

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4608184号
(P4608184)

(45) 発行日 平成23年1月5日(2011.1.5)

(24) 登録日 平成22年10月15日(2010.10.15)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 17/02 (2006.01)	C O 7 K 17/02 Z N A
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 9 7
請求項の数 53 (全 113 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-571544 (P2002-571544)	(73) 特許権者	503096568
(86) (22) 出願日	平成14年3月13日(2002.3.13)		ダコ デンマーク アクティーゼルスカブ
(65) 公表番号	特表2005-500257 (P2005-500257A)		デンマーク国、グロストラップ 2 6 0 0
(43) 公表日	平成17年1月6日(2005.1.6)		、プロダクションスヴェイ 4 2
(86) 国際出願番号	PCT/DK2002/000169	(73) 特許権者	506001516
(87) 国際公開番号	W02002/072631		インヴィトロジェン ダイナル エーエス
(87) 国際公開日	平成14年9月19日(2002.9.19)		ノルウェー国 オスロ スメスタッド ピ
審査請求日	平成17年3月10日(2005.3.10)		ーオーボックス 1 1 4
(31) 優先権主張番号	PA 2001 00435	(74) 代理人	100095832
(32) 優先日	平成13年3月14日(2001.3.14)		弁理士 細田 芳徳
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)	(72) 発明者	ウィンザー, ラーズ
(31) 優先権主張番号	PA 2001 00436		デンマーク国 スメラム ディーケー-2
(32) 優先日	平成13年3月14日(2001.3.14)		7 6 5 トゥリパンハーヴェン 8 0
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規なMHC分子構築物、ならびに診断および処置のためにこれらの構築物を用いる方法、ならびにMHC分子の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

可溶性媒体に可溶性の形態であるか、または固体もしくは半固体支持体上に固定化されたMHC分子構築物であって、該MHC分子構築物は、可溶性多糖類キャリア分子を含んでなり、該キャリア分子には、1つより多くの結合実体が結合しており、該1つより多くの結合実体の各々には、2～4つのMHC分子が結合しており、該MHC分子構築物は、少なくとも5つのMHC分子を含む、MHC分子構築物。

【請求項 2】

MHC分子がペプチド非含有MHC分子である請求項 1 記載のMHC分子構築物。

【請求項 3】

MHC分子が同一であるかまたは少なくとも2つのMHC分子が異なるものである請求項 1 または 2 記載のMHC分子構築物。

【請求項 4】

MHC分子により収容されるペプチドが同一であるかまたはMHC分子によって収容される少なくとも2つのペプチドが異なるものである請求項 1～3 いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項 5】

結合実体が、ストレプトアビジン (SA)、アビジン、およびそれらの誘導体、ならびに
ビオチンから選ばれるものである請求項 1～4 いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項 6】

1つ以上の生物学的に活性な分子をさらに含んでなる請求項1～5いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項7】

生物学的に活性な分子が、タンパク質、共刺激分子、細胞調節分子、レセプター、アクセサリー分子、接着分子、天然のリガンド、および毒性分子、それらに対する抗体および組換え結合分子、ならびにそれらの組み合わせから選ばれるものである請求項6記載のMHC分子構築物。

【請求項8】

生物学的に活性な分子が、直接的にまたは1つ以上の結合実体を介してのいずれかでキャリア分子に結合している請求項6または7記載のMHC分子構築物。

10

【請求項9】

生物学的に活性な分子が、
MIC A、MIC B、CD1d、HLA E、HLA F、HLA G、HLA H、ULBP-1、ULBP-2、およびULBP-3等のMHCクラスI様タンパク質の群に由来するタンパク質、
Tおよび／またはNK細胞上に発現されるCD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD27、CD28、CD30、CD69、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD147、CDw150 (SLAM)、CD152 (CTLA-4)、CD153 (CD30L)、CD40L (CD154)、NKG2D、ICOS、HVEM、HLAクラスII、PD-1、Fas (CD95)、およびFasL、ならびにAPCおよび／または腫瘍細胞上に発現されるCD40、CD48、CD58、CD70、CD72、B7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、B7RP-1、B7-H3、PD-L1、PD-L2、CD134L、CD137L、ICOSL、およびLIGHTの群に由来する共刺激分子、
NK細胞上に発現されるCD16、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80、2B4、KIR、LIR、CD94/NKG2A、およびCD94/NKG2C、ならびにIFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、CSF (コロニー刺激因子)、ビタミンD3、IL-2毒素、シクロスポリン、FK-506、ラパマイシン、TGF- β 、クロトリマゾール、ニトレンジピン、およびカリブドトキシンの群に由来する細胞調節分子、
LFA-1、CD11a/18、CD54 (ICAM-1)、CD106 (VCAM)、およびCD49a、b、c、d、e、f/CD29 (VLA-4) の群に由来するアクセサリー分子、
ICAM-1、ICAM-2、GlyCAM-1、CD34、抗-LFA-1、抗-CD44、抗- β 7、ケモカイン、CXCR4、CCR5、抗セレクトリンL、抗セレクトリンE、および抗セレクトリンPの群に由来する接着分子、
シクロホスファミド、メトトレキサート (methotrexate)、アザチオプリン、ミゾリピン、15-デオキシスベルグアリン (deoxuspergualin)、ネオマイシン、スタウロスポリン、ゲネスタイン、ハービマイシンA、シュードモナスエキソトキシンA、サポリン、リタキサン、リシン、ゲムツズマブオゾオガミチン、志賀毒素、無機および有機水銀等の重金属、およびFN18-CRM9、放射性同位体 (好ましくはヨウ素、コバルト、セレン、トリチウム、およびリンの取り込まれた同位体)、およびハプテン (好ましくはDNP)、ならびにジゴキシゲニンの群に由来する毒性分子、
ならびにそれらに対する抗体、またはそれらの抗体誘導体もしくは断片、およびそれらの組み合わせから選ばれるものである請求項6～8いずれか記載のMHC分子構築物。

20

30

【請求項10】

1つ以上の標識化合物をさらに含んでなる請求項1～9いずれか記載のMHC分子構築物。

40

【請求項11】

1つ以上の標識化合物が、キャリア分子および／または1つ以上の結合実体および／または1つ以上のMHC分子に結合している請求項10記載のMHC分子構築物。

【請求項12】

標識化合物が直接的または間接的に検出可能である請求項10または11記載のMHC分子構築物。

【請求項13】

標識化合物が、蛍光標識、酵素標識、放射性同位体、化学発光標識、生物発光標識、ポリマー、金属粒子、ハプテン、抗体、または色素である請求項10～12いずれか記載の

50

MHC分子構築物。

【請求項 1 4】

標識化合物が、

5-（および6）-カルボキシフルオレセイン、5-または6-カルボキシフルオレセイン、6-（フルオレセイン）-5-（および6）-カルボキサミドヘキサン酸、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、テトラメチルローダミン、および色素（好ましくはCy2、Cy3、およびCy5、任意に置換されたクマリン（好ましくはAMCA）、PerCP、フィコビルタンパク質（好ましくはR-フィコエリトリン（RPE）およびアロフィコエリトリン（APC））、テキサスレッド、プリンストンレッド、グリーン蛍光タンパク質（GFP）およびこれらのアナログ）、ならびにR-フィコエリトリンまたはアロフィコエリトリンおよびCy5またはテキサスレッドのコンジュゲート、および半導体ナノ結晶（好ましくは量子ドットおよびQdotTMナノ結晶）に基づく無機蛍光標識、ならびにEu³⁺およびSm³⁺のようなランタニドに基づく時間分解蛍光標識の群に由来する蛍光標識から選ばれるか、

DNP、ビオチン、およびジゴキシゲニンの群に由来するハプテンから選ばれるか、またはセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、β-ガラクトシダーゼ（GAL）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、β-N-アセチルグルコサミニダーゼ、β-グルクロニダーゼ、インベルターゼ、キサンチンオキシダーゼ、ホタルルシフェラーゼおよびグルコースオキシダーゼ（GO）の群に由来する酵素標識から選ばれるか、または

ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、1,2-ジオキセタンおよびピリドピリダジンの群に由来する発光標識から選ばれるか、または

ヨウ素、コバルト、セレン、トリチウム、およびリンの取り込まれた同位体の群に由来する放射能標識から選ばれる、

請求項 1 0～1 3 いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項 1 5】

多糖類キャリア分子が、

多糖類、好ましくは、デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、デキストランポリアルデヒド、カルボキシメチルデキストランラクトン、およびシクロデキストリン、プルラン、シゾフィラン、スクレログルカン、キサンタン、ジェラン、0-エチルアミノグアララン、6-0-カルボキシメチルキチンおよびN-カルボキシメチルキトサンを含むキチンおよびキトサン、

誘導体化セロロジクス（cellulosics）、好ましくは、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、6-アミノ-6-デオキシセルロースおよび0-エチルアミンセルロース、

ヒドロキシ化デンプン、ヒドロキシプロピルデンプン、ヒドロキシエチルデンプン、カラゲナン、アルギン酸塩、およびアガロース、ならびに

合成多糖類、好ましくは、フィコールおよびカルボキシメチル化フィコールから選ばれるものである請求項 1～1 4 いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項 1 6】

固体または半固体支持体に直接固定化された請求項 1～1 5 いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項 1 7】

リンカー、スパーサー、または抗体、その抗体誘導体もしくは断片を介して固体または半固体支持体に固定化された請求項 1～1 5 いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項 1 8】

支持体が、粒子、ビーズ、生分解性粒子、シート、ゲル、フィルター、膜（好ましくはナイロン膜）、繊維、毛細管、針、マイクロタイター条片、チューブ、プレートまたはウェル、コーム、ピペットチップ、マイクロアレイ、チップおよびスライドから選ばれるものである請求項 1～1 7 いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項 1 9】

10

20

30

40

50

ビーズおよび粒子が、ポリマービーズ、ポリマー粒子、磁性ビーズ、磁性粒子、超磁性ビーズ、または超磁性粒子である請求項 18 記載のMHC分子構築物。

【請求項 20】

フローサイトメトリー法、組織学的方法または細胞学的方法において使用するための請求項 1～19 いずれか記載のMHC分子構築物。

【請求項 21】

請求項 1～20 いずれか記載のMHC分子構築物を含有してなる組成物。

【請求項 22】

可溶性媒体中における請求項 21 記載の組成物。

【請求項 23】

MHC分子構築物が、ペプチド充填MHC分子またはペプチド非含有MHC分子を含んでなる請求項 21 または 22 記載の組成物。

【請求項 24】

ペプチド非含有MHC分子を充填するためのペプチド、およびペプチド非含有分子を含むMHC分子構築物が、別々に提供される請求項 23 記載の組成物。

【請求項 25】

MHC認識細胞がMHC分子構築物に結合する条件下で、請求項 1～20 いずれか記載のMHC分子構築物とMHC認識細胞を含有することが予想されるサンプルとを接触させる工程、および

結合MHC分子構築物およびMHC認識細胞を単離する工程を含むMHC認識細胞の入手方法。

【請求項 26】

単離が、磁場を印加することまたはフローサイトメトリーにより行われる請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

MHC認識細胞のエキソビボ増殖のための請求項 1～20 いずれか記載のMHC分子構築物の使用。

【請求項 28】

組織学的方法または細胞学的方法における検出システムとしての請求項 1～20 いずれか記載のMHC分子構築物の使用。

【請求項 29】

被験体由来のサンプル中のMHC認識細胞の存在を決定する方法におけるMHC分子構築物の使用であって、該方法において被験体由来のサンプルのMHC認識細胞が支持体にマウントされる、請求項 28 記載の使用。

【請求項 30】

被験体由来のサンプル中のMHC認識細胞の存在をモニターする方法におけるMHC分子構築物の使用であって、該方法において被験体由来のサンプルのMHC認識細胞が支持体にマウントされる、請求項 28 記載の使用。

【請求項 31】

MHC認識細胞が関与する疾患の状態を決定する方法におけるMHC分子構築物の使用であって、該方法において被験体由来のサンプルのMHC認識細胞が支持体にマウントされ、該方法が、疾患の進行によって現れる異常な細胞の情報を得る工程を含み、該異常な細胞の出現が疾患の進行を示す、請求項 28 記載の使用。

【請求項 32】

MHC認識細胞が関与する疾患の予後を確立する方法におけるMHC分子構築物の使用であって、該方法において被験体由来のサンプルのMHC認識細胞が支持体にマウントされ、該方法が、疾患の進行によって現れる異常な細胞の情報を得る工程を含み、該異常な細胞の出現が疾患の進行を示す、請求項 28 記載の使用。

【請求項 33】

サンプルが、組織学的材料、細胞学的材料、原発腫瘍、二次器官転移物、細針吸引物、

10

20

30

40

50

脾臓組織、骨髓検体、細胞スメア、剥脱性細胞検体、接触調製物、口腔スワブ、喉頭スワブ、膣スワブ、気管支洗浄物、および胃洗浄物から、臍帯から、および血液（好ましくは、血液または白血球搬出産物などの他の血液由来調製物から単離された末梢血液単核細胞（PBMC）集団から）等の体液から、ならびに痰サンプル、喀出物、および気管支吸引液から選ばれるものである請求項 28～32 いずれか記載の使用。

【請求項 34】

(a) 支持体上にマウントされたMHC認識細胞を含有していることが予想されるサンプルと、請求項 1～20 いずれか記載のMHC分子構築物とを接触させる工程、および

(b) MHC分子の任意の結合を測定する工程、ここで、結合はMHC認識細胞の存在を示す、を含むサンプル中のMHC認識細胞の存在の検出方法。

10

【請求項 35】

(a) 支持体上にマウントされたMHC認識細胞を含有していることが予想されるサンプルと、請求項 1～20 いずれか記載のMHC分子構築物とを接触させる工程、および

(b) MHC分子の任意の結合を測定し、それによりMHC認識細胞をモニターする工程を含むMHC認識細胞のモニター方法。

【請求項 36】

(a) 支持体上にマウントされたMHC認識細胞を含有していることが予想されるサンプルと、請求項 1～20 いずれかに規定されるMHC分子構築物とを接触させる工程、および

(b) MHC分子の任意の結合を測定し、それによりMHC認識細胞が関与する疾患の予後を確認する工程、ここで、結合が、異常な細胞の情報を示し、該異常な細胞の出現が疾患の予後を示す、を含むMHC認識細胞が関与する疾患の予後の確立方法。

20

【請求項 37】

(a) 支持体上にマウントされたMHC認識細胞を含有していることが予想されるサンプルと、請求項 1～20 いずれかに規定されるMHC分子構築物とを接触させる工程、および

(b) MHC分子の任意の結合を測定し、それによりMHC認識細胞が関与する疾患の状態を決定する工程、ここで、結合が、異常な細胞の情報を示し、該異常な細胞の出現が疾患の状態を示す、を含むMHC認識細胞が関与する疾患の状態の決定方法。

30

【請求項 38】

(a) 支持体にマウントされた医薬での処置を受けた被験体由来のサンプルと、請求項 1～20 いずれかに規定されるMHC分子構築物とを接触させる工程、および

(b) MHC分子の任意の結合を決定し、それにより医薬の有効性を決定する工程、ここで、結合が、異常な細胞の情報を示し、該異常な細胞に対する効果が医薬の有効性の指標である、を含むMHC認識細胞が関与する疾患に対する医薬の有効性を決定するための方法。

【請求項 39】

MHC認識細胞が、炎症性、自己免疫性、アレルギー性、ウイルス性、癌性、感染性、同種異系または異種（移植片対宿主および宿主対移植片）起源の疾患に関与する請求項 34～38 いずれか記載の方法。

40

【請求項 40】

疾患が、クローン病もしくは潰瘍性結腸炎等の慢性炎症性腸疾患、硬化症、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、喘息、悪性黒色腫、腎癌、乳癌、肺癌、子宮の癌、子宮頸癌、前立腺癌、脳癌、頭部および頸部の癌、白血病、皮膚リンパ腫、肝癌、結腸直腸癌、膀胱癌、拒絶関連疾患、対宿主性移植片病、または肝炎、AIDS、麻疹、痘、水痘、風疹もしくは疱疹に関連するウイルス性疾患である請求項 39 記載の方法。

【請求項 41】

MHC認識細胞が、CD3+T細胞、 γ 、 δ T細胞、 α 、 β T細胞、CD4+T細胞、Tヘルパー細胞、CD8+T細胞、サプレッサーT細胞、CD8+細胞傷害性T細胞、CTL、NK細胞、NKT細胞

50

、LAK細胞、およびMAKの分集団から選ばれる請求項 3 4 ～ 4 0 いずれか記載の方法。

【請求項 4 2】

サンプルが、組織学的材料、細胞学的材料、原発腫瘍、二次器官転移物、細針吸引物、脾臓組織、骨髓検体、細胞スメア、剥脱性細胞検体、接触調製物、口腔スワブ、喉頭スワブ、膣スワブ、気管支洗浄物、および胃洗浄物から、臍帯から、および血液（好ましくは、血液または白血球搬出産物などの他の血液由来調製物から単離された末梢血液単核細胞（PBMC）集団から）等の体液から、ならびに痰サンプル、喀出物、および気管支吸引液から選ばれるものである請求項 3 4 ～ 4 1 いずれか記載の方法。

【請求項 4 3】

（a）MHC認識細胞を含有していることが予想されるサンプルと請求項 1 ～ 2 0 いずれか記載のMHC分子構築物とを接触させる工程、および

10

（b）MHC分子構築物の任意の結合を測定する工程、結合はMHC認識細胞の存在を示す、を含むサンプル中のMHC認識細胞の存在の検出方法。

【請求項 4 4】

（a）MHC認識細胞を含有していることが予想されるサンプルと請求項 1 ～ 2 0 いずれか記載のMHC分子構築物とを接触させる工程、および

（b）MHC分子構築物の任意の結合を測定し、それによりMHC認識細胞をモニターする工程、を含むMHC認識細胞のモニター方法。

【請求項 4 5】

20

（a）医薬での処置を受けた被験体に由来するサンプルと請求項 1 ～ 2 0 いずれか記載のMHC分子構築物とを接触させる工程、および

（b）MHC分子構築物の任意の結合を測定し、それにより医薬の有効性を決定する工程、ここで、結合が、異常な細胞の情報を示し、該異常な細胞に対する効果が医薬の有効性の指標である、を含むMHC認識細胞が関与する疾患に対する医薬の有効性を決定する方法。

【請求項 4 6】

MHC認識細胞が、炎症性、自己免疫性、アレルギー性、ウイルス性、癌性、感染性、同種異系または異種（移植片対宿主および宿主対移植片）起源の疾患に関与する請求項 4 3 ～ 4 5 いずれか記載の方法。

30

【請求項 4 7】

疾患が、クローン病もしくは潰瘍性結腸炎等の慢性炎症性腸疾患、硬化症、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、喘息、悪性黒色腫、腎癌、乳癌、肺癌、子宮の癌、子宮頸癌、前立腺癌、脳癌、頭部および頸部の癌、白血病、皮膚リンパ腫、肝癌、結腸直腸癌、膀胱癌、拒絶関連疾患、対宿主性移植片病、または肝炎、AIDS、麻疹、痘、水痘、風疹もしくは疱疹に関連するウイルス性疾患である請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

MHC認識細胞が、CD3+T細胞、 γ 、 δ T細胞、 α 、 β T細胞、CD4+T細胞、Tヘルパー細胞、CD8+T細胞、サプレッサーT細胞、CD8+細胞傷害性T細胞、CTL、NK細胞、NKT細胞、LAK細胞、およびMAKの分集団から選ばれる請求項 4 3 ～ 4 7 いずれか記載の方法。

40

【請求項 4 9】

サンプルが、組織学的材料、細胞学的材料、原発腫瘍、二次器官転移物、細針吸引物、脾臓組織、骨髓検体、細胞スメア、剥脱性細胞検体、接触調製物、口腔スワブ、喉頭スワブ、膣スワブ、気管支洗浄物、および胃洗浄物から、臍帯から、および血液（好ましくは、血液または白血球搬出産物などの他の血液由来調製物から単離された末梢血液単核細胞（PBMC）集団から）等の体液から、ならびに痰サンプル、喀出物、および気管支吸引液から選ばれるものである請求項 4 3 ～ 4 5 いずれか記載の方法。

【請求項 5 0】

結合の測定が、顕微鏡での検査、光、蛍光、電子透過、またはフローサイトメトリーにより行われる請求項 4 3 ～ 4 9 いずれか記載の方法。

50

【請求項 5 1】

サンプルが支持体上にマウントされる請求項 4 3～5 0 いずれか記載の方法。

【請求項 5 2】

支持体が固体または半固体の支持体である請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 3】

支持体が、ガラススライド、1つ以上のウェルを有するマイクロタイタープレート、ビーズ、粒子、膜、フィルター、フィルター膜、ポリマースライド、ポリマー膜、チャンバースライド、皿、およびペトリ皿から選ばれるものである請求項 5 1 または 5 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、関連する標的細胞上の対抗レセプター (counterreceptor) に結合することができるリガンドを有する多価化合物の分野に関する。本発明の化合物は、化合物を広範囲の様々な適用のために非常に好適にする多数の好都合な特徴を有している。具体的には、本発明は、1つ以上のMHC分子を含む新規なMHC分子構築物に関する。このような構築物のMHC分子の親和性および結合力 (avidity) は驚くほど大きい。多数のMHC分子を標的細胞に提示することができることにより、本発明のMHC分子構築物は、例えば、診断分野において極めて有力なツールになる。本発明によって含まれるものには、MHC分子およびMHC分子多量体およびMHC分子構築物のサンプルマウント (sample-mounted) 使用がある。本発明はさらに、一般には、治療方法および治療組成物を含む治療分野に関する。本発明の治療組成物はインビボおよびエキソビボの両方において適用することができる。

20

【0 0 0 2】

発明の背景

リガンドが標的細胞表面の対抗レセプターに特異的に連結することにより、ヒト生物における多くの重要な応答が制御される。ペプチドホルモンに対するレセプター (例えば、インスリンレセプター (IR)) にリガンドが結合することの生理学的意味が何十年にわたって知られている。ペプチドホルモンが1つの器官から分泌されて、その作用を局所的に発揮することがあるか、あるいは遠位に様々な細胞タイプまたは組織に血液によって分配されることがある。様々なレセプターに関連する生物学的機能の我々の今日の理解が、生理学的応答のリガンド結合およびシグナル伝達および他の測定の詳細な研究からもたらされている。

30

【0 0 0 3】

最近では、特異的な免疫応答の調節に関連する様々なより複雑なリガンドレセプター相互作用が報告されている。例えば、主要組織適合性複合体 (MHC、ヒトではHLA) によってコードされるペプチドエピトープに特異的な膜分子とT細胞レセプター (TCR) との生化学的相互作用が、特異的な免疫応答を誘発させるためには必要であることが現在では広く知られている。このタイプのリガンドレセプター相互作用は、インスリンとIRとのようなより「従来の」なリガンドレセプターモデルと比較して少しより複雑である。T細胞の活性化は、他のレセプターを介して同時に起こるシグナル伝達をも必要とし、そして関与する細胞間の密な物理的接触を確保するために他の膜分子 (例えば、接着タンパク) 間の連結からさらなる結合エネルギーを獲得し得る。

40

【0 0 0 4】

特異的 (適応) 免疫系は、「異物」または「非自己」の侵入物による攻撃から身体を特異的に防御するために一緒に働く細胞および器官の複雑なネットワークである。さらに、免疫系はまた、異物侵入物に対する抵抗性を物理的および化学的な手段によってもたらす様々な細胞タイプおよび組織からなるあまり特異的でない防御線 (いわゆる先天免疫系) を含む。

