

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-46831

(P2018-46831A)

(43) 公開日 平成30年3月29日(2018.3.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 6 3
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C 4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 C O 8 7

審査請求 有 請求項の数 8 O L 外国語出願 (全 132 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-198256 (P2017-198256)	(71) 出願人	504090190
(22) 出願日	平成29年10月12日 (2017.10.12)		アルター・バイオサイエンス・コーポレー ション
(62) 分割の表示	特願2013-529432 (P2013-529432) の分割		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 エイ 2810号
原出願日	平成23年9月21日 (2011.9.21)	(74) 代理人	100189131
(31) 優先権主張番号	61/384,817		弁理士 佐伯 拓郎
(32) 優先日	平成22年9月21日 (2010.9.21)	(74) 代理人	100182486
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中村 正展
(31) 優先権主張番号	61/527,911	(74) 代理人	100158872
(32) 優先日	平成23年8月26日 (2011.8.26)		弁理士 牛山 直子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100147289
			弁理士 佐伯 裕子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多量体 I L - 1 5 可溶性融合分子並びにその製造及び使用方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】少なくとも2つの可溶性融合タンパク質を有している可溶性融合タンパク質複合体の提供。

【解決手段】2つの I L - 1 5 受容体融合ポリペプチドからなる二量体、及び I L - 1 5 配列の72位でNからDへの置換を含有してなる I L - 1 5 変異体ポリペプチド (I L - 1 5 N 7 2 D) の2分子を含んでなり、 I L - 1 5 受容体融合ポリペプチドはそれぞれ、免疫グロブリン F c ドメインに融合した I L - 1 5 R α s u s h i 結合ドメイン (I L - 1 5 R α S u / F c) を含有してなり、 I L - 1 5 R α s u s h i 結合ドメインはそれぞれ、 I L - 1 5 N 7 2 D ポリペプチドと結合している、 I L - 1 5 結合部位が完全に占有されている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体。 I L - 1 5 N 7 2 D 及び/又は I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質がグリコシル化されている、複合体。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの可溶性融合タンパク質を含んでなる、可溶性融合タンパク質複合体であって、

第 1 の融合タンパク質が、インターロイキン - 15 (I L - 15) ポリペプチド (b) 又はその機能的断片と共有結合している第 1 生物活性ポリペプチド (a) を含み；そして

第 2 の融合タンパク質が、可溶性インターロイキン - 15 受容体アルファ (I L - 15 R α) ポリペプチド (d) 又はその機能的断片と共有結合している第 2 生物活性ポリペプチド (c) を含み、

第 1 及び第 2 融合タンパク質の一方又は両方が更に免疫グロブリン F c ドメイン又はその機能的断片を含み、

第 1 融合タンパク質の I L - 15 ドメインが第 2 融合タンパク質の可溶性 I L - 15 R α ドメインと結合して可溶性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 1 及び第 2 生物活性ポリペプチドの一方が第 1 可溶性 T 細胞受容体 (T C R) 又はその機能的断片を含んでいる、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】

他方の生物活性ポリペプチドが、請求項 2 に記載の第 1 可溶性 T C R 又はその機能的断片を含み、それによって増大した結合活性を有する多価 T C R 融合タンパク質複合体を作成する、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】

他方の生物活性ポリペプチドが第 1 可溶性 T C R と異なる第 2 可溶性 T C R 又はその機能的断片を含んでいる、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】

T C R が特定抗原の認識に特異的である、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】

T C R が、 α 及び β 鎖 T C R を含んでい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】

T C R が 1 本鎖 T C R ポリペプチドを含んでいる、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】

1 本鎖 T C R が、ペプチドリンカー配列によって T C R V - β 鎖と共有結合している T C R V - α 鎖を含んでいる、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】

1 本鎖 T C R が、T C R V - β 鎖と共有結合している可溶性 T C R C β 鎖断片を更に含んでいる、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】

1 本鎖 T C R が、T C R V - α 鎖と共有結合している可溶性 T C R C α 鎖断片を更に含んでいる、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 1 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 2 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んでいる、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】

第 1 及び第 2 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んでいる、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

抗体が、特定抗原の認識に特異的である、請求項 1 2 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 1 4】

抗体が、1 本鎖抗体又は 1 本鎖 F v である、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 1 5】

1 本鎖抗体が、ポリペプチドリンカー配列によって免疫グロブリン重鎖可変領域と共有結合している免疫グロブリン軽鎖可変領域を含んでいる、請求項 1 4 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 1 6】

第 1 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 2 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んでいる、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 1 7】

IL - 1 5 ポリペプチドが、天然の IL - 1 5 ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を含んでいる IL - 1 5 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 1 8】

IL - 1 5 変異体が、IL - 1 5 アゴニスト又はアンタゴニストとして機能する、請求項 1 7 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 1 9】

IL - 1 5 変異体が、天然の IL - 1 5 ポリペプチドと比較して、IL - 1 5 R β γ C 受容体に対する増大した又は減少した結合活性を有している、請求項 1 7 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2 0】

IL - 1 5 変異体の配列が、天然の IL - 1 5 配列と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸変化を有している、請求項 1 7 ~ 1 9 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 2 1】

アミノ酸変化が、IL - 1 5 R β 及び / 又は IL - 1 5 R γ C と相互作用する IL - 1 5 のドメイン中のアミノ酸置換又は欠失である、請求項 2 0 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2 2】

アミノ酸変化が、成熟ヒト IL - 1 5 配列（配列番号 1）の 6、8、10、61、65、72、92、101、104、105、108、109、111、又は 112 位における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸置換又は欠失である、請求項 2 0 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2 3】

アミノ酸変化が、成熟ヒト IL - 1 5 配列の 6 位の I を S に、8 位の D を N 若しくは A に、61 位の D を A に、65 位の N を A に、72 位の N を R に、104 位の V を P に、又は 108 位の Q を A に置換すること、又はこれらの置換の何れかの組み合わせである、請求項 2 2 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2 4】

アミノ酸変化が、IL - 1 5 アンタゴニスト活性又は天然の IL - 1 5 ポリペプチドと比較して IL - 1 5 R β γ C 受容体に対する減少した結合活性を有する IL - 1 5 変異体をもたらす、請求項 2 3 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2 5】

アミノ酸変化が、成熟ヒト IL - 1 5 配列の 72 位で N を D に置換することである、請求項 2 0 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2 6】

アミノ酸変化が、IL - 1 5 アゴニスト活性又は天然の IL - 1 5 ポリペプチドと比較

10

20

30

40

50

して I L - 1 5 R β y C 受容体に対する増大した結合活性を有する I L - 1 5 変異体をもたらす、請求項 2 5 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2 7】

F c ドメイン又はその機能的断片が、I g G F c ドメイン、ヒト I g G 1 F c ドメイン、ヒト I g G 2 F c ドメイン、ヒト I g G 3 F c ドメイン、ヒト I g G 4 F c ドメイン、I g A F c ドメイン、I g D F c ドメイン、I g E F c ドメイン、及び I g M F c ドメインからなる群より選ばれる F c ドメインを含んでいる、請求項 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 2 8】

F c ドメインが、変化した相補体又は F c 受容体結合特性を有する F c ドメインをもたらすアミノ酸変化を含んでいる、請求項 2 7 に記載の可溶性融合タンパク質。

10

【請求項 2 9】

アミノ酸変化が、I g G 1 C_H 2 の 2 3 4 及び 2 3 5 位のロイシン残基の（抗体コンセンサス配列に基づいてナンバリング）（すなわち、．．． P E L L G G ．．．）アラニン残基による置換（すなわち、．．． P E A A G G ．．．）、I g G 1 C_H 2 の 3 3 2 位のリジン残基の（抗体コンセンサス配列に基づいてナンバリング）（すなわち、．．． K C K S L ．．．）アラニン残基による置換（すなわち、．．． K C A S L ．．．）、又はこれらの何れかの組み合わせからなる群より選ばれる、請求項 2 8 に記載の可溶性融合タンパク質。

【請求項 3 0】

第 1 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 I L - 1 5 ポリペプチド（又はその機能的断片）と共有結合している、請求項 1 ～ 2 9 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

20

【請求項 3 1】

第 2 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 I L - 1 5 R α ポリペプチド（又はその機能的断片）と共有結合している、請求項 1 ～ 3 0 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 3 2】

I L - 1 5 R α ポリペプチド（又はその機能的断片）が、ポリペプチドリinker 配列によって F c ドメイン（又はその機能的断片）と共有結合している、請求項 1 ～ 3 1 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

30

【請求項 3 3】

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

【請求項 3 4】

ペプチド抗原が、主要関連ポリペプチド又はウィルスがコードするポリペプチドに由来している、請求項 3 3 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 3 5】

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んでいる、請求項 1 3 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

40

【請求項 3 4】

抗体ドメインに対する抗原が、C D 抗原、サイトカイン又はケモカインの受容体又はリガンド、成長因子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 / 陰性同時刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、或いはウィルスがコードする抗原を含んでいる、請求項 1 3 又は 3 5 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 3 5】

I L - 1 5 R α ポリペプチドが、I L - 1 5 ポリペプチドを結合することができる I L - 1 5 受容体アルファの細胞外ドメインを含んでいる、請求項 1 ～ 3 4 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

50

【請求項 36】

IL-15R α ポリペプチドが、IL-15R α sushiドメイン又はIL-15R α Δ E3ドメインの何れかを含んでいる、請求項1～35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 37】

請求項1～36の何れか一項に記載の第2可溶性融合タンパク質複合体と共有結合している請求項1～36の何れか一項に記載の第1可溶性融合タンパク質複合体を含んでなる、可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 38】

第1可溶性融合タンパク質複合体が、第2可溶性融合タンパク質複合体と同じである、請求項37に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

10

【請求項 39】

第1可溶性融合タンパク質複合体が、第2可溶性融合タンパク質複合体と異なる、請求項37に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 40】

第1可溶性融合タンパク質複合体が、ジスルフィド結合で第2可溶性融合タンパク質複合体と共有結合している、請求項37に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 41】

ジスルフィド結合が、第1可溶性融合タンパク質複合体の第2ポリペプチドのFcドメインを第2可溶性融合タンパク質複合体の第2ポリペプチドのFcドメインに共有結合させる、請求項40に記載の可溶性融合複合体。

20

【請求項 42】

請求項1～36の何れか一項に記載の第1融合タンパク質をコードする核酸配列。

【請求項 43】

請求項1～36の何れか一項に記載の第2融合タンパク質をコードする核酸配列。

【請求項 44】

核酸配列が融合タンパク質をコードする配列に操作可能に結合しているプロモータ、翻訳開始シグナル、及びリーダー配列を更を含んでいる、請求項42又は43に記載の核酸配列。

【請求項 45】

請求項42に記載の核酸配列を含んでなる、DNAベクター。

30

【請求項 46】

請求項43に記載の核酸配列を含んでなる、DNAベクター。

【請求項 47】

請求項42及び43に記載の核酸配列を含んでなる、DNAベクター。

【請求項 48】

請求項42に記載の配列、請求項43に記載の配列、及び請求項42及び43に記載の配列の群から選ばれる核酸配列を含んでなる、細胞。

【請求項 49】

方法が、

40

a) 第1融合タンパク質をコードする請求項45に記載のDNAベクターを第1宿主細胞内に導入すること、

b) 細胞又は培地中に第1融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で培地中で第1宿主細胞を培養すること；

c) 宿主細胞又は培地から第1融合タンパク質を精製すること、

d) 第2融合タンパク質をコードする請求項46に記載のDNAベクターを第2宿主細胞内に導入すること、

e) 細胞又は培地中に第2融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で培地中で第2宿主細胞を培養すること；及び

f) 宿主細胞又は培地から第2融合タンパク質を精製すること、及び

50

g) 第1融合タンパク質のIL-15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性IL-15R α ドメインの間を結合させるのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合して可溶性融合タンパク質複合体を形成すること；

を含んでなる、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。

【請求項50】

請求項46に記載の核酸から発現されたポリペプチド間にジスルフィド結合を形成させるのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合することを更に含み、ここで請求項37に記載の可溶性融合タンパク質複合体を形成する、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

方法が、

10

a) 第1融合タンパク質をコードする請求項45に記載のDNAベクター及び第2融合タンパク質をコードする請求項46に記載のDNAベクターを宿主細胞に導入すること、

b) 細胞又は培地中に融合タンパク質を発現して、第1融合タンパク質のIL-15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性IL-15R α ドメインの間を会合させて可溶性融合タンパク質複合体の形成を可能にす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；

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；

を含んでなる、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。

【請求項52】

請求項46に記載の核酸から発現されたポリペプチド間にジスルフィド結合を形成させるのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質複合体を混合することを更に含み、ここでクレーム37に記載の可溶性融合タンパク質複合体を形成する、請求項51に記載の方法。

20

【請求項53】

方法が、

a) 第1及び第2融合タンパク質をコードする請求項47に記載のDNAベクターを宿主細胞内に導入すること、

b) 細胞又は培地中に融合タンパク質を発現して、第1融合タンパク質のIL-15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性IL-15R α ドメインの間を会合させて可溶性融合タンパク質複合体の形成を可能にする、及び請求項46に記載の核酸によってコードされるポリペプチドの間にジスルフィド結合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；

30

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；

を含んでなる、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。

【請求項54】

請求項46に記載の核酸から発現されたポリペプチド間にジスルフィド結合を形成させるのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合することを更に含み、ここで請求項37に記載の可溶性融合タンパク質複合体を作成する、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

方法が、

40

a) 複数の細胞を請求項1～41に記載の可溶性融合タンパク質複合体と接触させること（ここで複数の細胞は更に、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鎖を担持している免疫細胞又は請求項1に記載のFcドメインによって認識されるFc受容体鎖を担持している免疫細胞、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1つによって認識される抗原を担持している標的細胞を含んでいる）、

b) 標的細胞上の抗原と、免疫細胞上のIL-15R又はFc受容体鎖の間に、免疫細胞を結合及び活性化するのに十分に、特異的結合複合体（架橋）を形成すること；及び

c) 結合した活性化免疫細胞によって標的細胞を殺傷すること；

を含んでなる、標的細胞を殺傷する方法。

【請求項56】

50

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 55 に記載の方法。

【請求項 57】

生物活性ポリペプチドが TCR を含んでいる、請求項 55 又は 56 に記載の方法。

【請求項 58】

標的細胞上の抗原が、MHC 又は HLA 分子内に提示され、TCR によって認識される、腫瘍又はウイルスによってコードされるペプチド抗原を含んでいる、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

免疫細胞が、T 細胞、LAK 細胞、NK 細胞、マクロファージ、単球又は顆粒球である、請求項 55 に記載の方法。

10

【請求項 60】

疾患細胞が疾患関連抗原を発現している、患者の疾患を予防又は治療する方法であって、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んでいる請求項 1 ~ 41 の何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) 抗原発現疾患細胞と免疫細胞を発現している IL-15R 又は Fc 受容体の間に免疫細胞を局在化するのに十分に特異的結合複合体（架橋）を形成すること；及び

c) 患者の疾患を予防又は治療するのに十分に疾患細胞を損傷又は殺傷すること；を含んでなる、方法。

20

【請求項 61】

疾患細胞が疾患関連抗原を発現している、患者の疾患を予防又は治療する方法であって、方法が：

a) IL-15R 鎖又は Fc 受容体鎖を担持してい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んでいる請求項 1 ~ 41 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) 抗原発現疾患細胞と免疫細胞を発現している IL-15R 又は Fc 受容体の間に免疫細胞を局在化するのに十分に特異的結合複合体（架橋）を形成すること；及び

d) 患者の疾患を予防又は治療するのに十分に疾患細胞を損傷又は殺傷すること；を含んでなる、方法。

30

【請求項 62】

疾患が癌又はウイルス感染症である、請求項 60 又は 61 に記載の方法。

【請求項 63】

疾患関連抗原がペプチド / MHC 複合体である、請求項 60 又は 61 に記載の方法。

【請求項 64】

請求項 1 ~ 41 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んでなる、哺乳動物における免疫応答を刺激する方法。

【請求項 65】

請求項 1 ~ 41 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んでなる、哺乳動物における免疫応答を抑制する方法。

40

【請求項 66】

少なくとも 1 つの可溶性融合タンパク質複合体が検出可能な標識を含んでいる、請求項 1 ~ 41 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 67】

検出可能な標識が、ビオチン、ストレプトタビジン、酵素又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、リン光性若しくはケミルミネセント分子である、請求項 66 に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

【請求項 68】

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の間に特異的結合複合

50

体を形成する条件下で、細胞又は組織を請求項 6 6 に記載の少なくとも 1 つの可溶性融合タンパク質複合体と接触させること、

b) 抗原に結合しなかった何れの可溶性融合タンパク質複合体も除去するのに適している条件下で細胞又は組織を洗浄すること；及び

c) 抗原を含有している細胞又は組織の指標であるとして、特異的結合複合体を検出すること；

を含んでなる、細胞又は組織上に提示される抗原を含有している細胞又は組織を検出する方法。

【請求項 6 9】

生物活性ポリペプチドが T C R を含み、そして抗原が T C R によって認識される M H C 又は H L A 分子内に提示されるペプチド抗原を含んでいる、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

抗原提示のコピー数が細胞当たり多くて 1 0 0 0 コピーである、請求項 6 8 又は 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

方法がインビボ、インビトロ、又はエクスビボで行われる、請求項 6 8 ~ 7 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7 2】

第 1 可溶性融合タンパク質複合体と第 2 可溶性融合タンパク質複合体の二量体を形成すること（ここで、それぞれの融合タンパク質複合体の第 1 生物活性ポリペプチドと第 2 生物活性ペプチドの結合部位は同一又は異なっている）を含んでなる、請求項 2 又は 1 2 に記載の可溶性融合タンパク質複合体の分子当たりの結合活性を増大する方法。

【請求項 7 3】

分子当たりの結合活性が、1 0 % 又はそれ以上、2 0 % 又はそれ以上、3 0 % 又はそれ以上、4 0 % 又はそれ以上、5 0 % 又はそれ以上、6 0 % 又はそれ以上、或いは 7 0 % 又はそれ以上増大する、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

第 1 可溶性融合タンパク質複合体と第 2 可溶性融合タンパク質複合体の二量体を形成することを含んでなる、請求項 2 又は 1 2 に記載の可溶性融合タンパク質複合体の分子当たりの I L - 1 5 活性を増大する方法。

【請求項 7 5】

方法が：

a) I L - 1 5 をコードする第 1 D N A ベクター及び I L - 1 5 R α 融合タンパク質をコードする第 2 D N A ベクターを宿主細胞内に導入すること；

b) I L - 1 5 と I L - 1 5 R α 融合タンパク質を発現す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；及び

c) I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること；

を含んでなる、インターロイキン - 1 5 (I L - 1 5) : インターロイキン - 1 5 受容体アルファ (I L - 1 5 R α) 融合タンパク質複合体を製造する方法。

【請求項 7 6】

I L - 1 5 R α 融合タンパク質複合体が、生物活性ポリペプチドと共有結合している可溶性 I L - 1 5 R α を含んでいる、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

生物活性ポリペプチドが、I g G の重鎖定常ドメインである、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

生物活性ポリペプチドが、I g G の重鎖定常ドメインの F c ドメインである、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 9】

10

20

30

40

50

IL - 15 が、第 2 生物活性ポリペプチドと共有結合している IL - 15 を含んでいる、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 80】

方法が：

a) IL - 15 をコードする第 1 DNA 及び IL - 15 R α / Fc 融合タンパク質をコードする第 2 DNA を宿主細胞内に導入すること；

b) IL - 15 と IL - 15 R α / Fc 融合タンパク質を発現す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；及び

c) IL - 15 : IL - 15 R α / Fc 複合体を宿主細胞又は培地から精製すること：を含んでなる、IL - 15 R α / Fc 融合タンパク質を含んでいる IL - 15 : IL - 15 R α 複合体を製造する方法。

10

【請求項 81】

方法が：

a) IL - 15 と IL - 15 R α / Fc 融合タンパク質を宿主細胞内で同時発現すること；

b) IL - 15 と IL - 15 R α / Fc 融合タンパク質を発現す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；及び

c) IL - 15 : IL - 15 R α / Fc 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること：

を含んでなる、IL - 15 R α / Fc 融合タンパク質を含んでいる IL - 15 : IL - 15 R α 融合タンパク質複合体を製造する方法。

20

【請求項 82】

IL - 15 : IL - 15 R α 複合体を宿主細胞又は培地から精製することが、IL - 15 : IL - 15 R α 融合タンパク質複合体を特異的に結合する親和性試薬上に IL - 15 : IL - 15 R α 複合体を捕獲することを含んでいる、請求項 75 ~ 81 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 83】

IL - 15 R α 融合タンパク質が、IL - 15 R α / Fc 融合タンパク質及び Fc ドメインと特異的に結合する親和性試薬を含んでいる、請求項 82 に記載の方法。

30

【請求項 84】

親和性試薬が、プロテイン A 又はプロテイン G である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

親和性試薬が抗体である、請求項 82 又は 83 に記載の方法。

【請求項 86】

IL - 15 : IL - 15 R α 複合体を宿主細胞又は培地から精製することが、イオン交換クロマトグラフィーを含んでいる、請求項 75 ~ 85 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 87】

IL - 15 : IL - 15 R α 複合体を宿主細胞又は培地から精製することが、サイズ排除クロマトグラフィーを含んでいる、請求項 75 ~ 86 の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 88】

IL - 15 R α が、IL - 15 R α Sushi (IL - 15 R α Su) を含んでいる、請求項 75 ~ 87 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 89】

IL - 15 が突然変異 IL - 15 である、請求項 75 ~ 88 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 90】

突然変異 IL - 15 が、IL - 15 N72D を含んでいる、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

宿主細胞が哺乳動物の細胞である、請求項 75 ~ 90 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 92】

50

IL - 15 : IL - 15 R α 複合体の IL - 15 結合部位が完全に占有されている、請求項 75 ~ 91 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 93】

IL - 15 : IL - 15 R α Su / Fc 複合体の両方の IL - 15 結合部位が完全に占有されている、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 94】

IL - 15 : IL - 15 R α 複合体が、複合体の電荷又はサイズ特性に基づいて精製される、請求項 75 ~ 93 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 95】

a) 宿主細胞内で IL - 15 N72D と IL - 15 R α Su / Fc 融合タンパク質を同時発現すること；

b) IL - 15 N72D と IL - 15 R α Su / Fc 融合タンパク質を発現す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；及び

c) IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること（ここで、IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体の両方の IL - 15 結合部位は完全に占有されている）；

を含んでなる、IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 融合タンパク質複合体を製造する方法。

【請求項 96】

完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 融合タンパク質複合体を、複合体の電荷特性に基づいてアニオン交換クロマトグラフィーで精製する、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 融合タンパク質複合体を、低イオン強度で中性 pH の緩衝液を用いる結合条件及びイオン強度を上昇させる緩衝液を用いる溶出条件で、4 級アミンに基づく樹脂を用いて精製する、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 98】

IL - 15 又は IL - 15 突然変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチド及び IL - 15 受容体融合タンパク質をコードする第 2 ポリヌクレオチドを含んでなる、細胞。

【請求項 99】

細胞が、IL - 15 N72D をコードする第 1 発現ベクター及び IL - 15 R α Su / Fc 融合タンパク質をコードする第 2 発現ベクターを含んでいる、請求項 98 に記載の細胞。

【請求項 100】

二量体 IL - 15 R α Su / Fc 及び 2 つの IL - 15 N72D 分子を含んでなる、単離された完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体。

【請求項 101】

複合体が、少なくとも 90 ~ 95 % 又はそれ以上精製された完全に占有されている複合体である、請求項 100 に記載の複合体。

【請求項 102】

複合体が、5 . 6 ~ 6 . 5 の間の等電点を有している、請求項 100 に記載の複合体。

【請求項 103】

約 114 kDa の分子量を有している、請求項 100 に記載の複合体。

【請求項 104】

IL - 15 N72D 及び / 又は IL - 15 R α Su / Fc 融合タンパク質がグリコシル化されている、請求項 100 に記載の複合体。

【請求項 105】

請求項 75 ~ 97 の何れか一項の方法に従って産生された、単離された完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体。

【請求項 106】

方法が、請求項 100～105 の何れか一項に記載の完全に占有されている IL-15 N72D: IL-15 R α S u / F c 複合体を対象に投与することを含んでなる、対象における免疫応答を調節する方法。

【請求項 107】

免疫応答を増大又は減少する、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

方法が、請求項 100～105 の何れか一項に記載の完全に占有されている IL-15 N72D: IL-15 R α S u / F c 複合体を対象に投与することを含んでなる、腫瘍を有している対象における免疫応答を増強する方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本願はその全ての内容が参照により本明細書に取り込まれている、2010年9月21日に出願された米国仮特許出願第 61/384,817 号及び 2011年8月26日に
出願された米国仮特許出願第 61/527,911 号の優先権を主張する。

【0002】

(政府の支援)

本願の研究支援は、保健社会福祉省、長官に代表されるアメリカ合衆国によって実施された。

20

【背景技術】

【0003】

多価分子の形成を介して有効親和性を増大すること、或いは複数の特定分子の形成を介して認識の範囲を広げることを目的とする多量体標的タンパク質を作ることの有用性を過去の研究が明らかにしている。多種のタンパク質相互作用ドメインが2価及び多価結合部位を有する組み換えタンパク質を作るために用いられてきた。初めに、ロイシンのジッパードメインに対する標的ドメインの融合が一般に二量化に用いられた。この手法では、ロイシンジッパードメインの疎水性相互作用が並行 α 螺旋中の規則的間隔のロイシンによって介在され、それと同時に二量化の相手が、主に荷電される残基である、疎水性コアのすぐ手前にある別のアミノ酸によって認識され、塩橋を形成する(1～3)。この相互作用はタンパク質の Fos と Jun ファミリーによって例示され、これは標的ドメイン特異性の有意な障害なしで優先的にヘテロ二量体を形成する。この手法は多量体を作るための多目的な骨格を提供する(4、5)。しかしながら、治療用タンパク質の開発に対するこの手法の実用性に著しく影響を与える制限がある。最も顕著には、Fos と Jun は殆ど例外なく核内に蓄積される細胞内タンパク質である。従って、可溶性で分泌型の Fos と Jun の融合は通常、バキュロウィルス感染又は安定に形質転換された昆虫細胞系を用いて、比較的低い収量で容易には拡張できない製造工程で作られる(6、7)。二重特異性分子を作るために、Fos - Jun に結合している抗体ドメインを細菌細胞又は哺乳動物細胞内に産生したが、主な制限は、精製工程を複雑にしそして全収量を低下する(8、9)サブユニットのホモ二量化であった(8、9)。更に、昆虫又は細菌細胞によって産生されるタンパク質のグリコシル化のパターンの相違が、治療適用で用いられるときに産生物の潜在的な免疫原性についての懸念を引き起こしている。

30

40

【0004】

ロイシンジッパーモチーフに加えて、免疫グロブリン(IgG)定常ドメイン、ヘリックス・ターン・ヘリックス自己二量化ペプチド、コラーゲンの三量又は四量サブドメイン及び p53 が、それによって多価分子を作る骨格として用いられている(8、10～13)。IgG 断片を除いて、これらの相互作用ドメインは主として分子骨格として働いて、自らはその他の機能活性を欠いている。更に、これらのドメインを含んでいる融合タンパク質は大抵、安定な多量体形成を促進するための最適化及び特殊化した産生細胞株、そし

50

て面倒な又は治療法の開発に関する規制ハードルを負わせる精製方法を必要としている（10、12）。これらの骨格の多くは、乏しい薬物動態特性を示しそしてその治療可能性を制限する免疫原性応答のリスクをもたらす非ヒトタンパク質ドメイン又は血漿の非天然成分の何れかの誘導体である。

【発明の概要】

【0005】

本発明は少なくとも2つの可溶性融合タンパク質を有している可溶性融合タンパク質複合体を提供する。ある特定の実施態様では、第1融合タンパク質は、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第1生物活性ポリペプチドを包含している。第2融合タンパク質は、可溶性インターロイキン-15受容体アルファ（IL-15R 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第2生物活性ポリペプチドを包含している。複合体中で、第1及び第2融合タンパク質の一方又は両方が更に免疫グロブリンFcドメイン又はその機能断片を包含している。複合体中で、第1融合タンパク質のIL-15ドメインは第2融合タンパク質の可溶性IL-15R α と結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成する。

10

【0006】

ある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体中で、第1及び第2生物活性ポリペプチドのうちの1つは第1可溶性T細胞受容体（TCR）又はその機能的断片を包含している。ある特定の実施態様では、第1可溶性TCRを包含している可溶性融合タンパク質複合体は、生物活性ポリペプチドとして第2可溶性TCRを包含し、それによって増大した結合活性を伴う多価TCR融合タンパク質複合体を作る。ある特定の実施態様では、複合体中のTCRは少なくとも2つの異なったTCRを包含する。ある特定の実施態様では、全てのTCRが同じである。2つの異なったTCRが存在するある特定の実施態様では、TCRは別の標的分子に結合する。2つの異なったTCRが存在するある特定の実施態様では、TCRは同じ標的分子上の異なったエピトープに結合する。ある特定の実施態様では、TCRは特定抗原の認識に対して特異的である。

20

【0007】

ある特定の実施態様では、本発明の可溶性融合複合体中で、TCRは独立して、 α 及び β 鎖TCR並びに単鎖TCRポリペプチドを含んでいるヘテロ二量体から選ばれる。ある特定の実施態様では、単鎖TCRはペプチドリンカー配列によってTCRV- β 鎖と共有結合しているTCRV- α 鎖を包含している。ある特定の実施態様では、単鎖TCRは更に、TCRV- β 鎖と共有結合している可溶性TCRC β 鎖断片を包含している。ある特定の実施態様では、単鎖TCRは更に、TCRV- α 鎖と共有結合している可溶性TCRC α 鎖断片を包含している。可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、第1生物活性ポリペプチドはTCR α ポリペプチド又はその機能的断片を包含し、そして第2生物活性ポリペプチドはTCR β ポリペプチド又はその機能的断片を包含する。

30

【0008】

ある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体中で、第1及び第2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包含する。ある特定の実施態様では、複合体中の抗体は少なくとも2つの異なった抗体を包含する。ある特定の実施態様では、全ての抗体が同じである。少なくとも2つの異なった抗体が存在するある特定の実施態様では、抗体は異なった標的分子に結合する。少なくとも2つの異なった抗体が存在するある特定の実施態様では、抗体は同じ標的分子上の異なったエピトープに結合する。ある特定の実施態様では、抗体は特定抗原の認識に対して特異的である。

40

【0009】

可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、抗体は単鎖抗体又は単鎖Fvである。ある特定の実施態様では、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んでいる。ある特定の実施態様では、第1生物活性ポリペプチドは抗体重鎖ポリペプチド又

50

はその機能的断片を含んでおり、そして第2生物活性ポリペプチドは抗体軽鎖ポリペプチド又はその機能的断片を含んでいる。

【0010】

本発明の可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、IL-15ポリペプチドは天然型IL-15ポリペプチドと異なったアミノ酸配列を有しているIL-15変異体である。ヒトIL-15ポリペプチドを本明細書ではhuIL-15、hIL-15、huIL15、hIL15、IL-15野生型(wt)等で示し、そしてこの変異体を天然アミノ酸、天然配列中のその位置及び変異アミノ酸を用いて示す。例えば、huIL15N72Dは、72位のNのDへの置換を含むヒトIL-15を示す。ある特定の実施態様では、IL-15変異体は、例えば、天然型IL-15ポリペプチドと比べてIL-15R β YC受容体に対する増大した結合活性によって実証されているように、IL-15アゴニストとして機能する。ある特定の実施態様では、IL-15変異体は、例えば、天然型IL-15ポリペプチドと比べてIL-15R β YC受容体に対する減少した結合活性によって実証されているように、IL-15アンタゴニストとして機能する。ある特定の実施態様では、IL-15変異体は天然型IL-15ポリペプチドと比べIL-15R β YC受容体に対して増大した結合親和性又は減少した結合活性を有している。ある特定の実施態様では、IL-15変異体の配列は天然型IL-15の配列と比べて、少なくとも1つの(すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上の)アミノ酸変化を有している。アミノ酸変化は、IL-15R β 及び/又はIL-15R γ Cと相互作用するIL-15のドメインにおける1つ又はそれ以上のアミノ酸の置換又は欠失を包含できる。ある特定の実施態様では、アミノ酸変化は成熟ヒトIL-15配列(配列番号1)の8、61、65、72、92、101、108、又は111位における1つ又はそれ以上のアミノ酸置換又は欠失である。例えば、アミノ酸変化は、成熟ヒトIL-15配列の8位のDをN又はAへ、61位のDをAへ、65位のNをAへ、72位のNをRへ又は108位のQをAへの置換又はこれらの置換の組合わせである。ある特定の実施態様では、アミノ酸変化は、成熟ヒトIL-15配列の72位のNをDへの置換である。

【0011】

本発明のある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体中で、Fcドメイン又はその機能的断片は、IgGFcドメイン、ヒトIgG1Fcドメイン、ヒトIgG2Fcドメイン、ヒトIgG3Fcドメイン、ヒトIgG4Fcドメイン、IgAFcドメイン、IgDFcドメイン、IgEFcドメイン、及びIgMFcドメイン：又はこれらの何れかの組合わせよりなる群から選ばれるFcドメインを包含する。ある特定の実施態様では、Fcドメインは、変化した補体又はFc受容体結合特性を有するFcドメインをもたらすアミノ酸変化を包含する。変化した補体又はFc受容体結合特性を有するFcドメインを生ずるアミノ酸変化は当該技術分野で公知である。例えば、IgG1C_H2の234位及び235位(番号は抗体コンセンサス配列に基づいている)のロイシン残基(すなわち、...PELLGG...)のアラニン残基による置換(すなわち、...PEAAGG...)はFcガンマ受容体結合の損失をもたらすのに対して、IgG1C_H2の322位(番号は抗体コンセンサス配列に基づいている)のリジン残基(すなわち、...KCKSL...)のアラニン残基による置換(すなわち、...KCASL...)は補体活性の損失をもたらす。ある特定の実施態様では、このような突然変異を組合わせることができる。

【0012】

可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、第1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IL-15ポリペプチド(又はその機能的断片)と共有結合している。可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、第2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IL-15R α ポリペプチド(又はその機能的断片)と共有結合している。可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、IL-15R α ポリペプチド(又はその機能的断片)はポリペプチドリンカー配列

によってF cドメイン（又はその機能的断片）と共有結合している。それぞれのポリペプチドリンカー配列は独立して選択できる。ある特定の実施態様では、ポリペプチドリンカー配列は同一である。ある特定の実施態様では、これは異なっている。

【0013】

ある特定の実施態様では、T C Rドメインに対する抗原はM H C又はH L A分子内に存在するペプチド抗原を包含する。ある特定の実施態様では、ペプチド抗原は腫瘍関連ポリペプチド又はウィルスがコードするポリペプチドから誘導される（すなわち、少なくともこれらの部分配列を包含する）。ある特定の実施態様では、抗体ドメインに対する抗原は細胞表面受容体又はリガンドを含んでいる。

【0014】

ある特定の実施態様では、抗体ドメインに対する抗原はC D抗原、サイトカイン又はケモカインの受容体或いはリガンド、生育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 / 陰性同時刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、或いはウィルスがコードする抗原の1つ又はそれ以上である。

【0015】

可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、I L - 1 5 R α ポリペプチドは、I L - 1 5ポリペプチドと結合できるI L - 1 5受容体アルファの細胞外ドメインを包含する。可溶性ヒトI L - 1 5 R α ポリペプチドを本明細書では、h I L - 1 5 R α 、h u I L - 1 5 R α 、h I L - 1 5 R α 、h u I L - 1 5 R α などと呼ぶ。ある特定の実施態様では、I L - 1 5 R α ポリペプチドはI L - 1 5 R α s u s h i (S u)ドメイン又はI L - 1 5 R α Δ E 3ドメインの何れかを包含する。

【0016】

ある特定の実施態様では、本発明の可溶性融合タンパク質複合体は、多量体化、例えば、二量体化、三量体化又は他の多量体化（例えば、四量体化、五量体化）されている。ある特定の実施態様では、多量体はホモ多量体である。ある特定の実施態様では、多量体はヘテロ多量体である。ある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体は、共有結合、例えば、ジスルフィド結合、化学架橋剤によって結合している。ある特定の実施態様では、ジスルフィド結合が第1可溶性融合タンパク質複合体の第2ポリペプチドのF cドメインを第2可溶性融合タンパク質複合体の第2ポリペプチドのF cドメインに共有結合する。

【0017】

ある特定の実施態様では、本発明の可溶性融合タンパク質複合体は、I L - 1 5ポリペプチド、I L - 1 5変異体又はその機能的断片、及び可溶性I L - 1 5 R α ポリペプチド又はその機能的断片を包含し、ここでI L - 1 5及びI L - 1 5 R α ポリペプチドは更に免疫グロブリンF cドメイン又はその機能的断片を包含する。

【0018】

ある特定の実施態様では、本発明の可溶性融合タンパク質複合体は、検出可能な標識を含んでいる少なくとも1つの可溶性融合タンパク質を包含する。検出可能な標識は、これに限定されないが、ビオチン、ストレプトタビジン、それらの酵素的或いは触媒的に活性な断片、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、或いはケミルミネセンス分子；又はこれらの何れかの組み合わせを包含する。

【0019】

本発明は、本発明の融合タンパク質の何れかをコードする核酸配列を提供する。ある特定の実施態様では、核酸配列は更に1つ又はそれ以上の翻訳及び / 又は転写調節配列、例えば、融合タンパク質をコードする配列に操作可能に結合している：プロモーター、翻訳開始シグナル、及びリーダー配列を包含する。ある特定の実施態様では、核酸配列は複製、発現又は両方のためのベクター中にある。

【0020】

本発明は、本発明の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法を提供する。方法は：

10

20

30

40

50

a) 第1融合タンパク質をコードする適切な調節配列を有するDNAベクターを第1宿主細胞内へ導入すること、

b) 細胞中又は培地中に第1融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で第1宿主細胞を培地中で培養すること、

c) 宿主細胞又は培地から第1融合タンパク質を精製すること、

d) 第2融合タンパク質をコードする適切な調節配列を有するDNAベクターを第2宿主細胞内へ導入すること、

e) 細胞中又は培地中に第2融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で第2宿主細胞を培地中で培養すること、

f) 宿主細胞又は培地から第2融合タンパク質を精製すること、及び

g) 第1融合タンパク質の1L-15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性1L-15R α の間を結合させるのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合して可溶性融合タンパク質複合体を形成すること；

の工程を包含する。

【0021】

ある特定の実施態様では、方法は更に、発現ベクターから発現されたポリペプチドの間にジスルフィド結合を形成するのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合することを包含する。

【0022】

本発明は、本発明の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法を提供し、その方法は

a) 第1融合タンパク質をコードする適切な調節配列を有するDNAベクター及び第2融合タンパク質をコードする適切な調節配列を有するDNAベクターを宿主細胞内へ導入すること、

b) 細胞中又は培地中に融合タンパク質を発現して第1融合タンパク質の1L-15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性1L-15R α ドメインの間を結合させるのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養して可溶性融合タンパク質複合体を形成すること、

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；

の工程を包含する。

【0023】

ある特定の実施態様では、方法は更に、発現ベクターから発現されたポリペプチドの間にジスルフィド結合を形成するのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合することを包含する。

【0024】

本発明は、本発明の可溶性融合タンパク質複合体を製造する方法を提供し、その方法は

a) 第1及び第2融合タンパク質をコードする適切な調節配列を有するDNAベクターを宿主細胞内へ導入すること、

b) 細胞中又は培地中に融合タンパク質を発現して第1融合タンパク質の1L-15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性1L-15R α ドメインの間を結合させるのに十分な条件下で宿主細胞を培地中で培養して、可溶性融合タンパク質複合体を形成して、そして特許請求の範囲第46項に記載の核酸によってコードされるポリペプチドの間にジスルフィド結合を形成させること、

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；

の工程を包含している。

【0025】

ある特定の実施態様では、方法は更に、発現ベクターから発現されたポリペプチドの間にジスルフィド結合を形成するのに十分な条件下で第1及び第2融合タンパク質を混合することを包含する。

【0026】

10

20

30

40

50

本発明は標的細胞を死滅させる方法を提供し、方法は：

a) 複数の細胞を本発明の可溶性融合タンパク質複合体と接触させること（ここで複数の細胞は、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、又はFcドメインによって認識されるFc受容体鎖を有している免疫細胞、及び少なくとも1つの生物活性ポリペプチドによって認識される抗原を有している標的細胞を更に包含する）、

b) 標的細胞上の抗原と免疫細胞上のIL-15R又はFc受容体鎖との間に特定の結合複合体（架橋）を形成して、免疫細胞を十分に結合させて活性化すること、及び

c) 結合して活性化した免疫細胞によって標的細胞を死滅させること；

の工程を包含している。

10

【0027】

死滅させる方法のある特定の実施態様では、標的細胞は腫瘍細胞又はウイルスに感染した細胞である。

【0028】

死滅させる方法のある特定の実施態様では、生物活性ポリペプチドはTCRを包含する。

【0029】

死滅させる方法のある特定の実施態様では、標的細胞上の抗原はMHC又はHLA分子中に存在してTCRによって認識される腫瘍又はウイルスがコードするペプチド抗原を包含する。免疫細胞は、例えば、T細胞、LAK細胞、NK細胞、マクロファージ、単球又は顆粒球である。

20

【0030】

本発明は、病的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を提供し、方法は、

a) 疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを有している本発明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) 抗原発現病的細胞と免疫細胞を発現しているIL-15R又はFc受容体との間で、免疫細胞を局在化するのに十分な、特定結合複合体（架橋）を形成すること；及び

c) 病的細胞を損傷又は殺傷させて患者における疾患を十分に予防又は治療すること；の工程を包含している。

30

【0031】

本発明は、病的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を提供し、方法は、

a) IL-15R鎖又はFc受容体鎖を有している免疫細胞を、疾患関連抗原を認識する生物活性ポリペプチドを包含している本発明の可溶性融合タンパク質複合体と混合すること；

b) 免疫細胞と融合タンパク質複合体との混合物を患者にとうよすること；

c) 抗原発現病的細胞と免疫細胞を発現しているIL-15R又はFc受容体との間で、特定結合複合体（架橋）を形成して免疫細胞を十分に局在化させこと；及び

c) 患者における疾患を予防又は治療するのに十分に異常細胞を損傷又は殺傷すること；

40

d) 病的細胞を損傷又は殺傷させて患者における疾患を十分に予防又は治療すること；の工程を包含している。

【0032】

病的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のある特定の実施態様では、疾患は癌又はウイルス感染症である。ある特定の実施態様では、疾患関連抗原はペプチド/MHC複合体である。

【0033】

本発明は、本発明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によって哺乳動物における免疫応答を刺激する方法を提供する。

50

【0034】

本発明は、本発明の何れか1つ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によって哺乳動物における免疫応答を抑制する方法を提供する。

【0035】

本発明は、細胞又は組織上に存在している抗原を有している細胞又は組織を検出する方法を提供し、方法は：

a) 細胞又は組織を、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で特定結合複合体を形成する条件下で、検出可能な標識を包含している本発明の可溶性融合タンパク質複合体の少なくとも1つと接触させること；

b) 抗原と結合しなかった可溶性融合タンパク質複合体の何れをも除去するのに適している条件下で細胞又は組織を洗浄すること；及び

c) 抗原を含有している細胞又は組織の指標として特定結合複合体を検出すること；の工程を包含している。

【0036】

検出方法のある特定の実施態様では、生物活性ポリペプチドはTCRを含み、抗原はTCRによって認識されるMHC又はHLA分子中に存在するペプチドを含有する。本明細書で提供される検出方法は高感度である。例えば、この方法では、存在する抗原のコピー数は細胞当たり1000又はそれ以下のコピーである。本明細書で提供される検出方法はインビボ、インビトロ、又はエクスピボで実施できる。

【0037】

本発明は、第1可溶性融合タンパク質複合体と第2可溶性融合タンパク質複合体の二量体を形成することによって、本発明の可溶性融合タンパク質複合体の分子あたりの結合活性を増大する方法を提供し、ここでそれぞれの融合タンパク質複合体の第1生物活性ポリペプチドと第2生物活性ペプチドの結合部位は同一又は異なっている。例えば、分子あたりの結合活性は、10%又はそれ以上、20%又はそれ以上、30%又はそれ以上、40%又はそれ以上、50%又はそれ以上、60%又はそれ以上、或いは70%又はそれ以上である。

【0038】

本発明は、第1可溶性融合タンパク質複合体と第2可溶性融合タンパク質複合体の二量体を形成することによって、本発明の可溶性融合タンパク質複合体の分子あたりのIL-15活性を増大する方法も提供する。

【0039】

一態様では、本発明は、インターロイキン-15(IL-15)：インターロイキン-15受容体アルファ(IL-15R α)融合タンパク質複合体を製造する方法を提供し、方法は、IL-15(又はIL-15変異体)をコードする第1DNAベクター及びIL-15R α 融合タンパク質をコードする第2DNAベクターを宿主細胞(例えば哺乳動物の細胞)内へ導入すること；IL-15(又はIL-15変異体)及びIL-15R α 融合タンパク質を発現す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IL-15：IL-15 α 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること；を含んでいる。

【0040】

別の態様では、本発明は、IL-15R α /Fc融合タンパク質を含んでいるIL-15：IL-15R α 複合体を製造する方法を提供し、方法は、IL-15(又はIL-15変異体)をコードする第1DNAベクター及びIL-15R α /Fc融合タンパク質をコードする第2DNAベクターを宿主細胞内へ導入すること；IL-15(又はIL-15変異体)及びIL-15R α /Fc融合タンパク質を発現す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IL-15：IL-15R α 複合体を宿主細胞又は培地から精製すること；を含んでいる。

【0041】

別の態様では、本発明は、IL-15R α /Fc融合タンパク質を含んでいるIL-1

10

20

30

40

50

5 : I L - 1 5 R α 融合タンパク質複合体を製造する方法を提供し、方法は、宿主細胞中で I L - 1 5 (又は I L - 1 5 変異体) 及び I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質を同時発現すること ; I L - 1 5 (又は I L - 1 5 変異体) 及び I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質を発現す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 ; 及び I L - 1 5 : I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること : を含んでいる。

【 0 0 4 2 】

別の態様では、本発明は、宿主細胞中で I L - 1 5 N 7 2 D 及び I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質を同時発現すること ; I L - 1 5 N 7 2 D 及び I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質を発現す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 ; 及び I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでいる、I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質複合体を製造する方法を提供する。ここで I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体の I L - 1 5 結合部位は両方とも完全に塞がっている。

10

【 0 0 4 3 】

別の態様では、本発明は、I L - 1 5 又は I L - 1 5 変異体をコードする第 1 ポリヌクレオチド及び I L - 1 5 受容体融合タンパク質をコードする第 2 ポリヌクレオチドを含有している細胞を提供する。一実施態様では、細胞は I L - 1 5 N 7 2 D をコードする第 1 発現ベクター及び I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質をコードする第 2 発現ベクターを含んでいる。

20

【 0 0 4 4 】

別の態様では、本発明は、二量体 I L - 1 5 R α S u / F c 及び 2 つの I L - 1 5 N 7 2 D 分子を含有している単離された完全に塞がっている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体を提供する。一実施態様では、複合体は 9 0 ~ 9 5 % 又はそれ以上精製されて完全に塞がれていて ; 5 . 6 ~ 6 . 5 の等電点を有し ; 約 1 1 4 k D a の分子量を有し ; そして / 或いは I L - 1 5 N 7 2 D 及び I L - 1 5 R α S u / F c ポリペプチドの何れか又は両方上でグリコシル化される。

【 0 0 4 5 】

別の態様では、本発明は、本明細書中で詳しく説明されている発現及び精製方法の何れかによって産生される、単離されて完全に塞がっている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体を提供する。

30

【 0 0 4 6 】

別の態様では、本発明は、対象における免疫応答を調節する (例えば、増大又は減少する) 方法を提供し、方法は完全に塞がっている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体を対象に投与することを含んでいる。

【 0 0 4 7 】

別の態様では、本発明は、腫瘍を有している対象において免疫応答を増強する方法を提供し、方法は完全に塞がっている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体を対象に投与することを含んでいる。

【 0 0 4 8 】

上記態様又は本明細書で詳細に説明されている本発明の他の態様の多様な実施態様では、I L - 1 5 R α 融合タンパク質は、生物活性ポリペプチド (例えば、I g G の重鎖定常ドメイン、I g G の重鎖定常ドメインの F c ドメイン) と共有結合している可溶性 I L - 1 5 R α を含んでいる。上記態様の本発明の別の実施態様では、I L - 1 5 は、第 2 生物活性ポリペプチドと共有結合している I L - 1 5 を含んでいる。別の実施態様では、細胞又は培地から I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体を精製することは、I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 融合タンパク質複合体と特異的に結合する親和性試薬上に I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体を捕獲することを含んでいる。別の実施態様では、I L - 1 5 R α 融合タンパク質は、I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質を含んでいて、親和性試薬は F c ドメインと特異的に結合する。別の実施態様では、親和性試薬はプロテイン A 又はプロテイン G

40

50

である。別の実施態様では、親和性試薬は抗体である。別の実施態様では、宿主細胞又は培地から I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体を精製することはイオン交換クロマトグラフィーを含んでいる。別の実施態様では、宿主細胞又は培地から I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体を精製することはサイズ排除クロマトグラフィーを含んでいる。別の実施態様では、I L - 1 5 R α は I L - 1 5 R α S u s h i (I L - 1 5 R α S u) を含んでいる。別の実施態様では、I L - 1 5 は、突然変異 I L - 1 5 (例えば、I L - 1 5 N 7 2 D) である。別の実施態様では、I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体の I L - 1 5 結合部位は完全に塞がっている。別の実施態様では、I L - 1 5 : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体の両方の I L - 1 5 結合部位は完全に塞がっている。別の実施態様では、I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体は複合体電荷又はサイズ特性に基づいて精製される。別の実施態様では、完全に塞がっている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質複合体は複合体電荷特性に基づいて陰イオン交換クロマトグラフィーで精製される。別の実施態様では、完全に塞がっている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質複合体は、低いイオン強度の中性 pH 緩衝剤を用いる結合条件及びイオン強度を増大させる緩衝剤を用いる溶出条件と共に 4 級アミンベースの樹脂を用いて精製される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

本発明は、本発明の 1 つ又はそれ以上の可溶性融合タンパク質複合体、本発明の可溶性融合タンパク質複合体を製造するための 1 つ又はそれ以上の特定試薬 (例えば、本発明の 1 つ又はそれ以上の可溶性融合タンパク質複合体をコードするヌクレオチド)、及び / 又は本発明の 1 つ又はそれ以上の可溶性融合タンパク質複合体を用いるための特定物質を包含しているキットも提供する。キット中の物質は、一般的に使用説明書と共に、適切な容器中で提供される。

その他の実施態様は以下の開示から明確になるだろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 0 】

【 図 1 】 図 1 は、多重鎖ポリペプチドからなる T 2 分子 (T 2 M) として示される融合タンパク質を示す。

【 図 2 】 図 2 は、正確なヒト I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子挿入を含有しているベクター (p M C . c 2 6 4 s c T C R - S u / I g G 1 . P U R) を示す。

【 図 3 】 図 3 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 核酸配列の配列を示す。

【 図 4 】 図 4 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 ペプチドのタンパク質配列を示す。

【 図 5 】 図 5 は、c 2 6 4 s c T C R / S u s h i / h I g G 1 - p M S G V c 又は p M S G V c 2 6 4 S u I g と表わされるベクターを示す。

【 図 6 】 図 6 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 核酸配列の配列を示す。

【 図 7 】 図 7 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 ペプチドのタンパク質配列を示す。

【 図 8 】 図 8 は、c 1 4 9 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D - p M S G V n 又は p M S G V - c 1 4 9 I L 1 5 N 7 2 D と表わされるベクターを示す。

【 図 9 】 図 9 は、c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 核酸配列の配列を示す。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D ペプチドのタンパク質配列を示す。

【 図 1 1 】 図 1 1 は、T 2、c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 Δ C H 1 融合タンパク質の精製画分の還元及び非還元条件下での S D S - P A G E 分析を示す。還元条件下で、T 2 分子バンドは c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / H u I g G 1 ポリペプチドと一致する分子量に移動する。非還元変性条件下で、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R

α S u s h i / h u I g G 1 バンドは、二量体ジスルフィド結合した c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 複合体及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D ポリペプチドと一致する分子量に移動する。

【図 1 2】図 1 2 は、天然の T 2 タンパク質が、四重鎖 (2 × c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D 、 2 × c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1) 分子の予測された分子量で溶出されたことを明らかにしているサイズ排除ゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる精製した T 2 タンパク質、又は精製した c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 融合タンパク質の等モル量を抗ヒト I g G 1 抗体でコーティングしたウェル上に捕獲した、インビトロ結合アッセイの結果を示す。結合に続いて、標準的な E L I S A 条件下で抗ヒト I g G 1 抗体を用いてタンパク質を検出した。

10

【図 1 4】図 1 4 は、T 2 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 タンパク質の等モル量を抗ヒト I g G 1 A b でコーティングしたウェル上に捕獲して抗ヒト T C R C β 抗体 (W 4 F) で検出した、インビトロ結合アッセイの結果を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、T 2 分子の T C R ドメインのペプチド / M H C 結合活性を評価したインビトロ結合アッセイの結果を示す。T 2 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる) 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 タンパク質の等モル量を抗ヒト I g G 1 A b でコーティングしたウェル上に捕獲して、p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 ストレプタビジン - H R P 四量体で検出した。

20

【図 1 6】図 1 6 は、T 2 分子の I L - 1 5 ドメインの活性を明らかにしているインビトロアッセイの結果を示す。マイクロタイターウェルを抗ヒト I L - 1 5 抗体でコーティングして、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる精製した T 2 タンパク質、又は精製した c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質の等モル量をウェルに適用した。結合及び洗浄工程に続いて、結合したタンパク質を標準的な E L I S A 条件下で抗ヒト I L - 1 5 抗体で検出した。

【図 1 7】図 1 7 は、サイトカイン依存性の 3 2 D β 細胞株を用いて T 2 分子の I L - 1 5 ドメインの機能活性を更に特徴付けるための増殖アッセイの結果を示す。細胞増殖を測定するために、3 2 D β 細胞 (2 × 1 0 ⁴ 細胞 / ウェル) を増大する濃度の T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる) 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質と 3 7 ° C で 4 8 時間培養した。細胞増殖試薬 W S T - 1 (Roche (登録商標) Applied Science) を製造会社の手順に従って細胞生育の最終 4 時間の間に添加した。代謝的に活性な細胞による W S T - 1 の着色されたフォルマザン色素への変換を 4 4 0 n m における吸光度測定により確認した。

30

【図 1 8】図 1 8 A ~ B は、I L - 1 5 応答免疫細胞の増殖を促進する T 2 タンパク質の能力を確認するインビボ霊長類モデル実験の結果を示す。T 2 タンパク質を注射した後 5 日目に血液を採取して C D 8 メモリー T 細胞マーカー (C D 8 及び C D 9 5) (A) 及び N K 細胞マーカー (C D 5 6 及び C D 1 6) (B) について染色を行い、そして処置前に採取した血液と比較した。

40

【図 1 9】図 1 9 A ~ B は、T 2 分子の I g G 1 F c ドメインの結合活性を特徴付ける細胞結合アッセイを示す。A . U 9 3 7 細胞を有している F c ガンマ受容体を 3 3 n M の T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる) 、 c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 又は A 2 A L 9 s c T C R / I g G 1 (陰性コントロール) と 2 0 分間培養したアッセイの結果を示しているフローサイトメトリー分析である。細胞を 1 回洗浄して、P E と共役した p 5 3 (a a 2 6 4 ~ 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 四量体と 2 0 分培

50

養した。U937細胞表面上でのFcγ受容体との結合をフローサイトメトリーで分析した。B.示されているタンパク質の一連の濃度を用いる同様のU937結合試験を実施して染色細胞に対する平均蛍光強度をプロットした結果を示すフローサイトメトリー分析。

【図20】図20は、T2分子のFcドメインの抗体依存性細胞傷害活性を介在する生物活性を評価するアッセイの結果を示す。T2タンパク質、c264scTCR/huIgG1又はA2AL9scTCR/IgG1(陰性コントロール)を0.137nM~100nMの濃度で96ウェルに添加した。HLA-A2陽性T2標的細胞を10μMのp53aa264~272ペプチドでパルスして50μg/mlのカルセイン-AMで標識した。融合タンパク質をウェル当り 1×10^4 個の標的細胞と混合して 1×10^6 個/ウェルの新鮮なヒトPBMCを添加した。プレートをCO₂インキュベータ中で2時間37で培養し、100μlの条件培地を採取して、溶解細胞から放出したカルセインを定量的に分析した。

【図21】図21A及びBは、HLA-A2陽性T2細胞を各種濃度のp53aa264~272ペプチドでパルスして、T2タンパク質の細胞表面のペプチド/MHC標的との結合活性を評価するアッセイの結果を示す。ペプチド負荷細胞をそれぞれ83mMのT2タンパク質(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1鎖からなる)、c264scTCR/huIgG1又はA2AL9scTCR/IgG1(陰性コントロール)と培養した。細胞をビオチニル化した抗TCR Ab(BF1)及びストレプタビジン-PEと培養した。次いで、細胞をフローサイトメトリーで抗体染色について分析して(A)、異なった濃度のペプチドを負荷した細胞の平均蛍光染色強度をプロットした(B)。

【図22】図22は、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1又はc264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1のT2分子(細胞培養上澄液中)を、抗ヒトTCR抗体BF1でコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲して、結合したT2分子を抗ヒトTCR抗体W4F-BNを用いて検出したELISAの結果を示す。

【図23】図23は、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1又はc264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1のT2分子(細胞培養上澄液中)を、ヤギ抗ヒトIgG抗体でコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲して、結合したT2分子を抗ヒトIL-15抗体を用いて検出したELISAの結果を示す。

【図24】図24は、c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1のT2分子(細胞培養上澄液中)をヤギ抗ヒトIgG抗体又は抗ヒトTCR抗体BF1の何れかでコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲したELISAの結果を示す。BF1が捕獲したT2分子を抗ヒトTCR抗体W4F-BN又は抗ヒトIL-15抗体の何れかで検出した。ヤギ抗ヒトIgG Abが捕獲したT2分子をp53(aa149~157)ペプチド/HLA-A2ストレプタビジン-HRP四量体又はp53(aa264~272)ペプチド/HLA-A2ストレプタビジン-HRP四量体の何れかで検出した。

【図25】図25は、2つの異なったドメイン、すなわち、c264scTCR/huIL15N72D及びc149scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1鎖を含むT2分子を特徴付けたフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。これらの分子のFc及びTCR活性をU937細胞を有しているFcγ受容体との結合及びp53(aa264~272)ペプチド/HLA-A2四量体による検出に続くフローサイトメトリーによって評価した。

【図26】図26A及びBは、マウス(A)又はサル(B)にc264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1

10

20

30

40

50

鎖からなる精製した T2 タンパク質を注射した薬物動態アッセイの結果を示す。サンプルは表示される時点で採取した。A. 表示されるようにヤギ抗ヒト IgG Ab をウェルをコーティングするために用いて、抗ヒト TCR Ab (W4F-BN) を検出のために用いた；又はヤギ抗ヒト IgG Ab をプレートにコーティングするために用いて、抗ヒト IL-15 Ab を検出のために用いて、表示される時点で血液中の T2 タンパク質の量を定量した ELISA 形式アッセイ。B. 抗ヒト TCR Ab (β F-1) を用いてウェルをコーティングして、HRP 共役ヤギ抗ヒト IgG Ab を用いて検出する；又は抗ヒト IL-15 Ab を用いてプレートをコーティングして、HRP 共役ヤギ抗ヒト IgG Ab を用いて検出するか又は抗ヒト IL-15 Ab を用いてプレートをコーティングして、抗ヒト TCR Ab (W4F-BN) を用いて検出した。

10

【図 27】図 27 は、ヌードマウスにおけるヒト p53 + HLA-A2 + A375 メラノーマ細胞株を用いる原発腫瘍生育モデルの結果を示す。腫瘍担持マウスに c264scTCR/huIL15N72D 及び c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1 鎖からなる T2 タンパク質を 32 μ g/用量 (1.6 mg/kg)、c264scTCR/huIL2 を 32 μ g/用量 (1.6 mg/kg)、又は 264scTCR/huIgG1 を 60 μ g/用量 (3 mg/kg) 静脈内投与した。腫瘍の生育を測定してデータを図に示した。

【図 28】図 28 は、IL-15 ドメインに各種の点突然変異を有する T2 分子の IL-15 活性アッセイの結果を、32D β 細胞の増殖により測定して示す。

【図 29】図 29 は、IL-15 及び IgGFc ドメインに各種の点突然変異を有する T2 分子を用いる抗体依存性細胞傷害活性アッセイの結果を、ペプチド負荷 T2 標的細胞の PBMC 依存性溶解により測定して示す。

20

【図 30】図 30 は、ヒト NK 及び T 細胞応答を刺激する T2 分子の能力に対する IL-15 及び Fc 突然変異の効果を検出するアッセイの結果を示す。1.8 ~ 5 $\times 10^5$ 細胞/ml のヒト PBMC を、表示される突然変異を含む 1 nM の T2 分子を含有しているか、又はコントロールとして 10 ng/ml の組み替えヒト IL-2 又は IL-15 を有する培地中で 4 日間 37 ° で培養した。次いで、50 μ g/ml のカルセイン-AM で標識化した後、NK 感受性 K-562 細胞を標的細胞として用いて、NK 細胞細胞傷害性を評価した。

