
TCR V256
TCR V257
TCR V258
TCR V259
TCR V260
TCR V261
TCR V262
TCR V263
TCR V264
TCR V265
TCR V266
TCR V267
TCR V268
TCR V269
TCR V270
TCR V271
TCR V272
TCR V273
TCR V274
TCR V275
TCR V276
TCR V277
TCR V278
TCR V279
TCR V280
TCR V281
TCR V282
TCR V283
TCR V284
TCR V285
TCR V286
TCR V287
TCR V288
TCR V289
TCR V290
TCR V291
TCR V292
TCR V293
TCR V294
TCR V295
TCR V296
TCR V297
TCR V298
TCR V299
TCR V300
TCR V301
TCR V302
TCR V303
TCR V304
TCR V305
TCR V306
TCR V307
TCR V308
TCR V309
TCR V310
TCR V311
TCR V312
TCR V313
TCR V314
TCR V315
TCR V316
TCR V317
TCR V318
TCR V319
TCR V320
TCR V321
TCR V322
TCR V323
TCR V324
TCR V325
TCR V326
TCR V327
TCR V328
TCR V329
TCR V330
TCR V331
TCR V332
TCR V333
TCR V334
TCR V335
TCR V336
TCR V337
TCR V338
TCR V339
TCR V340
TCR V341
TCR V342
TCR V343
TCR V344
TCR V345
TCR V346
TCR V347
TCR V348
TCR V349
TCR V350
TCR V351
TCR V352
TCR V353
TCR V354
TCR V355
TCR V356
TCR V357
TCR V358
TCR V359
TCR V360
TCR V361
TCR V362
TCR V363
TCR V364
TCR V365
TCR V366
TCR V367
TCR V368
TCR V369
TCR V370
TCR V371
TCR V372
TCR V373
TCR V374
TCR V375
TCR V376
TCR V377
TCR V378
TCR V379
TCR V380
TCR V381
TCR V382
TCR V383
TCR V384
TCR V385
TCR V386
TCR V387
TCR V388
TCR V389
TCR V390
TCR V391
TCR V392
TCR V393
TCR V394
TCR V395
TCR V396
TCR V397
TCR V398
TCR V399
TCR V400
TCR V401
TCR V402
TCR V403
TCR V404
TCR V405
TCR V406
TCR V407
TCR V408
TCR V409
TCR V410
TCR V411
TCR V412
TCR V413
TCR V414
TCR V415
TCR V416
TCR V417
TCR V418
TCR V419
TCR V420
TCR V421
TCR V422
TCR V423
TCR V424
TCR V425
TCR V426
TCR V427
TCR V428
TCR V429
TCR V430
TCR V431
TCR V432
TCR V433
TCR V434
TCR V435
TCR V436
TCR V437
TCR V438
TCR V439
TCR V440
TCR V441
TCR V442
TCR V443
TCR V444
TCR V445
TCR V446
TCR V447
TCR V448
TCR V449
TCR V450
TCR V451
TCR V452
TCR V453
TCR V454
TCR V455
TCR V456
TCR V457
TCR V458
TCR V459
TCR V460
TCR V461
TCR V462
TCR V463
TCR V464
TCR V465
TCR V466
TCR V467
TCR V468
TCR V469
TCR V470
TCR V471
TCR V472
TCR V473
TCR V474
TCR V475
TCR V476
TCR V477
TCR V478
TCR V479
TCR V480
TCR V481
TCR V482
TCR V483
TCR V484
TCR V485
TCR V486
TCR V487
TCR V488
TCR V489
TCR V490
TCR V491
TCR V492
TCR V493
TCR V494
TCR V495
TCR V496
TCR V497
TCR V498
TCR V499
TCR V500
TCR V501
TCR V502
TCR V503
TCR V504
TCR V505
TCR V506
TCR V507
TCR V508
TCR V509
TCR V510
TCR V511
TCR V512
TCR V513
TCR V514
TCR V515
TCR V516
TCR V517
TCR V518
TCR V519
TCR V520
TCR V521
TCR V522
TCR V523
TCR V524
TCR V525
TCR V526
TCR V527
TCR V528
TCR V529
TCR V530
TCR V531
TCR V532
TCR V533
TCR V534
TCR V535
TCR V536
TCR V537
TCR V538
TCR V539
TCR V540
TCR V541
TCR V542
TCR V543
TCR V544