【0 0 0 5】

特異的免疫系の細胞ネットワークは、様々な疾患に対する身体の主要な防御の1つであ

50

る。特異的免疫系は、様々な方法で、癌を含む疾患に対して働く。

【0006】

従って、ヒト免疫系の活性化の基礎をなす分子機構の詳細な知識は、ヒトにおける疾患を抑制するための顕著な効果および重要性を有し得るだけではない。詳しく理解することによりまた、様々な診断ツールが、経済的に重要な他の脊椎動物種における感染症および他の疾患を抑制するためにもたらされる。詳しく理解することによりさらに、感染症および他の疾患が制御されるように免疫系を（インビボおよびエキソビボの両方で）操作できるという可能性がもたらされる。

【0007】

ヒトMHC遺伝子座（HLA遺伝子座）に存在する遺伝子は、1組の非常に多型の膜タンパク質をコードしており、それらは細胞内区画においてペプチドをサンプル抽出し、そのようなペプチドエピトープをT細胞表面の抗原特異的レセプター（TCR）に提示する。この遺伝子座の甚だしい遺伝子多型は、個体における免疫系の特徴的な遺伝子的指紋に対する背景であり、そしてそのような遺伝子多型により、ヒト集団が認識し、応答することができる抗原性ペプチドエピトープのレパートリーが規定される。従って、HLA分子は、ヒト疾患の浸透度および拡大を決定する際の重要な因子である。他の高等脊椎動物種のMHC分子は、ヒトにおけるHLAについて報告される分子と同一の生物学的機能を発揮する。

【0008】

十分かつ適切な応答を誘発させるために、免疫系は、MHC分子およびTCR分子のペプチド特異的な相互作用から生じるシグナル伝達（シグナル1）に加えて、他のいわゆる共刺激分子の連結による刺激（シグナル2）もまた獲得する。両群の免疫活性化リガンドは、低い親和性でそれらの特異的な対抗レセプターに結合する。例えば、1価MHC-TCRの相互作用は10mMの親和定数を有し、数分に対応する半減期を有することが測定されている。T細胞上のCD28と抗原提示細胞表面の共刺激分子との相互作用は同じレベルの親和性を有する。この低い固有的親和性は、特異的な免疫応答のために必要とされる特異的な相互作用の定量的分析を制限していた重要な要因であった。Davisおよび共同研究者によって1996年に最初に報告された技術（参考文献1、Science、274、94～96（1996））ではあるが、可溶性の四量体MHC複合体を製造する最近確立された技術により、ペプチドエピトープに特異的なMHCとT細胞表面のTCRとの特異的な相互作用を分析および検出するためのツールがある種のいくつかの適用において提供されている。様々な四量体が、特異的なペプチド決定基の存在下で折り畳まれたMHCクラスI分子をビオチン化し、その後、ストレプトアビジンと架橋することから得られる。現在まで、いくつかのインビトロアッセイおよびインビボアッセイ（限定希釈アッセイ、増殖アッセイ、サイトカイン活性または細胞傷害活性、ELISPOTおよびフローサイトメトリー）が、癌、感染性疾患および自己抗原に対する細胞傷害性T細胞の応答をモニターするために確立されている。臨床的効力（例えば、癌ワクチンの臨床的効力）を予測するためのこれらの方法の最も有用な方法はまだ明らかにされていないが、四量体の潜在的可能性についてはこの分野では非常に期待されている。より最近に開発された別の方法において、Schneckのグループは、免疫グロブリンを、2価のペプチド-MHC-IgG複合体を製造するための分子足場として使用した（参考文献2）。数多くの報告により、両タイプの低価数（oligovalent）のMHC複合体が抗原特異的T細胞に結合することが示されている。そのような方法は、科学的で、実用的または臨床的な使用に有益であることが判明している。

【0009】

しかしながら、これまでの報告された知見には依然として改善の余地がある。多くのMHC分子は、非常に容易に得ることができない不安定な化合物であり、そして機能的であるためには正しく折り畳まれる必要があり、そしてTCRとの十分な相互作用を得ることを困難にする、TCRに対する低い固有的な結合親和性を有している。これらの障害は、その複合的な影響とともに、MHC多量体技術の利用および多くの研究室における使用を制限している。以前の報告は、ペプチドエピトープに特異的な2個～4個のMHCクラスI分子またはMHCクラスII分子からなる多価複合体の結合を明らかにするだけであった。そのような多価

10

20

30

40

50

複合体の結合は、高親和性のT細胞クローンの検出を可能にするだけである。すなわち、例えば、亜優勢のペプチド/MHCエピトープに対して特異的に応答する様々なT細胞クローンを逃している。

【0010】

多くの技術、例えば、フローサイトメトリー、ELISAまたは電気泳動のような技術では、ホモジネート化された組織または細胞または細胞フラグメントが使用される。しかし、多くの適用においては、その本来の環境および状況において、すなわち、形態が保持されているサンプルにおいて潜在的な標的を同定および研究できることは重要な利点である。しかし、これは、測定において使用される手段に対して非常に大きな要求を課すものである。そのような手段は、形態が保持されているときに目的とする標的に結合することができなければならない。

10

【0011】

早期診断の利点は極めて大きい。重大な疾患または状態の診断が早期に確立されるほど、治癒または少なくとも制御の可能性が良好になる。しかし、これには、高感度で、特異的で、そしてとりわけ非常に確実な手段が必要である。後者は、例えば、非常に多くの偽陽性の結果および非常に多くの偽陰性の結果の両方を避けるためには重要である。

【0012】

診断法、予後法ならびに患者のモニタリングおよび階層化のために広く使用されている1つの方法が、組織化学であり、特に免疫組織化学(IHC)(または免疫細胞化学、ときにはそう呼ばれることがある)である。IHCは、組織形態学の研究と一緒にあって、様々な生体高分子または関連する生化学的事象をその現場において明らかにするための強力なツールであり、そして生物医学研究および臨床診断研究において、特に腫瘍診断のためにこれまで適用されており、そして引き続き広範囲に適用される。

20

【0013】

従って、組織化学は、例えば、類似する組織学的パターンを有する腫瘍を区別するために、そして腫瘍の予後判定において、転移した腫瘍の起源を明らかにするために(すなわち、早期の新生物プロセスを検出するために)、そして腫瘍の再発を確認するために、そして様々な治療の有効性を測定するために使用される。

【0014】

研究適用では、IHCは、DNAレベルおよびRNAレベルでの結果に対する補足的な分析および/または確認分析として生物学的構造体の細胞学的分布および組織学的分布を判定することにおいて明かな役割を有している。

30

【0015】

本発明はさらに、治療分野において有力なツールを提供する。診断および治療は、密接に繋がった2つの分野である。診断はまた、適切かつ最適な治療を決定または選択することに関係する。様々な医薬品は、疾患の特定の異型を効果的に標的化してより特異的になるので(いわゆるデザイナー薬物)、診断と治療との相互関係はより重要かつ不可分になっている。さらに、免疫系の理解が増大することにより、医薬品を設計する可能性が、それに対する要求とともに生じる。

【0016】

40

抗腫瘍免疫療法または抗ウイルス免疫療法の主要な目的は、標的細胞を殺すことを可能にする抗原特異的かつ長寿命の保護的なT細胞を生じさせることである。抗原特異的なT細胞が単離されると、そのようなT細胞は共刺激分子の存在下で培養することができる。Dynabeads(登録商標)などの磁気ビーズは、様々な共刺激分子に対して開発された抗体でコーティングすることができ、そしてT細胞の様々なサブセットのエキソビボでの長期間の成長を支える人工APCとして使用することができる。ヒトのエフェクターT細胞集団のエキソビボでのこの初回刺激および拡大は、様々なタイプの癌および感染性疾患に対する免疫療法適用における使用に関して大きい潜在的可能性を有している。

【0017】

明らかに、細胞の機能を実質的に妨げる免疫療法の成功はこれまで限られていたが、こ

50

れは、癌および自己免疫疾患を含む広範囲の重篤な疾患を処置する1つの方法であると引き続き考えられている。

【0018】

以前に報告された知見にもかかわらず、新しい方法のための多くの余地が依然として存在する。本発明は、そのような新しい方法を診断分野および治療分野の両方で提供する。

【0019】

発明の要旨

多価MHC化合物の実際の潜在的可能性を利用するために、新規なMHC分子構築物が作製された。これらは、数多くの長所を有することが示されており、従って、これらの新規な構築物に対する期待は大きい。本発明の構築物は、十分に明らかにされたTCR特異的リガンドである非常に多数のMHC分子（ポリリガンド）を潜在的に発現させることができる。

10

【0020】

これらのMHC分子構築物は、比較可能な条件のもとで、知られている先行技術の四量体よりもはるかに大きい結合力で抗原特異的なT細胞に結合することが本明細書中に示される（実施例を参照のこと）。予想外で、そして驚くほどの増大した結合エネルギーが、化合物のより大きい価数から得られるので、そのような結合エネルギーにより、例えば、フローサイトメトリーを使用して、例えば、末梢血細胞における希薄なT細胞集団さえも特異的かつ効率的に染色することが可能になる（実施例を参照のこと）。

【0021】

従って、第1の局面において、本発明は、1つ以上のMHC分子が結合しているキャリア分子を含む新規なMHC分子構築物に関する。この場合、MHC分子は、直接的に、または1つ以上の結合性物質を介して、そのいずれかでキャリア分子に結合している。

20

【0022】

本発明のMHC分子構築物は、意図された適用に依存して、不溶性の形態または可溶性の形態で提供され得る。

【0023】

本発明のMHC分子構築物は多数の用途を有しており、例えば、診断、予後、モニタリング、階層化の各分野において、そして疾患または症状の状態を決定することにおいて、そして同様に治療において有益かつ有力なツールである。従って、本発明のMHC分子構築物は、MHC認識細胞の検出を伴う様々な方法において適用することができる。

30

【0024】

さらに、本発明は、MHC分子構築物を可溶化媒体に含む組成物に関する。本発明はまた、固体または半固体の担体に固定化されたMHC分子構築物を含む組成物に関する。

【0025】

前記MHC分子構築物は検出システムとして非常に好適である。従って、本発明は、検出システムとして本明細書中に規定されるようなMHC分子構築物の使用に関する。

【0026】

別の局面において、本発明は、サンプルをマウントする様々な方法におけるMHC分子およびそのようなMHC分子の多量体の一般的な使用に関する。これらの方法には、診断方法、予後方法、疾患または症状の進行および状態を明らかにするための方法、そして患者を階層化するための方法が含まれる。

40

【0027】

本発明のMHC分子構築物はまた、様々な疾患に対する医薬品の予想される効力を試験することにおいて、または様々な疾患の処置について試験することにおいて有益である。従って、本発明は、医薬品または処置の効果を試験する方法に関する。この方法は、MHC分子構築物がMHC認識細胞に結合することを検出すること、そしてMHC認識細胞の特異性に基づいて問題とする医薬品または処置の有効性を明らかにすることを含む。

【0028】

上記に述べられているように、本発明はまた、一般には治療分野に関する。従って、本発明は、それ自体、医薬品として使用される本明細書中に規定されるようなMHC分子構築

50

物、そしてインビボ治療およびエキソビボ治療において使用されるMHC分子構築物に関する。

【0029】

本発明は、本明細書中に規定されるようなMHC分子構築物を有効成分として含む治療組成物に関する。

【0030】

本発明の重要な局面の1つは、関連するMHC認識細胞を単離するために本明細書中に規定されるようなMHC分子構築物を使用し、そしてそのような細胞を臨床的に関連する数にまで拡大して得られるMHC認識細胞の有効な量を活性成分として含む治療組成物である。

【0031】

本発明はさらに、疾患を処置または防止または緩和するための方法、細胞のアネルギーを誘導するための方法、ならびに免疫応答をアップレギュレーション、ダウンレギュレーション、調節、刺激、阻害、回復、増強および/または他の場合には操作するための方法に関する。

【0032】

本発明はまた、本明細書中に規定されるようなMHC分子構築物を使用してMHC認識細胞を得るための方法に関する。

【0033】

本発明の治療組成物を調製するための方法もまた本発明によって包含される。

【0034】

下記には、図面の簡単な説明が示される。

【0035】

図1～図24および図49～図57には、本発明のMHC分子構築物のいくつかの実施形態が例示される。図49および図50には、図1～図24に示される実施形態もまた固定化形態で提供され得るが、MHC分子構築物のいくつかの実施形態が固定化形態で提供されることが特に例示される。これらの実施形態は好適なMHC分子構築物の例であり、そして決して本発明の範囲に対する限定ではないことを認識しなければならない。

【0036】

図25～図33には、特異性、サイズ効果、インキュベーション時間、濃度依存性、結合の解離に対する時間経過、抗体による結合阻害、特異的結合に対する結合時のHLA（ヒトMHC）対デキストラン比の影響、ならびにT細胞垂集団を染色する能力を含む、MHC分子構築物の適用のいくつかが例示される（実施例を参照のこと）。従って、実用的な臨床的適用におけるMHC分子構築物の有用性が明らかにされる。

【0037】

図34～図37には、興味深いHLA（ヒトMHC）のクラスI結合モチーフおよびクラスII結合モチーフ、興味深いHIV/SIVタンパク質、Tリンパ球によって認識される興味深い腫瘍関連抗原、およびHIV CTLエピトープが示される。

【0038】

図38～図45には、実用的な適用におけるMHC分子構築物の有用性が例示される（実施例を参照のこと）。

【0039】

図46～図48には、細胞表面のレセプターが、例えば、感染細胞上に提示されたMHC分子に結合する実際の状況を本発明の構築物のMHC分子が模倣する様子が概略的に例示される。

【0040】

発明の詳細な説明

本発明をより十分に説明するために、免疫系およびMHC分子の重要な特徴のいくつかは下記に記載される。

【0041】

免疫系およびMHC分子

10

20

30

40

50

免疫系は自然の主要な生物情報系の1つとして考えることができる。免疫系により、内部の環境に進入するすべての物質が評価され、そしてその性質が明らかにされ、そしてそれに対する行動を起こすべきかどうかが決まる。タンパク質およびペプチドが、そのような免疫情報を得て、伝える最も重要な手段である。この観点から、MHC分子は、免疫原性抗原の認識のために必要とされる最も本質的な分子群をコードする。MHC分子は、ペプチド情報のためにタンパク質代謝全体をサンプル抽出しており、この情報を免疫系の中心的な認識ユニット（T細胞）のために利用できるようにする。しかし、これらのエフェクター細胞は、MHC分子とTCRとの間での実質的な相互作用を必要とする。このような相互作用により、少なくとも2つのシグナルがナイーブT細胞の活性化のために必要であることが裏づけられる:1つのシグナルがMHC分子とTCRとの分子相互作用によって現れ、これに対して、もう1つのシグナルは、共刺激リガンド（例えば、B7-1）とそれらの対抗レセプター（例えば、CD28）との結合から得られる。他の分子（例えば、NKレセプター）がT細胞の活性化閾値を調節し得ることもまた示されている。従って、T細胞および他の免疫適格エフェクター細胞の完全な活性化には、多数のリガンドの協奏した作用が必要である。すなわち、免疫応答はポリリガンド化合物の制御下にあるとすることができる。

10

【0042】

免疫系の機能は、外来侵入物または異常な自己分子（例えば、寄生虫、細菌、ウイルスおよび癌）から身体を守ることである。そのような脅威は、通常、免疫系によって効率的に除去または中和され得る。この潜在的能力を行うために、免疫系は、疾患（例えば、癌）の発生時に発現し得る異物または異常な自己分子の存在から健康な身体における正常な分子を識別しなければならない。理想的には、異物分子または異常な分子は除去されなければならない。一方で、身体そのものは無傷のままなければならない。従って、免疫系の主要な特徴の1つは、特異性、すなわち、様々な標的を識別する能力、特に、自己と非自己とを識別する能力である。特異的（または適応）免疫系は、非常に多くの異なる細胞タイプを伴う。様々な免疫応答が抗原プロセッシング/提示細胞およびエフェクター細胞の協奏的相互作用から発生する。中心的なエフェクター細胞はリンパ球であり、リンパ球は、体液性応答および細胞性応答を説明するB細胞およびT細胞にそれぞれ大きく分類される。両方の細胞集団は様々なレセプターを使用するが、そのレセプターは、リコンビナトリアルレセプターの膨大な多様性を可能にする多くの小さい部分でそれらのゲノムにコードされる。B細胞またはT細胞はそれぞれが、母集団のそれらの小さいが、他とは異なる特徴的なフラグメントを認識するこれらのレセプターの1つを有し、しかも1つのみを有する。組み合わせられるすべてのヒトリンパ球により、母集団全体が、2つの大きい標的群に、すなわち、免疫系によって寛容される自己抗原の群と、応答を誘発し得る非自己または異常な抗原の群とに分けられる。免疫系の全体的な特異性が、個々のリンパ球を制御するプロセスによってもたらされ、調節され、そして協調させられる。リンパ球クローンの欠失または不活性化により、対応する特異性がレパートリーから除かれる。リンパ球クローンの活性化および増殖により、対応する特異性が増強され、従って、免疫系を抗原に対して迅速かつ強く応答させることができる。

20

30

【0043】

免疫系の細胞

40

免疫系の細胞には、下記の細胞が含まれる:リンパ球は、血液中および身体の多くの他の部分において見出される一種の白血球である。様々なタイプのリンパ球には、B細胞、T細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。

【0044】

B細胞およびT細胞は、異常な物質を特異的に認識し、その異常な物質に対して特異的に応答し、従って、特異的な免疫系の一部である。

【0045】

B細胞（Bリンパ球）は成熟して、抗原として知られている外来物質を認識し、これを攻撃するタンパク質である抗体（免疫グロブリン）を分泌する形質細胞になる。各タイプのB細胞が、抗原表面における1つの特定のエピトープを認識する1つの特異的な抗体を産生

50

する。

【0046】

T細胞は、MHC分子に関連して「非自己」（または異常）ペプチドの形態で抗原を示す抗原提示細胞（APC）との相互作用によって異常な物質を認識し、これに応答する。それぞれのT細胞クローンはT細胞レセプター（TCR）の1つの特徴的な特異性を発現し、これにより、1つの特定のペプチド/MHCエпитープを認識する。

【0047】

T細胞は2つの主要な分集団を含む。細胞溶解性のT細胞は、MHCクラスI分子（下記に記載される）に関連して異物または異常な形態の内因性ペプチドを示す感染細胞または異物細胞または癌性細胞を直接攻撃する。MHCクラスII分子内の異物の外因性ペプチドによって活性化される「ヘルパー」T細胞は、他の免疫系防御因子にシグナルを送ることによって免疫応答の調節に寄与している。T細胞はまた、リンホカインと呼ばれるタンパク質を産生することによって機能する。

10

【0048】

NK細胞は、すべての異物侵入物に結合して、これを殺す強力な化学物質を産生する。それらは、特定の抗原を最初に認識する必要なく攻撃し、従って、先天免疫系にも関連する免疫細胞タイプである。

【0049】

単球は、食作用および抗原プロセッシングとして知られているプロセスで微視的な生物および粒子を飲み込み、消化することができる白血球である。樹状細胞（DC）は、T細胞の効果的な活性化を生じさせる「専門的方法」でペプチドエпитープを提示するので、特に注目されている。プロAPCは、T細胞上に発現した様々な対抗レセプターと結合する様々な共刺激分子を発現する。

20

【0050】

免疫系における細胞は2種類のタンパク質（すなわち、抗体およびサイトカイン）を分泌する。特異的な抗体は、特定の抗原におけるエпитープと一致し、これにより、鍵が錠と合う方法で十分に合致する。従来のワクチン法は、特に、抗原特異的な抗体の分泌をもたらしヘルパーT細胞およびB細胞の活性化によって機能する。

【0051】

サイトカインは、他の細胞と連絡するために一部の免疫細胞によって産生される物質である。様々なタイプのサイトカインには、リンホカイン、インターフェロン、インターロイキンおよびコロニー刺激因子が含まれる。

30

【0052】

B細胞およびT細胞による抗原認識

B細胞およびT細胞は、その標的を認識するために全く異なる機構を使用する。B細胞は可溶性の抗原を認識する。B細胞は、そのレセプターを抗体として分泌することができるので、細胞外空間の液相の至るところで抗原と潜在的に相互作用することができる。著しく対照的に、T細胞のレセプターは常に膜に結合しており、抗原提示細胞（APC）の膜に提示される抗原を認識するだけである。すなわち、T細胞の認識は、2つの細胞（すなわち、T細胞およびAPC）の直接的な物理的相互作用を伴う。B細胞およびT細胞はまた、それらが認識するものに関しても異なる。B細胞はほとんどすべての種類の有機物質を認識することができ、これに対して、T細胞は主としてタンパク質を認識する（生物学的標的として、タンパク質は、全生涯の構造的および機能的な基礎を構成するので、特に重要である）。B細胞は、未変性タンパク質と変性タンパク質とを識別することができることによって例示されるように、タンパク質の三次元構造を認識する。対照的に、T細胞は未変性タンパク質と変性タンパク質とを識別することができない。今日、T細胞は、APCの表面においてMHC分子と一緒に提示された抗原性ペプチドを認識するだけであることが知られている。一般に、細胞傷害性T細胞は短いペプチド（一般には8残基～11残基に対応する）を認識し、そのアミノ末端およびカルボキシ末端がMHCクラスI分子内に深く埋め込まれている（すなわち、ペプチドの長さには制限がある）。これに対して、ヘルパーT細胞

40

50

は、アミノ末端およびカルボキシル末端がMHCクラスII分子から突き出ているより長いペプチド（一般には13残基～30残基に対応する）を認識する傾向がある。

【0053】

MHC拘束およびT細胞免疫性

T細胞は、B細胞の活性を含む適応免疫系の反応性および特異性を決定する。従って、これらの細胞に注目することは適切である。T細胞は、所与の抗原が特定のMHC分子に関連して提示されたときにその所与の抗原を認識するだけである。T細胞は個体発生時に「教育」され、そして特定の抗原-MHC分子の組合せに対して特異的なレセプターを有するT細胞を発達させることを目的とするプロセスにおける最初の抗原刺激のときにさらに活性化される。これらのT細胞は、その後、同じ抗原-MHC分子の組合せを認識することができるだけである。この現象は、「MHC拘束」として知られている。別の免疫現象、すなわち、「レスポンダー状態」の現象もまた、MHC分子によって決定される。1つのMHCハプロタイプを有する個体は、いくつかの抗原に対して応答するが、他の抗原には応答しない。別のMHCハプロタイプを有する他の個体は異なる応答を示す。これらの2つの現象は、何らかの合理的な免疫操作のためには明らかに重要である。述べられたように、現在、我々は、様々なMHC分子がそれらの両方を制御していることを知っている。これらの分子は、抗原提示のために特異的に進化させられてきた。抗原提示の我々の現在の理解は下記のようにまとめることができる。第1に、外来物質（すなわち、抗原）はAPCによって取り込まれる。抗原性ペプチドの細胞内プールが、細胞にとって利用可能なタンパク質すべてのタンパク質分解的断片化によって作製される（これには、正常な細胞タンパク質（「自己タンパク質」）と、感染性生物由来の抗原（「非自己タンパク質」）との両方が含まれることがある）。

10

20

【0054】

このペプチドプールが個体のMHC分子に差し出され、長さおよび配列に従ってサンプル抽出される。一部が結合し、その一方で、他は無視される（MHC分子は、「決定基選択」を行うと言われている）。続いて、MHC分子は、選択されたペプチドをさらなる分解から保護し、それらをAPCの表面に輸送して、T細胞による精査のためにそれらをディスプレイする。「非自己タンパク質」に由来する抗原性ペプチドは、「自己タンパク質」に由来するペプチドとは対照的に、T細胞によって認識され、その結果、T細胞が活性化され得る。