【図 31】図 31 は、NK 細胞増殖アッセイの結果を示し、ここでは PBMC を、IL-15 及び IgGFc ドメインに各種の点突然変異を含有する T2 分子と、又はコントロールとして組み替えヒト IL-2 又は IL-15 と培養した。c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1 及び c264scTCR/huIL15N72D 鎖を含む T2 分子又は Fc ドメイン LALA 及び KA 突然変異体を有するものが CD56 + NK 細胞の増殖において増大をもたらしたのに対して、IL-15N65D 又は D8N 置換を含有する T2 分子はそれほど多くの NK 細胞増殖活性をもたらさなかった。

30

【図 32】図 32 A 及び B は、IL-15 及び Fc 突然変異を包含している T2 分子の、p53 ペプチドを負荷した (T2.265) 及び負荷していない (T2) T2 細胞に対する抗原特異的結合を試験するフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。A はフローサイトメトリーのヒストグラムを示し、B はペプチド特異的対非特異的細胞染色のシグナル対ノイズ比を示す。

40

【図 33】図 33 A ~ C は、A. 32D β 細胞生育をサポートする、B. 各種 T 細胞集団の拡張を刺激する、そして C. NK 細胞活性を刺激する各種 T2 分子及び IL-15 分子の活性を検出するアッセイの結果を示す。

【図 34】図 34 は、表示される各種 T2 分子のマウスにおける免疫刺激活性を、フローサイトメトリーを用いて検出する血液及び脾臓細胞中の CD8 + T 細胞及び NK 細胞のパーセント変化によって確認したインビボアッセイの結果を示す。

【図 35】図 35 A 及び B は、1) オボアルブミンのアミノ酸 257 ~ 264 由来のペプチドに特異的な scTCR と融合している huIL15N72D ドメイン、及び 2) huIL15R α Sushi/huIgG1 融合体と結合している一本鎖 CD8 α / β ドメイ

50

ンを含有している多重特異的 T2 分子を用いる E L I S A の結果を示す。O T 1 - C D 8 - T 2 M の結合活性を O T 1 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合体のそれと E L I S A によって比較した。各タンパク質の等モル量を抗 T C R C β m A b (H 5 7) でコーティングしたウェル上に捕獲して、O V A a a 2 5 7 - 2 6 4 / H - 2 K b 四量体又は I L 1 5、C D 8 α 、C D 8 β 若しくは T C R V α 2 に対する m A b でプローブした。抗ヒト I g でコーティングしたウェルを用いて抗 T C R V α 2 でプローブするアッセイも実施した。

【図 3 6】図 3 6 A は、c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 : c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A 複合体 (c 2 6 4 s c T C R 二量体) の概略図を示す。二量体 h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S u ドメインのモデルは、ヒト I L - 1 5 : I L - 1 5 R α S u 複合体の公表されている結晶構造に基づいている (3 3) (P D B 2 Z 3 Q)。B は、c 2 6 4 s c T C R 融合タンパク質の S E C 分析を示す。図は、c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 (上)、c 2 4 6 s c T C R / h I L - 5 R α S u / b i r A (中) 及び c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 : c 2 4 6 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A 複合体 (c 2 6 4 s c T C R 二量体) (下) のサイズ分析を示し、点線は比タンパク質ピークを示している。

【図 3 7】図 3 7 は、c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 : c 2 4 6 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A 複合体を含む c 2 6 4 s c T C R 二量体、及び c 1 4 9 s c T C R / h I L - 1 5 : c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A 複合体を含む c 2 6 4 s c T C R / c 1 4 9 s c T C R ヘテロ二量体の結合活性の特性を示す。A . T 2 細胞を 0 ~ 6 2 . 5 n M の p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチドでパルスした。細胞を等量 (8 0 n M) の c 2 6 4 s c T C R 二量体又は c 2 6 4 s c T C R / b i r A の P E 共役多量体で染色した。B . c 2 6 4 s c T C R 二量体を c 2 6 4 s c T C R / b i r A 試薬と比べた細胞染色の相対的増大を異なったペプチド濃度で確認した。増大 (倍) = (c 2 6 4 s c T C R 二量体で染色された T 2 細胞の幾何学的平均) / (c 2 6 4 s c T C R / b i r A で染色された T 2 細胞の幾何学的平均)。C . c 2 6 4 s c T C R / c 1 4 9 s c T C R ヘテロ二量体の p 5 3 ペプチド / H L A - A * 0 2 0 1 結合活性を E L I S A で確認した。抗 h I L - 1 5 モノクローナル抗体 (R & D System) を捕獲抗体として用いた。A 2 / p 5 3 . 2 6 4 - 2 7 2 . H R P 又は A 2 / 5 3 . 1 4 9 - 1 5 7 . H R P 四量体をプローブとして用いた。データは 3 回繰返し測定 of 平均 $\pm$ S D を表わす。

【図 3 8】図 3 8 は、O T 1 s c T C R / h I L - 1 5 : O T 1 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A 複合体からなる O T 1 s c T C R 二量体の結合活性の特性を示す。E L 4 細胞に O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) ペプチドを負荷して、2 0 0 n M の O T 1 s c / b i r A - S A - P E (上) 及び O T 1 s c T C R 二量体 - S A - P E (下) で染色した。

【図 3 9】図 3 9 は、O T 1 s c T C R / h I L - 1 5 : s c C D 8 / h I L - 1 5 R α S u / b i r A 複合体を含む O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体が増強した p M H C I 結合活性を示すことを表わす。A . O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体のネズミ C D 8 発現を E L I S A で確認した。抗 m T C R H 5 7 - 5 9 7 m A b を捕獲抗体として用いた。ビオチニル化抗ネズミ C D 8 α 又は C D 8 β m A b をプローブとして用いた後、S A - H R P を行った。データは 3 回繰返し測定 of 平均 $\pm$ S D を表わす。B . E L 4 細胞に表示される濃度の O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) ペプチドを負荷して、2 0 0 n M の O T 1 s c T C R 二量体 - S A - P E (上) 及び O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体 - S A - P E (下) で染色した。

【図 4 0】図 4 0 は、T C R α / h I L - 1 5 : T C R β / h I L - 1 5 R α S u / b i r A 複合体を含む T C R α / β ヘテロ二量体を包含する融合タンパク質は p M H C I 結合活性を保持することを示す。A . O T 1 s c T C R / b i r A と O T 1 T C R α / β のヘテロ二量体の O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) / H - 2 K b 複合体への結合活性を E L I S A で確認した。抗 m T C R H 5 7 - 5 9 m A b を捕獲抗体として用いた。K b / O

10

20

30

40

50

V A . 2 5 7 - 2 6 4 四量体をプローブとして用いた。 B . 2 6 4 s c T C R / b i r A 及び 2 6 4 T C R α / β ヘテロ二量体の p 5 3 (a a 2 6 - 2 7 2) / H L A - A * 2 0 1 複合体への結合活性を E L I S A によって確認した。抗 T C R m A b を捕獲抗体として用いた。 A 2 / p 5 3 . 2 6 4 - 2 7 2 . H R P 四量体をプローブとして用いた。データは 3 回繰返し測定の前平均 $\pm$ S D を表わす。

【図 4 1】図 4 1 は、融合タンパク質の I L - 1 5 結合及び機能活性を示す。 A . 3 2 D β 細胞を I L - 1 5 野生型又は I L - 1 5 N 7 2 D 若しくは I L - 1 5 D 8 N 突然変異タンパク質ドメインを含む 3 2 0 n M の c 2 6 4 s c T C R 二量体と培養した。融合タンパク質の結合を順に抗ヒト T C R C β A b で検出した。 B . I L - 1 5 の野生型又は突然変異タンパク質ドメインを含む c 2 6 4 s c T C R 二量体の 3 2 D β 細胞の増殖をサポートする能力を実施例に記載されるように確認した。データは 2 回繰返し測定の前平均 $\pm$ S D を表わす。

10

【図 4 2】図 4 2 は、O T 1 s c T C R / h I L - 1 5 D 8 N、O T 1 s c T C R / h T L - 1 5 R α S u / b i r A 及び O T 1 s c T C R 二量体の O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) / H - 2 K ^b 結合活性を E L I S A で確認したことを示す。抗 m - T C R H 5 7 - 5 9 7 m A b を捕獲抗体として用いた。 K b / O V A . 2 5 7 - 2 6 4 . H R P 四量体をプローブとして用いた。データは 3 回繰返し測定の前平均 $\pm$ S D を表わす。

【図 4 3】図 4 3 は、S P R で確認した O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) / H - 2 K ^b 及びコントロールである V S V / H - 2 K ^b 複合体に対する O T 1 s c T C R 融合タンパク質の結合曲線を示す。

20

【図 4 4】図 4 4 A 及び B は、免疫正常マウスにおけるネズミ B 1 6 腫瘍細胞株を用いる原発腫瘍生育モデルの結果を示す。腫瘍担持マウスに r h I L - 1 5、T 2 M、T 2 M Δ C H 1 及び T 2 M Δ T C R Δ C H 1 タンパク質、又は P B S (コントロール) を静脈内注射した。腫瘍の生育を測定してデータを A 示す。動物における体重の処置後変化を B に示す。

【図 4 5】図 4 5 A 及び B は、免疫正常マウスにおけるネズミ E G 7 腫瘍細胞株を用いる原発腫瘍生育モデルの結果を示す。腫瘍担持マウスに r h I L - 1 5、T 2 M、及び T 2 M Δ T C R Δ C H 1 タンパク質、又は P B S (コントロール) を静脈内注射した。腫瘍の生育を測定してデータを A 示す。動物における体重の処置後変化を B に示す。

【図 4 6】図 4 6 は、共有結合で及び / 又は遺伝子的に他のタンパク質ドメインと融合して融合タンパク質複合体を生成したヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメイン又は F c ドメインのタンパク質配列を示す。

30

【図 4 7】図 4 7 は、細胞発現ペプチド M H C 標的に対する、T 2 M 及び s c T C R - h u I g G 1 タンパク質が介在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。各種の量の融合タンパク質 (T 2 M、T 2 M 2 又は c 2 6 4 s c T C R - I g) を新鮮なヒト P B M C 及び p 5 3 ペプチドでパルスした H L A - A 2 陽性 T 2 細胞 (カルセイン標識化) (E : T 比、4 0 : 1) と混合した。2 時間培養した後、培養培地を採取して溶解細胞からのカルセイン放出を定量的に分析した。

【図 4 8】図 4 8 は、マウスにおける各種 T 2 分子の免疫刺激活性を確認するインビボアッセイの結果を示す。C 5 7 B L / 6 マウスを h I L - 1 5 (1 m g / k g)、I L 1 5 N 7 2 D : I L 1 5 R α - F c (3 . 6 m g / k g)、T 2 M (1 1 m g / k g)、T 2 M 2 (1 0 m g / k g) の等モル I L - 1 5 用量、又は等容量の P B S で試験第 1 日目に i . v . 処置した。試験 4 日目にマウスを屠殺して血液の W B C 数及び脾臓重量を図 A に示すように確認した。末梢血単核細胞 (P B M C) C D 8 ⁺ 及び N K p 4 6 ⁺ 細胞のパーセント変化を図 B に示すようにフローサイトメトリーで評価した。P B M C も図 C に示すように、カルセイン放出アッセイにおける N K 感受性 Y a c - 1 標的細胞の溶解に基づく N K 細胞活性を評価するために用いた。

40

【図 4 9】図 4 9 は、マウスにおける免疫活性に対する各種 T 2 分子の用量及び経時変化を確認するインビボアッセイの結果を示す。 A . C 5 7 B L / 6 マウスを h I L - 1 5 (1 m g / k g)、I L 1 5 N 7 2 D : I L 1 5 R α - F c (4 m g / k g)、T 2 M 2

50

(各種濃度)の等モルIL-15用量又はPBSの等容量で試験1日目にi.v.処置した。試験4日目に、PBMC CD8⁺及びNKp46⁺細胞のパーセントをフローサイトメトリーで評価した。B.ヌードマウスをIL15N27D/IL15R α -Fc(0.2mg/kg)又はT2M2(2mg/kg)で試験第1日目にi.v.処置した。処置後4日及び7日目に、PBMC NKp46⁺細胞のパーセントをフローサイトメトリーで評価した。

【図50】図50は、ヌードマウスにおけるヒトp53+HLA-A2+A375メラノーマ細胞を用いる原発性腫瘍生育モデルの結果を示す。A.A375ヒトメラノーマ腫瘍細胞(1×10⁶)をヌードマウス(5~6匹/群)にs.c.注射した。腫瘍を確立させて、マウスを等モル用量のIL-15(0.35mg/kg)、scTCR-IL15融合体(1.6mg/kg)、scTCR-IL15/scTCR-IL15/scTCR-IL15R α 複合体(3.2mg/kg)、又はPBSでi.v.処置した。11日目に開始して週に3回3週間マウスを処置した。B.A375腫瘍担持ヌードマウスをAのように4mg/kgのT2Mでもi.v.処置した。C.A375腫瘍担持ヌードマウスを等モル用量のIL-15(0.2mg/kg)、T2M2(2mg/kg)又はPBSでi.v.処置した。腫瘍を1日おきに測定して、腫瘍容量(平均値±SEM)をプロットした。

【図51】図51は、c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1CH2-CH3(Fc)構築物(T2M Δ TCR Δ CH1及びT2M2とも呼ばれている)の核酸配列を示す。

【図52】図52は、成熟c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1CH2-CH3(Fc)融合タンパク質(T2M Δ TCR Δ CH1及びT2M2とも呼ばれている)のタンパク質配列を示す。

【図53】図53は、抗CD20scAb/huIL-15N72D構築物の核酸配列を示す。

【図54】図54は、成熟抗CD20scAb/huIL-15N72D融合タンパク質のタンパク質配列を示す。

【図55】図55は、抗CD20scAb/huIL-15R α Su/huIgG1Fc構築物の核酸配列を示す。

【図56】図56は、成熟抗CD20scAb/huIL-15R α Su/huIgG1Fc融合タンパク質のタンパク質配列を示す。

【図57】図57は、抗CD20scAb T2M分子のダウディ細胞(Daudi cells)に対するCD20抗原特異的結合を試験するフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。

【図58】図58は、CD20⁺ヒト腫瘍細胞に対する抗CD20scAb T2Mが介在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。各種濃度の融合タンパク質(抗CD20scAb T2M、c264sc T2M(陰性コントロール))又はキメラ抗CD20mAb(陽性コントロール)を新鮮なヒトPBMC(異なる2人のドナー由来)及びダンディ細胞(カルセイン標識化)(E:T比、100:1)と混合した。培養期間後に、培養培地を採取して溶解細胞から放出したカルセインを定量的に分析した。

【図59】図59は、CD20⁺ヒト腫瘍細胞に対する抗CD20scAb T2Mが介在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。融合タンパク質(抗CD20scAb T2M、c264scTCR T2M(陰性コントロール))又はキメラ抗CD20mAb(陽性コントロール)を各種の比率の新鮮なヒトPBMC(異なる2人のドナー由来及びダンディ細胞(カルセイン標識化))と混合した。培養期間後に、培養培地を採取して溶解細胞から放出したカルセインを定量的に分析した。

【図60】図60は、抗CD20軽鎖Vドメイン/ヒトカッパ定常ドメイン/huIL-15N72D構築物の核酸配列を示す。

【図61】図61は、成熟抗CD20軽鎖Vドメイン/ヒトカッパ定常ドメイン/huIL-15N72D融合タンパク質のタンパク質配列を示す。

【図62】図62は、抗CD20重鎖Vドメイン/ヒトIgG1CH1ドメイン/hu

10

20

30

40

50

IL - 15 R α S u / h u I g G 1 F c 構築物の核酸配列を示す。

【図 6 3】図 6 3 は、成熟抗 CD 20 重鎖 V ドメイン / ヒト I g G 1 C H 1 ドメイン / h u I L - 15 R α S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質のタンパク質配列を示す。

【図 6 4】図 6 4 は、二量体 IL - 15 R α S u / F c 融合タンパク質と非共有結合する (して) IL - 15 N 7 2 D を基礎とする IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 複合体の概略図である。

【図 6 5】図 6 5 (A ~ D) は、IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 調製物のゲル電気泳動分析プロファイルの写真である。 (A) I E F p H 3 ~ 10 ゲル分析。レーン 1、I E F マーカー。レーン 2、r プロテイン A カラムで精製した IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 複合体。レーン 3、IL - 15 R α S u / F c。レーン 4、IL - 15 w t。 (B) I E F p H 3 ~ 10 ゲル分析。レーン 1、I E F マーカー。レーン 2、Q 工程 1 溶出で精製した IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 複合体。レーン 3、Q 工程 2 溶出による Q 1 c。レーン 4、Q 工程 2 溶出による Q 2 c。 (C) S D S - P A G R (還元) 分析。レーン 1、M W マーカー。レーン 2、r プロテイン A カラムで精製した IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 複合体。レーン 3、Q 工程 2 溶出による IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c (Q 2 c)。レーン 4、IL - 15 R α S u / F c (Q 流出から)。 (D) タンパク質の脱グリコシル化を示す S D S - P A G E (還元) 分析。レーン 1、M W マーカー。レーン 2 及び 3 はそれぞれ N - グリコシダーゼ F で消化した及び消化していない IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c タンパク質を示す。レーン 4、IL - 15 w t。

【図 6 6】図 6 6 は、スーパーデックス 200 H R 10 / 30 ゲルろ過カラムを用いる S E C クロマトグラムのグラフである。精製された IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 複合体が単一ピークとして溶出された。

【図 6 7】図 6 7 は、C D - 1 マウスへ静脈内注射した後の IL - 15 w t 及び IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 複合体の薬物動態プロファイルの比較を示すグラフである。抗 IL - 15 A b E L I S A は IL - 15 w t の濃度を測定する (■)。抗 IL - 15 A b E L I S A は無傷 IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 分子の濃度を測定する (□) のに対して、抗ヒト I g G F c A b E L I S A は IL - 15 R α S u / F c 融合タンパク質の血清濃度を測定する (▼)。観察された濃度をシンボルで表わし、モデル近似曲線をラインで表わしている。

【図 6 8】図 6 8 は、インビトロで構築した IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c (IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c I V A) の生物活性の IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c との比較を示しているグラフである。32 D β 細胞をインビトロで構築した IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c (■) 又は IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c (□) と 72 時間培養した後、W S T - 1 を 4 時間添加した。440 n m で読み取った吸光度によって細胞増殖を定量してホルマゾンレベルを評価した。示されているデータ点は 3 回繰返しサンプルの平均 (± 標準偏差) であり、線は E C₅₀ を決定するのに適している S 字型用量応答曲線を表わしている。結果は少なくとも 3 回の実験を代表している。

【図 6 9】図 6 9 は、IL - 15 w t と IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 複合体の脾臓重量及び白血球レベルに対する効果を示す一組のグラフである。C 57 B L / 6 マウス (1 群当り 5 匹マウス) に 1 m g / k g の IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 融合複合体、0.28 m g / k g (等モル用量) の IL - 15 w t、又は陰性コントロールとして P B S の単回用量を静脈内に注射した。脾臓重量 (左図) 及び血中の白血球数 (右図) を注射後 4 日目に確認した。バーは平均値 ± 標準誤差 (n = 5) を表わす。* P B S 及び IL - 15 w t と比較して p > 0.05。結果は少なくとも 2 回の実験を代表している。

【図 7 0】図 7 0 は、マウスリンパ球に対する IL - 15 w t 及び IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u / F c 複合体の効果を示す一組のグラフである。C 57 B L / 6 マウス (1 群当り 5 匹マウス) に 1 m g / k g の IL - 15 N 7 2 D : IL - 15 R α S u /

Fc融合複合体、0.28mg/kg（等モル用量）のIL-15wt、又は陰性コントロールとしてPBSの単回用量を静脈内に注射した。注射後4日目に、B細胞（CD19）、CD4 T細胞（CD4）、NK細胞（NKp46）及びCD8 T細胞（CD8）のパーセントを脾臓細胞中で確認し（左図：平均値±標準誤差（n=5））、そしてPBM（右欄：プール血液中の濃度（n=5））で確認した。* PBSと比較して $p > 0.05$ 。* * IL-15wtと比較して $p > 0.05$ 。結果は少なくとも2回の実験を代表している。

【発明を実施するための形態】

【0051】

（定義）

以下の定義は以下の明細書で用いられている特定の用語に対して提供されている。

【0052】

本明細書で用いられる用語「を包含する（comprising）」は、列挙されている要素を包含しているがその他の要素を排除していない組成物及び方法の意味するように意図されている。組成物及び方法を定義するために用いられる場合の「実質的にからなる（consisting essentially of）」は、組合わせに対する本質的な意義とは別の要素を除外することを意味するものである。従って、実質的に本明細書で定義されているような要素からなる組成物は、単離及び精製方法由来の微量汚染物質、及びリン酸緩衝食塩水、保存剤等のような薬学的に許容される担体を除外しない。「からなる（consisting of）」はその他の成分及び本発明の組成物を投与する実質的な方法の工程の微量要素以外を除外することを意味するものである。これらの変遷用語のそれぞれによって定義される実施態様は本発明の範囲内である。

【0053】

本明細書で用いられる用語「IL-15：IL-15R α 融合タンパク質複合体」は、生物活性ポリペプチドに共有結合している可溶性IL-15R α のIL-15R α ドメインと非共有結合で結合しているIL-15を有している複合体である。IL-15はIL-15又は第2生物活性ポリペプチドと共有結合しているIL-15の何れかであってよい。

【0054】

本明細書で用いられる用語「同時発現された」は、2つの異なったポリペプチドが、2つのポリペプチドが宿主細胞内又は宿主細胞の培養培地内で相互作用又は互いに結合して複合体を形成するように、宿主細胞内で同時に発現されることを意味するように意図されている。

【0055】

本明細書で用いられる用語「親和性試薬」は、他の分子と特異的に結合する組成物の何れかを意味するように意図されている。親和性試薬の例は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、プロテインA、及びプロテインGを包含する。

【0056】

「抗体」は、特異的エピトープを結合する抗体及びその断片を包含する、免疫グロブリンの何れかである。この用語はポリクローナル、モノクローナル、キメラ、Fab_s、Fv_s、一本鎖抗体、及び一重又は多重免疫グロブリン変異鎖を、或いはCDRドメイン構造を、更に二重特異及び多重特異抗体も包含する。

【0057】

本明細書で用いられる用語「抗原」は、免疫系が、それに対する抗体又は特異的細胞介在免疫応答を引き起こすようにする何れかの物質を意味する。疾患関連抗原は、免疫系が、それに対する抗体又は特異的細胞介在免疫応答を引き起こすようにする何れかの疾患と関連している何れかの物質である。

【0058】

本明細書で用いられる用語「生物活性ポリペプチド」は、抗原結合活性を有するTCR若しくは抗体、CD8を包含するCD分子、又はFcドメインを包含する抗体ドメインを

10

20

30

40

50

包含する、本明細書で検討しているような望ましい効果を生ずることができるタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのようなアミノ酸配列；糖若しくは多糖；脂質若しくは糖脂質；糖タンパク質；又はリポタンパク質への言及を意味している。

【0059】

本明細書で用いられる用語「細胞」は、原核、真核、初代細胞又は不死細胞株、組織又は臓器にあるそのような細胞の何れかの群を包含している。哺乳動物特にヒト起源の細胞で、1つ又はそれ以上の病原体に感染できることが好ましい。本発明の「宿主細胞」は、原核生物、真核生物、哺乳動物、鳥類、昆虫、植物又は細菌細胞を包含する、何れかの起源の、トランスフォーム、形質転換、形質導入又は感染した細胞でよく、或いはこれは本明細書に記載の核酸を伝搬するために用いることができる任意起源の細胞であってよい。

10

【0060】

本明細書で用いられる用語「共役分子」は、化学又はその他の適切な方法で共有結合している（すなわち融合している）TCR又は抗体分子、及び通常は化学の又は合成される分子であるエフェクター分子への言及を意味している。所望により、共役分子をペプチドリinker配列又は担体分子を介して1つの又はいくつかの部位で融合することができる。あるいは、ペプチドリinker又は担体を共役分子の構築を支援するために用いることができる。共役分子が共役毒素又は検出可能標識であることが特に好ましい。

【0061】

本明細書で用いられる用語「エフェクター分子」は、IL-15Rアルファ、IL-15R α Su、IL-15R α エクソン3欠失、IL-2Rベータ又はガンマ-C、又はこれらの機能的断片のようなIL-15ドメイン、IL-15変異体又はIL-15受容体、及び更に免疫グロブリンFcドメイン又はその機能的断片を含んでいるポリペプチドのようなものを包含する、本明細書で検討しているような所望の効果を生ずることができるタンパク質、ポリペプチド又はペプチドのようなアミノ酸配列；糖又は多糖；脂質又は糖脂質；糖タンパク質；リポタンパク質；又は化学試薬を示している。

20

【0062】

用語「融合分子」及び「融合タンパク質」は互換可能に用いられて、遺伝子組み換え、化学の又はその他の適切な方法で共有結合している（すなわち、融合している）生物活性ポリペプチド（通常はTCR又は抗体）とエフェクター分子（通常はタンパク質又はペプチド配列）への言及を意味している。所望により、融合分子を、ペプチドリinker配列を介して1部位又はいくつかの部位で融合することができる。あるいは、ペプチドリinkerを融合分子の構築を支援するために用いることができる。融合分子が融合タンパク質であることが特に好ましい。一般に融合分子は共役分子から成っていてもよい。

30

【0063】

用語「宿主細胞」はクローニングベクター又は発現ベクターの何れかを含有している原核又は真核細胞の何れかへの言及を意味している。この用語は、宿主細胞の染色体又はゲノムにクローン遺伝子（複数を含む）が含まれるように遺伝子操作されている原核又は真核細胞も包含している。

【0064】

本明細書で用いられる用語「免疫応答」は、免疫細胞が、異なった接着及び/又は活性化工程に關与する多元的な工程を介して刺激を受けそして/又は血液からリンパ球、更には非リンパ組織へ集められる過程への言及を意味している。活性化条件が、サイトカイン、成長因子、ケモカイン及びその他の因子の放出を引き起こし、免疫細胞上の接着及びその他の活性化分子の発現を上方制御し、接着、形態変化、及び/又は組織からケモタキシスを伴う溢出を促進し、細胞増殖及び細胞毒性活性を増大し、抗原提示を刺激し、そして記憶細胞タイプの生成を含むその他の表現型変化をもたらす。免疫応答は、炎症又は別の免疫細胞の細胞毒性活性を抑制又は制御する免疫細胞の活性への言及も意味している。免疫応答はインビトロ又はインビボにおける免疫細胞の活性への言及を意味する。

40

【0065】

本明細書で用いられる用語「ポリヌクレオチド」及び「核酸分子」は、任意の長さのヌ

50

クレオチドの多量体型に言及するために互換可能に用いられる。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／又はこれらの類縁体を含むことができる。ヌクレオチドは何れかの三次元構造を有することができ、そして公知又は未知の何れかの機能を果たすことができる。用語「ポリヌクレオチド」は、例えば、一重、二重螺旋及び三重螺旋分子、遺伝子又は遺伝子断片、エクソン、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、分岐ポリヌクレオチド、アプタマー、プラスミド、ベクター、任意配列の単離されたDNA、任意配列の単離されたRNA、核酸プローブ、及びプライマーを包含する。核酸分子は改変核酸分子（例えば、改変された塩基、糖、及び／又はヌクレオチド間の結合を含む）も含むことができる。

10

【0066】

用語「ポリペプチド」は、好ましくはその大きさに関わらず本質的に20種の天然アミノ酸の何れかからなる、何れかのポリマーへの言及を意味している。用語「タンパク質」が比較的大きいタンパク質を参照するために用いられ、そして多くの場合「ペプチド」が小さいポリペプチドを参照するために用いられているが、この分野におけるこれらの用語の使用はオーバーラップしていることが多い。用語「ポリペプチド」は特段の断りがない限り、一般にタンパク質、ポリペプチド、及びペプチドを示す。一般に本発明に関して有用なペプチドは通常、遠心分離又はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような標準的分子サイズ測定技術で評価して、約0.1~100KD又は最高約1000KDの大きさ、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。

20

【0067】

用語「予防する」、「予防すること」、「予防」、「予防的治療」等は、疾患又は病気を有していないが、疾患又は病気を発症するリスクが高いか罹りやすい対象の疾患又は病気が発症する確立を減少させることへの言及を意味している。予防等は対象が特定の病気又は疾患に決して罹らないように予防することを意味していない。予防は複数用量の投与を必要としてもよい。予防は全ての症状がなくなった対象の疾患の再発を防ぐこと、又は再発寛解疾患の再発を防ぐことを包含する。

【0068】

用語「一本鎖抗体」は、一本鎖形態に基づく抗体への言及を意味している。一本鎖抗体は抗体の最小結合サブユニットから成っていてよい。一本鎖抗体は、一本の安定に畳まれているポリペプチド鎖上で抗体の抗原-結合領域（例えば、相補体決定領域の全て又は幾つか、重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域に存在するCDR）とのみ結合できる。このように、一本鎖抗体は古典的な免疫グロブリンよりサイズが相当に小さいものであるが、抗体の抗原特異的結合特性を保持している。一本鎖抗体はリガンド、例えば、エフェクター分子又は薬物複合体の広い領域と結合できる。

30

【0069】

本明細書で用いられる用語「可溶性」は、水性緩衝液、例えば、細胞培地から低いG力遠心分離下（例えば、通常の遠心機で約30,000回転/分以下）で容易に沈殿しない融合分子、特に融合タンパク質を意味する。更に、融合分子は、低濃度の陰イオン又は非イオン洗浄剤の存在下又は非存在下において中性pH又はその付近で約5~37より高い温度で水溶液に維持されるならば可溶性である。これらの条件下で、可溶性タンパク質は低い沈降価、例えば約10~50のスベドベルグ単位を有している。

40

【0070】

本明細書で参照する水溶液は一般に、pH、具体的には約5~9の範囲のpH、及び約2mM~500mMの範囲のイオン強度を確立するために緩衝化合物を有している。たまに、プロテアーゼ阻害剤又は弱い非イオン洗浄剤を添加する。また、所望により、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添加してもよい。例示的な水性緩衝剤は、標準的なリン酸緩衝食塩水、トリス緩衝食塩水、又はその他の周知の緩衝剤及び細胞培地製剤を包含する。

50

【 0 0 7 1 】

用語「刺激する」又は「刺激すること」は、生理活性、例えば免疫応答を増大すること、増幅すること、補強すること、強化することへの言及を意味している。刺激は正の変化でよい。例示的な増大は、例えば、5%、10%、25%、50%、75%或いは90～100%までであってよい。その他の例示的な増大は2倍、5倍、10倍、20倍、40倍又は100倍までもを包含する。

【 0 0 7 2 】

用語「抑制する」又は「抑制すること」は、生理活性、例えば免疫応答を減少すること、弱めること、減らすこと、止めること又は安定化することを示している。抑制は負の変化でよい。例示的な減少は、例えば、5%、10%、25%、50%、75%或いは90～100%までであってよい。例示的な減少は2倍、5倍、10倍、20倍、40倍又は100倍までもを包含する。

10

【 0 0 7 3 】

用語「T細胞受容体」(TCR)は、抗原の提示に応答してT細胞の活性化に關与する内在性膜タンパク質の複合体の又はこれに由来するポリペプチドへの言及を意味している。ある場合は、T細胞は、 $\alpha\beta$ 又は $\gamma\delta$ ヘテロ二量体T細胞受容体(TCR)を介してMHC産物と結合しているペプチドを認識する。TCRレパトリーは、抗体重鎖及び軽鎖遺伝子で用いたものと同じ遺伝子再配列メカニズムにより創生された広汎の多様性を有している[Tonegawa, S. (1988) Biosci. Rep. 8:3-26]。殆どの多様性は、 α 及び β 鎖の相補性決定領域3(CDR3)をコードする可変(V)及び結合(J)(或いは多様性、D)の合流点で創生される[Davis and Bjorkman (1988) Nature 334:395-402]。しかしながら、TCRは抗体のように、そして恐らく偶然ではなく、体細胞点突然変異を受けない。TCRは抗体と同じ程度の親和性成熟も受けない。天然に生じるようなTCRは、 $10^5 \sim 10^7 M^{-1}$ の親和性を有していると思われるのに対して、抗体は通常 $10^5 \sim 10^9 M^{-1}$ の親和性を有している[Davis et al. (1998) Annu. Rev. Immunol. 16:523-544; Eisen et al. (1996) Adv. Protein Chem. 49:1-56]。TCRに体細胞突然変異が存在しないことは低い親和性に関係しているかもしれないが、TCRが高い親和性を有することの選択的優位性がないとも反論されている。実際に、T細胞活性化の連続引き金[Valitutti et al. (1995) Nature 375:148-151]及び動的校正[Rabinowitz et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1401-1405]モデルの両方とも、より長いオフ速度(高い親和性に関係している)がシグナル伝達系に弊害をもたらすことを示唆している。より高い親和性TCRはT細胞応答に必要なペプチド特異性を保持できないという可能性もある。例えば、MHCの溝の内部で結合するペプチドは限られたアクセス可能表面を提示し[Bjorkman, P. J. (1997) Cell 89:167-170]、これは順に相互作用中に生成されるエネルギーの量を制限する。一方、エネルギーをMHC螺旋に向けることによりTCRの親和性を増やすことは、恐らく負の選択中に胸腺の欠失をもたらす[Bevan, M. J. (1997) Immunity 7:175-178]。用語「TCR」は、TCRV α 及びV β ドメインを含む分子を包含する、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト化、ヘテロ二量体及び一本鎖T細胞受容体又はその機能的断片を包含する。用語「TCR」は、例えば、2008年3月19日に出願されて米国特許公開第US 20030144474号の、標題「T CELL RECEPTOR FUSIONS AND CONJUGATES AND METHODS OF USE THEREOF」の米国仮特許出願に開示されているT細胞受容体も包含する。

20

30

40

【 0 0 7 4 】

用語「ベクター」は、宿主細胞中で自己複製ができて、外来DNAを受け入れることができる核酸分子である。ベクターはそれ自体の複製起点、外来DNA挿入のために用いることができる制限エンドヌクレアーゼ用の1つ又はそれ以上の固有の認識部位、及び通常は抗生物質耐性をコードする遺伝子のような選択可能なマーカー、並びに挿入されたDNAの発現のための認識配列(例えば、プロモーター)をしばしば担持している。一般的なベクターはプラスミドベクター及びファージベクターを包含している。

【 0 0 7 5 】

50

用語「Fcドメイン」又は「Fc領域」は、免疫グロブリン重鎖「断片結晶化可能」領域への言及を意味している。一般に、Fcドメインは第2Fcドメインと相互作用して二量体複合体を形成できる、FcドメインはFc受容体と呼ばれる細胞表面受容体及び/又は相補体系のタンパク質と結合でき、或いはこれらの結合活性を減少又は増大するために改変できる。FcドメインはIgG、IgA、IgD、IgM又はIgE抗体アイソタイプから得ることができ、そしてオプソニン化、細胞溶解、マスト細胞の劣化、好塩球増加及び好酸球増加、並びにその他のFc受容体依存性過程を包含する免疫活性；相補経路の活性化；及びインビボにおけるタンパク質安定性の影響を及ぼす。

【0076】

用いられている略語は：IgG、免疫グロブリン；h、ヒト（の）；IL、インターロイキン；R、受容体；Su、sushiドメイン；TCR、T細胞受容体；sc、一本鎖；sTNFR、可溶性腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）受容体；NK、ナチュラルキラー；KD、平衡解離定数；CTLs、細胞毒性Tリンパ球；aa、アミノ酸（複数を含む）；OVA、オボアルブミン；VSV、水疱性口内炎ウイルス；IMDM、イソコーブ改変ダルベッコ培地；CHO、チャイニーズハムスター卵巣；mAb、モノクローナル抗体； β 2m、 β 2ミクログロブリン；SA、ストレプトタビジン；HRP、ホースラディッシュペルオキシダーゼ；PE、フィコエリトリン；ABTS、2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ジアンモニウム塩；PLE、ペプチド負荷エンハンサー；c246scTCR、ヒトp53（aa264-272）ペプチド/HLA-A*0201複合体に特異的な可溶性一本鎖TCR；c149scTCR、ヒトp53（aa149-157）ペプチド/HLA-A*0201複合体に特異的な可溶性一本鎖TCR；OT1scTCR、OVA（aa257-264）ペプチド/H-2Kb複合体に特異的な可溶性一本鎖TCR；SEC、サイズ排除クロマトグラフィー；pMHC I、ペプチド/MHCクラスI；SPR、表面プラズモン共鳴；MW、分子量；m、ネズミ；A、吸光度；RU、応答単位である。

【0077】

本明細書で提供されている範囲は範囲内の全ての値を省略していると理解される。例えば、1～50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50からなる群の何れかの数、数の組み合わせ、又は部分範囲を包含すると理解される。

【0078】

「1より大きい」は2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、100等又はその間の任意の値であると理解される。「少なくとも」特定値、はその値及びその値より大きい全ての値であると理解される。

【0079】

具体的に述べられているか又は文脈から明らかである場合を除いて、本明細書で用いられている用語「又は」は包括的であると理解される。

【0080】

具体的に述べられているか又は文脈から明らかである場合を除いて、本明細書で用いられている用語「a」、「an」、及び「the」は単数又は複数であると理解される。

【0081】

具体的に述べられているか又は文脈から明らかである場合を除いて、本明細書で用いられている用語「約」は、当該技術分野において正常に許容される範囲内、例えば、平均値の2標準偏差内であると理解される。約は、述べられている値の10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、又は0.01%以内であると理解できる。文脈から明らかな場合を除いて、本明細書で提供されている全ての数値は用語、約で修飾できる。

10

20

30

40

50

本明細書の可変基の定義の何れかにおける化学基を列挙するリストは、何れかの単一基又は列挙されている基の組合わせとしての可変基の定義を包含する。本明細書の可変基又は態様についての実施態様の列挙は、何れかの単一の実施態様又は他の実施態様又はその部分との組み合わせとしての実施態様を包含する。

【0082】

本明細書に提供されている何れかの組成物又は方法は、本明細書に提供されているその他の何れかの組成物及び方法の1つ又はそれ以上と組み合わせることができる。

【0083】

(Fcドメイン)

IgGクラスの免疫グロブリンはヒト血液中に最も豊富にあるタンパク質である。これらの血中半減期は21日もの長期に達する。融合タンパク質は、IgGのFc領域と、各種サイトカイン及び可溶性受容体のような、別のタンパク質のドメインとの結合体であると報告されている(例えば、Capon et al., Nature, 337:525-531, 1989; Chamow et al., Trends Biotechnol., 14:52-60, 1996); 米国特許第5,116,964号及び同第5,541,087号を参照されたい)。原型の融合タンパク質はIgGFcのヒンジ領域でシステイン残基を介して結合しているホモ二量体タンパク質であって、重鎖可変及びCH1ドメイン並びに軽鎖のないIgG分子と類似の分子をもたらす。Fcドメインを含む融合タンパク質の二量体特性は、別の分子との高次相互作用(すなわち、2価又は二重特異性結合)をもたらす点で好都合である。構造的相同性に起因して、Fc融合タンパク質は類似のアイソタイプを有するヒトIgGのそれに相当するインビボの薬物動態プロファイルを示す。IL-15又はIL-15融合タンパク質の血中半減期を引き延ばすためにそして/又はその生物活性を増大するために、本発明に開示又は記載されているヒト重鎖IgGタンパク質のFc部分と共有結合しているIL-15R α と非共有結合しているIL-15を含有している融合タンパク質複合体を作成することが望ましい。

【0084】

用語「Fc」は、単量体又は多量体の形態にあるかに関わらず、全抗体の非抗原結合断片の配列を含んでいる分子又は配列への言及を意味する。天然型Fcの原免疫グロブリン供給源はヒト起源であることが好ましく、何れかの免疫グロブリンであってもよいが、IgG1及びIgG2が好ましい。天然型Fcは二量体又は多量体形態内へ共有結合(すなわち、ジスルフィド結合)及び非共有関係で結合できる単量体ポリペプチドで構成されている。天然型Fc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス(例えば、IgG、IgA、IgE)又はサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgGA2)に依存して1~4の範囲にある。天然型Fcの一例は、IgGのパパイン消化由来のジスルフィド結合した二量体である(Ellison et al. (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9を参照されたい)。本明細書で用いられる用語「天然型Fc」は単量体、二量体、及び多量体形態に対する総称である。FcドメインはプロテインA、プロテインG、各種のFc受容体及び相補タンパク質に対する結合部位を含有している。

【0085】

ある実施態様では、用語「Fc変異体」は、天然型Fcから改変されているがサルベージ受容体であるFcRnへの結合部位を未だ含んでいる分子又は配列への言及を意味する。国際出願第WO97/34631号(1997年9月25日公開)及び同第WO96/32478号公報は例示的なFc変異体を、更にはサルベージ受容体との相互作用を記載していて、これは参照により本明細書に組み込まれている。従って、用語「Fc変異体」は非ヒト天然型Fcからヒト化された分子又は配列を含んでいる。更に、天然型Fcは、本発明の融合タンパク質に必要な構造特性或いは生物活性をもたらすので除去されてもよい部位を含んでいる。従って、ある特定の実施態様では、用語「Fc変異体」は、(1)ジスルフィド結合形成、(2)選択された宿主細胞との不適合性、(3)選択された宿主細胞における発現に対するN-末端異種混交化、(4)グリコシル化、(5)相補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、又は(7)抗体依存

10

20

30

40

50

性の細胞傷害 (A D C C) に影響を及ぼすか或いはこれに關与する天然型 F c の部位又は残基の 1 つ又はそれ以上を欠失した分子又は配列を含んでいる。 F c 変異体は以下に更に詳細に記載されている。

【 0 0 8 6 】

用語「 F c ドメイン」は、天然型 F c 及び F c 突然変異分子、並びに上記の配列を包含する。 F c 変異体及び天然型 F c と同様に、用語「 F c ドメイン」は、全抗体から消化されたか或いは組み替え遺伝子発現により又は別の方法で產生されたかに関わらず、単量体又は多量体形態にある分子を包含する。

【 0 0 8 7 】

(T 細胞受容体 (T C R))

T 細胞はその他の免疫細胞型 (多形核球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、B 細胞、NK 細胞) と共に免疫系の細胞要素を構成する、細胞のサブグループである。生理的条件下で、T 細胞は免疫監視において並びに外来抗原の排除において機能する。しかしながら、病的条件下では、T 細胞が疾患の原因及び伝播において重要な役割を果たすという強力な証拠がある。これらの疾患において、中枢又は末梢における、T 細胞免疫寛容の破綻は自己免疫疾患の原因における基本的な過程である。

【 0 0 8 8 】

T C R 複合体は少なくとも 7 つの膜貫通タンパク質から成っている。ジスルフィド結合した ($\alpha \beta$ 又は $\gamma \delta$) ヘテロ二量体は単一型抗原認識ユニットを形成するが、 ϵ 、 γ 、 δ 、 ξ 、及び η 鎖から成る、C D 3 の不変鎖は、T 細胞活性化及び細胞免疫応答の同化をもたらすシグナル伝達経路へのリガンド結合のカップリングに關与する。T C R 鎖の遺伝子多様性にも関わらず、2 つの構造特性が全ての公知サブユニットに共通している。第 1 に、これらは恐らく α 螺旋である、一本鎖膜貫通ドメインを有する膜貫通タンパク質である。第 2 に、全ての T C R 鎖は予測される膜貫通ドメイン内に荷電アミノ酸を保有しているという独特な特性を有している。不変鎖はマウスとヒトの間に保存されている、単一の負の電荷を有し、そして可変鎖は 1 つの (T C R - β) 又は 2 つの (T C R - α) 正電荷を保有している。T C R の膜貫通配列は多数の種で高度に保存されているので、系統発生的に重要な役割を果たしているのだろう。親水性アミノ酸、アルギニン及びリジンを含んでいるオクタペプチド配列が種の間で一致している。

【 0 0 8 9 】

T 細胞の応答は T C R に結合している抗原によって調節される。T C R の 1 つの型は、免疫グロブリン可変 (V) 及び定常 (C) 領域に類似している α 及び β 鎖からなる膜結合ヘテロ二量体である。T C R の α 鎖が共有結合した V - α と C - α 鎖を包含しているのに対して、 β 鎖は C - β 鎖と共有結合している V - β 鎖を包含している。V - α 及び V - β 鎖は、主要な組織的適合性複合体 (M H C) (ヒトでは H L A 複合体として知られている) との関連でスーパー抗原又は抗原を結合できるポケット又は裂け目を形成する。概して、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。

【 0 0 9 0 】

T C R 鎖 ($\alpha \beta$ 又は $\gamma \delta$) の細胞外ドメインも、細胞表面上で発現するための異種膜貫通ドメインとの融合体として遺伝子操作できる。このような T C R は、C D 3、C D 2 8、C D 8、4 - 1 B B 及び / 又はキメラ活性化受容体 (C A R) 膜貫通又は活性化ドメインとの融合体を包含する。T C R は 1 つ又はそれ以上の $\alpha \beta$ 又は $\gamma \delta$ 鎖の抗原結合ドメインを含む可溶性タンパク質であってもよい。このような T C R は T C R 定常ドメインを有しているか又は有していない T C R 可変ドメイン又はその機能的断片を包含してもよい。可溶性 T C R はヘテロ二量体又は一本鎖分子であってもよい。

【 0 0 9 1 】

(融合タンパク質複合体)

本発明の可溶性融合タンパク質及び共役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んでいる。ある特定の実施態様では、第 1 融合タンパク質は、インターロイキ

10

20

30

40

50

ン - 15 (IL - 15) 又はその機能的断片と共有結合している第1生物活性ポリペプチドを含み; 第2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 - 15 R α) ポリペプチド又はその機能的断片と共有結合している第2生物活性ポリペプチドを含み、そしてここで第1融合タンパク質のIL - 15 ドメインは第2融合タンパク質の可溶性IL - 15 R α ドメインと結合して可溶性融合タンパク質複合体を形成する。本発明の融合タンパク質複合体は第1及び第2融合タンパク質の一方又は両方と結合している免疫グロブリンFcドメイン又はその機能的断片も含んでいる。Fcドメインが第1及び第2融合タンパク質と結合するFcドメインが相互作用して融合タンパク質複合体を形成することが好ましい。このような複合体は免疫グロブリンFcドメイン間にジスルフィド結合を形成することにより安定化させることができる。ある特定の実施態様では、本発明の可溶性融合タンパク質複合体は、IL - 15 ポリペプチド、IL - 15 変異体又はその機能的断片及び可溶性IL - 15 R α ポリペプチド又はその機能的断片を包含し、そこではIL - 15 及びIL - 15 R α ポリペプチドの一方又は両方が免疫グロブリンFcドメイン又はその機能的断片を更に包含している。

【0092】

ある特定の実施例では、生物活性ポリペプチドの1つが第1可溶性TCR又はその断片を含んでいる。別の又は第2生物活性ポリペプチドが第1可溶性TCR又はその機能的断片を含んでいるので、1価TCRと比べて同種リガンドに対する増大した結合活性を有する多価TCR融合タンパク質複合体を作り出す。更に、別の生物活性ポリペプチドは第1可溶性TCRとは異なる第2可溶性TCR又はその機能的断片を含んでいる。ある特定の実施例では、TCRは、例えば、天然型TCRと比較して同種リガンドに対するより高い親和性又は増大した結合親和性を有するものとして産生される。本明細書に記載されているような本発明の可溶性TCRがそのリガンドに対してより高い活性又は親和性を有している場合、細胞表面結合抗原に対する特異的なプローブとして有用である。本発明のある特定の好ましい実施例では、TCRは特定抗原の認識に対して特異的である。

【0093】

典型的な実施態様では、TCRは α 鎖(本明細書では α 、アルファ、又はa鎖という)及び β 鎖(本明細書では β 、ベータ、又はb鎖という)を含有しているヘテロ二量体である。別の典型的な実施態様では、TCRは一本鎖TCRポリペプチドを含んでいる。一本鎖TCRはペプチドリンカー配列によってTCR V - β 鎖と共有結合しているTCR V - α 鎖を含んでいてよい。一本鎖TCRは更にTCR V - β 鎖と共有結合している可溶性TCR C β 鎖断片を含んでいてもよい。一本鎖TCRは更にTCR V - α 鎖と共有結合している可溶性TCR C α 鎖断片を含んでいてもよい。

【0094】

更なる実施態様では、第1及び第2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んでいる。

【0095】

別の実施態様では、TCRドメインに対する抗原はMHC又はHLA分子中に存在するペプチド抗原を含んでいる。更なる実施態様では、ペプチド抗原は腫瘍関連ポリペプチド又はウィルスがコードするポリペプチドに由来している。

【0096】

別の実施態様では、抗体ドメインに対する抗原は細胞表面受容体又はリガンドを含んでいる。

【0097】

更なる実施態様では、抗原はCD抗原、サイトカイン又はケモカイン受容体又はリガンド、成長因子受容体又はリガンド、組織因子、細胞接着分子、MHC / MHC様分子、Fc受容体、To11様受容体、NK受容体、TCR、BCR、陽性 / 陰性同時刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、或いはウィルスがコードする抗原を含んでいる。

【0098】

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる用語「生物活性ポリペプチド」又は「エフェクター分子」は、本明細書で検討するような所望の効果を生み出すことのできる、タンパク質、ポリペプチド又はペプチド；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のようなアミノ酸配列を意味する。エフェクター分子は化学物質も包含する。生物活性又はエフェクタータンパク質、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されている。従って、適切な分子は調節因子、酵素、抗体又は薬剤、更にはDNA、RNA、及びオリゴヌクレオチドを包含する。生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子は天然由来であってもよく或いは公知成分から、例えば、遺伝子組み換え又は化学合成、によって合成でき、そして異種成分を包含できる。生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子は通常、遠心分離又はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような標準的分子サイズ測定技術で評価して、約0.1~100KD又は最大で約1000KDの大きさ、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。本発明の望ましい効果は、これに限定されないが、例えば、増大した結合活性を有する本発明の融合タンパク質複合体を形成すること、標的細胞を殺傷して、例えば、疾患の予防又は治療において、細胞増殖又は細胞死を誘発して、免疫応答を開始すること、又は診断目的で検出分子として作用することを包含する。このような検出のために、アッセイを用いることができ、例えば、それを増殖するために細胞を培養すること、及び細胞を本発明のTCR融合複合体と接触させること、次いでTCR融合複合体が細胞の更なる発生を阻害するか否かを評価することを含んでいるアッセイを用いることができる。

10

20

30

40

50

【0099】

本発明に従って本発明の融合タンパク質複合体にエフェクター分子を共有結合することは多くの重要な利点をもたらす。公知構造のペプチドのようなものを包含している、単一のエフェクター分子を含んでいる本発明の融合タンパク質複合体を産生できる。更に、多種のエフェクター分子を同様のDNAベクターに産生できる。すなわち、感染細胞又は病的細胞を認識するために、異なったエフェクター分子のライブラリーを融合タンパク質複合体に結合することができる。更に、治療適用のために、本発明の融合タンパク質複合体の対象への投与よりむしろ、融合タンパク質複合体をコードするDNA発現ベクターを融合タンパク質複合体のインビボ発現のために投与できる。このような手法は典型的に組み換えタンパク質の製造に関連しているコストのかかる精製工程を避け、そして従来手法に関連している抗原の取り込み及び処理の複雑さを避けることができる。

【0100】

述べたように、本明細書に開示されている融合タンパク質の成分、例えば、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、タンパク毒素、免疫グロブリンドメイン又はその他の生物活性分子のようなエフェクター分子及び何れかのペプチドリンカーを、融合タンパク質が意図されている機能を有するという条件で、ほぼ任意の方法で構造化できる。具体的には、融合タンパク質のそれぞれの成分を所望により、少なくとも1つの適切なペプチドリンカー分別の成分と距離を空けることができる。更に、融合タンパク質は、例えば、融合タンパク質の改変、同定及び/又は精製を促進するために、タグを包含できる。より具体的な融合タンパク質は以下に記載されている実施例中にある。

【0101】

(リンカー)

本発明の融合複合体は、IL-15又はIL-15R α ドメインと生物活性ポリペプチドの間に挿入されたフレキシブルなリンカー配列も包含していることが好ましい。リンカー配列は、IL-15又はIL-15R α ドメインに対する生物活性ポリペプチドの効果的な位置決めが両方のドメインに機能活性を持たせるようにしなければならない。生物活性ポリペプチドがTCRである場合の実施態様では、リンカー配列は、T細胞受容体が提示MHCペプチド複合体を認識できるように、そしてエフェクター分子を望ましい位置へ送達できるように、TCR分子結合溝を位置付ける。エフェクター分子の良好な提示は、T細胞を培養してこれを増殖すること、T細胞を本発明のTCR融合複合体と接触させること、そしてTCR融合複合体が細胞の更なる発生を阻害するか否かを評価することの連

続工程を含んでいるインビトロアッセイを包含している、以下に開示されているアッセイによって確認されるように、細胞がＴ細胞増殖を誘発又は阻害するか、或いは特定部位に対する免疫応答を開始するか阻害するかの何れかの細胞の活性を調節することができる。

【０１０２】

ある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体は、第１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（又はその機能的断片）に共有結合しているリンカーを有している。

【０１０３】

別の特定の実施態様では、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２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（又はその機能的断片）に共有結合しているリンカーを有している。

10

【０１０４】

提示抗原を認識するためにＴＣＲ分子の結合溝を、或いは抗原を認識するために抗体分子の結合ドメインを効果的に位置づけることができるペプチドをもたらすヌクレオチド配列によって、リンカー配列がコードされることが好ましい。本明細書で用いられる語句「ＩＬ－１５又はＩＬ－１５Ｒ α ドメインに対する生物活性ポリペプチドの効果的な位置決め」、又は同様の語句は、ＩＬ－１５又はＩＬ－１５Ｒ α ドメインに結合している生物活性ポリペプチドが、ＩＬ－１５又はＩＬ－１５Ｒ 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できるように位置していることを意味するように意図されている。ある特定の実施態様では、ＩＬ－１５又はＩＬ－１５Ｒ α ドメインが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、或いは細胞の成長を阻害又は刺激することを許容するように効果的に位置している。

20

【０１０５】

本発明の融合複合体は、ＩＬ－１５又はＩＬ－１５Ｒ α ドメインと免疫グロブリンＦｃドメインの間に挿入されたフレキシブルなリンカー配列も包含していることが好ましい。リンカー配列は、Ｆｃドメイン、生物活性ポリペプチド及びＩＬ－１５又はＩＬ－１５Ｒ α ドメインを、それぞれのドメインが機能活性を持つように、効果的に位置づけるようにしなければならない。ある特定の実施態様では、Ｆｃドメインは、適切な融合タンパク質複合体形成及び／又は免疫細胞又は相補体系のタンパク質上のＦｃ受容体との相互作用を許容して、オプソニン化、細胞溶解、マスト細胞、好塩基球及び好酸球の脱顆粒、並びにその他のＦｃ受容体依存性の過程；を包含するＦｃが介在する効果を刺激し；相補経路を活性化し；そして融合タンパク質複合体のインビボ半減期の増大することを可能にするように効果的に位置決めされている。

30

【０１０６】

リンカー配列は生物活性ポリペプチドの２つ又はそれ以上を結合して所望の機能活性を有する一本鎖分子を生成するためにも用いることができる。

【０１０７】

リンカー配列は好ましくは約７～２０個のアミノ酸を、より好ましくは約８～１６個のアミノ酸を含んでいる。リンカー配列は、望ましくない単一構造中に生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子を保持しないようにフレキシブルであることが好ましい。リンカー配列は、例えば、認識部位を融合分子から距離をあけて置くために用いることができる。具体的には、ペプチドリンカー配列を、例えば、これを化学的に架橋して分子柔軟性をもたらすために、生物活性ポリペプチドとエフェクター分子の間に位置付けることができる。リンカーは主にグリシン、アラニン及びセリンのような小さい側鎖を有するアミノ酸を含んでいて柔軟性をもたらすことが好ましい。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、アラニン、又はセリン残基を、特にグリシンとセリン残基を含有している。ヘテロ二量体ＴＣＲを含んでいる融合タンパク質複合体に関しては、リンカー配列はＴＣＲ分子の α 鎖にも結合できるが、リンカー配列はＴＣＲ分子の β 鎖に適切に結合する。あるいは、リンカー配列はＴＣＲ分子の α 及び β 鎖の両方に結合できる。このように β ペプチド鎖が α 鎖と共に発現された場合は、結合したＴＣＲポリペプチド

40

50

は、図 1 に大まかに描かれているように畳み込まれて機能的な T C R 分子をもたらす。1 つの適切なリンカー配列は、A S 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、T C R の β ドメインの第 1 アミノ酸と結合していることが好ましい。抗体可変領域を共に結合するために良好に用いられている多くのフレキシブルリンカーデザインの何れかを包含する異なったリンカー配列を用いることができる。Whitlow, M. et al., (1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97-105 を参照されたい。ある実施例では、エフェクター分子を T C R β 鎖分子と共有結合するために、リンカーのアミノ配列は、T C R β 鎖の C 末端残基からエフェクター分子の N 末端残基までの適切な距離を橋渡しすることができる。適切なリンカー配列を実験的に容易に確認することができる。また、リンカー配列の適切な大きさ及び配列も T C R 分子の予測サイズ及び形状に基づいて従来のコンピュータモデリング技術によって確認できる。

10

【0108】

一般に、本発明の融合タンパク質複合体の製造は本明細書に開示されている方法により及び、例えば、ポリメラーゼ連鎖増幅反応 (P C R)、プラスミド D N A の製造、制限酵素を用いる D N A の開裂、オリゴヌクレオチドの製造、D N A のライゲーション、m R N A の単離、D N A の適切な細胞への導入、宿主の形質転換又はトランスフェクション、宿主の培養に関する広く認められている組み換え D N A 技術によって遂行できる。更に、融合分子はカオトロピック剤及び周知の電気泳動、遠心分離及びクロマトグラフィー方法を用いて単離及び精製できる。これらの方法に関する開示について、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed. (1989); and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1989) を概して参照されたい。

20

【0109】

本明細書で用いられている本発明の生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子は、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、タンパク質毒素、免疫グロブリンドメイン又は酵素のようなその他の生物活性タンパク質のような因子を包含できる。また、生物活性ポリペプチドは、非タンパク質毒素、細胞毒性薬、化学療法剤、検出可能な標識、放射活性物質等のようなその他の化合物との複合体を包含できる。

30

【0110】

本発明のサイトカインは、他の細胞に影響を及ぼして細胞免疫性の様々な複数効果の何れかに関与する、細胞によって産生される何れかの因子によって定義される。サイトカインの例は、これに限定されないが、I L - 2 ファミリー、インターフェロン (I F N)、I L - 10、I L - 1、I L - 17、T G F 及び T N F サイトカインファミリー、及び I L - 1 から I L - 35、I N F - α 、I N F - β 、I N F γ 、T G F - β 、T N F α 、並びに T N F β を包含する。

【0111】

本発明の一態様では、第 1 融合タンパク質はインターロイキン - 15 (I L - 15) ドメイン又はその機能的断片と共有結合している第 1 生物活性ポリペプチドを含んでいる。I L - 15 は T 細胞の活性化及び増殖に影響を及ぼす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 I L - 15 活性は、ある意味では I L - 2 と類似しているが、根本的な違いはよく特徴付けられている (Waldmann, T A, 2006, Nature Rev. Immunol. 6: 595-601)。

40

【0112】

本発明の別の態様では、第 1 融合タンパク質は I L - 15 変異体 (本明細書では I L - 15 突然変異体ともよぶ) であるインターロイキン - 15 (I L - 15) ドメインを含んでいる。I L - 15 変異体は、天然型 (又は野生型) I L - 15 タンパク質とは異なったアミノ酸配列を含んでいることが好ましい。I L - 15 変異体は I L - 15 R α ポリペプチドと結合して I L - 15 アゴニスト又はアンタゴニストとして機能することが好ましい。アゴニスト活性を伴う I L - 15 変異体はスーパーアゴニスト活性を有していることが

50

好ましい。ある実施態様では、IL-15 変異体はその IL-15 R α との関連とは独立して IL-15 アゴニスト又はアンタゴニストとして作用する。IL-15 アゴニストは野生型 IL-15 と比較して相当の又は増加した生物活性によって例示される。IL-15 アンタゴニストは野生型と比較して減少した生物活性で、又は IL-15 が介在する応答を阻害する能力によって例示される。ある例では、IL-15 変異体は増大した又は減少した活性で IL-15 R β γ C 受容体と結合する。ある実施態様では、IL-15 変異体の配列は、天然型 IL-2 配列と比べて、少なくとも1つのアミノ酸変化、例えば、置換又は欠失を有していて、このような変化は IL-15 アゴニスト又はアンタゴニスト活性をもたらす。アミノ酸置換/欠失が IL-15 R β 及び/又は γ C と相互作用する IL-15 のドメイン内にあることが好ましい。アミノ酸置換/欠失が IL-15 R α との結合或いは IL-15 変異体を産生する能力に影響を及ぼさないことがより好ましい。IL-15 変異体を生成する適切なアミノ酸置換/欠失は、想定される又は公知の IL-15 構造、公知構造を有する IL-2 のような同族分子と IL-15 との比較に基づいて、本明細書で提供されているように、又はその他の実験方法で、合理的な或いは無作為的な突然変異生成及び機能アッセイによって確認できる。更なる適切なアミノ酸置換は同類又は非同類変化及び追加のアミノ酸の挿入である。本発明の IL-15 変異体が、天然の成熟型ヒト IL-15 配列の 6、8、10、61、65、72、92、101、104、105、108、109、111、又は112 位に1つ又はそれ以上の1つのアミノ酸置換/欠失を含んでいることが好ましく；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位置を示し、そして「N」は IL-15 変異体のその位置で置換されたアミノ酸残基を示す）、I6S、D8A、D61A、N65A、N72R、V104P 又は Q108A 置換はアンタゴニスト活性を有する IL-15 変異体もたらして、N72D 置換はアゴニスト活性を有する IL-15 変異体をもたらす。