TCR V545
TCR V546
TCR V547
TCR V548
TCR V549
TCR V550
TCR V551
TCR V552
TCR V553
TCR V554
TCR V555
TCR V556
TCR V557
TCR V558
TCR V559
TCR V560
TCR V561
TCR V562
TCR V563
TCR V564
TCR V565
TCR V566
TCR V567
TCR V568
TCR V569
TCR V570
TCR V571
TCR V572
TCR V573
TCR V574
TCR V575
TCR V576
TCR V577
TCR V
```

20

nikelflsfvhivqmints
II-15 >

【図 3 A】



【図 3A】

【図 3 B】

5' - ACCACCATGGAGACAGACACTCTGTATGGTACTGCTGCTGGGTTCCAGTTCCACCGGTCACTAGTACGCGCAGC
 CCGATGCTCGCGTCACTGCTCTGAAGGAGCCTCTCTGACAGTGAAGTATTCCTTACCTGCGGACACCTTATCTCTGT
 CTGGTATCTCCAGTACCCCGCGGCGAGGGGCTGCGACTGCTCTCAAGTACTATTCAGGAGACCCAGGTTCAGGAGTGAAT
 GGCTTCGAGGCTGAGTTACAGAGATACTCTCTCTCCACCTCGGAAAGCCTCTGTGCTACTGAGCGACTCTGCTGTGT
 ACTTCTGTGTTTTCAGCGAGGATAGCACTATCACTATGCTGCGGCTCTGGGACCAAGTAAATTAAGCCAGACACTAG
 TGGTGGCGGTGGCAGCGGCTGGTGGTTCGGGCGGCGGTCTGCGGCTCTGCTGAGCAATTCAGAAATCTCAT
 CAGACTCCCAAGATATCTGGTGAAGGGCAAGGACAAAGCAAGATGAGTGTATCCCTGAAGAGGACATCCAGTTGTAT
 TCTGTATCAACAAATTAAGACAAATGAGTTTAAATTTTGAATTAATTCAGAAATCAAGAGTCTTTCAGCAATAGACAT
 GACTGAAGACGATTCCTGCTGAGTGTCTTCAACTCCTGAGCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGCGAGGACTCA
 GCAGTGTACTCTCTGCGACGACTGCTGCGAGGGGCGGACAGAGTTTCTTTGGTAAAGAACCCAGACTCAAGTGTAG
 AGGACTCGAACAGGTGTTCCACCGGAGGTCGCTGTTGAGCCATCAGAGCAGAGATCTCCACACCCAAAGGCCAC
 ACTGTGTGCTGCGCACAGGCTTCTTCCCTGACCACTGAGGAGTGGTGGGTAATGGGAGAGGAGTGCACAGTGGG
 GTCAGCAGCGGACCGCAGCGCTCAAGAGGAGCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCTGAGCAGCGCGCTGAGGGTCT
 CGGCCACCTCTGCGCAGAACCCCGGACCACTTCCGCTCAAGTTCAGTTCACGGCTCTCGGAGATGACGAGTGGAC
 CCAGATAGGGCCAAACCCGCTCAGCTCCGCGGAGCGCTGAGGAGTGAAGTAAAGTGAATTAAGTGAATTAAGTGAATTA
 GACAAAATCAACATCTCCCGTCTCCACCGGTAACTGGGTGAATTAAGTGAATTAAGTGAATTAAGTGAATTAAGTGAATTA
 TCAATCTATCATATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
 TCTCTTGGAGTTTCAAGTTTATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
 AACACAGTTTGTCTTCTATGGGAATTAACAGATCTGGATGCAAGATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTA
 AATTTTTCAGAGTTTGTACATATTTGTCAAATGTTTCATCAACACTCTTGTATAA -3'

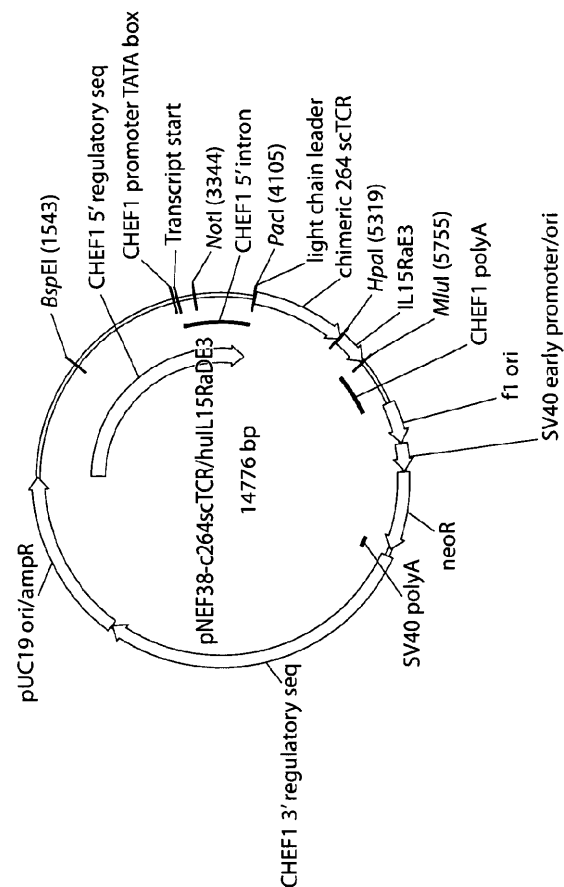
【図 3B】

【図 3 C】

metdtllllwlllwpvgstgsvtqdarvtvsegasqlrckysygtpylfwyqyprgglqlilkyyys
 < Signal peptide >< TCR Vα
 gdpvvgvngfeafsksnssfhlrkasvhwdsavfcvlsedsnyqliwsgtkllilpdtsgggsgg
 >< linker
 TCR Vα
 gsgggsgggsgssnskvigtprylvkqggkakmcipekgbpvfwyqgnknefkflinfqngvqlg
 Linker >< TCR Vβ
 qidntekrfsaecpsnpsleiqsaeagsdalylcasslsgggtvffgkgrlrvvedlnkvfppevav
 TCR Vβ >< TCR Cβ
 fepseaeishtakatlvcilatgffpdhvelswvngkevhsqvdppqlkegpaldnsryclssrlrvsa
 TCR Cβ
 tfwgnprnhfrqgvqfgyglseadewtqdrakpvtqivsaesawgradvnepkssdkhtspsttrnwvni
 TCR Cβ > < linker > < IL-15