30

【0055】

多数のレセプターが免疫細胞の抗原特異的活性化に関与する

細胞のこのネットワークを制御することに関連するいくつかのリガンドレセプター相互作用は、単純なホルモン-レセプター相互作用（例えば、インスリンおよびIR）を含むより「通常の」なりガンドレセプターモデルと比較して複雑である。

【0056】

例えば、T細胞の完全な活性化は、TCRのシグナル伝達に加えて、様々なレセプターによって同時に起こるシグナル伝達をもたらす。APCおよびT細胞上に発現した多数の膜分子の連結から生じる結合エネルギーにより、関与する細胞間の密な物理的接触が確保される。T細胞の活性化に関連する非常に重要なさらなるレセプターの1つがCD28分子であり、これは、プロAPC表面に発現したB7ファミリーのタンパク質と結合する。T細胞表面に発現する調節レセプターの他の知られている例には、様々なNKレセプター（NKR）があり、これらは阻害性イソ型および活性化イソ型の両方を含む。活性化NKRおよび阻害NKRの発現形態間のバランスにより、特定のT細胞を活性化するための閾値が決定されることが考えられている。

40

【0057】

最近、TCR分子およびMHC分子を含むこの細胞相互作用に関与するレセプターおよびリガンドの多くの間における分子相互作用は不安定であること、すなわち、そのような分子相互作用は親和性が低いことが報告されている。例として、一価MHC分子-TCRの相互作用は $K_D=10\text{mM}$ の親和定数を有し、解離定数が1分未満であることが測定されている。CD28とB7タ

50

ンパク質との分子相互作用は同じレベルの親和定数を有する。対照的に、大きい親和性の相互作用、例えば、ホルモンリガンドレセプター結合（インスリン/IR）および抗体-抗原結合により形成される複合体の安定性および親和性は著しくより大きい（親和定数 K_D は0.1nM~10nMの範囲にある）。

【0058】

しかし、T細胞の活性化に関連する多数のタンパク質は、APCとT細胞との細胞接触を安定化するだけでなく、T細胞の活性化のために必要とされる様々なシグナル伝達事象にも寄与する。T細胞の活性化を決定するのは、これらのシグナル伝達事象の協奏した作用である。例えば、細胞溶解性のナイーブT細胞は、少なくとも2つのシグナルを活性化のために必要とすることが示されている。第1のシグナルは、（APC上に発現した）MHC分子がT細胞上のTCRに結合することによって送達される。第2のシグナルは、T細胞上のCD28レセプターと連結する、例えば、B7タンパク質ファミリー由来の共刺激分子を介して送達される。

10

【0059】

MHC分子および抗原提示:特異的な免疫系への入口

ヒトMHC遺伝子座（HLA遺伝子座）に存在する遺伝子は、1組の非常に多型の膜タンパク質をコードしており、それらは細胞内区画においてペプチドをサンプル抽出し、抗原提示細胞（APC）の表面でそのようなペプチドエピトープを精査T細胞に提示する。MHC遺伝子座の甚だしい遺伝子多型は、個体における免疫系の特徴的な遺伝子的指紋に対する背景であり、そのような遺伝子多型により、ヒト集団が認識し、応答することができる抗原性ペプチドエピトープのレパートリーが規定される。

20

【0060】

MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子の2つのサブタイプのMHC分子が存在する。これらのサブタイプはTリンパ球の2つのサブタイプに対応する:1) CD8+細胞傷害性T細胞、これは、通常、MHCクラスI分子によって提示されるペプチドを認識し、感染したT細胞または変異したT細胞を殺す;そして2) CD4+ヘルパーT細胞、これは、通常、MHCクラスII分子によって提示されるペプチドを認識し、免疫系の他の細胞の応答を調節する。MHCクラスI分子は、12,000のMWを有する非グリコシル化タンパク質（軽鎖（ β 鎖）、これはまた b_2 -ミクログロブリンとして知られている）と非共有結合的に会合した、43,000のMWを有する膜貫通糖タンパク質（ α 鎖）から構成される。MHCクラスII分子は、ドメイン分布が異なるが、MHCクラスI分子と類似した全体的な構造を有する。MHCクラスII分子は、およそ34,000のMWおよび29,000のMWを有する2つの非共有結合的に会合した膜貫通糖タンパク質から構成される。MHCクラスI分子およびMHCクラスII分子の詳細な構造は、例えば、Bjorkman他（参考文献8）によって、X線結晶学のレベルで解明されている。MHC分子構造の最も注目される部分は、溝の壁を形成する2つの α らせんと、溝の床を形成する8個の β プリーツシートとから構成される特徴的なペプチド結合溝を示す「上部」部分である。

30

【0061】

ペプチドは、適応免疫系による「非自己」の認識における不可欠な標的構造体であり、そしてMHC分子群が免疫系への入口を構成し、従って、ヒト疾患の浸透度および拡大を決定する際に大きな役割を果たしていると言われている。他の高等脊椎動物種のMHC分子が、ヒトにおけるHLAの生物学的機能と同一の生物学的機能を発揮している。

40

【0062】

MHC遺伝子座は極めて多型であり、すなわち、多くの異なる形態（対立遺伝子、アロタイプ）が集団において存在する。しかし、それぞれの個体は、これらのうちの2つを受け継ぐだけである（1つを父親から、1つを母親から）。MHC遺伝子座はまた多遺伝子性であり、すなわち、数個のイソ型の同時発現を可能にする数個のMHCコード遺伝子座がゲノムに存在する。重要なことに、多型残基の大部分は、例えば、Matsumura他（参考文献9）によって記載されるように、そのサイズおよび形状および機能性に影響を及ぼすペプチド結合溝の方を向いている（point）。ペプチド-MHC相互作用は、広範囲にもかかわらず、特異的であり、これにより、多くの関連しないペプチドがそれぞれのMHCアロタイプに結

50

合することを可能にしている。多型により、ペプチド結合の特異性が決定され、そして、このことの生物学的結果は、集団内のそれぞれの個体が特徴的なT細胞レパートリーを教育し、かつ決めるということである。

【0063】

様々な比較的变化しないMHCクラスI分子様分子が同定されている。この群は、CD1d、HLA A E、HLA G、HLA H、HLA F、MIC A、MIC B、ULBP-1、ULBP-2およびULBP-3を含む。これらの非古典的な分子は、HLA A、HLA BおよびHLA Cとは異なる組織分布および機能を有している。それらの一部は重鎖タンパク質だけを含み、すなわち、b₂m分子およびペプチドと会合していない。前記に記載されるように、様々な免疫応答が、抗原プロセッシング/提示細胞およびエフェクター細胞の協奏的相互作用から生じている。

10

【0064】

モノマー形態および可溶型形態の同族体、ならびに修飾されたMHC分子（例えば、ペプチドを有する単鎖タンパク質、1つの構築物に融合された重鎖および軽鎖）が、細菌、ならびに真核生物細胞において製造されている。組換え技術およびインビトロでのタンパク質フォールディング法における最近の進歩により、適切なT細胞レセプターに対して大きい結合力で結合する多量体MHC分子を大規模に製造するための効率的なプロトコルが提供されている。

【0065】

NK細胞およびMHC分子

NK細胞は最近まで謎であった。これらの細胞は、先行する刺激の非存在下である種の腫瘍を溶解するその能力によって定義される。しかし、最近の報告では、NK細胞の活性は、MHC分子を含む多数のリガンドによって調節されることが示されている（参考文献5）。NK細胞は、阻害シグナルを送達する表面レセプターを介してMHCクラスI分子を認識する。従って、NK細胞は、MHC分子の発現を失った標的細胞を溶解することができる。腫瘍細胞は、MHC分子に関連した腫瘍関連抗原（ペプチド）を認識する細胞傷害性T細胞からの選択圧のためであると考えられているが、多くの場合、MHC分子のその発現を低下させているか、または失っていることが広く知られている。この場合、NK細胞が正常な細胞と腫瘍細胞とを識別する能力は、Ljunggren他（参考文献6）による「ミッシングセルフ（missing-self）仮説」によって説明される。しかし、NK細胞は、広範囲のMHC分子を認識するレセプターを単に備えているだけではない。NKレセプターが複雑であることはまた、一部が活性化しつつあり、これに対して、他が阻害性である種々のイソ型が発現していることによって反映される。興味深いことに、5%~10%の（ $\alpha\beta$ ）T細胞もまた、阻害レセプタースーパーファミリーに属する、KIR、ILTまたはCD94/NKG2などの異なるNKレセプターを発現している。そのようなレセプターは、細胞性免疫応答に対する活性化閾値を上げるように作用し得る（参考文献7）。

20

30

【0066】

刺激性レセプターと阻害性レセプターとのバランスは、おそらくは、T細胞およびNK細胞の活性化を制御していると考えられる。NK細胞およびT細胞の表面に発現した異なるNKレセプターの一部によって、MHCクラスI分子のより広い特異性が認識され、これに対して、他のレセプターによって、発現することがより希である対立遺伝子決定基が認識される。従って、MHC分子が特異的な免疫応答の刺激および阻害の両方に関与し得る。

40

【0067】

T細胞レセプター

T細胞レセプターは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、それぞれが2つの細胞外ドメインを含む、約30,000のMWを有する2つの非共有結合的に会合した膜貫通糖タンパク質（「 α 」鎖および「 β 」鎖）から構成される。これらの2つの鎖は二量体を形成し、そしてより大きいタンパク質複合体のCD3と会合する。MHCクラスI分子と会合したTCRの詳細な構造がX線結晶学レベルで解明されている。可溶性TCRの組換え形態（これは細胞外ドメインから構成される）が細菌および真核生物細胞において製造されている。

50

【0068】

特異的なTCRリガンド（すなわち、免疫原性ペプチド/HLA複合体）と特異的なT細胞レセプターとの特異的な相互作用により、TCR/CD3複合体によって構成されるシグナロソームのリガンド誘導形成がもたらされ、チロシンキナーゼ（lck、Fyn、Syk、Zap-70）およびアダプター（LAT、TRIMおよびGrp2）の細胞内プールとのその相互作用がもたらされる（参考文献4）。上記に記載されるように、様々なTCRをクローン発現させ、そして適切なペプチド特異的MHC複合体のみが免疫応答を誘発することができる。

【0069】

まとめると、個々のT細胞クローンは、特異的なT細胞レセプターとその天然リガンドとの相互作用を介して内外の世界に由来する小さいフラグメント、すなわち、HLA分子に関連したペプチドについて「試食（taste）」すると言することができる。しかし、T細胞は、T細胞の活性化のために適切なシグナルを（HLA分子との協奏的作用において）提供するさらなるリガンド（複合化リガンドと言することができる）を必要とする。

【0070】

共刺激分子

適応免疫応答には、2つのシグナルが最初の活性化のために必要である：抗原提示細胞（APC）上のペプチド-MHCがT細胞レセプター（TCR）に結合することによってもたらされる1つのシグナル、そして共刺激と呼ばれる抗原非依存性のもう1つのシグナル。CD28は、T細胞が、CD28のリガンド（B7-1（CD80）またはB7-2（CD86））を発現するAPCと遭遇したときに共刺激機能をもたらしT細胞表面の膜レセプターである。CD28の機能は、主として、TCRによって開始されるシグナルを変化させることであり、これにより、増殖、サイトカイン産生および細胞生存を生じさせる一連の事象において定性的および定量的な変化がもたらされる。共刺激シグナルを伴わないナイーブT細胞の誘発は、T細胞を機能的に非応答性（アネルギー、アポトーシス）にすることがある。CD28は、CD8+T細胞と比較して、CD4+T細胞のより大きい増殖を誘導する。誘導型共刺激因子（ICOS）などを含む、CD28免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーの他のメンバーは、活性化されたCD4+T細胞およびCD8+T細胞において共刺激シグナルを提供し、その増殖を高める。

【0071】

リンパ球応答は、活性化シグナルだけでなく、阻害シグナルによって調節される。CTLA-4およびPD-1はそのような阻害シグナルを媒介した。CTLA-4は、CD28と比較した場合、共有するリガンドであるB7-1およびB7-2に対してより大きい親和性を有しており、TCR-CD28の結合のときにアップレギュレーションされる。PD-1は阻害シグナルを媒介するようであり、造血系由来組織および活性化されたT細胞において広く発現されている。インターロイキン-2および共刺激シグナルは、連続した細胞分裂を維持するために要求される2つの最も重要な因子である。

【0072】

CD28はナイーブT細胞上に非常に重要な共刺激シグナルを提供するが、腫瘍壊死レセプター（TNFR）スーパーファミリーにおける他の共刺激分子（4-1BB（CD137）、CD27およびOX40（CD134）など）は活性化T細胞表面に共刺激シグナルを提供して、T細胞応答の性質を細胞生存またはアポトーシスに向かわせる。

【0073】

一部のCD8+エフェクターT細胞はCD28の発現を有していない。しかし、これらの細胞は、レクチン様のNKG2Dホモダイマー、すなわち、MICと呼ばれるMHCクラスI様分子に対するレセプターを発現する。NKG2Dは、CD28-CD8+T細胞に対する共刺激分子として、そしてTCR/CD3複合体により誘導されるIL-2およびT細胞の増殖と一緒に引き起こしながら働く。NKG2Dの発現および機能はサイトカインのIL-15によって選択的にアップレギュレーションされる。ヒトNKG2Dは、 γ 、 δ T細胞、CD8+T細胞、NK細胞、および小さいサブセットのCD4+T細胞で発現される。ストレスによって誘導されるMIC A分子およびMIC B分子が、腸上皮において、そして同様に上皮起源の様々な腫瘍において発現する。NK細胞は、腫瘍がNKG2Dに対するリガンド（すなわち、MIC AまたはMIC B）を発現する場合、MHCクラス

I分子を発現する腫瘍を拒絶することができる。NK細胞表面に発現する、自然細胞傷害性レセプター（NCR）と呼ばれる一群のレセプター（NKp46、NKp30、NKp44）が様々な腫瘍のNK媒介溶解に関与している。

【0074】

サイトカイン

上記に述べられたように、様々なサイトカインが細胞間の連絡において重要な役割を果たしている。サイトカインの群には下記が含まれる：

【0075】

インターフェロン（IFN）：インターフェロンは、体内において天然に生じるタイプのサイトカインである。インターフェロン- α 、インターフェロン- β およびインターフェロン- γ の3つの主要なタイプのインターフェロンが存在する。インターフェロンはNK細胞およびT細胞およびマクロファージを刺激し、これにより免疫系の機能を高める。

10

【0076】

インターロイキン：インターフェロンと同様に、インターロイキンは、体内において天然に生じるサイトカインであり、実験室において作製することができる。多くのインターロイキンが同定されている：インターロイキン-2（IL-2）が癌の処置において最も広く研究されている。IL-2は、リンパ球などの多くの免疫細胞の成長および活性を刺激する。コロニー刺激因子（CSF）（これは造血性増殖因子と呼ばれることがある）は、通常、骨髄細胞を刺激して、白血球、血小板および赤血球に分化し、発達させる。骨髄は、すべての血液細胞の源であるので、身体の免疫系にとって非常に重要である。

20

【0077】

免疫応答を操作するための治療法およびワクチン法

生物学的治療（免疫療法、生物療法または生物学的応答調節物質療法）は、比較的新しいタイプの処置であり、ヒト免疫系の活性化の基礎となる細胞的および分子的な機構の知識に基づいている。例えば、免疫系は、体内の健康な細胞と癌細胞との違いを認識し、癌になる細胞を除去するように機能する。生物学的治療では、癌と戦うために、またはいくつかの癌処置によって引き起こされ得る副作用を少なくするために、直接的または間接的のいずれかで身体の免疫系を使用する。そのような免疫療法の重要な目的は、T細胞などの適切なエフェクター細胞を刺激することによって免疫系細胞の殺傷能を高めることである。

30

【0078】

癌「ワクチン」は生物学的治療の一形態である。麻疹、流行性耳下腺炎および破傷風などの感染性疾患に対する従来のワクチンは、免疫系が疾患の弱化体にさらされるので効果的である。この暴露は、免疫系に、抗体を産生することによって応答を生じさせる。免疫系が抗体を作製すると、活性化された免疫細胞の一部がその暴露を記憶する。従って、次回、同じ抗原が体内に進入すると、免疫系は、その抗原を破壊するためにより迅速に応答することができる。

【0079】

癌処置のために、研究者は、現在、癌細胞を認識するために免疫系を強化し得る様々なワクチンを開発している。これらのワクチンは、身体が腫瘍を拒絶し、かつ癌の再発を防止することを助ける。感染性疾患に対するワクチンとは対照的に、癌ワクチンは、疾患が発症する前ではなく、疾患が診断された後に注射されるように設計される。例として、腫瘍関連抗原（TAA）に由来する適切なペプチドが負荷されたDCによる免疫化により、「腫瘍特異的」T細胞が刺激され、これにより、一部の患者では、疾患のさらなる進行が妨げられ、究極的には疾患の退行がもたらされることが示されている。この方法は、DCによって行われる抗原プロセッシング/提示の「専門的経路」を利用している。これに対して、可溶性の腫瘍TAAまたはTAAに由来する適切なペプチドを含む可溶性MHC分子の注射は、おそらくは可溶性抗原からの抗原刺激の効力が低いために、効果が限られているか、または効果がないことが判明しているだけである。特異的なT細胞の低い親和性ならびに不十分な刺激により、可溶性のペプチド/MHC分子を用いた免疫化によって得られる保護が不良であ

40

50

ることが説明され得る。実際、本質的なリガンドレセプター相互作用の低い固有的亲和性は、特異的なT細胞を刺激するために可溶性の組換えタンパク質を利用することが制限されることを意味している。

【0080】

本発明

上記から明かであるように、MHC分子は非常に重要な役割を果たしており、従って、MHC分子を認識する細胞の検出は非常に重要であり、有益である。同様に、いくつかの試みが、制御可能な効率的かつ一貫した方法で免疫系を操作するために行われている。しかし、その成功は限られている。従って、実際に効き目がある免疫治療のための物質を見出すことは、現在治療法がない多数の重篤な疾患に対する戦いに向けた大きなステップであると考えられる。

10

【0081】

本発明により、様々な強力なツールが提供される。本発明は、一般には診断および治療の分野において効率的であるいくつかのポリリガンド化合物を提供する。

【0082】

本発明は、エピトープ特異的なT細胞クローンまたは他の免疫適格エフェクター細胞などのMHC認識細胞におけるレセプターを検出および分析するためにMHC分子を含む化合物を作製するという重要な研究に関する。本発明の化合物の増大した結合価により、先行技術から知られている低価数の複合体（四量体）と比較して、驚くほど大きくなった結合力がもたらされることが本明細書において示される。これにより、例えば、フローサイトメトリーによって、小さい細胞集団でさえ、その定量的分析が可能になる。

20

【0083】

上記で言及された四量体は、例えば、米国特許第5,635,363号（Altman他）（参考文献10）から知られている。米国特許第5,635,363号には、多価成分に結合しているペプチドとともに2つ以上のMHC分子を含む多量体の結合性複合体が記載される。MHC分子の数は、好ましくは4であり、従って、四量体を形成する。多価成分は、好ましくはストレプトアビジンまたはアビジンである。

【0084】

本発明の潜在的可能性および価値は、いくつかの報告により、末梢血におけるT細胞の反応性と新生物疾患の経過との間には相関がないことが明らかにされている（例えば、参考文献11）ので明かである。例えば、腫瘍組織ならびにリンパ組織におけるT細胞活性の分析により、より良好な理解が、固形腫瘍に対する免疫性に関してもたらされ得る。

30

【0085】

ヒトおよび寄生虫の一次タンパク質配列の増大しつつあるゲノムデータベースと、適切なリガンドによってもたらされる分子情報を免疫系がどのように処理しているかというこの理解とを組み合わせることによって、治療用ワクチンを開発するための新しい有力な方法がもたらされる。これは、次に、腫瘍発生によって引き起こされる疾患またはウイルスおよび細菌のような病原体による感染に対する指向した効率的な免疫操作のための様々な可能性を改善する。HIVは重要な一例である。本発明により考えられるように、組換えMHC分子または様々な混合リガンドを作製し、これらをキャリア分子に連結できることは、免疫応答をモニターするための新規な分析ツールを可能にし、そして新規な治療適用および「ワクチン」適用のための合理的な基盤に寄与する。ペプチド特異的な刺激による特異的なT細胞の増殖を刺激する治療組成物（「ワクチン」）は、実際に、本発明の範囲に含まれる可能性の1つである。従って、ペプチド特異的な刺激によって増殖する特異的T細胞の定量的分析およびリガンド型検出が、生じた応答をモニターするために同時に行われるはずである。非常に多型なヒトHLAをコードするタンパク質の群に由来する様々な分子を製造するための効果的な方法は、様々なペプチドエピトープ特異的T細胞クローンを含み得る複雑な免疫応答の進化した分析をもたらすと考えられる。本明細書中に開示される最新技術に由来する大きい結合力に基づくフローサイトメトリーおよび組織染色法は、T細胞応答のそのような進化した分析の開発を著しく増大させる。

40

50

【0086】

本発明のMHC分子構築物

本発明のMHC分子構築物の長所の1つは、明らかに、MHC分子構築物がモノマーリガンドおよび対抗レセプターの低い固有的亲和性を克服しているということである。しかし、そのようなMHC分子構築物は、標的細胞表面の高親和性レセプター（例えば、インスリンに対するホルモンペプチドレセプター）を標的化することを含む非常に様々な適用を有し得ることに留意しなければならない。まとめると、標的細胞に対するポリリガンドの結合は、直ちに商業的に注目される実用的な臨床的および科学的な用途を有する。

【0087】

従って、本発明は、MHC認識細胞のために多価の結合部位を提示するMHC分子の構築物を提供する。本発明の構築物は非常に好都合な性質を有しており、広範囲の有益な用途を有する重要なツールである。

10

【0088】

従って、第1の局面において、本発明は、1つ以上のMHC分子が結合しているキャリア分子を含むMHC分子構築物に関する。この場合、MHC分子は、直接的に、または1つ以上の結合実体を介して、そのいずれかでキャリア分子に結合している。

【0089】

本明細書中を通して使用される「1つ以上」は、1つおよび複数を含むことが意図される。

【0090】

これは、一般にはMHC分子および結合実体に適用される。従って、キャリア分子には、1つのMHC分子もしくは複数のMHC分子および/または1つの結合実体もしくは複数の結合実体がそれに結合している。

20

【0091】

本明細書中を通して使用される「複数」は2つ以上として解釈されなければならない。

【0092】

これは、一般にはMHC分子および結合実体に適用される。

【0093】

複数のMHC分子がキャリア分子に結合しているとき、その数は、状況に応じて、キャリア分子または結合実体の能力によって制限され得るだけである。結合実体の数は、キャリア分子の能力および性質によって制限され得るだけである。

30

【0094】

本発明のMHC分子構築物の使用に依存して、構築物そのものは、キャリア分子を注意深く選択することによって、可溶性の形態または不溶性の形態で提供され得る。可溶性および不溶性の両方の形式により、その好都合な性質が示される。