【0113】

サイトカインと同様に、ケモカインは、他の細胞に暴露されたときに細胞免疫の様々な複数効果の何れかに関与する、化学因子又は分子の何れかと定義される。適切なケモカインは、これに限定されないが、CXCL、CC、C 及び CX₃C ケモカインファミリー、CCL-1 から CCL-28、CXCL-1 から CXCL-17、XCL-1、XCL-2、CX3CL1、MIP-1b、IL-8、MCP-1、及びランテスを包含する。

【0114】

成長因子は、特定の細胞に暴露されると病的細胞の増殖及び/又は分化を誘発する何れかの分子を包含する。成長因子はタンパク質及び化学分子を包含し、その幾つかは、GM-CSF、G-CSF、ヒト成長因子及び幹細胞成長因子を包含する。

【0115】

毒素又は細胞毒性薬は、細胞に暴露されたときに致死効果又は生育に対する阻害効果を有する物質の何れかを包含する。より具体的には、エフェクター分子は、例えば、ジフテリア毒素（DT）、志賀毒素、アブリン、コレラ毒素、リシン、サボリン、シュドモナス外毒素（PE）、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパク質、又はゲロニンのような、植物又は細菌起源の細胞毒素であってよい。このような毒素の生物活性断片は当該技術分野において周知であって、例えば、DTA 鎖及びリシン A 鎖を包含する。更に、毒素は、例えば、ホスホリパーゼ酵素（例えば、ホスホリパーゼ C）のような細胞表面で活性な薬剤であってよい。

【0116】

更に、エフェクター分子は、例えば、ビンデシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、メトトレキセート、アドリアマイシン、ブレオマイシン、又はシスプラチンのような化学療法剤であってよい。

【0117】

更に、エフェクター分子は診断又は画像検討に適している検出可能な標識化分子であってよい。このような標識はビオチン、又はストレプトタビジン/アビジン、検出可能なナノ粒子又は結晶、酵素又はその触媒活性断片；緑色蛍光タンパク質、FITC、フィコエリ

10

20

30

40

50

トリン、チクローム、テキサスレッド又は量子ドットのような蛍光標識；放射性核種、例えば、ヨウ素 - 131、イットリウム - 90、レニウム - 188、又はビスマス - 212；リン発光或いはケミルミネセント分子、又は Gd^{3+} 又は常時性金属イオンをベースにした造影剤のような、PET、超音波又はMRIによって検出可能な標識を包含する。エフェクター又はタグを含んでいるタンパク質の製造及び使用に関連する開示について、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); PCT出願公開第 WO 94 / 29350号；PCT出願公開第 WO 94 / 04689号；PCT出願公開第 WO 2005046449号及び米国特許第 5,620,939号を参照されたい。

10

【0118】

共役結合したIL-15及びIL-15R α ドメインを包含しているタンパク質融合又は共役複合体はいくつかの重要な用途を有している。例えば、TCRを含んでいるタンパク質融合又は共役複合体は、IL-15：IL-15R α 複合体を特異的にTCRを結合できるある特定の細胞へ送達するために用いることができる。従って、タンパク質融合又は共役複合体は、リガンドを含有している細胞を選択的に損傷又は殺傷する手段を提供する。TCRを含有しているタンパク質融合又は共役複合体のよって損傷又は殺傷可能な細胞又は組織の例は、TCRによって特異的に結合できる1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又は細菌に感染した細胞を包含する。損傷又は殺傷を受けやすい細胞又は組織は本明細書に開示されている方法で容易にアッセイできる。

20

【0119】

本発明のIL-15及びIL-15R α ポリペプチドは、天然由来のIL-15及びIL-15R α 分子、例えば、ヒト、マウス或いはその他の齧歯動物、又はその他の哺乳動物のIL-15及びIL-15R α 分子とアミノ酸配列において適切に対応する。これらのポリペプチド及びコードする核酸の配列は文献中で公知であって、ヒトインターロイキン15(IL15)mRNA-GenBank：U14407.1、ハツカネズミ筋肉インターロイキン15(IL15)mRNA-GenBank：U14332.1、ヒトインターロイキン-15受容体 α 鎖前駆体(IL-15RA)mRNA-GenBank：U31628.1、ツカネズミ筋肉インターロイキン15受容体、 α 鎖-GenBank：BC095982.1を包含する。

30

【0120】

ある設定では、本発明の多価体のタンパク質融合又は共役複合体を、例えば、sc-TCR又はsc-抗体の結合価を増やすために作成することは有用である。特に、融合タンパク質複合体のIL-15とIL-15R α ドメインの間の相互作用は多価複合体を作成する手段を提供する。また、多価融合タンパク質は、例えば、標準的なビオチン-ストレプトタビジン標識化技術を用いて1~4つの間のタンパク質(同一又は異なっている)と共に共有結合又は非共有結合で結合するか、又はラテックスビーズのような適切な固体支持体へ接合して作成できる。化学的に架橋したタンパク質(例えば、デンドリマーへ架橋)も適切な多価の種である。例えば、タンパク質を、ビオチニル化BirAタグ或いはCys又はHisのように化学反応性側鎖を有するアミノ酸残基のように改変できるタグ配列をコードする配列を包含させることにより、改変できる。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様々な位置に、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して、位置付けることができる。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(複数を含む)を含有している別の融合タンパク質と共有結合させることができる。2つ又はそれ以上の融合タンパク質を適切なデンドリマー又はその他のナノ粒子と化学的に結合して多価の分子を得るために適切な側鎖を包含させることができる。デンドリマーは、その表面の多数の異なった官能基のうちの何れか1つ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))。本発明に従って用いるための例示的なデン

40

50

ドリマーは、例えば、システイン残基を結合できる、E 9 星形ポリアミン dendrimer 及び E 9 可燃性ポリアミン dendrimer を包含する。例示的なナノ粒子はリボソーム、コアシェル粒子又は PLGA をベースとする粒子を包含する。

【0121】

本発明の別の実施態様では、融合タンパク質複合体の一方又は両方のポリペプチドは免疫グロブリンドメインを含んでいる。あるいは、タンパク質結合ドメイン - IL - 15 融合タンパク質は免疫グロブリンドメインと更に結合できる。好ましい免疫グロブリンドメインは、別の免疫グロブリンドメインと相互作用して上で提供されるような多重鎖タンパク質を形成できる領域を含んでいる。例えば、IgG1_{CH2} - C_{H3} のような、免疫グロブリン重鎖領域は安定に相互作用してFc領域を作り出す。Fcドメインを包含している好ましい免疫グロブリンドメインは、Fc受容体又は相補タンパク質結合活性を包含しているエフェクター機能を有する、及び/又はグリコシル化部位を有する領域も含有している。ある実施態様では、融合タンパク質複合体の免疫グロブリンドメインは、Fc受容体又は相補体の結合活性又はグリコシル化を減少又は増大して、それにより得られたタンパク質の生物活性に影響を及ぼす突然変異を含んでいる。例えば、Fc受容体への結合を減少させる突然変異を含有している免疫グロブリンドメインを、Fc受容体担持細胞への低結合活性を有する本発明の融合タンパク質複合体を生成するために用いることができ、これは特異抗原を認識又は検出するように設計された試薬にとって有利である。

10

【0122】

(核酸及びベクター)

20

本発明は更に、核酸配列及び特に本発明の融合タンパク質をコードするDNA配列を提供する。好ましくは、DNA配列は、ファージ、ウィルス、プラスミド、ファージミド、コスミド、YAC、又はエピソードのような細胞外複製に適している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DNAベクターを本明細書に記載されている調製方法を促進して有意量の融合タンパク質を得るために用いることができる。DNA配列を適切な発現ベクター、すなわち、挿入されるタンパク質をコードする配列の転写及び翻訳に必須の要素を含有しているベクターに挿入できる。各種の宿主 - ベクター系を、タンパク質をコードする配列を発現するために用いることができる。これらは、ウィルスに感染した哺乳動物細胞系（例えば、ワクシニアウィルス、アデノウィルス等）；ウィルスに感染した昆虫細胞系（例えば、バキュロウィルス）；酵母ベクターを含有している酵母、又はバクテリオファージDNA、プラスミドDNA或いはコスミドDNAで形質転換された細菌のような微生物を包含する。用いた宿主 - ベクター系に応じて、多数の適切な転写及び翻訳要素のうちの何れか1つを用いることができる。概して前記 Sambrook et al., 及び前記 Ausubel et al., を参照されたい。

30

【0123】

可溶性融合タンパク質複合体を作成する方法が本発明に含まれていて、方法は本明細書に記載されているように第1及び第2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、細胞又は培地中に融合タンパク質を発現して、第1融合タンパク質のIL - 15ドメインと第2融合タンパク質の可溶性IL - 15R α ドメインの間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養すること、可溶性融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでいる。

40

【0124】

一般に、本発明の好ましいDNAベクターは、5'から3'方向に、生物活性ポリペプチドをコードする第1ヌクレオチド配列を導入するための、エフェクター分子をコードする配列と操作可能に結合する第1クローニング部位を含有しているリン酸ジエステル結合によって結合しているヌクレオチド配列を含有している。

【0125】

DNAベクターでコードされる融合タンパク質成分はカセット形式で提供されてもよい。用語「カセット」とは、標準的な組み換え方法で各成分を別の成分に容易に置き換えることができることを意味する。特に、カセット形式に構成されたDNAベクターは、コー

50

ドされた融合複合体を、血清型を有しているか又は発生させる能力を有している病原菌に対して用いられる場合に特に望ましい。

【0126】

融合タンパク質複合体をコードするベクターを作成するために、生物活性ポリペプチドをコードする配列を、適切なリガーゼを用いてエフェクターペプチドをコードする配列に結合する。提示されるペプチドをコードするDNAは適切な細胞株からのように天然の供給源からDNAを単離して、又は公知の合成方法、例えば、リン酸トリエステル方法によって得ることができる。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も市販の自動オリゴヌクレオチド合成器を用いて製造することができる。単離されたら、生物活性ペプチドをコードする遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)又は当該技術分野で公知のその他の手段で増幅できる。生物活性ポリペプチド遺伝子を増幅するのに適切なPCRプライマーはPCR産物へ制限酵素認識部位を添加できる。PCR産物は好ましくはエフェクターペプチド用のスプライス部位及び生物活性ポリペプチド-エフェクター融合複合体の適切な発現及び分泌に必要なリーダー配列を含んでいる。PCR産物がリンカー配列をコードする配列、或いはこのような配列のライゲーションのための制限酵素部位を包含していることも好ましい。

10

【0127】

本明細書に記載されている融合タンパク質は、標準的な遺伝子組み換えDNA技術によって産生されることが好ましい。例えば、生物活性ポリペプチドをコードするDNA分子が単離されたら、配列をエフェクターポリペプチドをコードする別のDNA分子にライゲート(結合)することができる。生物活性ポリペプチド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配列と直接結合してもよい、又はより典型的には、本明細書で検討されたようなリンカー配列をコードするDNA配列を生物活性ポリペプチド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置いて適切なリガーゼを用いて結合させてよい。得られるハイブリッドDNA分子を適切な宿主細胞内で発現させて融合タンパク質複合体を産生できる。DNA分子を5'から3'方向に互いにライゲートして、ライゲーション後にコードされるポリペプチドの翻訳フレームが変化しないようにする(すなわち、DNA分子をフレーム中で互いにライゲートする)。得られるDNA分子はインフレーム融合タンパク質をコードする。

20

【0128】

その他のヌクレオチド配列も遺伝子構築物中に包含させることができる。例えば、エフェクターペプチドと融合した生物活性ポリペプチドをコードする配列の発現を制御する、プロモーター配列(これは融合タンパク質を細胞表面又は培養培地に移動させる)を、リーダー配列を構築物中に含有させるか、又は構築物が挿入されている発現ベクター中に存在させることができる。免疫グロブリン又はCMVプロモータが特に好ましい。

30

【0129】

変異生物活性ポリペプチド、IL-15、IL-15R α 又はFcドメインをコードする配列を得るときに、当業者は生物活性の損失又は減少なしで、ある特定のアミノ酸置換、付加、欠失及び翻訳後改変によってポリペプチドを改変できることを認識するだろう。特に、同類アミノ酸置換は周知である。すなわち、1つのアミノ酸を類似した大きさ、荷電、極性及び構造のアミノ酸による置換はタンパク質機能を有意に変化させる可能性は少ない。タンパク質の構成要素である20の標準アミノ酸は以下のように同類アミノ酸の4群に大まかに分類できる：非極性(親水性)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包含する；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、セリン、スレオニン及びチロシンを包含する；正の荷電をもつ(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む；及び負の荷電をもつ(酸性)グループはアスパラギン酸及びグルタミン酸を含む。タンパク質において1つのアミノ酸の同じグループ内の別のアミノ酸による置換は、タンパク質の生物活性に対して不都合な影響を殆ど有さない。別の例では、アミノ酸位置の改変がタンパク質の生物活性を減少又は増強させることができる。この

40

50

ような変化は、不規則に、或いは標的残基の公知又は予測される構造、及び機能の特性に基づく部位特異的突然変異を介して導入できる。変異タンパク質の発現に続いて、改変に起因する生物活性の変化を結合又は機能アッセイを用いて容易に評価できる。

【0130】

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によって確認でき、ここで2重鎖DNAハイブリッドの安定性は生じる塩基対の程度に依存している。高温及び/又は低塩含量の条件はハイブリッドの安定性を減少させ、そして選択された程度より低い相同性を有する配列のアニールを阻害するように変化させることができる。例えば、約55%のG-C含量を有する配列については、40~50°C、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)のハイブリッド及び洗浄条件が約60~70%の相同性を示し、50~65°C、1×SSC及び0.1%SDSのハイブリッド及び洗浄条件が約82~97%の相同性を示し、そして52°C、0.1×SSC及び0.1%SDSのハイブリッド及び洗浄条件は約99~100%の相同性を示す。ヌクレオチド及びアミノ酸配列を比較する(及び相同性の程度を測定する)ための広範囲のコンピュータプログラムも利用可能で、市販及び無料ソフトウェアの両方の供給源を提供するリストは Ausbel et al.(1999)に見出せる。容易に入手できる配列比較及び複数配列アラインメントアルゴリズムは、それぞれ、the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1997) 及び ClustalW programs である。BLASTは世界的なウェブ、ncbi.nlm.nih.gov で入手可能であって、ClustalWのバージョンは 2.ebi.ac.uk で入手可能である。

10

20

【0131】

融合タンパク質の成分は、それぞれがその意図される機能を果たすことができれば、殆ど任意の順序で構成させることができる。例えば、ある実施多様では、生物活性ポリペプチドはエフェクター分子のC又はN末端に位置付けられる。

【0132】

本発明の好ましいエフェクター分子は、これらのドメインが意図している機能をもたらすサイズを有するだろう。本発明のエフェクター分子は、周知の化学架橋方法を含む多種の方法によって作成されて生物活性ポリペプチドと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。S. S. Wong (1991) in Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Pressも参照されたい。しかしながら、インフレーション融合タンパク質を作成する組み換え操作を用いることが一般に好ましい。

30

【0133】

述べたように、本発明による融合分子又は共役分子は幾つかの方法で構成できる。例示的な構造では、生物活性ポリペプチドのC-末端がエフェクター分子のN末端に操作可能に結合している。この結合は所望により組み替え方法で実現できる。しかしながら、別の構造では、生物活性ポリペプチドのN末端がエフェクター分子のC末端に結合している。

【0134】

その代わりに、或いは更に、必要に応じて、1つ又はそれ以上の追加エフェクター分子を生物活性ポリペプチド又は共役複合体内部へ挿入することができる。

40

【0135】

(ベクター及び発現)

本発明のタンパク質融合複合体を発現するために多数の戦略を用いることができる。例えば、上記の融合タンパク質構築物を、構築物を挿入し次いでライゲーションするために、ベクターに切れ目を入れる制限酵素を用いるような公知の方法によって適切なベクターに組み込むことができる。次いで融合タンパク質の発現のために、遺伝子構築物含有しているベクターを適切な宿主に導入する。概要は、前記の Sambrook et al. を参照されたい。適切なベクターの選択は、クローニングプロトコルに関する因子に基づいて経験的に行うことができる。例えば、ベクターは用いられている宿主に適合し、そしてこれに対して適切なレプリコンを有していなければならない。更に、ベクターは、発現されるべき融

50

合タンパク質複合体をコードするDNA配列を収容できなければならない。適切な宿主細胞は真核及び原核細胞を包含し、容易に形質転換できて培養培地中で迅速な成長を示すものが好ましい。特に好ましい宿主細胞は、*E. coli*、*Bacillus subtilis* 等のような原核細胞、及び動物細胞及び酵母株、例えば、*S. cerevisiae* のような真核細胞を包含する。哺乳動物の細胞、特にJ588、NSO、SP2-O又はCHOが一般に好ましい。その他の適切な宿主は、例えば、Sf9のような昆虫細胞を包含する。従来の培養条件が用いられる。前記のSambrookを参照されたい。次いで、安定に形質転換された又はトランスフェクトされた細胞株を選択できる。本発明の融合タンパク質複合体を発現する細胞を公知の手順によって確認できる。例えば、免疫グロブリンと結合している融合タンパク質複合体の発現は、結合した免疫グロブリンに特異的なELISA及び/又はイムノブロットングによって確認できる。IL-15又はIL-15R α ドメインに結合している生物活性ポリペプチドを含有している融合タンパク質の発現を検出するためのその他の方法は実施例に開示されている。

10

【0136】

上で大まかに述べたように、宿主細胞は、所望の融合タンパク質をコードする核酸を繁殖させるための予備的目的で用いることができる。従って、宿主細胞は融合タンパク質の産生を特異的に意図している原核又は真核細胞を包含できる。従って、宿主細胞は具体的に、酵母、ハエ、蠕虫、植物、カエル、哺乳動物細胞、及び融合体をコードする核酸を伝播できる器官を包含する。使用可能な哺乳動物細胞の限定しない例は、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のような骨髓腫細胞 (Galfre and Milstein, Meth. Enzymol., 73(B):3 (1981)) を包含できる。

20

【0137】

所望の融合タンパク質複合体をコードする核酸を伝播できる宿主細胞は、昆虫 (例えば、*Sp. frugiperda*)、酵母 (例えば、Fleer, R., Current Opinion in Biotechnology, 3(5):486496 (1992) によって概説されているような、*S. cerevisiae*、*S. pombe*、*P. pastoris*、*K. lactis*、*H. polymorpha*)、真菌及び植物細胞を包含する非哺乳類真核細胞も包含する。*E. coli* 及び*Bacillus* のようなある特定の原核生物も意図されている。

30

【0138】

所望の融合タンパク質をコードする核酸を宿主細胞をトランスフェクトする標準的な技術によって、宿主細胞内へ導入することができる。用語「トランスフェクトする」又は「トランスフェクション」は、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン介在トランスフェクション、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、ウィルス形質導入及び/又は組み込みを包含する、核酸を宿主細胞内へ導入する全ての従来技術を包含するように意図されている。宿主細胞をトランスフェクトする適切な方法は、前記のSambrook et al. 及びその他の実験用教科書に見出せる。

【0139】

各種のプロモーター (転写開始調節領域) を本発明に従って用いることができる。適切なプロモーターの選択は提案された発現宿主に依存している。それらが選択された宿主内で機能する限り、異種起源由来のプロモーターを用いることができる。

40

【0140】

プロモーター選択はペプチド又はタンパク質産生の望ましい効率及びレベルにも依存している。tacのような誘導可能なプロモーターは、*E. coli* においてタンパク質発現のレベルを劇的に増大するためによく用いられている。タンパク質の過剰発現は宿主細胞に害を及ぼす。従って、宿主細胞生育を制限する可能性がある。誘導可能なプロモーター系の使用は遺伝子発現の誘導前に宿主細胞を受容可能な密度に培養されるようにするので、より高い産物収率を促す。

【0141】

本発明に従って各種シグナル配列を用いることができる。生物活性ポリペプチドをコー

50

ドする配列と同族の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プロセスのために選択又は設計されたシグナル配列も用いることができる。例えば、適切なシグナル配列 / 宿主細胞の組み合わせは、*B. subtilis* 中に分泌するための *B. subtilis sacB* シグナル配列と、*Saccharomyces cerevisiae* α - 交配因子又は *P. pastoris* 分泌のための *P. pastoris* 酸ホスファターゼ *phoI* シグナル配列を包含する。シグナル配列はタンパク質をコードする配列とシグナルペプチダーゼ開裂部位をコードする配列を介して又は通常 10 未満のコドンからなる短いヌクレオチド架橋を介して直接結合してもよく、ここでこの架橋は下流の TCR 配列の正確なリーディングフレームを保証する。

【0142】

転写及び翻訳を増強する要素は真核タンパク質発現系に対して確認されている。例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) プロモーター 1000 bp を異種プロモーターのどちらかの側に位置づけることは、植物細胞における転写レベルを 10 ~ 400 倍まで上昇できる。発現構築物は適切な翻訳開始配列を包含するべきである。適切な翻訳開始のためにコザックコンセンサス配列を包含するように発現構築物を改変することは、翻訳のレベルを 10 倍まで増大できる。

【0143】

選択マーカーがよく用いられ、マーカーを目的の遺伝子とは異なる位置に結合できるように、これは発現構築物の 1 部であるか又はそれから分離している (例えば、発現ベクターで遂行される)。例は、抗生物質に対して耐性をもたらす (例えば、*bla* は *E. coli* 宿主細胞についてのアンピリシンに対する抵抗をもたらす、*nptII* は各種の原核及び真核細胞についてのカナマイシン耐性をもたらす) か又は宿主の最少培地での生育を可能にする (例えば、*HIS4* は *P. pastoris* 又は *HIS⁺ S. cerevisiae* のヒスチジン不在での生育を可能にする) マーカーを包含する。選択可能マーカーはマーカーの他に依存しない発現を許容するそれ自身の転写及び複製開始及び終止調節領域を有している。マーカーとして抗生物質耐性を用いる場合、選択用の抗生物質の濃度が、抗生物質に応じて、一般に、培地 1 mL 当たり抗生物質 10 ~ 600 μ g の範囲で変化するだろう。

【0144】

発現構築物は公知の組み換え DNA 技術を用いて構成される (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999)。制限酵素消化及びライゲーションは DNA の 2 つの断片を結合するために用いる基本的な工程である。DNA 断片の末端はライゲーションの前に改変を必要とすることがあり、これは突出部に埋めること、ヌクレアーゼ (例えば、*ExoI*、*ExoII*) で断片の末端部分を欠失すること、部位特異的突然変異、又は PCR で新規な塩基対を加えることによって達成できる。選択された断片の結合を促進するためにポリリンカー及びアダプターを用いることができる。発現構築物は、*E. coli* の一連の制限、ライゲーション、及び形質転換を用いて段階的に構成化される。発現構築物の構築のために適している多数のクローニングベクターは当該技術分野において公知であって (λ ZAP 及び pB LUE SCRIPT SK-1、Stratagene, La Jolla, CA, pET, Novagen Inc., Madison, WI、Ausubel et al., 1999 で引用されている)、特定の選択は本発明に重要ではない。クローニングベクターの選択は、発現構築物の宿主細胞内への導入のために選択された遺伝子導入系に影響を受けるだろう。各段階の終わりに、得られた構築物を、制限、DNA 配列、ハイブリダイゼーション及び PCR 分析で分析できる。

【0145】

発現構築物を宿主内で線状又は環状の何れかのクローニングベクターとして形質転換するか、又はクローニングベクターから除去してそのまま用いるか、若しく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中への発現構築物の導入及び保持を促進する。発現構築物は多数の公知遺伝子導入システム (例えば、自然の形質転換受容性、化学的媒介形質転換、プロトプラスト形質転換、エレクトロポレーション、遺伝子銃形質転換、トランスフェクション、又は接合) (Ausubel et al., 1999; Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1999) で用いられる。

10

20

30

40

50

rook et al., 1989) の何れかによって宿主細胞内へ導入される。遺伝子導入システムは用いられた宿主細胞及びベクターシステムに応じて選択される。

【0146】

例えば、発現構築物を、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 *S. cerevisiae* 内に導入することができる。*S. cerevisiae* のエレクトロポレーションは容易に達成されて、スフェロプラスト形質転換に匹敵する形質転換効率を生じる。

【0147】

本発明は更に、目的の融合タンパク質を単離するための製造工程を提供する。この工程では、調節配列と操作可能に結合している目的のタンパク質をコードする核酸がその中に導入されている、宿主細胞（例えば、酵母、真菌、昆虫、細菌又は動物細胞）は培養培地中で生産規模に生育させて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刺激する。続いて、採取した宿主細胞から又は培養培地から目的の融合タンパク質を単離する。標準的なタンパク質精製技術を、培地又は採取した細胞から目的のタンパク質を単離するために用いることができる。特に、精製技術は、回転ボトル、攪拌フラスコ、組織培養プレート、バイオリアクター、又は発酵槽を包含する各種の実行から、大規模で（例えば、少なくともミリグラム量で）所望の融合タンパク質を発現及び精製するために用いることができる。

【0148】

発現されたタンパク質融合複合体は公知の方法で単離及び精製できる。典型的には、培養培地を遠心分離又はろ過し、次いで上澄液を親和性又は免役親和性クロマトグラフィー、例えば、プロテイン A 若しくはプロテイン G 親和性クロマトグラフィー、又は結合した TCR 若しくはその免疫グロブリン領域のような発現された融合複合体と結合するモノクローナル抗体の使用を含む免役親和性プロトコルにより精製する。本発明の融合タンパク質は公知技術の適切な組み合わせによって分離及び精製できる。これらの方法は、例えば、塩析沈殿及び溶媒沈殿のような溶解性を利用する方法；透析、限外ろ過、ゲルろ過、及び SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法；イオン交換カラムクロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーのような特異的な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な疎水性の差を利用する方法及び等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法、Ni-NTA のような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は、前記の Sambrook et al. 及び Ausubel et al. を概して参照されたい。

【0149】

本発明の融合タンパク質が実質的に純粋であることが好ましい。すなわち、融合タンパク質が少なくとも 80%、又は 90%～95% の均質性 (w/w) であるように、融合タンパク質が細胞に自然に付随している細胞置換分から単離されていることが好ましい。少なくとも 98%～99% の均質性を有している融合タンパク質は、多くの医薬、臨床及び研究適用に対して最も好ましい。実質的に精製されると融合タンパク質は治療適用のために、夾雑物を実質的に含まないはずである。部分的に又は実質的に純粋にまで精製されると、可溶性融合タンパク質を治療的に、又は本明細書に記載されているようなインビトロ又はインビボでのアッセイの実施に用いることができる。実質的な純度はクロマトグラフィー及びゲル電気泳動のような各種標準技術によって確認できる。

【0150】

本発明の可溶性 TCR 融合複合体は、TCR 融合複合体が発現後に培養培地に分泌され得るように十分に切断されている TCR ドメインを含有している。従って、切断された TCR 融合複合体は疎水性残基に富んだ領域、典型的に TCR 分子の膜貫通及び細胞質性ドメインを包含しない。従って、例えば、本発明の好ましい切断型 TCR 分子に関しては、TCR 分子の β 鎖のおよそ最後のシステインから C 末端及び α 鎖のおよそ最後のシステインから C 末端が切断型 TCR 融合複合体中に含まれていないことが好ましい。

【0151】

本発明の融合タンパク質複合体は癌性である又は感染している、或いは1つ又はそれ以上の病気に感染するかもしれない各種細胞を用いるインビトロ又はインビボでの使用に適している。

【詳細な説明】

【0152】

ヒトのインターロイキン - 15 (hIL - 15) は抗原提示細胞上に発現されたヒト IL - 15 受容体 α 鎖 (hIL - 15 R α) によって免疫エフェクター細胞にトランス提示されている。IL - 15 R α は、主に細胞外 s u s h i ドメイン (hIL - 15 R α S u) を介して、高い親和性 (38 pM) で IL - 15 に結合する。hIL - 15 及び hIL - 15 R α S u ドメインを複数ドメイン融合複合体を構築するための骨格 (スカフォールド) として用いることができることをここで明らかにする。2価及び二重特異性 T 細胞受容体 (TCR) 融合複合体の両方をこのスカフォールドを用いて hIL - 15 及び hIL - 15 R α S u 鎖の N 末端と融合している各種一本鎖 (s c) TCR ドメインの組み合わせを介して形成した。これらの融合体において、s c TCR ドメインは抗原結合活性を保持して hIL - 15 ドメインは受容体結合及び生物活性を示す。2価 s c TCR 融合体は増大した分子結合力に起因する改善された抗原結合能力を示す一方、2つの異なった s c TCR ドメインを含有している融合体は2つの同種ペプチド / MHC 複合体と結合する能力があった。s c TCR 及び s c C D 8 α β ドメインを含有している二重特異性ドメインも2価或いは1価の s c TCR 分子よりも同族ペプチド / MHC 複合体との有意に優れている結合を示して、IL - 15 : IL - 15 R α スカフォールドが複数ドメインの所定の標的との相互作用をサポートするのに必要な柔軟性を示すことを明らかにした。驚くべきことに、機能性 TCR は、hIL - 15 及び hIL - 15 R α S u ドメインとの融合体として別々に TCR α 及び β 鎖を同時発現させることによって形成できた。最後に、融合した hIL - 15 ドメインを部位特異的突然変異によって操作してスーパーアゴニスト又はアンタゴニストサイトカイン活性をもたらすことができた。同時に、これらの特性は、hIL - 15 及び hIL - 15 R α ドメインを新規な標的免疫分子を作成するための多用途で機能的なスカフォールドとして用いることができることを示している。

10

20

【0153】

IgG ドメイン、特に Fc 断片は、承認された生物製剤を含む多数の治療用分子のための二量体のスカフォールドとして成功裏に用いられている。例えば、エタネルセプトはヒト IgG 1 の Fc ドメインに結合している可溶性ヒト p 7 5 腫瘍壊死因子 - α (TNF - α) 受容体 (sTNFR) の二量体である。この二量体化は、エタネルセプトが TNF α 活性の阻害を一量体の sTNFR より 1, 000 倍まで強力にすることを可能にして、そして一量体形態より5倍長い血清半減期を有する融合体を提供する。結果的にエタネルセプトはインビボにおける TNF α の炎症誘発活性を中和して多数の異なった自己免疫適応症について患者の予後を改善するのに効果的である。

30

【0154】

その二量体化活性に加えて、Fc 断片は、天然のキラー細胞 (NK)、好中球、食細胞及び樹状細胞上に提示される Fc γ 受容体との相補活性及び相互作用を介して細胞毒性エフェクター機能ももたらす。抗癌治療用抗体及びその他の抗体ドメイン - Fc 融合タンパク質との関連では、これらの活性は、動物の腫瘍モデル及び癌患者で観察された効果に重要な役割を果たしているようだ。しかし、これらの細胞傷害性エフェクターの応答は多くの治療適用において十分ではないかもしれない。従って、Fc ドメインのエフェクター活性を改善して拡張すること、並びに T 細胞活性を含む、細胞溶解性免疫応答を標的治療分子を介して疾患部位で採用するその他の方法を開発することにかかなりの関心がもたれている。IgG ドメインは、二重特異性抗体を形成するためのスカフォールドとして用いて、従来のハイブリドーマ融合技術によって作成された産物を質的及び量的に改善している。この方法はその他のスカフォールドの欠点を回避するが、臨床的開発及び使用をサポートするのに十分なレベルで二重特異性抗体を哺乳動物細胞内で産生するのは困難である。

40

【0155】

50

新規な、ヒト由来免疫刺激性多量体スカフォールドを開発する目的で、ヒトIL-15 (hIL-15) 及びIL-15受容体ドメインの使用に焦点を合わせた。hIL-15は、高い結合親和性(平衡解離定数(KD) $\sim 10^{-11}$ M)でhIL-15受容体 α 鎖(hIL-15R α)と結合するサイトカインの短い4本 α 螺旋束ファミリーの一員である。次いで、得られる複合体をT細胞及びNK細胞表面上に表示されているヒトIL-2/15受容体 β /共通 γ 鎖(hIL-15R $\beta\gamma$ C)複合体とトランスに提示する。このサイトカイン/受容体相互作用はエフェクターT細胞及びNK細胞の拡張及び活性化を引き起こし、これがウイルス感染及び悪性腫瘍細胞を撲滅するために重要な役割を果たす。正常には、hIL-15及びhIL-15R α は樹状細胞内で同時に産生されて細胞内で複合体を形成し、これは続いて分泌されて細胞表面上にヘテロ二量体として提示される。従って、hIL-15とhIL-15R α の相互作用の特徴が、これらの鎖間結合ドメインが新規なヒト由来免疫刺激性スカフォールドとして働いて標的的特異的結合が可能な可溶性二量体分子を作成することを示唆している。本明細書に、T細胞受容体(TCR)及びCD8結合ドメインを含んでいる多数の融合タンパク質の作成及び特性を記載して、標的抗原に対する増大した機能的結合親和性を有する可溶性ホモ二量体及び多部位特異的タンパク質複合体のためのヘテロ二量体の両方を作成するためにhIL-15:hIL-15R α スカフォールドの使用の可能性を明らかにする。これらの融合タンパク質が免疫エフェクター細胞応答の刺激を可能にする強力なhIL-15活性を保持していることも示した。

10

20

【0156】

本明細書で、新規な、二量体分子を作成するためのhIL-15:hIL-15R α Suをベースとするスカフォールドの使用の可能性を明らかにする。二量体融合タンパク質複合体はそのhIL-15ドメイン及び結合ドメインの免疫刺激性及び標的的特異的生物活性を保持して、hIL-15及びhIL-15R α の付加が融合ドメインの空間的配置を著しく変更しないこと、及びサイトカイン活性に影響を及ぼさずに適度の構造的柔軟性をもたらすことを示唆した。従って、このスカフォールドは、c264scTCR二量体のような、多価融合複合体を形成して、分子、又はc264scTCR/c149scTCRヘテロ二量体のような、二重特異性分子の全体的結合親和性を増大するために用いることができる。全ての場合で、可溶性融合タンパク質は組み換えCHO細胞培養で比較的高いレベルで産生されて広範囲の細胞株スクリーニング及び最適化を行わずに細胞培養上澄液中にリットル当たり数ミリグラム)、そして細胞培養上澄液から容易に精製できた。hIL-15:hIL-15R α Suをベースとするスカフォールドの有用性が、ポリペプチド鎖2本の細胞外ドメインをhIL-15及びhIL-15R α SuのN末端と融合することにより、 α/β TCRのような可溶性、生物活性、2本鎖分子を作成するために、拡張できたことも明らかにした。この形態が、恐らくhIL-15:hIL-15R α Su複合体の遠位N末端と融合している相互に折り込まれたTCR α/β と複合体の中間部に位置するhIL-15R $\beta\gamma$ C結合部位との間の立体障害に起因している、hIL-15活性の中等度の減少をもたらした。その他の形態も可能で従来の方法を用いて作成することができる。

30

40

【0157】

hIL-15:hIL-15R α Suをベースとするスカフォールドは、CD8 α/β 及びTCRドメインが同じpMHC I複合体と結合可能であるが空間的に異なった位置にある、OT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体を作成するために用いることもできる。可溶性pMHC I試薬を用いる先の検討は、CD8がオフ速度及びオン速度の両方への影響を介して細胞表面でのTCR:pMHC I相互作用を安定化して増大することを確認している。pMHC I特異的T細胞の活性化に対するCD8の要件がTCR:pMHC I親和性と逆相関するように、T細胞のCD8コレセプター活性への依存性を確認する際にこの効果は重要である。しかしながら、可溶性の精製したCD8 α/β 、TCR及びpMHC Iタンパク質を用いる幾つかの結合研究は、TCR:pMHC I相互作用がCD8の存在又は非存在による影響を受けないことを示して、共同結合効果を示唆しなかった。

50

【0158】

OT1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体を用いる細胞に基づく S P R 結合研究の結果は、これら先の報告とは著しく異なって、同じ可溶性分子上に提示された T C R 及び C D 8 ドメインが、1 価又は 2 価 T C R ドメインを担持している分子で観察されたよりもより優れたペプチド / M H C 結合活性を示したことを明らかにしている。この効果は、T 細胞上での C D 8 及び T C R 分子への p M H C I 結合に関する観察と一致して、p M H C I : O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体複合体のより遅いオフ速度及びより速いオン速度の両方に反映される。従って、O T 1 s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体は T 細胞上の O T 1 T C R の結合を模倣し、これが C D 8 コレセプター活性の p M H C への強い依存性を示す。これらの結果は、s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体及びこの分子の変異体が無細胞系における第三級の T C R : p M H C I : C D 8 複合体間の分子間相互作用を更に切断するための非常に有用なツールとして機能することを示唆している。また、増強された p M H C I 結合活性を有する s c T C R / s c C D 8 ヘテロ二量体ベースの試薬は、結合活性を増大するために T C R ドメインを突然変異させる必要なしで、病的細胞上の抗原提示を検出するのに有用である。

10

【0159】

O T 1 s c T C R 融合体に関する S P R 実験の結果は、1 価 O T 1 T C R α / β ヘテロ二量体の固定化 O V A ペプチド / H - 2 K b 複合体への結合親和性がほぼ 6 μ M であることが示されている Alam et al. によって報告されたものと異なっている。この実験では、30 μ M の明確な K D を示した O T 1 s c T C R / b i r A 単量体及び O T 1 s c T C R / b r i A 二量体の O V A ペプチド / H - 2 K b 結合を検出できなかった。1 本鎖 V α - リンカー - V β - C β 分子として形成されると、O T I T C R は結合活性を欠失する可能性がある。しかし、O T 1 s c T C R / b r i A と 2 本鎖構築物を比較して同等の活性を観察した。更に、先の研究は、C D 8 結合を無効にする K b 突然変異を有する O V A ペプチド / H - 2 K b 四量体が、高濃度の四量体を用いたときでさえ、O T 1 T C R 担持細胞への特異的結合活性を殆ど或いは全く示さないことを明らかにして、O T 1 T C R とその同族 p M H C I の間の非常に低い親和性相互作用を示唆している。対照的に、C D 8 結合突然変異がない O V A ペプチド / H - 2 K b 四量体は、本研究で観察された C D 8 の O T 1 T C R 結合活性を増強する能力と一致して、O T 1 T C R 担持細胞を色鮮やかに染色することが可能であった。

20

30

【0160】

h I L - 15 : h I L - 15 R α S u をベースとするスカフォールドは、I g G スカフォールドの F c ドメインとほぼ同様に多価又は多重特異的の標的治療薬を作成するために利用できる。エフェクター N K 及び C D 8 $^{+}$ 記憶 T 細胞の増殖及び活性化を刺激するその強力な活性を用いて、h I L - 15 ドメインは抗体依存性の細胞傷害性及び I g G に基づく手法に関連する相補体活性化を越えて、潜在的な免疫治療メカニズムの範囲を拡大する。I g G 分子の F c ドメインの活性を操作するために用いられているものと同様の手法を用いて、I L - 15 ドメインが、その機能的活性を増大又は減少するように突然変異できることを明らかにする。I L - 15 ドメインに N 72 D 突然変異を含んでいる h I L - 15 : h I L - 15 R α S u 融合分子が生物活性の 3 ~ 4 倍の増加を示す一方で、I L - 15 D 8 N 突然変異は殆ど又は全く活性を表わさないことが示される。I L - 15 スーパーアゴニストに基づく融合タンパク質は癌又は感染性疾患のための標的免疫治療薬として役立つ一方、疾患部位で I L - 15 応答細胞を阻害できる I L - 15 アンタゴニストは、同種移植拒絶反応及び炎症性自己免疫疾患、特に記憶 C D 8 T 細胞が疾患病状の一因となっている場合の治療における治療可能性を有している。非標的 I L - 15 突然変異 / F c γ 2 a アンタゴニストタンパク質は、実験動物モデルにおける脾臓及び心臓同種移植の拒絶反応の抑制及び関節炎の発症及び進行を予防するのに有効であることが既に示されている。h I L - 15 : h I L - 15 R α S u 融合タンパク質に関連している I L - 15 アンタゴニストドメインを用いる同様のアプローチが可能である。さらに、ある特定の状況下では、多量体分子を作成するために機能的に不活性なスカフォールドを有することが望まし

40

50

い。例えば、IL-15R β γ との相互作用を除去するIL-15D8N突然変異を含んでいるscTCR/hIL-15:scTCR/hIL-15R α Su融合体がIL-15受容体複合体を提示する細胞の優れたTCR抗原特異的染色をもたらすことを見出した。

【0161】

本明細書における説明の目的のために標的ドメインとしてTCR及びCD8分子に焦点を合わせているが、hIL-15:hIL-15R α Suスカフォールドを、抗体、接着分子、又はその他の受容体に由来するタンパク質ドメインを用いてその他の新規な分子を構築するために使用できることを理解されたい。結晶構造に基づいて改変に利用可能なhIL-15及びhIL-15R α SuのC末端とのタンパク質ドメイン融合体を創出することも可能である。得られる分子は4つまでの異なった標的認識性能を有することができる。適切な融合パートナーを用いて、これらのタイプの分子は免疫エフェクター細胞と標的細胞の接合を促進して標的細胞の効果的な殺傷を達成できる。また、エフェクター細胞増殖及び細胞毒性をサポートする免疫刺激活性を提供することによって、複合体のIL-15ドメインはこれらの過程を更に補強できる。各種の多機能分子は、抗癌及び抗ウィルス免疫治療剤として用いるためにこの概念に基づいた。

10

【0162】

これまでは、標準的な哺乳類細胞における弱い発現レベルが治療薬としての組み換えhIL-15の開発を制限していた。本明細書で明らかにしたように、臨床開発及び潜在的に商品化をサポートできるレベルでのscTCR/hIL-15:scTCR/hIL-15R α Su複合体の発現を達成することができる。また、IL-15R α 鎖が、メカニズムに縛られることなく、恐らくサイトカインの薬物動態を改善することによって、hIL-15のインビボ活性を増強することが示されている。hIL-15:hIL-15R α Su複合体のこれら2つの特性は、その多価特質及び/又は多重特異性標的設計と組合わせて、癌及びウィルス感染症に対する免疫治療薬剤としてhIL-15の最大の能力を得る機会をもたらしている。

20

【0163】

実施例に提供されているように、免疫グロブリンFcドメインを含有しているhIL-15:hIL-15R α Su融合タンパク質複合体は更なる利点を有することが見出された。Fcドメインの結合が多価及び多重特異性相互作用が可能な多鎖分子の作成を許容する。実際に、同じscTCRの複数ドメインを含んでいる本発明の融合タンパク質複合体は二量体scTCR融合体の活性に基づいて予測されたものより増大した抗原結合活性を示した。ある場合では、本発明の融合複合体は、IL-15R β γ C担持免疫細胞とFc受容体担持免疫細胞の両方を結合して活性化でき、強力な免疫刺激活性を許容する。2つのIL-15ドメインを含んでいる本発明のタンパク質融合複合体は、他のIL-15融合タンパク質と比較したときに想定されるよりも優れたIL-15活性を示すことが分かった。更に、本発明のタンパク質融合複合体は、ペプチド/MHC提示標的細胞に対する抗体Fc依存性細胞傷害性を介在することにおいてTCR-IgG1融合タンパク質よりもより有効であった。改善された活性は、タンパク質融合複合体のペプチド/MHC複合体との増強された結合及び/又はFc受容体又はIL-15受容体を提示するエフェクター細胞との増大した反応性の結果であるかもしれない。更に、突然変異生成分析によって、融合タンパク質複合体のTCR、IL-15及びIgGFcドメインのそれぞれがその結合及び機能活性を変化させるように容易に且つ独立して操作されて望ましい生物学的効果を有する多重特異的複合体をもたらすことが分かった。

30

40

【0164】

本発明の融合タンパク質複合体は、遊離のIL-15より有意に優れた薬物動態プロファイルを有していることが明らかにされた。また、異なった分析方法で観察された類似したPKプロファイルに基づくと、融合タンパク質複合体はポリペプチド鎖解離又は切断の証拠を有していない多鎖分子としてインビボで無傷のままである。更に、本発明の融合タンパク質複合体は動物において標的担持及び非標的担持腫瘍の両方に対する抗腫瘍活性を

50

介在できることが示され、そして等モル用量を投与した r h I L - 1 5 よりもより強力な抗腫瘍効果を示した。また、融合タンパク質の有効用量による治療はこれらの動物モデルで良好な耐性を示した。

【実施例】

【0165】

実施例 1 - c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i - h u I g G 1 及び c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 遺伝子融合体を含有している発現ベクターの構築。

T 2 分子 (T 2 M) と呼ばれる融合タンパク質は多鎖ポリペプチドから成っている (図 1) 。本発明の一実施態様では、これらのポリペプチドの 1 つは、国際特許公開第 W O 2 0 0 8 1 4 3 7 9 4 号公報 (参照により本明細書に取り込まれている) に開示されているようにタンパク質結合ドメインと I L - 1 5 (又 I L - 1 5 変異体) の間の融合を含んでいる。T 2 の第 2 ポリペプチドはタンパク質結合ドメイン、I L - 1 5 R α ドメイン及び免疫グロブリンドメインの間の融合を含んでいる。或いは、タンパク質結合ドメイン - I L - 1 5 融合タンパク質は、更に免疫グロブリンドメインと結合してもよい。好ましい免疫グロブリンドメインは他の免疫グロブリンドメインと相互作用して多鎖タンパク質を形成できるようにする領域を含んでいる。例えば、I g G 1、C_H 2 - C_H 3 のような、免疫グロブリンの重鎖領域は相互作用して F c 領域を作成できる。好ましい免疫グロブリンドメインは F c 受容体又は相補体タンパク質結合活性を包含する、エフェクター機能を有し、そして又はグリコシル化部位を有する領域も含んでいる。ある実施態様では、T 2 分子の免疫グロブリンドメインは、F c 受容体又は相補体の結合活性若しくはグリコシル化を減少又は補強して、それにより得られるタンパク質の生物活性に影響を及ぼす突然変異を含んでいる。例えば、F c 受容体との結合を減少する突然変異を含んでいる免疫グロブリンドメインは F c 受容体担持細胞に対する低い結合活性を有する T 2 分子を作成するために用いることができ、これは T C R - 特異抗原を認識又は検出するように設計された試薬に対して有利であろう。

【0166】

ヒト I L - 1 5 R α s u s h i ドメイン (h u I L - 1 5 R α S u s h i) 及びヒト I g G 1 定常領域 (h u I g G 1 C_H 1 - C_H 2 - C_H 3) と融合している p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) 1 本鎖 T C R (c 2 6 4 s c T C R と呼ぶ) を含有している発現ベクターの構築を以下のように実施した。c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 遺伝子断片を先に構築した p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 ベクターから P a c I 及び M 1 u I で制限消化して除去した。遺伝子断片をゲルで精製し、同じ制限酵素で消化した p M S G V ベクターにライゲートして、p M S G V - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 と呼ぶ構築物をもたらした。C M V プロモーターを含有している DNA 断片を p c D N A 3 . 1 から精製し、続いて N r u I 及び H i n d I I I で消化した。この断片を、P a c I で消化してある p M S G V - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 内にライゲートして、DNA ポリメラーゼで充填して平滑末端を作成した後 H i n d I I I で消化した。得られた構築物を p M C - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 と称した。先に構築された、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 (国際公開第 W O 2 0 0 8 1 4 3 7 9 4 号公報を参照されたい) 由来の h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子断片をフロン

トプライマー： 5' - T G T T G G G A A T T C A T C A C G T G C C C T C - 3'、

及びバックプライマー： 5' - T G G T G T G A A T T C T C T A A T G C A T T T G A G A C T G G - 3'、

を用いて、次の P C R 条件下で K O D H O T S t a r t D N A ポリメラーゼ (E M D) によって増幅した：95℃、2分、1サイクル；95℃、20秒、65℃、20秒；70℃、20秒、35サイクル；72℃、10分、1サイクル。ヒト I L - 1 5 R α S u s h i 遺伝子の P C R 産物をゲルで精製して E c o R I で消化した。この遺伝子を E c o R I で消化してある p M C - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 内にライゲートした。ヒト

IL - 15 R α S u s h i ドメインをコードする DNA 断片の p M C - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 内へのクローニングは以下の配列を含んでいる c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i - h u I g G 1 融合遺伝子をもたらした：3' - 免疫グロブリン重鎖リーダー - 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 - ヒト IL - 15 R α S u s h i - ヒト I g G 1 重鎖。図 2 に示されている、正確なヒト IL 15 R α S u s h i 遺伝子挿入を含有している得られたベクター (p M C . c 2 6 4 s c T C R - S u / I g G 1 . P U R) を診断 P C R に基づいて同定し、そして DNA シークエンシングで再確認した。c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 遺伝子及びタンパク質はそれぞれ図 3 及び図 4 に示される。

【 0 1 6 7 】

c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 R α S u s h i - h u I g G 1 遺伝子融合を含有している異なった発現ベクター (内在 E c o R I 部位 (及び対応するコード配列) を欠失している) を構築した。このベクターのために、c 2 6 4 s c T C R 遺伝子断片の部分を c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 ベクターから、フロントプライマー：

5' G T A C G A C T T A A T T A A C T C G A G C C A C C A T G G A G A C A G A C A C A C T C C T G T T A T G G 3' ,

及びバックプライマー：

5' C T T C C C G T T A A C C C A C C A G C T C A G C T C C A C G T G 3' ,
を用いて増幅した。

【 0 1 6 8 】

c 2 6 4 s c T C R 遺伝子断片の T C R β 定常領域の残りの部分を c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 ベクターから、フロントプライマー：

5' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3' ,

及びバックプライマー：

5' G A G G G C A C G T G A T G T C T G C T C T A C C C C A G G C C T C 3' ,
を用いて増幅した。

【 0 1 6 9 】

h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子断片を 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、フロントプライマー：

5' G T A G A G C A G A C A T C A C G T G C C C T C C C C C C A T G 3' ,

及びバックプライマー：

5' C C T T G G T G C T A G C T C T A A T A C A T T T G A G A C T G G G G G T T G T C C 3' ,

を用いて増幅した。

【 0 1 7 0 】

h u I g G 1 重鎖定常領域遺伝子断片を c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 ベクターから、フロントプライマー：

5' C C A G T C T C A A A T G T A T T A G A G C T A G C A C C A A G G G C C C A T C G G T C 3' ,

及びバックプライマー：

5' G T A A T A T T C T A G A C G C G T T C A T T A T T T A C C A G G A G A C A G G G A G A G G C T C T T C 3' ,

を用いて増幅した。

【 0 1 7 1 】

T C R β 定常領域配列及び h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子を含有している得られた産物を鋳型として用いて、フロントプライマー：

5' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3' ,

及びバックプライマー：

10

20

30

40

50

5' CCTTGGTGCTAGCTCTAATACATTTGAGACTGGGGGT
TGTCC3'

を用いるPCRによって遺伝子断片を作成した。

【0172】

得られたPCR産物及びhuIgG1遺伝子断片は、フロントプライマー：

5' CTGGTGGGTTAAACGGGAAGGAGGTTGCACAGTGGGGTCC
3'

及びバックプライマー：

5' GTAATATTCTAGACGCGTTTCATTATTTACCAAGGAGAC
AGGGAGAGGCTCTTTC3'

を用いるPCRによってTCRβc/huIL15RαSushi/huIgG1融合遺伝子を作成するための鋳型の役割を果たした。

【0173】

c264scTCR PCR産物をPacI及びHpaIで消化して、TCRβc/huIL15RαSushi/huIgG1融合遺伝子をHpaI及びNsiIで消化した。消化した遺伝子断片をCMVプロモーターを含有しているpMSGVレトロウィルスベクター内にライゲートした。得られたベクターをc264scTCR/Sushi/huIgG1-pMSGV又はpMSGVc264SuiGと表した(図5)。c264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1遺伝子及びタンパク質の配列は、それぞれ図6及び図7に示される。

【0174】

1本鎖TCR結合ドメイン(すなわち、c264scTCR)とIL-15(又はIL-15変異体)の融合を産生する発現ベクターの作成は国際公開第WO2008143794号公報に開示されている。特に有用なIL-15変異体はIL-15の生物活性を減少若しくは消去するもの又はIL-15の生物活性を増大するものである。例えば、72位を置換した(すなわち、N72D置換)ヒトIL-15変異体はIL-15の生物活性を5~10倍増大できる。IL-15変異体は以下の表に提供される。

【0175】

【表1】

突然変異体	位置	8	61	65	72	108	IL15Rβγc 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			-	+	-

10

20

30

40

50

【0176】

すぐ上の図に記載されているIL-15変異体を含有している融合タンパク質複合体を、TCR特異的抗原である、p53(a a 2 6 4 - 2 7 2) / H L A - A 2 . 1と結合するそれらの能力について特徴付けた。p53(a a 2 6 4 - 2 7 2) / H L A - A 2 . 1を提示する細胞を生成するために、H L A - A 2 . 1陽性T2細胞(2×10^6 / mL)に20 μ Mのp53(a a 2 6 4 - 2 7 2)ペプチドを、1 $\times$ P L E (Altor Bioscience)の存在下37 で2~3時間負荷した。ペプチドで培養されなかったT2細胞及びIL-2 / 1 5 R β γ cを発現する3 2 D β 細胞をコントロールに供した。次いで、p53ペプチド負荷T2細胞、コントロールT2細胞、又は3 2 D β 細胞(2×10^5 / 1 0 0 μ L)を次の二量体融合タンパク質複合体3 2 0 nMと4 で30分間培養した：

- 1) 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、
- 2) 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、及び
- 3) 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。

1 6 0 nMの精製したc 2 6 4 s c T C R h u I L 1 5融合タンパク質及び1 6 0 nMの精製した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 で3時間培養して、これらの複合体を生成した。次いで染色する、細胞を洗浄緩衝液(0.5%のB S Aと0.05%のアジ化ナトリウムを含有しているP B S)で1度洗浄して、0.5 μ gのビオチニル化マウスモノクローナル抗ヒトTCR C β 抗体(B F 1)で1 0 0 μ Lの洗浄緩衝液中、4 で30分間染色した。細胞を1度洗浄して、0.5 μ gのR - フィコエリトリン共役ストレプトアビジンで1 0 0 μ Lの洗浄緩衝液中、4 で30分間染色した。細胞を洗浄してフローサイトメトリーで分析するために再懸濁した、

【0177】

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、p53ペプチド負荷T2細胞を特異的に染色することに関して、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と同等の活性を示した。これらの結果は、これらの融合複合体のそれぞれにおいて多価s c T C Rドメインが十分に機能的であることを示している。IL-15変異体(D 8 A及びD 8 N)を含有している融合タンパク質複合体は3 2 D β 細胞上に存在している1 L - 1 5 R β γ c受容体との結合活性を示さない。1 L - 1 5 R β γ c受容体結合の同様な検討をIL-15変異体を含有しているその他の融合タンパク質を用いて実施して表1に要約した。結果は、IL-15変異体を含有している本発明の融合タンパク質及び融合タンパク質複合体がペプチド/M H C複合体を認識する活性を保持して、1 L - 1 5 R β γ c受容体との結合活性の減少又は増大を示すことを示唆している。

【0178】

ある特定のT2分子に関しては、1 L - 1 5及びIL-1 5 R α 成分と融合した複数の異なった結合ドメインを有することが有用である。このような分子の活性を説明する一例では、H L A - A 2と関連して提示されるp53(a a 1 4 9 - 1 5 7)ペプチドに特異的な、1本鎖TCRドメイン(c 1 4 9 s c T C Rと呼ばれる)をIL-1 5 N 7 2 Dドメインと結合して、得られた融合タンパク質を、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1融合タンパク質と同時に発現させて、c 2 6 4 s c T C R及びc 1 4 9 s c T C R結合ドメインを有する多鎖T2タンパク質を産生した。

【0179】

c 1 4 9 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D遺伝子融合を生成するために、c 1 4 9 s c T C R遺伝子断片(T C R - α 、リンカー、T C R - β 及びT C R - β 定常断片)をc 1 4 9 s c T C R / h u I g G 1発現ベクターからフロントプライマー：

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

C T T C T T C 3 ' ,

及びバックプライマー :

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

を用いて増幅した。

【 0 1 8 0 】

c 1 4 9 s c T C R / h u I g G 1 ベクターの T C R β 定常領域の残分をフロントプライマー :

5 ' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3 ' ,

及びバックプライマー :

5 ' C A C C C A G T T G T C T G C T C T A C C C C A G G C C T C 3 ' ,

を用いて増幅した。

【 0 1 8 1 】

h u I L 1 5 N 7 2 D 遺伝子を c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 発現ベクターからフロントプライマー :

5 ' C T G G G G T A G A G C A G A C A A C T G G G T G A A T G T A A T A A G T G A T T T G 3 ' ,

及びバックプライマー :

5 ' C C T C A T G C A T T C G A A T C C G G A T C A T T A A G A A G T G T T G A T G A A C A T T T G G 3 ' ,

を用いて増幅した。

【 0 1 8 2 】

T C R β 定常領域配列及び h u I L 1 5 N 7 2 D 遺伝子を含有している得られた産物を鋳型として用い、フロントプライマー :

5 " C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3 ' ,

及びバックプライマー :

5 ' C C T C A T G C A T T C G A A T C C G G A T C A T T A A G A A G T G T T G A T G A A C A T T T G G 3 ' ,

を用いる P C R によって遺伝子断片を生成した。

【 0 1 8 3 】

c 1 4 9 s c T C R P C R 産物を P a c I 及び H p a I で消化して、T C R β c / h u I L 1 5 N 7 2 D P C R 産物を H p a I 及び B s t B I で消化した。消化した遺伝子断片を C M V プロモーター含有 p M S G V レトロウィルスベクター内にライゲートした。得られたベクターを c 1 4 9 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D - p M S G V n 又は p M S G V - c 1 4 9 I L 1 5 N 7 2 D と称した (図 8) 。 c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 遺伝子及びタンパク質の配列をそれぞれ、図 9 及び図 1 0 に示す。

【 0 1 8 4 】

実施例 2 - 融合タンパク質を産生するトランスフェクトした宿主細胞株の生成。

発現ベクターを、いくつかの異なる形質転換、トランスフェクション又は形質導入方法によって多様な宿主細胞株内に導入することができる。このような一方法では、C H O - K 1 細胞 (5×10^5) を 6 ウェルのプレートに播種して C O ₂ インキュベータ中で 1 晩培養した。細胞を、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合遺伝子を含有している発現ベクター 5 μ g で、1 0 μ L の M i r u s T r a n s I T - L T 1 試薬 (Mirus) を用いて製造会社のプロトコールに従ってトランスフェクトした。トランスフェクション後 1 日目に細胞を 4 m g / m L の G 4 1 8 (Invitrogen) を用いて選択した。G 4 1 8 耐性細胞を増殖し、T C R / I L 1 5 融合タンパク質発現細胞を限界希釈法で 3 回サブクローニングして産生細胞株を、捕獲抗体、抗ヒト T C R C β 抗体 (B F I) 及び検出抗体であって既に記載されている (出願公開第 W O 2 0 0 8 1 4 3 7 9 4 号公報を参照されたい) ビオチニル化抗ヒト I L - 1 5 抗体 (B A M 2 4 7 、 R & D Systems) を用いる T C R 及び

10

20

30

40

50

h u I L 1 5 特異的 E L I S A によって、培養培地中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スクリーニングした。次いで、c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D 産生細胞株を、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i - h u I g G 1 融合遺伝子を含む偽型レトロウイルスベクターで以下のようにして形質導入した。

【 0 1 8 5 】

偽型レトロウイルスベクターを産生するために、ポリリジンコーティングした 1 0 c m のディッシュ (BD Bioscience) 内で 2×10^6 個の 2 9 3 G P パッケージ細胞を C O ₂ インキュベーター内で 2 日間 3 7 ° で培養した。次いで、細胞に、リポフェクタミン 2 0 0 0 (Invitrogen) を用いて、9 μ g のプラスミド p M C - c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 及び 4 μ g の V S V - G エンベロープタンパク質をコードするプラスミド p M D - G を同時導入した。トランスフェクション後 4 8 時間目に、ウイルスを含む上澄液を採取して、0 . 4 5 μ M のフッ化ポリビニリデンフィルターを通過させて細胞残屑を除去した。1 0 μ g / m l のポリブレン (Sigma-Aldrich) の存在下でウイルスを c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D 産生細胞 (6 ウェルプレート中、 1×10^5 細胞 / ウェル) に適用した。形質導入後 2 日目に、細胞を 1 0 μ g / m l のピューロマイシン及び 2 m g / m l の G 4 1 8 を用いて選択した。ピューロマイシン及び G 4 1 8 耐性細胞を増殖し、T 2 融合タンパク質複合体発現細胞を限界希釈法で 3 回サブクローニングして、産生細胞株を、捕獲抗体、抗ヒト I g G 抗体 (Jackson ImmunoResearch)、及び検出抗体であるビオチニル化抗ヒト I L - 1 5 抗体 (B A M 2 4 7、R&D Systems) で h u I g G 1 / h u I L 1 5 特異的 E L I S A を用いて、培養培地中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スクリーニングした。