 sdlkkiedliqsmhidatlytesdvhpssckvtamkcfllleqlvislesgdasihdtvenliilannslsn
 IL-15
 gnvtsgskeeeleeknikelfqsfhivqmfints
 IL-15 >

【図 3C】

【図 4 A】



【図 4A】

【 5 C 】

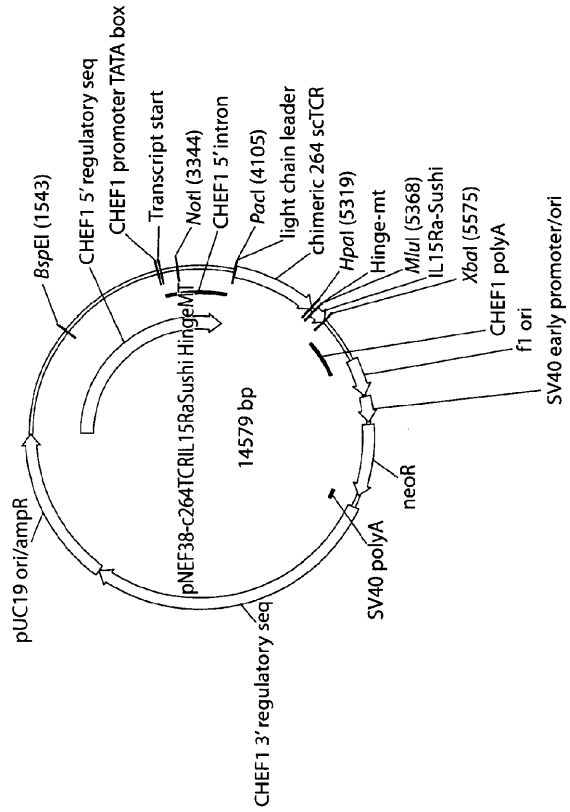
```

metdtllllwllwpvgstgsvtqpdrvtvsegaslqrlckysysgtpylfwvgyprgqlqlllkyys
< Signal peptide >< TCR Vα
gdpvvgvngfeafsksnssfhllrkasvhwdsavfvcvlsedsnyqlwsgtkllikpdtsgggsgg
>< linker
ggsgggsgggsssskviqtprylvkqgggkakmrcipekghpvvfwyqgnknefkflinfqnevlg
Linker >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsaeagsdalylcasslsgggevffgkgrlrvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cβ
fepseaeishtqkatlvclatgffpdbhvelswvngkevhsqvstdpqlkepalndsrlyclsrllrsva
TCR Cβ
tfwqgnprnhfrvcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaawgradvnitcpgppmsvehadiwvksyls
TCR Cβ
Reryicnsgfkrkagtsstltecvlnkatnvahwttpslkcir
IL-15RaSushi >

```

【 5C 】

【 6 A 】



【 6A 】

【 6 B 】

```

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTATGGGTACTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACCGGTCAGT
CAGTGACGAGCCCGATGCTCGCTGCTCTGAGGAGCTCTCTGAGCTGAGATGCAAGTATTC
CTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGGTATGCCAGTACCCGCGGAGGGCTCAGCTCCTCAAG
TACTATTACAGGAGACCCAGTGTTCAGAGAGTGAATGGCTTCGAGCTGACTTCAGCAAGAGTAACTCTT
CCTTCCACTCTCGGAAAGCCCTCTGTGCACTGGAGCGACTCTGCTGTGTACTCTGTTGTTGACGAGGA
TAGCAACTATCTAGTTGCTCTGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTAAGCCAGACACTAGTGTGGCGGT
GGCAGCGGCGTGTGCTCCGGTGGCGGCTTCCTGGCGGGCTTCCTCGAGCACTAATAAAGTCA
TTACAGCTCCCAAGATATCTGTGTAAGGGCAAGGACAAAAGCAAGATGAGGTATCCCTGAAGAGG
ACATCCAGTTGATTCCTGATCAACAATAAGAACAAATGAGTTTAAATTTTGAATTAATCTTCAGAAAT
CAAGAAGTCTTCAGCAAAATAGACATGACTGAAAAACGATCTCTGCTGAGTCTCTCAAACTCACCTT
GCACCTTAGAAATTCATCTCTGAGCGAGGAGACTCAGCACTGTACTCTGTGCGCAGCAGTCTGTGAG
GGCGGCGCAGAAATTTCTTTGGTAAAGAAACAGACTCAGACTCAGTTGTAGAGGACTGAAACAAGGTGTT
CCACCCAGAGTGTGCTGTGTTGAGCATCAGAGACAGAGATCTCCACACCAAAAGGCCACACTGTGT
GCCTGGCCACAGCTTCTTCCCTGACCACTGGAGCTGAGCTGTGGTGGTGAATGGGAAGAGGTGCACAG
TGGGGTCAGCAGGACCCGAGCCCTCAAGGAGCAGCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCTGCTGAGC
AGCCGCTGAGGCTCTGGCCACCTCTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCGCTGCTCAAGTCCAGTCT
ACGGGCTCTCGGAGAAATGACAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAATCTTCTGACAAACTACCACTCCACCGCTCCA
GGCTGGGCTAGAGCAGACGTTAACGAGGCCAAATCTTCTGACAAACTACCACTCCACCGCTCCA
ACGCGTATCACGCTCCCTCCCGCATGTCCGTGGAAACAGCAGACATCTGGGTCAAGACTACAGCTGT
ACTCCAGGAGGGTACATTTGTAATCTGTGTTTCAAGCGTAAAGCGGACGCTCCAGCTGACGAGTG
CGTGTGAACAAGGCCACGAATGTGCGCCACTGGACAAACCCCGAGTCTCAATGCTATGATGATATAA - 3'

```

【 6B 】

【 6 C 】

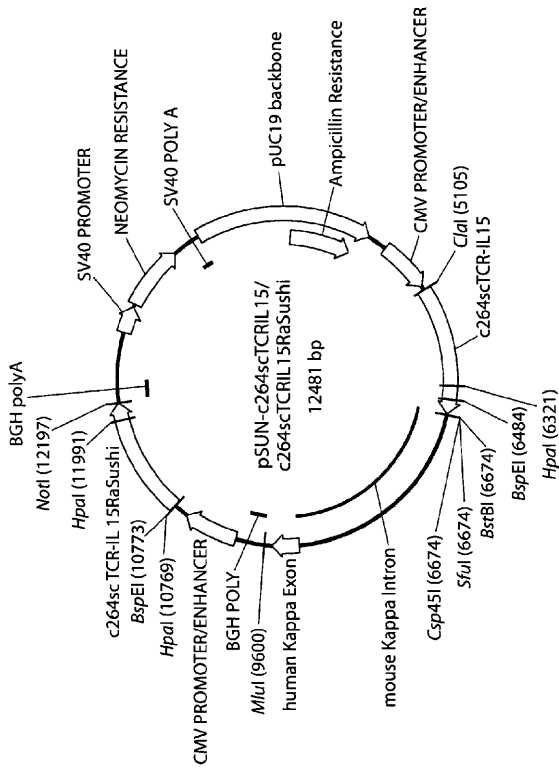
```