【0095】

本明細書中を通して使用される用語「a」または用語「an」または用語「the」は、1つ以上であること、すなわち、少なくとも1つであることが意味される。

【0096】

「MHC分子構築物」および「MHC構築物」は本明細書中では交換可能に使用され得る。

40

【0097】

本明細書中を通して使用される用語「MHC分子」によって、前記分子に属する機能の少なくとも1つを行うことができるそのような分子が意味される。この用語には、古典的なMHC分子および非古典的なMHC分子の両方が含まれる。MHC分子に関連して「古典的」および「非古典的」の意味は、当業者には十分に知られている。非古典的なMHC分子には、MHC様分子のサブグループがある。用語「MHC分子」および用語「MHC」は本明細書中では交換可能に使用される。従って、用語「MHC分子」はさらに、MHCクラスI分子、MHCクラスII分子、ならびに非古典的なMHCクラスI分子およびMHCクラスII分子のサブグループを含むMHC分子（クラスIおよびクラスIIの両方）を含むことが意図される。

【0098】

50

本明細書中を通して使用される「MHCクラスI分子」は、重鎖、軽鎖（ β_2m ）と一緒にになった重鎖、可動性リンカーを介して軽鎖（ β_2m ）と一緒にになった重鎖、ペプチドと一緒にになった重鎖、可動性リンカーを介してペプチドと一緒にになった重鎖、ペプチドと一緒にになった重鎖/ β_2m ダイマー、および重鎖または軽鎖に対して可動性リンカーを介してペプチドと一緒にになった重鎖/ β_2m ダイマーを含む、1個～3個のサブユニットを含む分子として定義される。MHC分子鎖は、前記分子に属する機能を高めるか、または弱めるために、1個の天然アミノ酸の置換もしくは数個の天然アミノ酸による置換によって、または挿入によって、または欠失によって変化させることができる。例として、ヒト β_2m の位置nnにおけるXXのYYによる置換は、MHCクラスI分子複合体の生化学的安定性を高め、従って、垂優勢なペプチドエピトープのより効率的な抗原提示をもたらす得ることが示されている。

10

【0099】

本明細書中を通して使用される「MHCクラスII分子」は、 α 鎖および β 鎖を含む分子（ α/β のダイマー）、ペプチドを有する α/β ダイマー、そして α 鎖または β 鎖に対する可動性リンカーを介してペプチドと一緒にになった α/β ダイマー、アフィニティータグ（例えば、jun-fos）による相互作用を介して一緒にになった α/β ダイマー、アフィニティータグ（例えば、jun-fos）による相互作用を介して一緒になり、かつさらに α 鎖または β 鎖に対する可動性リンカーを介してペプチドと一緒にになった α/β ダイマーを含む、2個～3個のサブユニットを含む分子として定義される。MHC分子鎖は、前記分子に属する機能を高めるか、または弱めるために、1個の天然アミノ酸の置換もしくは数個の天然アミノ酸による置換によって、または挿入によって、または欠失によって変化させることができる。

20

【0100】

MHCクラスI様分子（非古典的MHCクラスI分子を含む）には、CD1d、HLA E、HLA G、HLA F、HLA H、MIC A、MIC B、ULBP-1、ULBP-2およびULBP-3が含まれる。

【0101】

MHCクラスII様分子（非古典的MHCクラスII分子を含む）には、HLA DM、HLA DO、I-A β 2およびI-E β 2が含まれる。

【0102】

本明細書中を通して使用される「ペプチド非含有MHCクラスI分子」は、ペプチドを有しない上記に定義されるようなMHCクラスI分子であることが意味される。

30

【0103】

本明細書中を通して使用される「ペプチド非含有MHCクラスII分子」は、ペプチドを有しない上記に定義されるようなMHCクラスII分子であることが意味される。

【0104】

そのようなペプチド非含有MHCクラスI分子およびペプチド非含有MHCクラスII分子はまた、「空」のペプチド非含有MHCクラスI分子およびペプチド非含有MHCクラスII分子と呼ばれる。

【0105】

MHC分子は、好適には、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシまたは鳥類のMHC分子などの脊椎動物のMHC分子であり得る。異なる種に由来するそのようなMHC分子は異なる名称を有する。例えば、ヒトでは、MHC分子はHLAとして示される。当業者は、様々な種に由来するMHC分子の名称を容易に知ることができる。

40

【0106】

一般に、用語「MHC分子」は、対立遺伝子を含むことが意図される。例として、ヒトでは、例えば、HLA A、HLA B、HLA C、HLA D、HLA E、HLA F、HLA G、HLA H、HLA DR、HLA DQおよびHLA DPの対立遺伝子が注目され、マウス系ではH-2対立遺伝子が注目される。同様に、ラット系ではRT1対立遺伝子が注目され、ブタ系ではSLA対立遺伝子が注目され、ウシ系ではBoLAが注目され、そして鳥類系では、例えば、ニワトリB対立遺伝子が注目される。

【0107】

50

本発明のMHC分子構築物の定義は、MHC分子に関して様々な有益な可能性が可能である。従って、有益なMHC分子構築物の例として、下記のようなMHC分子構築物がある：

MHC分子の少なくとも2つが異なるMHC分子構築物、

MHC分子が同じであるMHC分子構築物、

MHC分子によって収容 (harbour) されるペプチドの少なくとも2つが異なるMHC分子構築物、

MHC分子によって収容されるペプチドが同じであるMHC分子構築物、

MHC分子によって収容されるペプチドが、非天然アミノ酸を含有するように、または親水基もしくは疎水基を含有するように化学修飾または化学合成されているMHC分子構築物、

MHCクラスI分子によって収容されるペプチドが可動性リンカーによってMHCクラスI重鎖に連結されているMHC分子構築物、

MHCクラスI分子によって収容されるペプチドが可動性リンカーによってMHCクラスI軽鎖 (β_2m) に連結されているMHC分子構築物、

ペプチドが、可動性リンカーによって軽鎖 (β_2m) と結合したMHCクラスI重鎖を含むMHCクラスI分子によって収容されているMHC分子構築物、

MHCクラスII分子によって収容されるペプチドが可動性リンカーによって α 鎖に連結されているMHC分子構築物、

MHCクラスII分子によって収容されるペプチドが可動性リンカーによって β 鎖に連結されているMHC分子構築物、

MHCクラスI分子が変異しているMHC分子構築物、

MHCクラスII分子が変異しているMHC分子構築物。

【0108】

上記の列挙は、決して包括的ではなく、多数の有益な可能性の概略である。

【0109】

特に、複数のMHC分子によって包囲されるペプチドが互いに異なる場合、そのようなペプチドは、数タイプのMHC認識細胞を同時に検出するために使用することができる。これは、異なるペプチドで満たされたMHC分子を含む1つのMHC分子構築物を用いることによって、または同じタイプのペプチドを有するMHC分子をそれぞれが含む数個のMHC分子構築物（例えば、1つのペプチドを示す1つのMHC分子構築物および別のペプチドを示す別のMHC分子構築物）を用いることによって、そのいずれでも達成することができる。

【0110】

本発明のMHC分子構築物の1つの実施形態において、1つ以上のMHC分子がキャリア分子に直接結合している。別の実施形態において、1つ以上のMHC分子が1つ以上の結合実体を介してキャリア分子に結合している。

【0111】

MHC分子が1つ以上の結合実体を介して結合しているとき、それぞれの結合実体は、好適には、1個～10個、例えば、1個～8個、1個～6個、1個～4個、1個～3個または1個もしくは2個のMHC分子がそれに結合している。しかし、MHC分子の可能な数（すなわち、どのくらい多くのMHC分子が結合し得るか）は問題としている結合実体に依存することを理解しなければならない。従って、結合実体を注意深く選ぶことによって、10個を越えるMHC分子をそれぞれの結合実体に結合させることが可能であり得る。しかし、この数は、それぞれの結合実体に結合したMHC分子の平均数であり得ることを理解しなければならない。従って、MHC分子構築物が、非常に多くの場合には特定の所望する重量分布で製造および精製されるので、そのような数のMHC分子が結合実体上に均一または非均一に分布し得る。従って、平均数は、少数の非限定的な例を述べるためには、整数である必要はないが、2つの整数の間でなんでもよく（すなわち、小数）、例えば、2.8、4.7または5.3であり得る。

【0112】

MHC分子構築物のMHC分子の総数は原理的には無制限である。従って、構築物のMHC分子の総数は、好適には、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくと

も8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも16、少なくとも20、少なくとも24、少なくとも28、少なくとも32、または少なくとも64であり得る。特に、構築物のMHC分子の総数は、1~100の範囲内、1~95の範囲内、1~90の範囲内、1~85の範囲内、1~80の範囲内、1~75の範囲内、1~70の範囲内、1~65の範囲内、1~60の範囲内、1~55の範囲内、1~50の範囲内、1~45の範囲内、1~40の範囲内、1~35の範囲内、1~30の範囲内、1~25の範囲内、1~20の範囲内、1~15の範囲内、1~10の範囲内、1~5の範囲内、1~4の範囲内、1~3の範囲内、または1もしくは2であり得る。用語「総数」は、キャリア分子に直接結合しているMHC分子だけでなく、1つ以上の結合実体を介してキャリア分子に結合しているMHC分子を含むことが意図されることを理解しなければならない。しかし、この総数は、結合しているMHC分子の平均数であり得ることを理解しなければならない。従って、そのような数のMHC分子が、複数のMHC分子構築物の間で均一または不均一に分布し得る。従って、平均数は、少数の非限定的な例を述べるためには、整数である必要はないが、2つの整数の間の任意の数（すなわち、小数）であり、例えば、28.4、44.5または57.2であり得る。

10

【0113】

結合実体は、MHC分子を結合させ、同時に、MHC分子をMHC認識細胞に結合できるようにさせるために好適な任意のそのようなものである。好適な結合実体の例には、ストレプトアビジン（SA）およびアビジンおよびそれらの誘導体、ビオチン、免疫グロブリン、抗体（モノクローナル、ポリクローナルおよび組換え）、抗体フラグメントおよびそれらの誘導体、AP-1のロイシンジッパードメイン（junおよびfos）、hexa-his（金属キレート成分）、hexa-hat GST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）グルタチオン親和性、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、Streptタグ、セルロース結合ドメイン、マルトース結合タンパク質、S-ペプチドタグ、キチン結合タグ、免疫反応性エピトープ、エピトープタグ、E2Tag、HAエピトープタグ、Mycエピトープ、FLAGエピトープ、AU1エピトープおよびAU5エピトープ、Glu-Gluエピトープ、KT3エピトープ、IRSエピトープ、Btagエピトープ、プロテインキナーゼCエピトープ、VSVエピトープ、様々な化合物（炭水化物、脂質およびタンパク質を含む）に対する結合を媒介するレクチン（例えば、ConA（タチナタマメ [Canavalia ensiformis]）またはWGA（コムギ胚芽凝集素））、ならびにテトラネクチンまたはプロテインAもしくはプロテインG（抗体親和性）がある。そのような結合実体の組合せもまた含まれる。非限定的な例は、ストレプトアビジン-ビオチンおよびjun-fosである。特に、MHC分子にタグが付けられるとき、結合実体は「抗タグ」にすることができる。「抗タグ」により、タグに結合する抗体およびそのようなタグに結合することができる任意の他の分子が意味される。

20

30

【0114】

結合実体の数および密度および性質はそれぞれのキャリア分子について変化させることができる。結合実体はリンカーによってキャリア分子に結合され得ることを理解しなければならない。好適なリンカーには、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、6xHIS、プロテインA、プロテインG、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、Streptタグ、セルロース結合ドメイン、マルトース結合タンパク質、S-ペプチドタグ、キチン結合タグ、免疫反応性エピトープ、エピトープタグ、GSTタグ化タンパク質、E2Tag、HAエピトープタグ、Mycエピトープ、FLAGエピトープ、AU1エピトープおよびAU5エピトープ、Glu-Gluエピトープ、KT3エピトープ、IRSエピトープ、Btagエピトープ、プロテインキナーゼCエピトープ、VSVエピトープが含まれる。

40

【0115】

1つ以上のMHC分子は、好適には、タグによって結合実体に結合させることができる。タグの例が、好適な結合実体の定義のもと、上記に示される。従って、組換え的にタグが付けられているか、または化学的にタグが付けられているMHC分子は、親和性が大きいために、結合実体に特異的に結合する。MHC分子の組換えタグはさらに、構築物における位置特異的な結合部位を可能にする。

【0116】

50

タグは、MHC分子の任意の部分に存在させることができる。しかし、現時点では、タグは、好ましくは、MHC分子の細胞結合部から離れて存在させることが望ましいと考えられる。

【0117】

例として、タグが付けられたMHC分子は、MHCクラスI重鎖分子と、酵素的なモノビオチン化のためのC末端の標的ペプチド配列とからなる組換えMHC融合分子であり得る。アフィニティータグがC末端に存在することにより、MHC分子のN末端の細胞結合部の最適な暴露が可能になる。現時点では、ビオチン化のための標的配列もまた β_2m 分子に存在させることができると考えられる。化学的にビオチン化されたMHCタンパク質は、ストレプトアビジン結合実体に結合する。ビオチン化されたMHC分子は、大きい親和性でストレプトアビジンに結合する。MHC分子対ストレプトアビジンの比は、ストレプトアビジン複合体における4つのビオチン結合部位のために、理論的には4:1である。

10

【0118】

多くの適用において、MHC分子構築物が1つ以上の生物学的に活性な分子をさらに含むことは好都合である。用語「生物学的に活性な」により、化合物が、MHC分子構築物の結合特性または作用に影響を及ぼし得ることが意味される。「1つ以上」、「複数」、「a」、「an」および「the」のこれらの用語に関して、上記の定義が参照される。従って、MHC分子構築物は、同じまたは異なっているいてもよい数個の生物学的に活性な分子を含むことができる。

【0119】

そのような生物学的に活性な分子は、特に、タンパク質、共刺激分子、細胞調節分子、レセプター、アクセサリー分子、接着分子、天然リガンド、および毒性分子、ならびに、前記のいずれかに対する抗体および組換え結合分子、そしてそれらの組合せからなる群から選択することができる。

20

【0120】

「組換え結合性分子」は、組換え技術によって調製されるペプチドフラグメントなどの分子で、天然分子の活性（例えば、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーション）を模倣するか、または天然分子の活性を阻害もしくは阻止する能力を有する分子を意味することが意図される。

【0121】

生物学的に活性な分子は、好適には、直接的に、または1つ以上の結合実体を介して、そのいずれかでキャリア分子に結合させることができる。

30

【0122】

特に、生物学的に活性な分子は下記から選択することができる：

【0123】

タンパク質、例えば、MIC A、MIC B、CD1d、HLA E、HLA F、HLA G、HLA H、ULBP-1、ULBP-2およびULBP-3のようなMHCクラスI様タンパク質など、

共刺激分子、例えば、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD27、CD28、CD30、CD69、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD147、CDw150 (SLAM)、CD152 (CTLA-4)、CD153 (CD30L)、CD40L (CD154)、NKG2D、ICOS、HVEM、HLAクラスII、PD-1、Fas (CD95)、T細胞および/またはNK細胞において発現するFasL、CD40、CD48、CD58、CD70、CD72、B7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、B7RP-1、B7-H3、PD-L1、PD-L2、CD134L、CD137L、ICOSL、APC細胞および/または腫瘍細胞において発現するLIGHTなど、

40

細胞調節分子、例えば、CD16、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80、2B4、KIR、LIR、CD94/NKG2A、NK細胞において発現するCD94/NKG2C、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、CSF (コロニー刺激因子)、ビタミンD3、IL-2トキシシン、シクロスポリン、FK-506、ラパマイシン、TGF- β 、クロトリマゾール、ニトレンジピンおよびカリブドトキシシンなど、

アクセサリー分子、例えば、LFA-1、CD11a/18、CD54 (ICAM-1)、CD106 (VCAM)、およびCD49a、b、c、d、e、f/CD29 (VLA-4) など、

50

接着分子、例えば、ICAM-1、ICAM-2、GlyCAM-1、CD34、抗LFA-1、抗CD44、抗 β 7、ケモカイン、CXCR4、CCR5、抗セレクトリンL、抗セレクトリンEおよび抗セレクトリンPなど、

トキシン、酵素、抗体、放射性同位体、化学発光物質、生物発光物質、ポリマー、金属粒子およびハプテンから選択される毒性分子、例えば、シクロホスファミド、メトトレキサート、アザチオプリン、ミゾリビン、15-デオクソスベルグアリン、ネオマイシン、スタウロスポリン、ゲネステイン、ヘルビマイシンA、シュードモナスのエンドトキシンA、サポリン、リツキサシ、リシン、ゲムツズマブ・オゾガミシン、志賀トキシン、無機水銀剤および有機水銀剤のような重金属、ならびにFN18-CRM9、放射性同位体（ヨウ化物、コバルト、セレン、トリチウムおよびリンの取り込まれた同位体など）、ならびにDNPなどのハプテン、ならびにジゴキシゲニンなど、

10

そして、前記のいずれかの組合せ、ならびに、関連する場合には、前記に対する抗体（モノクローナル、ポリクローナルおよび組換え）。抗体誘導体またはそのフラグメントもまた使用することができる。

【0124】

MHC分子構築物のMHC認識細胞に対する結合の容易な検出を可能にするために、構築物は標識することができる。従って、別の局面において、本発明は、1つ以上の標識化合物をさらに含む、上記に定義されるようなMHC分子構築物に関する。「1つ以上」、「複数」、「a」、「an」および「the」の上記に示されるこれらの用語の定義はの場合にも適用される。複数の標識化合物は、どこでも、同じまたは異なっているもよい2つ以上の標識化合物として理解しなければならない。

20

【0125】

特に、

1つ以上の標識化合物がキャリア分子に結合され得、あるいは

1つ以上の標識化合物が1つ以上の結合実体に結合され得、あるいは

1つ以上の標識化合物が1つ以上のMHC分子に結合され得、あるいは

1つ以上の標識化合物がキャリア分子および／または1つ以上の結合実体および／または1つ以上のMHC分子に結合され得、あるいは

1つ以上の標識化合物がMHC分子によって包囲されるペプチドに結合され得る。

【0126】

いくつかの適用においては、異なるMHC分子構築物を、組合せとしてまたは個々の段階においてのいずれかで適用することが利点であり得る。かかる異なるMHC分子構築物は、異なるように（すなわち、異なる標識化合物を用いて標識することによって）標識され得、異なる標識MHC認識細胞の可視化を可能にする。従って、異なる標識化合物を有する数個の異なるMHC分子構築物が存在する場合、MHC分子構築物のそれぞれが異なるペプチドを提示する場合、1つより多くの特異的なレセプターを同定することが同時に可能である。

30

【0127】

標識化合物は、好ましくは、直接的または間接的に検出可能であるような化合物である。

【0128】

標識化合物は、直接的または間接的な検出に適切な任意の標識化合物であり得る。用語「直接的」により、標識化合物が、二次化合物を必要とするなく、それ自体で検出され得ること、すなわち、標識化合物が「一次」標識化合物であることが意味される。用語「間接的」により、標識化合物が、1つ以上の「二次」化合物を使用することによって検出され得ること、すなわち、検出が、一次化合物への二次化合物の結合を検出することによって行われることが意味される。

40

【0129】

標識化合物はさらに、適切なリンカーを介して結合され得る。標識化合物への結合に適切なリンカーは当業者により容易に知される。

【0130】

かかる適切な標識化合物の例は、蛍光標識、酵素標識、放射性同位体、化学発光標識、

50

生物発光標識、ポリマー、金属粒子、ハプテン、抗体および色素である。

【0131】

標識化合物は、下記から好適に選択され得る：

【0132】

蛍光標識、例えば、5-（および6）-カルボキシ-フルオレセイン、5-または6-カルボキシフルオレセイン、6-（フルオレセイン）-5-（および6）-カルボキサミドヘキサン酸、フルオレセインイソチオシアナート（FITC）、ローダミン、テトラメチルローダミン、ならびに色素、例えば、Cy2、Cy3およびCy5）、任意に置換されたクマリン（AMCAを含む）、PerCP、フィコビリプロテイン（R-フィコエリトリン（RPE）およびアロフィコエリトリン（APC）を含む）、テキサスレッド、プリンセストンレッド、緑色蛍光タンパク質（GFP）およびそのアナログ、ならびにR-フィコエリトリンまたはアロフィコエリトリンと、例えば、Cy5またはテキサスレッドとの結合体、ならびに半導体ナノ結晶（量子ドットナノ結晶およびQdotTMナノ結晶など）に基づく無機蛍光標識、ならびにEu³⁺およびSm³⁺のようなランタニドに基づく時間分解蛍光標識から、

10

【0133】

DNP、ビオチンおよびジゴキシギニンなどのハプテンから、

【0134】

西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、β-ガラクトシダーゼ（GAL）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、β-N-アセチルグルコサミニダーゼ、β-グルクロニダーゼ、インベルターゼ、キサンチンオキシダーゼ、ホタルルシフェラーゼおよびグルコースオキシダーゼ（GO）のような酵素標識から、

20

【0135】

ルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル、1, 2-ジオキセタン類およびピリドピリダジン類のような発光性標識から、ならびに

【0136】

ヨウ化物、コバルト、セレン、トリチウムおよびリンの取り込まれた同位体のような放射性標識から。

【0137】

放射性標識は、特に、MHC分子によって包囲されるペプチドを標識することに関連して注目され得る。

30

【0138】

上記に定義されるように、本発明のMHC分子構築物はキャリア分子を含む。キャリア分子は可溶性のキャリア分子または不溶性のキャリア分子であり得る。キャリア分子は、MHC分子、結合実体、および／または生物学的に活性な化合物の結合を可能にし、同時に構築物の有利な性質を提供する任意のかかる分子であり得る。適切なキャリア分子の例を下記である：

【0139】

多糖類（デキストラン、カルボキシメチルデキストラン、デキストランポリアルデヒド、カルボキシメチルデキストランラクトン、およびシクロデキストリンが挙げられる）、

【0140】

プルラン、シゾフィラン、スクレログルカン、キサンタン、ゲラン、0-エチルアミノグララン、キチンおよびキトサン（6-0-カルボキシメチルキチンおよびN-カルボキシメチルキトサンが挙げられる）、

40

【0141】

誘導体化セルロース化合物（カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、6-アミノ-6-デオキシセルロースおよび0-エチルアミンセルロースが挙げられる）、

【0142】

ヒドロキシル化デンプン、ヒドロキシプロピルデンプン、ヒドロキシエチルデンプン、カラゲナン、アルギン酸塩、およびアガロース、

50

【0143】

合成多糖類（フィコールおよびカルボキシメチル化フィコールが挙げられる）、

【0144】

ビニルポリマー（ポリ（アクリル酸）、ポリ（アクリルアミド）、ポリ（アクリル酸エステル）、ポリ（メタクリル酸2-ヒドロキシエチル）、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（マレイン酸）、ポリ（無水マレイン酸）、ポリ（アクリルアミド）、ポリ（エチル-co-酢酸ビニル）、ポリ（メタクリル酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルアルコール-co-クロロ酢酸ビニル）、アミノ化ポリ（ビニルアルコール）、およびそれらのコブロックポリマーが挙げられる）、

【0145】

ポリマー骨格（鎖状、櫛型またはStarBurstTMデンドリマーが挙げられる）を含むポリエチレングリコール（PEG）またはポリプロピレングリコールまたはポリ（エチレンオキシド-co-プロピレンオキシド）、

【0146】

ポリアミノ酸（ポリリシン、ポリグルタミン酸が挙げられる）、ポリウレタン、ポリ（エチレンイミン）、プルリオール、

【0147】

タンパク質（アルブミン、免疫グロブリン、およびウイルス様タンパク質（VLP）が挙げられる）、ならびに

【0148】

ポリヌクレオチド、DNA、PNA、LNA、オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドデンドリマー構築物。