【 0 1 8 6 】

実施例 3 - T 2 融合タンパク質の生成及び精製。

c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 を発現する細胞株を生育条件 (すなわち、小規模培養フラスコ、スピナー、若しくは攪拌フラスコ、又は大規模の中空繊維、ウェーブバッグ若しくは攪拌タンク生物反応器、又は同等の培養容器及び反応器中で、2 5 ~ 3 7 ° で 5 ~ 2 8 日間) 下で培養して、培養培地中に可溶性タンパク質として T 2 分子を産生した。T 2 分子を精製するために、培養培地を pH 調節してセファロースに共有結合させた抗 T C R 抗体 (B F 1) を含む免疫親和性カラムに付した。カラムを洗浄して、T 2 分子を 0 . 5 M のクエン酸ナトリウム、p H 4 . 0 で溶出した。溶出したタンパク質を濃縮して緩衝液をリン酸緩衝食塩液 (P B S) に交換し、次いで r プロテイン A - セファロースカラムに付した。洗浄工程に続いて、タンパク質を 0 . 5 M のクエン酸ナトリウム、p H 4 . 0 で溶出し、次いで P B S に緩衝液を交換した。得られたタンパク質をクーマシー - 染色 S D S - P A G E 及びサイズ排除クロマトグラフィーで特性化した。

【 0 1 8 7 】

還元 S D S - P A G E 条件下で、精製した T 2 タンパク質は、ホモ二量体分子に予想される単一バンドに移動する精製した c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 Δ C H 1 融合タンパク質と比較して、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 成分に予想される分子量に対応する 2 つのポリペプチドバンドに移動した (図 1 1)。非還元変性条件下では、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 バンドは二量体ポリペプチドと一致する分子量に移動するのに対して、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D バンドはその単量体形態と一致していた。サイズ排除ゲルろ過クロマトグラフィーにより、天然の T 2 タンパク質は 4 本鎖 ($2 \times$ c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D、 $2 \times$ c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1) 分子の予想される分子量で溶出された (図 1 2)。これらの結果は、図 1 に示すように、T 2 分子が h u I L 1 5 N 7 2 D 及び h u I L 1 5 R α S u s h i ドメインの間の相互作用並びに h u I g G 1 間の共有結合相互作用に一致している多鎖構造を示すことを確認している。

10

20

30

40

50

【0188】

同様な哺乳動物細胞発現及び親和性クロマトグラフィー精製方法を本明細書に記載されているその他のT2タンパク質複合体を生成するために用いた。

【0189】

実施例4 - T2分子の結合活性のインビトロでの特性化

T2分子のドメインの結合活性を特性化してこれらの活性をその他の融合タンパク質のそれと比較するためにインビトロアッセイを実施した。IgG1ドメインを特性化するために、マイクロタイターウェルを抗ヒトIgG1抗体でコーティングして、c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1鎖から成る、等モル量の精製したT2タンパク質、又は精製したc264scTCR/huIgG1融合タンパク質をウェルに適用した。結合及び洗浄工程に続いて、結合したタンパク質を標準的なELISA条件下で抗ヒトIgG1抗体を用いて検出した。

10

【0190】

図13に示されているアッセイの結果は、T2分子のIgG1ドメインが、TCR/IgG1融合体の相当するドメインと同等の抗体結合活性を示し、T2IgG1ドメインが生来の構造を保持することを示唆していることが明らかになった。T2分子のTCRドメインを同様のアッセイで評価した。等モル量のT2又はc264scTCR/huIgG1タンパク質がIgG1Abでコーティングしたウェル上に捕獲されて抗ヒトTCR Cβ抗体(W4F)で検出された。

20

【0191】

図14に示されているように、T2タンパク質は抗TCR抗体に対して、c264scTCR/huIgG1タンパク質より2倍高い反応性を示した。T2分子の4本鎖TCR融合タンパク質組成物をc264scTCR/huIgG1融合体のホモ二量体組成物と比較すると、このことは予想される。T2分子のTCRドメインのペプチド/MHC結合活性を評価した。等モル量のT2(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1鎖から成る)又はc264scTCR/huIgG1タンパク質を抗ヒトIgG1Abでコーティングしたウェルに捕獲してp53(aa264-272)ペプチド/HLA-A2ストレプトタビジン-HRP四量体で検出した。図15に示すように、T2タンパク質は、ペプチド/MHC試薬に対して、c264scTCR/huIgG1タンパク質より3倍高い結合活性を示した。その構造及び抗TCRAb反応性(図14を参照されたい)に基づくT2タンパク質はc264scTCR/huIgG1よりわずかに2倍高い結合活性を示すことが予測されるので、このことは予想外であった。従って、T2分子構造は、個々の成分に基づいて予測されるものよりもより優れた抗原特異的結合活性をもたらす。この増強した結合活性は、より小さい立体障害、優れた親和性効果、協調相互作用及び/又はTCRドメインとペプチド/MHC抗原の間の優れた構造適合の結果であろう。

30

【0192】

実施例5 - T2IL-15ドメインの生物活性の特性化

T2分子のIL-15ドメインの活性も評価した。マイクロタイターウェルを抗ヒトIL-15抗体でコーティングして、c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1鎖から成る、精製したT2タンパク質、又は精製したc264scTCR/huIL15N72D融合タンパク質の等モル量をウェルに適用した。結合及び洗浄工程に続いて、結合したタンパク質を標準的なELISA条件下で抗ヒトIL-15抗体で検出した。

40

【0193】

図16に示したように、T2タンパク質は、それぞれのT2分子が2つのIL-15ドメインを含有しているという仮説に基づいて予測したように、抗IL-15Abに対してc264scTCR/huIL15N72D融合体と比較して増大した反応性(1.6倍高い)を示した。T2分子のIL-15ドメインの生物活性を、サイトカイン依存性3

50

2 D β 細胞株を用いる増殖アッセイで更に特性化した。細胞増殖を測定するために、3 2 D β 細胞 (2×10^4 細胞 / ウェル) を濃度を上昇させた T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る) 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質と 3 7 で 4 8 時間培養した。細胞増殖試薬 W S T - 1 (Roche Applied Science) を製造会社の手順に従って、細胞生育の終わりの 4 時間の間に添加した。代謝的に活性な細胞による W S T - 1 の染色されたフォルマザン染料への変換を 4 4 0 n m の吸収測定で確認した。

【 0 1 9 4 】

図 1 7 に示したように、T 2 タンパク質は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質より 3 倍優れた生物活性を示した。その構造及び抗 I L - 1 5 A b 反応性 (図 1 6 を参照されたい) に基づくと、T 2 タンパク質は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D より 2 倍だけ高い I L - 1 5 活性を示すと予測されるので、このことは予想外であった。これらの結果は共に、これらの成分単独では又は他の融合タンパク質形態と関連しては観察されなかったものより増大した T C R 結合活性及び I L - 1 5 生物活性をもたらす T 2 分子形態の多くの利点を説明している。

【 0 1 9 5 】

I L - 1 5 応答免疫細胞の増殖を促進する T 2 タンパク質の能力を霊長動物モデルで試験した。カニクイザル (2 頭、雄 1 頭、雌 1 頭) に精製した T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る) 0 . 5 m g / k g を静脈内に注射した。5 日後に採血した血液を C D 8 記憶 T 細胞マーカー (C D 8 及び C D 9 5) 及び N K 細胞マーカー (C D 5 6 及び C D 1 6) で染色して処置前に採取した血液と比較した。図 1 8 に示すように、T 2 処置は C D 8 $^{+}$ C D 9 5 $^{+}$ 記憶 T 細胞 (A) 及び C D 5 6 $^{d i m}$ C D 1 6 $^{+}$ エフェクター N K 細胞 (B) の増殖をもたらした。これらの結果はインビボで強力な I L - 1 5 活性を示している T 2 分子と一致している。

【 0 1 9 6 】

実施例 6 - T 2 F c ドメインの結合及び生物活性の特性化

T 2 分子の I g G 1 F c ドメインの結合活性を細胞結合アッセイで特性化した。F c ガンマ受容体担持 U 9 3 7 細胞を 3 3 n M の T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る)、c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 又は A 2 A L 9 s c T C R / I g G 1 (陰性コントロール) と 2 0 分間培養した。細胞を 1 度洗浄して、P E - 共役 p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 四量体と培養した。U 9 3 7 細胞表面上の F c ガンマ受容体への結合を、図 1 9 A に示すように、フローサイトメトリーで分析した。タンパク質の濃度範囲を用いる同様な U 9 3 7 結合試験も実施して、染色細胞に対する平均蛍光強度を図 1 9 B にプロットした。

【 0 1 9 7 】

これらの検討の結果は、U 9 3 7 細胞が、対応する c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 融合タンパク質より T 2 分子によってより効果的に染色されることを示していて、T 2 分子の F c 受容体結合活性を検証した。F c ドメインの生物活性を評価するために、抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) 活性を介在する T 2 分子の能力を評価した。この検討では、0 . 1 3 7 ~ 1 0 0 n M の T 2 タンパク質、c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 又は A 2 A L 9 s c T C R / I g G 1 (陰性コントロール) を 9 6 ウェルプレートに添加した。H L A - A 2 陽性 T 2 標的細胞を 1 0 μ M の p 5 3 a a 2 6 4 - 2 7 2 ペプチドでパルスして 5 0 μ g / m l のカルセイン - A M で標識化した。融合タンパク質をウェル当り 1×10^4 標的細胞と混合して、 1×10^6 / ウェルの新鮮なヒト P B M C を添加した。プレートを C O ₂ インキュベーター中、3 7 で 2 時間培養し、1 0 0 μ l の条件培地を採取して、溶解細胞からのカルセイン放出を分析した。カルセインを E x - 4 8 5 n m、E m - 5 3 8 n m、及びカットオフ - 5 3 0 n m で蛍光リーダーを用いて定量した。特異的な細

10

20

30

40

50

胞溶解を次の式で算出した：特異的溶解 = $[e \times p - (\text{バックグラウンド} - \text{自動放出})] / [\text{完全放出} - (\text{バックグラウンド} - \text{自動放出})] \times 100\%$ 。E x p = 融合タンパク質 + T 2 細胞 + P B M C ; バックグラウンド = 培地のみ ; 自動放出 = T 2 細胞のみ ; 完全放出 = T 2 細胞 + 0 . 5 % トリトン X - 100。

【0198】

データ点当り3通りに決定した結果を図20に示してT2タンパク質の2つの異なったロットを特性化した。結果は、T2タンパク質が、ペプチド/MHC提示標的細胞に対してTCR-IgG1融合タンパク質よりもより効果的にADCC様活性を介在することを示している。改善された活性は、T2分子のペプチド/MHC複合体への増強された結合及び/又はFc受容体又はIL-15受容体を提示しているエフェクター細胞との増大した反応性の結果であろう。

10

【0199】

実施例7 - 細胞上に提示されたペプチド/MHC複合体と結合するT2分子の特性化

T2タンパク質の細胞上のペプチド/MHC標的との結合活性を評価するために、HLA-A2陽性T2細胞を各種の量のp53aa264-272ペプチドでパルスした。次いで、細胞をそれぞれ83nMのT2タンパク質(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIgG1又はA2AL9scTCR/IgG1(陰性コントロール)と培養した。細胞をビオチニル化抗TCR Ab(BF1)及びストレプトアビジン-PEと培養した。次いで、細胞を、図21Aに示すようにフローサイトメトリーで分析した。染色細胞に対する平均蛍光強度を図21Bにプロットした。

20

【0200】

結果は、T2分子がc264scTCR/huIgG1融合タンパク質と比較して、細胞上のp53ペプチド/HLA-A2複合体を検出する増強された能力を表わすことを示す。これらの結果は、T2タンパク質が、c264scTCR/huIgG1融合よりもより効果的に標的細胞上の腫瘍関連ペプチド抗原と結合できることを示唆している。

【0201】

別のペプチド/MHC標的に特異的なTCRドメインを含有しているT2分子を用いて同様な結果が期待される。例えば、ヒト腫瘍関連タンパク質; p53、gp100、MART1、MAGE-A3、PSMA、PSA、Her2/neu、hTERT、チロシナーゼ、スルビビン、WT1、PR1、NY-ESO1、EGFR、BRAF及びその他に由来する様々なペプチドがHLA分子に結合すること及びTCR相互作用を介するヒトT細胞応答に対する標的であることが知られている。更に、HIV、HCV、HBC、CMV、HTLV、HPV、EBV及びその他に由来するウィルスペプチド抗原を提示するHLA複合体に特異的なTCRが同定されている。これらのTCRは、IL-15又はhuIL15RαSushiタンパク質と融合でき、そして上記のような適切なペプチド負荷抗原提示細胞上でペプチド/MHC反応性について特性化できる。

30

【0202】

実施例8 - 2つの異なったTCRドメインを担持しているT2分子の特性化

上で示したように、T2分子のIL-15、IL-15Rα及びIgG成分と融合した複数の異なったTCRドメインを有することは有用である。これは、1つ以上の抗原標的活性を単一の多鎖タンパク質内に存在させることができる。この手法の実行可能性を明らかにするために、c264scTCR-Sushi-hIgG1-pMSGVc及びc149scTCR-hIL15N72D-pMSGVn発現ベクターをIMDM-10培地で培養したCHO細胞内に同時トランスフェクトした。室温で6日間トランスフェクト体を培養した後、培養上澄液を採取した。c149scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1のT2分子をELISAで特性化した。c264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1及びc264scTCR/huIL15N72Dの精製したT2分子をコントロールとして用いた。TCRドメインを評価する1つのアッセイでは、ウェルを抗ヒトTCR Ab(

40

50

B F 1) でコーティングし、融合タンパク質を添加して、結合したタンパク質をビオチニル化抗ヒト T C R A b (W 4 F - B N) で検出した。

【 0 2 0 3 】

図 2 2 に示した結果は、 c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 から成る T 2 分子の T C R ドメインが抗 T C R 抗体で検出可能であったことを示している。T 2 タンパク質の I g G 1 及び I L - 1 5 ドメインを評価するために、上記のようなヤギ抗ヒト I g G A b 捕獲及び抗ヒト I L - 1 5 A b 検出から成る E L I S A を用いた。

【 0 2 0 4 】

図 2 3 に示したように、 c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 から成る T 2 分子はこの形態で検出可能であり、I g G 及び I L - 1 5 N 7 2 D を含有しているタンパク質鎖の間の相互作用を示した。c 1 4 9 s c T C R ドメインの活性も、抗ヒト I g G A b 捕獲及び p 5 3 (a a 1 4 9 - 1 5 7) ペプチド / H L A - A 2 ストレプタビジン - H R P 四量体による検出を用いる E L I S A で試験した。

【 0 2 0 5 】

図 2 4 に示したように、 c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 から成る T 2 分子はこの形態で検出可能であり、I g G 1 ドメインを有する分子も c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖の間の相互作用を介する p 5 3 (a a 1 4 9 - 1 5 7) ペプチド / H L A - A 2 複合体との結合活性も有していることを示した。抗ヒト I g G A b 捕獲及び p 5 3 (a a 1 4 9 - 1 5 7) ペプチド / H L A - A 2 或いは p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 四量体による検出、又は抗 T C R A b (B F 1) 捕獲及び抗 T C R A b 若しくは抗 I L - 1 5 A b 検出から成る更なるアッセイは、それぞれのドメインが c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 及び c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖から成る T 2 タンパク質において機能的に結合されたことを立証した (図 2 4) 。

【 0 2 0 6 】

別のタンパク質鎖、すなわち、 c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖上でこれら 2 つの T C R ドメインが発現される T 2 分子も作成した。これらの分子の F c 及び T C R 活性を、続いて U 9 3 7 細胞と結合して、そして p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 四量体による検出、次いでフローサイトメトリーによって評価した。

【 0 2 0 7 】

図 2 5 に示したように、 c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る T 2 分子は、F c ドメインを介する U 9 3 7 細胞上の F c ガンマ受容体を結合すること及び c 2 6 4 s c T C R ドメインを介して p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 複合体を認識することが可能であった。これらの検討は複数の機能的 T C R ドメイン並びに I L - 1 5 、 I L - 1 5 R α 及び I g G 1 ドメインを有する T 2 分子が図 1 に示す構造を形成できることを立証している。

【 0 2 0 8 】

実施例 9 - マウス及びカニクイザルにおける T 2 タンパク質薬物動態の特性化

I L - 1 5 による治療可能性の主な制約はインビボにおけるサイトカインの非常に短い生物学的半減期である。動物モデルにおける T 2 分子の生物学的薬物動態特性を評価するために、H L A - A 2 / K b トランスジェニックマウス (5 匹マウス / 時点) に精製した T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る) 1 3 5 μ g / マウスを静脈内注射した。この c 2 6 4 s c T C R が制限されている、H L A - A 2 . 1 の存在がタンパク

10

20

30

40

50

質の薬物動態に影響を与え、そして他の非ヒトモデルより薬物動態より関連性のある「ヒト化」観点をもたらすはずであるので、HLA-A2/Kbトランスジェニックマウスモデルを選択した。この試験で、注射後0、1、4、8、24、48、72、及び96時間点で血液を採取して血清中のT2タンパク質の濃度をELISAで測定した。2つの異なったELISA形態を用いた：1)ヤギ抗ヒトIgG Ab捕獲及び抗ヒトTCR Ab (W4F-BN) 検出、又は2)ヤギ抗ヒトIgG Ab捕獲及び抗ヒトIL-15 Ab検出。これらのアッセイは無傷タンパク質及び多鎖タンパク質複合体の安定性の評価を可能にする。

【0209】

図26Aに示したように、T2分子は静脈内注射に続いて約9～11時間の生物学的半減期を有していた。これは報告されているIP注射後のマウスで観察された～1時間のヒトIL-15の半減期 (Stoklasek TA et al. 2006. J. Immunol. 177: 6072) よりかなり長い。また、T2分子は供給された用量と一致した血清濃度に達したのに対して、先に報告された研究 (Stoklasek TA et al. 2006. J. Immunol. 177: 6072) ではIL-15の投与された用量は殆ど血清中で回収されなかった。従って、T2分子は遊離のヒトIL-15より有意に優れている薬物動態プロファイルを有している。更に、2つのELISAを用いて観察された同様なPKプロファイルに基づくと、T2タンパク質は開裂の証拠の無い、多鎖分子として無傷のままであった。

【0210】

霊長動物モデルにおけるT2分子の生物学的薬物動態特性を評価するために、カニクイザル (2頭、雄1頭、雌2頭) に精製したT2タンパク質 (c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1鎖から成る) 0.5mg/kgを静脈内注射した。この試験で、注射後0、1、4、8、24、48、72、96及び120時間点で血液を採取して血清中のT2タンパク質の濃度をELISAで測定した。3つの異なったELISA形態を用いた：1)抗ヒトTCR Ab (βF-1) 捕獲及びHRP共役ヤギ抗ヒトIgG Ab検出、又は2)抗ヒトIL-15 Ab捕獲及びHRP共役ヤギ抗ヒトIgG Ab検出、又は3)抗ヒトIL-15 Ab捕獲及び抗ヒトTCR Ab (W4F-BN) 検出。これらのアッセイは無傷タンパク質及び多鎖タンパク質複合体の安定性の評価を可能にする。

【0211】

図26Bに示したように、T2分子は静脈内注射に続いて約4～6時間の生物学的半減期を有していた。これは報告されている皮下注射後のサルで観察された～1時間のIL-15の半減期 (Villinger, F. et al. 2004. Vaccine 22: 3510) よりかなり長い。従って、T2分子は遊離のIL-15より有意に優れた薬物動態プロファイルを有しているように思われる。更に、3つのELISAで観察された同様のPKプロファイルに基づくと、これらのデータはT2タンパク質が開裂の証拠の無い、多鎖分子として無傷のままであることを示唆しているネズミのPKデータをサポートしている。

【0212】

実施例10 - 異種移植腫瘍マウスモデルにおける固形ヒト腫瘍に対するT2分子の抗腫瘍活性

T2分子の治療効果を確認するために、ヌードマウスにおいてp53+HLA-A2+A375メラノーマ細胞株を有する原発腫瘍増殖モデルにおける抗腫瘍活性を試験した。腫瘍細胞をヌードマウスに皮下注射して、腫瘍を治療開始前に100mm³まで生育させた。腫瘍担持マウスに、32μg/用量 (1.6mg/kg) のc264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1鎖から成るT2タンパク質、32μg/用量 (1.6mg/kg) のc264scTCR/huIL2、又は60μg/用量 (3mg/kg) の264scTCR/huIgG1を静脈内注射した。マウスを1日おきに1週間処置し (3回注射)、9日の休息期間に続いてその後1日おきに更に一週間処置した (3回注射)。試験中に、腫瘍の生育を測定して腫瘍容量をプロットした (図27)。結果をPBSのみで処置したマウスにおけるA

375 腫瘍の生育と比較した。

【0213】

図27に示したように、A375 腫瘍の生育はT2分子又はTCRI L2若しくはTCRIgG融合タンパク質の何れかで処置したヌードマスにおいて阻害された。以前の研究では、このモデルにおけるp53特異的TCRI L2又はTCRIgG融合タンパク質の抗腫瘍効果は、エフェクタードメイン活性を、TCRドメインを介して腫瘍部位を標的化した結果であったことが示された (Belmont et al. 2006 Clin. Immunol. 121:29, Mosquera et al. 2005 J. Immunol. 174:4781)。この可能性を評価するために、非標的化TCRドメインを有するタンパク質がA375 腫瘍異種移植マウスモデルで試験されるだろう。p53に特異的なT2タンパク質と比較した非標的化T2分子のA375 腫瘍に対する減少した有効性は、腫瘍抗原標的化がT2分子の抗腫瘍活性で役割を果たしている証拠を提供するだろう。

10

【0214】

実施例11 - IL-15及びFcドメインに突然変異を有するT2分子の特性化

国際出願公開第WO2008143794号公報に開示されているように、IL-15Rβγ鎖と相互作用するその能力を増大又は減少してその生物活性に影響を及ぼす突然変異をIL-15ドメインに導入することができる。例えば、上で示したように、N72D置換はIL-15の生物活性を5~10倍増大することができる。別の例では、アンタゴニスト機能をもたらすIL-15の活性を減少することが有用である。T2分子形態に関連するこのような突然変異の効果を試験するために、IL-15ドメインの8位(すなわち、D8N)及び65位(すなわち、N65D)の置換を含んでいるc264scTCR/huIL15構築物を作成してc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1タンパク質と同時発現した。c264scTCR/huIL15変異体及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1鎖の得られた複合体を、実施例5に記載されているように32Dβ細胞を用いるIL-15生物活性について試験した。図28に示したように、IL-15D8N及びN65D変異を含んでいるT2分子は、IL-15N72Dドメイン又はc264scTCR/huIL15融合を含んでいるT2分子と比較して32Dβ細胞増殖をサポートするそれらの能力の有意な減少を示した。実施例5の結果と一致して、IL-15N72Dドメインを含んでいるT2分子はc264scTCR/huIL15N72D又はc264scTCR/huIL15融合体の何れかよりも高いIL-15活性を示した。

20

30

【0215】

Fcガンマ受容体又は相補体と相互作用するその能力を減少することが先に示されたIgG1Fcドメイン (Hessell, A. J., et al. 2007. Nature 449: 101-1040、参照により本明細書に取り込まれている) 内にも突然変異を導入した。例えば、IgG1C_H2の234位及び235位のロイシン残基(抗体コンセンサス配列に基づく番号付け)(すなわち、...PELLGG...)のアラニン残基による置換(すなわち、...PEAAGG...)は、Fcガンマ受容体結合の損失をもたらすのに対して、IgG1C_H2の322位のリジン残基(抗体コンセンサス配列に基づく番号付け)(すなわち、...KCKSL...)のアラニン残基による置換(すなわち、...KCASL...)は相補体活性化の損失をもたらす (Hessell, A. J., et al. 2007. Nature 449: 101-1040、参照により本明細書に取り込まれている)。これらの置換をc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1構築物内に導入して、得られたタンパク質をc264scTCR/huIL15N72D又は上記の別のTCRI L2変異体と同時発現した。これらの複合体がp53aa264-272ペプチド-負荷HLA-A2陽性T2標的細胞に対するヒトPBMCのADCC活性を介在する能力を実施例6に記載されているようにして評価した。Fc機能を変化させることが知られているその他の突然変異は、例えば、Lazar et al., PNAS, 103:4005-4010, 2006 (参照により本明細書に取り込まれている) に提供されている。

40

【0216】

50

図 29 に示したように、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 - L A L A 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖を含んでいる T 2 複合体は F c - L A L A 変異体によって示された F c ガンマ受容体結合の損失と一致して高レベルの A D C C 活性を介在することができなかった。これと対照的に、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 - K A 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖又は上記の I L - 1 5 変異体 (N 6 5 D 又は D 8 N) を含んでいる複合体は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 - c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 複合体と同レベルの A D C C 活性を示した。メカニズムに捕らわれずに、これらのデータも、I L - 1 5 ドメイン及び F c 相補体結合ドメインが A D C C 活性を介在することとは関連していないという可能性に基づいて予測される。

10

【 0 2 1 7 】

I L - 1 5 及び F c 突然変異の、ヒト N K 及び T 細胞応答を刺激する T 2 分子の能力への影響も試験した。1 . 8 ~ 5 $\times 10^5$ 細胞 / m L のヒト P B M C を、上記の突然変異を含んでいる 1 n M の T 2 分子、又はコントロールとして 1 0 n g / m L の組み換えヒト I L - 2 又は I L - 1 5 を含んでいる培地中、37 °C で 4 日間培養した。

【 0 2 1 8 】

次いで、N K 細胞傷害性を、N K 感受性 K - 5 6 2 細胞を標的細胞として用いて評価した後、5 0 μ g / m l のカルセイン - A M で標識化した。各種比の P B M C 及び K - 5 6 2 細胞を混合して C O ₂ インキュベーター内、37 °C で 2 時間培養し、1 0 0 μ l の条件培地を採取して、溶解した細胞から放出されたカルセインについて分析した。カルセインを E x - 4 8 5 n m、E m - 5 3 8 n m、及びカットオフ - 5 3 0 n m で蛍光リ - ダーを用いて定量した。特異的細胞溶解を次の式を用いて計算した：特異的溶解 = [e x p - (バックグラウンド - 自動放出) / [完全放出 - (バックグラウンド - 自動放出)] $\times 100$ %、E x p = K - 5 6 2 細胞 + P B M C ; バックグラウンド = 培地のみ ; 自動放出 = K - 5 6 2 細胞のみ ; 完全放出 = K - 5 6 2 細胞 + 0 . 5 % トリトン X - 1 0 0 。

20

【 0 2 1 9 】

図 3 0 に示したように、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖を含んでいる T 2 分子との培養は、培地だけで培養した後に観察されたものと比較してヒト P B M C の N K 細胞溶解活性を刺激することができた。更に、F C ドメイン L A L A 及び K A 変異体を含んでいる T 2 分子も N K 細胞を刺激できたのに対して、I L - 1 5 ドメインに N 6 5 D 又は D 8 N 置換を含有しているものは N K 細胞傷害性を殆ど又は全く刺激しないはずだ。これらの結果と一致して、ヒト P B M C の、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖を含んでいる T 2 分子、又は F c ドメイン L A L A 及び K A 変異体を有するものとの培養は C D 5 6 + N K 細胞の増殖の増大をもたらしたのに対して、I L - 1 5 N 6 5 D 又は D 8 N 置換を含んでいる T 2 分子はそれほど N K 細胞増殖活性をもたらさなかった (図 3 1) 。それぞれの I L - 1 5 の機能性に基づいてこのような結果が期待される。

30

【 0 2 2 0 】

ある適用に対しては、T 2 分子と I L - 1 5 又は F c 受容体との間の減少した相互作用は、これらの受容体を担持している細胞との非特異的結合を減少するために望ましいだろう。これを評価するために、I L - 1 5 及び F c 突然変異を含有している T 2 分子をペプチドを負荷させた T 2 細胞を用いて T C R 特異的標的細胞認識について評価した。T 2 分子又は c 2 6 4 s c T C R - ストレプタビジン四量体陽性コントロールによる細胞染色を、実施例 7 に記載された方法を用いて p 5 3 ペプチドを負荷させた T 2 細胞 (T 2 . 2 6 5) 及び負荷させていない T 2 細胞 (T 2) 上で実施した (図 3 2 A) 。非負荷細胞の染色に基づく、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖を含む T 2 分子は、c 2 6 4 s c T C R - ストレプタビジン四量体又は B F 1 抗体コントロールと比較して、有意な細胞結合を示すことが明確である。F c L A L A 又は I L - 1 5 N 6 5 D 若しくは D 8 N 突然変異の導入

40

50

はこの細胞結合を減少して、Fc及びIL-15受容体の両方との相互作用がT2複合体結合に役割を果していることを示唆している。Fc LALAとIL-15 N65D又はD8N突然変異との組み合わせは、c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1-LALA及びc264scTCR/huIL15D8Nを含む分子が上記BF1抗体陰性コントロールを負荷していないT2細胞との結合を示さないように、T2複合体結合を更に減少する。p53ペプチド負荷細胞の染色もFc又はIL-15突然変異の導入によって達成される。しかしながら、ペプチド負荷対非負荷細胞のT2分子染色の平均蛍光強度を比較したとき(特異的対非特異的の比)、c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1-LALA及びc264scTCR/huIL15D8N鎖を含むT2分子がp53ペプチド抗原に対して最も高い染色特異性をもたらすことが明確である(図32B)。これらの結果は、T2分子のTCR、IL-15及びIgGFcドメインのそれぞれの結合活性が容易に独立して操作されて望ましい生物活性を有する多重特異的複合体をもたらすことを示している。

【0221】

別の場合では、IL-15ドメイン及びIgGFcドメイン活性を改変して、T2複合体の治療インデックスを最適化して毒性を最小化することが有用である。例えば、その治療効果の一部をADCC活性に依存している標的複合体はIL-15成分の耐容用量レベルを超える高いレベルの用量(すなわち、1~20mg/kg)を必要とするかもしれない。そのような場合は、その活性を減少する突然変異をIL-15ドメイン中に含有している複合体がより良い治療活性及びより低い毒性をもたらすと期待される。上記のIL-15ドメイン中のN65D又はD8N置換、又はIL-15活性を減少することが見出されている、I6S、D8A、D61A、N65A、N72R、V104P又はQ108Aを包含する、その他の置換を含有しているT2分子は特に注目される。

【0222】

実施例12 - 非標的化T2分子の特性化

いくつかの適用では、T2複合体を用いて特異抗原を標的化する必要はない。このような分子では、TCR結合ドメインのような抗原特異的ドメインは突然変異によって又は完全に欠失させることによって不活性化できる。本明細書に記載されている方法を用いて、T2M Δ TCRと称するhuIL15R α Sushi/huIgG1及びhuIL15D8N鎖を含むような分子の活性を、c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1及びc264scTCR/huIL15N72D鎖を含むT2分子(T2Mと称する)及びhuIgG1鎖を欠失しているT2分子(c264scTCR/huIL15R α Sushi及びc264scTCR/huIL15N72D、T2M Δ Ig又はc264scTCR二量体と称する)と比較した。実施例5に記載されているように32D β 細胞生育をサポートする能力を試験したときに、T2M Δ TCRは組み換えヒトIL-15を用いて観察されたものの>24倍である非常に強いIL-15活性を示した(図33A)。

【0223】

ヒト免疫細胞生育をサポートするT2M Δ TCRの能力も評価した。1 $\times$ 10⁶細胞/mlのヒトPBMCをT2M(0.5nM)、T2M Δ TCR(0.5nM)、又はT2M Δ Ig(1nM)の存在下又は非存在下で培地と7日間培養した。細胞を抗CD45RO及び抗CD8、又は抗CD8、抗CD95、及び抗CCR7、又は抗CD56及び抗CD16で染色して、FACSscanで分析した。図33Bに示される8つの異なったドナーから得た平均した結果は、T2M Δ TCR及びその他のT2分子が、エフェクター記憶T細胞を包含する、各種CD8+記憶T細胞及びNK細胞サブセットの増殖を効果的に刺激できたことを示唆している。これらの細胞のNK細胞活性を実施例11に記載されている方法を用いて試験した。図33Cに示される2つのドナーPBMC調製物からの代表的な結果は、T2M Δ TCR及びその他のT2分子がNK細胞溶解活性を効果的に刺激できたことを示唆している。これらの結果の全てが、T2M Δ TCRタンパク質は強力な免疫刺激性分子であることを示唆している。

10

20

30

40

50

【0224】

実施例13 - T2分子のインビボ活性

T2分子の免疫刺激活性を更に特性化するために、T2M、T2M Δ TCR、IgG1CH1ドメインを欠失しているT2M Δ TCR(T2M Δ TCR Δ CH1)、Fc-LALA突然変異を有するT2M(T2MLALA)及びIL-15D8N突然変異を有するT2(T2MD8N)をC57BL/6マウスにおいてNK及びCD8T細胞の増殖を誘発するそれらの能力について試験した。更に、c264scTCR/huIL15N72D、c264scTCR/huIL15R α Sushi及びc264scTCR/huIL15N72D+c264scTCR/huIL15R α Sushi複合体を評価した。

10

【0225】

マウスにIL-15の2.5 μ g用量に相当する量の融合タンパク質を1日目と4日目に静脈内に注射した。8日目に、血液細胞と脾臓細胞を採取し、CD8T細胞及びNK細胞について染色して、フローサイトメトリーで分析した。図34に示した結果はT2分子が血液及び脾臓のNK細胞及びCD8T細胞の両方をインビボで増殖させるのに効果的であることを示唆している。T2MLALAはT2Mと同様の活性を示して、FcR結合及びシグナル伝達はNK及びCD8T細胞の増殖に有意な役割を果さないであろうことを示唆した。T2MD8N処置はT2Mと比較すると減少した活性をもたらし、ヒトPBMCを用いるインビトロにおける分子の免疫刺激活性をD8N突然変異が消失するという知見を確認した。TCRの欠失(T2M Δ TCR及びTCR)とCH1の欠失(T2M Δ TCR Δ CH1)は減少した活性を示した。これらの結果はこれらのより小さい分子のより短い半減期に起因しているかもしれない。c264scTCR/huIL15N72D、c264scTCR/huIL15R α Sushi及びc264scTCR/huIL15N72D+c264scTCR/huIL15R α Sushi複合体もT2Mと比較して減少したインビボ活性を示して、T2分子がより強力な免疫刺激性化合物であることを示唆しているインビトロ結果を立証した。

20

【0226】

実施例14 - 多重特異的T2分子

多重結合ドメインのスcaffoldとして作用するIL-15とIL-15R α /IgGFcの融合ドメインの能力を更に特性化するために、huIL15N72Dと結合したH-2K^b-制限OVAa257-264ペプチド(SIINFELK)に特異的な1本鎖TCRドメイン(OT1scTCR)とhuIL15R α Sushi/huIgG1融合と結合した1本鎖CD8 α / β ドメインを含む、融合タンパク質複合体(OT1-CD8-T2M)を作成した。1本鎖CD8 α / β ドメインは、(G₄S)₄ペプチドリナーを介してネズミCD8 β の細胞外ドメインと結合しているネズミCD8 α の細胞外ドメインを含んでいる。CD8が、TCR特異的ペプチド/MHC接合部と遠位のMHC分子内の部位と結合することが十分に特性化される。従って、OT1-CD8-T2M複合体のOTscTCRとscCD8 α / β ドメインの両方がOVAa257-264/H-2K^b-分子上の異なった部位で相互作用すると期待される。

30

【0227】

これを試験するために、OT1-CD8-T2Mの結合活性をOT1scTCR/huIL15N72D融合体のそれとELISAで比較した。それぞれのタンパク質の等モル量を抗TCR C β mAb(H57)でコーティングしたウェル上に捕獲して、OVAa257-264/H-2K^b四量体又はIL15、CD8 α 、CD8 β 或いはTCRV α 2に対するmAbでプローブした。アッセイを抗ヒトIgでコーティングしたウェルで実施して、抗TCRV α 2でプローブした。

40

【0228】

図35Aに示したように、OT1-CD8-T2Mタンパク質は抗IL-15、CD8 α 、CD8 β 、TCRV α 2及びヒトIg抗体に対して反応性を示した。T2M融合複合体の多価形態に基づいて期待されるように、OT1scTCR/huIL15N72D

50

より抗 T C R V α 2 m A b に対して約 3 倍高い反応性があった。しかしながら、O T 1 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合体は O V A a a 2 5 7 - 2 6 4 / H - 2 K ^b 四量体との結合を殆ど或いは全く示さなかったのに対して O T 1 - C D 8 - T 2 M タンパク質では結合が明らかに表れた (図 3 5 B)。これらの結果は、O T 1 - C D 8 - T 2 M 複合体の O T s c T C R 及び s c C D 8 α / β ドメインの両方が O V A a a 2 5 7 - 2 6 4 / H - 2 K ^b 分子と結合して親和性の高い安定な相互作用をもたらすことを示唆している。

【 0 2 2 9 】

実施例 1 5 - 機能的スカフォールドとしての I L 1 5 : I L - 1 5 R α ドメイン (ペプチド / M H C クラス I (p M H C I) 四量体の製造) -

上記のような C 5 7 B L / 6 マウスリンパ球から抽出した全 R N A から、ネズミ H - 2 K b 遺伝子をクローンした。細胞外領域を H L A - A * 0 2 0 1 コード配列 (3 1) を置き換える H L A - A * 0 2 0 1 重鎖発現ベクター (3 1) 内にライゲートした。 β 2 m、H L A - A * 0 2 0 1 及び H - 2 K b 発現ベクターを個々に E . c o l i 内に形質転換し、記載 (3 1) のようにして組み替えタンパク質の発現を誘発して、不溶性封入体として発現した。ペプチドと共に複合体活性及び溶解性タンパク質を、http://www.microbiology.emory.edu/altman/jdaWebSite_v3/ptetPrepOverview.shtml に記載されているリフォールディング方法で得た。 p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) 及び (a a 1 4 9 - 1 5 7) ペプチド / H L A - A * 0 2 0 1 試薬をそれぞれ A 2 / p 5 3 . 2 6 4 - 2 7 2 及び A 2 / p 5 3 . 1 4 9 - 1 5 7 と称し、O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) ペプチド / 2 K b を K b / O V A . 2 5 7 - 2 6 4 と称する。

【 0 2 3 0 】

(E L I S A) -

免役プレート (Maxisorb, Nunc, Rochester, NY) を、 c 2 6 4 s c T C R 融合タンパク質を捕獲するための (B F 1) 8 A 3 . 3 1 m A b で、或いは O T 1 s c T C R 融合タンパク質を捕獲するための H 5 7 - 5 9 7 m A b でコーティングした。洗浄した後、結果の部に詳述したような各種プローブを用いてタンパク質を検出した。次いで、A B T S (2 , 2 ' - アジノビス [3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸] - ジアンモニウム塩) 基質を加えて、9 6 ウェルプレートリーダー (Versamax, Sunnyvale, CA) を用いて 4 0 5 n m における吸光度を測定した。

【 0 2 3 1 】

(フローサイトメトリー) -

c 2 6 4 s c T C R 融合タンパク質複合体を特性化するために、T 2 細胞をペプチド負荷エンハンサー (P L E、Altor BioScience Corp., Miramar, FL) の存在下、3 7 で 2 時間 p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチドでパルスした。O T 1 s c T C R 融合タンパク質複合体について、ネズミリンパ腫 E L 4 細胞を 1 0 0 μ g / m l の O V A ペプチド及び P L E で 3 7 で 6 時間パルスした。各種の b i r A 融合タンパク質 (S A - P E と複合した) を加えて 4 で 1 時間培養した。サンプルを 2 回洗浄して、C e l l Q u e s t ソフトウェア (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて F A C S c a n フローサイトメトリーで分析した。

【 0 2 3 2 】

I L - 1 5 ドメインの結合活性を評価するために、3 2 D β 細胞を 3 2 0 n M の c 2 6 4 s c T C R 融合タンパク質複合体と 4 で 3 0 分間培養した。タンパク質の結合を、ビオチニル化 (B F 1) 8 A 3 . 3 1 m A b で 1 5 分間、及び S A - P E (それぞれ 5 μ g / m l) で 1 5 分間順に検出した。染色した細胞を上記のようにフローサイトメトリーで分析した。

【 0 2 3 3 】

(細胞増殖アッセイ) -

先に記載されている (2 5) ようにして細胞増殖を測定した。すなわち、3 2 D β 細胞 (1 $\times$ 1 0 ⁵ 細胞 / ウェル) を、等モル濃度の T C R / h I L - 1 5 R α S u の存在下又は非存在下で、濃度を増大させた s c T C R / h I L - 1 5 又は s c T C R - h I L 1 5

突然変異タンパク質と 37 で 48 時間培養した。細胞増殖試薬 W S T - 1 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を製造会社の手順に従って細胞増殖の最後の 4 時間の間に添加した。代謝的に活性な細胞による W S T - 1 の着色フォルマザン色素への変換を 440 nm における吸光度測定によって確認した。P r i z m 4 ソフトウェア (GraphPad Software, La Jolla, CA) で適合させる非線形回帰可変傾斜曲線によって実験データから作成した用量依存曲線で EC_{50} を確認した。

【0234】

(表面プラズモン共鳴) -

O t 1 s c T C R 融合タンパク質のそれらの同種 p M H C I との親和定数を、B I A c o r e 2000 計器 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) で表面プラズモン共鳴 (S P R) 手法を用いて確定した。ピオチニル化 p M H C I 複合体を、H B S 緩衝液 (10 mM の H E P E S、150 mM の N a C L、3.4 mM の E D T A、0.005 % の p 20 界面活性剤、p H 7.4) 中 $2 \mu g / ml$ のタンパク質を流速 $10 \mu l / 分$ で注入して、S A 5 センサーチップ (GE Healthcare, Piscataway, NJ) のストレプタビジンでコーティングした表面上に固定化した。これは固定化した p M H C I 複合体の 1000 ~ 1200 R U をもたらした。

【0235】

精製した O T 1 s c T C R 融合タンパク質を H B S 中で $1 \mu M$ 、 $0.5 \mu M$ 及び $0.25 \mu M$ に希釈する。それぞれの濃度を流速 $10 \mu l / 分$ で新たに固定化した p M H C I 表面上、並びにピオチンでブロックしたコントロールのストレプタビジン表面 (ベースライン) 上に 1 度注入し ($50 \mu l$) て、結合曲線を記録した。解離定数 (K_D) 及び結合 (k_{on}) と解離 (k_{off}) の比を、B I A 評価 4.1.1 ソフトウェア (GE Healthcare Sciences, Piscataway, NJ) を用いて、修正した結合曲線 (ベースラインを差し引いた) から計算した。

【0236】

(h I L - 15 : h I L - 15 R α スカフォールドを用いる s c T C R 二量体の作成) - c 264 s c T C R / h I L - 15 と称する生物活性な、二元機能を有する融合タンパク質は、h I L - 15 の N 末端を 3 つのドメイン、p 53 (a a 264 - 257) ペプチド抗原 (c 264 s c T C R) に特異的な H L A - A * 0201 - 制限キメラ T C R と融合することによって生成できることを先に示した (25) (図 36A)。c 264 s c T C R 及びヒト I L - 15 R α の s u s h i 結合ドメイン (a a 1 - 66) (h I L - 15 R α S u) を用いて同様な融合タンパク質を構築し、これは h I L - 15 結合に応答可能な構造要素を含有することが示されている。この融合タンパク質は遺伝子学的に b i r A ペプチドタグと結合してストレプタビジンの存在下でピオチニル化及びそれに続く多量体化を可能にする (32)。この融合タンパク質を c 264 s c T C R / h I L - 15 R α S u / b i r A と称し、その C H O 細胞からの発現及び精製は c 264 s c T C R / h I L - 15 のそれと同様であった (25)。これらの融合タンパク質は細胞培養上澄液のリットル当りミリグラムのレベルで容易に産生できる (データは示されていない)。

【0237】

h I L - 15 と h I L - 15 R α S u ドメインの間の高い特異的結合活性に基づいて、この融合タンパク質はヘテロ二量体複合体を形成できると推測した。更に、ヒト I L - 15 : I L 15 R α 複合体の結晶構造の実験は、2 つのタンパク質の N - 末端がほぼ 50 離れて複合体の反対端にあることを示唆した (33)。従って、s c T C R ドメインのこれらの領域との融合は複合体形成を阻害しないことが期待される。

【0238】

c 264 s c T C R / h I L - 15 と c 264 s c T C R / h I L - 15 R α S u / b i r A 融合タンパク質の間の結合の最初の証拠が、h I L - 15 及び c 246 s c T C R / h I L - 15 タンパク質を捕獲するためのプレートに結合した c 264 s c T C R / h I L - 15 R α S u / b i r A を用いる E L I S A で観察された (25)。二量体 c 264 s c T C R 融合タンパク質複合体 (c 264 s c T C R 二量体と称する) を更に特性化

するために、等モル量の精製 c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 と c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / B i r A 融合タンパク質を混合して 1 0 分以上室温で結合させた。複合体及び個々のタンパク質融合体をサイズ排除クロマトグラフィーで評価した。

【 0 2 3 9 】

図 3 6 B に示すように、精製 c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 と c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / B i r A 融合タンパク質調製物中の主要種は単量体タンパク質（それぞれ、分子量（MW）= 1 1 5 及び 1 1 3 k D a ）と一致する S E C プロファイルを示したのに対して、2 つのタンパク質の混合物は二量体複合体に対応する分子量（MW > 1 9 2 k D a ）を有する主要ピークをもたらした。従って、c 2 6 4 s c T C R 二量体調製物中により大きい分子量の種が出現したことはヘテロ二量体複合体が生成されたことの証拠である。

【 0 2 4 0 】

c 2 6 4 s c T C R 二量体を単量体 c 2 6 4 s c T C R / B i r A タンパク質と、T C R 特異抗原、p 5 3 (a a 2 4 6 ~ 2 7 2) / H L A - A * 0 2 0 1 を結合するそれらの能力について比較した。それぞれの場合に、タンパク質をビオチンリガーゼでビオチニル化した後、S A - P E と複合体化して (3 2) 先に記載されるように (3 2) 多量体フローサイトメトリー染色試薬を作成した。様々な濃度の p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチドでパルスされた H L A - A * 0 2 0 1 - 陽性 T 細胞を染色するために用いる場合、両方の試薬は、ペプチドの濃度依存的に増大する抗原特異的結合を示した (図 3 7 A) 。しかしながら、c 2 6 4 s c T C R 二量体を含む染色試薬は単量体由来 c 2 6 4 s c T C R / b i r A 対応物より最大 3 倍より良く染色した (図 3 7 B) 。メカニズムに囚われることなく、これらのデータは I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 相互作用による二量体化が s c T C R の機能活性を保存して、増大した親和性を通してその同種 H L A / ペプチドとの s c T C R 複合体の効果的な親和性を増大することを示唆している。b i r A タグによるビオチニル化を複合体の s c T C R / h I L - 1 5 の C - 末端を対象としたときに同様な結果が観察された (データは示していない) 。このことは複合体の C 末端が、二量体化又は融合タンパク質複合体の抗原結合ドメインの何れにも影響を与えずに、有意な大きさの分子のプロープ (ストレプタビジンの MW はほぼ 6 0 k D a である) と、共役するために利用しやすいことを明らかにしている。

【 0 2 4 1 】

これらの検討を、二重特異的分子を生成する可能性を試験するために拡張した。1 4 9 ~ 1 5 7 のアミノ酸残基に広がるヒト p 5 3 タンパク質の H L A - A * 0 2 0 1 制限エпитーブを認識する第 2 s c T C R (c 1 4 9 s c T C R) を作成した (2 4) 。この s c T C R を h I L - 1 5 と融合して、c 1 4 9 s c T C R / h I L - 1 5 と称する、得られたタンパク質を C H O 細胞内で c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 α S u / b i r A 融合体と同時発現した。組み換え C H O 細胞培養液の上澄液中で観察されたこの融合複合体を抗 I L - 1 5 抗体を用いて固定化して H R P - 標識化 p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) 又は p 5 3 (a a 1 4 9 - 1 5 7) ペプチド / H L A - A * 0 2 0 1 四量体の何れかでプロープした。図 3 7 C に示すように、抗 I L - 1 5 抗体が捕獲した融合タンパク質複合体は両方のペプチド負荷 H L A 四量体と結合できた。この結果は、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S u スカフォールドと融合したときに、個々の s c T C R 分子が機能活性を保持して、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S u 複合体の空間配置が個々におよそ 4 0 k D a の分子量を有している s c T C R ドメインの充填に有意には影響を及ぼさないことを明らかにしている。

【 0 2 4 2 】

h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S u スカフォールドのタンパク質二量体化に対する汎用性を明らかにするために、一方が h I L - 1 5 の N - 末端に融合していて他方が h I L - 1 5 R α S u / b i r A タンパク質の N - 末端に融合している 2 つの 1 本鎖 O T 1 T C R を対合して第 2 二量体 s c T C R 融合複合体を作成した。O T 1 は、ネズミ H - 2 K b との関連で、アミノ酸残基 2 5 7 - 2 6 4 に広がる O V A タンパク質のエピトープを認

10

20

30

40

50

識するとよく特徴付けられたTCRである(34)。組み換えCHO細胞発現のために、OT11本鎖TCR(OT1scTCR)遺伝子を作成して、hIL-15とOT1scTCR/hIL-15R α Su/birA構築物と融合した。親和性精製したOT1scTCR融合タンパク質は捕獲試薬として抗マウスTCR C β H57抗体、及びHRP標識化、OVA(aa257-264)ペプチド負荷H-2Kb四量体を用いるELISAでpMHC I結合活性を有することが見出された(図42)。OT1scTCR二量体とOT1scTCR/birA単量体の間の結合活性の相違を区別するために、c264scTCR二量体についての上記方法と同様だが、OVA(aa257-264)ペプチドを負荷したH-2Kb陽性EL4細胞を用いてフローサイトメトリー分析を行った。

【0243】

図38に示すように、OT1scTCR二量体を含むSA-PE四量体は実際に、単量体OT1scTCR/birA融合体を含むものより有意によく染色した。ストレプトアビジンセンサーチップ上に固定化されたビオチニル化OVA(aa257-264)ペプチド負荷H2-Kb/birA複合体に対するOT1scTCR単量体及び二量体の結合親和性を評価するために表面プラズモン共鳴アッセイも実施した。OVAペプチド/H-2Kb複合体に対するOT1scTCR二量体の見掛け上の結合親和性(KD)は約30 μ Mであると推定されたのに対して、単量体OT1scTCR/birA融合タンパク質については結合が観察されなかった(表1)。これらのデータは、hIL-15:hIL-15R α 相互作用による二量体化がscTCRの生物活性を保存して、増大した親和性によってscTCR分子のその同種pMHC I複合体との効果的な親和性を増大することを裏付けている。

【0244】

(Ot1scTCR/scCD8ヘテロ二量体の作成) -

CD8分子がOT1TCRとその同種OVAペプチド/H2-Kb複合体の間の相互作用に極めて重要な役割を果たしていることが先に明らかにされているので(35~37)、hIL-15:hIL-15R α Suスカフォールドは、細胞表面で発現されるOVAペプチド/H-2Kbに対するOT1TCR結合親和性を、そして細胞及び接着分子非存在条件下でCD8分子が増大するか否かを評価する機会をもたらす。これを実施するために、最初に、フレキシブルなリンカーを用いてネズミCD8の α 及び β 鎖の細胞外ドメインを融合して1本鎖形態のネズミCD8分子(scCD8)を作成した。この融合遺伝子をレトロウイルス発現ベクター中でhIL-15R α Su/birAと融合した。次いで、組み換えレトロウイルスをOT1scTCR/hIL-15融合タンパク質を発現しているCHO細胞株を感染するために用いた。ヘテロ二量体融合タンパク質複合体を培養した組み換えCHO細胞の上澄液から抗TCR抗体ベースのアフィニティークロマトグラフィーを上記のように用いて精製した。この精製したタンパク質を捕獲試薬として抗TCR抗体及びプローブとしてビオチニル化抗mCD8 α 又は抗mCD8 β mAbの何れかを用いるELISAに付した。

【0245】

図39Aに示すように、抗TCRAb固定化融合複合体はCD8 α 及びCD8 β の両方を含んでいるので、OT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体の形成を示唆している。フローサイトメトリー分析を用いて、細胞表面上に提示される様々な量のOVAペプチド/H-2Kb複合体に対するOT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体の結合活性をOT1scTCR二量体と比較した。図39Bに示すように、OT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体を含む染色試薬は、わずか10ng/mlのOVAペプチドを負荷したEL4細胞上で、OVAペプチド/H-2Kb複合体を容易に検出できたのに対して、OT1scTCR二量体を含む相当する試薬を用いたときはこのペプチド濃度で殆ど或いは全く染色が観察されなかった。ペプチドでパルスされていないEL4細胞上で、OT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体のより高いバックグラウンド染色が観察されて、細胞表面上でCD8ドメインとMHC分子の間にペプチド非依存的な相互作用が生じたことを示唆している。T細胞上で発現されたCD8分子と結合するpMHC I四量体について同様

10

20

30

40

50

な効果が報告されている(38)。

【0246】

OT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体のペプチド特異的相互作用の結果を表面プラズモン共鳴分析で更に確認した。OT1scTCR/scCD8ヘテロ二量体のOVAペプチド/H-2Kb複合体に対する結合親和性(KD)を、OT1scTCR二量体について観察された $\sim 30 \mu\text{M}$ より有意に高い、 $2.6 \mu\text{M}$ であると推定した(表1、図43)。どの融合タンパク質もコントロールVSVペプチド/H-2Kb複合体との結合を示さなかった。

【0247】

OT1scTCR二量体の2価特性がこのアッセイ形式で増大した機能的親和性をもたらすと期待されることを考えると、特異的pMHC I結合活性の相違は驚くべきことである。更に、可溶性TCR、CD8 α/β 及びpMHC Iタンパク質を独立した成分として用いて行った同様なSPR結合研究はCD8タンパク質とペプチド/H-2Kb複合体の間に単に弱い相互作用(KD30 $\sim$ 100 μM)のみを示し、TCR:ペプチド/H-2Kb相互作用に対するCD8の協調的効果を示さなかった(39 $\sim$ 41)。まとめると、これらのデータは、OT1scTCR融合体へのCD8 α/β ドメインの付加は、2価OT1scTCR分子の作成よりもpMHC I結合により大きい影響を及ぼすことを示している。本発明者らの結果は更に、hIL-15:hIL-15R α Suスカフォールドは、複雑なタンパク質-タンパク質相互作用に適合する柔軟性を有する機能的な二重特異性分子を作成するために用いることができることを明らかにしている。また、本発明者は機能的なCD8分子を可溶性1本鎖分子として構築できることを初めて示して、scCD8ドメインがヘテロ二量体分子内でOT1scTCRと複合体を形成すると、その他の接着分子が存在していない無細胞条件下で、TCR:pMHC I相互作用を増強することを明らかにした。

【0248】

(機能的TCR α/β ヘテロ二量体の作成) -

上で示したように、hIL-15及びhIL-15R α ドメインのN-末端は複合体の遠位末端にあり、このスカフォールドが多鎖タンパク質のポリペプチドと融合するために適しているか否かという問題を提起している。hIL-15及びhIL-15R α Suスカフォールドを用いて可溶性で、生物活性なヘテロ二量体TCR α/β を構築できるか否かを確認するために、細胞外OT1TCRV α -C α 及びV β -C β ドメインのC-末端をそれぞれ、hIL-15及びhIL-15R α Su/birAのN-末端に結合した。公表されている α/β TCRの結晶構造に基づく、適切に折り畳まれたOT1TCRV α/β 分子のTCRC α 及びC β C-末端アミノ酸は ~ 18 離れていると推測される(42)。OT1TCRV α /hIL-15及びOT1TCRV β /hIL-15 α Su/birA融合遺伝子を2つの別々の発現ベクター内にクローンしてCHO細胞内に同時にトランスフェクトした。分泌された融合タンパク質複合体を上記のように抗TCRC β mAbアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。還元条件下のクーマシー染色SDS-PAGEで分析すると、精製されたタンパク質のバンドが、2つの融合分子それぞれの計算された単量体MW(40kDa)と一致して、50kDaに移動した(データは示されていない)。

【0249】

精製したタンパク質を更に機能的ELISA(抗TCRC β mAbで捕獲:OVAペプチド/H2-Kb四量体でプローブ)で特性化した。図40Aに示すように、精製したタンパク質は1本鎖形態にあるOT1TCRと同等のpMHC I結合活性を有していることが分かった。同様な結果が、p53特異的264TCRのV α -C α 及びV β -C β 鎖とのhIL-15:hIL-15R α Su/birA融合体で観察された(図40B)。哺乳動物細胞内で可溶性 α/β TCRヘテロ二量体を産生する以前の試みは殆どうまくいかなかった(43、44)。従って、本発明者らの結果は、トランスフェクト細胞内でhIL-15及びhIL-15R α Su/birAdメインの結合によってTCR α 及び

10

20

30

40

50

β鎖が適切に折り畳まれていたことを示唆している。興味深いことに、h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S u スカフォールドのN - 末端との融合は、c 2 6 4 s c T C R / c 1 4 9 s c T C R ヘテロ二量体複合体を用いて観察されたように機能的に独立した結合ドメインにとって十分な空間配置を提供できる一方、O T 1 T C R 及び 2 6 4 T C R の α 及び β 鎖のような近接して対合している鎖の折り畳みを可能にする柔軟性を保持している。

【 0 2 5 0 】

(h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S u 融合複合体についての h I L - 1 5 ドメインの生物活性) -

c 2 6 4 s c T C R 二量体の h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α ドメインの I L - 1 5 受容体 (I L - 1 5 R β γ C) 結合能力を h I L - 1 5 R β 及びネズミ γ C (m y C) 鎖を担持している 3 2 D β 細胞を用いるフローサイトメトリー分析で評価した。これらの検討は野生型 h I L - 1 5 ドメインを含有している c 2 6 4 s c T C R 二量体を、更に h I L - 1 5 R β 鎖との結合を増強する (N 7 2 D) 又は減少する (D 8 N) ことが先に示されている (2 5) I L - 1 5 突然変異タンパク質ドメインを有する二量体も用いて実施した。また、本発明者らは、これらの突然変異が h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S u 複合体の形成に影響を及ぼさないことを明らかにしている (2 5)。c 2 6 4 s c T C R 二量体と培養した後、3 2 D β 細胞を抗 T C R m A b で染色して細胞に結合している融合タンパク質二量体を検出した。図 4 1 A に示したように、3 2 D β 細胞は h I L - 1 5 野生型又は h I L - 1 5 N 7 2 D ドメインを含有している c 2 6 4 s c T C R 二量体によって確実に染色されたが、h I L - 1 5 D 8 N ドメインを含有しているものでは染色されず、複合体の I L 1 5 : I L - 1 5 R α S u 部分が予測された I L - 1 5 R β γ C 結合活性を保持していることを示唆した。

【 0 2 5 1 】

融合タンパク質二量体の h I L - 1 5 生物活性も 3 2 D β 細胞を用いる細胞増殖アッセイで試験した。図 4 2 B に示すように、単量体 (s c T C R / h I L - 1 5 融合体) 又は二量体 (s c T C R / h I L - 1 5 : s c T C R / h I L - 1 5 R α S u) 融合形態中の h I L - 1 5 野生型ドメインは濃度依存的に 3 2 D β 細胞の生育をサポートできた、~ 3 0 0 p M の半数最大刺激 (half-maximal stimulation : E C ₅₀) を示した。h I L - 1 5 N 7 2 D 又は D 8 N ドメインは、これらが単量体又は二量体融合体中の何れに存在しているかに関わらず、それぞれ融合タンパク質の生物活性を増大又は消去した。これらの結果は、N 7 2 D 又は D 8 N 突然変異体を担持している非融合 I L - 1 5 サイトカインで観察された機能活性と一致している (2 5)。従って、2 つの独立した T C R ドメインを含有している融合タンパク質複合体の形成は I L - 1 5 ドメインの生物活性を有意には変化させない。対照的に、O T 1 T C R α / β ヘテロ二量体複合体に関しては I L - 1 5 活性の少なくとも 3 倍の損失があり (データは示されていない)、ヘテロ二量体 T C R 構造の形成が、ある程度、h I L - 1 5 ドメインの h I L - 1 5 R β m y C と相互作用する能力を阻害することを示唆した。更に、これらの結果は、h I L - 1 5 ドメインが受容体結合及び機能活性を増強又は減少できるように容易に操作できて、よって異なる適用において h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S u スカフォールドの使用に更に柔軟性をもたらすことを示している。

【 0 2 5 2 】

実施例 1 6 - 免疫正常マウスにおける T 2 分子の毒性プロファイル及び抗腫瘍活性

T 2 分子、I g G 1 C H 1 ドメインを欠失している T 2 M (T 2 M Δ C H 1) 及び非標的化 T 2 M Δ T C R Δ C H 1 タンパク質複合体の更なるインビボ効果を確認するために、腫瘍担持免疫正常 C 5 7 B L マウスにおいて毒性及び抗腫瘍活性を試験した。B 1 6 (5 × 1 0 ⁵ / マウス) 又は E G 7 (1 × 1 0 ⁶ / マウス) ネズミ腫瘍細胞を C 5 7 B L / 6 N H s d マウスに試験 0 日目に皮下に注射した。試験 1、4、8 及び 1 1 日目に腫瘍担持マウスに、5 1 又は 2 5 . 5 μ g / 用量の T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖から成る)、4 7 . 7 μ g / 用量の T 2 M Δ C H 1 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1

10

20

30

40

50

5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 C H 2 - C H 3 鎖から成る) (T 2 タンパク質の 5 1 μ g / 用量と等モル)、1 6 . 6 又は 8 . 3 μ g / 用量の T 2 M Δ T C R Δ C H 1 (h u I L 1 5 N 7 2 D 及び h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 C H 2 - C H 3 鎖から成る) (それぞれ T 2 タンパク質の 5 1 及び 2 5 . 5 μ g / 用量と等モル)、又は 1 . 2 μ g / 用量の r h I L - 1 5 (T 2 タンパク質の 2 5 . 5 μ g / 用量と等モル)を静脈内に注射した。試験期間中、動物の体重及び腫瘍の容量を測定して結果をプロットした(図 4 4 A - B 及び 4 5 A - B)。