metdtllllwllwpvgstgsvtqpdrvtvsegaslqrlckysysgtpylfwvgyprgqlqlllkyys
< Signal peptide >< TCR Vα
gdpvvgvngfeafsksnssfhllrkasvhwdsavfvcvlsedsnyqlwsgtkllikpdtsgggsgg
>< linker
ggsgggsgggsssskviqtprylvkqgggkakmrcipekghpvvfwyqgnknefkflinfqnevlg
Linker >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsaeagsdalylcasslsgggevffgkgrlrvvedlnkvfppevav
TCR Vβ >< TCR Cβ
fepseaeishtqkatlvclatgffpdbhvelswvngkevhsqvstdpqlkepalndsrlyclsrllrsva
TCR Cβ
tfwqgnprnhfrvcqvfyglsendewtqdrakpvtqivsaawgradvnitcpgppmsvehadiwvksyls
TCR Cβ
msvehadiwvksylsryicnsgfkrkagtsstltecvlnkatnvahwttpslkcir
IL-15RaSushi >

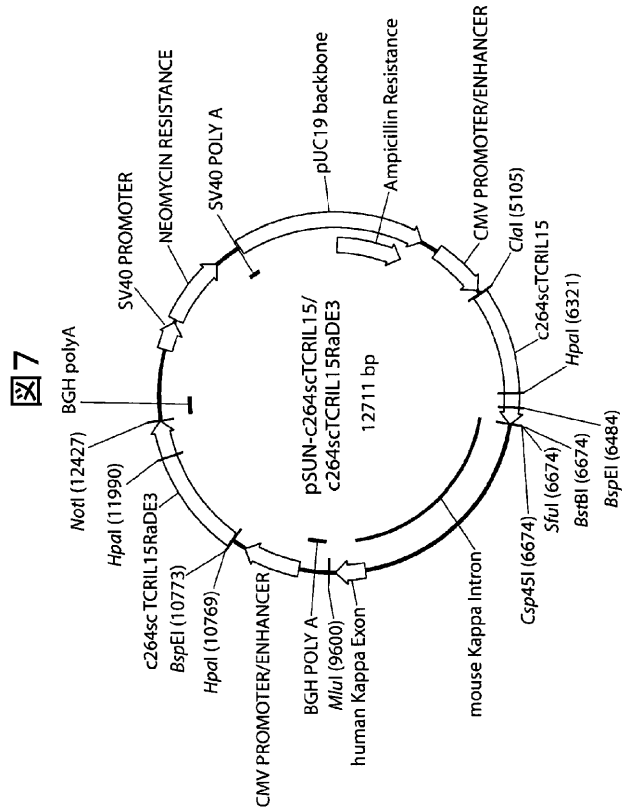
```

【 6C 】

【図 7】



【図 8】



【図 9】

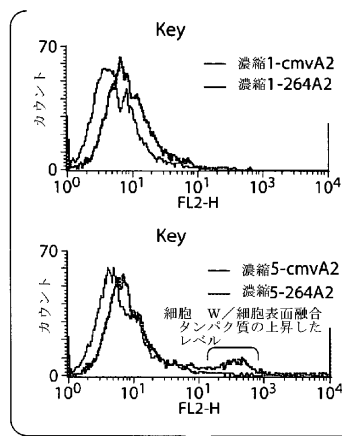


図9A

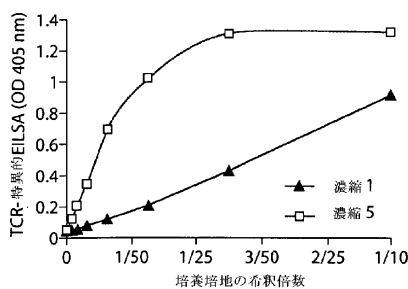


図9B

【図 10】

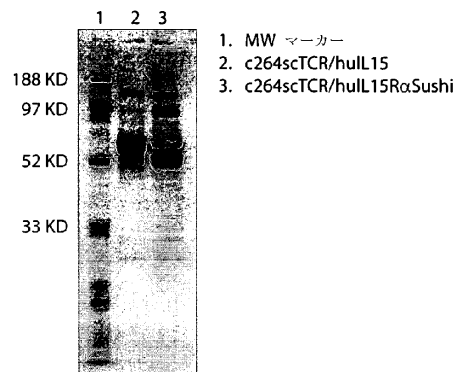


図10A

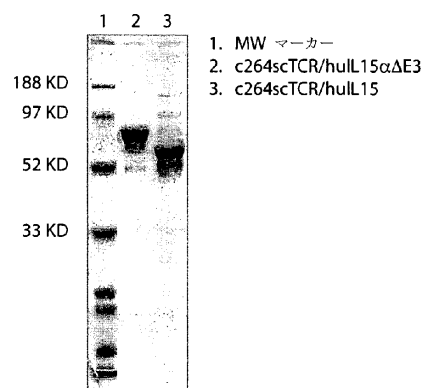


図10B

【図 1 1】

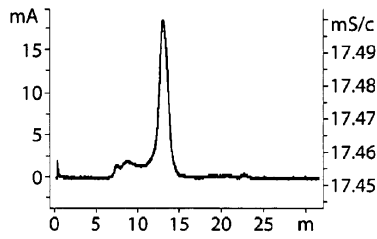


図11A

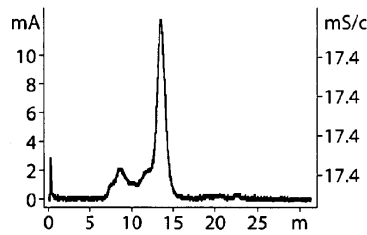


図11B

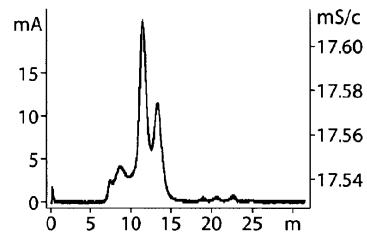


図11C

【図 1 3】

Key

- 対照 (ペプチド無し) T2 染色した w/ c264scTCR/IL15
- p53 ペプチド負荷 T2 染色した w/ c264scTCR/IL15
- 対照 (ペプチド無し) T2 染色した w/ c264scTCR/IL15+ c264scTCR/IL15RαSushi
- p53 ペプチド負荷 T2 染色した w/ c264scTCR/IL15+ c264scTCR/IL15RαSushi
- 対照 (ペプチド無し) T2 染色した w/ c264scTCR/IL15RαSushi
- p53 ペプチド負荷 T2 染色した w/ 264TCR/IL15RαSushi

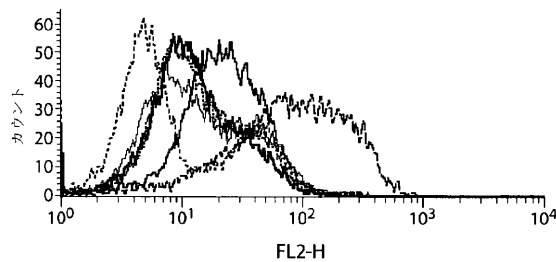


図13

【図 1 2】

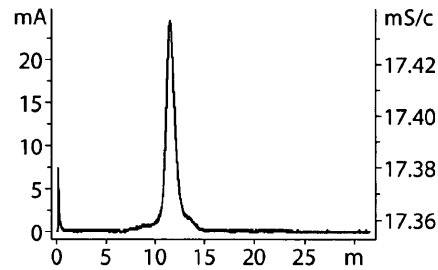


図12A

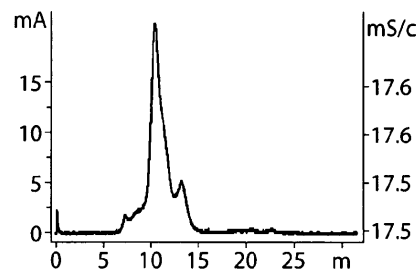


図12B

【図 1 4 A B】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVISLES GDASI
HDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSPFVHIVQMFINTS

図14A

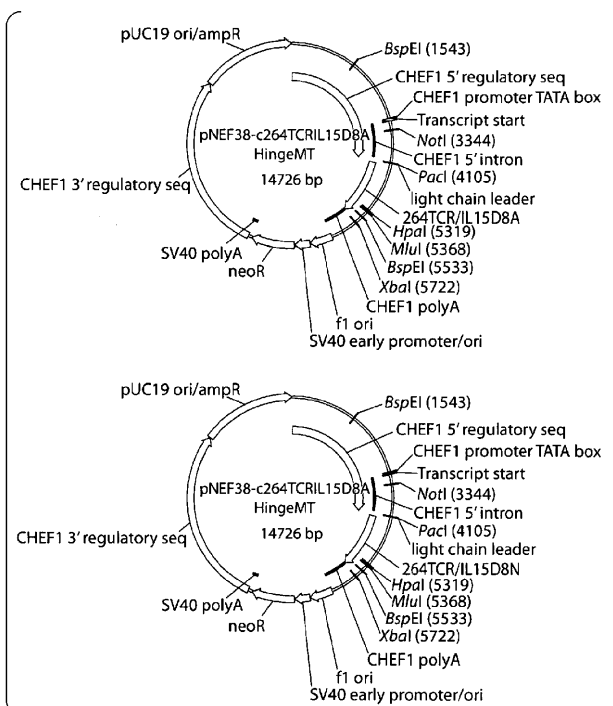


図14B

【図 14C-1】

c264scTCR-hmt-IL15D8A 遺伝子

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTTC
CAGGTTCCACCGGTCAGTCAGTCAGCGACGCCGATGCTCGCGTCAGTGCTCTC
TGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT
TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCGAGGGCTGCAGCTGCTCCTCA
AGTACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGA
GTTTCAGCAAGAGTAACTCTTCTCCACTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG
AGCGACTCTGCTGTGACTTCTGTGTTTGGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT
TGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATATATAAGCCAGACACTAGTGGTGG
CGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTTCGGTGGCGCGGTCTGGCGGTGGCGGT
TCCTCGAGCAATTCAAAGTCATTGAGACTCCAAGATATCTGGTGAAAGGGC
AAGGACAAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGT
ATTCTGGTATCAACAAAAAAGAACAATGAGTTTAAATTTTGTATTAACCTT
CAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAAATAGACATGACTGAAAAACGATTCTCTG