【0149】

キャリア分子のこの定義としては、混合された形態、すなわち、上記例の1つ以上から構成されるキャリア分子もまた含まれる。

【0150】

キャリア分子の選択は、一般的に、MHC分子構築物の適用に依存する。当然のことではあるが、長さおよび分枝度を含むいくつかのパラメーターは、キャリア分子の上記に示された例において変化し得る。さらに、キャリア分子は、さらなる誘導体化を可能にする様々な置換基（保護および／または活性化され得る置換基を含む）を有し得る。

【0151】

本発明のMHC分子構築物は、1つ以上のさらなる置換基をさらに含み得ることが理解されなければならない。用語「1つ以上」、「複数」、「a」、「an」および「the」の定義は、この場合にも適用する。かかる生物学的に活性な分子は、例えば、結合特性、影響、MHC分子特異性、溶解性、安定性または検出可能性に関して、構築物の特性に影響を及ぼすために構築物に結合され得る。例えば、MHC分子間の間隔が提供され得るか、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）のドナー／アクセプター対の一方または両方の発色団が挿入され得るか、官能基が結合され得るか、あるいは生物学的活性を有する基が結合させ得る。

【0152】

本発明のMHC分子構築物は、好ましくは、可溶性の形態で提供される。「可溶性の形態」により、構築物が適切な溶媒（「可溶化媒体」）に可溶であることが意味される。しかし、MHC分子構築物はまた、適切な溶媒において不溶性の形態で、例えば、分散可能な形態でも提供され得る。「分散可能な」により、MHC分子構築物が溶媒に可溶化されず、分散されることが意味される。

【0153】

適切な溶媒の例は、水、および様々な緩衝液（例えば、酢酸塩、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、CAPS、CHES、イミダゾール、PIPES、TAPS、TES、トリエタノールアミン、MOPS、MES、HEPES、PBS、炭酸塩、TRIS、ホウ酸塩を含有する緩衝液ならびにそれらの混合物）である。

【0154】

他の適切な溶媒としては、エチレングリコール、プロピレングリコール、NMP、DMSOまたはDMFを含有する水性混合物が挙げられる。

【0155】

MHC分子構築物を可溶化媒体において提供することにより、取扱いおよび貯蔵が容易になる。さらに、MHC分子構築物を可溶化媒体において提供することにより、構築物が多く適用のために「直ちに使用され得る」形式で調製され得るので、MHC分子構築物の適用が容易になる。また、治療において適用されたとき、MHC分子構築物が体液に容易に可溶であること、またはMHC分子構築物が投与に先立って既に可溶化されていることは利点であり得る。

【0156】

多数の適用において、MHC分子構築物を固体または半固体の支持体に固定化することは好都合であり得る。かかる支持体は、固定化、分離などに適している任意の支持体であり得る。非限定的な例としては、粒子、ビーズ、生分解性粒子、シート、ゲル、フィルター、膜（例えば、ナイロン膜）、ファイバー、細孔、針、マイクロタイターストリップ、チューブ、プレートまたはウェル、コーム、ピペットチップ、マイクロアレイ、チップ、スライドガラス、または実際には任意の固体表面材料が挙げられる。固体または半固体の支持体は、所望される場合には標識され得る。支持体はまた、散乱性質またはサイズを有し得、これにより、同じ性質の支持体、例えば、異なるサイズまたは散乱性質、色もしくは強度の粒子の中で識別が可能になる。

【0157】

好都合には、支持体は、ガラス、シリカ、ラテックス、プラスチックまたは任意のポリマー材料から製造され得る。支持体はまた、生分解性材料からも製造され得る。

【0158】

一般的に言えば、支持体の性質は重要ではなく、様々な材料が使用され得る。支持体の表面は疎水性または親水性であり得る。MHC分子構築物の結合のために大きい表面積を示す材料が好ましい。かかる支持体は、例えば、多孔性または粒子状であり、例えば、粒子、ビーズ、ファイバー、ウェブ、焼結体またはシーブであり得る。粒子およびビーズのような粒子状材料が、そのより大きい結合能力のために一般的に好ましい。特に、ポリマーのビーズおよび粒子は注目され得る。

【0159】

好都合には、粒子状支持体（例えば、ビーズまたは粒子）は実質的には球状であり得る。粒子状支持体のサイズは重要ではないが、そのサイズは、例えば、少なくとも1 μm 、好ましくは、少なくとも2 μm の直径を有し、そして好ましくは10 μm 以下、より好ましくは6 μm 以下の最大直径を有する。例えば、2.8 μm および4.5 μm の直径を有する粒子状支持体が良く機能する。

【0160】

粒子状支持体の例は、単分散粒子、すなわち、サイズが実質的に均一であるような粒子（例えば、直径標準偏差が5%未満であるサイズ）である。かかる粒子は、反応の非常に一様な再現性をもたらすという利点を有する。米国特許第4,336,173号（参考文献25）に記載される技術によって製造される単分散粒子（例えば、ポリマー材料から作製された単分散粒子）が特に好適である。

【0161】

非磁性ポリマービーズもまた適用可能であり得る。かかる非磁性ポリマービーズは、広範な製造者（例えば、Dynal Particles AS、Qiagen、Amersham Biosciences、Serotec、Seradyne、Merck、日本ペイント、Chemagen、Promega、Prolabo、Polysciences、Agowa、およびBangs Laboratories）から入手され得る。

【0162】

好適な支持体の別の例は、磁性ビーズまたは磁性粒子である。本明細書中を通して使用される用語「磁性」は、支持体が、磁場内に置かれる場合、支持体に分与される磁性モーメントを有され得ることを意味することが意図される。従って、支持体は、かかる磁場の

10

20

30

40

50

作用のもとで除かれ得る。すなわち、磁性ビーズまたは磁性粒子を含む支持体は、磁性凝集によって容易に除去され得、これにより、ビーズまたは粒子を溶液から分離する迅速な簡便かつ効率的な方法がもたらされる。磁性ビーズおよび磁性粒子は、好適には、常磁性または超常磁性であり得る。超常磁性のビーズおよび粒子は、例えば、欧州特許0106873 (Sintef、参考文献26) に記載される。磁性ビーズおよび磁性粒子は、いくつかの製造者、例えば、DynaBiotech ASA (Oslo、ノルウェー；以前のDynaL AS) から入手され得る (例えば、Dynabeads (登録商標))。

【0163】

支持体は、好適には、官能基化された表面を有し得る。種々のタイプの官能基化としては、支持体の表面を正荷電または負荷電にするか、あるいは親水性または疎水性にすることが挙げられる。これは、特にビーズおよび粒子に適用する。従って、様々な方法が、例えば、米国特許第4,336,173号 (参考文献25)、米国特許第4,459,378号 (参考文献27) および米国特許第4,654,267号 (参考文献28) に記載される。

【0164】

本発明のMHC分子構築物は、支持体への結合 (または固定化) に関して当該分野で公知の任意の方法によって固体または半固体の支持体に結合 (固定化) され得る。特に、MHC分子構築物は、リンカー、スペーサーもしくは抗体またはそれらの任意の組合せによって支持体に固定化され得る。好適なリンカーの例としては、カルモジュリン結合タンパク質 (CBP)、6xHIS、プロテインA、プロテインG、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、Strepタグ、セルロース結合ドメイン、マルトース結合タンパク質、S-ペプチドタグ、キチン結合タグ、免疫反応性エピトープ、エピトープタグ、GSTタグ化タンパク質、E2Tag、HAエピトープタグ、Mycエピトープ、FLAGエピトープ、AU1エピトープおよびAU5エピトープ、Glu-Gluエピトープ、KT3エピトープ、IRSエピトープ、Btagエピトープ、プロテインキナーゼCエピトープ、VSVエピトープ、「ゼロ長架橋剤」 (1-エチル-3 (3-ジメチルアミノプロピル) -カルボジイミド塩酸塩 (EDAC) など)、ホモ二官能性架橋剤 (グルタルアルデヒド、ジスクシンイミジルスベリン酸塩 (DSS)、ジメチルアジピミデート二塩酸塩 (DMA)、ジビニルフルホン (DVS) またはビスマレイミドヘキササンなど)、およびヘテロ二官能性架橋剤 (4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキササン1-カルボキシルヒドラジド塩酸塩 (M2C2H)、スクシンイミジル-4- (N-マレイミドメチル) (SMCC)、N-スクシンイミジル-3- (2-ピリジルジチオ) プロピオン酸塩 (SPDP)、およびN- (γ-マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミド (GMBS) など) が挙げられる。好適なスペーサーの例としては、ジアミノアルカン、ジカルボキシルおよびジヒドロキシルなどの多官能性分子が挙げられる。スペーサーは、例えば、エーテル、アミドおよびアミンなどの官能性基をさらに含み得る。好適な抗体 (ポリクローナル、モノクローナル、組換え) の例としては、キャリア分子に対する抗体、および結合実体に対する抗体が挙げられる。MHC分子構築物は共有結合的または可逆的に結合され得ることが理解されなければならない。「可逆的」により、MHC分子構築物が支持体から遊離させ得るように、結合が逆方向になり得ることが意味される。可能な可逆的リンカーの例 (例えば、エラストマーペプチドを含む挿入されたアミノ酸配列を有する分子) が、国際特許出願公開W099/11661 (参考文献29) に記載される。

【0165】

例として、キャリア分子がデキストラン分子である場合、MHC分子構築物は、抗デキストラン抗体を使用して固定化され得る。例として、PNAはMHC分子構築物に結合され得、そして抗PNA抗体が固定化のために使用され得る。

【0166】

数タイプの支持体または1タイプのみの支持体が同時に適用され得ることが理解されなければならない。同様に、支持体は、1つ以上のMHC分子構築物をそれに固定化し得る。「1つ以上」、「複数」、「a」、「an」および「the」のこれらの定義に関しては上記を参照のこと。支持体に固定化されたMHC分子構築物は、同じまたは異なっているもよい。例えば、1つのタイプのMHC分子構築物は1つのタイプの支持体に固定化され得、そして

別のタイプのMHC分子構築物は別のタイプの支持体に固定化され得る。原理的には、異なるMHC分子構築物の数は無制限である。

【0167】

本発明のMHC分子構築物が好適に可溶化形態で提供され得る用途としては、放射免疫アッセイ（RIA）、細胞結合放射能リガンドアッセイ、フローサイトメトリーおよびELISAが挙げられる。かかるアッセイは、そのようなアッセイが行われる手順が公知であるので、当業者には周知である。

【0168】

本発明のMHC分子構築物が好適に固体または半固体の支持体に固定化されて提供され得る用途としては、フローサイトメトリー、免疫磁性分離技術、培養細胞のエキスビボ刺激、凝集技術、側方流動デバイス、ELISA、RIAおよび細胞結合放射能リガンドアッセイが挙げられる。

10

【0169】

従って、本発明は、特に、フローサイトメトリー法、組織化学的方法および細胞化学的方法における用途として上記で定義されたようなMHC分子構築物に関する。従って、本発明のMHC分子構築物は検出システムとして適している。

【0170】

本発明のMHC分子構築物を使用する方法

本発明のMHC分子構築物は、広範囲のインビトロ方法またはエキスビボ方法における有力なツールである。

20

【0171】

従って、本発明は、下記の工程を含む、サンプルにおけるMHC認識細胞の存在を検出するための方法に関する：

【0172】

(a) MHC認識細胞を含むことが疑われるサンプルを提供する工程、
(b) サンプルを上記に規定されるようなMHC分子構築物と接触させる工程、および
(c) MHC分子構築物の何らかの結合を測定する工程で、そのような結合により、MHC認識細胞の存在が示される工程。

【0173】

かかる方法は、様々な疾患を診断することにおいて有力なツールである。診断を確立することはいくつかの点で重要である。診断により、疾患に関する情報が得られ、従って、患者には、好適な処置養生法が提供され得る。また、より特異的な診断を確立することにより、特定の処置が有益である疾患のサブタイプに関する重要な情報を得られ得る（すなわち、疾患の様々なサブタイプは、MHC認識細胞によって認識される異なるペプチドの提示を伴い、従って、処置は特定のサブタイプに対して効果的に標的化され得る）。このようにして、疾患または症状の進行によって現れる異常な細胞の情報を得ること、あるいはT細胞の特異性が影響を受けるかどうか、およびどのように影響を受けるかを調べることもまた可能であり得る。MHC分子構築物の結合はこれらの選択肢を可能にする。これは、その結合により、サンプルにおけるMHC認識細胞の存在、それに従って、ペプチドを提示するMHC分子の存在が示されるからである。

30

40

【0174】

本発明はまた、下記の工程を含む、MHC認識細胞をモニターするための方法に関する；

【0175】

(a) MHC認識細胞を含むことが疑われるサンプルを提供する工程、
(b) サンプルを上記に規定されるようなMHC分子構築物と接触させる工程、および
(c) MHC分子構築物の何らかの結合を測定し、それによりMHC認識細胞をモニターする工程。

【0176】

かかる方法は、例えば、処置の効果を綿密に追跡するために、疾患の進行をモニターすることにおいて有力なツールである。この方法は、一般に、疾患をより良好な方法で管理

50

または制御するために、患者が最適な処置養生法を受けることを保証するために、処置を調節するために、寛解または再発を確認するために、そして疾患を治癒または緩和しない医薬品で患者が処置されないことを保証するために、使用され得る。このようにして、疾患または症状の進行によって現れる異常な細胞をモニターすること、あるいはT細胞の特異性が処置期間中に影響を受けるかどうか、およびどのように影響を受けるかを調べることもまた可能であり得る。MHC分子構築物の結合はこれらの選択肢を可能にする。これは、その結合により、サンプルにおけるMHC認識細胞の存在、それに従って、ペプチドを提示するMHC分子の存在が示されるからである。

【0177】

本発明はまた、下記の工程を含む、MHC認識細胞に関与する疾患の予後を確立するための方法に関する：

10

【0178】

(a) MHC認識細胞を含むことが疑われるサンプルを提供する工程、
(b) サンプルを上記に規定されるようなMHC分子構築物と接触させる工程、および
(c) MHC分子構築物の何らかの結合を測定し、それによりMHC認識細胞に関与する疾患の予後を確立する工程。

【0179】

かかる方法は、疾患を管理するために、一般に、効果のない処置が患者に施されることがないことを保証するために、疾患が最適な方法で処置されることを保証するために、そして生存または治癒の可能性を予測するために、有益なツールである。このようにして、疾患または症状の進行によって現れる異常な細胞に関する情報を得ること、あるいはT細胞の特異性が影響を受けるかどうか、およびどのように影響を受けるかを調べ、それにより予後を確立され得ることもまた可能であり得る。MHC分子構築物の結合はこれらの選択肢を可能にする。これは、その結合により、サンプルにおけるMHC認識細胞の存在、それに従って、ペプチドを提示するMHC分子の存在が示されるからである。

20

【0180】

本発明はまた、下記の工程を含む、MHC認識細胞に関与する疾患の状態を測定するために方法に関する：

【0181】

(a) MHC認識細胞を含むことが疑われるサンプルを提供する工程、
(b) サンプルを上記に規定されるようなMHC分子構築物と接触させる工程、および
(c) MHC分子構築物の何らかの結合を測定し、それによりMHC認識細胞に関与する疾患の状態を測定する工程。

30

【0182】

かかる方法は、様々な疾患を管理および制御することにおいて有益なツールである。疾患は、例えば、ある段階から別の段階に変化することがあり、従って、疾患の状態を測定し得ることは重要である。このようにして、疾患または症状の進行によって現れる異常な細胞に関する情報を得ること、あるいはT細胞の特異性が影響を受けるかどうか、およびどのように影響を受けるかを調べ、それにより疾患または症状の状態を測定することもまた可能であり得る。MHC分子構築物の結合はこれらの選択肢を可能にする。これは、その結合により、サンプルにおけるMHC認識細胞の存在、それに従って、ペプチドを提示するMHC分子の存在が示されるからである。

40

【0183】

本発明はまた、下記の工程を含む、MHC認識細胞に関与する疾患を診断するための方法に関する：

【0184】

(a) MHC認識細胞を含むことが疑われるサンプルを提供する工程、
(b) サンプルを上記に規定されるようなMHC分子構築物と接触させる工程、および
(c) MHC分子構築物の何らかの結合を測定し、それによりMHC認識細胞に関与する疾患を診断する工程。

50

【0185】

かかる診断方法は、様々な疾患の診断において有力なツールである。診断を確立することはいくつかの点で重要である。診断により、疾患に関する情報が得られ、従って、患者には、好適な処置養生法が提供され得る。また、より特異的な診断を確立することにより、特定の処置が有益である疾患のサブタイプに関する重要な情報を得られ得る（すなわち、疾患の様々なサブタイプは、MHC認識細胞によって認識される異なるペプチドの提示を伴うことがあり、従って、処置が特定のサブタイプに対して効果的に標的化され得る）。疾患または症状の進行によって現れる異常な細胞について、ならびにT細胞の特異性が影響を受けるかどうか、およびどのように影響を受けるかについての有益な情報がまた、得られ得る。MHC分子構築物の結合はこれらの選択肢を可能にする。これは、その結合により、サンプルにおけるMHC認識細胞の存在、それに従って、ペプチドを提示するMHC分子の存在が示されるからである。

10

【0186】

本発明はまた、下記の工程を含む、細胞形態をサンプル中のMHC認識細胞の存在と関連させる方法に関する：

【0187】

(a) MHC認識細胞を含むことが疑われるサンプルを提供する工程、
(b) サンプルを上記に規定されるようなMHC分子構築物と接触させる工程、および
(c) MHC分子構築物の何らかの結合を測定し、それによりMHC分子構築物の結合を細胞の形態と関連させる工程。

20

【0188】

かかる方法は、MHC分子構築物の結合パターンおよび分布が直接観測され得るので、組織化学的方法の分野において適用される場合に特に有益である。かかる方法において、サンプルは、サンプルの個々の細胞の形態が保存されるように処理される。影響を受ける部位が直接観測され得るので、得られた情報は一般に診断手法において重要である。

【0189】

本発明はまた、下記の工程を含む、MHC認識細胞に関与する疾患に対する医薬品の有効性を測定するための方法に関する：

【0190】

(a) 医薬品による処置を受けている被験体由来のサンプルを提供する工程、
(b) サンプルを本明細書中に規定されるようなMHC分子構築物と接触させる工程、および
(c) MHC分子構築物の何らかの結合を測定し、それにより医薬品の有効性を明らかにする工程。

30

【0191】

かかる方法はいくつかの点で有益なツールである。この方法は、処置により、疾患が効果的に治療しているかどうかを測定するために使用され得る。この方法はまた、疾患または症状の進行によって現れる異常な細胞について、ならびにT細胞の特異性が影響を受けるかどうか、およびどのように影響を受けるかについての情報を提供し、それにより、問題としている医薬品の有効性の情報を提供し得る。MHC分子構築物の結合はこれらの選択肢を可能にする。これは、その結合により、サンプルにおけるMHC認識細胞の存在、それに従って、ペプチドを提示するMHC分子の存在が示されるからである。

40

【0192】

本発明はまた、下記の工程を含む、MHC認識細胞集団を操作するための方法に関する：

【0193】

(a) MHC認識細胞を含むサンプルを提供する工程、
(b) サンプルを、上記に規定されるような固体の支持体に固定化されたMHC分子構築物と接触させる工程、
(c) 関連するMHC認識細胞を単離する工程、および
(d) さらなる操作を用いて、または用いることなく、かかる細胞を臨床的に関連する

50

数にまで拡大する工程。

【0194】

かかるエキスピボ方法は、被験体に再導入される場合、標的細胞の殺傷を可能にし、そして様々なタイプの癌および感染性疾患に対する免疫療法適用における使用のために大きな潜在性を有する抗原特異的な長寿命のヒトエフェクターT細胞集団を得るための有力なツールである。

【0195】

上記の方法において、用語「MHC分子構築物」は、1つ以上のMHC分子構築物を含むことが意図される。「複数」、「a」、「an」および「the」の定義が参照され、そしてその意図された意味が上記に示される。

10

【0196】

本明細書中を通して使用される場合、用語「MHC認識細胞」は、MHC分子を認識して、これに結合され得るような細胞を意味することが意図される。「MHC分子」の意図された意味は上記に示される。かかるMHC認識細胞はまた、MHC認識細胞クローン、標的細胞、標的MHC認識細胞、標的MHC分子認識細胞、MHC分子レセプター、MHCレセプター、MHCペプチド特異的レセプター、またはペプチド特異的細胞とも呼ばれ得る。用語「MHC認識細胞」は、MHC分子を認識して、これに結合する、正常な細胞、異常な細胞および欠陥細胞のすべてのサブセットを含むことが意図される。実際、MHC分子に結合するのはMHC認識細胞上のレセプターである。

【0197】

20

上記に記載されるように、疾患および様々な症状において、ペプチドが、免疫系により認識されるMHC分子によって提示され、そしてかかるMHC分子を標的化する細胞（MHC認識細胞）が産生される。従って、かかるMHCタンパク質認識細胞が存在することは、MHCタンパク質認識細胞によって認識されるペプチドを提示するMHC分子が存在することを直接的に示している。提示されたペプチドは、様々な疾患および症状において示され、そして様々な疾患および症状に関与し得る。

【0198】

例えば、かかるMHC認識細胞は、炎症起源、自己免疫起源、アレルギー起源、ウイルス起源、癌起源、感染性起源、同種または異種（移植片対宿主および宿主対移植片）起源の疾患に関与し得る。

30

【0199】

特に、MHC認識細胞は、クローン病または潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患、硬化症、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、喘息、悪性黒色腫、腎臓癌、乳癌、肺癌、子宮癌、頸部癌、前立腺癌、脳癌、頭部および頸部の癌、白血病、皮膚型リンパ腫、肝臓癌、結腸直腸癌、膀胱癌、拒絶反応関連疾患、移植片対宿主関連疾患、あるいは肝炎、AIDS、麻疹、痘、水瘡、風疹またはヘルペスに関連するウイルス疾患に関与し得る。

【0200】

1つの態様において、MHC認識細胞は、CD3+T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、 $\alpha\beta$ T細胞、CD4+T細胞、Tヘルパー細胞、CD8+T細胞、サプレッサーT細胞、CD8+細胞傷害性T細胞、CTL

40

、NK細胞、NK T細胞、LAK細胞およびMAKの亜集団から選択される。

【0201】

上記に記載される方法において、サンプルは、好ましくは、組織学的材料、細胞学材料、原発性腫瘍、二次的器官転移物、微小針吸引物、脾臓組織、骨髓検体、細胞塗抹物、剥離細胞診検体、痕跡調製物、口内スワブ物、咽頭スワブ物、膣スワブ物、気管支洗浄物、胃洗浄物、臍帯、そして血液などの体液（例えば、血液から単離された末梢血単核細胞（PBMC）集団、または白血球フェレーシス産物などの他の血液由来調製物）、痰サンプル、喀出物、そして気管支吸引物から選択される。かかるサンプルは、そのまま使用され得るか、あるいは様々な精製、除染、濾過もしくは濃縮方法に、および／または免疫磁性分離のような、サンプルの一部分を単離するための方法に供され得る。サンプルまたはその一

50

部分（サンプル成分）はさらに、形態学を保持するように、またはサンプルの細胞を捕らえるように処理され得る。サンプル処理に関するかかる方法は当業者にとって周知である。本明細書中を通して使用される用語「サンプルの細胞」は、様々な処理が施されているか否かによらず、サンプルそのものまたはその単離された一部分を意味することが意図される。

【0202】

本発明の方法において用いられるMHC分子構築物は、上述のように、結合の観察が容易になるように、直接的または間接的に標識され得る。従って、MHC分子構築物は、好適には、顕微鏡検査、光、蛍光、電子透過、またはフローサイトメトリーによって観察され得るように標識され得る。