【0253】

T 2 M、T 2 M Δ C H 1 及び T 2 M Δ T C R Δ C H 1 タンパク質による処置は P B S 処置後に観察されたものより有意に B 1 6 (図 4 4 A) 及び E G 7 (図 4 5 A) 腫瘍の生育を阻害して、それぞれの融合タンパク質複合体は等モル濃度で投与された r h I L - 1 5 よりもより有効であった。また、腫瘍担持マウスの体重変化の測定の通り、T 2 M、T 2 M Δ C H 1 及び T 2 M Δ T C R Δ C H 1 処置の細胞毒性効果は殆ど或いは全くなかった(図 4 4 B 及び 4 5 B)。メカニズムにとらわれることなく、これらのデータは、免疫正常マウスにおいてこれらの分子のインビボ免疫刺激活性と一致している(実施例 1 3)。

【0254】

実施例 1 7 - T 2 M 及びその誘導体の免疫刺激及び抗腫瘍活性の更なる特性化

同様な標的化 I L - 1 5 : I L - 1 5 R α - F c 複合体を更に特性化するために、c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 R α / I g G 1 F c 融合タンパク質を同時発現する組み換え C H O 細胞株を作成した。ある場合は、ヒト I g G 1 ドメインは全重鎖定常 (C H 1 - C H 2 - C H 3) を包含し、第 2 の場合は、C H 2 - C H 3 ドメイン (すなわち、 Δ C H 1) 又は F c ドメインを上記のようにして用いた。ヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメイン又は F c ドメインのタンパク質配列を図 4 6 に示す。簡単にするために、この実施例では、得られた c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D スーパーアゴニスト : c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α / I g G 1 C H 1 - C H 2 - C H 3 複合体を T 2 分子 (T 2 M) と、そして c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D スーパーアゴニスト : c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α / I g G 1 C H 2 - C H 3 複合体を T 2 M 2 (上記のように T 2 M Δ C H 1 とともに) と称する。これらの複合体の利点は F c ドメインを介する二量体化及び I L - 1 5 と I L - 1 5 R α ドメインの間の相互作用が、I L - 1 5 R β γ 陽性細胞及び F c 受容体 (F c R) 陽性細胞と結合可能な四量体標的化分子を生ずることである。また、これらのドメインそれぞれの活性を同種受容体との相互作用を減少する突然変異体によって分析できる。組み換え C H O 細胞による可溶性発現の後、これらの複合体を抗 T C R C β m A b - セファロー

【0255】

上記分析と同様に、E L I S A に基づく方法が、T 2 M 及び T 2 M 2 の s c T C R 及び I L - 1 5 ドメインがそれらそれぞれの結合活性を保持することを確認している。更に、T 2 M 及び T 2 M 2 の I g G 1 ドメインは、s c T C R - I g G 1 融合体のそれに匹敵する活性を有するペプチド / H L A 四量体での特異的検出を可能にする F c 受容体 (F c R) 担持細胞を結合する能力を保持している。T 2 M 及び T 2 M 2 は p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) / H L A - A 2 複合体を提示している標的細胞に対するヒトリンパ球の A D C C 活性を介在することができた(図 4 7)。これらの結果は、T 2 M 及び T 2 M 2 が s c T C R - I g G 融合体について先に記載される抗体様エフェクター機能を保持していることを立証する。F c R 結合活性を減少する F c 突然変異 (L A L A) を含有している複合体を用いる検討は機能的 F c ドメインが A D C C 活性に必要であったことを明らかにした。T 2 M 及び T 2 M 2 は I L - 1 5 依存性 3 2 D β 細胞株の生育もサポートしたが、T 2 M 2 は T 2 M より約 ~ 3 倍低いインビトロ I L - 1 5 活性を示した。マウスにおける免疫応答を刺激するこれらの分子の能力も評価した。I L - 1 5 (1 m g / k g) による C 5 7

10

20

30

40

50

B L / 6 マウスの処置は、白血球 (W B C) 数、脾臓重量又は血中の N K 及び C D 8 + T 細胞集団に殆ど或いは全く影響を与えなかったのに対して、I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α - I g G C H 2 - C H 3 複合体 (I L - 1 5 の用量と等モルで) による処置は、同様な I L - 1 5 : I L - 1 5 R α - F c 複合体で先に観察された結果と一致して、脾臓及び上昇した血液 C D 8 + T 細胞レベルをもたらした (図 4 8 A 及び B)。T 2 M 2 複合体は等モル用量でより強力な免疫刺激効果を示して (3 2 D β 細胞に対してより低い I L - 1 5 活性を示したにもかかわらず)、T 2 M 及び T 2 M 2 複合体の両方は W B C レベル、脾臓重量及び血液 N K 及び C D 8 + T 細胞集団の増加を刺激した。同様な処置による N K 及び C D 8 + T 細胞数に対する効果が脾臓において観察された。T 2 M 2 及び I L - 1 5 N 7 2 D / I L - 1 5 R α - I g G 複合体で処置したマウスから単離した脾細胞が、N K 感受性 Y A C 細胞に対して細胞溶解活性を示した (図 4 8 C)。用量応答検討は、0 . 4 m g / k g という低い単回用量レベルでもこれらの効果が観察されることを示している (図 4 9 A)。T 2 M 2 及び I L - 1 5 N 7 2 D / I L - 1 5 R α - I g G によるヌードマウスの処置は、血液及び脾臓中の N K 細胞のパーセントが処置後 4 日目に増加して、これが処置後 7 日目にベースライン値付近まで減少したことを示した (図 4 9 B)。まとめると、これらの結果は、T 2 M 2 複合体がマウスにおける C D 8 + T 細胞及び N K 細胞応答を、I L - 1 5 のそれよりそして N K 細胞については I L - 1 5 N 7 2 D / I L - 1 5 R α - I g G 複合体のそれより有意に高い活性で刺激可能であったことを示している。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 6 】

これらの複合体の抗腫瘍活性をヌードマウスにおける皮下 A 3 7 5 異種移植モデルで更に試験した。初期の研究では、組み換えヒト I L - 1 5、c 2 6 4 s c T C R - I L 1 5 及び c 2 6 4 s c T C R - I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質又は c 2 6 4 s c T C R - I L 1 5 N 7 2 D / c 2 6 4 s c T C R - I L 1 5 R α 複合体は、s . c . A 3 7 5 腫瘍異種移植に対して P B S 又は c 2 6 4 s c T C R - I L 1 5 R α 融合タンパク質処置と比較して効果を示さなかった (図 5 0 A)。このモデルにおける T C R - I L 1 5 融合の効果の欠如は、c 2 6 4 s c T C R - I L 2 融合体を用いて報告されている結果と対照的に、これらのタンパク質が N K 細胞応答を刺激できないことに起因していると思われる。上で示したように、T 2 M 複合体をこのモデルで試験すると、N K 細胞増殖を刺激するこれらの能力と一致して、これらは中等度だが統計的に有意な抗腫瘍活性を示した (図 5 0 B)。しかし、c 2 6 4 s c T C R - I L 1 5 融合の等モル量による処置とは対照的に、T 2 M の用量スケジュール (3 週間 1 日おきに 4 m g / k g) は有意な体重減少及び最終投与後 6 匹マウスのうち 2 匹の死亡をもたらした。臨床所見はマウスの不活発化、猫背姿勢、及び赤みかかった肌を含んでいた。別のモデルにおける I L - 1 5 タンパク質複合体の同時研究は、繰返し 1 日おき投与は良好な耐容性がないこと及び週に 1 回の投与が過剰な毒性なしで免疫刺激をもたらすことを立証した。1 日おきから週に 1 回への用量計画の変更によって、N K 細胞増殖の誘発に有効であることを示した用量レベルで、T 2 M 2 複合体が I L - 1 5 又は P B S 処置と比較して有意により強い抗腫瘍活性を示した (図 5 0 C)。更に重要なことは、この週に 1 回の投与計画が腫瘍担持ヌードマウス及び免疫正常マウスにも良好な耐容性をもたらした。

【 0 2 5 7 】

s c T C R - I L 1 5 融合体及び T 2 M 複合体の毒性プロファイルを上記のインビボ活性試験と同時に評価した。上に示したように、s c T C R - I L 1 5 融合体による 3 週間の 1 日おき処置は腫瘍担持ヌードマウスに良好な耐容性をもたらしたが、T 2 M (4 m g / k g) 処置は動物の > 3 0 % 死亡率をもたらした。これを更に、1 週間 1 日おきに 9、1 8、又は 3 6 m g / k g の T 2 M 又は等モル量の T 2 M 2 複合体を投与した H L A - A * 0 2 0 1 / K b - トランスジェニックマウスで評価した。処置の開始 1 週間後に、体重及び臨床所見において用量及び時間に依存する効果が見られた。3 6 m g / k g の T 2 M を投与されたマウスは当量の T 2 M 2 で処置されたマウスで観察された 1 2 % 減少と比較して体重の 2 0 % 損失を示した。~ 9 m g / k g の T 2 M 又は T 2 M 2 で処置されたマウ

スは1週間の期間を越えても体重の変化が観察されなかった。興味深いことに、T2Mで観察されたより高い毒性は、T2M2で処置したマウスがT2Mで処置されたマウスより高いレベルのWBC数及びNK細胞レベルを示したように、増大した免疫細胞の活性化と関連しなかった。マウスの体重、脾臓重量及び免疫細胞に対する最小効果を0.4mg/kgのT2M2の単回用量i.v.投与後に観察した。更に、カニクイザルでの予備検討がT2Mの0.5mg/kg単回i.v.用量が観察された毒性効果を何も引き起こさず、しかしCD8+記憶T細胞及びエフェクターNK細胞増殖を誘発できたことを示した。これらの検討の結果は、強力な免疫刺激及び抗腫瘍活性並びに好ましい毒性及び薬物動態プロファイルを有する標的化IL-15融合複合体を作成できることを示している。これらの検討を介して、最適化されたTCR-標的化T2M2(c264scTCR/huIL15N72D及びc264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1CH2-CH3鎖から成るT2MΔCH1とも称する)を定義して特性化した。c264scTCR/huIL15RαSushi/huIgG1CH2-CH3構築物の核酸及びタンパク質配列をそれぞれ、図51及び52に示す。

【0258】

実施例18 - 抗体標的ドメイン含んでいるT2分子の特性化

更なる疾患標的分子を作成するためのhuIL-15:huIL-15RαSuスカフォールドの有用性を明らかにするために、抗ヒトCD20単鎖抗体のC-末端をhuIL-15N72D及びhuIL-15RαSu/huIgG1CH2-CH3(Fc)鎖のN末端と結合して構築物を作成した。抗ヒトCD20単鎖抗体(抗CD20scAb)配列は柔軟なリンカー配列を介して結合しているリツキシマブ抗体の重鎖及び軽鎖Vドメインのコード領域を包含している。抗CD20scAb/huIL-15N72D構築物の核酸及びタンパク質配列をそれぞれ、図53及び54に示す。抗CD20scAb/huIL-15RαSu/huIgG1Fc構築物の核酸及びタンパク質配列をそれぞれ、図55及び56に示す。これらの配列を上記のような発現ベクター内にクローンして発現ベクターをCHO細胞内にトランスフェクトした。2つの構築物の同時発現が、可溶性抗CD20scAb/huIL-15N72D:抗CD20scAb/huIL-15RαSu/huIgG1Fc複合体(抗CD20scAbT2Mと称する)の形成及び分泌を可能にして、これをプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いてCHO細胞培養上澄液から精製した。

【0259】

上記の分析と同様に、ELISAに基づく方法は、抗CD20scAb/huIL-15N72D:抗CD20scAb/huIL-15RαSu/huIgG1Fc複合体の形成を立証した。更に、上記のような32Dβ細胞を用いるIL-15受容体結合及び細胞増殖アッセイは、この複合体がIL-15結合及び生物活性を示すことを示唆した。次いで、抗CD20scAbT2M複合体をヒトCD20+パーキットリンバ腫ダウディ細胞株に対する抗原特異的結合活性について試験した。ダウディ細胞を抗CD20scAbT2M、c264scTCRT2M又はPBSと培養した。洗浄工程に続いて、細胞に結合した融合タンパク質複合体を、PEと共役しているヤギ抗ヒトIgG抗体(GAH-Ig-PE)を用いてフローサイトメトリーで検出した(図57)。抗CD20scAbT2M複合体は、c264scTCRT2M又はGAH-Ig-PEでは観察されなかったダウディ細胞との有意な結合を示し、これらの細胞との特異的な反応性を示唆した。

【0260】

抗CD20scAbT2M複合体がADCCに基づくメカニズムを介してCD20+腫瘍細胞を殺傷できたか否かを確認する試験も実施した。カルセイン-AMで標識したダウディ標的細胞をヒトPMBC(E:T-100:1)及び各種濃度の抗CD20scT2M、c264scTCRT2M(陰性コントロール)又はキメラ抗CD20mAb(陽性コントロール)と混合した。培養期間後に、標的細胞溶解を上記のように評価した。図58に示すように、抗CD20scAbT2M複合体はCD20+ヒトリンバ腫細胞に対す

る A D C C 活性を介在することにおいて非常に効果的であった。異なったエフェクターと標的細胞の比を試験する同様な検討でこのことが立証されて、ここで抗 C D 2 0 s c A b T 2 M 複合体 (2 n M で) はキメラ抗 C D 2 0 m A B に匹敵する活性を示した (図 5 9)

。

【 0 2 6 1 】

これらの結果に基づくと、抗 C D 2 0 s c A b T 2 M 分子は標準的な異種移植腫瘍モデル (例えば、 Rossi et al. Blood 2009;114:3864; Gillis et al. Blood. 2005;105:397 2; 及び Xuan et al. Blood 2010;115:2864-2871 を参照されたい) においてヒトリンパ腫細胞に対して抗腫瘍活性を示すことが期待される。

【 0 2 6 2 】

更に、それぞれが個々に h u I L - 1 5 N 7 2 D 及び h u I L - 1 5 R α S u / h u I g G 1 C h 2 - C H 3 (F c) 鎖と融合している (又はその逆) 抗 C D 2 0 軽鎖及び重鎖ドメインを含む T 2 M 構築物を本明細書に記載のように作成して発現できる。2つのこのような融合構築物の核酸及びタンパク質配列を図 6 0 ~ 6 3 に示す。これらの融合タンパク質を含む精製した複合体は、上記のように、F c ドメイン及び I L - 1 5 生物活性、並びに C D 2 0 に特異的な結合活性を示すことが期待される。これらの複合体は C D 2 0 + 腫瘍細胞に対する A D C C 活性を介在すること及びインビボで C D 2 0 + 腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性が期待される。

【 0 2 6 3 】

その他の C D 抗原、サイトカイン又はケモカインの受容体又はリガンド、成長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 / 陰性同時刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、ウイルスコード及び細菌コード抗原、並びに細菌特異的抗原に特異的な抗体配列を用いて s c A b 又は抗体認識ドメインを含む同様な T 2 M 構築物を容易に作成できる。特に興味深いのは、C D 3、C D 4、C D 1 9、C D 2 1、C D 2 2、C D 2 3、C D 2 5、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 8、C D 4 0、C D 4 4、C D 5 1、C D 5 2、C D 7 0、C D 7 4、C D 8 0、C D 1 5 2、C D 1 4 7、C D 2 2 1、E G F R、H E R - 2 / n e u、H E R - 1、H E R - 3、H E R - 4、C E A、O X 4 0 リガンド、c M e t、組織因子、ネクチン - 4、P S A、P S M A、E G F L 7、F G F R、I L - 6 受容体、I G F - 1 受容体、G D 2、C A - 1 2 5、E p C a m、細胞死受容体 5、M U C 1、V E G F R 1、V E G F R 2、P D G F R、T r a i l R 2、葉酸受容体、アンジオポエチン - 2、α v β インテグリン受容体及び H L A - D R 抗原のエピトープに特異的な抗体ドメインを有する T 2 M である。H I V、H C V、H B C、C M V、H T L V、H P V、E B V、R S V 及びその他のウイルスに由来するウイルス抗原に対する抗体ドメインも興味深く、特に H I V エンベロースパイク並びに / 又は g p 1 2 0 及び g p 4 1 エピトープを認識するものが興味深い。このような抗体ドメインは当該技術分野で公知の配列から作成できるか或いは当該技術分野で公知の各種供給源 (すなわち、脊椎動物宿主又は細胞、コンビナトリアルライブラリー、ランダム合成ライブラリー、コンピュータモデリング等) から新たに単離できる。

【 0 2 6 4 】

更に、前述の通り、I L - 1 5 ドメイン及び I g G F c ドメインの活性を増大又は減少して、抗体標的 T 2 複合体の治療インデックスを最適化しそして毒性を最小化することは有益である。F c ドメインの活性を改変する方法は上に記載されていて当該技術分野で十分に特性化されている。このような場合、その活性を減少する突然変異を I L - 1 5 ドメインに含んでいる複合体はよりすぐれた治療活性及びより低い毒性をもたらすことが期待される。I L - 1 5 ドメインに上記の N 6 5 D 又は D 8 N 置換、又は I L - 1 5 活性を減少することが知られている、I 6 S、D 8 A、D 6 1 A、N 6 5 A、N 7 2 R、V 1 0 4 P 又は Q 1 0 8 A を包含するその他の置換を含んでいる抗体標的 T 2 分子が特に興味深い。

【 0 2 6 5 】

実施例 19 : CHO 細胞における IL - 15 N72D 及び IL - 15 R α Su / Fc 融合遺伝子の同時発現

以前の研究は組み替え IL - 15 は哺乳動物の細胞によって発現されにくいことを示している (A. Ward et al., Protein Expr Purif 68 (2009) 42-48)。しかしながら、IL - 15 R α を用いる細胞内複合体形成は ER において IL - 15 分解を抑制することが報告されている (C. Bergamaschi et al., J Biol Chem 283 (2008) 4189-4199)。従って、IL - 15 は、これを IL - 15 R α と同時発現するとより高いレベルで産生できると仮定された。N 末端にいわゆる「sushi」ドメイン (Su) を含んでいる、可溶性 IL - 15 R α 断片はサイトカイン結合に關与する殆どの構造要素を担持することが知られている。可溶性 IL - 15 R α Su (その膜貫通ドメインを含まない) と IL - 15 は溶液中で非常に安定なヘテロ二量体複合体を形成でき (複合体の K_d = 100 pM (G. Bouchaud et al., J Mol Biol 382 (2008) 1-12))、そしてこれらの複合体は IL - 15 R β γ 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 (E. Mortier et al., J Biol Chem 281 (2006) 1612-1619; M.P. Rubinstein et al., Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 9166-9171; T.A. Stoklasek et al., J Immunol 177 (2006) 6072-6080; G. Bouchaud et al., J Mol Biol 382 (2008) 1-12)。従って、IL - 15 N72D 及び IL - 15 R α Su / Fc から成る複合体の産生のために選択した (図 64 を参照されたい)。IL - 15 R α Su ドメインをヒト IgG - Fc 領域と遺伝的に融合して精製及び鎖間ジスルフィド結合による二量体化を促進した。IL - 15 N72D と IL - 15 R α Su / Fc を同時発現するために、2 つの個別レトロウイルスに基づく発現ベクター、pMSGV - IL - 15 R α Su / Fc 及び pMSGV - IL - 15 N72D を構築して、CHO 細胞に同時にトランスフェクトした。組み替え CHO 細胞を、2 つの発現ベクターによってもたらされたネオマイシン及びピューロマイシン耐性要素に基づいて選択し、次いで、限定希釈クローニングを用いて個々の生産細胞株を作成した。無血清規定培地中で、ELISA に基づき、IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体を約 100 mg / L 産生できるクローンを同定した。この結果は、IL - 15 が哺乳動物細胞中で IL - 15 R α Su ドメインと同時発現されると高レベルで発現され得るということを示した。

【0266】

実施例 20 : IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体の精製及び特性化
IL - 15 R α Su / Fc と IL - 15 N72D を組み替え CHO 細胞内で同時発現して細胞内で構築すると、細胞培養上澄液内に 4 つの異なったタンパク質の形態が予測された : 1) 2 つの IL - 15 N72D サブユニットで完全に占有されている二量体 IL - 15 R α Su / Fc 分子、2) 1 つの IL - 15 N72D サブユニットで部分的に占有されている二量体 IL - 15 R α Su / Fc 分子、3) IL - 15 結合がない少量の遊離ホモ二量体 IL - 15 R α Su / Fc 分子、及び 4) 遊離 IL - 15 N72D。IL - 15 N72D は Fc 領域を欠失しているので、培養上澄液中の全ての Fc を担持する融合タンパク質から遊離 IL - 15 N72D を分離するために r プロテイン A に基づくアフィニティー精製工程を用いた。

【0267】

次いで、IL - 15 R α Su / Fc 複合体の多種の形態を分離するためにイオン交換クロマトグラフィーを展開した。IL - 15 R α Su / Fc 二量体分子の計算した等電点 (pI) は 8.5 である。予測通りに、20 mM Tris - HCl、pH 8.0 溶液中のこのタンパク質はその後 QSF 樹脂に結合しないことが分かった。また、計算した IL - 15 N72D の pI は 4.5 である。従って、部分的に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc (すなわち、二量体 IL - 15 R α Su / Fc + 1 つの IL - 15 N72D 分子) と完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc (すなわち、二量体 IL - 15 R α Su / Fc + 2 つの IL - 15 N72D 分子) の全体の電荷は異なることが予測された。このことは、プロテイン A の精製した調製物の IEF ゲル分析と一致していて、これは 5.6 ~ 6.5 と 6.8 ~ 7.5 の pI を有す

る2つの主要な複合体のグループが完全に占有されている複合体と部分的に占有されている複合体の予測されるpIとそれぞれに一致することを明らかにした(図65A)。各タンパク質群のpIバンド間の不均質性は恐らくIgG鎖におけるグリコシル化及びC-末端リジン変異体の程度に起因している。従って、異なったイオン強度を有する緩衝液をQSSFから完全に占有されている複合体と部分的に占有されている複合体を別々に溶出するために用いた。130mMのNaCl、20mMのTris-HCl、pH8.0を用いて単一タンパク質画分(Q工程1)をQSSFから溶出して、IL-15RαSu/Fc分子の部分占有を確認するELISAに基づいて、主に部分的に占有されている複合体を含有していることが分かった。300mMのNaCl、20mMのTris-HCl、pH8.0を用いる次の工程で、Q1c及びQ2cと称する2つのタンパク質画分がQSSFから溶出された。これらの調製物に行ったELISA分析が、Q1c画分が部分的に占有されている複合体(全体の10%)と完全に占有されている複合体(90%)の混合物を含んでいたのに対してQ2c画分が完全に占有されている複合体のみを含んでいたことを示した(データは示していない)。これらの知見は精製したタンパク質製剤のIEFゲル分析と一致している(図65B)。Q工程1から溶出したタンパク質は5.6~7.5の範囲の広いpIを有している:pIが6.8~7.5のタンパク質は部分的に占有されている複合体を示している。Q工程2溶出の画分Q1cは5.6~6.5の範囲のpIを有するタンパク質(すなわち、完全に占有されている複合体)を主に含んでいたが、5.6~7.5のpIを有する少量の夾雑タンパク質を含んでいた。Q2c画分は5.6~7.5の範囲のpIを有するタンパク質のみを含んでいた。

10

20

【0268】

SEC分析で、精製したIL-15N72D:IL-15RαSu/FcのQ2c調製物が高純度で単一分子として溶出することが分かった(図66)。ホモ二量体の推定分子量は約114kDaであり、これはIL-15N72DとIL-15RαSu/Fcの融合タンパク質の推定アミノ酸配列に基づいて算出した分子量92kDaより大きかった。これは哺乳動物細胞で生産したタンパク質のグリコシル化に起因していると思われる。

【0269】

還元SDS-PAGE(図65C)で、精製したIL-15N72D:IL-15RαSu/Fc調製物は40kDa、16kDa及び13kDaの分子量を有する3つのタンパク質を含んでいることが分かった。しかしながら、N-グリコシダーゼFで消化した後は、~37kDa及び13kDaの分子量を有する2つのタンパク質のみが検出された(図65D)。これらの分子量はIL-15RαSu/Fc及びIL-15又はIL-15N72Dの計算した分子量にごく近い。このことはこれら2つのタンパク質が哺乳動物細胞で生産中にグリコシル化されて、IL-15N72Dは13kDaと16kDaの分子量を有する2つの主要なグリコシル化形態で産生されたことを示唆している。図65Cに示されている異なった精製画分中にあるこれらのIL-15N72D種の相対存在量は、ELISA及びIEFゲル分析で確認された複合体の占有のレベルと一致している。

30

【0270】

IL-15N72DとIL-15RαSu/Fcは還元SDS-PAGEで分離されてこれらのN-末端アミノ酸配列はエドマン分解法で確認された。IL-15RαSu/FcとIL-15N72Dについて、それぞれ約15のN-末端アミノ酸配列が得られた。これらのタンパク質の確認されたN-末端アミノ酸配列は2つの遺伝子コード領域から推定されるこれらのアミノ酸配列と一致した。還元SDS-PAGE上の13及び16kDaに現れた2つの主要バンドに対するアミノ酸配列はIL-15N72Dであることが確認された。この配列確認は哺乳動物細胞におけるIL-15N72Dのグリコシル化の証拠を再びもたらした。

40

【0271】

実施例21: IL-15N72D:IL-15RαSu/Fc複合体の薬物動態特性

IL-15及びインビトロで構築されたIL15:IL-15Rα/Fc複合体は、マウスにこれらのタンパク質を腹腔内注射したときに、それぞれ1時間及び20時間の血清

50

半減期を有していたことが先に報告されている (T.A. Stoklasek et al., J Immunol 177 (2006) 6072-6080)。IL-15 及び同時に発現させた、精製した IL-15 : IL-15 α Su/Fc 複合体を静脈内に投与したときに同様に挙動するか否かを評価するために、それらの薬物動態パラメータを CD-1 マウスで確認した。静脈内投与は、ヒトにおいて IL-15 : IL-15 α Su-Fc 複合体に関して用いられる薬剤送達のルートであると思われるので静脈内投与を選択した。雌のマウスに 1.0 mg/kg の IL-15 : IL-15 α Su/Fc 又は 0.28 mg/kg の IL-15 (等モル用量) を静脈内に注射して、IL-15 については注射後 15 分から 8 時間、そして IL-15 N72D : IL-15 α Su/Fc については 30 分から 72 時間の様々な時点に血液を採取した。IL-15 N72D : IL-15 α Su/Fc の血清濃度を 2 つの ELISA 形態、無傷の複合体を検出する第 1 法 (抗 IL-15 AB 検出) 及び IL-15 α Su/Fc 融合タンパク質のみを検出する別法 (抗ヒト IgG Fc Ab 検出) を用いて評価した。IL-15 の濃度は標準的な IL-15 特異的 ELISA で評価した。

【0272】

単回静脈内急速注射後の IL-15 : IL-15 α Su/Fc 及び IL-15 についての予測フィット及び実際のデータを図 67 に示す。抗 IL-15 Ab に基づく、又は抗ヒト IgG Fc Ab に基づく ELISA を用いる IL-15 : IL-15 α Su/Fc の推定半減期はそれぞれ、約 25 時間又は 18 時間であった。これらの結果は、インビボでこの融合タンパク質は開裂せず、そして IL-15 は IL-15 R α Su/Fc 分子から有意には解離しなかったことを示している。IL-15 : IL-15 α Su/Fc のクリアランス (Cl) は 0.059 ~ 0.051 mL/時間に及んで、定常状態における分布の容積 (Vss) はアッセイの形式に依存して 2.1 ~ 1.3 mL に及んだ。これと比べると、IL-15 は 0.24 時間の吸収半減期及び 0.64 時間の消失半減期を有していた。IL-15 の Cl は 49 mL/時間であり、そして Vss は 18.4 mL であった。これらの結果は、IL-15 : IL-15 α Su/Fc が、IL-15 より > 2.4 倍長い消失半減期を示し、そして > 800 倍遅く排泄されることを示している。

【0273】

実施例 22 : IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc 複合体のインビトロ及びインビボ生物活性

同時発現及び精製された IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc 複合体の生物活性を IL-15 依存性 32D β 細胞増殖アッセイを用いて評価した。このアッセイのために、インビトロで構築した (IVA) IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc 複合体 (IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc IVA) も IL-15 N72D と IL-15 R α Su/Fc を 1 : 1 の比で 40 で 30 分混合して作成した。図 68 に示すように、IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc 複合体は 32D β 細胞の生育をサポートする IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc IVA と同等の活性を有していた。IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc 複合体は 15.61 pM の EC₅₀ を示し、そして IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc IVA は 15.83 pM の EC₅₀ を示した。このことは、同時発現された IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc 複合体は細胞内で適切に処理されて精製後も完全な IL-15 活性を保持していることを明らかにしている。従って、本明細書に提示されている方法は、個々に産生したインビトロ構築及びある場合はリフォールディングタンパク質を用いる現在の戦略よりも cGMP グレードの臨床材料を作成するための優れた手段を示している。

【0274】

IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc 複合体と IL-15 wt も、C57BL/6 マウスにおいて NK 細胞及び CD8⁺T 細胞の増殖を誘発するそれらの能力について比較した。図 69 に示すように、IL-15 wt は 0.28 mg/kg の単回静脈内投与後 4 日目に NK 及び CD8⁺細胞の増殖に対して有意な効果を有していない。これに対して、IL-15 N72D : IL-15 R α Su/Fc 複合体は血中及び脾臓内の NK 及

びCD8⁺細胞の増殖を有意に促進し、これは血中のリンパ球増加症及び脾腫を導いた(図69及び70)。これらの知見はIL-15:IL-15R α 複合体がインビボでIL-15の生物活性を有意に増大したという先の報告と一致している(M.P. Rubinstein et al., Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 9166-9171; T.A. Stoklasek et al., J Immunol 177 (2006) 6072-6080; S. Dubois et al., J Immunol 180 (2008) 2099-2106; M. Epardaud et al., Cancer Res 68 (2008) 2972-2983; A. Bessard et al., Mol Cancer Ther 8 (2009) 2736-2745)。IL-15N72D:IL-15R α Su/Fc複合体のこの増大した活性は、N72D突然変異タンパク質のIL-15R β γ c複合体との増大した結合活性(X. Zhu et al., J Immunol 183 (2009) 3598-3607)、インビボにおけるIL-15R α 鎖による最適化されたサイトカインのトランス提示(樹状細胞及びマクロファージ上のFcR受容体を介して)、サイトカインドメインの二量体特性(IL-15R β γ cとの結合について増大した親和性)及びIL-15と比較して増大したインビボ半減期(25時間対<40分)との組み合わせの結果と思われる。

10

【0275】

要約すると、本明細書に記載されている結果は、IL-15N72D及びIL-15R α Su/Fc遺伝子は組み換えCHO細胞において同時発現させることができ、完全に占有されているIL-15N72D:IL-15R α Su/Fc複合体は単純に拡張可能な精製方法を用いて細胞培養上澄液から高度に精製できることを明らかにする。

【0276】

上記実施例は以下の材料及び方法を用いて実施した。

20

【0277】

(タンパク質複合体発現のためのベクターの構築)

IL-15R α Su/Fc融合遺伝子をヒトIL-15R α (ヒトIL-15R α のaa1-66)のsushidメイン及びヒトIgG1Fc断片をコードするDNA鋳型のオーバーラップPCR増幅によって構築した。シグナルペプチド-IL-15R α Suコード領域(R.L. Wong et al., Protein Eng Des Sel 24 (2011) 373-383)及びヒトIgG1-Fc遺伝子断片(L.A. Mosquera et al., J Immunol 174 (2005) 4381-4388)をプライマー対:

BA494: 5'-GACTTTC AAGCTTAAATTAAGCCACCATGGACAGACTTACTTCTTC-3';

30

BA550R: 5'-GTGAGTTTGTGTCACAAAGATTTTCGGCTCTCTTAATGCATTTGAGACTGGGGGGTTG-3'、及び

BA550F: 5'-GAGCCGA AATCTTGTGACAA AACTCAC-3';

BA393R: 5'-GTAATATTCTAGACGCGTTTCATTATTTAC CAGGAGACAGGGAGAGGCTCTTTC-3'

をそれぞれ用いて増幅した。得られたIL-15R α Su/Fc融合遺伝子をピューロマイシン耐性発現ベクターpMSGV-1(M.S. Hughes et al., Hum Gene Ther 16 (2005) 457-472)内にライゲートして発現ベクターpMSGV-IL-15R α Su/Fcを構築した。

40

【0278】

IL-15N72Dのコード配列(X. Zhu et al., J Immunol 183 (2009) 3598-3607)を、IRES領域の後にネオマイシン耐性遺伝子を搭載している改変レトロウイルス発現ベクターpMSGV-1(M.S. Hughes et al., Hum Gene Ther 16 (2005) 457-472)内にクローンして発現ベクターpMSGV-IL-15N72Dを構築した。

【0279】

(CHO細胞におけるIL-15N72D:IL-15R α Su/Fc融合複合体の同時発現)

IL-15N72DとIL-15R α Su/Fcの融合タンパク質(図64を参照されたい)を同時発現するために、pMSGV-IL-15R α Su/FcとpMSGV-I

50

L - 15 N 7 2 D を C H O 細胞内に同時にトランスフェクトした後、2 m g / m L の G 4 1 8 (Hyclone, Logan, UT) と 1 0 μ g / m L のピューロマイシン (Hyclone, Logan, UT) を含有している培地中で選択した。I L - 15 R α S u / F c 融合タンパク質も、コントロールとして組み換えヒト野生型 I L - 15 (I L - 15 w t) を負荷するのに用いるために、別に C H O 細胞で発現させた。融合タンパク質の産生のために、組み替え C H O 細胞を無血清規定培地 (S F M 4 C H O、Hyclone, Logan, UT) 中で 3 7 °C で生育した。培養物の生育細胞密度が最大に達したとき、可溶性複合体を蓄積するために培養温度を 3 0 °C に下げた。次いで、培養物の生育細胞密度が約 1 0 % 生育細胞に達したときに培養上澄液を採取した。

【0280】

(精製手順)

組み替え C H O 細胞培養培地を遠心分離し、濾過して細胞と残骸を除去してから、1 M の T r i s - H C l (p H 8 . 0) で上澄液を p H 8 . 0 に調整した。可溶性 I L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R α S u / F c 融合タンパク質複合体をアフィニティー及びイオン交換クロマトグラフィーに基づくプロセスの 2 工程を用いて精製した。

【0281】

I L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R α S u / F c 複合体は I g G 1 - F c ドメインを含んでいるので、r P r o t e i n A S e p h a r o s e F a s t F l o w (GE Healthcare) カラムを精製処理の第 1 工程として用いた。サンプルを負荷する前に、カラムを 5 カラム容量 (C V) の 2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) で洗浄し、5 C V の 0 . 1 N N a O H で 1 時間消毒し、次いで 7 C V の 2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) で平衡化した。上澄液を 1 1 m L のカラム上に 2 m L / 分で負荷させて、次いでカラムを 8 C V の 2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) で洗浄した後、7 C V の洗浄緩衝液 (0 . 1 M N a - クエン酸、p H 5 . 0) で洗浄して非特異的結合タンパク質を除去した。次いで、タンパク質を 0 . 2 M N a - クエン酸 (p H 4 . 0) で溶出して、採取したピーク画分の p H を 0 . 2 M のクエン酸を用いて直ちに p H 3 . 5 に調整した：標準ウィルス排除工程として、溶出したタンパク質を 3 0 分間この低 p H で維持した。低 p H 維持工程の後に、溶出した調製物の p H を 2 M T r i s - H C l (p H 8 . 0) を用いて p H 7 . 7 に調整した。調製物を A m i c o n U l t r a - 15 遠心濃縮器 (3 0 k D a カットオフ、Millipore, Billerica, MA) を用いて濃縮して緩衝液を 2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) に変えた後、0 . 2 2 μ m フィルター (Corning Life Sciences, Lowell, MA) を用いて滅菌濾過した。

【0282】

次いで、タンパク質調製物を Q S e p h a r o s e F a s t F l o w (Q S F F ; GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) イオン交換カラムに付した。5 m L のカラムを緩衝液 A (2 0 m M T r i s - H C l、p H 8 . 0) で洗浄し、5 C V の 0 . 1 N N a O H で 1 時間消毒し、次いで緩衝液 A で平衡化した。調製物中のタンパク質濃度を最初に 2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) で < 1 m g / m L に調整した後、1 m L / 分の速度で Q S F F カラム上で負荷させた。次いで、以下の 3 工程勾配プロセスを用いてタンパク質をカラムから溶出した：第 1 工程として、4 C V に対して、2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0)、1 3 0 m M N a C l、第 2 工程として、4 C V に対して、2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0)、3 0 0 m M N a C l、そして最終工程として、2 C V に対して、2 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0)、1 M N a C l。タンパク質ピーク画分を採取し、緩衝液を P B S (Hyclone, Logan, UT) に交換して、0 . 2 2 μ m フィルターを用いて濾過した。タンパク質濃度を、 $A_{280\text{nm}} = 0.79$ m g / m L の吸光係数を用いる UV 分光光度計によって 2 8 0 n M で確認した。この吸光係数は I L - 15 N 7 2 D : I L - 15 R α S u / F c 複合体の推定アミノ酸配列に基づいて計算した。

【0283】

E . c o l i 中で産生してリフォールディングした I L - 15 N 7 2 D 又は I L - 15

10

20

30

40

50

w t (Z h u、1 0 0 9 # 3 3 1 5) で溶液中に複合体を構築するために、別に発現した I L - 1 5 R α S u / F c を上記のように r プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。これらのインビトロで構築した複合体を生物活性の評価、及び同時発現複合体における I L - 1 5 結合部位の占有程度の推定のための標準として用いた。

【 0 2 8 4 】

(ゲル電気泳動及びサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 分析)

精製したタンパク質を異なったタイプのゲル電気泳動方法で分析した。これは N u P A G E 1 2 % B i s - T r i s ゲル (還元及び非還元条件下)、4 ~ 2 0 % T r i s - グリシングル (自然条件)、及び I E F p H 3 ~ 1 0 ゲル (p I 確認用) を包含する。これら全ては Invitrogen (Carlsbad, CA) から供給された。実験方法は製造会社の記載のように実施した。泳動用緩衝液として P B S (Hyclone, Logan, UT) を用いる S u p e r d e x 2 0 0 H R 1 0 / 3 0 (GE Healthcare Bio-Sciences) クロマトグラフィーを純度を試験するため及びタンパク質の分子量を推定するために用いた。

10

【 0 2 8 5 】

(N - 末端アミノ酸配列及びグリコシル化の分析)

興味深いタンパク質バンドを、P V D F 膜上にプロットしてボンソー S 溶液で染色する、S D S - P A G E で分離した。N - 末端アミノ酸配列決定をエドマン分解法 (Molecular Structure Facility, UC Davis, Davis, CA) を用いて実施した。

【 0 2 8 6 】

融合複合体がグリコシル化されているか否かを試験するために、イオン交換クロマトグラフィー後の高度に精製されたタンパク質 5 0 μ g を、2 μ L の N - グリコシダーゼ (Calbiochem, La Jolla, CA) で、総容量 5 0 μ L の P B S 中、室温で 4 8 時間消化した後、還元条件下で N u P A G E 1 2 % B i s - T r i s ゲル中電気泳動に付した。

20

【 0 2 8 7 】

(I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体の I L - 1 5 N 7 2 D 占有の確認)

精製した I L - 1 5 R α S u / F c に I L - 1 5 w t (E . c o l i 中で産生してリフォールディングした、J. Yovandich, NCI, Fredrick, MD より提供された) を様々な比で 1 5 時間 4 で負荷した。培養後、I L - 1 5 w t : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体を上記のように r プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。精製した複合体を、2 つの E L I S A 形態、無傷の複合体を検出する 1 つの方法 (抗ヒト I g G F c で捕獲して抗 I L - 1 5 で検出する) 及び I L - 1 5 α S u / F c 融合タンパク質のみを検出するもう 1 つの方法 (抗ヒト I g G F c で捕獲して抗ヒト I g G F c で検出する) を用いて評価した。無傷 I L - 1 5 w t : I L - 1 5 α S u / F c 複合体と I L - 1 5 R α S u / F c タンパク質濃度の間の比は、複合体の I L - 1 5 結合部位の占有率を反映している。[占有率 (%) = 無傷複合体 (n g / m L) / I L - 1 5 R α S u / F c (n g / m L I) $\times$ 1 0 0 %]。次いで、完全に占有されている複合体 (I L - 1 5 R α S u / F c と I L - 1 5 w t を 1 : 3 の比で前もって結合した) を精製後に精製した I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質複合体の占有率を定量化するための標準として用いた。

30

40

【 0 2 8 8 】

(I L - 1 5 生物活性の確認)

先に記載されている (X. Zhu et al., J Immunol 183 (2009) 3598-3607) ように、I L - 1 5 依存性 3 2 D β 細胞株を用いるインビトロ細胞増殖アッセイを、精製した複合体と I L - 1 5 w t タンパク質の I L - 1 5 生物活性を評価するために用いた。

【 0 2 8 9 】

(薬物動態の評価)

I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体及び I L - 1 5 w t の薬物動態プロファイルを雌の C D - 1 マウス (1 時点当りマウス 4 匹、Harlan, Indianapolis, IN) において、I L - 2 について先に記載されている (H. J. Belmont et al., Clin Immun

50

ol 121 (2006) 29-39) ようにして評価した。IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体の血清濃度を上記のような2つのELISA形態で評価した。IL - 15 wt 濃度を抗IL - 15 捕獲剤 (MAB647 ; R&D Systems, Minneapolis, MN) 及び抗IL - 15 検出剤 (BAM247 ; R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いるELISAで評価した。それぞれのELISA形態からのIL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 濃度はPK Solution 2.0 (Summit Research Services, Montrose, CO) を用いる1分画モデルと一致した。IL - 15 wt で処置したマウスから得られたデータは2分画モデルとして最もよくモデル化された。

【0290】

(リンパ球刺激)

10

C57BL / 6 マウス (雄、6 週齢、Harlan, Indianapolis, IN) に IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 融合複合体 1 mg / kg 又はヒト IL - 15 wt 0.28 mg / kg (等モル用量) それぞれの、或いは陰性コントロールとしてPBSの単回用量を静脈内に注射した。処置後4日目に、プール血液 (1 群当り5匹のマウス) 及び脾細胞を採取した。ヒストパック (Sigma, St. Louis, MO) を用いて血液からPBMCを単離した。次いで、PBMC及び脾細胞をPEで標識した抗CD19、PEで標識した抗CD335 (NKp46)、FITCで標識した抗CD4及びFITCで標識した抗CD8抗体 (BioLegend, San Diego, CA) で染色した。染色した細胞をFACSscanフローサイトメトリー (BD Bioscience, San Jose, CA) で分析した。全ての動物実験はAltors IACUC承認プロトコールに従って実施された。

20

【0291】

以下のペプチドを前期実施例に示される検討で用いた。

【0292】

【表2】

タンパク質	アミノ酸	配列 (配列番号)
p53	149-157	STPPPGTRV
p53	264-272	LLGRNSFEV
OVA	257-264	SIINFEKL
VSV	52-59	RGYVYQGL

30

【0293】

以下の融合タンパク質のタンパク質ドメインリンカー配列を示される実施例に用いた。

【0294】

【表 3】

リンカー	リンカー配列	融合タンパク質
一本鎖 TCR リンカー	TCR V α - DTSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSS - TCR V β	c264scTCR/hIL-15, c264scTCR/hIL- 15R α Su/birA
	TCR V α - TSGGGGSGGGGSPGGGGSGGGGSSS - TCR V β	c149scTCR/hIL15N72D
	TCR V α - DTSGGGGSGGGASGGGGSGGGGSSS - TCR V β	OT1scTCR/birA
	TCR V α - SGGGGSGGGASGGGGSGGGGS - TCR V β	OT1scTCR/hIL-15D8N, OT1scTCR/hIL- 15R α Su/birA
突然変異 ヒト IgG1 ヒンジ	TCR ドメイン - VNEPKSSDKTHTSPSPTR - hIL-15R α Su	c264scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1TCR β /hIL-15R α Su/birA, 264TCR β /hIL-15R α Su/birA
	TCR ドメイン - VNEPKSSDKTHTSPSPTR - hIL-15	264TCR α /hIL-15D8N, OT1TCR α /hIL-15, OT1scTCR/hIL-15D8N
BirA リンカー	hIL-15R α Su - SGGGSGGGGSID - birA タグ	c264scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1TCR β /hIL-15R α Su/birA
一本鎖 CD8 リンカー	CD8 α - SGGGSGGGGSGGGGSGGGGS - CD8 β	scCD8 $\alpha\beta$ /hIL-15R α Su/birA

【0295】

以下に列挙した参考文献並びに本願で引用された全ての参考文献、特許、及び Gen Bank ナンバー（本願の優先日以前に入手可能なバージョンにおける）はそれらが独立して組み込まれているようにそれぞれが参照により組み込まれている。

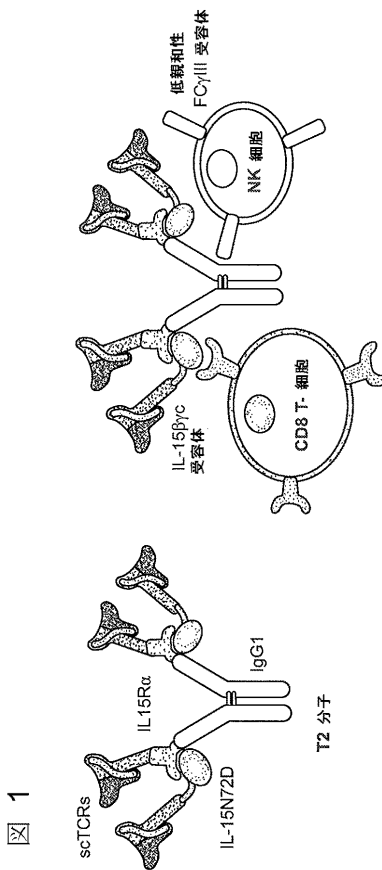
【0296】

1. Kouzarides, T., and Ziff, E. (1988) Nature 336, 646-651
2. Kouzarides, T., and Ziff, E. (1989) Nature 340, 568-571
3. Kouzarides, T., and Ziff, E. (1989) Cancer Cells 1, 71-76
4. Rieker, J. D., and Hu, J. C. (2000) Methods Enzymol 328, 282-296
5. Busch, R., Pashine, A., Garcia, K. C., and Mellins, E. D. (2002) J Immunol Methods 263, 111-1216. Stern, L. J., and Wiley, D. C. (1992) Cell 68, 465-477
7. Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and

- d Zaller, D. M. (1995) *Nature* 375, 802-806
8. de Kruif, J., and Logtenberg, T. (1996) *Journal of Biological Chemistry* 271, 630-7634
9. Kostelny, S., Cole, M., and Tso, J. (1992) *J Immunol* 148, 1547-1553
10. Holliger, P., and Hudson, P. J. (2005) *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136
11. Hayden-Ledbetter, M. S., Cervený, C. G., Espling, E., Brady, W. A., Grosmaire, L. S., Tan, P., Bader, R., Slater, S., Nilsson, C. A., Barone, D. S., Simon, A., Bradley, C., Thompson, P. A., Wahl, A. F., and Ledbetter, J. A. (2009) *Clinical Cancer Research* 15, 2739-2746
12. Kubetzko, S., Balic, E., Waibel, R., Zangemeister-Wittke, U., and Pluckthun, A. (2006) *J Biol Chem* 281, 35186-35201 10
13. Cuesta, A. M., Sanchez-Martin, D., Sanz, L., Bonet, J., Compte, M., Kremer, L., Blanco, F. J., Oliva, B., and Alvarez-Vallina, L. (2009) *PLoS One* 4, e5381
14. Mohler, K., Torrance, D., Smith, C., Goodwin, R., Stremler, K., Fung, V., Madani, H., and Widmer, M. (1993) *J Immunol* 151, 1548-1561
15. Feldmann, M. (2002) *Nat Rev Immunol* 2, 364-371
16. Weiner, L. M. (2007) *Nat Rev Cancer* 7, 701-706
17. Baeuerle, P. A., Kufer, P., and Bargou, R. (2009) *Curr Opin Mol Ther* 11, 22-30
18. Shen, J., Vil, M. D., Jimenez, X., Iacolina, M., Zhang, H., and Zhu, Z. (2006) *J Biol Chem* 281, 10706-10714 20
19. Lu, D., and Zhu, Z. (2009) *Methods Mol Biol* 525, 377-404, xiv
20. Jackman, J., Chen, Y., Huang, A., Moffat, B., Scheer, J. M., Leong, S. R., Lee, W. P., Zhang, J., Sharma, N., Lu, Y., Iyer, S., Shields, R. L., Chiang, N., Bauer, M. C., Wadley, D., Roose-Girma, M., Vandlen, R., Yansura, D. G., Wu, Y., and Wu, L. C. (2010) *J Biol Chem* (In Press)
21. Mortier, E., Quemener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grotzinger, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2006) *J Biol Chem* 281, 1612-1619
22. Waldmann, T. A. (2006) *Nat Rev Immunol* 6, 595-601
23. Bergamaschi, C., Rosati, M., Jalah, R., Valentin, A., Kulkarni, V., Alicea, C., Zhang, G. M., Patel, V., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (2008) *J Biol Chem* 283, 4189-4199 30
24. Theobald, M., Biggs, J., Dittmer, D., Levine, A. J., and Sherman, L. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11993-11997.
25. Zhu, X., Marcus, W. D., Xu, W., Lee, H. I., Han, K., Egan, J. O., Yovandich, J. L., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2009) *J Immunol* 183, 3598-3607
26. Deer, J. R., and Allison, D. S. (2004) *Biotechnol Prog* 20, 880-889
27. Zhao, Y., Bennett, A. D., Zheng, Z., Wang, Q. J., Robbins, P. F., Yu, L. Y., Li, Y., Molloy, P. E., Dunn, S. M., Jakobsen, B. K., Rosenberg, S. A., and Morgan, R. A. (2007) *J Immunol* 179, 5845-5854 40
28. Belmont, H. J., Price-Schiavi, S., Liu, B., Card, K. F., Lee, H. I., Han, K. P., Wen, J., Tang, S., Zhu, X., Merrill, J., Chavillaz, P. A., Wong, J. L., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2006) *Clin Immunol* 121, 29-39
29. Yang, S., Rosenberg, S. A., and Morgan, R. A. (2008) *J Immunother* 31, 830-839
30. Card, K. F., Price-Schiavi, S. A., Liu, B., Thomson, E., Nieves, E., Belmont, H., Builes, J., Jiao, J. A., Hernandez, J., Weidanz, J., Sherman, L., Francis, J. L., Amirkhosravi, A., and Wong, H. C. (2004) *Cancer Immunol Immunother* 53, 345-357
31. Garboczi, D. N., Hung, D. T., and Wiley, D. C. (1992) *PNAS* 89, 3429-3433 50

32. Zhu, X., Belmont, H. J., Price-Schiavi, S., Liu, B., Lee, H. I., Fernandez, M., Wong, R. L., Builes, J., Rhode, P. R., and Wong, H. C. (2006) *J Immunol* 176, 3223-3232
33. Chirifu, M., Hayashi, C., Nakamura, T., Toma, S., Shuto, T., Kai, H., Yamagata, Y., Davis, S. J., and Ikemizu, S. (2007) *Nat Immunol* 8, 1001-1007
34. Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994) *Cell* 76, 17-27
35. Daniels, M. A., and Jameson, S. C. (2000) *J Exp Med* 191, 335-346.
36. Nugent, C. T., Renteria, R. O., Kuus-Reichel, K., and Kumar, A. (2005) *Immunol Lett* 98, 208-215 10
37. Schott, E., and Ploegh, H. L. (2002) *Eur J Immunol* 32, 3425-3434
38. Neveu, B., Echasserieau, K., Hill, T., Kuus-Reichel, K., Houssaint, E., Bonnevillie, M., and Saulquin, X. (2006) *Int. Immunol.* 18, 1139-1145
39. Kern, P., Hussey, R. E., Spoerl, R., Reinherz, E. L., and Chang, H.-C. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274, 27237-27243
40. Arcaro, A., Gregoire, C., Bakker, T. R., Baldi, L., Jordan, M., Goffin, L., Boucheron, N., Wurm, F., van der Merwe, P. A., Malissen, B., and Luescher, I. F. (2001) *J Exp Med* 194, 1485-1495
41. Wang, R., Natarajan, K., and Margulies, D. H. (2009) *J Immunol* 183, 2554-2564 20
42. Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996) *Nature* 384, 134-141
43. Lin, A., Devaux, B., Green, A., Sagerstrom, C., Elliott, J., and Davis, M. (1990) *Science* 249, 677-679
44. Traunecker, A., Dolder, B., Oliveri, F., and Karjalainen, K. (1989) *Immunol Today* 10, 29-32
45. Laugel, B., van den Berg, H. A., Gostick, E., Cole, D. K., Wooldridge, L., Boulter, J., Milicic, A., Price, D. A., and Sewell, A. K. (2007) *J Biol Chem* 282, 23799-23810
46. Wooldridge, L., van den Berg, H. A., Glick, M., Gostick, E., Laugel, B., Hutchinson, S. L., Milicic, A., Brenchley, J. M., Douek, D. C., Price, D. A., and Sewell, A. K. (2005) *J Biol Chem* 280, 27491-27501 30
47. Gakamsky, D. M., Luescher, I. F., Pramanik, A., Kopito, R. B., Lemonnier, F., Vogel, H., Rigler, R., and Pecht, I. (2005) *Biophys J* 89, 2121-2133
48. Cole, D. K., Dunn, S. M., Sami, M., Boulter, J. M., Jakobsen, B. K., and Sewell, A. K. (2008) *Mol Immunol* 45, 2700-2709
49. Alam, S. M., Davies, G. M., Lin, C. M., Zal, T., Nasholds, W., Jameson, S. C., Hogquist, K. A., Gascoigne, N. R., and Travers, P. J. (1999) *Immunity* 10, 227-237
50. Cheever, M. A. (2008) *Immunol Rev* 222, 357-368 40
51. Ferrari-Lacraz, S., Zanelli, E., Neuberg, M., Donskoy, E., Kim, Y. S., Zheng, X. X., Hancock, W. W., Maslinski, W., Li, X. C., Strom, T. B., and Moll, T. (2004) *J Immunol* 173, 5818-5826
52. Zheng, X. X., Gao, W., Donskoy, E., Neuberg, M., Ruediger, M., Strom, T. B., and Moll, T. (2006) in *Transplantation* Vol. 81, pp. 109-116
53. Ferrari-Lacraz, S., Zheng, X. X., Fueyo, A. S., Maslinski, W., Moll, T., and Strom, T. B. (2006) *Transplantation* 82, 1510-1517

【図 1】



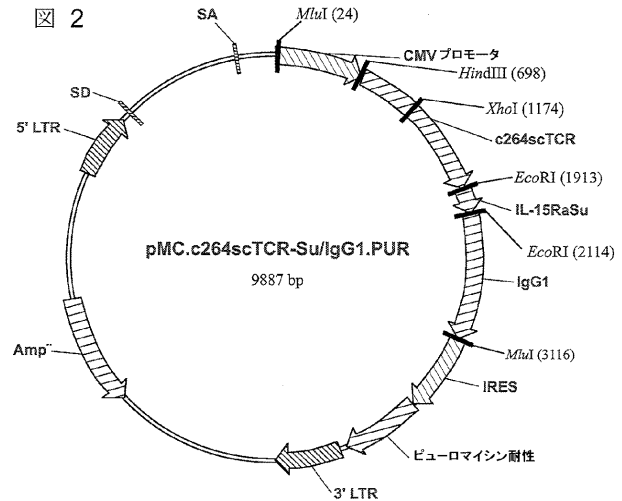
【図 3】

図 3

atggacagacttacttctcattcctgctcctgattgtccctgcgtacgtcttgtcccagtc
 agtgacgcagcccgatgctcgcgtcactgtctctgagggagcctctctgcagctgagatgca
 agtattcctactctgggacaccttattctgttctggtatgtccagtagccgcggcagggctg
 cagctgctcctcaagtagtattcaggagaccagtggttcaaggagtgatggcttcgaggc
 tgagttcagcaagtagtaactcttctccacctgcggaagcctctgtgcactggagcgact
 ctgctgtgtacttctgtgtttgagcgaggatagcaactatcagttgatctggggctctggg
 accaagctaattataagccagacactagtggtggcgggtggcagcgcggtggtggttcggg
 tggcgcggttctggtggtggcgttctctgcagcaattcaaaagtcattcagactccaagat
 atctggtgaaagggaaggacaaaagcaagatgaggtgtatccctgaaaggacatcca
 gttgtattctggtatcaacaaaataagaacaatgagtttaattttgattaactttcagaa
 tcaagaagttcttcagcaaatagacatgactgaaaaacgattctctgctgagtgcttcaa
 actcaacttgacgcttagaattcagtcctctgagcgagagactcagcactgtacctctgt
 gccagcagctctgcagggggcgccacagaagttttcttggtaaggaaaccaggtcacagt
 tgttagagacctgaacaaaggtgttccaccgcaggtcgtctgttggacatcagaagcag
 agatctccacaccccaaaaggccacactggtgtgctggccacaggtcttctccctgaccac
 gtggagctgagctggtgggtgaatgggaagggtgcacagtggtgcagcagccgacccgca
 gccctcaaggagcagccgcctcaatgactccagatactgctgagcagccgctgaggg
 tctcggccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtcaggttctacggg
 ctctcggagaatgacgagtggaacccaggtatgggccaacccgtcaccagatcgtcagcgc
 cgaggcctgggtagagcagacgaattcatcacgtgccctcccccatgtcctggaacacg
 cagacatctgggtcaagagctacagcttctactccaggagcggtacatttgaactctggt
 tcaagcgttaaagccggcacgtccagcctgacggagtgctgttgaacaaggccacgaatgt
 cgccactggacaacccccagctctcaatgcattagagaattcgctccacaaggcccat
 cggcttctccctggcaccctctccaagagcactctggggcagcagcgccctgggtgc
 ctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcagggcctgaccag
 cggcgtgcacaccttcccggtgtctcactgctcctcaggactctactcctcagcagcgtgg
 tgacctgacctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagccc
 agcaacaccaaggtggacaagaaggtgagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgcc
 accgtgccagcagctgaaactcctgggggacccgtcagcttctctctcccccaaaaccca
 aggacacctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtagctgagccac
 gaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggcggcgtggaggtgcataatgccaagac
 aaagccggaggagcagtagtaacacagcagctacggtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgc
 accagactgggtgaatggcaggagtagcaagtgcaaggtctccaacaaagccctccagcc
 ccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggcagcccgagagacacacaggtgtacacct
 gccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaaggtct
 tctatcccgagacatcccggtgaggtggagagcaatgggcagcggagagaaactacaag
 accagcctcccggtgctggaactccagcgtccttctctctacagcaagctcaccgtgga
 caagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgaca
 accatcacgcagagaagacgtctcctctgctccgggtaaa

【図 2】

図 2



【図 4 - 1】

図 4-1

mdrltssfilllipayvlsgsvtqpdarvtvsegaslqlrckysvsgtpylfwvyqypr
 < >
 Ig リーダー TCR-Vα
 gglqlllkyvsqdpvvvgvngfeaeafsksnssfhrlkasvhwdsdavyfcvlsedsnyq
 TCR-Vα
 liwsgtkliikpdtsgggsgggsgggsgggsgggssnskvigtprylvkqgqkqakm
 < >
 TCR-Vα リンカー TCR-Vβ
 rcipekghpvvfwyqgnknnefkflinfngqevlqqidmtekrfsaecpsnspcsleiq
 TCR-Vβ
 sseagdsalylcasslsgggtvffkgtrltvvedlnkvfppevavfepseaeishtg
 < >
 TCR-Vβ TCR-Cβ
 katlvclatgffpdhvelswwngkevhsqvstdpqlkeqpalndsryclssrlrvsa
 TCR-Cβ
 tfwgnprnhfrcqvfgyglsendewtqdrakpvtqivsaeawgradeffitcppmmsveh
 > <

【 図 4 - 2 】

図 4-2

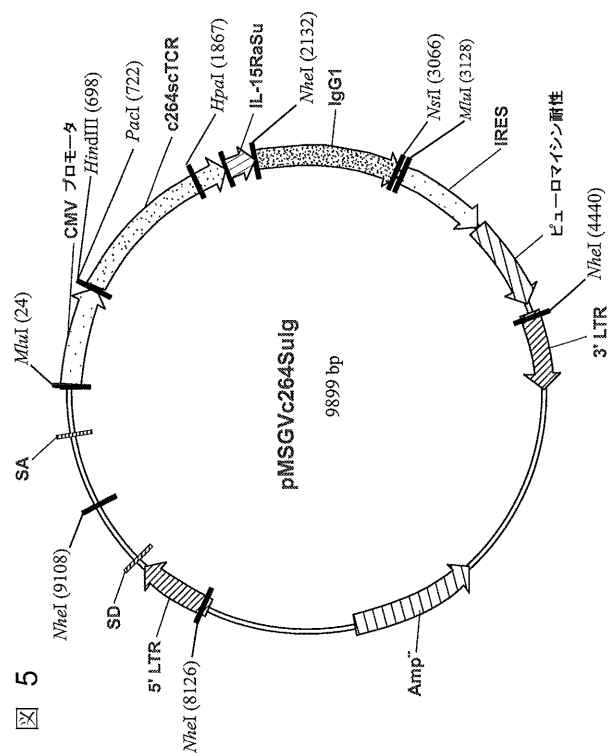
TCR-C β	huIL-15R α Su
<u>adiwvksyslsreryicnsgfkrkagtssltecvlnkatnvahwttpslkcirefast</u> > <	
huIL-15R α Su	huIgG1
<u>kgpsvfplapsskstsaggaalgcclvkdypfpvsvwnsgaltsgvhtfpavlgssgl</u> huIgG1 定常領域	
<u>yslssvvtvpssslgtqtyicnvnkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcapellggp</u> huIgG1 定常領域	
<u>svflfppkpkdtlmsirtpvctcvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyn</u> huIgG1 定常領域	
<u>styrvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakggprepgvvtlppsrdr</u> huIgG1 定常領域	
<u>eltknqvsitclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdk</u> huIgG1 定常領域	
<u>rwqgnvfscsvmhcalhnhytqkslslspgk</u> huIgG1 定常領域	