CTGAGTGCTCTTCAAACACCTTGCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGC
AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTCAAGGGGCGGCACA
GAAGTTTTCTTGGTAAAGGAACAGACTCACAGTTGTAGAGGACTGAACA
AGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGGACCATCAGAAGCAGAGATCTC
CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCTTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGTGCACAGTGGGCTCA
GCAGGACCCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCTCAATGACTCCAGATA
CTGACTGAGCAGCGCCTGAGGGTCTCGGCCACTTCTGGCAGAACCCCGC
AACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT
GGGACCCAGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCTG
GGGTAGCAGCAGCTTAACGAGCCAAATCTTGCACAAAACCTCACACATCT
CCACCGCTCCCAAGCCGCTAACTGGGTGAATGTAATAAGTCTTTGAAAAAAA
TTGAAGATCTTATTCATCTATGATATTTGATGCTACTTTATATACGGAAG
TGATGTTACCCAGTTGCAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTCTCTTGGAG
TTACAAGTTATTTCACTTGAGTGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAG
AAAATCTGATCATCTAGCAAAACACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAC
AGAATCTGGATGCAAGAAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAA
TTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTTGCCAAATGTTCAACACTTCTTGAT
AA -3'

図 14C-1

【図 14C-2】

c264scTCR-hmt-IL15D8N 遺伝子

5' - ACCACCATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTTC
CAGGTTCCACCGGTCAGTCAGTCAGCGACGCCGATGCTCGCGTCAGTGCTCTC
TGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT
TATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCGAGGGCTGCAGCTGCTCCTCA
AGTACTATTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGAGGCTGA
GTTTCAGCAAGAGTAACTCTTCTTCCACTGCGGAAAGCCTCTGTGCACTGG
AGCGACTCTGCTGTGACTTCTGTGTTTGGAGCGAGGATAGCAACTATCAGT
TGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATATATAAGCCAGACACTAGTGGTGG
CGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTTCGGTGGCGCGGTCTGGCGGTGGCGGT
TCCTCGAGCAATTCAAAGTCATTGAGACTCCAAGATATCTGGTGAAAGGGC
AAGGACAAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAAGGGACATCCAGTTGT
ATCTGGTATCAACAAAAAAGAACAATGAGTTTAAATTTTGTATTAACCTT
CAGAATCAAGAAGTTCTTCAGCAAAATAGACATGACTGAAAAACGATTCTCTG
CTGAGTGCTCTTCAAACACCTTGCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGC
AGGAGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGTCTGTGAGGGGCGGCACA
GAAGTTTTCTTGGTAAAGGAACAGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACA
AGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGGAGCATCAGAAGCAGAGATCTC
CCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCTTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGTGCACAGTGGGCTCA
GCAGGACCCCGCAGCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCTCAATGACTCCAGATA
CTGCTGAGCAGCGCCTGAGGGTCTCGGCCACTTCTGGCAGAACCCCGC
TGCCTGAGCAGCGCCTGAGGGTCTCGGCCACTTCTGGCAGAACCCCGC
AACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT
GGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCTG
GGGTAGAGCAGACGTTAAGCAGCCAAATCTTTCAGCAAAACCTCACATCT
CCACCGTCTCCAAGCCGCTAACTGGGTGAATGTAATAAGTCTTTGAAAAAAA
TTGAAGATCTTATTCATCTATGATATTTGATGCTACTTTATATACGGAAG
TGATGTTACCCAGTTGCAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTCTCTTGGAG
TTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAG
AAAATCTGATCATCTAGCAAAACACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAAC
AGAATCTGGATGCAAGAAATGTGAGGAACTGGAGGAAAAAATATTAAGAA
TTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTTGCCAAATGTTCTATCAACACTTCTTGAT
AA -3'

図 14C-2

【図 14D-1】

c264scTCR-hmt-IL15D8A タンパク質
metdllllwllwvpgstgsvtqpdarvtvsegaslqrlckysygtpylfwvvyprqglqllkyy
< Signal peptide >< TCR Va
gdpvvgvngfeaeefsknsfhlrkasvhsdsavfvcvlsedsnyqliwsgtkliikpdsgggsgg
linker >< TCR Vα
ggsgggsgggssnskvigtprylvkgggqkakmrcipekghpvvfwyqgnknefklfnqgevlq
linker >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsaeagsalylcasslsgggtevfvgktrltvvedlnkvfppevav
linker >< TCR Vβ
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsqvstdbpplkeqpalndryclssrlrsva
linker >< TCR Cβ
tfwnprnhfrcqvqfvlsewdetgdrakpvtqivsaawgradvnepkssdkthtspptnrvnvi
linker >< TCR Cβ
salkkiedliqsmhidatlytesdvhpckvtamkcfllleqlqvislesgdsashtvenlilannslsn
* IL-15 D8A
gnvtesgkeceeleeknikelfqsfvhiqmfints >
IL-15 D8A

図 14D-1

【図 14D-2】

c264scTCR-hmt-IL15D8N タンパク質
metdllllwllwvpgstgsvtqpdarvtvsegaslqrlckysygtpylfwvvyprqglqllkyy
< Signal peptide >< TCR Va
gdpvvgvngfeaeefsknsfhlrkasvhsdsavfvcvlsedsnyqliwsgtkliikpdsgggsgg
linker >< TCR Vα
ggsgggsgggssnskvigtprylvkgggqkakmrcipekghpvvfwyqgnknefklfnqgevlq
linker >< TCR Vβ
qidmtekrfsaecpsnspcsleiqsaeagsalylcasslsgggtevfvgktrltvvedlnkvfppevav
linker >< TCR Vβ
fepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswvngkevhsqvstdbpplkeqpalndryclssrlrsva
linker >< TCR Cβ
tfwnprnhfrcqvqfvlsewdetgdrakpvtqivsaawgradvnepkssdkthtspptnrvnvi
linker >< TCR Cβ
salkkiedliqsmhidatlytesdvhpckvtamkcfllleqlqvislesgdsashtvenlilannslsn
* IL-15 D8N
gnvtesgkeceeleeknikelfqsfvhiqmfints >
IL-15 D8N

図 14D-2

【図 15】

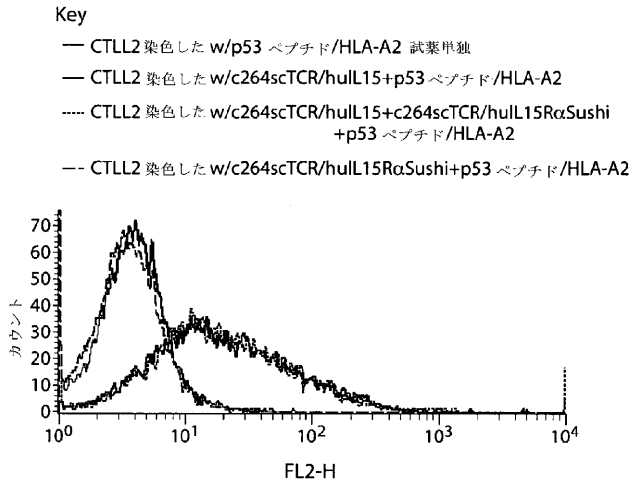


図 15

【図 16】

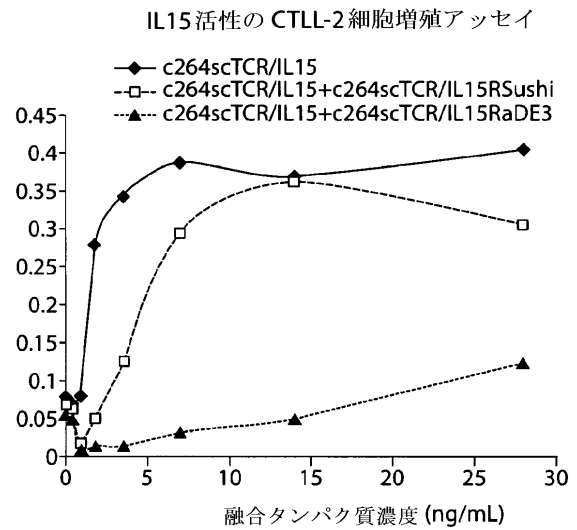


図 16

【図 17 A B】

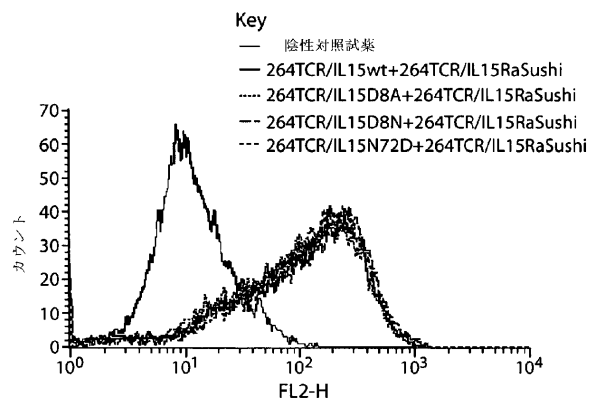


図 17A

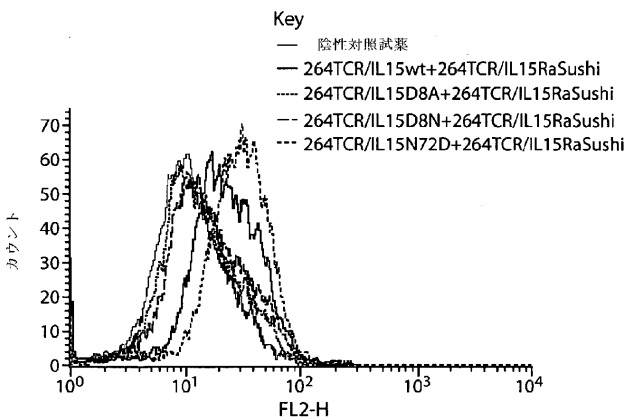


図 17B

【図 17 C】

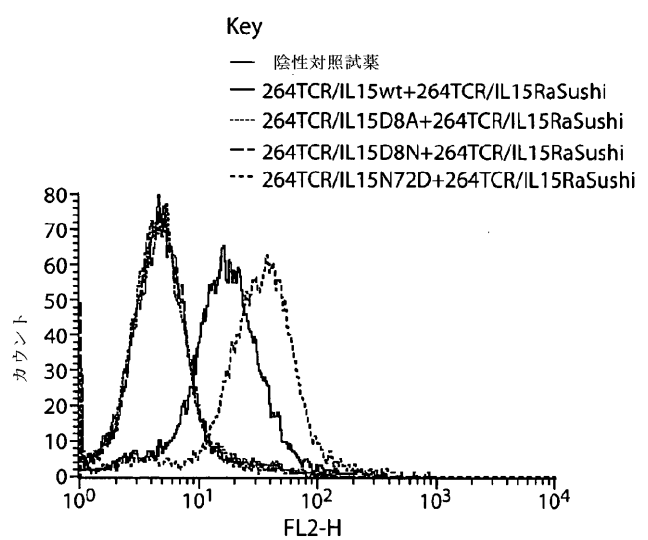


図 17C

【図 18】

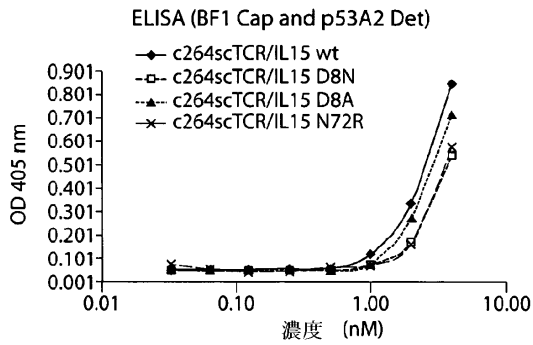


図18A

【図 19 A B】