10

【0203】

1つのMHC分子構築物および数個（複数）のMHC分子構築物（すなわち、1つ以上）が、所望の情報に依存して、本発明の方法において用いられ得ることが理解されるべきである。MHC分子構築物、ならびにMHC分子、ペプチド、任意の生物学的に活性な化合物、および任意の標識化合物の実際の組み合わせの総数は、原理的には無制限である。

【0204】

上記に記載される本発明の方法は、好適には、分析されるサンプルが支持体にマウントされるような方法であり得る。支持体は、好適には、固体または半固体の表面であり得る。好適な固体または半固体の表面は当該分野では周知であり、ガラススライドガラス、ビーズ、粒子、膜、フィルター、フィルター膜、ポリマースライドガラス、ポリマー膜、チャンバースライドガラス、裏材、台座、皿およびペトリ皿が挙げられる。

20

【0205】

下記には、本発明の方法を実施するための具体的な手順が簡単に考察される。

【0206】

細胞学的方法および組織学的方法

本明細書中に記載される方法は、細胞学的方法および組織学的方法（サンプルマウント方法）として実施され得る。

【0207】

用語「マウントされる（mounted）」により、実質的に平面の支持体に配置されるか、または付着されることが意味される。組織または細胞のサンプルを、例えば、顕微鏡スライドガラス上で観察するために、支持体上に配置することも包含される。サンプルは、支持体を取り扱っている際の落下または滑落をさらに防ぐために、付着され得る。支持体に付着させる方法としては、物理的、毛管引力、接着および化学的結合によることが挙げられる。サンプルは固定されてもよく、または固定されなくてもよい。

30

【0208】

上記の、サンプルは精製または濃縮され得、あるいは細胞は分析前に単離され得る。サンプルはまた、パラフィンに包埋され、分析前に切片にされ得る。かかる手順は当業者には周知である。

【0209】

具体的には、支持体は、ガラススライドガラス、メンブレン、フィルター、ポリマースライドガラス、チャンバースライドガラス、皿またはペトリ皿であり得る。

40

【0210】

サンプルまたはその一部分は、好適には、分析に先立ち、支持体上において直接、増殖または培養され得る。好適な培養培地の例としては、血清もしくは組織抽出物などの生物学起源の培養培地；化学的に規定された合成培地；またはそれらの混合物が挙げられる。細胞培養物は、通常、フラスコ内またはチャンバースライドガラス上において、例えば、ガラス表面またはプラスチック表面における細胞の単層として、あるいは液体培地または半固体培地における懸濁液として、そのいずれかで増殖させられる。細胞は、より好適な支持体（例えば、ガラススライドガラス）に移され、マウントされ得る。例えば、顕微鏡で観察するために好適なチャンバースライドガラスにおいて増殖させた場合、細胞は、潜

50

在的には支持体上に残ったままであり得る。

【0211】

しかし、細胞は、分析前に増殖または培養する必要はない。多くの場合、サンプルは、培養することなく直接分析される。直接的な分析が行われるサンプルは、上記に記載される加工処理手順が施され得ることが理解されるべきである。

【0212】

従って、サンプルは、主として2つの主要なタイプの方法（インサイチュ方法（インサイチュ分析）およびインビトロ方法（インビトロ分析））で、直接的に、または1つ以上の加工処理工程が施された後、そのいずれかで分析され得る。

【0213】

これに関連して、インサイチュ方法（インサイチュ分析）は、サンプル細胞の形態学が本質的に保持されているアッセイとして理解しなければならない。「本質的に保持される」により、全体的な形態学が保持され、これにより組織または細胞の構造的組成の一部またはすべてを同定することを可能にすることが意味される。例としては、塗抹物、生検、痕跡調製物、および支持体上へのサンプル展開物の分析である。サンプルは、一般的に、分析前に固定または透過処理または他の加工処理工程に供される得る。

【0214】

インビトロ方法は、全体的な形態が保持されていない方法として理解しなければならない。インビトロ方法の場合、サンプルは、細胞構造の形態学を破壊する処理に供される。かかる処理は当業者に公知であり、有機溶媒を用いた処理、高濃度のグアニジンチオシアナートなどの強いカオトロピック試薬を用いた処理、酵素処理、界面活性剤処理、ビーズによる破碎、熱処理、超音波処理および／またはフレンチプレスの適用が挙げられる。

【0215】

組織学的材料および細胞学的材料としては、生検および他の組織サンプルが挙げられる。一般に、細胞学は、細胞のすべての正常な構成要素および異常な構成要素の構造、ならびにそのような構成要素の変化、動きおよび変換の研究である。細胞学の研究分野としては、細胞発生学、細胞化学および顕微解剖学が挙げられる。細胞は、生存状態で直接研究されるか、あるいは殺傷（固定）され、明視野顕微鏡または電子顕微鏡で調べるために、例えば、包埋、切片化または染色によって調製される。

【0216】

1つの周知の細胞学的手法は、子宮頸部の癌を検出するために使用されるパパニコラウ試験の医学的手法である。かき取った検体、ブラシで集めた検体、または塗抹が膺または子宮頸部の表面から採取され、そしてスライドガラス上において調製され、顕微鏡検査および細胞学的分析のために染色される。細胞の外観が、その細胞が正常であるか、または癌の疑いがあるか、または癌であることを決定する。

【0217】

組織学は、一般的に、大部分の多細胞植物および多細胞動物に見出される組織と呼ばれる特殊化した細胞群の研究であると理解されている。

【0218】

組織学者は、器官全体から細胞の分子的構成要素に至るまでのすべてのレベルでの組織の組織化を研究する。動物組織は、例えば、上皮組織、結合組織、筋組織および神経組織として分類される。血液およびリンパは、一般的には脈管組織として別に分類されることがある。

【0219】

これらの組織タイプは、特徴的な器官を形成するために生物体内において種々の方法で一体化する。細胞が連結され、組織化される方法は、ときには組織の形態学と呼ばれ、細胞および組織の状態に関する有益な情報をもたらす。

【0220】

様々な技術が組織学的研究のために使用されており、組織培養、様々な固定剤および染色剤の使用、薄い切片を調製するためのミクロトームの使用、光学顕微鏡観察、電子顕微

10

20

30

40

50

鏡観察、およびX線回折が挙げられる。組織学の分野としてはまた、組織構造の化学的組成の研究である組織化学も挙げられる。

【0221】

組織学的調査としては、組織の死および再生、ならびに傷害または侵入生物に対する組織の反応の研究が挙げられる。正常な組織は特徴的な外観を有するので、組織学的検査は、多くの場合、病的組織を同定するために利用される。

【0222】

用語「形態学」は、個々の細胞および組織の両方に関して使用される。

【0223】

一般に、組織学的材料としては2つのカテゴリーがある。最も一般的なものは、固定されたパラフィン包埋の組織検体であり、多くの場合、アーカイブ（archive）材料である。これらの検体は、通常の場合にはホルマリン系の固定剤を使用して固定され、キシレンにより脱水され、パラフィンまたはプラスチック（例えば、Epon、Araldite、Lowicryl、LRWhiteまたはポリアクリルアミド）に包埋され、スライドガラス上で切片化され、脱パラフィンまたは別の処理がされ、再水和されて、染色される。

10

【0224】

第2のカテゴリーとしては、一般的にアルデヒド系の固定剤で固定されていない、新鮮な組織および／または細胞である調製物が挙げられる。かかる検体は、スライドガラスまたはカバーガラスに直接配置されるか、あるいは凍結され、スライドガラスで切片化されるかのいずれかである。かかる検体は、その後、通常の場合にはアルコール系またはアセトン系の固定剤を用いて固定され、そして染色される。これらの検体としては、外科的手法が行なわれている間に分析され得る生検材料（凍結切片）、細胞学的調製物（例えば、痕跡調製物および血液塗抹が挙げられる）、および組織化学的に分析される組織が一般的に挙げられる。

20

【0225】

染色された検体を観察する方法としては、明視野顕微鏡またはスキャナー、蛍光顕微鏡またはスキャナー、透過型電子顕微鏡（TEM）または走査型電子顕微鏡（SEM）が挙げられる。

【0226】

免疫染色は、疾患状態のある種の形態学的指標を選択的に染色することによって強調するために、スライドガラス上にマウントされた組織切片に対して行なわれる一連の処置工程を必要とする。典型的な工程としては、非特異的結合を減少させるための組織切片の前処理、特異的試薬と接触させる工程、および様々な可視化技術が挙げられ、これらは任意に洗浄工程によって分けられる。例えば、ヘマトキシリン、エールリッヒ染色、シリウスレッド、メチルグリーン、メチレンブルーなどを用いた対比染色もまた適用され得る。室温またはわずかに高い温度（通常約40℃）でのインキュベーションが適用され得、そして組織は絶えず脱水から保護されなければならない。

30

【0227】

下記には、染色手順における個々の工程のいくつかが記載される。

【0228】

固定剤は、再現可能かつ生きているような様式で細胞および組織を保存するために必要である。これを達成するために、組織塊片、切片、または塗抹は固定液に浸漬されるか、あるいは塗抹の場合には乾燥させられる。固定剤は細胞および組織を安定化させ、それによって加工処理技術および染色技術の過酷な条件から細胞および組織を保護する。

40

【0229】

固定剤のタイプとしては、ホルマリン（水性ホルムアルデヒド）が挙げられ、中でも、中性緩衝化ホルマリン（NBF）が、最も一般的に使用される。他の固定剤としては、グルタルアルデヒド、アクロレイン、カルボジイミド、イミダート、ベンゾエキノン（benzoquinone）、オスミウム酸および四酸化オスミウムが挙げられる。

【0230】

50

新鮮な生検検体、細胞学的調製物（痕跡調製物および血液塗抹が挙げられる）、免疫組織化学的分析用の凍結された切片および組織は、一般的に、有機溶媒（エタノール、メタノールおよび／またはアセトンが挙げられる）中で固定される。

【0231】

スライドガラスに切片を付着またはマウントするための方法としては、清浄なスライドガラスを使用すること、そして接着ではなく、毛管引力によることが挙げられる。他の技術としては、卵白グリセリンのような糊、グリセリン-ゼラチン混合物、ポリ酢酸ビニル糊、クロムミョウバンゼラチンおよびポリリジンコーティングが挙げられる。切片のマウントを容易にする手段としての切片の加熱または「燃焼」は、組織が破壊され得るので、注意して使用されなければならない。

10

【0232】

固定された組織における特異的認識を容易にするために、多くの場合には、標的の大部分の反応性を増大させるための検体の前処理によって標的を回復または露出させることが必要である。

【0233】

標的の回復としては、特異的な検出試薬との相互作用のために標的の有用性が最大最大化され得るようにする様々な方法が挙げられる。最も一般的な技術は、適切な緩衝液中におけるタンパク質分解酵素（例えば、プロテイナーゼ、プロナーゼ、ペプシン、パパイン、トリプシンまたはノイラミニダーゼ）を用いた酵素的消化、あるいは適切なpH安定化緩衝液（通常、EDTA、Tris-HCl、クエン酸塩、尿素、グリシン-HClまたはホウ酸を含有する）において、マイクロ波照射の使用、通常のオープンでの加熱、オートクレーブ処理、または加圧下での加熱処理が行われる熱誘導エピトープ回復（HIER）である。

20

【0234】

組織切片中への試薬の浸透は、切片または細胞学的調製物の前処理の際に界面活性剤を使用して、あるいは界面活性剤を希釈培地およびリンス緩衝液への添加剤として使用して増大され得る。

【0235】

さらに、シグナル対ノイズ比は、試薬のインキュベーション前またはインキュベーション時に真空および超音波の適用、または切片の凍結融解を含む、種々の物理的方法によって増大され得る。

30

【0236】

内因性のビオチン結合部位または内因性の酵素活性（例えば、ホスファターゼ、カタラーゼまたはペルオキシダーゼ）は、染色手順における工程として除去され得る。

【0237】

同様に、HSA、BSA、オボアルブミン、ウシ胎児血清または他の血清のような不活性なタンパク質、あるいはTween20、TritonX-100、Saponin、BrijまたはPluronicのような界面活性剤を用いる非特異的な結合部位のブロッキングが、広く使用されている。標識されていない標的非特異的な形態（version）の特異的試薬を用いる組織または細胞における非特異的な結合部位をブロックすること。

【0238】

免疫細胞化学で利用される標準的な可視化技術は、レセプターの染色には直接使用され得ない。これは、その結合が、通常使用される高アビジニティ抗体またはDNAプローブではなく、MHC分子の低い結合強度によるからである。また、MHC分子の多型およびある程度の感受性性質により、MHC分子は、例えば、免疫細胞化学において使用されるモノクローナル抗体とは区別される。一方、実際に使用されるためには、使用される特異的レセプターの染色手順および染色方法は、現行の方法と類似していなければならない。

40

【0239】

本発明は、驚くべきことに、日常的な免疫細胞化学手法に似た方法論を使用して特異的なレセプターを染色することを可能にする。

【0240】

50

種々の免疫細胞化学可視化技術に対する一般的な概論については、例えば、Lars-Inge Larsson（参考文献23）を参照のこと。

【0241】

免疫組織化学において最も一般的に使用されている検出方法は、蛍光または金粒子の直接可視化、および酵素媒介比色検出である。

【0242】

直接蛍光研究の場合、標識は、例えば、5-（および6）-カルボキシフルオレセイン、5-または6-カルボキシフルオレセイン、6-（フルオレセイン）-5-（および6）-カルボキサミドヘキサ酸、フルオレセインイソチオシアナート（FITC）、ローダミン、テトラメチルローダミン、ならびに色素、例えば、Cy2、Cy3、およびCy5、任意に置換されたクマリ

10

ン（AMCAを含む）、PerCP、フィコビリプロテイン（R-フィコエリトリン（RPE）およびアロフィコエリトリン（APC）を含む）、テキサスレッド、プリンセストンレッド、緑色蛍光タンパク質（GFP）およびそのアナログ、ならびにR-フィコエリトリンまたはアロフィコエリトリンと、例えば、Cy5またはテキサスレッドとの結合体、ならびに半導体ナノ結

晶（量子ドットおよびQdotTMナノ結晶など）に基づく無機蛍光標識、ならびにEu³⁺およびSm³⁺のようなランタニドに基づく時間分解蛍光標識であり得る。

【0243】

コロイド金または銀は、電子顕微鏡観察および光学顕微鏡観察のために、免疫細胞化学的研究のための直接的な標識として使用され得る。シグナルの増幅は、コロイド金粒子のさらなる銀増強により得られ得る。

20

【0244】

一般的な酵素的方法は、標識されたアビジンまたはストレプトアビジン-ビオチン（LAB）、アビジンまたはストレプトアビジン-ビオチン複合体（ABC）、酵素抗酵素複合体（例えば、PAPおよびAPAAP）、直接デキストランポリマー系抗体-酵素複合体（例えば、DAKOのEPOS）；間接デキストランポリマー系抗体-酵素複合体（例えば、DAKOのEnVision）あるいは二重結合酵素抗酵素複合体を使用する。

【0245】

酵素的染色は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、β-ガラクトシダーゼ（GAL）、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、β-N-アセチルグルコサミニダーゼ、インペルターゼ、キサンチンオキシダーゼ、ホタルルシフェラーゼ

30

およびグルコースオキシダーゼ（GO）などの酵素標識を使用する。

【0246】

西洋ワサビペルオキシダーゼに対して一般的に使用される基質の例としては、3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）、ニッケル増強を伴うジアミノベンジジン、3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）、ベンジジン二塩酸塩（BDHC）、ハンカー-イエーツ（Hanker-Yates）試薬（HYR）、インドファンブルー（IB）、テトラメチルベンジジン（TMB）、4-クロロ-1-ナフトール（CN）、α-ナフトールピロニン（α-NP）、o-ジアニジン（OD）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸（BCIP）、ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、2-（p-ヨードフェニル）-3-p-ニトロフェニル-5-フェニルテトラゾリウムクロリド（INT）、テトラニトロブルーテトラゾリウム（TNBT）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシル-

40

β-D-ガラクトシド/フェローフェリシアン化物（BCIG/FF）が挙げられる。

【0247】

アルカリホスファターゼに対して一般的に使用される基質の例としては、ナフトール-AS-B1-リン酸/ファストレッドTR（NABP/FR）、ナフトール-AS-MX-リン酸/ファストレッドTR（NAMP/FR）、ナフトール-AS-B1-リン酸/ファストレッドTR（NABP/FR）、ナフトール-AS-MX-リン酸/ファストレッドTR（NAMP/FR）、ナフトール-AS-B1-リン酸/ニューフクシン（NABP/NF）、プロモクロロインドリルリン酸/ニトロブルーテトラゾリウム（BCIP/NBT）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-b-d-ガラクトピラノシド（BCIG）が挙げられる。

【0248】

最も強力な検出システムの1つは、触媒によるレポーター沈着（CARD）である；この増幅法は、HRPの酵素作用によって組織上の標識化チラミドに沈着に基づく。HRP免疫染色後、標識化チラミドが適用され、HRP活性の部位近くに結合される。結合した標識化チラミドが、その後、従来の蛍光または比色測定酵素媒介検出によって可視化される。

【0249】

自動化された染色システムは、費用を削減させ、スライドガラス調製物の均一性を高め、面倒な定型的な仕事を減らし、そして最も重要なことに手順上の人的ミスを減らすために導入されている。

【0250】

現在の自動化システムは、免疫蛍光に依存するアッセイ、間接免疫アッセイ手順、酵素または金染色法を含む任意の免疫化学的アッセイを扱い得る。現在の自動化システムは、複雑さまたはその順序にかかわらず、命令された時間および温度で免疫組織化学的アッセイの全工程を行う。

10

【0251】

免疫細化学技術は、従来、特異的な抗体の同定および可視化のために特異低抗体を使用されている。この技術は複雑であり、多くの工程および特異的染色のために高親和性を有する分子を必要とする。

【0252】

本発明によって、免疫細胞化学技術は改善され、抗体-抗原相互作用に基づかない微量の細微なレセプターの同定を可能にしている。

20

【0253】

例えば、スライドガラス上にマウントされた組織におけるMHCペプチド特異的レセプターの染色は、所望の場合、任意に形態学的情報と組み合わせてMHCペプチド特異的レセプターの同定を可能にする非常に有力な診断ツールである。

【0254】

形態学的情報を特定の細胞および特定のレセプターの二重染色とさらに組み合わせることにより、さらに有用な診断情報が得られ得る。

【0255】

フローサイトメトリー方法

本発明のMHC分子構築物は、好適には、フローサイトメトリーによってMHC認識細胞を同定するために標識化された試薬として使用される。これによりさらに、例えば、CD8、CD4、CD3、CD94/NKG2-A/CおよびKIRによって表される抗体エピトープのようなさらなる表面マーカーの分析が可能になる。

30

【0256】

本発明のMHC分子構築物のさらなる利点は、フローサイトメトリー分析を高速度の細胞選別と組み合わせることによって、機能的アッセイが、分析される細胞のインビトロでの拡大を必要とすることなく、選別された細胞上で実施され得ることである。

【0257】

フローサイトメーターでは、種々の細胞が、密度、形状およびサイズのようなその特有の細胞形態学によって同定され得る。組織形態そのものは、細胞がばらばらになるので、フローサイトメーターから得られるデータから見ることはできない。

40

【0258】

フローサイトメトリーは、細胞、ビーズまたは粒子を、それらが液体の流れの中（すなわち、フローセルの中）を移動する場合、検知領域を通過するレーザまたは光ビームによって測定するためのシステムである。粒子の相対的な光散乱および色識別蛍光が測定される。

【0259】

フローサイトメーターは、一般的に、光源、フローセル、種々の色の光を検出器に集束させるための構成部分、シグナル増幅器および処理装置、ならびにデータを記録および分析するためのコンピューターからなる。

50

【0260】

レーザーは、好ましい光源として最新のフローサイトメーターでは使用される。使用される最も一般的なレーザーは、アルゴンイオンレーザーである。これは主要な線を488nmにおいてもち、この光は、例えば、フルオレセイン、フィコエリトリン、およびタンデム結合体の励起のために、ならびにDNA測定において使用されるヨウ化プロピウムのために青色光の光源となる。フローセルにおいて、細胞は、流体力学的に集束することにより整列させられ、その結果、一度に1個ずつレーザービームを通過する。

【0261】

光散乱が、目的の細胞集団または粒子集団を同定するために利用され、同時に、蛍光強度の測定により、個々の細胞に関する特定の情報が得られる。

10

【0262】

流体の流れに保持された個々の細胞は1つ以上のレーザービームを通過する。細胞はレーザー光を散乱させ、同時に蛍光色素に様々な周波数で光を放射させる。光電子増倍管(PMT)は、光を電気シグナルに変換し、そして細胞データが集められる。

【0263】

フローサイトメトリをそのような強力な技術にするものは、細胞の蛍光の測定および細胞が光を散乱する方法により、非常に短い時間で何千もの細胞の数個のパラメーターを測定するその能力である。例として、青色光を励起のために使用した場合、何千もの細胞の集団内の各細胞について、赤色、緑色およびオレンジ色の蛍光と、ビームに対して前方および直角の両方向に散乱された光の量とを測定することが可能である。

20

【0264】

多数の装置は、少なくとも5つの異なるパラメーターを測定し得る。すべてのパラメーターが相関様式で同時に表示するために組み合わせられないので、ゲーティングと呼ばれるシステムが使用される。目的の領域(すなわち「ゲート」)が定義され、これにより、さらなるパラメーターの表示のために特定の細胞集団の選択を可能にする。フローサイトメーターは、蛍光標識されている細胞の亜集団を迅速かつ正確に分析するために使用され得る。他の特徴(例えば、サイズ)に基づく選別もまた可能である。

【0265】

フローサイトメトリ装置は、3タイプのデータを同時に生じる: 1) 前方散乱(FSc)は、およそその細胞または粒子サイズを生じ、2) 側方散乱または直交散乱(SSc)は、細胞または粒子の複雑さまたは粒度を生じ、そして3) 蛍光標識が、例えば、細胞の構造および機能を調べるために使用される。

30

【0266】

前方散乱および側方散乱は、細胞の予備的同定のために使用される。末梢血サンプルにおいて、例えば、リンパ球集団、単球集団および顆粒球集団が、前方散乱および側方散乱に基づいて規定され得る。前方散乱および側方散乱は、残屑および死亡細胞を排除するために使用される。例えば、粒子は、そのサイズおよび/またはその蛍光によって同定され得る。

【0267】

細胞または粒子の集団は、単一パラメーターまたは2元パラメーターのヒストグラムにおいて表され得る。光散乱および蛍光シグナルは、線形増幅または対数増幅の後に分析され得る。分析される細胞または粒子の集団が一旦同定されると、結合した抗体または色素に関連する蛍光が、バックグラウンドの蛍光が安定した後に測定される。

40

【0268】

フローサイトメーターのいくつかは、細胞または粒子を特定の集団に物理的に選別し得る。これは、細胞を含有する帯電液滴の静電的偏向によって最も一般的になされる。フローセルが振動し、そして液体の流れが出口ノズルを離れるので、液体の流れを小さい液滴に粉碎する。目的とする細胞または粒子が目下形成されつつある液滴の内部にあるとき、フローセルは帯電し、従って液滴を帯電させる。液滴の流れは、その後、一对の電氣的に帯電した電極を通過し、そして(目的とする細胞または粒子を含有する)帯電した液滴

50

は回収容器に偏向させられる。

【0269】

電極の間に作られた電場は、細胞または粒子を、使用者が指定したいいくつかの回収容器の1つに指向し得る。帯電していない液滴は廃棄物容器に流れる。

【0270】

細胞または細胞サブセットの濃度分析（しばしば「絶対的計数」と呼ばれる）は、医学的診断、あるいは細胞培養物または他の生体工学的プロセスにおける細胞の状態をモニターするために、さらに注目され得る。