【 図 6 】

図 6

ATGAGACAGACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTCCAGGTCCACCGGTCA
 GTCAGTGACGAGCCGATGCTCGCGCTCACTGCTCTGAAAGGAGCCTCTCGCAGCTGAGAT
 GCAAGTATTCTACTCTGGGACACCTTATCTGTTCTGGTATGTCAGTACCCGCGCAGGGG
 CTGCAGCTGCTCCTCAAGTACTATTTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTCGA
 GGCTGAGTTTCAGCAAGAGTAACCTTCTCTCCACCTGCGGAAAGCCTCTGTGCACCTGAGAGCG
 ACTCTGCTGTGACTTCTGTGTTTGTAGCGAGGATAGCAACTATCAGTTGATCTGGGGCTCT
 GGGACCAAGCTAATTATAAGCCAGACACTAGTGTGGCGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTTTC
 CGGTGGCGCGGTTCCTGGCGGTGGCGGTTCCTCTGAGCAATTCAAAAGTATTTCAGACTCCAA
 GATATCTGGTGAAAGGGCAAGGACAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCCTGAAAGGGACAT
 CCAGTTGTATTCTGGTATCAACAAATAAGAACAATGAGTTTAAATTTTGTATTAATTTCA
 GAATCAAGAAGTTCTTCAGCAATAGACATGACTGAAAAACGATTCTCTGCTGAGTGTCTCT
 CAAACTCACCTTGCAGCCTAGAAATTCAGTCTCTGAGGAGGAGACTCAGCACTGTACCTC
 TGTGCGCAGCTCTGTGAGGGGCGGCACAGAGTTTCTTGGTAAAGGAACAGGCTCAC
 AGTTGTAGAGGACTGACAAAGGTGTTCACCCAGGAGTGTGCTGTGTTGAGCCATCAGAAAG
 CAGAGATCTCCACACCCCAAGGCGCACACTGGTGTGGCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGAC
 CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTAAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCAGGACCC
 GCAGCCCTCAAGGAGCAGCCGCCCTCAATGACTCCAGATAGCTGCTGAGCAGCGCCCTGA
 GGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTAC
 GGGCTCTCGGAGAAATGACGAGTGGAGCCAGGATAGGGCCAAACCCGTACCCAGATCGTTCAG
 CGCCGAGGCTGGGGTAGAGCAGACATCAGTGGCCCTCCCGCATGTCCGTGGAACAGCAG
 ACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGAGCGGTACATTTGTAATCTGGTTTC
 AAGCGTAAAGCCGCGACGTCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAGGCCACGAATGTCG
 CCAGTGGACAACCCAGCTCCTCAATGTATTAGAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGTCTTCC
 CCTTGGCACCTCTCTCAAGAGCAGCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCTGGTCAAG
 GACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGCGCCCTGACACGCGCGTGC
 CACTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGC
 CCTTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGGCCAAATCTTGTGACAAACCTCACACATGCCACCGTGCCC
 AGCACCTGAATCTCTGGGGGACCGTCAGCTTCTCTTCCCGCAACCAAGGACACCC
 TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAGCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGCAAGCCGCG
 GGAGAGCAGTACACAGCAGCTACCGTGTGGTACGCTCTCACCGTCTGCAACAGGACT
 GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAG
 AAAACATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATC
 CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
 CGGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCGGAGCAACACTACAAGACACCGCT
 CCCGTGCTGAGTCCGAGCGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG
 GTGGCAGCAGGGGAAGCTTCTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACA
 CGCAGAAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATAA

【 図 5 】



5

【 図 7 - 1 】

図 7-1

metdtllllwvlllwpvgstgsgsvtqpdarvtvsegaslqrlcksysqtpylfwvvyvyp
 < >>
 Ig リーダー TCR-V α
rgqlqlllkyysgdpvvgvngfeaeafsksnssfhrlkasvhwdsavvfcvlsedsny
 TCR-V α
qliwsgtkliikpdtsgggsgggsgggsgggsgggssskviqtprylvlkggqkak
 >> >>
 TCR-V α リンカー TCR-V β
mrceipekghpvvfwyqqnknnefkflinfnqgevlqgidmtekrfsaeccpsnspcslei
 TCR-V β
gsseagdsalylicasslsgggtvffgkgtlrvvedlnkvfppevavfepseaeisht
 >>
 TCR-V β TCR-C β
gkatlvlatgffpdhvelswvngkevhsqvstdpqplkegalndrsryclssrlrsv
 TCR-C β
atfwgnprnhfrcqvgfyglsendewtqdrakpvtqivsaewgtraditcpgppmsveha
 >>
 TCR-C β huIL-15R α Su

【 図 7 - 2 】

図 7-2

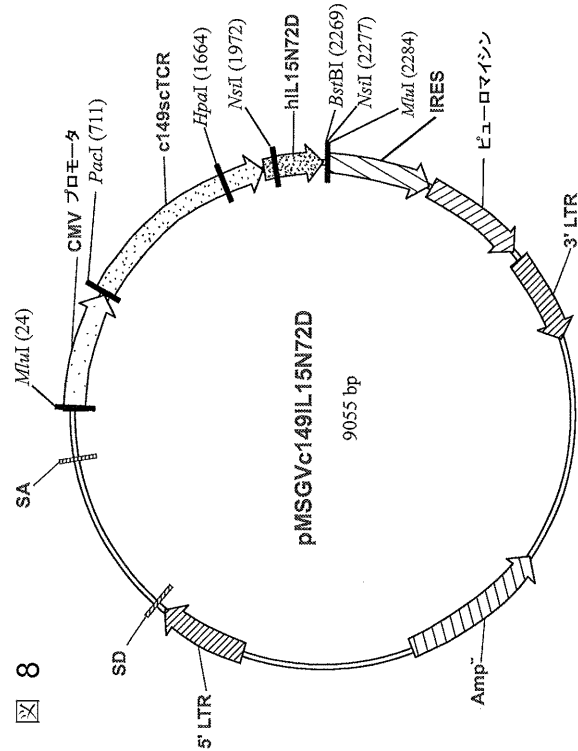
diwvksyslsreryicnsgfkrkagtsltecvinlkatnvahwttslkcirastkqp
 huIL-15RαSu huIgG1
 svfplapsskstsggtaalgclvdyfpepvtvswngaltsqgvhtfpavlqssgylsl
 huIgG1 定常領域
 ssvvtvpssslgtqtyicnvnkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcapellggpsvf
 huIgG1 定常領域
 lfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreegynsty
 huIgG1 定常領域
 rvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakggpreqvvtlppsrldelt
 huIgG1 定常領域
 knqvsiltclvkgyfypsdiawesnggpennykttpvldsgsfflyskltvdksrwg
 huIgG1 定常領域
 ggnvfscsvmhcalnhhytqkslsispqk
 huIgG1 定常領域

【 図 9 】

図 9

ATGGACAGACTTACTTCTTCATTCCTGCTCCTGATTGTCCCTGCGTACGTCCTTGCCCCAGAA
 GGTAAACAGACTCAGACTTCAATTTCTGTGATGGAGAAGACAACGGTGACAATGGACTGTG
 TGTATGAAACCCGGACAGTCTTACTTCTTATTCTGGTACAAGCAACAGCAAGTGGGAA
 ATAGTTTCCCTTATTCGTCAGACTCTTACAAAAGGAAATGCAACAGAAGTCATTATTC
 TCTGAACCTTCAGAACCAAAAGTTCCATCGGACTCATCATCTGCCACACAGATTGAGG
 ACTCAGCAGTATATTTCTGTGCTATGAGAGACACAAATGCTTACAAAGTCATCTTTGAAAA
 GGGACACATCTTACTGTTCTGCCTACTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTCCCC
 TGGTGGCGGGGTTCTGGCGGTGGCGGTTCTCGAGCGAGGCTGCAGTCACCAAGTCCAA
 GAAGCAAGGTGGCAGTAACAGAGAGAAAGGTGACATTGAGCTGTACACAGACTAATAACCAT
 GACTATATGTACTGGTATCGGCAGGACACGGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTACTCATA
 TGTGCGTGACAGCACGGAGAAAGGAGATATCCCTGATGGGTACAAGGCTCCAGACCAAGCC
 AAGAGAATTTCTCTCATTTCTGGAGTTGGCTTCCCTTTCTCAGACAGCTGTATATTTCTGT
 GCCAGCAGCCCCACTCCTATGAACAGTACTTCGGTCCCGCACCAGGCTCAGGTTTTAGA
 GGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTGCTGTGTTTGAAGCATCAGAAGCAGAGATCT
 CCCACACCCAAAGGCCACACTGGTGTGCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCAGTGGAG
 CTGAGCTGGTGGGTAAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGTCAGCACGGACCCGAGCCCT
 CAAGGAGCAGCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGCTCTCGG
 CCACCTTCTGCGAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG
 GAGAATGACAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGC
 CTGGGGTAGACAGACAACCTGGTGAATGAATAAGTGATTTGAAAAAATTGAAGATCTTA
 TTCAATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAGTGATGTTTACCCAGTTGCAAA
 GTAACAGCAATGAAGTGCTTCTCTGGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAATCCGAGATGC
 AAGTATTCTATGATACAGTAGAAAACTGATCATCTAGCAACGACAGTTTGTCTTCTAATG
 GGAATGTAACAGAACTGAGATGCAAGAAATGTGAGGAACCTGAGGAAAAAATATTAAAGAA
 TTTTTCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTCAATCAACACTTCTTAA

【 図 8 】

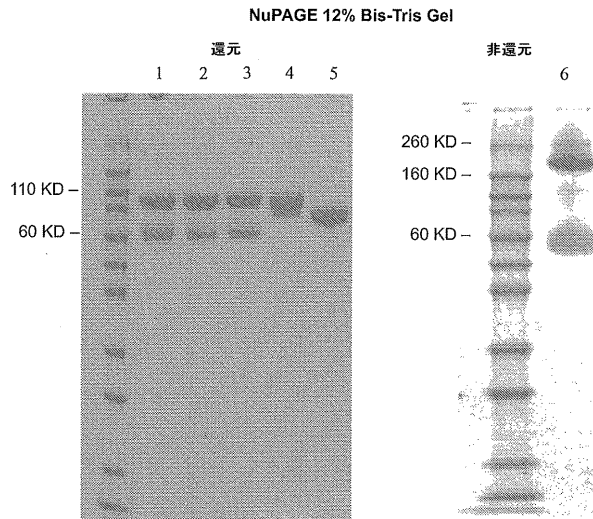


【 図 10 】

図 10

mdrltssfillivpayvlagkvltgtqtstisismektvtvmdcvyetrdsyflfwyqta
 Ig リーダー TCR-Vα
sgelvflirqdsykenateghyslnfqkpkssiglilitatqiedsavfycamrdtnav
 TCR-Vα
kvi fgkqthlhvlpstsgggsgggsgggsgggsgggssseavtgsprskvavtggkvt
 TCR-Vα リンカー TCR-Vβ
lschqtnnhdymwyrgdtghlrlhihsyvadstekdipdykasrpsqenflsile
 TCR-Vβ
laslsqtavfycassphsyegfygpgtrltvledlnkvfppevavfepseaeishtqka
 TCR-Vβ TCR-Cβ
tlvclatgffpdhvelswvngkevhsgvstdpgplkegalndrsryclssrlrvsatf
 TCR-Cβ
wqpnrhfrqvgfyglsendewtqdrakpvtqivsaawgradnwnvisdlkkiedl
 TCR-Cβ huIL-15N72D
iqsmhidatlytesdvhpckvtamkcfillelqvlesgdasihdtenliilandsl
 huIL-15N72D
sngnvtsgckeeceeleeknikelfsqsfhvhiqmfints
 huIL-15N72D

【図 1 1】

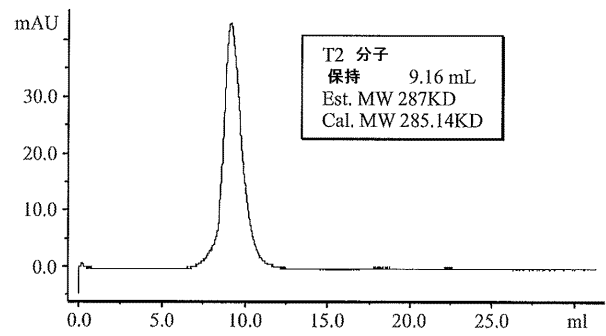


- 還元
1. T2 BF1 カラム pH4
2. T2 BF1 カラム pH3
3. T2 BF1 + R-プロテインA
4. c264scTCR/IgG1 BF1 + R-プロテインA
5. c264scTCR/IgG1ΔC_{H1} BF1 + R-プロテインA
- 非還元
6. T2 BF1 + R-プロテインA

図 11

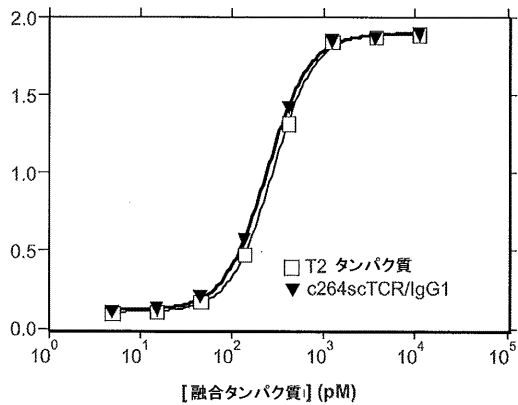
【図 1 2】

図 12



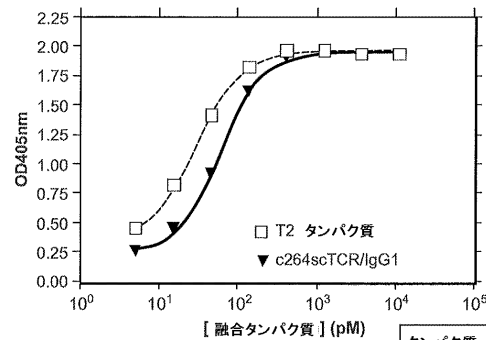
【図 1 3】

図 13



【図 1 4】

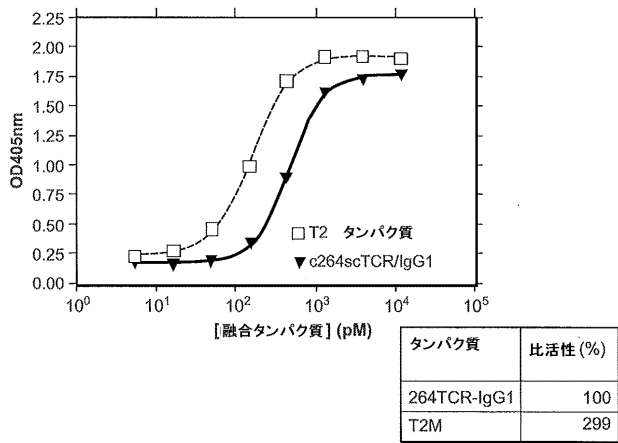
図 14



タンパク質	比活性(%)
264TCR-IgG1	100
T2M	209

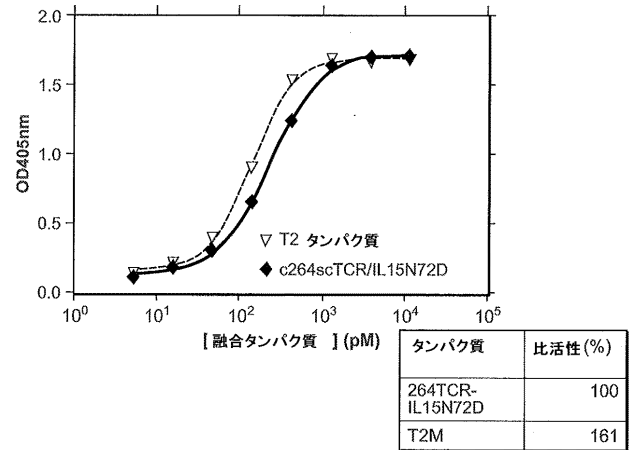
【図 15】

図 15



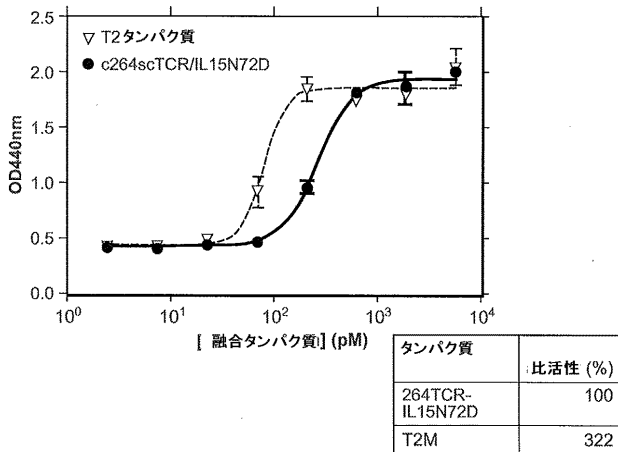
【図 16】

図 16

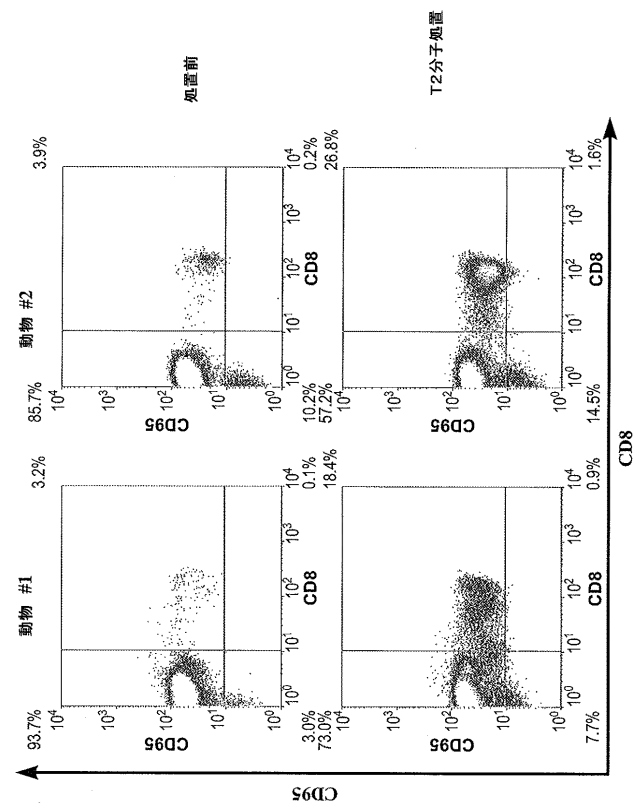


【図 17】

図 17

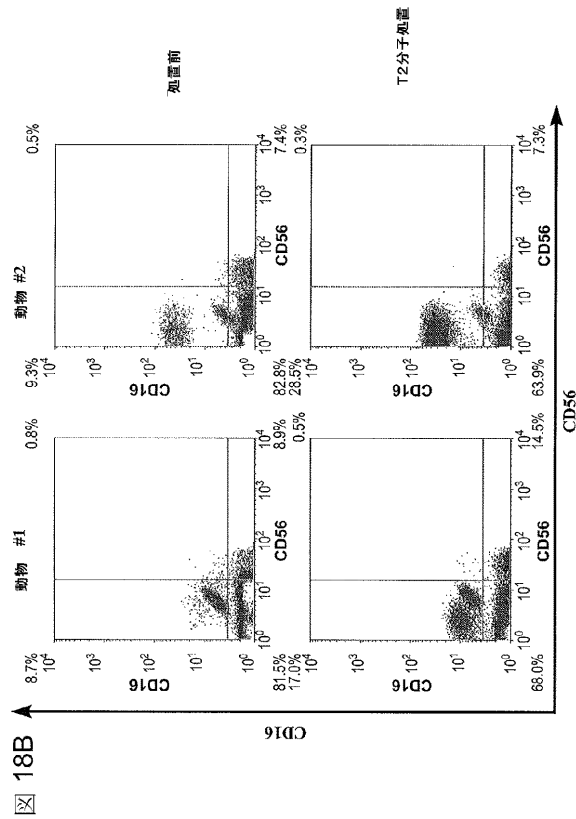


【図 18 A】



18A

【図 18 B】



【図 20】

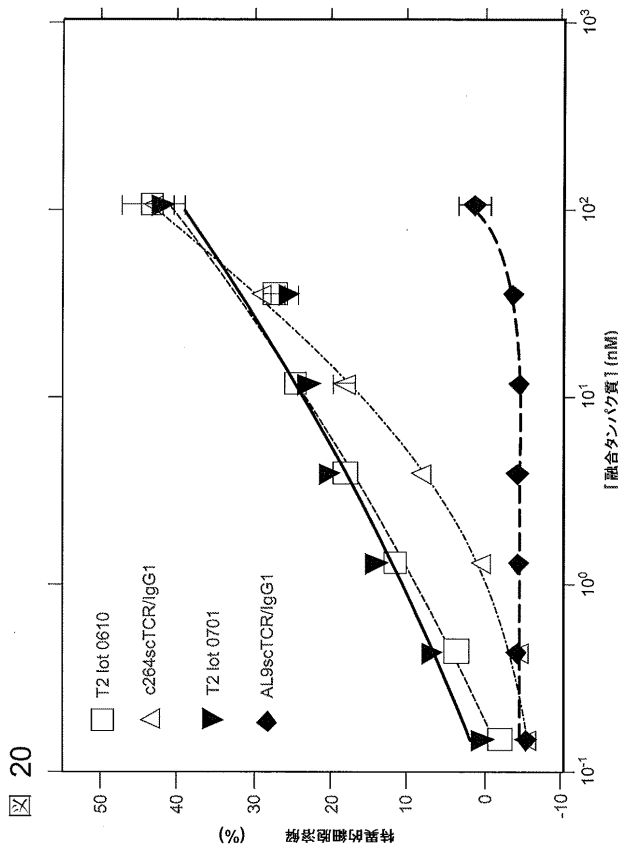


図 20

【図 19】

図 19A

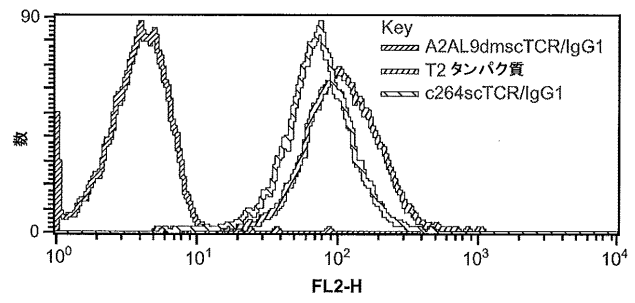
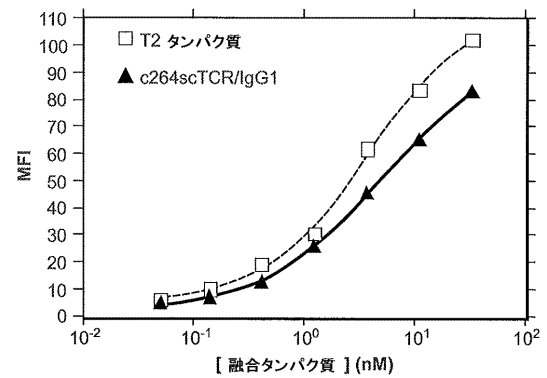


図 19B

U937細胞上のT2又はTCR-IgのFcγRsとの結合



【図 21 A】

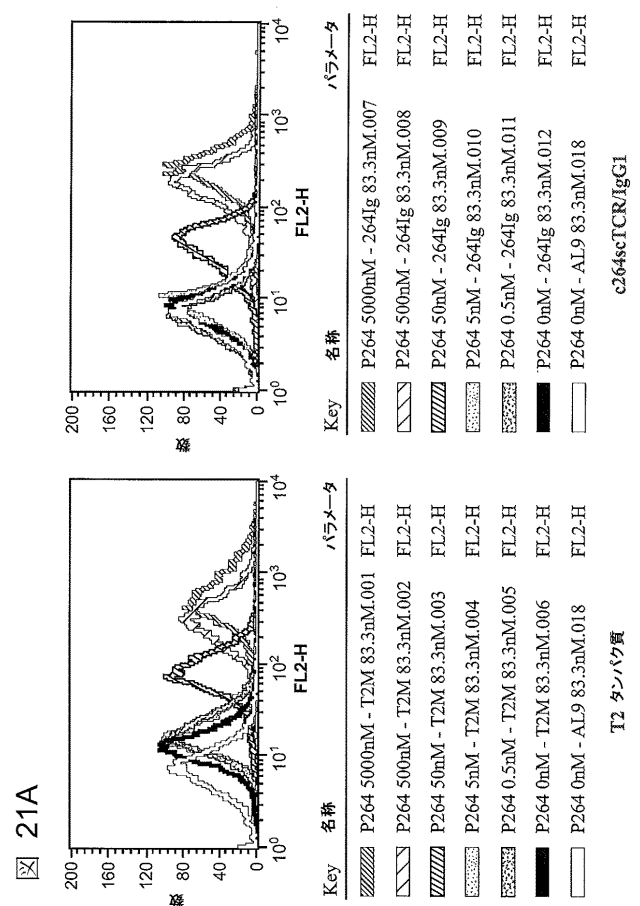
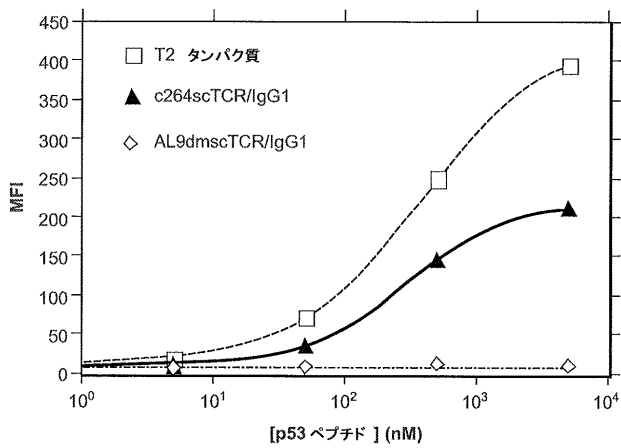


図 21A

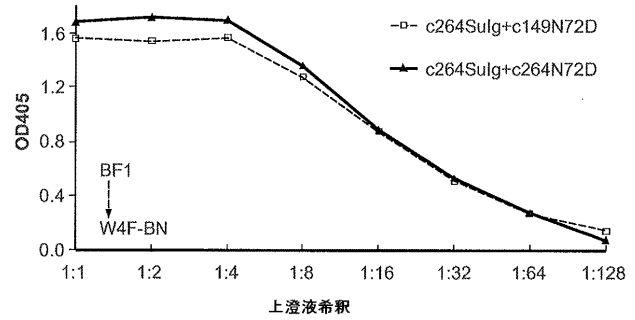
【図 2 1 B】

図 21B



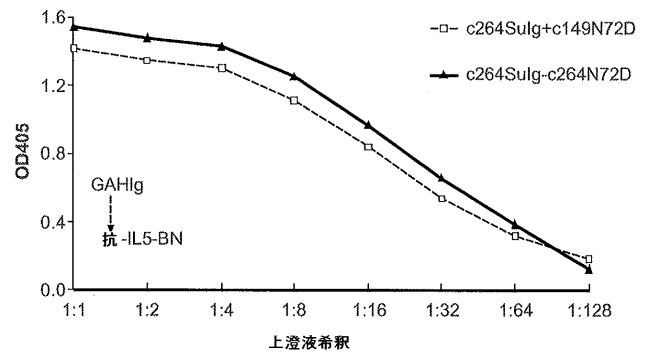
【図 2 2】

図 22



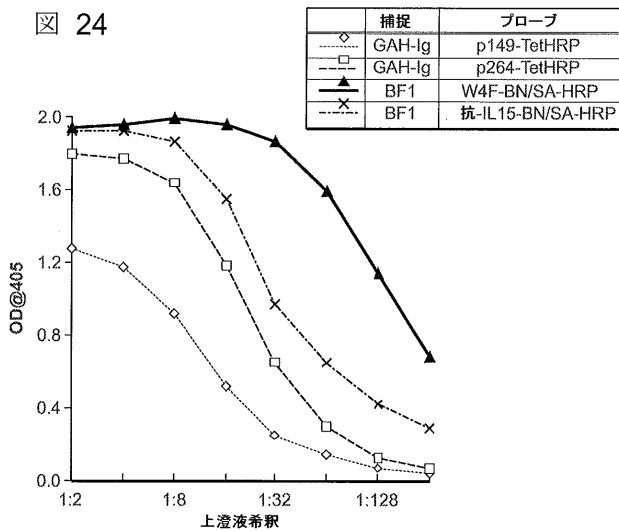
【図 2 3】

図 23



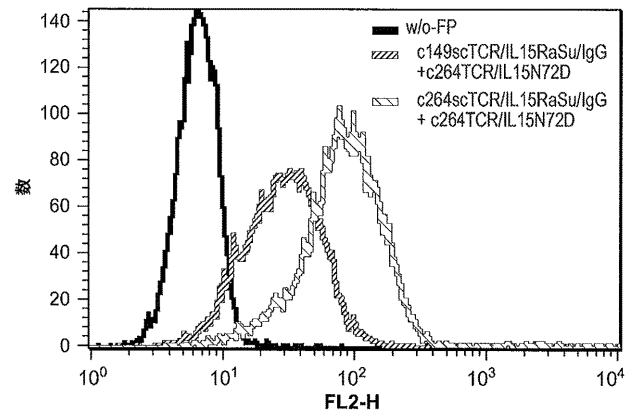
【図 2 4】

図 24



【図 2 5】

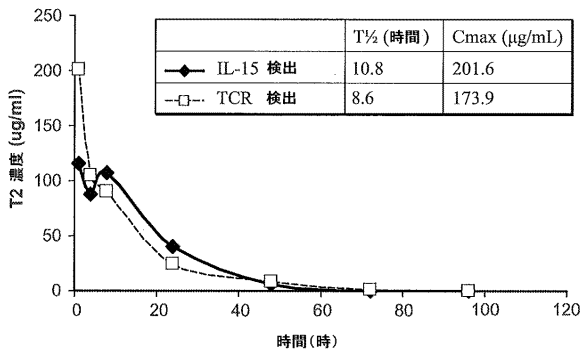
図 25



【図 26】

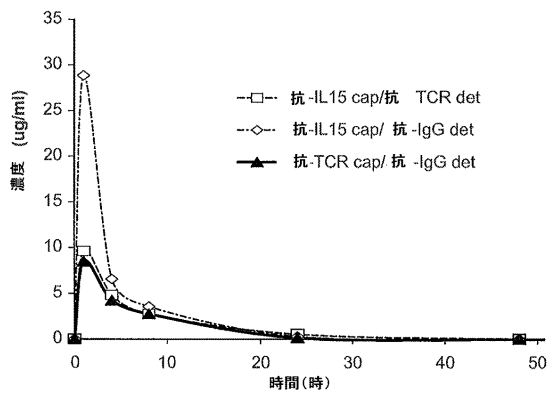
26A

マウス検討

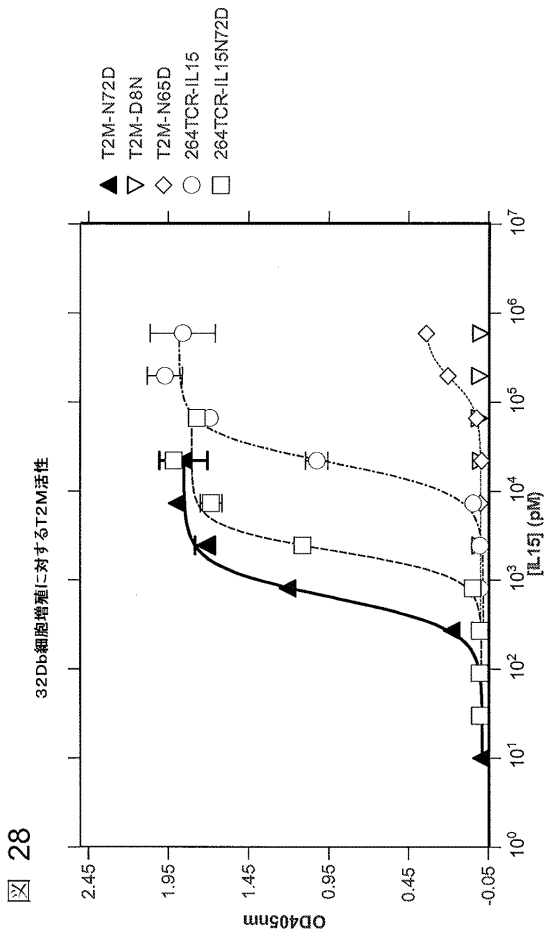


26B

サル検討

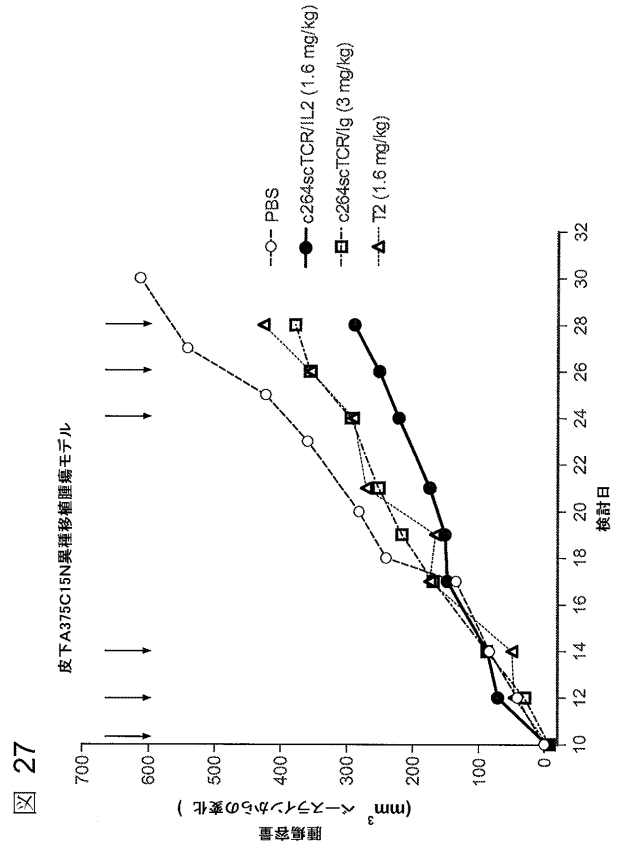


【図 28】



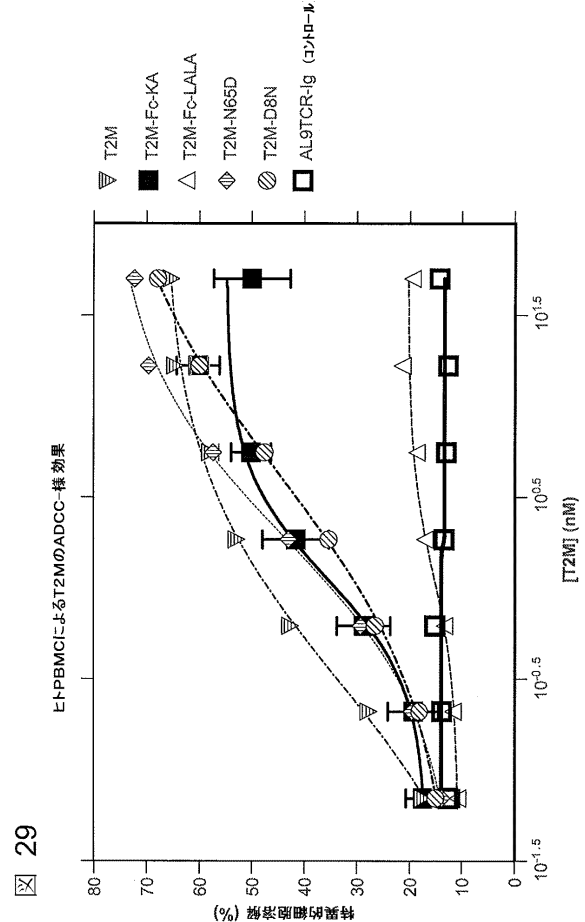
28

【図 27】



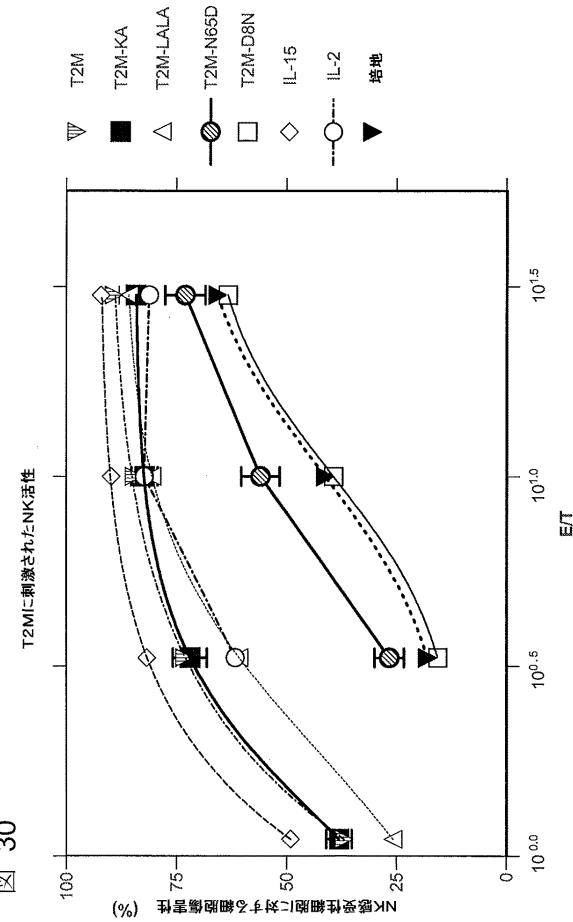
27

【図 29】

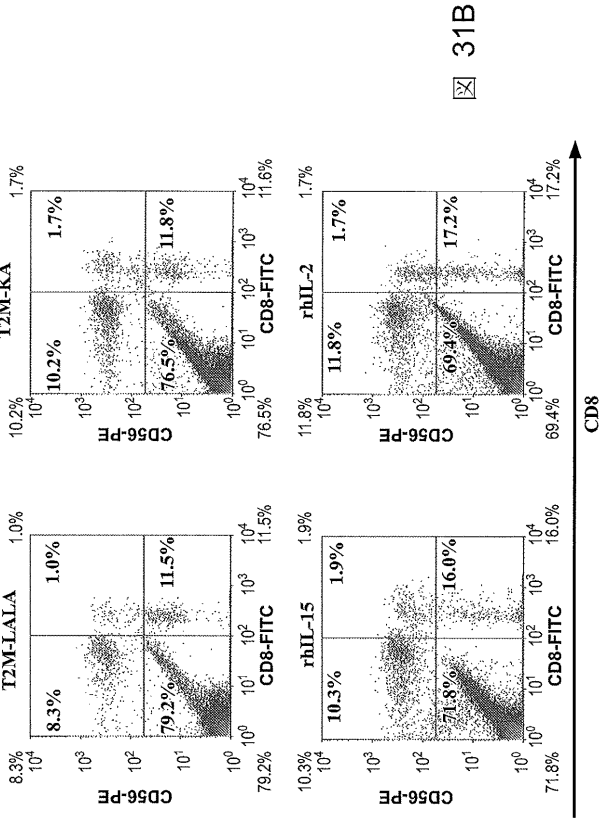


29

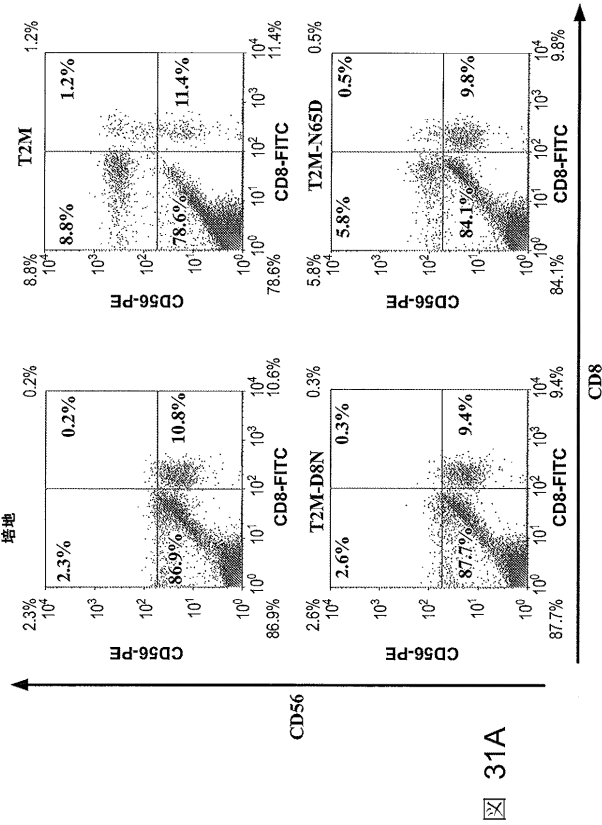
【図 3 0】



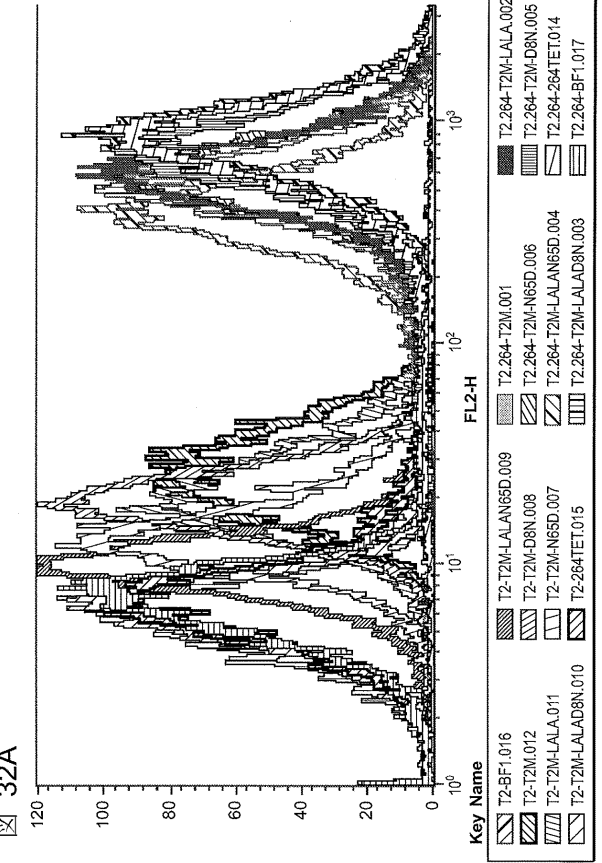
【図 3 1 B】



【図 3 1 A】

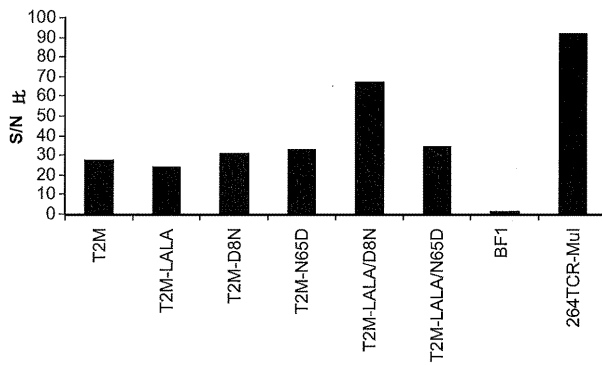


【図 3 2 A】



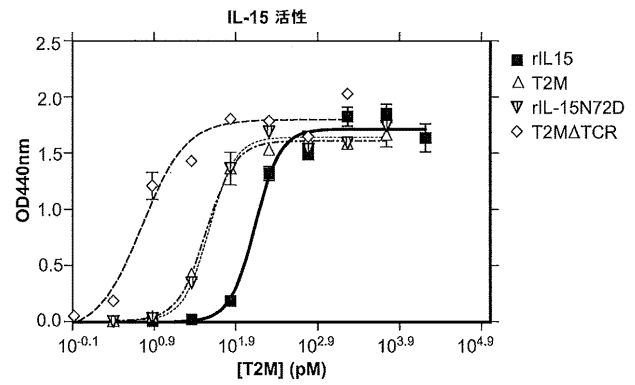
【図 3 2 B】

32B



【図 3 3 A】

33A

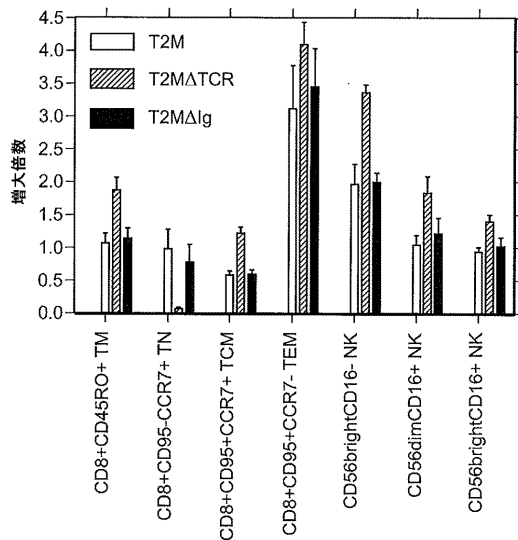


タンパク質	EC ₅₀ (pM)	比活性 (%)	比活性 (%)
rIL-15	136.7	100	28
rIL-15N72D	37.64	363	100
T2M	34.77	393	108
T2MΔTCR	5.633	2428	668

【図 3 3 B】

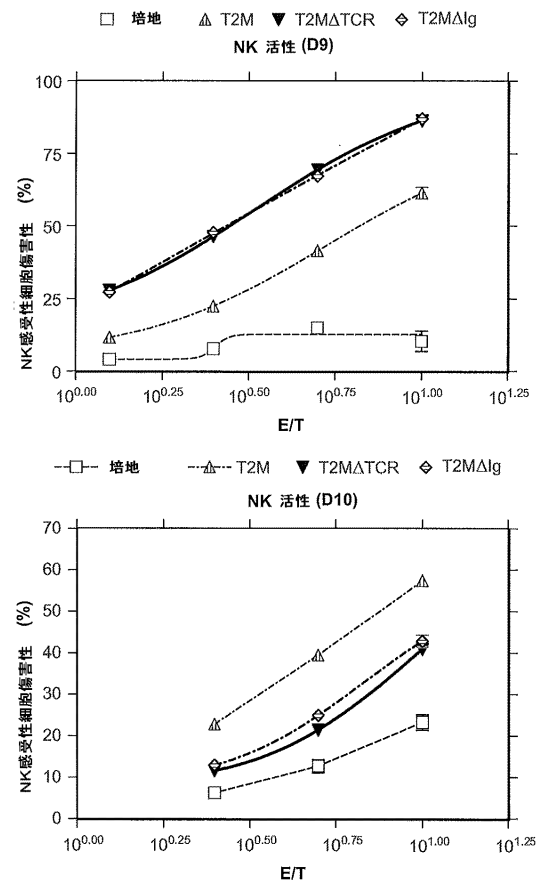
33B

増大倍数 =
培地+T2処置中の細胞% /
培地のみ中の細胞%

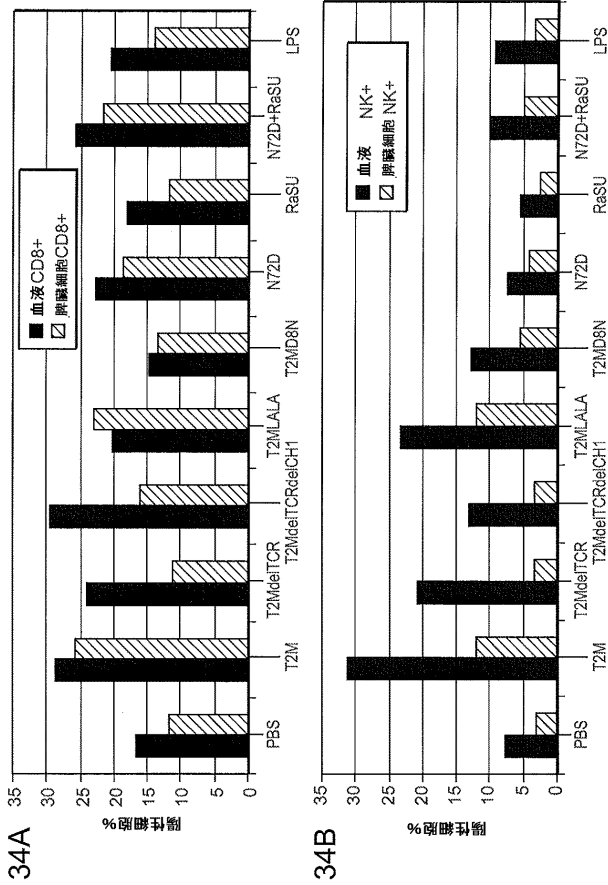


【図 3 3 C】

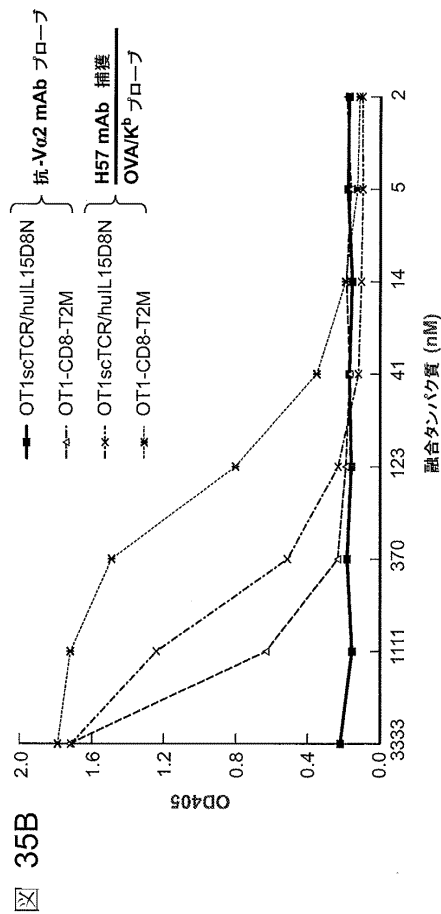
33C



【図 3 4】

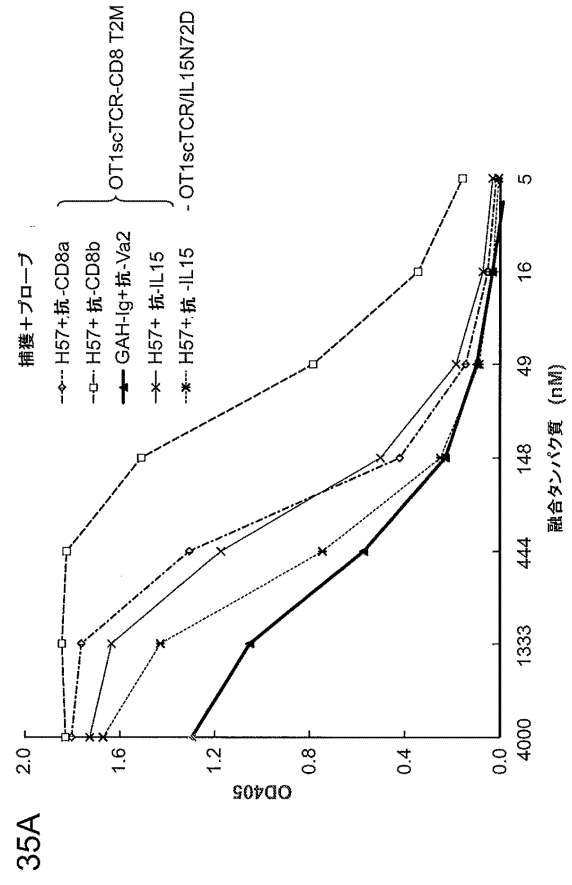


【図 3 5 B】

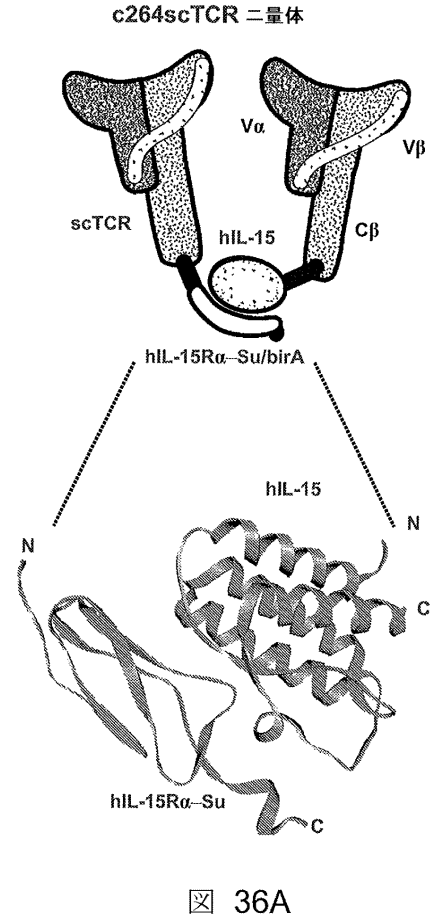


【図 3 5 A】

【図 3 5 A】



【図 3 6 A】



【図 36 B】

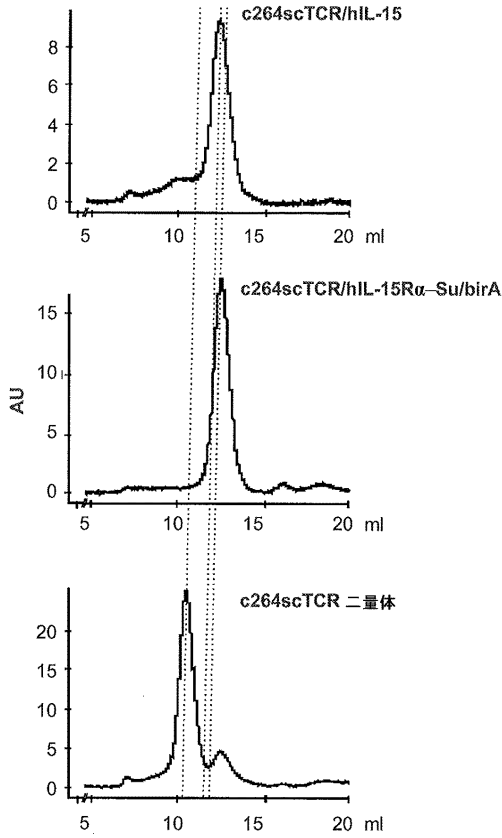


図 36B

【図 38】

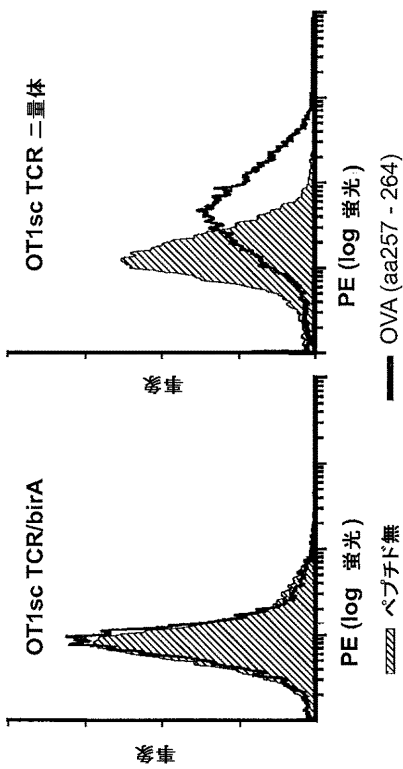


図 38

【図 37】

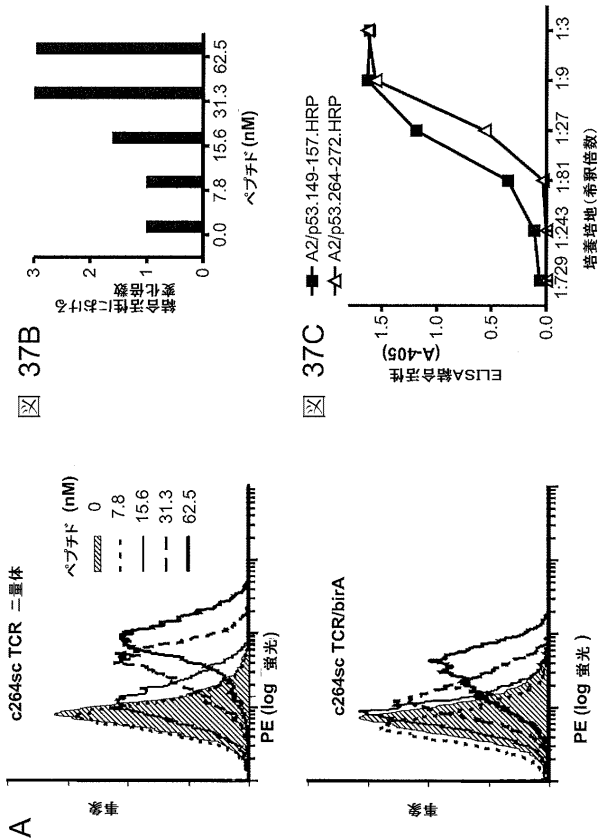


図 37A

図 37B

【図 39】

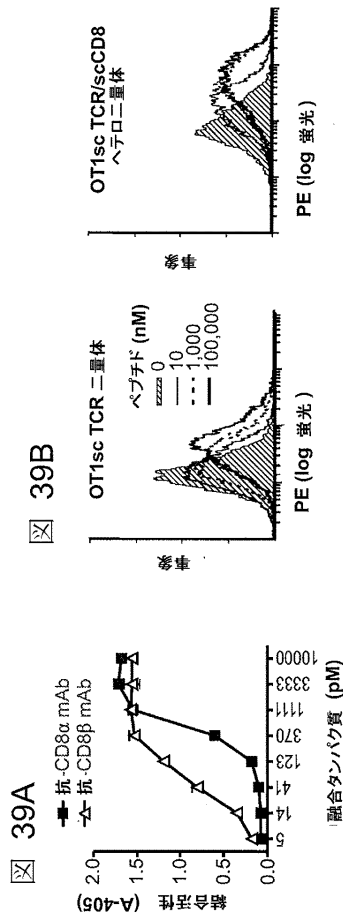
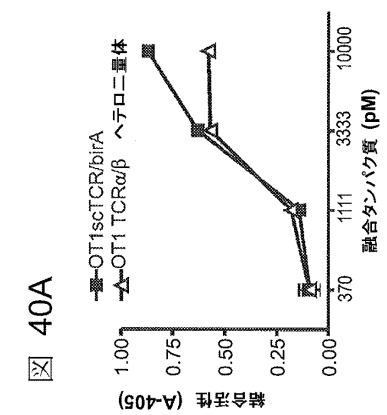
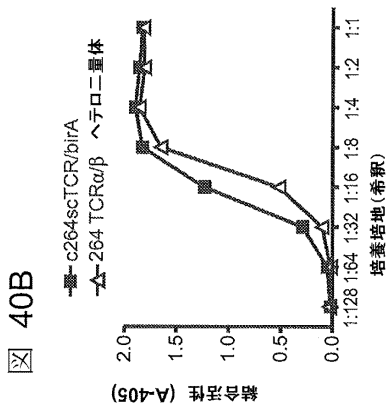