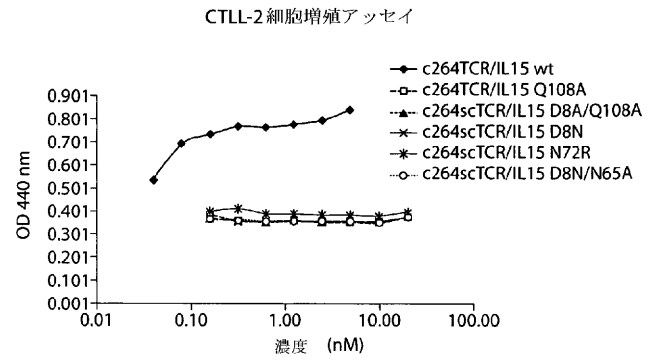


図19A

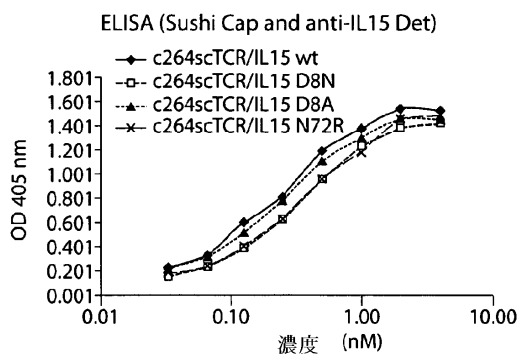


図18B

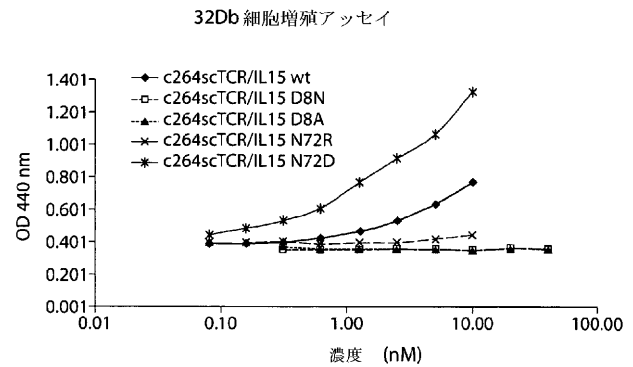


図19B

【図 19 C】

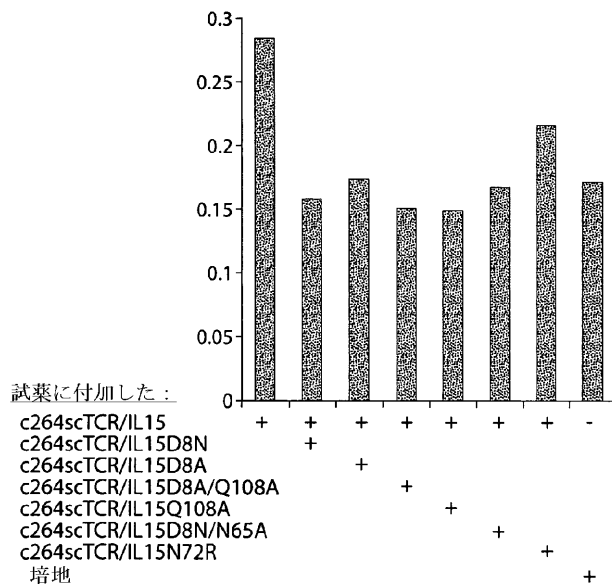


図19C

【図 20】

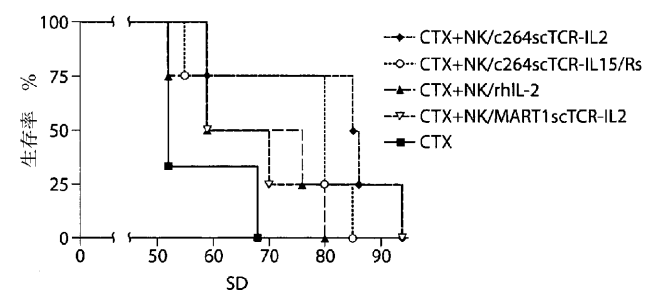


図20

【 図 2 1 】

変異体	位置	8	61	65	72	108	IL15Rβ/c 受容体結合	IL15Rα 結合	増殖活性
	WT aa	D	D	N	N	Q	+	+	+
1	8	N					-	+	-
2	8	A					-	+	-
3	61		A				-	+	-
4	65			D			-	+	-
5	65			A			-	+	-
6	72				D		3+	+	3+
8	72				R		-	+	-
9	108					A	-	+	-
10	8+65	N		A			-	+	-
11	8+108	A				A	-	+	-
12	8+65	S		R			-	+	-

【 配列表 】

2010527919000001.app

【 図 2 2 】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

図22A

AACGGGTGAATGTAATAAGTGATTGAAAAAATGAAGATCTTATTCATCTATGCAT
ATTGATGCTACTTTATATACGGAAGTGATGTTACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATG
AAGTGCCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGTATTCAT
GATACAGTAGAAAACTGATCATCTAGCAAAACAAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTA
ACACAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAATATTAAGAATTTTG
CAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTGA

図22B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/05918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/00 (2008.04) USPC - 530/351 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) USPC - 530/351 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/85.1, 85.2 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Google Scholar Search Terms Used: interleukin-15 receptor alpha, IL-15Ra, C , V, chain, T-cell receptor, TCR, covalent, fusion, protein, amino, acid, change, mutate, substitute, agonist, antagonist		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2004/0156826 A1 (DANGOND et al.) 12August 2004 (12.08.2004) entire document	1-4, 11-25, 29, 30, 57-65, 69-70, 73, 74
A	US 20060263857 A1 (LEFRANCOIS et al.) 23November 2006 (23.11.2006) entire document, especially para [0019]	1-4, 11-25, 29, 30, 73, 74
A	US 2003/0180868 A1 (FRASER) 25September 2003 (25.09.2003) entire document, especially para [0250]	1-4, 11-25, 29, 30, 73, 74
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 August 2008 (16.08.2008)		Date of mailing of the international search report 04 SEP 2008
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. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/05918

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-10, 26-28, 31-56, 66-68, 71, 72
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K	35/14	(2006.01)	A 6 1 K 35/14 Z
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y

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

(72)発明者 シャオユン ツー