【0271】

フローサイトメーターは、従来の病理学的方法または細胞学的方法の能力をはるかに超えて、非常に多数の細胞を迅速にスクリーニングすることが可能である。得られた情報は、様々な疾患の診断、分類、および予後において助けとなる。

【0272】

フローサイトメトリーが適用され得る応用は、細胞選別から、細胞表面抗原の測定、および悪性障害の解明を助けるためのDNA分析まで急速に拡大している。

【0273】

日常的な臨床研究室におけるフローサイトメトリーに関する一般的な使用としては、造血系新生物の免疫表現型決定、免疫状態の評価、特にHIV陽性患者におけるCD4+T細胞の定量化、および固形腫瘍のDNA細胞周期分析が挙げられる。

【0274】

造血系を構成する種々の細胞集団は、様々な成熟段階で明らかに異なる細胞表面抗原を発現している。これらの発現された抗原を検出し、測定することによって、フローサイトメトリーは、白血病およびリンパ腫の細胞系統の分類の助けになり得る。

【0275】

独立した診断様式であることは意図されないが、フローサイトメトリーは、多くの場合、従来の形態学的技術および細胞化学的技術の能力を越えて、造血系悪性疾患を細分類し得る。

【0276】

フローサイトメトリーの最も一般的な日常的使用は、モノクローナル抗体を使用する免疫蛍光標識による表面抗原（マーカー）の測定である。一般に使用されているマーカーは、全B細胞、全T細胞、および様々なT細胞サブセットである。全T細胞、ヘルパーT細胞およびサプレッサーT細胞に対するマーカーは、CD3、CD4およびCD8のクラスター分化（CD）カテゴリーがそれぞれ割り当てられている。このマーカーのスペクトル（全部で45個より多く存在）は、免疫不全状態、リンパ性白血病、自己免疫疾患の臨床的分類のために、および治療に対するそれらの応答をモニターするために使用される。

【0277】

例えば、CD4およびCD8の測定は、AIDSの進行をモニターするために特に有用である。これは、CD4+細胞がHIVによる感染によって激減し、一方、CD8+細胞は残存するからである。CD4+細胞の絶対数はまた、より明白なAIDSに対するHIV感染の進行マーカーである。CD4/CD8の比はまた、移植患者におけるシクロスポリンAを用いた免疫抑制治療の成功を評価するために使用され得る。

【0278】

免疫状態評価の場合、典型的には、リンパ球の亜集団は、様々な細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体を利用することによりフローサイトメーターによって同定および定量される。後天性免疫不全疾患または先天性免疫不全疾患の患者および免疫抑制薬物治療中の患者はリンパ球集団において特徴的な変化を示す。

【0279】

フローサイトメトリーのための典型的な直接的染色手順は、洗浄工程および混合工程の他に下記の工程の1つまたはいくつかを含み得る：

【0280】

10

20

30

40

50

例えば、緩衝化ホルムアルデヒドを用いた細胞の固定、透過処理、蛍光標識された標的
特異的試薬の添加、インキュベーション、遠心分離、細胞ペレットからの上清の吸引、再
懸濁、希釈およびフローサイトメーターでの分析。

【0281】

患者由来の血液サンプル中の、インビトロで拡大されたT細胞の増殖している免疫亜集
団のフローサイトメトリーに基づいた検出および定量分析についていくつかの例が報告さ
れている。腫瘍特異的な免疫治療を受けている患者においてモニターされている、T細胞
によって認識される抗原性TAAペプチドについての周知の例は、MART-1 (27~35)、gp100
(154~162)、およびNY-ESO (157~165)である。他の興味深いMHC分子としては、低い
固有的親和性を有する様々なレセプター (例えば、ペプチド特異的TCRならびにCD94/NKG2
-A/CおよびKIRのようなNKレセプター) を検出するための、HLAA、HLA B、HLA C、H-2、DR
-対立遺伝子およびHLA Eが挙げられる。

10

【0282】

ペプチド/MHC分子と特異的な対抗(counter)レセプターとの相互作用は、染色機能の
ためには必須である比較的大きい親和性によって行なわれる。従って、亜優性(sub-domi
nant) ペプチド/MHC分子複合体と相互作用する低親和性のMHC認識細胞クローンは、潜在
的には、フローサイトメトリーによる分析から「逃れる」ことがある。これは、実際に、
フローサイトメトリー手法における先行技術の四量体の場合において認められている。し
かし、本発明の構築物により、フローサイトメトリー手法におけるこの欠点は除かれる。

【0283】

20

本発明のポリリガンドMHC分子構築物は、先行技術の四量体と比較した場合、特異的なM
HC認識細胞のレセプターに対してより強固に結合する。このことは、信頼できるフローサ
イトメトリー手法のために必要とされる。従って、本発明の構築物は、MHC認識細胞のと
らえにくい亜集団のフローサイトメトリー分析のために特に有用である。本発明のMHC分
子構築物の増大した結合アビディティは、低親和性のレセプターを発現するMHC認識細胞
の検出を可能にする。増大した相互作用はまた、血液サンプル中の非常に少ないMHC認識
細胞集団でさえも、インビトロでの拡大を必要とすることなく、その検出を可能にする。
従って、本発明のMHC分子構築物は、血液サンプル中のすべてのタイプのMHC認識細胞のフ
ローサイトメトリーによって直接モニターするために有用であると考えられる。

【0284】

30

本発明のポリリガンドMHC分子構築物はまた、特異的なMHC認識細胞と非特異的なMHC認
識細胞とのより良好な分離を可能にし、従って、抗原特異的なMHC認識細胞の迅速なフロ
ーセル選別を利用することを増大させる。

【0285】

他の技術

また、本発明のMHC分子構築物は、好適には、いわゆる「フリーフローティング」技術
において適用され得ると考えられる。

【0286】

いわゆる「フリーフローティング技術」を使用した染色手順において、組織切片は、懸
濁された状態で、または適切な容器 (例えば、微量遠心分離チューブ) において自由に浮
遊した状態で、種々の試薬および洗浄緩衝液と接触する。

40

【0287】

組織切片は、染色手順の際、種々の試薬および緩衝液を含有するチューブからチューブ
に、例えば、「釣針様」デバイス、スパーテルまたはガラスリングを使用して移され得る
。

【0288】

種々の試薬および緩衝液はまた、穏やかなデカンテーションまたは真空吸引によって変
化し得る。あるいは、組織切片を含む容器は、Corningの「Netwell」のような特別な染色
用ネットに移され、そして次の染色工程のためにチューブへ戻される前に組織切片が洗浄
され得る。

50

【0289】

染色手順の個々の工程（例えば、固定、抗原回復、洗浄、ブロッッキング試薬とのインキュベーション、免疫特異的試薬とのインキュベーション、および例えば、着色染料の酵素触媒による顕色が挙げられる）はすべて、組織切片が自由に浮遊しているときに、またはネット上に保持されているときに行なわれる。染料の顕色後、組織切片はスライドガラス上でマウントおよび乾燥され、その後、対比染色され、そしてカバーガラスが載せられ、その後、例えば、顕微鏡で分析される。

【0290】

時折、組織切片は、免疫特異的試薬との不可欠なインキュベーションの後でスライドガラス上にマウントされる。残りの染色プロセスは、その後、スライドガラス上にマウントされた組織切片に対して行なわれる。

10

【0291】

フリーフローティング法は、主に厚い組織切片に対して使用されている。切片が染色プロセスのときに決して乾燥しないことが重要である。

【0292】

フリーフローティング法の利点としては、免疫組織化学的な染色試薬の一樣かつ良好な浸透が挙げられる。フリーフローティング法は、高濃度の試薬および良好な混合を可能にする。

【0293】

MHC分子構築物を含有する組成物

20

MHC分子構築物を含有する組成物（キット）もまた、本発明の重要な態様である。かかる組成物は、病院および研究室においてそれらをすぐに使える様式で製剤化され得る。かかる組成物はまた、使用者が所望するように改変または使用することが可能であるように製剤化され得る。

【0294】

組成物は、意図される使用に依存して、1つのMHC分子構築物または数個のMHC分子構築物を含み得ることが理解されるべきである。MHC分子構築物の総数、ならびにMHC分子とペプチドとの実際の組み合わせは、原理的には無制限である。

【0295】

従って、本発明は、上記に定義されるようなMHC分子構築物、ならびに任意に他の成分（例えば、緩衝剤および／または可視化手段）を含む組成物に関する。MHC分子構築物のMHC分子は、上記に定義されているように、ペプチドで満たされ得るか、またはペプチドを含まないMHC分子であり得るか、あるいはそれらの混合体であり得る。MHC分子構築物および任意に他の成分は、別々の容器または同じ容器で提供され得る。

30

【0296】

この文脈を通して使用されるように、用語「1つ以上」、「多数」、「a」、「an」および「the」は、上記に示された意味を有する。

【0297】

1つの態様において、本発明の組成物は、上記に定義されるようなMHC分子構築物を可溶化媒体に含む。組成物は、MHC分子構築物がペプチドで満たされたMHC分子を含むような組成物、またはMHC分子構築物がペプチドを含まないMHC分子を含むような組成物であり得る。後者の場合、組成物は、ペプチドを含まないMHC分子を満たすペプチド、およびペプチドを含まないMHC分子を含むMHC分子構築物が別々に提供されるような組成物であり得る。

40

【0298】

別の態様において、本発明の組成物は、MHC分子構築物が固体または半固体の支持体に固定化されている、上記に定義されるようなMHC分子構築物を含む。好適な固体および半固体の支持体は上記に示されている。組成物は、MHC分子構築物がペプチドで満たされたMHC分子を含むような組成物、またはMHC分子構築物がペプチドを含まないMHC分子を含むような組成物であり得る。後者の場合、組成物は、ペプチドを含まないMHC分子を満たすペ

50

プチドが別に提供されるような組成物であり得る。

【0299】

特に、MHC分子構築物は、MHC分子が低親和性のペプチドで満たされている形態で提供され得る。従って、特定の用途のために、これらの低親和性ペプチドを、親和性がより大きいペプチドで交換することが可能であり得る。この適用は、組成物（キット）を提供するときには特に有益であり得る。MHC分子を低親和性ペプチドで満たすことは、MHC分子を安定化するという利点を有し、同時にペプチドを含まないMHC分子の利益を提供する。

【0300】

下記には、MHC分子、ペプチドおよびMHC分子構築物の製造が記載される。

【0301】

MHC分子、ペプチドおよびMHC分子構築物の製造

本明細書中において、MHC分子の製造ならびになかでも、好適なT細胞レセプターおよびNK細胞レセプターを発現する免疫適格標的細胞（MHC認識細胞）へのMHC分子の特異的な結合を達成するための、キャリア分子（MHC分子構築物）上のポリリガンド化合物として組織化された十分に規定されたMHC分子の使用が記載される。

【0302】

MHC分子の製造

いくつかのMHC分子は、細胞性生合成のとき、望ましくないペプチドの混入または事前に占有されている（pre-occupied）ので、天然の供給源（すなわち、真核生物細胞）から得ることは非常に難しいことが判明している。

【0303】

最近の技術的進歩により、細菌発現ベクター内に連結された適切なcDNAを使用して、ペプチドを含まないが、機能的なMHCクラスIおよびMHCクラスIIを製造することが可能になっている。最近開発されたインビトロでの折り畳み手法である酸化タンパク質折り畳み（OPF）により、十分に規定されたMHCクラスI分子の製造が可能になっている（WO2000/15665（参考文献31）を参照のこと）。この方法は、タンパク質（例えば、封入体）が、製造中のどこかの時点で、確立された適切なジスルフィド結合を破壊しない状態で、カオトロピック（例えば、尿素）中において溶媒和される、任意のタンパク質製造スキームにおける使用である（それが原核生物または真核生物において行われたとしても）。簡単に記載すると、OPF法は、適切な条件（pH、塩分濃度など）を有する緩衝液において効率的かつ迅速な折り畳み経路によって変性MHC分子を誘導する予め形成されたジスルフィド結合を利用する。例として、ペプチドを含まない比較的安定なMHCクラスI分子は、過剰量の機能的な β_2m を含有する緩衝液中で、適切なジスルフィド結合を有する変性重鎖分子の希釈によって即座に形成される。新たに折り畳まれたMHCクラスI重鎖のこの中間状態は、 β_2m の存在によって厳密に制御される。続くペプチドの添加は、重鎖分子における分子変化を誘導し、安定かつ機能的なMHCクラスI分子の形成をもたらす。従って、OPF法は、2つの異なる形態で、すなわち、a) 極めて安定で、T細胞結合性である、ペプチドで満たされた分子として、そしてb) 適度に安定で、容易にペプチドを受容し得る、部分的に成熟したペプチドを含まない分子（「空」のMHC分子）として、MHCクラスI分子の製造を可能にする。比較として、細菌により産生されるMHC分子の従来の折り畳みは、 β_2m およびペプチドの両方の存在を必要とし、その結果、ペプチドで満たされたMHC分子の安定化をもたらすのみである。

【0304】

例えば、MHCクラスIサブユニットの酸化された状態は、尿素で可溶化された細菌封入体由来、または真核生物細胞（例えば、CHO細胞）で産生された変性MHCクラスI分子由来の個々のサブユニットの生化学的な精製（例えば、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィー）によって得られる得るだけである。

【0305】

MHC分子はまた、例えば、ストレプトアビジンのような結合実体を介するキャリア分子への結合に適切な部分（例えば、ビオチン化部位）でタグが付けられた、十分に規定され

10

20

30

40

50

、かつ高度に精製された成分を得るために組換え技術によって作製され得る。MHC分子およびMHC様分子は、生合成のときに細胞内区画において多くの異なるペプチドで負荷されるので、天然の供給源からは困難を伴って得られるだけである。MHC分子を製造するための効率的な方法はまた、MHC遺伝子座の極端な多型を克服するための必要条件である。ヒト集団においては、400を超える異なるHLA A対立遺伝子、HLA B対立遺伝子およびHLA C対立遺伝子が存在し、200を超えるHLA D対立遺伝子が存在する。この分子的多様性は、上記で述べられたように、免疫学的目的を有しているが、多くの異なるMHC分子が作製され、個々に最適化され、実証され、特徴付けられ、貯蔵されることなどが必要であるので、MHC製造に対する実際的な障害である。しかし、十分に規定されたペプチドを提示する組換えMHC分子は、細菌または真核生物細胞において産生されたMHC分子由来の変性および予め酸化されたサブユニット（すなわち、MHCクラス I 分子の重鎖および軽鎖 β_2m 、およびMHCクラスII分子の α 鎖、 β 鎖）のインビトロでの折り畳みによって高い効率で得られ得る。

10

【0306】

MHC分子は、例えば、MolecularCloning (Sambrook、FritschおよびManiatis、Cold Spring Harbor Press、1989、参考文献13) に記載されるような標準的な手順に従って、目的とする様々な分子をコードするcDNAのクローニングによって得られ得る。簡単に記載すると、cDNAが、市販のcDNA合成キット（場合により、Pharmaciaから得られる）を使用して適切な細胞株から合成される。例えば、ヒト細胞の場合、細胞は、第12回国際組織適合性ワークショップの細胞株パネルデータベースから得られる、HLAを発現するEBV形質転換ヒトB細胞株のパネルに由来し得る（「HLA：HLAの遺伝的多様性。機能的および医学的な意味」、DominiqueCharron編、EDK Press、1997（参考文献12））。例えば、HLA A*0201の場合、適切な細胞株はIHW9012であると考えられる。所望するMHC（HLA）分子に対応するヌクレオチド配列は、公開されているデータベースにおいて見出され得る。適切な配列情報を使用して、オリゴヌクレオチドプライマーは、適切なcDNAに由来する関連した成熟MHC（HLA）分子を含むコード領域をPCR反応によって増幅するために設計され得る。増幅のための関連する順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、適切な発現ベクターのNcoI制限部位およびHindIII制限部位に挿入される。適切な発現ベクターは、例えば、Novagen（Novagen, Inc、Madison、WI、アメリカ）から得られ得る。

20

【0307】

MHCクラス I 分子およびMHCクラスII分子と結合するペプチド

30

MHC分子を満たすためのペプチド（またはペプチド抗原）は任意の長さであり得る。ペプチドは、MHCクラス I 分子に結合するとき、少なくとも8～10アミノ酸残基の長さでなければならない。MHCクラスII分子に結合するペプチドの長さは、通常、MHCクラス I 分子に結合するペプチドよりも長く、例えば、50個ものアミノ酸残基であり得るが、通常的には約20アミノ酸残基よりも短く、例えば、約17アミノ酸残基よりも短い。しかし、上記に示された長さは例としてであり、従って、限定されるべきでないことが理解されるべきである。

【0308】

抗原性分子または組織が多数の免疫病理学について公知であるので、好適なペプチドは、この情報を使用して選択され得る。例として、特定の細胞傷害性T細胞によって認識される腫瘍関連抗原に由来する抗原性ペプチドのパネルが同定されている。

40

【0309】

アミノ酸組成物もまた、反復した手順または分子モデリングにより得られ得る。MHCクラス I（およびMHCクラスII）によって制限されるT細胞エピトープの迅速かつ確実な同定は、新しい腫瘍抗原、自己抗原または感染性疾患に関する定義を含む様々な分野の医学研究において必須である。従って、予め必要なものは、MHC-ペプチド-TCR複合体内における分子相互作用に関する正確な知識である。合成無作為配列ペプチドライブラリーによって、非常に多数のMHCペプチド結合モチーフがこの10年間に明らかにされている。MHCペプチド結合モチーフの共通する特徴は、MHC分子に結合するペプチドの強さを制御する、ペ

50

プチドのアンカー残基および結合部位のポケットが存在することである。500を超える異なるMHC分子が見出されており、それらの各々が異なるペプチド結合モチーフを含んでいる。結合モチーフの情報を含む現在の生物データベースから、多数のアルゴリズムが、抗原の公知の配列から推定されるMHC結合モチーフを予測するために開発されている。周知の1つの例として、MHCリガンドおよびペプチドモチーフのデータベース「SYFPEITHI」がある。これは、クラス I およびクラス II のMHC分子と結合することが知られている約2000個のペプチド配列を含むデータベースである。収録配列は、公表された報告から集められている。このデータベースにより、様々な感染症および細胞形質転換に関与する分子におけるMHC結合モチーフを同定するための強力な手段が提供される。例えば、HIV/SIV抗原および腫瘍関連抗原が同定されている。これらの抗原の公知の配列から、多数のMHC結合モチーフが予測され、その後、ペプチド結合分析によって確認されている。MHC結合ペプチドの同様の推定は、例えば、癌、マラリアおよび結核において、様々な疾患関連抗原に対して利用可能である。

10

【0310】

好適なMHCクラス I ペプチドエピトープの予測を改善するためのより最近のアプローチは、ERにおいてMHCクラス I 結合ペプチドを生成するプロテオソームのパターンを整理する知識に基づいている。例として、NetChopWWWサーバーは、ヒトプロテアソームの切断部位についてニューラルネットワーク予測を行う (<http://www.cbs.dtu.dk/-services/NetChop/>)。プロテアソームの構造はほとんど保存されているので、このサーバーは、少なくとも他の哺乳類のプロテアソームについて信頼できる予測を行ない得ると考えられる。同様のWWWサーバーは<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>において利用可能である (C.Kuttler、A.K.Nussbaum、T.P.Dick、H.-G.Rammensee、H.Schild、K.P.Hadeler、Algorithm for the prediction of proteasomal cleavages、J.Mol.Biol.298(2000)417~429もまた参照のこと) (参考文献24)。

20

【0311】

調整された人工ネットワークによる分析は、切断を促進または阻害するさらなるモチーフおよび特徴の同定を可能にする。このツールはまた、MHC結合能力の予測と組合せて、MHCクラス I 分子におけるペプチドの生成および提示のより完全な予測を可能にする。

【0312】

ペプチドは、固相合成法によって得られ得る。Merrifield (参考文献14および15) によって最初に導入されたこの技術の第1段階は、保護されたアミノ酸誘導体を用いたポリマー支持体上におけるペプチド鎖の組み立てからなる。この技術の第2段階は、すべて側鎖保護基を同時に切断しながら、支持体からペプチドを切断して、粗製の遊離ペプチドを得ることである。より長いペプチドを得るために、これらのプロセスは連続して繰り返され得る。

30

【0313】

種々の化学的保護スキームならびに固体支持体および可溶性支持体を含むこの方法論の総説については、例えば、G.BaranyおよびFields (参考文献16および17) を参照のこと。

【0314】

非常に多数のペプチド、いわゆるペプチドライブラリーは、無作為配列ペプチド合成によって得られ得る；例えば、Gordonら、R.A.HoughtenらおよびG.Jungら (参考文献18、19および20) を参照のこと。ペプチドのこれらのコレクションは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸およびアミノ酸模倣体の両方を配列に含有し得る。このようなライブラリーは、非常に多数のペプチドをスクリーニングするために有用である。

40

【0315】

ペプチドを得るための他の方法としては、酵素によるフラグメント連結、遺伝子工学技術 (例えば、部位指向変異誘発など) が挙げられる。あるいは、ペプチドは、天然の供給源から単離した後得られ得る。

【0316】

本発明のMHC分子構築物の製造

50

本発明によって、低親和性の可溶性MHC分子をその特異的な対レセプターに安定に結合させることが可能である。これを可能にするプロセスが下記に記載され、MHC分子をキャリア分子（これは、意図される使用に依存して、可溶性または不溶性であるように選択され得る）に結合させ、従って、ポリリガンド（すなわち多価）化合物であるMHC分子構築物を形成する工程を含む。

【0317】

複数価（multi-valent）または多価（poly-valent）の分子複合体としてこのようにして組織化された複数の低親和性MHC分子は、個々のMHC分子の結合に関連する固有の大きい解離速度（off-rate）が補償される。

【0318】

多数の低親和性MHC分子を発現する本発明のMHC分子構築物は、大きいアビディティでMHC認識細胞の特定のレセプターに結合する。例えば、モノマー形態の可溶性HLAクラスIは迅速に解離するが、これに対して、HLAクラスIを含む本発明のMHC分子構築物は、はるかに安定であることが判明している。

【0319】

従って、本発明はさらに、MHC分子構築物を調製するためのプロセスに関する。

【0320】

本発明のプロセスは以下の工程を含む：

【0321】

(a) MHC分子またはMHC分子サブユニットを提供する工程、および
(b) MHC分子またはMHC分子サブユニットを、本明細書中に記載されるような好適なキャリア分子、または本明細書中に記載されるような好適なキャリア分子および好適な結合実体に結合させ、それによりMHC分子構築物を得る工程。

【0322】

記載されるように、キャリア分子は、可溶性または不溶性であるように選択され得る。

【0323】

より詳細には、本発明のプロセスは以下の工程を含む：

【0324】

(a) タグ付加またはタグ非付加のMHC分子またはMHC分子サブユニットをコードする1つ以上の遺伝子を含む原核生物細胞または真核生物細胞を提供する工程であって、該遺伝子が該細胞内で発現可能である工程、
(b) 遺伝子が発現される条件のもとで細胞を培養する工程、
(c) 細胞によって生成されたMHC分子またはMHC分子サブユニットのその後の精製を可能にする条件のもとで、MHC分子またはMHCサブユニットを細胞から単離する工程、および、
(d) 任意に、単離されたMHC分子サブユニットを、本明細書中に記載されるようなキャリア分子、または本明細書中に記載されるような結合実体およびキャリア分子に結合させるプロセス前または中に折り畳み処理に供し、それによりMHC分子構築物を得る工程。