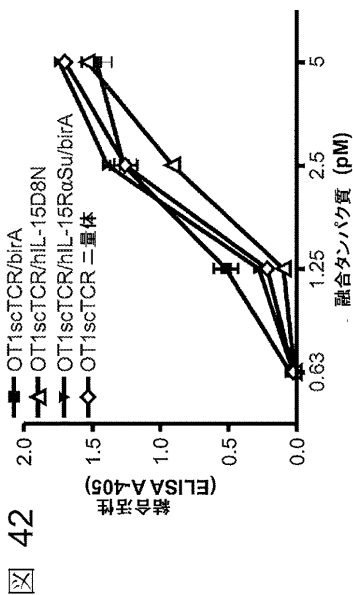
図 39A

図 39B

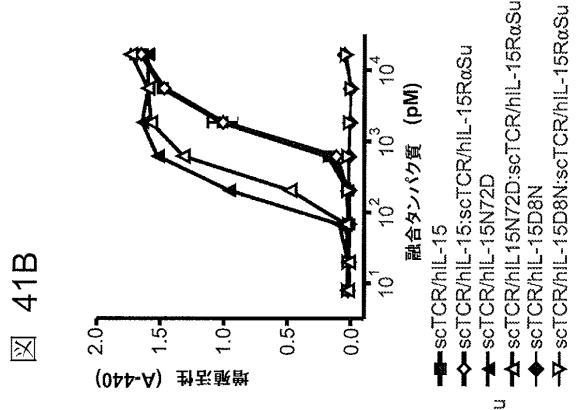
【 図 4 0 】



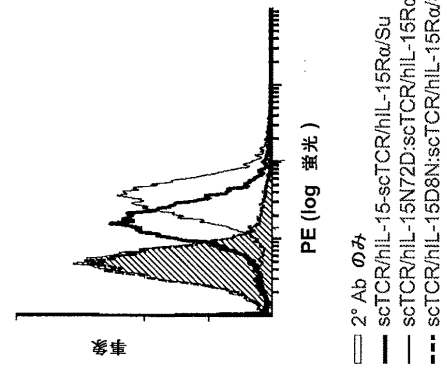
【 図 4 2 】



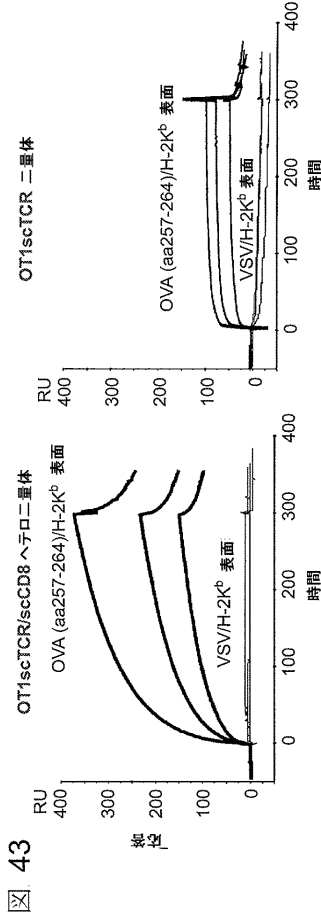
【 図 4 1 】



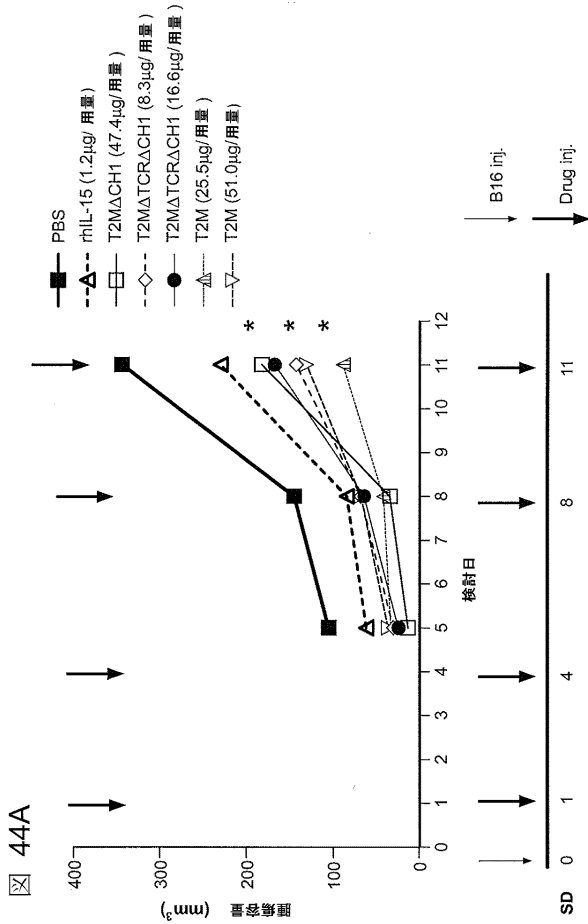
【 図 4 1A 】



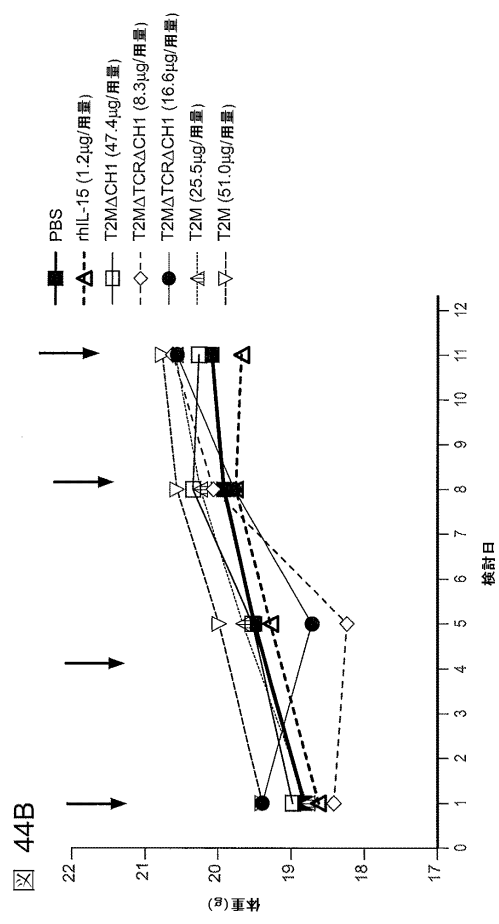
【 図 4 3 】



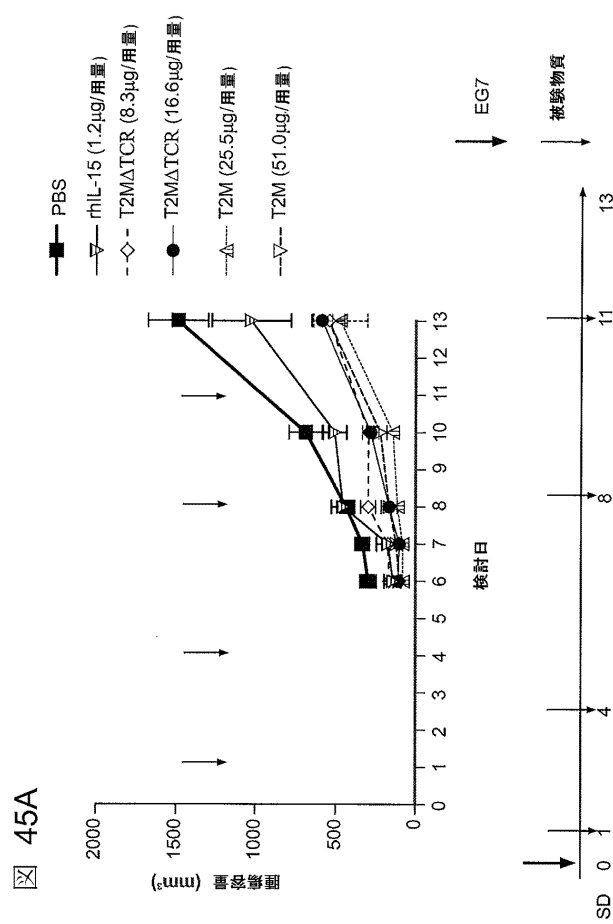
【図 4 4 A】



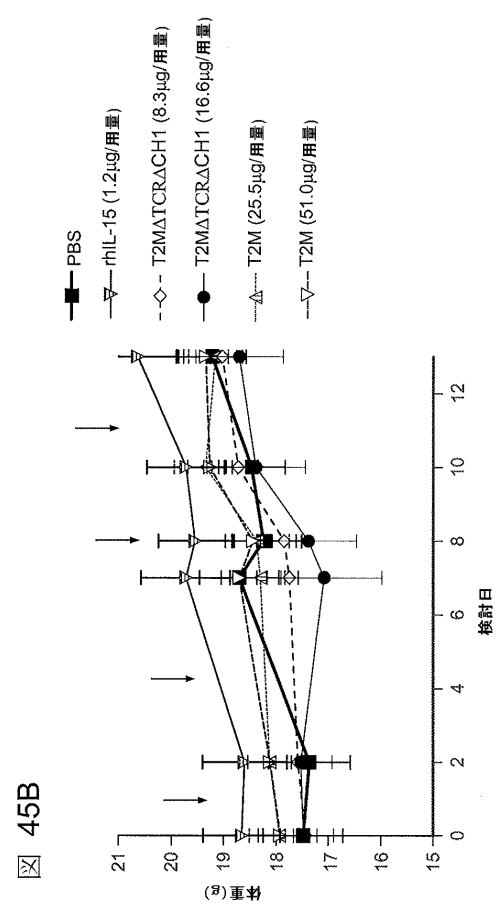
【図 4 4 B】



【図 4 5 A】



【図 4 5 B】



【 図 4 6 】

epkscdkthtccppcpapellggpsvflfppkpkdtlmiisrtpevtcvvvdvshedqevkfrw
yvdgvevhnaktkpreecynstyrsvsltvhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiska
kggprepgvvtlppsrdeitknqvsitclvkfgypsdiavewesnggpennykttppvldsd
gsfflyskltvdksrwqggnvfscsvmhealhnhytqixslslspgk

46

図

【 図 4 8 A B 】

図 48A

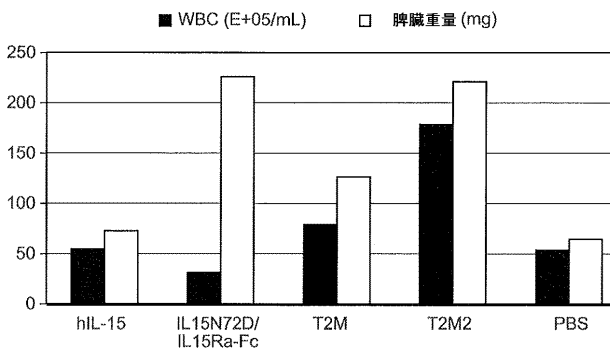
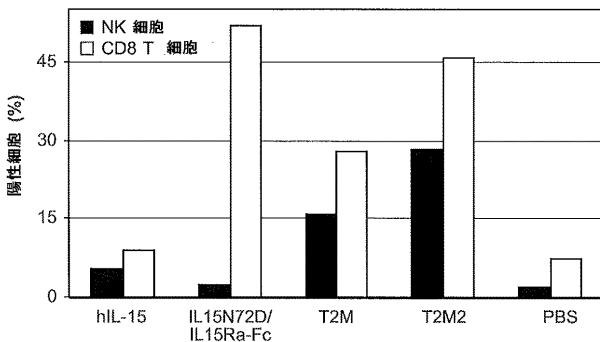
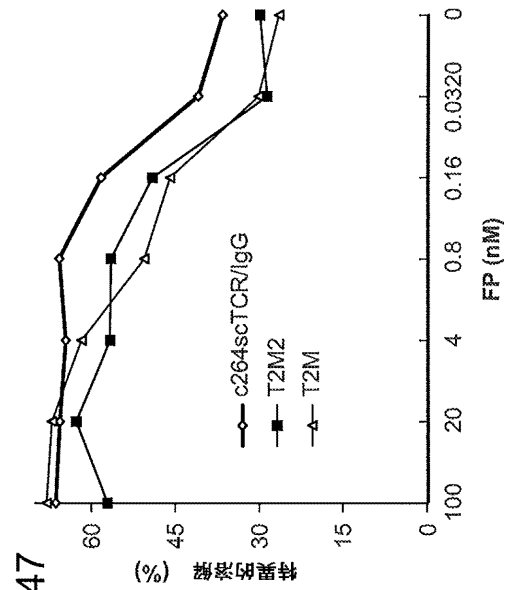


図 48B



【 図 4 7 】



図

【 図 4 8 C 】

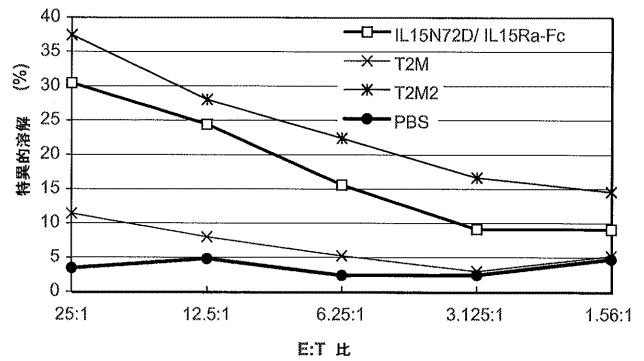
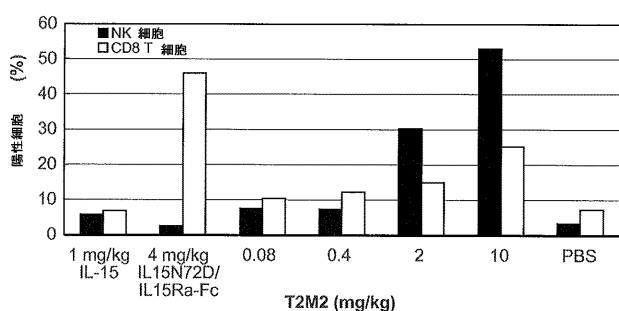
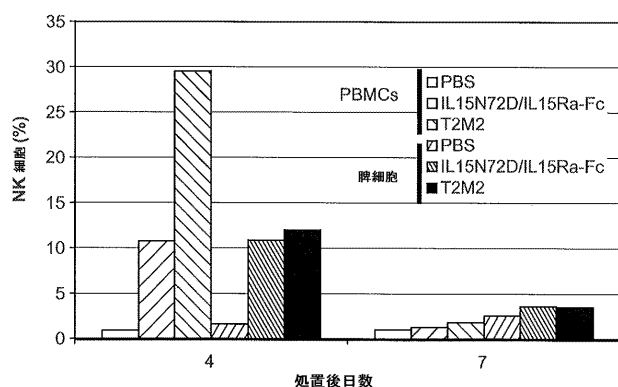


図 48C

Figure 49A is a line graph with 'Number of trials' on the x-axis (0 to 10) and 'Number of correct responses' on the y-axis (0 to 10). The data points are (0, 0), (1, 1), (2, 2), (3, 3), (4, 4), (5, 5), (6, 6), (7, 7), (8, 8), (9, 9), and (10, 10). A straight line is drawn through these points, starting from the origin and extending to the top right corner of the graph.



☒ 49B



【 ㇮ 5 0 C 】

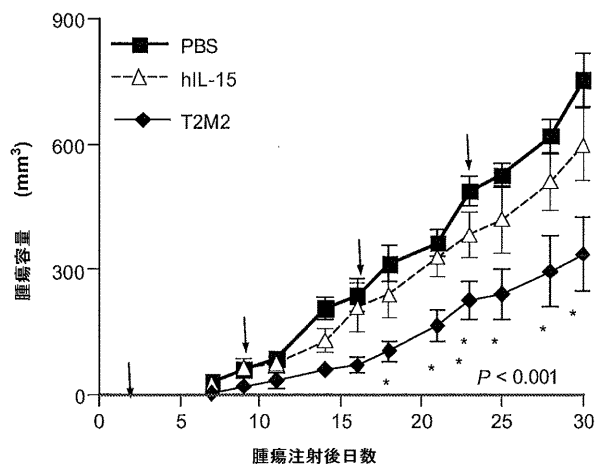


図 50C

【 図 5 0 A B 】

図 50A

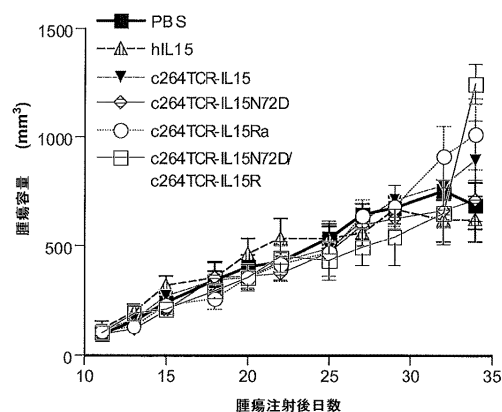
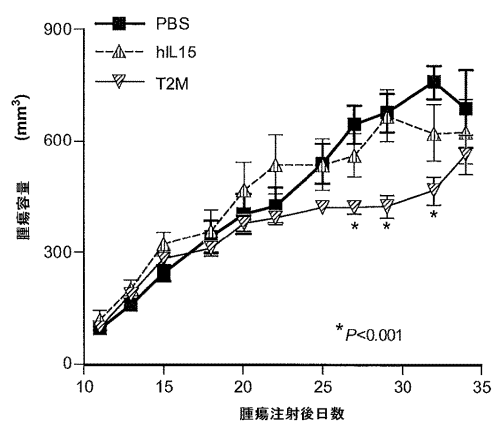


図 50B



【 図 5 1 - 1 】

图 51-1

ATGGAGACAGACACACTCCTGTTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGG
< リーダー seq
TTCCACCGGTGAGTCAGTGACGCAGCCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTCTG
>< c264scTCR
AAGGAGCCTCTCTGCACTGAGATGCAAGTATTCCTACTCTGGGACACCT
TATCTGTTTGGTATGTCCAGTACCCGGCGAGGGGCTGCAGCTGCTCCT
CAAGTACTATTTCAGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAAATGGCTTCGAGG
CTGAGTTACGACAGAGATAACTCTCTTCCACTCGCGAAAGCCTCTGTG
CACTGGAGCGCACTCTGCTGTGTACTTCTGTGTTTTCGAGCAGGATAGCAA
CTATCAGTGTGATCTGGGGCTCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCAGACCA
CTAGTGGTGGCGGTGGCAGCGCGGTGGTGGTTCCGGTGGCGCGGTCTCT
GGCGGTGGCGGTTTCTCGAGCAATTCAAAGTCATTTCAGACTCCAAGATA
TCTGGTGAAAGGCAAGGACAAAAAGCAAGATGAGGTGTATCCTCGAAA
AGGACATACCGTCTGATTTCTGGTATCAACAATAAGAACAATGAGTTT
AAATTTTTGATTAACTTTCAAGATCAAGAGTTCTTCAGCAAAATAGACATT
GACTGAAAACGATTTCTCTGTGAGTGTCTTCAAACCTCACTTTCAGCC
TAGAAATTCAGTCTCTTGAGGACGAGAGACTCAGCATGTACCTCTGTGCC
AGCAGTCTGTGACGGGGCGGACAGAAGTCTTTTGGTAAAGGAAGCAG
GCTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTG
TGTTTTCAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTG
GTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTG
GGTTAACGGGAAGAGGTGCACAGTGGGTGACGACGAGCCCGAGCCCTC
TCAAGGAGCAGCCCGCCTCAATGACTCCAGATACTGCTTCAGGACCGCG
CTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCGCAACCACTTCCGCTG
TCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGATGACGAGTGGACCCAGGATA
GGCCCAAACCCGTCACCCAGATCTGTACGCGCCGAGGCTGGGGTAGAGCA
GACATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAAACACGACAGACATCTGGGT
><
ヒト IL-15R α sushi ドメイン
CAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGAGCGGTACATTTGTAACTCTGGT

【図 5 1 - 2】

図 51-2

TCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCCTGTTGAACAAG
GCCACGAATGTCGCCACCTGGACAACCCCACTCTCAAATGCATTAGAGA
><
GCCGAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG
ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
AACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGAC
ACCCATCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGT
GAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC
ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGTAAATAA
>

【図 5 2】

図 52

qsvtqpdarvtvsegaslqlrcksysgtpylfwyvqyprqglqlllkyysgdpvvgvyn
< c264scTCR
gfeae fsksnssfhlrkasvhwdsavyfcvlsedsnyqliwsgtkliikpdtsggggs
ggggsgggsgggsgssnskvitprylvkqggqkakmrcipekghpvvfwyqqnknef
kflinfqnqevlqqidmtekrfsaecpsnspcsleiqsseaagsalylcasslsgggtv
ffgkgtrltvvedlnkvfppevavfepseaeishtqkatlvclatgffpdhvelswwng
kevhsgvstdpqplkeqpalndsryclssrlrvsatfwqnprnhfrcqvqfyglsendew
tqdrakpvtqivsaewgraditcpcppmsvehadiwvksyslysreryicnsgfkrkagt
>< ヒト IL-15R α sushi ドメイン
ssltec vlnkatnvahwttsplkcirepkscdkthtccppcpapellggpsvflfppkpkd
>< ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
tlmsirtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqnystyrvvsvltlv
hqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakgqprepqvtylpprsdeltknqvslclv
kgfypsdiawewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmh
ealhnhytqkslsispqk
>

【図 5 3】

図 53

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
< リーダー seq
CATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGT
><
CTGCATCTCCAGGGGAGAGGTCAACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGT
抗-CD20軽鎖Vドメイン
GTAAGTTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC
CTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAG
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGTCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
CACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAAGTGGAGGTGGCGGAT
>< リンカー
CAGGAGGCGGAGGTTCTGGCGGAGGTGGGAGTCAGGTACAATGCAGCAG
><
CCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTTGCAA
抗-CD20重鎖Vドメイン
GGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGA
CACCTGGTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTATCCCGGAAATGGT
GATACCTCTACAATCAGAAGTCAAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGA
CAAATCCTCCAGCAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGG
ACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGG
TACTTCAATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTGCAAACTG
><
GGTGAATGTAATAAGTGATTTGAAAAAATGAAGATCTTATTCAATCTA
ヒト IL-15N72D
TGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTACCCCAAGTTGC
AAAGTAACAGCAATGAAGTGCCTTCTCTTGGAGTTACAAGTTATTTCACT
TGAGTCCGGAGATGCAAGTATTATGATACAGTAGAAAAATCTGATCATCC
TAGCAACGACAGTTTGTCTTCAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATGC
AAAGAAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAATATTAAGAATTTTTCAGAG
TTTTGTACATATTGTCCAATGTTCAACAACACTTCTTAA
>

【図 5 4】

図 54

qivlsqspailsaspgkvtmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkpiyatnlasgvpvr
< 抗-CD20軽鎖Vドメイン
fsgsgsgtsysltisrveaadaatyyccqwt snpptfgggtkleiksgggsgggsggg
>< リンカー
gsqvqlqpggae lvkpgasvkmsckasgyfttsynmhvwtktprgrlewigaiypngd
>< 抗-CD20重鎖Vドメイン
synqkfkkgkatltadkssstaymqlssltedsavyycarstyyggdwfydvwgagttvt
vsanwnvisdlkkiedliqsmhidatlytesdvhpckvtamkcflllelqvlesgda
>< ヒト IL-15N72D
sihdtvenliilandslssngnvtsgckeeleeknikelfqsfvhlvqmifints
>

【図 55 - 1】

図 55-1

ATGGATTTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
 < リーダー seq
 CATAATGTCCAGAGGACAAATTTGTTCTCTCCCACTCTCCAGCAATCCTGT
 ><
 CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAAAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGT
 抗-CD20軽鎖Vドメイン
 GTAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC
 CTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCA
 GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAG
 GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
 CACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGTGGAGTGGCGGAT
 >< リンカー
 CCGGAGGTGGAGGTCTTGGTGGAGGTGGGAGTCAGGTACAATGCAGCAG
 ><
 CCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTTGCAA
 抗-CD20重鎖Vドメイン
 GGCTTCTGGGTACACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGA
 CACCTGGTTCGGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTATCCCGGAAATGGT
 GATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGA
 CAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGG
 ACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATCGACTTACTACGGCGGTGACTGG
 TACTTCRATGTCTGGGGCGCAGGGACCAGGTCACMGTCCTCTGCAATCAC
 ><
 GTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCAGACATCTGGGTCAAGAGCT
 ヒト IL-15R α sushi ドメイン
 ACAGCTTGTAATCCAGGGAGCGGTACATTTGTAACCTCTGGTTTCAAGCGT
 AAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGGTGTGAACAAGGCCACGAA
 TGTCGCCCCTGGACAACCCCACTCTCAAATGCATTAGAGAGCCGAAAT
 ><

【図 55 - 2】

図 55-2

CTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACCTCCTG
 ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
 GGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG
 AAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGT
 GGTGAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
 ACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACC
 ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC
 CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG
 TCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGG
 CTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
 TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGTGTAATAA
 >

【図 56】

図 56

qivlsqspailsaspgkvmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkpwiatsnlasgvpvr
 < 抗-CD20軽鎖Vドメイン
 fsgsgsgtsysltisrveadaatyccqgwtstnpptfgggtkleiksggqsgqsggg
 >< リンカー
 gsvqlqppgaelvkgasvkmckasgytftsnyhmhwktpgrglewigaiypngdt
 >< 抗-CD20重鎖Vドメイン
 synqkikgkatltadkssstaymqissitsedsavyyrcarstyygdyfnnvgagttvt
 vsaitcoppmsvehadiwvksyslysreryicnsqfkrkaqtssltcvlnkatnvahwt
 >< ヒト IL-15R α sushi ドメイン
 tpslkci repkscdkthtccppapellgqpsvflfppkpkdtlmsrtpevtcvvvdvs
 >< ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
 hedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeyckvsnka
 lpapiektiskakgpprepqvytlpsrdeltknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqp
 ennykttpvldsdgsfflyskltvdkrsrwqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispk
 >

【図 57】

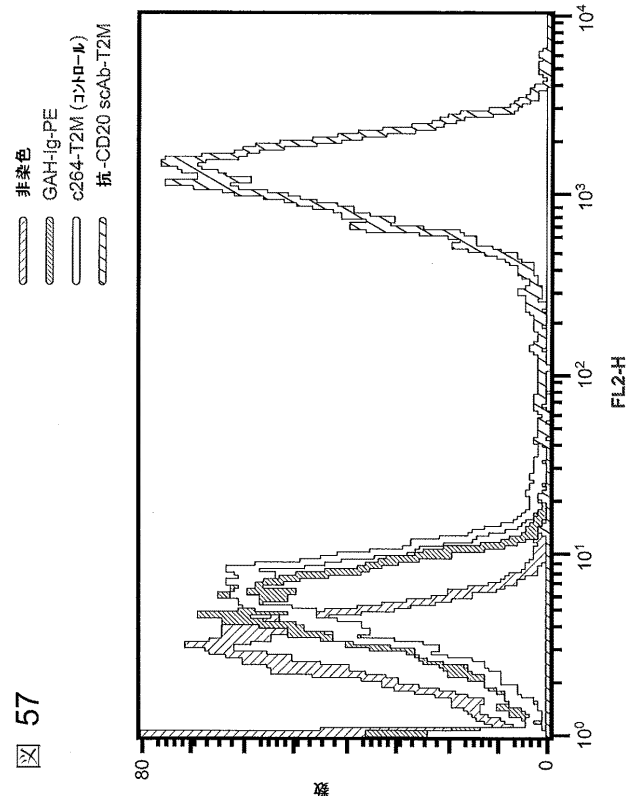
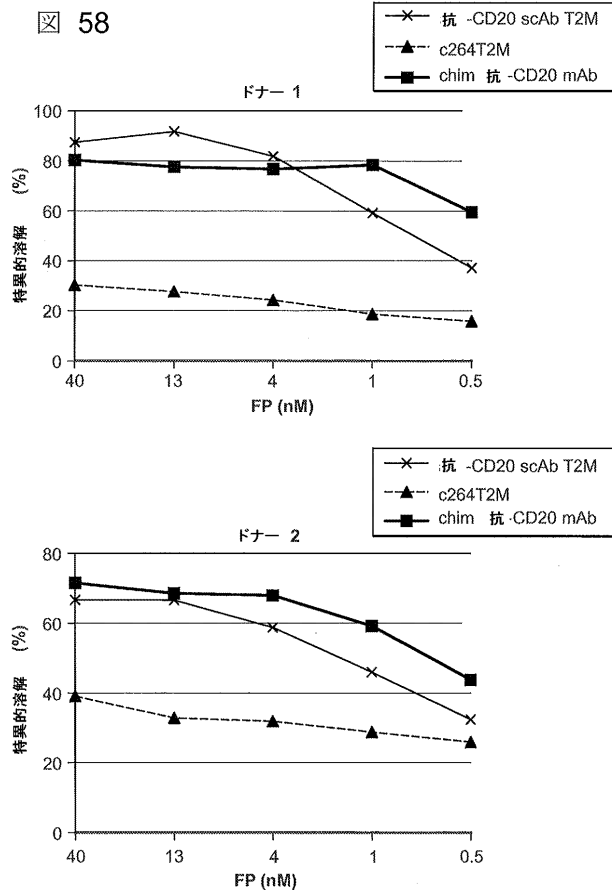
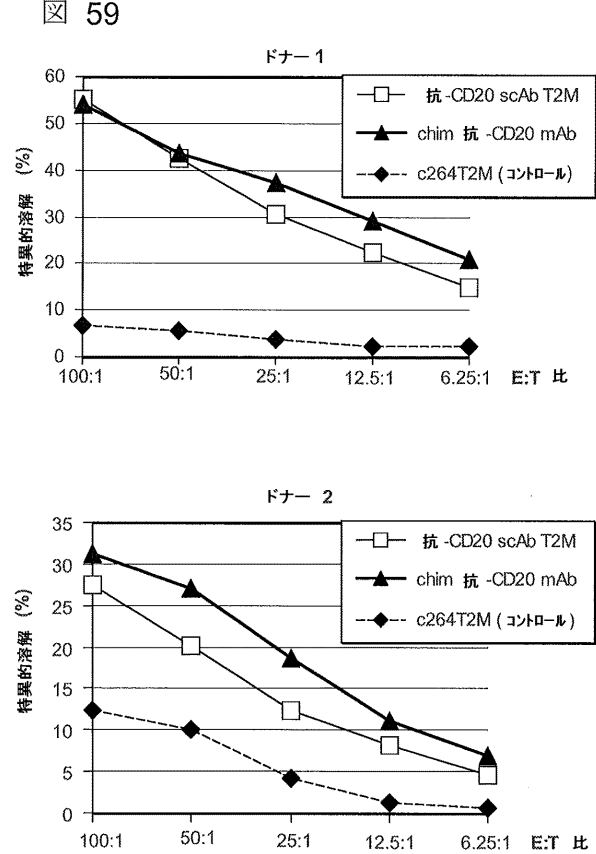


図 57

【図 58】



【図 59】



【図 60】

図 60

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCTTCAGT
< リーダー 配列
CATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGT
>>
CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGT
抗-CD20軽鎖V / ヒト カッパ C ドメイン
GTAAGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC
CTGGATTTATGCCACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCA
GTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGAG
GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC
CACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAATCAAACGTACGGTTGCTGCAC
CATCTGCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGT
ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCCTACAGCCTCAGCAGCACCTTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT
CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
AGTGTAAGTGGGTGAATGAATAAGTGATTTGAAAAAATGAAGATCTT
>>
ヒト IL-15N72D
ATTCATCTATGCATATTGATGCTACTTTATATACGAAAGTGATGTTCA
CCCCAGTTGCAAGTAACGCAATGAAGTGCTTTCTCTTGGAGTTACAAG
TTATTTCACTTGAGTCCGAGATGCAAGTATTCATGATACAGTAGAAAAAT
CTGATCATCTAGCAAAACGACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGA
ATCTGGATGCAAGAAATGTGAGGAACGGAGGAAAAAATATTAAGAAT
TTTTGCAGAGTTTGTACATATTGTCCAAATGTTTCATCAACACTTCTTAA
>

【図 61】

図 61

qivlsqspailsaspgekvtmtcrasssvsyihwfqqkpgsspkpiyatsnlasgvpvr
< 抗-CD20軽鎖VDメイン
fsgsgsgtsysltisrveaadaatyycqqtwnpftfgggtkleikrtvaapsvfifpps
>>
deqlksgtasvvcllnnfybreakvqwkvdnlqsgnsqesvteqgskdstylsstltl
ヒト カッパ C ドメイン
skadyekhkvacevthqglsspvtksfnrgecnwvnnvisdlkkiedliqsmhidatlyt
>> ヒト IL-15N72D
esdvhpvscvktamkcfllelqvvisesgdasihdtenliilandslssngnvtsgcke
ceeleeeknikelfqsfvshivqmints
>

【図 6 2 - 1】

図 62-1

ATGGGTTGGAGTCTCATCTTGCTCTTCTTGTGCTGTTGCTACACGTGT
 < リーダー 配列
 CCTGTCCCAGGTACAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTG
 ><
 GGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGT
 抗-CD20重鎖V / ヒト HC CH1 ドメイン
 TACAATATGCACTGGGTAAACAGACACCTGGTCGGGGCTGGAATGGAT
 TGGAGCTATTTATCCCGGAAATGGTGATATTCTTACAATCAGAAGTTCA
 AAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
 CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAG
 ATCGACTTACTACGGCGGTGACTGGTACTTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGA
 CCACGGTCACCGTCTCTGCAGTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
 CTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCTAG
 GCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCA
 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG
 CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAAAGTTATCACGTGCCCTCCCCCATGTCCGTGGAACACGCA
 >< ヒト IL-15R α sushi ドメイン
 GACATCTGGGTCAAGAGCTACAGCTTGTACTCCAGGGAGCGGTACATTG
 TAACTCTGGTTTCAAGCGTAAAGCCGGCACGTCCAGCCTGACGGAGTGCG
 TGTGGAACAAGGCCACGAATGTCGCCCACTGGACAACCCCACTCTCAAA

【図 6 3】

図 63

qvqlqpqaclvkgasvkmckasgytftsynmhvkwqtpgrglewigaiypngdtsy
 < 抗-CD20重鎖Vドメイン
 nqkfkgkatltadkssstaynqlssltedsavyyicarstyyggdwfydvwgagttvtvs
 aastkqpsvflpaspsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqs
 >< ヒト IgG1 HC CH1 ドメイン
 sglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvitcoppmsvehadiwvksysl
 ><
 ysrrerycnsqfkrkagtsltecvlkatnvahwttpslkcirepkscdkthtcppcpa
 ヒト IL-15R α sushi ドメイン ><
 pellggpsvflfpkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshdpevkfnwyvdgvevhnaktkp
 ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
 reeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvyl
 ppsrdeltknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflysklt
 vdksrwqggnvfscsvmhcalhnhytqkslsispk
 >

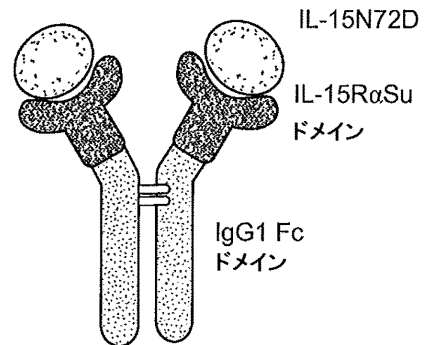
【図 6 2 - 2】

図 62-2

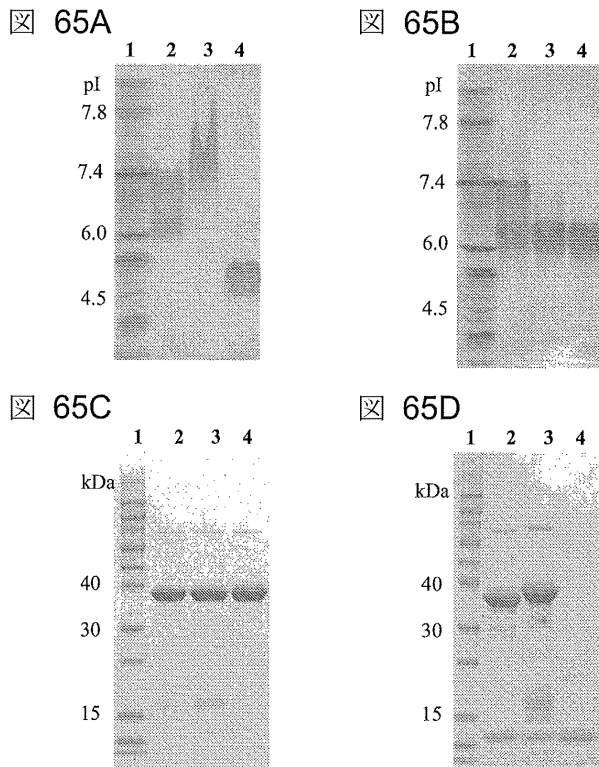
TGCATTAGAGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCCACCGTG
 >< ヒト IgG1 CH2-CH3 (Fc) ドメイン
 CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA
 AACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT
 GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGAC
 TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC
 AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGGTGACCAAGAACCAG
 GTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGT
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCGACCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC
 CCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTG
 GTAAATAA
 >

【図 6 4】

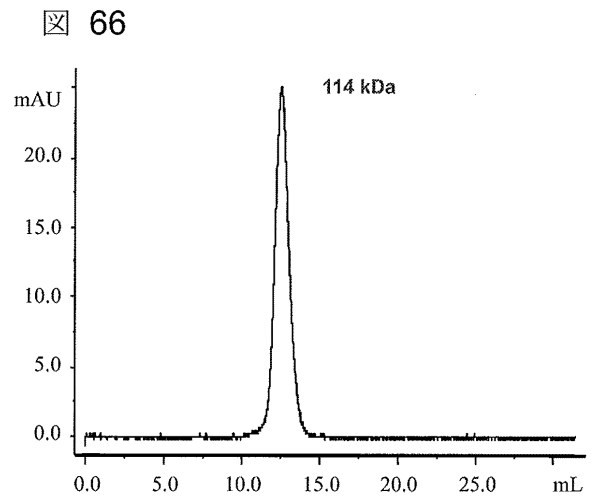
図 64



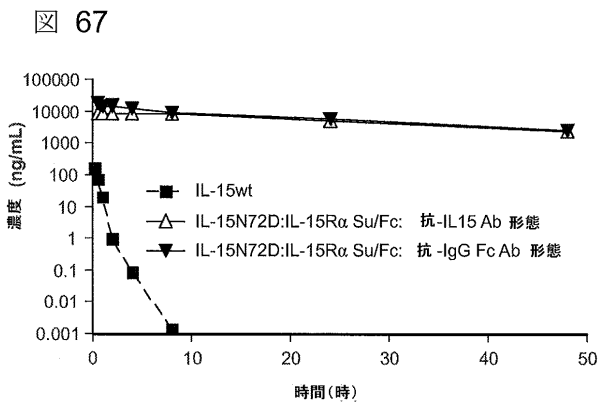
【図 6 5】



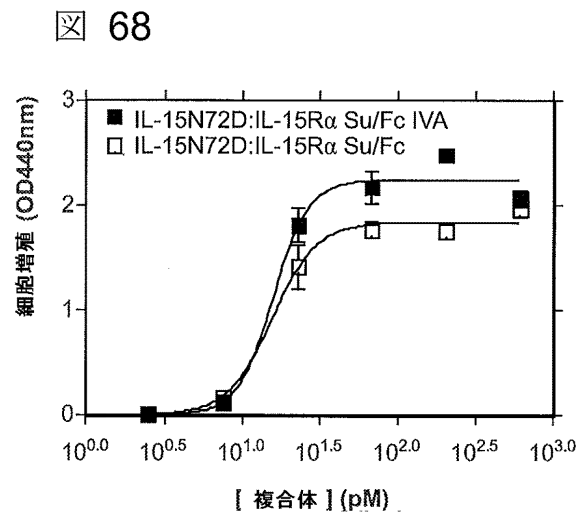
【図 6 6】



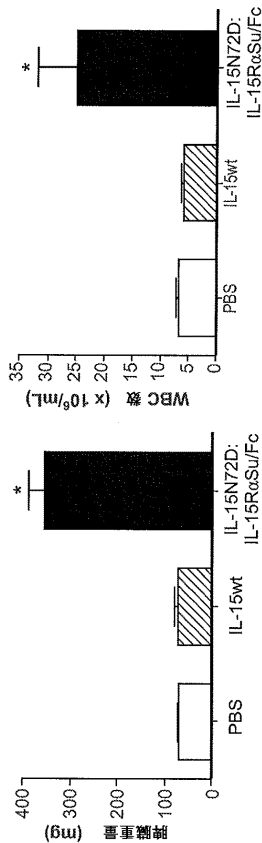
【図 6 7】



【図 6 8】



【図 69】



69



【配列表】

2018046831000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月10日(2017.11.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

2つのIL-15受容体融合ポリペプチドからなる二量体、及びIL-15配列の72位でNからDへの置換を含有してなるIL-15変異体ポリペプチド(IL-15N72D)の2分子を含んでなり、

IL-15受容体融合ポリペプチドはそれぞれ、免疫グロブリンFcドメインに融合したIL-15Rαsuhi結合ドメイン(IL-15RαSu/Fc)を含有してなり、

IL-15Rαsuhi結合ドメインはそれぞれ、IL-15N72Dポリペプチドと結合している、

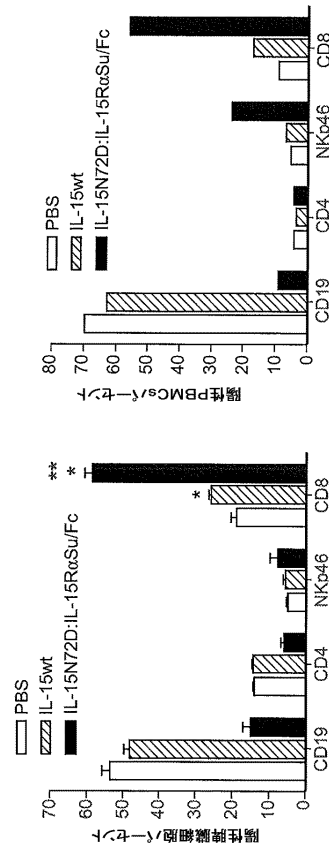
IL-15結合部位が完全に占有されているIL-15N72D:IL-15RαSu/Fc複合体。

【請求項2】

IL-15N72D及び/又はIL-15RαSu/Fc融合タンパク質がグリコシル化されている、請求項1に記載の複合体。

【請求項3】

【図 70】



70



請求項 1 又は 2 に記載の複合体をコードする配列を含んでなる、核酸。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の核酸を含んでなる、DNA ベクター。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の核酸を含んでなる、細胞。

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 に記載の完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体を含んでなる、対象における免疫応答を増大又は減少するための医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載の完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体を含んでなる、腫瘍を有している対象における免疫応答を増強するための医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 に記載の完全に占有されている IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc 複合体を含んでなる、ウィルス感染に対する免疫応答を増強するための医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明の可溶性融合タンパク質複合体のある特定の実施態様では、IL - 15 ポリペプチドは天然型 IL - 15 ポリペプチドと異なったアミノ酸配列を有している IL - 15 変異体である。ヒト IL - 15 ポリペプチドを本明細書では hu IL - 15、h IL - 15、hu IL 15、h IL 15、IL - 15 野生型 (wt) 等で示し、そしてこの変異体を天然アミノ酸、天然配列中のその位置及び変異アミノ酸を用いて示す。例えば、hu IL 15 N72D は、72 位の N の D への置換を含むヒト IL - 15 を示す。ある特定の実施態様では、IL - 15 変異体は、例えば、天然型 IL - 15 ポリペプチドと比べて IL - 15 R β γ C 受容体に対する増大した結合活性によって実証されているように、IL - 15 アゴニストとして機能する。ある特定の実施態様では、IL - 15 変異体は、例えば、天然型 IL - 15 ポリペプチドと比べて IL - 15 R β γ C 受容体に対する減少した結合活性によって実証されているように、IL - 15 アンタゴニストとして機能する。ある特定の実施態様では、IL - 15 変異体は天然型 IL - 15 ポリペプチドと比べ IL - 15 R β γ C 受容体に対して増大した結合親和性又は減少した結合活性を有している。ある特定の実施態様では、IL - 15 変異体の配列は天然型 IL - 15 の配列と比べて、少なくとも 1 つの (すなわち、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれ以上の) アミノ酸変化を有している。アミノ酸変化は、IL - 15 R β 及び / 又は IL - 15 R γ C と相互作用する IL - 15 のドメインにおける 1 つ又はそれ以上のアミノ酸の置換又は欠失を包含できる。ある特定の実施態様では、アミノ酸変化は成熟ヒト IL - 15 配列 (配列番号 51) の 8、61、65、72、92、101、108、又は 111 位における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸置換又は欠失である。例えば、アミノ酸変化は、成熟ヒト IL - 15 配列の 8 位の D を N 又は A へ、61 位の D を A へ、65 位の N を A へ、72 位の N を R へ又は 108 位の Q を A への置換又はこれらの置換の組合わせである。ある特定の実施態様では、アミノ酸変化は、成熟ヒト IL - 15 配列の 72 位の N を D への置換である。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

本発明のある特定の実施態様では、可溶性融合タンパク質複合体中で、Fcドメイン又はその機能的断片は、IgG Fcドメイン、ヒトIgG1 Fcドメイン、ヒトIgG2 Fcドメイン、ヒトIgG3 Fcドメイン、ヒトIgG4 Fcドメイン、IgA Fcドメイン、IgD Fcドメイン、IgE Fcドメイン、及びIgM Fcドメイン；又はこれらの何れかの組合わせよりなる群から選ばれるFcドメインを包含する。ある特定の実施態様では、Fcドメインは、変化した補体又はFc受容体結合特性を有するFcドメインをもたらすアミノ酸変化を包含する。変化した補体又はFc受容体結合特性を有するFcドメインを生ずるアミノ酸変化は当該技術分野で公知である。例えば、IgG1 C_H2の234位及び235位（番号は抗体コンセンサス配列に基づいている）のロイシン残基（すなわち、...PELLGG...（配列番号1））のアラニン残基による置換（すなわち、...PEAAGG...（配列番号2））はFcガンマ受容体結合の損失をもたらすのに対して、IgG1 C_H2の322位（番号は抗体コンセンサス配列に基づいている）のリジン残基（すなわち、...KCKSL...（配列番号3））のアラニン残基による置換（すなわち、...KCASL...（配列番号4））は補体活性の損失をもたらす。ある特定の実施態様では、このような突然変異を組み合わせることができる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

本発明は、本発明の1つ又はそれ以上の可溶性融合タンパク質複合体、本発明の可溶性融合タンパク質複合体を製造するための1つ又はそれ以上の特定試薬（例えば、本発明の1つ又はそれ以上の可溶性融合タンパク質複合体をコードするヌクレオチド）、及び/又は本発明の1つ又はそれ以上の可溶性融合タンパク質複合体を用いるための特定物質を包含しているキットも提供する。キット中の物質は、一般的に使用説明書と共に、適切な容器中で提供される。

すなわち、本発明は、以下の(1)から(108)に関する。

(1) 少なくとも2つの可溶性融合タンパク質を含んでなる、可溶性融合タンパク質複合体であって、第1の融合タンパク質が、インターロイキン-15(IL-15)ポリペプチド(b)又はその機能的断片と共有結合している第1生物活性ポリペプチド(a)を含み、そして、第2の融合タンパク質が、可溶性インターロイキン-15受容体アルファ(IL-15R α)ポリペプチド(d)又はその機能的断片と共有結合している第2生物活性ポリペプチド(c)を含み、第1及び第2融合タンパク質の一方又は両方が更に免疫グロブリンFcドメイン又はその機能的断片を含み、第1融合タンパク質のIL-15ドメインが第2融合タンパク質の可溶性IL-15R α ドメインと結合して可溶性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。

(2) 第1及び第2生物活性ポリペプチドの一方が第1可溶性T細胞受容体(TCR)又はその機能的断片を含んでいる、前記(1)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3) 他方の生物活性ポリペプチドが、前記(2)に記載の第1可溶性TCR又はその機能的断片を含み、それによって増大した結合活性を有する多価TCR融合タンパク質複合体を作製する、前記(2)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(4) 他方の生物活性ポリペプチドが第1可溶性TCRと異なる第2可溶性TCR又はその機能的断片を含んでいる、前記(2)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(5) TCRが特定抗原の認識に特異的である、前記(2)～(4)に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(6) T C R が、 α 及び β 鎖 T C R を含んでいるヘテロ二量体である、前記 (2) ~ (4) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(7) T C R が 1 本鎖 T C R ポリペプチドを含んでいる、前記 (2) ~ (4) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(8) 1 本鎖 T C R が、ペプチドリンカー配列によって T C R V - β 鎖と共有結合している T C R V - α 鎖を含んでいる、前記 (7) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(9) 1 本鎖 T C R が、T C R V - β 鎖と共有結合している可溶性 T C R C β 鎖断片を更に含んでいる、前記 (8) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 0) 1 本鎖 T C R が、T C R V - α 鎖と共有結合している可溶性 T C R C α 鎖断片を更に含んでいる、前記 (8) 又は (9) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 1) 第 1 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 2 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んでいる、前記 (1) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 2) 第 1 及び第 2 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んでいる、前記 (1) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 3) 抗体が、特定抗原の認識に特異的である、前記 (1 2) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 4) 抗体が、1 本鎖抗体又は 1 本鎖 F v である、前記 (1 2) 又は (1 3) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 5) 1 本鎖抗体が、ポリペプチドリンカー配列によって免疫グロブリン重鎖可変領域と共有結合している免疫グロブリン軽鎖可変領域を含んでいる、前記 (1 4) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 6) 第 1 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 2 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んでいる、前記 (1) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 7) I L - 1 5 ポリペプチドが、天然の I L - 1 5 ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を含んでいる I L - 1 5 変異体である、前記 (1) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 8) I L - 1 5 変異体が、I L - 1 5 アゴニスト又はアンタゴニストとして機能する、前記 (1 7) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(1 9) I L - 1 5 変異体が、天然の I L - 1 5 ポリペプチドと比較して、I L - 1 5 R β γ C 受容体に対する増大した又は減少した結合活性を有している、前記 (1 7) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 0) I L - 1 5 変異体の配列が、天然の I L - 1 5 配列と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸変化を有している、前記 (1 7) ~ (1 9) の何れかに記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 1) アミノ酸変化が、I L - 1 5 R β 及び / 又は I L - 1 5 R γ C と相互作用する I L - 1 5 のドメイン中のアミノ酸置換又は欠失である、前記 (2 0) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 2) アミノ酸変化が、成熟ヒト I L - 1 5 配列 (配列番号 5 1) の 6、8、1 0、6 1、6 5、7 2、9 2、1 0 1、1 0 4、1 0 5、1 0 8、1 0 9、1 1 1、又は 1 1 2 位における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸置換又は欠失である、前記 (2 0) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 3) アミノ酸変化が、成熟ヒト I L - 1 5 配列の 6 位の I を S に、8 位の D を N 若しくは A に、6 1 位の D を A に、6 5 位の N を A に、7 2 位の N を R に、1 0 4 位の V を P に、又は 1 0 8 位の Q を A に置換すること、又はこれらの置換の何れかの組み合わせである、前記 (2 2) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 4) アミノ酸変化が、I L - 1 5 アンタゴニスト活性又は天然の I L - 1 5 ポリペプチドと比較して I L - 1 5 R β γ C 受容体に対する減少した結合活性を有する I L - 1 5 変異体をもたらす、前記 (2 3) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 5) アミノ酸変化が、成熟ヒト I L - 1 5 配列の 7 2 位で N を D に置換することである、前記 (2 0) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 6) アミノ酸変化が、I L - 1 5 アゴニスト活性又は天然の I L - 1 5 ポリペプチドと比較して I L - 1 5 R β γ C 受容体に対する増大した結合活性を有する I L - 1 5 変異体をもたらす、前記 (2 5) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 7) F c ドメイン又はその機能的断片が、I g G F c ドメイン、ヒト I g G 1 F c ドメイン、ヒト I g G 2 F c ドメイン、ヒト I g G 3 F c ドメイン、ヒト I g G 4 F c ドメイン、I g A F c ドメイン、I g D F c ドメイン、I g E F c ドメイン、及び I g M F c ドメインからなる群より選ばれる F c ドメインを含んでいる、前記 (1) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(2 8) F c ドメインが、変化した相補体又は F c 受容体結合特性を有する F c ドメインをもたらすアミノ酸変化を含んでいる、前記 (2 7) に記載の可溶性融合タンパク質。

(2 9) アミノ酸変化が、I g G 1 C_H 2 の 2 3 4 及び 2 3 5 位のロイシン残基の (抗体コンセンサス配列に基づいてナンバリング) (すなわち、 . . . P E L L G G . . .) アラニン残基による置換 (すなわち、 . . . P E A A G G . . .)、I g G 1 C_H 2 の 3 3 2 位のリジン残基の (抗体コンセンサス配列に基づいてナンバリング) (すなわち、 . . . K C K S L . . .) アラニン残基による置換 (すなわち、 . . . K C A S L . . .)、又はこれらの何れかの組合わせからなる群より選ばれる、前記 (2 8) に記載の可溶性融合タンパク質。

(3 0) 第 1 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 I L - 1 5 ポリペプチド (又はその機能的断片) と共有結合している、前記 (1) ~ (2 9) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 1) 第 2 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 I L - 1 5 R α ポリペプチド (又はその機能的断片) と共有結合している、前記 (1) ~ (3 0) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 2) I L - 1 5 R α ポリペプチド (又はその機能的断片) が、ポリペプチドリinker 配列によって F c ドメイン (又はその機能的断片) と共有結合している、前記 (1) ~ (3 1) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 3) T C R ドメインに対する抗原が、M H C 又は H L A 分子中で提示されるペプチド抗原を含んでいる、前記 (5) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 4) ペプチド抗原が、腫瘍関連ポリペプチド又はウィルスがコードするポリペプチドに由来している、前記 (3 3) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 5) 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んでいる、前記 (1 3) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 4) 抗体ドメインに対する抗原が、C D 抗原、サイトカイン又はケモカインの受容体又はリガンド、成長因子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 / 陰性同時刺激受容体又はリガンド、死受容体又はリガンド、腫瘍関連抗原、或いはウィルスがコードする抗原を含んでいる、前記 (1 3) 又は (3 5) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 5) I L - 1 5 R α ポリペプチドが、I L - 1 5 ポリペプチドを結合することができる I L - 1 5 受容体アルファの細胞外ドメインを含んでいる、前記 (1) ~ (3 4) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 6) I L - 1 5 R α ポリペプチドが、I L - 1 5 R α s u s h i ドメイン又は I L - 1 5 R α Δ E 3 ドメインの何れかを含んでいる、前記 (1) ~ (3 5) の何れかに記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 7) 前記 (1) ~ (3 6) の何れかに記載の第 2 可溶性融合タンパク質複合体と共有結合している前記 (1) ~ (3 6) の何れかに記載の第 1 可溶性融合タンパク質複合体を含んでなる、可溶性融合タンパク質複合体。

(3 8) 第 1 可溶性融合タンパク質複合体が、第 2 可溶性融合タンパク質複合体と同じである、前記 (3 7) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(3 9) 第 1 可溶性融合タンパク質複合体が、第 2 可溶性融合タンパク質複合体と異なる、前記 (3 7) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(4 0) 第 1 可溶性融合タンパク質複合体が、ジスルフィド結合で第 2 可溶性融合タンパク質複合体と共有結合している、前記 (3 7) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(4 1) ジスルフィド結合が、第 1 可溶性融合タンパク質複合体の第 2 ポリペプチドの F c ドメインを第 2 可溶性融合タンパク質複合体の第 2 ポリペプチドの F c ドメインに共有結合させる、前記 (4 0) に記載の可溶性融合複合体。

(4 2) 前記 (1) ~ (3 6) の何れかに記載の第 1 融合タンパク質をコードする核酸配列。

(4 3) 前記 (1) ~ (3 6) の何れかに記載の第 2 融合タンパク質をコードする核酸配列。

(4 4) 核酸配列が融合タンパク質をコードする配列に操作可能に結合しているプロモータ、翻訳開始シグナル、及びリーダー配列を更に含んでいる、前記 (4 2) 又は (4 3) に記載の核酸配列。

(4 5) 前記 (4 2) に記載の核酸配列を含んでなる、DNAベクター。

(4 6) 前記 (4 3) に記載の核酸配列を含んでなる、DNAベクター。

(4 7) 前記 (4 2) 及び (4 3) に記載の核酸配列を含んでなる、DNAベクター。

(4 8) 前記 (4 2) に記載の配列、前記 (4 3) に記載の配列、及び前記 (4 2) 及び (4 3) に記載の配列の群から選ばれる核酸配列を含んでなる、細胞。

(4 9) 方法が、a) 第 1 融合タンパク質をコードする前記 (4 5) に記載の DNA ベクターを第 1 宿主細胞内に導入すること、b) 細胞又は培地中に第 1 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で培地中で第 1 宿主細胞を培養すること、c) 宿主細胞又は培地から第 1 融合タンパク質を精製すること、d) 第 2 融合タンパク質をコードする前記 (4 6) に記載の DNA ベクターを第 2 宿主細胞内に導入すること、e) 細胞又は培地中に第 2 融合タンパク質を発現するのに十分な条件下で培地中で第 2 宿主細胞を培養すること、及び f) 宿主細胞又は培地から第 2 融合タンパク質を精製すること、及び g) 第 1 融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと第 2 融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R α ドメインの間を結合させるのに十分な条件下で第 1 及び第 2 融合タンパク質を混合して可溶性融合タンパク質複合体を形成すること、を含んでなる、前記 (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。

(5 0) 前記 (4 6) に記載の核酸から発現されたポリペプチド間にジスルフィド結合を形成させるのに十分な条件下で第 1 及び第 2 融合タンパク質を混合することを更に含み、ここで前記 (3 7) に記載の可溶性融合タンパク質複合体を形成する、前記 (4 9) に記載の方法。

(5 1) 方法が、a) 第 1 融合タンパク質をコードする前記 (4 5) に記載の DNA ベクター及び第 2 融合タンパク質をコードする前記 (4 6) に記載の DNA ベクターを宿主細胞に導入すること、b) 細胞又は培地中に融合タンパク質を発現して、第 1 融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと第 2 融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R α ドメインの間を会合させて可溶性融合タンパク質複合体の形成を可能にす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、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、を含んでなる、前記 (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。

(5 2) 前記 (4 6) に記載の核酸から発現されたポリペプチド間にジスルフィド結合を形成させるのに十分な条件下で第 1 及び第 2 融合タンパク質複合体を混合することを更に含み、ここで前記 (3 7) に記載の可溶性融合タンパク質複合体を形成する、前記 (5 1) に記載の方法。

(5 3) 方法が、a) 第 1 及び第 2 融合タンパク質をコードする前記 (4 7) に記載の DNA ベクターを宿主細胞内に導入すること、b) 細胞又は培地中に融合タンパク質を発現して、第 1 融合タンパク質の I L - 1 5 ドメインと第 2 融合タンパク質の可溶性 I L - 1 5 R α ドメインの間を会合させて可溶性融合タンパク質複合体の形成を可能にする、及び

前記（４６）に記載の核酸によってコードされるポリペプチドの間にジスルフィド結合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、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んでなる、前記（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。

（５４）前記（４６）に記載の核酸から発現されたポリペプチド間にジスルフィド結合を形成させるのに十分な条件下で第１及び第２融合タンパク質を混合することを更に含み、ここで前記（３７）に記載の可溶性融合タンパク質複合体を作成する、前記（５３）に記載の方法。

（５５）方法が、a）複数の細胞を前記（１）～（４１）に記載の可溶性融合タンパク質複合体と接触させること（ここで複数の細胞は更に、前記（１）に記載のＩＬ－１５ドメインによって認識されるＩＬ－１５Ｒ鎖を担持している免疫細胞又は前記（１）に記載のＦｃドメインによって認識されるＦｃ受容体鎖を担持している免疫細胞、及び前記（１）に記載の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担持している標的細胞を含んでいる）、b）標的細胞上の抗原と、免疫細胞上のＩＬ－１５Ｒ又はＦｃ受容体鎖の間に、免疫細胞を結合及び活性化するのに十分に、特異的結合複合体（架橋）を形成すること；及びc）結合した活性化免疫細胞によって標的細胞を殺傷することを含んでなる、標的細胞を殺傷する方法。

（５６）標的細胞が、腫瘍細胞又はウイルス感染細胞である、前記（５５）に記載の方法。

（５７）生物活性ポリペプチドがＴＣＲを含んでいる、前記（５５）又は（５６）に記載の方法。

（５８）標的細胞上の抗原が、ＭＨＣ又はＨＬＡ分子内に提示され、ＴＣＲによって認識される、腫瘍又はウイルスによってコードされるペプチド抗原を含んでいる、前記（５７）に記載の方法。

（５９）免疫細胞が、Ｔ細胞、ＬＡＫ細胞、ＮＫ細胞、マクロファージ、単球又は顆粒球である、前記（５５）に記載の方法。

（６０）疾患細胞が疾患関連抗原を発現している、患者の疾患を予防又は治療する方法であって、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んでいる前記（１）～（４１）の何れか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）抗原発現疾患細胞と免疫細胞を発現しているＩＬ－１５Ｒ又はＦｃ受容体の間に免疫細胞を局在化するのに十分に特異的結合複合体（架橋）を形成すること、及びc）患者の疾患を予防又は治療するのに十分に疾患細胞を損傷又は殺傷すること、を含んでなる、方法。

（６１）疾患細胞が疾患関連抗原を発現している、患者の疾患を予防又は治療する方法であって、方法が、a）ＩＬ－１５Ｒ鎖又はＦｃ受容体鎖を担持してい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んでいる前記（１）～（４１）の何れか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）抗原発現疾患細胞と免疫細胞を発現しているＩＬ－１５Ｒ又はＦｃ受容体の間に免疫細胞を局在化するのに十分に特異的結合複合体（架橋）を形成すること、及びd）患者の疾患を予防又は治療するのに十分に疾患細胞を損傷又は殺傷することを含んでなる、方法。

（６２）疾患が癌又はウイルス感染症である、前記（６０）又は（６１）に記載の方法。

（６３）疾患関連抗原がペプチド／ＭＨＣ複合体である、前記（６０）又は（６１）に記載の方法。

（６４）前記（１）～（４１）の何れか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んでなる、哺乳動物における免疫応答を刺激する方法。

（６５）前記（１）～（４１）の何れか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んでなる、哺乳動物における免疫応答を抑制する方法。

（６６）少なくとも１つの可溶性融合タンパク質複合体が検出可能な標識を含んでいる、前記（１）～（４１）の何れかに記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(6 7) 検出可能な標識が、ビオチン、ストレプトタビジン、酵素又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、リン光性若しくはケミルミネセント分子である、前記 (6 6) に記載の可溶性融合タンパク質複合体。

(6 8) 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の間に特異的結合複合体を形成する条件下で、細胞又は組織を前記 (6 6) に記載の少なくとも 1 つの可溶性融合タンパク質複合体と接触させること、b) 抗原に結合しなかった何れの可溶性融合タンパク質複合体も除去するのに適している条件下で細胞又は組織を洗浄すること、及び c) 抗原を含有している細胞又は組織の指標であるとして、特異的結合複合体を検出することを含んでなる、細胞又は組織上に提示される抗原を含有している細胞又は組織を検出する方法。

(6 9) 生物活性ポリペプチドが T C R を含み、そして抗原が T C R によって認識される M H C 又は H L A 分子内に提示されるペプチド抗原を含んでいる、前記 (6 8) に記載の方法。