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 1 7 6 マイアミ サウスウェスト・1 1 8 ス・ストリート
1 0 3 0 0

(72)発明者 カイピン ハン

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 0 2 5 ミラマー サウスウェスト・2 4 ス・ストリート 1
0 2 3 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA26 CA01 GA11 HA01 HA11
4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 BA44 CA01 CA26 DA08 DA12 MA17 MA22
MA23 MA24 MA31 MA35 MA37 MA52 MA56 MA57 MA59 MA63
MA66 NA14 ZB07 ZB09 ZB11 ZB26 ZB27 ZB33
4C087 AA01 AA02 BB37 MA17 MA22 MA23 MA24 MA35 MA37 MA52
MA56 MA57 MA59 MA66 NA14 ZB07 ZB09 ZB11 ZB26 ZB27
ZB33
4H045 AA10 BA10 BA41 CA40 DA02 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	融合分子及びIL-15変異体		
公开(公告)号	JP2010527919A	公开(公告)日	2010-08-19
申请号	JP2010507463	申请日	2008-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔托生物科学有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿尔特生物科学公司		
[标]发明人	ヒンシーウォン ピーターロード シャオユンツー カイピンハン		
发明人	ヒン シー ウォン ピーター ロード シャオユン ツー カイピン ハン		
IPC分类号	C07K14/54 C07K19/00 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/00 A61K35/14 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/02 A61P29/00 A61P35/02 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/5443 A61K38/00 A61K38/1774 A61K38/1793 A61K38/2086 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 C07K14/7155 C07K2319/00 C12N15/09 C12N15/62 C07K14/7051 C07K16/18 C07K16/28 C07K2319/31 C07K2319/33 C07K2319/74 C07K2319/75 C12P21/00 G01N33/56977		
FI分类号	C07K14/54.ZNA C07K19/00 C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K37/02 A61K35/14.Z A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/02 A61P29/00 A61P35/02 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA26 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/BA44 4C084/CA01 4C084/CA26 4C084/DA08 4C084/DA12 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB07 4C084/ZB09 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZB33 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/MA17 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA24 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA52 4C087/MA56 4C087/MA57 4C087/MA59 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB07 4C087/ZB09 4C087/ZB11 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB33 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA02 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	60/928900 2007-05-11 US		
其他公开文献	JP5501222B2 JP2010527919A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了具有治疗和诊断用途的可溶性融合蛋白复合物和IL-15变体，以及制备这种蛋白质的方法。本发明还提供了使用本发明的融合蛋白复合物和IL-15变体刺激或抑制哺乳动物免疫应答的方法。

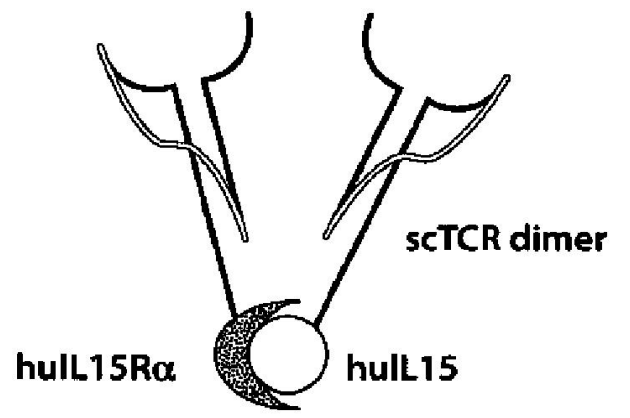


Fig. 1A