(7 0) 抗原提示のコピー数が細胞当たり多くて 1 0 0 0 コピーである、前記 (6 8) 又は (6 9) に記載の方法。

(7 1) 方法がインピボ、インピトロ、又はエクスピボで行われる、前記 (6 8) ~ (7 0) の何れかに記載の方法。

(7 2) 第 1 可溶性融合タンパク質複合体と第 2 可溶性融合タンパク質複合体の二量体を形成すること (ここで、それぞれの融合タンパク質複合体の第 1 生物活性ポリペプチドと第 2 生物活性ペプチドの結合部位は同一又は異なっている) を含んでなる、前記 (2) 又は (1 2) に記載の可溶性融合タンパク質複合体の分子当りの結合活性を増大する方法。

(7 3) 分子当りの結合活性が、1 0 % 又はそれ以上、2 0 % 又はそれ以上、3 0 % 又はそれ以上、4 0 % 又はそれ以上、5 0 % 又はそれ以上、6 0 % 又はそれ以上、或いは 7 0 % 又はそれ以上増大する、前記 (7 2) に記載の方法。

(7 4) 第 1 可溶性融合タンパク質複合体と第 2 可溶性融合タンパク質複合体の二量体を形成することを含んでなる、前記 (2) 又は (1 2) に記載の可溶性融合タンパク質複合体の分子当りの I L - 1 5 活性を増大する方法。

(7 5) 方法が、a) I L - 1 5 をコードする第 1 D N A ベクター及び I L - 1 5 R α 融合タンパク質をコードする第 2 D N A ベクターを宿主細胞内に導入すること、b) I L - 1 5 と I L - 1 5 R α 融合タンパク質を発現す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、及び c) I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでなる、インターロイキン - 1 5 (I L - 1 5) : インターロイキン - 1 5 受容体アルファ (I L - 1 5 R α) 融合タンパク質複合体を製造する方法。

(7 6) I L - 1 5 R α 融合タンパク質複合体が、生物活性ポリペプチドと共有結合している可溶性 I L - 1 5 R α を含んでいる、前記 (7 5) に記載の方法。

(7 7) 生物活性ポリペプチドが、I g G の重鎖定常ドメインである、前記 (7 6) に記載の方法。

(7 8) 生物活性ポリペプチドが、I g G の重鎖定常ドメインの F c ドメインである、前記 (7 6) に記載の方法。

(7 9) I L - 1 5 が、第 2 生物活性ポリペプチドと共有結合している I L - 1 5 を含んでいる、前記 (7 5) に記載の方法。

(8 0) 方法が、a) I L - 1 5 をコードする第 1 D N A 及び I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質をコードする第 2 D N A を宿主細胞内に導入すること、b) I L - 1 5 と I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質を発現す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、及び c) I L - 1 5 : I L - 1 5 R α / F c 複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでなる、I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質を含んでいる I L - 1 5 : I L - 1 5 R α 複合体を製造する方法。

(8 1) 方法が、a) I L - 1 5 と I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質を宿主細胞内で同時発現すること、b) I L - 1 5 と I L - 1 5 R α / F c 融合タンパク質を発現するの

に十分な条件下で、宿主細胞を培地中で培養すること、及びc) IL - 15 : IL - 15 R α / FC融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製することを含んでなる、IL - 15 R α / FC融合タンパク質を含んでいるIL - 15 : IL - 15 R α 融合タンパク質複合体を製造する方法。

(82) IL - 15 : IL - 15 R α 複合体を宿主細胞又は培地から精製することが、IL - 15 : IL - 15 R α 融合タンパク質複合体を特異的に結合する親和性試薬上にIL - 15 : IL - 15 R α 複合体を捕獲することを含んでいる、前記(75)～(81)の何れかに記載の方法。

(83) IL - 15 R α 融合タンパク質が、IL - 15 R α / Fc融合タンパク質及びFcドメインと特異的に結合する親和性試薬を含んでいる、前記(82)に記載の方法。

(84) 親和性試薬が、プロテインA又はプロテインGである、前記(83)に記載の方法。

(85) 親和性試薬が抗体である、前記(82)又は(83)に記載の方法。

(86) IL - 15 : IL - 15 R α 複合体を宿主細胞又は培地から精製することが、イオン交換クロマトグラフィーを含んでいる、前記(75)～(85)の何れかに記載の方法。

(87) IL - 15 : IL - 15 R α 複合体を宿主細胞又は培地から精製することが、サイズ排除クロマトグラフィーを含んでいる、前記(75)～(86)の何れかに記載の方法。

(88) IL - 15 R α が、IL - 15 R α Sushi (IL - 15 R α Su)を含んでいる、前記(75)～(87)の何れかに記載の方法。

(89) IL - 15が突然変異IL - 15である、前記(75)～(88)の何れかに記載の方法。

(90) 突然変異IL - 15が、IL - 15 N72Dを含んでいる、前記(89)に記載の方法。

(91) 宿主細胞が哺乳動物の細胞である、前記(75)～(90)の何れかに記載の方法。

(92) IL - 15 : IL - 15 R α 複合体のIL - 15結合部位が完全に占有されている、前記(75)～(91)の何れかに記載の方法。

(93) IL - 15 : IL - 15 R α Su / Fc複合体の両方のIL - 15結合部位が完全に占有されている、前記(88)に記載の方法。

(94) IL - 15 : IL - 15 R α 複合体が、複合体の電荷又はサイズ特性に基づいて精製される、前記(75)～(93)の何れかに記載の方法。

(95) a) 宿主細胞内でIL - 15 N72DとIL - 15 R α Su / Fc融合タンパク質を同時発現すること、b) IL - 15 N72DとIL - 15 R α Su / Fc融合タンパク質を発現す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、及びc) IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc融合タンパク質複合体を宿主細胞又は培地から精製すること(ここで、IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc複合体の両方のIL - 15結合部位は完全に占有されている)を含んでなる、IL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc融合タンパク質複合体を製造する方法。

(96) 完全に占有されているIL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc融合タンパク質複合体を、複合体の電荷特性に基づいてアニオン交換クロマトグラフィーで精製する、前記(95)に記載の方法。

(97) 完全に占有されているIL - 15 N72D : IL - 15 R α Su / Fc融合タンパク質複合体を、低イオン強度で中性pHの緩衝液を用いる結合条件及びイオン強度を上昇させる緩衝液を用いる溶出条件で、4級アミンに基づく樹脂を用いて精製する、前記(95)に記載の方法。

(98) IL - 15又はIL - 15突然変異体をコードする第1ポリヌクレオチド及びIL - 15受容体融合タンパク質をコードする第2ポリヌクレオチドを含んでなる、細胞。

(99) 細胞が、IL - 15 N72Dをコードする第1発現ベクター及びIL - 15 R α

S u / F c 融合タンパク質をコードする第 2 発現ベクターを含んでいる、前記 (9 8) に記載の細胞。

(1 0 0) 二量体 I L - 1 5 R α S u / F c 及び 2 つの I L - 1 5 N 7 2 D 分子を含んでなる、単離された完全に占有されている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体。

(1 0 1) 複合体が、少なくとも 9 0 ~ 9 5 % 又はそれ以上精製された完全に占有されている複合体である、前記 (1 0 0) に記載の複合体。

(1 0 2) 複合体が、5 . 6 ~ 6 . 5 の間の等電点を有している、前記 (1 0 0) に記載の複合体。

(1 0 3) 約 1 1 4 k D a の分子量を有している、前記 (1 0 0) に記載の複合体。

(1 0 4) I L - 1 5 N 7 2 D 及び / 又は I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質がグリコシル化されている、前記 (1 0 0) に記載の複合体。

(1 0 5) 前記 (7 5) ~ (9 7) の何れかに記載の方法に従って産生された、単離された完全に占有されている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体。

(1 0 6) 方法が、前記 (1 0 0) ~ (1 0 5) の何れかに記載の完全に占有されている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体を対象に投与することを含んでなる、対象における免疫応答を調節する方法。

(1 0 7) 免疫応答を増大又は減少する、前記 (1 0 6) に記載の方法。

(1 0 8) 方法が、前記 (1 0 0) ~ (1 0 5) の何れかに記載の完全に占有されている I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体を対象に投与することを含んでなる、腫瘍を有している対象における免疫応答を増強する方法。

その他の実施態様は以下の開示から明確になるだろう。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 0】

【図 1】図 1 は、多重鎖ポリペプチドからなる T 2 分子 (T 2 M) として示される融合タンパク質を示す。

【図 2】図 2 は、正確なヒト I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子挿入を含有しているベクター (p M C . c 2 6 4 s c T C R - S u / I g G 1 . P U R) を示す。

【図 3】図 3 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 核酸配列の配列 (配列番号 3 4) を示す。

【図 4】図 4 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 ペプチドのタンパク質配列 (配列番号 3 5) を示す。

【図 5】図 5 は、c 2 6 4 s c T C R / S u s h i / h I g G 1 - p M S G V c 又は p M S G V c 2 6 4 S u I g と表わされるベクターを示す。

【図 6】図 6 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 核酸配列の配列 (配列番号 3 6) を示す。

【図 7】図 7 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 ペプチドのタンパク質配列 (配列番号 3 7) を示す。

【図 8】図 8 は、c 1 4 9 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D - p M S G V n 又は p M S G V - c 1 4 9 I L 1 5 N 7 2 D と表わされるベクターを示す。

【図 9】図 9 は、c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 核酸配列の配列 (配列番号 3 8) を示す。

【図 1 0】図 1 0 は、c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D ペプチドのタンパク質配列 (配列番号 3 9) を示す。

【図 1 1】図 1 1 は、T 2、c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R

/ h u I g G 1 Δ C H 1 融合タンパク質の精製画分の還元及び非還元条件下での S D S - P A G E 分析を示す。還元条件下で、T 2 分子バンドは c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / H u I g G 1 ポリペプチドと一致する分子量に移動する。非還元変性条件下で、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 バンドは、二量体ジスルフィド結合した c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 複合体及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D ポリペプチドと一致する分子量に移動する。

【図 1 2】図 1 2 は、天然の T 2 タンパク質が、四重鎖 (2 × c 2 6 4 s c T C R / I L 1 5 N 7 2 D 、 2 × c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1) 分子の予測された分子量で溶出されたことを明らかにしているサイズ排除ゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる精製した T 2 タンパク質、又は精製した c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 融合タンパク質の等モル量を抗ヒト I g G 1 抗体でコーティングしたウェル上に捕獲した、インビトロ結合アッセイの結果を示す。結合に続いて、標準的な E L I S A 条件下で抗ヒト I g G 1 抗体を用いてタンパク質を検出した。

【図 1 4】図 1 4 は、T 2 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 タンパク質の等モル量を抗ヒト I g G 1 A b でコーティングしたウェル上に捕獲して抗ヒト T C R C β 抗体 (W 4 F) で検出した、インビトロ結合アッセイの結果を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、T 2 分子の T C R ドメインのペプチド / M H C 結合活性を評価したインビトロ結合アッセイの結果を示す。T 2 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる) 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 タンパク質の等モル量を抗ヒト I g G 1 A b でコーティングしたウェル上に捕獲して、p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 ストレプタビジン - H R P 四量体で検出した。

【図 1 6】図 1 6 は、T 2 分子の I L - 1 5 ドメインの活性を明らかにしているインビトロアッセイの結果を示す。マイクロタイターウェルを抗ヒト I L - 1 5 抗体でコーティングして、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる精製した T 2 タンパク質、又は精製した c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質の等モル量をウェルに適用した。結合及び洗浄工程に続いて、結合したタンパク質を標準的な E L I S A 条件下で抗ヒト I L - 1 5 抗体で検出した。

【図 1 7】図 1 7 は、サイトカイン依存性の 3 2 D β 細胞株を用いて T 2 分子の I L - 1 5 ドメインの機能活性を更に特徴付けるための増殖アッセイの結果を示す。細胞増殖を測定するために、3 2 D β 細胞 (2 × 1 0 ⁴ 細胞 / ウェル) を増大する濃度の T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる) 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質と 3 7 ° C で 4 8 時間培養した。細胞増殖試薬 W S T - 1 (Roche (登録商標) Applied Science) を製造会社の手順に従って細胞生育の最終 4 時間の間に添加した。代謝的に活性な細胞による W S T - 1 の着色されたフォルマザン色素への変換を 4 4 0 n m における吸光度測定により確認した。

【図 1 8】図 1 8 A ~ B は、I L - 1 5 応答免疫細胞の増殖を促進する T 2 タンパク質の能力を確認するインビボ霊長類モデル実験の結果を示す。T 2 タンパク質を注射した後 5 日目に血液を採取して C D 8 メモリー T 細胞マーカー (C D 8 及び C D 9 5) (A) 及び N K 細胞マーカー (C D 5 6 及び C D 1 6) (B) について染色を行い、そして処置前に採取した血液と比較した。

【図 1 9】図 1 9 A ~ B は、T 2 分子の I g G 1 F c ドメインの結合活性を特徴付ける細胞結合アッセイを示す。A . U 9 3 7 細胞を有している F c ガンマ受容体を 3 3 n M の T 2 タンパク質 (c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R

/ h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる)、c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 又は A 2 A L 9 s c T C R / I g G 1 (陰性コントロール)と20分間培養したアッセイの結果を示しているフローサイトメトリー分析である。細胞を1回洗浄して、P E と共役した p 5 3 (a a 2 6 4 ~ 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 四量体と20分培養した。U 9 3 7 細胞表面上での F c ガンマ受容体との結合をフローサイトメトリーで分析した。B . 示されているタンパク質の一連の濃度を用いる同様の U 9 3 7 結合試験を実施して染色細胞に対する平均蛍光強度をプロットした結果を示すフローサイトメトリー分析。

【図20】図20は、T2分子のFcドメインの抗体依存性細胞傷害活性を介する生物活性を評価するアッセイの結果を示す。T2タンパク質、c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 又は A 2 A L 9 s c T C R / I g G 1 (陰性コントロール)を0.137 nM ~ 100 nMの濃度で96ウェルに添加した。H L A - A 2 陽性T2標的細胞を10 μMのp 5 3 a a 2 6 4 ~ 2 7 2 ペプチドでパルスして50 μg / m l のカルセイン - A M で標識した。融合タンパク質をウェル当り1 × 10⁴個の標的細胞と混合して1 × 10⁶個 / ウェルの新鮮なヒトP B M C を添加した。プレートをC O₂ インキュベータ中で2時間37で培養し、100 μl の条件培地を採取して、溶解細胞から放出したカルセインを定量的に分析した。

【図21】図21A及びBは、H L A - A 2 陽性T2細胞を各種濃度のp 5 3 a a 2 6 4 ~ 2 7 2 ペプチドでパルスして、T2タンパク質の細胞表面のペプチド / M H C 標的との結合活性を評価するアッセイの結果を示す。ペプチド負荷細胞をそれぞれ83 mMのT2タンパク質(c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる)、c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 又は A 2 A L 9 s c T C R / I g G 1 (陰性コントロール)と培養した。細胞をビオチニル化した抗T C R A b (B F 1) 及びストレプタビジン - P E と培養した。次いで、細胞をフローサイトメトリーで抗体染色について分析して(A)、異なった濃度のペプチドを負荷した細胞の平均蛍光染色強度をプロットした(B)。

【図22】図22は、c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 のT2分子(細胞培養上澄液中)を、抗ヒトT C R 抗体B F 1 でコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲して、結合したT2分子を抗ヒトT C R 抗体W 4 F - B N を用いて検出したE L I S A の結果を示す。

【図23】図23は、c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 又は c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 のT2分子(細胞培養上澄液中)を、ヤギ抗ヒトI g G 抗体でコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲して、結合したT2分子を抗ヒトI L - 1 5 抗体を用いて検出したE L I S A の結果を示す。

【図24】図24は、c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 のT2分子(細胞培養上澄液中)をヤギ抗ヒトI g G 抗体又は抗ヒトT C R 抗体B F 1 の何れかでコーティングしたマイクロタイタープレート上に捕獲したE L I S A の結果を示す。B F 1 が捕獲したT2分子を抗ヒトT C R 抗体W 4 F - B N 又は抗ヒトI L - 1 5 抗体の何れかで検出した。ヤギ抗ヒトI g G A b が捕獲したT2分子をp 5 3 (a a 1 4 9 ~ 1 5 7) ペプチド / H L A - A 2 ストレプタビジン - H R P 四量体又はp 5 3 (a a 2 6 4 ~ 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 ストレプタビジン - H R P 四量体の何れかで検出した。

【図25】図25は、2つの異なったドメイン、すなわち、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 1 4 9 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖を含むT2分子を特徴付けたフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。これらの分子のFc及びT C R 活性をU 9 3 7 細胞を有しているFc - ガンマ受容体との結合及び p

53 (a a 2 6 4 ~ 2 7 2) ペプチド / H L A - A 2 四量体による検出に続くフローサイトメトリーによって評価した。

【図 26】図 26 A 及び B は、マウス (A) 又はサル (B) に c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる精製した T 2 タンパク質を注射した薬物動態アッセイの結果を示す。サンプルは表示される時点で採取した。A. 表示されるようにヤギ抗ヒト I g G A b をウェルをコーティングするために用いて、抗ヒト T C R A b (W 4 F - B N) を検出のために用いた；又はヤギ抗ヒト I g G A b をプレートにコーティングするために用いて、抗ヒト I L - 1 5 A b を検出のために用いて、表示される時点で血液中の T 2 タンパク質の量を定量した E L I S A 形式アッセイ。B. 抗ヒト T C R A b (β F - 1) を用いてウェルをコーティングして、H R P 共役ヤギ抗ヒト I g G A b を用いて検出する；又は抗ヒト I L - 1 5 A b を用いてプレートにコーティングして、H R P 共役ヤギ抗ヒト I g G A b を用いて検出するか又は抗ヒト I L - 1 5 A b を用いてプレートにコーティングして、抗ヒト T C R A b (W 4 F - B N) を用いて検出した。

【図 27】図 27 は、ヌードマウスにおけるヒト p 5 3 + H L A - A 2 + A 3 7 5 メラノーマ細胞株を用いる原発腫瘍生育モデルの結果を示す。腫瘍担持マウスに c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 鎖からなる T 2 タンパク質を 3 2 μ g / 用量 (1.6 mg / kg)、c 2 6 4 s c T C R / h u I L 2 を 3 2 μ g / 用量 (1.6 mg / kg)、又は 2 6 4 s c T C r / h u I g G 1 を 6 0 μ g / 用量 (3 mg / kg) 静脈内投与した。腫瘍の生育を測定してデータを図に示した。

【図 28】図 28 は、I L - 1 5 ドメインに各種の点突然変異を有する T 2 分子の I L - 1 5 活性アッセイの結果を、3 2 D β 細胞の増殖により測定して示す。

【図 29】図 29 は、I L - 1 5 及び I g G F c ドメインに各種の点突然変異を有する T 2 分子を用いる抗体依存性細胞傷害活性アッセイの結果を、ペプチド負荷 T 2 標的細胞の P B M C 依存性溶解により測定して示す。

【図 30】図 30 は、ヒト N K 及び T 細胞応答を刺激する T 2 分子の能力に対する I L - 1 5 及び F c 突然変異の効果を検出するアッセイの結果を示す。1.8 ~ 5 × 10⁵ 細胞 / m l のヒト P B M C を、表示される突然変異を含む 1 n M の T 2 分子を含有しているか、又はコントロールとして 1 0 n g / m l の組み替えヒト I L - 2 又は I L - 1 5 を有する培地中で 4 日間 37 ° で培養した。次いで、5 0 μ g / m l のカルセイン - A M で標識化した後、N K 感受性 K - 5 6 2 細胞を標的細胞として用いて、N K 細胞細胞傷害性を評価した。

【図 31】図 31 は、N K 細胞増殖アッセイの結果を示し、ここでは P B M C を、I L - 1 5 及び I g G F c ドメインに各種の点突然変異を含有する T 2 分子と、又はコントロールとして組み替えヒト I L - 2 又は I L - 1 5 と培養した。c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 及び c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 鎖を含む T 2 分子又は F c ドメイン L A L A 及び K A 突然変異体を有するものが C D 5 6 + N K 細胞の増殖において増大をもたらしたのに対して、I L - 1 5 N 6 5 D 又は D 8 N 置換を含有する T 2 分子はそれほど多くの N K 細胞増殖活性をもたらさなかった。

【図 32】図 32 A 及び B は、I L - 1 5 及び F c 突然変異を包含している T 2 分子の、p 5 3 ペプチドを負荷した (T 2 . 2 6 5) 及び負荷していない (T 2) T 2 細胞に対する抗原特異的結合を試験するフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。A はフローサイトメトリーのヒストグラムを示し、B はペプチド特異的対非特異的細胞染色のシグナル対ノイズ比を示す。

【図 33】図 33 A ~ C は、A. 3 2 D β 細胞生育をサポートする、B. 各種 T 細胞集団の拡張を刺激する、そして C. N K 細胞活性を刺激する各種 T 2 分子及び I L - 1 5 分子の活性を検出するアッセイの結果を示す。

【図 34】図 34 は、表示される各種 T 2 分子のマウスにおける免疫刺激活性を、フローサイトメトリーを用いて検出する血液及び脾臓細胞中の C D 8 + T 細胞及び N K 細胞のバ

ーセント変化によって確認したインビボアッセイの結果を示す。

【図35】図35A及びBは、1)オボアルブミンのアミノ酸257～264由来のペプチドに特異的なs c T C Rと融合しているh u I L 1 5 N 7 2 Dドメイン、及び2) h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1融合体と結合している一本鎖C D 8 α / βドメインを含有している多重特異的T2分子を用いるE L I S Aの結果を示す。O T 1 - C D 8 - T 2 Mの結合活性をO T 1 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D融合体のそれとE L I S Aによって比較した。各タンパク質の等モル量を抗T C R C β m A b (H 5 7)でコーティングしたウェル上に捕獲して、O V A a a 2 5 7 - 2 6 4 / H - 2 K b四量体又はI L 1 5、C D 8 α、C D 8 β若しくはT C R V α 2に対するm A bでプローブした。抗ヒトI gでコーティングしたウェルを用いて抗T C R V α 2でプローブするアッセイも実施した。

【図36】図36Aは、c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 : c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A複合体(c 2 6 4 s c T C R二量体)の概略図を示す。二量体h I L - 1 5 : h I L - 1 5 R α S uドメインのモデルは、ヒトI L - 1 5 : I L - 1 5 R α S u複合体の公表されている結晶構造に基づいている(33)(P D B 2 Z 3 Q)。Bは、c 2 6 4 s c T C R融合タンパク質のS E C分析を示す。図は、c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5(上)、c 2 4 6 s c T C R / h I L - 5 R α S u / b i r A(中)及びc 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 : c 2 4 6 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A複合体(c 2 6 4 s c T C R二量体)(下)のサイズ分析を示し、点線は比タンパク質ピークを示している。

【図37】図37は、c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 : c 2 4 6 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A複合体を含むc 2 6 4 s c T C R二量体、及びc 1 4 9 s c T C R / h I L - 1 5 : c 2 6 4 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A複合体を含むc 2 6 4 s c T C R / c 1 4 9 s c T C Rヘテロ二量体の結合活性の特性を示す。A. T2細胞を0～62.5 nMのp 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2)ペプチドでパルスした。細胞を等量(80 nM)のc 2 6 4 s c T C R二量体又はc 2 6 4 s c T C R / b i r AのP E共役多量体で染色した。B. c 2 6 4 s c T C R二量体をc 2 6 4 s c T C R / b i r A試薬と比べた細胞染色の相対的増大を異なったペプチド濃度で確認した。増大(倍) = (c 2 6 4 s c T C R二量体で染色されたT2細胞の幾何学的平均) / (c 2 6 4 s c T C R / b i r Aで染色されたT2細胞の幾何学的平均)。C. c 2 6 4 s c T C R / c 1 4 9 s c T C Rヘテロ二量体のp 5 3ペプチド/H L A - A * 0 2 0 1結合活性をE L I S Aで確認した。抗h I L - 1 5モノクローナル抗体(R & D System)を捕獲抗体として用いた。A2 / p 5 3 . 2 6 4 - 2 7 2 . H R P又はA2 / 5 3 . 1 4 9 - 1 5 7 . H R P四量体をプローブとして用いた。データは3回繰返し測定 of 平均 ± S Dを表わす。

【図38】図38は、O T 1 s c T C R / h I L - 1 5 : O T 1 s c T C R / h I L - 1 5 R α S u / b i r A複合体からなるO T 1 s c T C R二量体の結合活性の特性を示す。E L 4細胞にO V A (a a 2 5 7 - 2 6 4)ペプチドを負荷して、200 nMのO T 1 s c / b i r A - S A - P E(上)及びO T 1 s c T C R二量体 - S A - P E(下)で染色した。

【図39】図39は、O T 1 s c T C R / h I L - 1 5 : s c C D 8 / h I L - 1 5 R α S u / b i r A複合体を含むO T 1 s c T C R / s c C D 8ヘテロ二量体が増強したp M H C I結合活性を示すことを表わす。A. O T 1 s c T C R / s c C D 8ヘテロ二量体のネズミC D 8発現をE L I S Aで確認した。抗m T C R H 5 7 - 5 9 7 m A bを捕獲抗体として用いた。ビオチニル化抗ネズミC D 8 α又はC D 8 β m A bをプローブとして用いた後、S A - H R Pを行った。データは3回繰返し測定 of 平均 ± S Dを表わす。B. E L 4細胞に表示される濃度のO V A (a a 2 5 7 - 2 6 4)ペプチドを負荷して、200 nMのO T 1 s c T C R二量体 - S A - P E(上)及びO T 1 s c T C R / s c C D 8ヘテロ二量体 - S A - P E(下)で染色した。

【図40】図40は、T C R α / h I L - 1 5 : T C R β / h I L - 1 5 R α S u / b i

r A 複合体を含む T C R α / β ヘテロ二量体を包含する融合タンパク質は p M H C I 結合活性を保持することを示す。 A . O T 1 s c T C R / b i r A と O T 1 T C R α / β のヘテロ二量体の O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) / H - 2 K b 複合体への結合活性を E L I S A で確認した。抗 m T C R H 5 7 - 5 9 m A b を捕獲抗体として用いた。 K b / O V A . 2 5 7 - 2 6 4 四量体をプローブとして用いた。 B . 2 6 4 s c T C R / b i r A 及び 2 6 4 T C R α / β ヘテロ二量体の p 5 3 (a a 2 6 - 2 7 2) / H L A - A * 2 0 1 複合体への結合活性を E L I S A によって確認した。抗 T C R m A b を捕獲抗体として用いた。 A 2 / p 5 3 . 2 6 4 - 2 7 2 . H R P 四量体をプローブとして用いた。データは 3 回繰返し測定 of 平均 $\pm$ S D を表わす。

【図 4 1】図 4 1 は、融合タンパク質の I L - 1 5 結合及び機能活性を示す。 A . 3 2 D β 細胞を I L - 1 5 野生型又は I L - 1 5 N 7 2 D 若しくは I L - 1 5 D 8 N 突然変異タンパク質ドメインを含む 3 2 0 n M の c 2 6 4 s c T C R 二量体と培養した。融合タンパク質の結合を順に抗ヒト T C R C β A b で検出した。 B . I L - 1 5 の野生型又は突然変異タンパク質ドメインを含む c 2 6 4 s c T C R 二量体の 3 2 D β 細胞の増殖をサポートする能力を実施例に記載されるように確認した。データは 2 回繰返し測定 of 平均 $\pm$ S D を表わす。

【図 4 2】図 4 2 は、 O T 1 s c T C R / h I L - 1 5 D 8 N 、 O T 1 s c T C R / h T L - 1 5 R α S u / b i r A 及び O T 1 s c T C R 二量体の O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) / H - 2 K ^b 結合活性を E L I S A で確認したことを示す。抗 m - T C R H 5 7 - 5 9 7 m A b を捕獲抗体として用いた。 K b / O V A . 2 5 7 - 2 6 4 . H R P 四量体をプローブとして用いた。データは 3 回繰返し測定 of 平均 $\pm$ S D を表わす。

【図 4 3】図 4 3 は、 S P R で確認した O V A (a a 2 5 7 - 2 6 4) / H - 2 K ^b 及びコントロールである V S V / H - 2 K ^b 複合体に対する O T 1 s c T C R 融合タンパク質の結合曲線を示す。

【図 4 4】図 4 4 A 及び B は、免疫正常マウスにおけるネズミ B 1 6 腫瘍細胞株を用いる原発腫瘍生育モデルの結果を示す。腫瘍担持マウスに r h I L - 1 5 、 T 2 M 、 T 2 M Δ C H 1 及び T 2 M Δ T C R Δ C H 1 タンパク質、又は P B S (コントロール) を静脈内注射した。腫瘍の生育を測定してデータを A 示す。動物における体重の処置後変化を B に示す。

【図 4 5】図 4 5 A 及び B は、免疫正常マウスにおけるネズミ E G 7 腫瘍細胞株を用いる原発腫瘍生育モデルの結果を示す。腫瘍担持マウスに r h I L - 1 5 、 T 2 M 、 及び T 2 M Δ T C R Δ C H 1 タンパク質、又は P B S (コントロール) を静脈内注射した。腫瘍の生育を測定してデータを A 示す。動物における体重の処置後変化を B に示す。

【図 4 6】図 4 6 は、共有結合で及び / 又は遺伝子的に他のタンパク質ドメインと融合して融合タンパク質複合体を生成したヒト I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメイン又は F c ドメインのタンパク質配列 (配列番号 4 0) を示す。

【図 4 7】図 4 7 は、細胞発現ペプチド M H C 標的に対する、 T 2 M 及び s c T C R - h u I g G 1 タンパク質が介在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。各種の量の融合タンパク質 (T 2 M 、 T 2 M 2 又は c 2 6 4 s c T C R - I g) を新鮮なヒト P B M C 及び p 5 3 ペプチドでパルスした H L A - A 2 陽性 T 2 細胞 (カルセイン標識化) (E : T 比、 4 0 : 1) と混合した。2 時間培養した後、培養培地を採取して溶解細胞からのカルセイン放出を定量的に分析した。

【図 4 8】図 4 8 は、マウスにおける各種 T 2 分子の免疫刺激活性を確認するインビボアッセイの結果を示す。 C 5 7 B L / 6 マウスを h I L - 1 5 (1 m g / k g) 、 I L 1 5 N 7 2 D : I L 1 5 R α - F c (3 . 6 m g / k g) 、 T 2 M (1 1 m g / k g) 、 T 2 M 2 (1 0 m g / k g) の等モル I L - 1 5 用量、又は等容量の P B S で試験第 1 日目に i . v . 処置した。試験 4 日目にマウスを屠殺して血液の W B C 数及び脾臓重量を図 A に示すように確認した。末梢血単核細胞 (P B M C) C D 8 ⁺ 及び N K p 4 6 ⁺ 細胞のパーセント変化を図 B に示すようにフローサイトメトリーで評価した。 P B M C も図 C に示すように、カルセイン放出アッセイにおける N K 感受性 Y a c - 1 標的細胞の溶解に基づく

NK細胞活性を評価するために用いた。

【図49】図49は、マウスにおける免疫活性に対する各種T2分子の用量及び経時変化を確認するインビボアッセイの結果を示す。A. C57BL/6マウスをhIL-15 (1 mg/kg)、IL15N72D: IL15R α -Fc (4 mg/kg)、T2M2 (各種濃度)の等モルIL-15用量又はPBSの等容量で試験1日目にi.v.処置した。試験4日目に、PBMC CD8⁺及びNKp46⁺細胞のパーセントをフローサイトメトリーで評価した。B. ノードマウスをIL15N27D/IL15R α -Fc (0.2 mg/kg)又はT2M2 (2 mg/kg)で試験第1日目にi.v.処置した。処置後4日及び7日目に、PBMC NKp46⁺細胞のパーセントをフローサイトメトリーで評価した。

【図50】図50は、ノードマウスにおけるヒトp53+HLA-A2+A375メラノーマ細胞を用いる原発性腫瘍生育モデルの結果を示す。A. A375ヒトメラノーマ腫瘍細胞 (1×10⁶)をノードマウス (5~6匹/群)にs.c.注射した。腫瘍を確立させて、マウスを等モル用量のIL-15 (0.35 mg/kg)、scTCR-IL15融合体 (1.6 mg/kg)、scTCR-IL15/scTCR-IL15/scTCR-IL15R α 複合体 (3.2 mg/kg)、又はPBSでi.v.処置した。11日目に開始して週に3回3週間マウスを処置した。B. A375腫瘍担持ノードマウスをAのように4 mg/kgのT2Mでもi.v.処置した。C. A375腫瘍担持ノードマウスを等モル用量のIL-15 (0.2 mg/kg)、T2M2 (2 mg/kg)又はPBSでi.v.処置した。腫瘍を1日おきに測定して、腫瘍容量 (平均値±SEM)をプロットした。

【図51】図51は、c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1 CH2-CH3 (Fc)構築物 (T2M Δ TCR Δ CH1及びT2M2とも呼ばれている)の核酸配列 (配列番号41)を示す。

【図52】図52は、成熟c264scTCR/huIL15R α Sushi/huIgG1 CH2-CH3 (Fc)融合タンパク質 (T2M Δ TCR Δ CH1及びT2M2とも呼ばれている)のタンパク質配列 (配列番号42)を示す。

【図53】図53は、抗CD20scAb/huIL-15N72D構築物の核酸配列 (配列番号43)を示す。

【図54】図54は、成熟抗CD20scAb/huIL-15N72D融合タンパク質のタンパク質配列 (配列番号44)を示す。

【図55】図55は、抗CD20scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc構築物の核酸配列 (配列番号45)を示す。

【図56】図56は、成熟抗CD20scAb/huIL-15R α Su/huIgG1 Fc融合タンパク質のタンパク質配列 (配列番号46)を示す。

【図57】図57は、抗CD20scAb T2M分子のダウディ細胞 (Daudi cells)に対するCD20抗原特異的結合を試験するフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。

【図58】図58は、CD20⁺ヒト腫瘍細胞に対する抗CD20scAb T2Mが介在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。各種濃度の融合タンパク質 (抗CD20scAb T2M、c264sc T2M (陰性コントロール))又はキメラ抗CD20mAb (陽性コントロール)を新鮮なヒトPBMC (異なる2人のドナー由来)及びダンディ細胞 (カルセイン標識化) (E:T比、100:1)と混合した。培養期間後に、培養培地を採取して溶解細胞から放出したカルセインを定量的に分析した。

【図59】図59は、CD20⁺ヒト腫瘍細胞に対する抗CD20scAb T2Mが介在する抗体依存性細胞傷害活性を確認するアッセイの結果を示す。融合タンパク質 (抗CD20scAb T2M、c264scTCR T2M (陰性コントロール))又はキメラ抗CD20mAb (陽性コントロール)を各種の比率の新鮮なヒトPBMC (異なる2人のドナー由来及びダンディ細胞 (カルセイン標識化))と混合した。培養期間後に、培養培地を採取して溶解細胞から放出したカルセインを定量的に分析した。

【図60】図60は、抗CD20軽鎖Vドメイン/ヒトカッパ定常ドメイン/huIL-1

5 N 7 2 D 構築物の核酸配列 (配列番号 4 7) を示す。

【図 6 1】図 6 1 は、成熟抗 C D 2 0 軽鎖 V ドメイン / ヒトカッパ定常ドメイン / h I L - 1 5 N 7 2 D 融合タンパク質のタンパク質配列 (配列番号 4 8) を示す。

【図 6 2】図 6 2 は、抗 C D 2 0 重鎖 V ドメイン / ヒト I g G 1 C H 1 ドメイン / h u I L - 1 5 R α S u / h u I g G 1 F c 構築物の核酸配列 (配列番号 4 9) を示す。

【図 6 3】図 6 3 は、成熟抗 C D 2 0 重鎖 V ドメイン / ヒト I g G 1 C H 1 ドメイン / h u I L - 1 5 R α S u / h u I g G 1 F c 融合タンパク質のタンパク質配列 (配列番号 5 0) を示す。

【図 6 4】図 6 4 は、二量体 I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質と非共有結合する (して) I L - 1 5 N 7 2 D を基礎とする I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体の概略図である。

【図 6 5】図 6 5 (A ~ D) は、I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 調製物のゲル電気泳動分析プロファイルの写真である。(A) I E F p H 3 ~ 1 0 ゲル分析。レーン 1、I E F マーカー。レーン 2、r プロテイン A カラムで精製した I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体。レーン 3、I L - 1 5 R α S u / F c。レーン 4、I L - 1 5 w t。(B) I E F p H 3 ~ 1 0 ゲル分析。レーン 1、I E F マーカー。レーン 2、Q 工程 1 溶出で精製した I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体。レーン 3、Q 工程 2 溶出による Q 1 c。レーン 4、Q 工程 2 溶出による Q 2 c。(C) S D S - P A G R (還元) 分析。レーン 1、M W マーカー。レーン 2、r プロテイン A カラムで精製した I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体。レーン 3、Q 工程 2 溶出による I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c (Q 2 c)。レーン 4、I L - 1 5 R α S u / F c (Q 流出から)。(D) タンパク質の脱グリコシル化を示す S D S - P A G E (還元) 分析。レーン 1、M W マーカー。レーン 2 及び 3 はそれぞれ N - グリコシダーゼ F で消化した及び消化していない I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c タンパク質を示す。レーン 4、I L - 1 5 w t。

【図 6 6】図 6 6 は、スーパーデックス 2 0 0 H R 1 0 / 3 0 ゲルろ過カラムを用いる S E C クロマトグラムのグラフである。精製された I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体が単一ピークとして溶出された。

【図 6 7】図 6 7 は、C D - 1 マウスへ静脈内注射した後の I L - 1 5 w t 及び I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体の薬物動態プロファイルの比較を示すグラフである。抗 I L - 1 5 A b E L I S A は I L - 1 5 w t の濃度を測定する (■)。抗 I L - 1 5 A b E L I S A は無傷 I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 分子の濃度を測定する () のに対して、抗ヒト I g G F c A b E L I S A は I L - 1 5 R α S u / F c 融合タンパク質の血清濃度を測定する (▼)。観察された濃度をシンボルで表わし、モデル近似曲線をラインで表わしている。

【図 6 8】図 6 8 は、インビトロで構築した I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c (I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c I V A) の生物活性の I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c との比較を示しているグラフである。3 2 D β 細胞をインビトロで構築した I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c (■) 又は I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c (□) と 7 2 時間培養した後、W S T - 1 を 4 時間添加した。4 4 0 n m で読み取った吸光度によって細胞増殖を定量してホルマゾンレベルを評価した。示されているデータ点は 3 回繰返しサンプルの平均 (± 標準偏差) であり、線は E C ₅₀ を決定するのに適している S 字型用量応答曲線を表わしている。結果は少なくとも 3 回の実験を代表している。

【図 6 9】図 6 9 は、I L - 1 5 w t と I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体の脾臓重量及び白血球レベルに対する効果を示す一組のグラフである。C 5 7 B L / 6 マウス (1 群当り 5 匹マウス) に 1 m g / k g の I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 融合複合体、0 . 2 8 m g / k g (等モル用量) の I L - 1 5 w t、又は陰性コントロールとして P B S の単回用量を静脈内に注射した。脾臓重量 (左図) 及び血中の白血球数 (右図) を注射後 4 日目に確認した。バーは平均値 ± 標準誤差 (n = 5) を表

わす。* P B S 及び I L - 1 5 w t と比較して $p > 0.05$ 。結果は少なくとも 2 回の実験を代表している。

【図 7 0】図 7 0 は、マウスリンパ球に対する I L - 1 5 w t 及び I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 複合体の効果を示す一組のグラフである。C 5 7 B L / 6 マウス (1 群当り 5 匹マウス) に 1 m g / k g の I L - 1 5 N 7 2 D : I L - 1 5 R α S u / F c 融合複合体、0.28 m g / k g (等モル用量) の I L - 1 5 w t、又は陰性コントロールとして P B S の単回用量を静脈内に注射した。注射後 4 日目に、B 細胞 (C D 1 9)、C D 4 T 細胞 (C D 4)、N K 細胞 (N K p 4 6) 及び C D 8 T 細胞 (C D 8) のパーセントを脾臓細胞中で確認し (左図 : 平均値 $\pm$ 標準誤差 ($n = 5$))、そして P B M C (右欄 : プール血液中の濃度 ($n = 5$)) で確認した。* P B S と比較して $p > 0.05$ 。* * I L - 1 5 w t と比較して $p > 0.05$ 。結果は少なくとも 2 回の実験を代表している。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0107

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0107】

リンカー配列は好ましくは約 7 ~ 20 個のアミノ酸を、より好ましくは約 8 ~ 16 個のアミノ酸を含んでいる。リンカー配列は、望ましくない単一構造中に生物活性ポリペプチド又はエフェクター分子を保持しないようにフレキシブルであることが好ましい。リンカー配列は、例えば、認識部位を融合分子から距離をあけて置くために用いることができる。具体的には、ペプチドリリンカー配列を、例えば、これを化学的に架橋して分子柔軟性をもたすために、生物活性ポリペプチドとエフェクター分子の間に位置付けることができる。リンカーは主にグリシン、アラニン及びセリンのような小さい側鎖を有するアミノ酸を含んでいて柔軟性をもたすことが好ましい。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、アラニン、又はセリン残基を、特にグリシンとセリン残基を含有している。ヘテロ二量体 T C R を含んでいる融合タンパク質複合体に関しては、リンカー配列は T C R 分子の α 鎖にも結合できるが、リンカー配列は T C R 分子の β 鎖に適切に結合する。あるいは、リンカー配列は T C R 分子の α 及び β 鎖の両方に結合できる。このように β ペプチド鎖が α 鎖と共に発現された場合は、結合した T C R ポリペプチドは、図 1 に大まかに描かれているように畳み込まれて機能的な T C R 分子をもたらす。1 つの適切なリンカー配列は、A S 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) (配列番号 5) であり、T C R の β ドメインの第 1 アミノ酸と結合していることが好ましい。抗体可変領域を共に結合するために良好に用いられている多くのフレキシブルリンカーデザインの何れかを包含する異なるリンカー配列を用いることができる。Whitlow, M. et al., (1991) Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97-105 を参照されたい。ある実施例では、エフェクター分子を T C R β 鎖分子と共有結合するために、リンカーのアミノ配列は、T C R β 鎖の C 末端残基からエフェクター分子の N 末端残基までの適切な距離を橋渡しすることができる。適切なリンカー配列を実験的に容易に確認することができる。また、リンカー配列の適切な大きさ及び配列も T C R 分子の予測サイズ及び形状に基づいて従来のコンピュータモデリング技術によって確認できる。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0166

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0166】

ヒト I L - 1 5 R α s u s h i ドメイン (h u I L - 1 5 R α S u s h i) 及びヒト I

g G 1 定常領域 (h u I g G 1 C_H 1 - C_H 2 - C_H 3) と融合している p 5 3 (a a 2 6 4 - 2 7 2) 1 本鎖 T C R (c 2 6 4 s c T C R と呼ぶ) を含有している発現ベクターの構築を以下のように実施した。c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 遺伝子断片を先に構築した p N E F 3 8 - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 ベクターから P a c I 及び M 1 u I で制限消化して除去した。遺伝子断片をゲルで精製し、同じ制限酵素で消化した p M S G V ベクターにライゲートして、p M S G V - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 と呼ぶ構築物をもたらした。C M V プロモーターを含有している D N A 断片を p c D N A 3 . 1 から精製し、続いて N r u I 及び H i n d I I I で消化した。この断片を、P a c I で消化してある p M S G V - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 内にライゲートして、D N A ポリメラーゼで充填して平滑末端を作成した後 H i n d I I I で消化した。得られた構築物を p M C - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 と称した。先に構築された、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 (国際公開第 W O 2 0 0 8 1 4 3 7 9 4 号公報を参照されたい) 由来の h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子断片をフロントプライマー :

5 ' - T G T T G G G A A T T C A T C A C G T G C C C T C - 3 ' (配列番号 6)

及びバックプライマー :

5 ' - T G G T G T G A A T T C T C T A A T G C A T T T G A G A C T G G - 3 ' (配列番号 7)

を用いて、次の P C R 条件下で K O D H O T S t a r t D N A ポリメラーゼ (E M D) によって増幅した : 9 5 C、2 分、1 サイクル ; 9 5 C、2 0 秒、6 5 C、2 0 秒 ; 7 0 C、2 0 秒、3 5 サイクル ; 7 2 C、1 0 分、1 サイクル。ヒト I L - 1 5 R α S u s h i 遺伝子の P C R 産物をゲルで精製して E c o R I で消化した。この遺伝子を E c o R I で消化してある p M C - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 内にライゲートした。ヒト I L - 1 5 R α S u s h i ドメインをコードする D N A 断片の p M C - c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 内へのクローニングは以下の配列を含んでいる c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i - h u I g G 1 融合遺伝子をもたらした : 3 ' - 免疫グロブリン重鎖リーダー - 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 - ヒト I L - 1 5 R α S u s h i - ヒト I g G 1 重鎖。図 2 に示されている、正確なヒト I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子挿入を含有している得られたベクター (p M C . c 2 6 4 s c T C R - S u / I g G 1 . P U R) を診断 P C R に基づいて同定し、そして D N A シークエンシングで再確認した。c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 遺伝子及びタンパク質はそれぞれ図 3 及び図 4 に示される。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 6 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 6 7】

c 2 6 4 s c T C R / h u I L - 1 5 R α S u s h i - h u I g G 1 遺伝子融合を含有している異なった発現ベクター (内在 E c o R I 部位 (及び対応するコード配列) を欠失している) を構築した。このベクターのために、c 2 6 4 s c T C R 遺伝子断片の部分を c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 ベクターから、フロントプライマー :

5 ' G T A C G A C T T A A T T A A C T C G A G C C A C C A T G G A G A C A G A C A C A C T C C T G T T A T G G 3 ' (配列番号 8)

及びバックプライマー :

5 ' C T T C C C G T T A A C C C A C C A G C T C A G C T C C A C G T G 3 ' (配列番号 9)

を用いて増幅した。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 6 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 6 8 】

c 2 6 4 s c T C R 遺伝子断片の T C R β 定常領域の残りの部分を c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 ベクターから、フロントプライマー：

5 ' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3 ' (配列番号 1 0)

及びバックプライマー：

5 ' G A G G G C A C G T G A T G T C T G C T C T A C C C C A G G C C T C 3 ' (配列番号 1 1)

を用いて増幅した。

【 手 続 補 正 1 0 】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 6 9

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 6 9 】

h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子断片を 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、フロントプライマー：

5 ' G T A G A G C A G A C A T C A C G T G C C C T C C C C C C A T G 3 ' (配列番号 1 2)

及びバックプライマー：

5 ' C C T T G G T G C T A G C T C T A A T A C A T T T G A G A C T G G G G G T T G T C C 3 ' (配列番号 1 3)

を用いて増幅した。

【 手 続 補 正 1 1 】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 7 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 7 0 】

h u I g G 1 重鎖定常領域遺伝子断片を c 2 6 4 s c T C R / h u I g G 1 ベクターから、フロントプライマー：

5 ' C C A G T C T C A A A T G T A T T A G A G C T A G C A C C A A G G G C C C A T C G G T C 3 ' (配列番号 1 4)

及びバックプライマー：

5 ' G T A A T A T T C T A G A C G C G T T C A T T A T T T A C C A G G A G A C A G G G A G A G G C T C T T C 3 ' (配列番号 1 5)

を用いて増幅した。

【 手 続 補 正 1 2 】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 7 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 1 7 1 】

T C R β 定常領域配列及び h u I L 1 5 R α S u s h i 遺伝子を含む得られた産物を鋳型として用いて、フロントプライマー：

5 ' C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3 ' (配列番号 1 0)

及びバックプライマー：

5' CCTTG GTGCTAGCTCTAATACATTTGAGACTGGGGGT
TGTCC3' (配列番号13)

を用いるPCRによって遺伝子断片を作成した。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0172

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0172】

得られたPCR産物及びhuIgG1遺伝子断片は、フロントプライマー：

5' CTGGTG GGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGT C
3' (配列番号10)

及びバックプライマー：

5' GTAATATTCTAGACGCGTTTCATTTATTTACCAAGGAGAC
AGGGAGAGGCTCTTTC3' (配列番号15)

を用いるPCRによってTCR β c/huIL15R α Sushi/huIgG1融合遺伝子を作成するための鋳型の役割を果たした。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0179

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0179】

c149scTCR/IL15N72D遺伝子融合を生成するために、c149scTCR遺伝子断片(TCR- α 、リンカー、TCR- β 及びTCR- β 定常断片)をc149scTCR/huIgG1発現ベクターからフロントプライマー：

5' GACTTCAAGCTTAATTAAGCCACCATGGACAGACTTA
CTTCTTTC3' (配列番号16)

及びバックプライマー：

5' -CTTCCCGTTAACCACACAGCTCAGCTCCACGTG-3'
(配列番号9)

を用いて増幅した。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0180

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0180】

c149scTCR/huIgG1ベクターのTCR β 定常領域の残分をフロントプライマー：

5' CTGGTG GGTTAACGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGT C
3' (配列番号10)

及びバックプライマー：

5' CACCCAGTTGTCTGCTCTACCCAGGCCCTC3' (配列番号
17)

を用いて増幅した。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0181

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0181】

h u I L 1 5 N 7 2 D 遺伝子を c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 発現ベクターからフロントプライマー：

5 ' C T G G G G T A G A G C A G A C A A C T G G G T G A A T G T A A T A A G T G A T T T G 3 ' (配列番号 1 8)

及びバックプライマー：

5 ' C C T C A T G C A T T C G A A T C C G G A T C A T T A A G A A G T G T T G A T G A A C A T T T T G G 3 ' (配列番号 1 9)

を用いて増幅した。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0182

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0182】

T C R β 定常領域配列及び h u I L 1 5 N 7 2 D 遺伝子を含む得られた産物を鋳型として用い、フロントプライマー：

5 " C T G G T G G G T T A A C G G G A A G G A G G T G C A C A G T G G G G T C 3 ' (配列番号 1 0)

及びバックプライマー：

5 ' C C T C A T G C A T T C G A A T C C G G A T C A T T A A G A A G T G T T G A T G A A C A T T T T G G 3 ' (配列番号 1 9)

を用いる P C R によって遺伝子断片を生成した。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0215

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0215】

F c ガンマ受容体又は相補体と相互作用するその能力を減少することが先に示された I g G 1 F c ドメイン (Hessell, A. J., et al. 2007. Nature 449: 101-1040、参照により本明細書に取り込まれている) 内にも突然変異を導入した。例えば、I g G 1 C_H2 の 2 3 4 位及び 2 3 5 位のロイシン残基 (抗体コンセンサス配列に基づく番号付け) (すなわち、. . . P E L L G G . . . (配列番号 1)) のアラニン残基による置換 (すなわち、. . . P E A A G G . . . (配列番号 2)) は、F c ガンマ受容体結合の損失をもたらすのに対して、I g G 1 C_H2 の 3 2 2 位のリジン残基 (抗体コンセンサス配列に基づく番号付け) (すなわち、. . . K C K S L . . . (配列番号 3)) のアラニン残基による置換 (すなわち、. . . K C A S L . . . (配列番号 4)) は相補体活性化の損失をもたらす (Hessell, A. J., et al. 2007. Nature 449: 101-1040、参照により本明細書に取り込まれている)。これらの置換を c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 R α S u s h i / h u I g G 1 構築物内に導入して、得られたタンパク質を c 2 6 4 s c T C R / h u I L 1 5 N 7 2 D 又は上記の別の T C R - I L 1 5 変異体と同時発現した。これらの複合体が p 5 3 a a 2 6 4 - 2 7 2 ペプチド - 負荷 H L A - A 2 陽性 T 2 標的細胞に対するヒト P B M C の A D C C 活性を介在する能力を実施例 6 に記載されているようにして評価した。F c 機能を変化させることが知られているその他の突然変異は、例えば、Lazar et al., PNAS, 103:4005-4010, 2006 (参照により本明細書に取り込まれている) に提供されている。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0226

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0226】

実施例14 - 多重特異的T2分子

多重結合ドメインのスcaffoldとして作用するIL-15とIL-15R α /IgG Fcの融合ドメインの能力を更に特性化するために、huIL15N72Dと結合したH-2K^b-制限OVAa257-264ペプチド(SIINFELK(配列番号20))に特異的な1本鎖TCRドメイン(OT1scTCR)とhuIL15R α Sushi/IgG1融合と結合した1本鎖CD8 α / β ドメインを含む、融合タンパク質複合体(OT1-CD8-T2M)を作成した。1本鎖CD8 α / β ドメインは、(G₄S)₄ペプチドリinker(配列番号21)を介してネズミCD8 β の細胞外ドメインと結合しているネズミCD8 α の細胞外ドメインを含んでいる。CD8 α が、TCR特異的ペプチド/MHC接合部と遠位のMHC分子内の部位と結合することが十分に特性化される。従って、OT1-CD8-T2M複合体のOTscTCRとscCD8 α / β ドメインの両方がOVAa257-264/H-2K^b-分子上の異なった部位で相互作用すると期待される。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0277

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0277】

(タンパク質複合体発現のためのベクターの構築)

IL-15R α Su/Fc融合遺伝子をヒトIL-15R α (ヒトIL-15R α のa1-66)のsushiドメイン及びヒトIgG1Fc断片をコードするDNA鋳型のオーバーラップPCR増幅によって構築した。シグナルペプチド-IL-15R α Suコード領域(R.L. Wong et al., Protein Eng Des Sel 24 (2011) 373-383)及びヒトIgG1-Fc遺伝子断片(L.A. Mosquera et al., J Immunol 174 (2005) 4381-4388)をプライマー対:

BA494: 5' - GACTTCAAGCTTAATTAAGCCACCATGGACAGACTTACTTCTTC - 3' (配列番号16);

BA550R: 5' - GTGAGTTTGTGTCACAAAGATTTTCGGCTCTCTTAATGCATTTGAGACTGGGGGTTG - 3' (配列番号22)、及び

BA550F: 5' GAGCCGAAATCTTGTGACAAAACTCAC - 3' (配列番号23);

BA393R: 5' - GTAATATTCTAGACGCGTTTCATTATTTCACAGGAGACAGGGAGAGGCTCTTC - 3' (配列番号15)

をそれぞれ用いて増幅した。得られたIL-15R α Su/Fc融合遺伝子をピューロマイシン耐性発現ベクターpMSGV-1(M.S. Hughes et al., Hum Gene Ther 16 (2005) 457-472)内にライゲートして発現ベクターpMSGV-IL-15R α Su/Fcを構築した。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0292

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0292】

【表 2】

タンパク質	アミノ酸	配列 (配列番号)
p53	149-157	STPPPGTRV (配列番号 2 4)
p53	264-272	LLGRNSFEV (配列番号 2 5)
OVA	257-264	SIINFEKL (配列番号 2 0)
VSV	52-59	RGYVYQGL (配列番号 2 6)

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 9 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 9 4】

【表 3】

リンカー	リンカー配列	融合タンパク質
一本鎖 TCR リンカー	TCR V α - DTSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSSS - TCR V β (配列番号 27 として開示される リンカー配列)	c264scTCR/hIL-15, c264scTCR/hIL- 15R α Su/birA
	TCR V α - TSGGGGSGGGGSPGGGGSGGGSSS - TCR V β (配列番号 28 として開示される リンカー配列)	c149scTCR/hIL15N72D
	TCR V α - DTSGGGGSGGGASGGGGSGGGSSS - TCR V β (配列番号 29 として開示される リンカー配列)	OT1scTCR/birA
	TCR V α - SGGGGSGGGASGGGGSGGGGS - TCR V β (配列番号 30 として開示される リンカー配列)	OT1scTCR/hIL-15D8N, OT1scTCR/hIL- 15R α Su/birA
突然変異 ヒト IgG1	TCR ドメイン - VNEPKSSDKTHTSPSPTR - hIL-15R α Su (配列番号 31 として開示される リンカー配列)	c264scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1TCR β /hIL-15R α Su/birA, 264TCR β /hIL-15R α Su/birA
ヒンジ	TCR ドメイン - VNEPKSSDKTHTSPSPTR - hIL-15 (配列番号 31 として開示される リンカー配列)	264TCR α /hIL-15D8N, OT1TCR α /hIL-15, OT1scTCR/hIL-15D8N
BirA リンカー	hIL-15R α Su - SGGGSGGGGSID - birA タグ (配列番号 32 として開示されるリンカー 配列)	c264scTCR/hIL-15R α Su/birA, OT1TCR β /hIL-15R α Su/birA
一本鎖 CD8 リンカー	CD8 α - SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS - CD8 β (配列番号 33 として開示される リンカー配列)	scCD8 $\alpha\beta$ /hIL-15R α Su/birA

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 H 0 4 5	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12		
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12		
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z	
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K	38/02		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y	
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	14/54		
C 0 7 K	14/715	(2006.01)	C 0 7 K	14/715		
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705		
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		
C 1 2 N	5/0786	(2010.01)	C 1 2 N	5/0786		
C 1 2 N	5/0787	(2010.01)	C 1 2 N	5/0787		

(72)発明者 ウォン, ヒン シー.

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 3 3 2 ウェストン ウェントワース 2 9 6 6

(72)発明者 ロード, ピーター

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 1 8 5 マイアミ サウスウェスト・4 2 ンド・レーン 1 4
8 5 7

(72)発明者 リウ, バイ

アメリカ合衆国 フロリダ州 クーパー・シティ ノースウェスト・3 9 ス・ストリート 9 6 3
1

(72)発明者 チュー, シャオユン

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 ハン, カイピン

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) 4B063 QA18 QA19 QQ79 QS33 QX02

4B064 AG03 AG20 AG27 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AC20 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 BA44 CA53 DC50 NA14 ZB081 ZB091 ZB261 ZB331

4C087 AA01 AA02 BB37 BB64 BB65 NA14 ZB26 ZB33

4H045 AA10 AA11 AA30 BA13 BA14 BA18 BA19 BA20 BA41 EA22

EA51 EA53 FA74

【外国語明細書】
2018046831000001.pdf

专利名称(译)	多聚体IL-15可溶性融合分子及其制备和使用方法		
公开(公告)号	JP2018046831A	公开(公告)日	2018-03-29
申请号	JP2017198256	申请日	2017-10-12
[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	ウォンヒンシー ロードピーター リウバイ チューシャオユン ハンカイピン		
发明人	ウォン,ヒン シー. ロード,ピーター リウ,バイ チュー,シャオユン ハン,カイピン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/46 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/04 A61P35/00 A61P31/12 A61K35/12 A61K35/17 A61K38/02 G01N33/53 C07K14/54 C07K14/715 C07K14/705 C12N5/0783 C12N5/0786 C12N5/0787		
CPC分类号	A61K35/17 C07K14/5443 C07K14/7051 C07K14/7155 C07K2319/30 C12N5/0693 A61K38/00 A61K38/1793 A61K38/2086 A61K45/06 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P43/00 C07K16/2887 C07K2317/622 C07K2317/732 C07K2319/21 C07K2319/22 C12N15/09 C12N15/62 A61K2300/00 A61K31/00 A61K38/04 A61K38/16 A61K38/17 A61K39/00 C07K14/001 C07K14/075 C07K14/54 C07K19/00 C12N15/63 A61K39/3955 C07K16/18 C07K2319/00 C12P21/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/46 C12N5/10 C12P21/02.C C12Q1/04 A61P35/00 A61P31/12 A61K35/12 A61K35/17.Z A61K38/02 G01N33/53.Y C07K14/54 C07K14/715 C07K14/705 C12N5/0783 C12N5/0786 C12N5/0787 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ79 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG03 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB081 4C084/ZB091 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB64 4C087/BB65 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA20 4H045/BA41 4H045/EA22 4H045/EA51 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	佐伯优子		
优先权	61/384817 2010-09-21 US 61/527911 2011-08-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了具有至少两种可溶性融合蛋白的可溶性融合蛋白复合物。 解决方案：IL-15突变多肽包含由两个IL-15受体融合多肽组成的二聚体和IL-15序列的第72位N取代D（IL-15N72D），IL-15受体融合多肽各自包含与免疫球蛋白Fc结构域和IL-15Rα融合的IL-15Rαushi结合结构域（IL-15RαSu/ Fc）。ushi结合结构域各自是IL-15N72D：IL-15RαSu/ Fc复合物，其与IL-15 N72D多肽结合，IL-15结合位点被完全占据。其中IL-15N72D和/或IL-15RαSu/ Fc融合蛋白是糖基化的。

(51) Int. Cl.		F 1		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 6 3
C O 7 K	16/46 (2006.01)	C O 7 K	16/46		4 B O 6 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 B O 6 5
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 C O 8 4
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04		4 C O 8 7
審査請求 有 請求項の数 8 O L 外国語出願 (全 132 頁) 最終頁に続く					
(21) 出願番号	特願2017-198256 (P2017-198256)		(71) 出願人	504090190	
(22) 出願日	平成29年10月12日 (2017.10.12)			アルター・バイオサイエンス・コーポレーション	
(62) 分割の表示	特願2013-529432 (P2013-529432)の分割			ショー	
原出願日	平成23年9月21日 (2011.9.21)			アメリカ合衆国 フロリダ州 33025	
(31) 優先権主張番号	61/384,817		(74) 代理人	ミラマー ノース・コマース・パークウェイ 2810号	
(32) 優先日	平成22年9月21日 (2010.9.21)			100189131	
(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人	弁理士 佐伯 拓郎	
(31) 優先権主張番号	61/527,911			100182486	
(32) 優先日	平成23年8月26日 (2011.8.26)		(74) 代理人	弁理士 中村 正展	
(33) 優先権主張国	米国 (US)			100158872	
			(74) 代理人	弁理士 牛山 直子	
				100147289	
				弁理士 佐伯 裕子	
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 多量体 I L - 1 5 可溶性融合分子並びにその製造及び使用方法					