【0325】

MHC分子は、同じ細胞または異なる細胞において生じ得る。後者の場合、MHC分子（これはおそらく、異なる2種類の分子、例えば、MHCクラスI分子の重鎖および β_2m であり得る）は、キャリア分子（結合実体を有するかまたは有さない）に結合させる前または間に一緒に結合され得る。

【0326】

適切な発現ベクターを含む宿主細胞は、原核生物性または真核生物性であり得る。

【0327】

本明細書中で使用されるMHC分子を製造するためには、用途が広く、かつ高発現性の細菌発現が特に好ましい。例として、E.coli株、例えば、溶原菌BL21 (DE3) は、目的とするcDNAコード発現ベクターで容易に形質転換され、そして多量の分子の発現を誘導し得る。

【0328】

MHC分子をコードする発現プラスミドを含む宿主細胞は、原核生物起源（細菌）であってもよく、または真核生物起源（酵母、昆虫または哺乳動物細胞）であってもよい。

【0329】

好ましい細菌性製造は、多量の変性したサブユニット分子（例えば、重鎖分子および β_2m 分子）を生じるような製造である。機能的なMHC分子は、当業者に公知の標準的な手法に従うインビトロでの折り畳みによって得られ得る。例えば、従来の方法は、細菌から得られた変性および完全に還元されたMHCクラスI重鎖分子が、ジスルフィド結合の形成および変性したポリペプチド鎖の二次構造形成および三次構造形成の確立を可能にする物理的条件および化学的条件のもと、 β_2m および適切なペプチドの存在下で再生されることを記載している（参考文献21）。ペプチドおよび β_2m はともに、初期の折り畳み期においてサブユニット分子の低い親和性を補うために、折り畳まれつつある重鎖の量と比較して過剰に添加される。目的とするペプチドは、重鎖によって形成されるペプチド結合部位内への十分な負荷を確実にするために、適切なアンカー残基を含むべきである。

10

【0330】

より最近に開発された好ましい方法である「酸化折り畳みタンパク質」（OPF）は、変性した分子の迅速かつより効率的な折り畳みを指示する予め形成されたジスルフィド結合を有する重鎖分子を利用する。この方法は、 β_2m だけの存在下でのMHCクラスI重鎖の折り畳みを記載する。ペプチドを含まない生化学的に安定なMHCクラスI分子が、重鎖および軽鎖の会合により形成される。その後の適切なアンカー残基を含むペプチドの添加は、機能的かつ安定なMHC-ペプチド複合体の急速な形成をもたらす。

20

【0331】

十分に規定されたMHC分子またはMHC分子サブユニットはまた、適切なcDNAをコードする細胞内で産生され得る。かかるcDNAを含む発現ベクターは、当該分野で公知の任意の技術を使用して宿主細胞に導入され得る。これらの技術としては、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、トランスフェリンーポリカチオン媒介DNA移入、裸核酸またはカプセル化核酸を用いたトランスフェクション、リボソーム媒介細胞融合、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合およびウイルス感染が挙げられる。

【0332】

例として、本発明に関連した研究にとって興味深いと考えられるペプチド結合モチーフが、図34～図37に示される。

30

【0333】

治療

上記に述べられるように、本発明は、一般的に治療分野に関する。本発明のMHC分子構築物は様々な治療の適用における有力なツールである。特に、本発明のMHC分子構築物は、下記から明らかであるように、インビボおよびエクシボでの治療的適用において適用され得る。

【0334】

本発明はまた、（I）特定のMHC認識細胞を標的とし、そして（II）かかる細胞上のレセプターに注意を向けることにより特定の標的MHC認識細胞において所望の応答を誘導するようにポリリガンドMHC分子構築物を設計可能であるという認識に基づいている。さらに、所定の特異性を有するMHC分子／ペプチド複合体のかかる設計により、MHC認識細胞の活性に影響する他の分子を組み込むことにより治療用組成物に他の刺激を「付加」することが可能であるということも認識された。即ち、特異的に標的化されたMHC認識細胞クローンの活性を調節しつつ、他のMHC認識細胞クローンには影響を与えないままとすることが可能である。さらにまた、前述した他の分子を適切に選択することにより1つ以上のMHC認識細胞クローンの活性を特異的に調節することも可能である。本発明はさらに、本明細書に記載したMHC分子構築物を用いて特異的MHC認識細胞を獲得してかかるエクシボを調節し、これによりかかる細胞がインビボの治療に使用され得ることが可能であるという認識に基づいている。

40

50

【0335】

従って本発明は、免疫系をアップレギュレート、ダウンレギュレート、調節、回復、増強および／または刺激する方法、ならびに、細胞のアネルギーを誘導する方法を提供する。このことは、本発明によれば一般的に2つの方法、即ちインビボまたはエキスピボで達成され得る。「インビボ」とは、活性物質または成分の有効量が任意の適切な経路で被験体に投与され、活性物質または成分がその作用を被験体において発揮できることを意味する。「エキスピボ」（「インビトロ」と記載される場合もある）とは、被験体から抜き取った細胞が被験体の外部において何らかの影響を受け、その後被験体に再導入され、これにより所望の応答を達成することを意味する。

【0336】

強調すべき点として、MHC分子構築物および他の用語の双方について上記の全てかつ任意の定義が後述する部分にも等しく適用されるものとする。本発明の治療用組成物は上記で定義した1つ以上のMHC分子構築物を含んでよいと理解されるべきである。「1個以上」、ならびに「一つの」「複数の」および「その」という表現に付いては上記を参照されたい。また上記のように、構築物のMHC分子はペプチドで満たされているか、ペプチドを含まないであるか、またはこれらの混合物であってよい。それぞれの構築物のMHC分子は同じであるか、または異なっているもよい。同様にMHC分子のペプチドは同じであるか、または異なっているもよい。同様に、MHC分子構築物は同じであるかまたは異なっているもよい、1つ以上の生物学的に活性な分子を含む場合がある。これらの表現は上記のとおり説明される。

【0337】

特に、生物学的に活性な分子の封入は所望の応答を開始するために重要であり得る。上記のように、免疫系は幾つかのシグナル伝達経路に依存しており、従って生物学的活性分子の封入は、MHC構築物の一部としてまたは単独のいずれであっても、免疫系の制御または方向付けのための優れた方法であり得る。

【0338】

従って、本発明は一般的に治療用組成物または医薬品として使用するための上記のMHC分子構築物そのものに関する。本発明はまたインビボの治療で使用するため、および、エキスピボの治療で使用するための、本明細書に規定するMHC分子構築物に関する。

1つの局面において、本発明は本明細書に規定するMHC分子構築物を有効成分として含む治療用組成物に関する。

【0339】

別の局面において、本発明はMHC認識細胞の有効量を有効成分として含む治療用組成物に関し、該MHC認識細胞は、

本明細書中に規定するMHC分子構築物にMHC認識細胞を含む対象由来のサンプルを接触させ、それにより、MHC分子構築物にMHC認識細胞を結合させること、

結合したMHC分子構築物およびMHC認識細胞を単離すること、ならびに、

該MHC認識細胞を臨床上適する数量にまで増殖させること、により得ることができる。

【0340】

治療用組成物は適宜、1つ以上のアジュバントおよび／または賦形剤を含有してもよい。

本明細書においては「アジュバント」という用語は免疫学的アジュバントを指すものとする。これは該当成分への免疫系の応答を増強または促進し、これにより被験体において免疫応答または一連の免疫応答を誘発する能力を有する化合物を指す。アジュバントはデポ剤（成分の半減期を延長するもの）を形成することにより治療用組成物の効果を促進し、別のT細胞を与え、そして、サイトカインの産生を刺激し得る。アジュバントによる抗原生存性の促進および非特異的刺激は、いくつかのケースにおいてMHC分子エピトープが免疫系により認識される治療用組成物中の唯一の特徴である場合には必要となり得る。

【0341】

「免疫応答」という用語に含まれるものとして、特異的な体液性、すなわち抗体、なら

びに細胞性の免疫応答であり、抗体は血清学的なもの、ならびに分泌性のものおよびサブクラスIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEに関わるもの、ならびに全てのイソ型、アロタイプおよびそのサブクラスである。用語はさらに、他の血清または組織の成分も含むものとする。細胞応答は1型および2型のTヘルパーリンパ球、細胞毒性T細胞ならびにNK細胞を含む。

【0342】

適切なアジュバントの例は、上記のもの、即ち、サポニン類、例えばQuil AおよびQs-21、o/w型エマルジョン、例えばMF59、MPL、PLG、PLGA、アルミニウム塩類、リン酸カルシウム、w/o型エマルジョン、例えばIFA（フロイントの不完全アジュバント）およびCFA（フロイントの完全アジュバント）、インターロイキン類、例えばIL-1 β 、IL-2、IL-7、IL-12およびINF γ 、Adju-Phos（登録商標）、グルカン、抗原製剤、生体分解性微粒子、コレラ毒素、リポソーム類、DDE、DHEA、DMPC、DMPG、DOC/Alum複合体、ISCOMs（登録商標）、ムラミルジペプチド、モノホスホリル脂質A、ムラミルトリペプチドおよびホスファチジルエタノールアミンである。好ましい実施態様においては、アジュバントはサポニン類、例えばQuil AおよびQs-21、MF59、MPL、PLG、PLGA、リン酸カルシウムおよびアルミニウム塩から選択される。適切な賦形剤の例は上記のもの、即ち、希釈剤、緩衝剤、懸濁剤、水和剤、可溶化剤、pH調節剤、分散剤、保存料および/または着色料である。とりわけ、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンを含有しないPBS緩衝液が適している。

10

【0343】

本発明の治療用組成物は種々の疾患の治療、予防、安定化または緩和において適切に適応され得る。対象となる疾患は、上記のもの、即ち、炎症性、自己免疫性、アレルギー性、ウィルス性、癌性、感染性、同種異型性または異種性（移植片対宿主および宿主対移植片）起源の疾患である。特に、疾患は慢性の炎症性腸疾患、例えばクローン病または潰瘍性大腸炎、硬皮症、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、喘息、悪性メラノーマ、腎癌、乳癌、肺癌、子宮癌、前立腺癌、脳癌、頭部および頸部の癌、白血病、皮膚リンパ腫、肝癌、結腸直腸癌、膀胱癌、拒絶反応関連性疾患、移植片対宿主関連疾患、または、肝炎関連ウィルス疾患、AIDS、麻疹、痘疹、水痘、風疹またはヘルペスであり得る。

20

【0344】

より詳しくは、疾患は、

炎症性/自己免疫起源のもの、例えば、喘息、高血圧性肺炎、間質性肺疾患、サルコイドーシス、特発性肺線維症、クローン病または潰瘍性大腸炎またはホイップル病に関わる間質性肺疾患、ウエーゲナー肉芽腫症または高血圧性血管炎に関わる間質性肺疾患、

血管炎症候群、ヘノッホ-シェーンライン紫斑病、グッドパスチャー症候群、ウエーゲナー肉芽腫症、

腎疾患、例えば急性糸球体腎炎の際の抗体媒介糸球体症、全身エリテマトーデスに関わる腎炎、他の全身疾患、例えばウエーゲナー肉芽腫症およびグッドパスチャー症候群および混合結合組織疾患に関わる腎炎、慢性間質性腎炎、慢性糸球体腎炎、

胃腸疾患、例えばクローン病、潰瘍性大腸炎、腹腔疾患、ホイップル病、コラーゲン蓄積大腸炎、好酸球性大腸炎、リンパ性大腸炎、

肝臓胆管疾患、例えば自己免疫肝炎、アルコール誘発肝炎、門脈周囲線維症、原発性胆管肝硬変、硬化性胆管炎、

中枢または末梢神経系の障害、例えば脱ミエリン疾患、例えば多発性硬化症、急性播種性脳脊髄炎、亜急性硬化性全脳炎、

皮膚疾患、例えば乾癬、アトピー性皮膚炎、湿疹、アレルギー性皮膚疾患、進行性全身性硬皮症（硬皮症）、剥脱性皮膚炎、尋常性瘡瘡、

関節疾患、例えば慢性関節リウマチ、強直性脊髄炎、乾癬または炎症性腸疾患に関わる関節炎、

筋骨格疾患、例えば重症筋無力症、多発性筋炎、

30

40

50

内分泌性疾患、例えばインシュリン依存性真性糖尿病、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）、甲状腺中毒症、グレーブス病、造血系の疾患、例えば自己免疫性貧血、自己免疫性血小板減少症、心臓血管系の疾患、例えば心筋症、血管炎、全身性エリテマトーデスのような全身性疾患に関わる心臓血管系の疾患、結節性多発性関節炎、慢性関節リウマチ、硬皮症、サルコイドーシス、癌起源の疾患、例えば悪性黒皮症、セザリー症候群、皮膚T細胞リンパ腫、腎細胞癌、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、肝癌、肺癌および肉腫、アレルギー起源の疾患、障害または症状、である。

10

【0345】

アレルギー反応が起こる最も一般的なアレルゲンには、例えば樹木、草木、雑草、カビ、ハウスダストダニ、貯蔵ダニ、ゴキブリおよび動物の体毛、毛皮およびフケに由来するアレルゲンの吸引が含まれる。樹木、草木および雑草に由来する重要な花粉アレルゲンは分類学上のブナ目 (Fagales)、モクセイ目 (Oleales) およびマツ目 (Pinales)、例えばカバノキ (Betula)、ハンノキ (Alnus)、ハシバミ (Corylus)、シデ (Carpinus) およびオリーブ (Olea)、イネ目 (Poales)、例えばドクムギ属 (Lolium)、オオアワガエリ属 (Phleum)、ナガハグサ属 (Poa)、ギョウギシバ属 (Cynodon)、カモガヤ属 (Dactylis) およびライムギ属 (Secale) の草木、キク目 (Asterales) およびイラクサ目 (Urticales)、例えばブタクサ (Ambrosia) およびヨモギ (Artemisia) 属の雑草である。カビ由来の重要な吸入アレルゲンは、とりわけ、アルテルナリア (Alternaria) およびクラドスポリウム (Cladosporium) 属に由来するものである。他の重要な吸入アレルゲンはデルマトファゴイデス (Dermatophagoides) 属のハウスダストダニ、レピドグリフィス (Lepidoglyphys) 属の破壊性の貯蔵ダニ、ゴキブリ、および哺乳動物、例えばネコ、イヌ、ウマ、ウシおよびトリに由来するものである。刺したり噛んだりする昆虫類に対するアレルギー反応、例えば分類学上の膜翅目、例えばハチ、スズメバチおよびアリに由来するものが一般的に観察されている。特定のアレルゲン成分は当業者に公知であり、例えば、ブナ目の *Bet v 1* (B.ベルコーサ (*B. verrucosa*)), カバノキ)、*Aln g 1* (アルヌス・グルチオノーサ (*Alnus glutinosa*)), ハンノキ)、*Cora 1* (コリルス・アベラナ (*Corylus avellana*)), ハシバミ) および *Car b 1* (カルピヌスベツルス (*Carpinus betulus*)), シデ) である。他のものとしては、*Cry j 1* (マツ目)、*Amb a 1* および *Ar t v 1* (キク目)、*Par j 1* (イラクサ目)、*Ole e 1* (モクセイ目)、*Ave e 1*、*Cyn d 1*、*Dac g 1*、*Fes p 1*、*Hol l 1*、*Lol p 1* および *Pas n 1*、*Phl p 1* および *Poa p 1*、*Sec c 1* および *Sor h 1* (種々の草木花粉)、*Alt a 1* および *Cla h 1* (カビ)、*Der f 1* および *Der p 1* および *D. farinae* および *D. pteronyssinus*))、*Lep d 1*、*Bla g 1* および *Per a 1* (ゴキブリ、それぞれ、ブラテラ・ゲルマニカ (*Blattella germanica*) およびペリプラネタ・アメリカーナ (*Periplaneta americana*))、*Fel d 1* (ネコ)、*Can f 1* (イヌ)、*Equ c 1*、*Apis m 1* および *Ves g 1*、*Pol a 1*、*Sol i 1*、*2*、*3* および *4* (ホタルアリ) 等が最も一般的なものとして挙げられる。

20

30

40

【0346】

本発明の治療用組成物は、投与経路および投与すべき有効成分の量に応じて任意の適切な方法で製剤してよい。特に本発明の治療用組成物は非経口投与用、例えば静脈内、筋肉内、関節内、皮下、皮内、外皮/経皮および腹腔内投与用、注入用、経口投与用、鼻内投与用、直腸投与用、または局所投与用に製剤され得る。

【0347】

MHC分子構築物は固体または半固体の支持体上に適切に固定化される場合がある。固体および半固体の支持体の例は上記のもの、即ち、粒子、ビーズ、生体分解性粒子、シート

50

、ジェル、フィルター、膜、繊維、キャピラリー、針、マイクロタイターストリップ、管、プレートまたはウェル、コーム、ピペット、チップ (tip)、マイクロアレイおよびチップ (chip) である。特に固体支持体は粒子およびビーズ、好ましくは、重合体、磁性体または超常磁性体である粒子およびビーズから選択される。インビボの治療のためには、生体分解性の粒子が特に好ましいが、エクスビボの治療の場合は生体分解性、重合体、磁性体、常磁性体または超常磁性体の粒子が特に好ましい。

【0348】

上記のように、治療用組成物中に使用されるMHC分子構築物はインビボおよびエクスビボの両方においてMHC認識細胞の調節のために高度に適した性質を有する極めて興味深い分子ポリリガンド化合物である。

10

【0349】

ポリリガンドMHC分子構築物はキャリア分子によって複数のペプチド提示MHC分子を担持でき、これにより特異的な対抗レセプターに対する高親和力の結合を可能にする。

【0350】

このような応答には、アポトーシスをもたらすアネルギー、応答のアップレギュレーション、応答のダウンレギュレーション、応答の刺激、応答の調節、応答の増強、応答の抑制、および、応答を操作する任意の他の方法が含まれることが理解される。この点に関し、構築物のMHC分子/ペプチドは多数の他の応答を誘発するか、あるいは治療、予防または緩和すべき疾患に対して有益な影響をもたらす種々のシグナル伝達物質の産生をもたらすシグナル伝達経路を活性化させるように選択され得る。

20

【0351】

これを達成するためには、組成物中で使用するMHC分子構築物は、適宜、インビボおよびエクスビボで標的MHC認識細胞において1個以上の機能を発揮する異種または同種のMHC分子（例えば、異なるペプチドを提示する）を含み得る。

【0352】

さらにまた、MHC分子構築物のこのような所望の効果は上記の生物学的活性化化合物をさらに結合させることにより、増強、低減、抑制、刺激されまたは他の効果と組み合わせてもよく、これにより特定のMHC認識細胞のクローンを指向することができる。このためには、MHC分子とペプチドの特定の組み合わせを選択してよい。例えば、同時刺激分子、例えばB7.1をポリリガンドMHC分子構築物に担持させることにより2官能性のポリリガンドMHC分子構築物の形成が誘導され、これは (I) 所望のペプチド特異的MHC認識細胞クローンを対象とし、(II) 免疫応答を開始するための2種の強制的なシグナルを含む適切な刺激を促進する。他の例は、自己免疫疾患の治療のための組成物であり、ここでは、組み換え毒素、例えばPE-38も、使用されるMHC分子構築物に結合される。

30

【0353】

これにより、望まれる如何なる態様でも応答を調節することが可能になる。従って、本発明はインビボおよびエクスビボの両方で所望の標的細胞応答をもたらすMHC分子/ペプチドを設計する方法にも関する。

【0354】

癌を含む種々の疾患は患者において免疫抑制をもたらす。免疫療法は患者自身の免疫系を刺激することにより癌細胞を認識して破壊させようとするものである。腫瘍は幾つかの異なる機序を通して免疫系全体にその抑制的作用を示すことができる。腫瘍細胞は免疫系を感作することができるが、腫瘍退避機序は腫瘍に対する免疫学的寛容性を誘発することができる。腫瘍退避免疫サーベイランスの機序は幾つかが知られている。例えば、腫瘍細胞はエフェクターT細胞に対して腫瘍抗原を提供するのに非効率的である場合が多い。これは腫瘍細胞によるMHC分子のダウンレギュレーションまたは突然変異、あるいは、同時刺激分子、例えばB7、または、抗原提示経路において重要なTAPのような他の分子のダウンレギュレーションの結果である可能性がある。

40

【0355】

さらにまた、腫瘍細胞はT細胞におけるCD3-ゼータ鎖の発現をダウンレギュレートする

50

ことによりT細胞における寛容性を誘発することがわかっている。腫瘍細胞はまた、抑制性サイトカインの放出によるT細胞の活性化を抑制し、Fas-Fasリガンド相互作用を通してT細胞のアポトーシスを誘発することができる。腫瘍細胞はまた、未成熟の樹状細胞の完全に成熟した抗原提示細胞への成熟を抑制するIL-12のようなサイトカインの放出を通して免疫系を抑制する能力を有する。腫瘍細胞により放出される抑制因子は顆粒球の活性化を抑制し、これにより活性化顆粒球による腫瘍細胞の殺傷が回避されることがわかっている。

【0356】

化学療法および放射線療法のような一般的な治療方法もまたより一般的な方法で免疫を抑制する。

10

【0357】

種々の異なる従来技術の方法が腫瘍に対する患者の免疫応答を再生または増強する試みに用いられており、例えばモノクローナル抗体の投与、癌ワクチン、サイトカイン療法および樹状細胞またはT細胞を用いた養子細胞免疫療法が例示される。T細胞が関与する細胞免疫療法には腫瘍細胞を殺傷する能力を有するCD8+細胞毒性エフェクター細胞が含まれる。さらにまた、CD4+サイトカイン産生T細胞はまた細胞毒性CD8細胞の持続可能な抗腫瘍細胞活性の維持において重要な役割を果たしていることも解かっている。しかしながら従来技術の方法の成果は限定的なものであった。

【0358】

上記によれば、治療用組成物のMHC分子構築物を興味深いものとしているものは、
 使用するMHC分子構築物のMHC分子の少なくとも2つは異なっており、
 使用するMHC分子構築物のMHC分子は同じであり、
 使用するMHC分子構築物の複数のMHC分子により捕獲されるペプチドの少なくとも2つは異なっており、
 使用するMHC分子構築物のMHC分子により捕獲されるペプチドは同じであり、
 使用するMHC分子構築物のMHC分子により捕獲されるペプチドは天然アミノ酸、親水性または疎水性の基を含まないように化学的に修飾されるか合成されており、
 使用するMHC分子構築物のMHCクラスI分子により捕獲されるペプチドは可撓性のリンカーによりMHCクラスI重鎖に連結されており、
 使用するMHC分子構築物のMHCクラスI分子により捕獲されるペプチドは可撓性のリンカーによりMHCクラスI軽鎖 (β_2m) に連結されており、
 ペプチドは可撓性のリンカーにより軽鎖 (β_2m) と結合したMHCクラスI重鎖を有する使用するMHC分子構築物のMHCクラスI分子により捕獲され、
 使用するMHC分子構築物のMHCクラスII分子により捕獲されるペプチドは可撓性のリンカーにより α 鎖に連結されており、
 使用するMHC分子構築物のMHCクラスII分子により捕獲されるペプチドは可撓性のリンカーにより β 鎖に連結されており、
 使用するMHC分子構築物のMHCクラスI分子は突然変異されており、
 使用するMHC分子構築物のMHCクラスII分子は突然変異されており、
 使用するMHC分子構築物のMHC分子はペプチド非含有MHC分子である、
 という点である。

20

30

40

【0359】

上記のように、MHC分子構築物は1つ以上の生物学的に活性な分子を有してよい。これらは上記で定義したとおりである。特に好ましい生物学的化合物は、MIC A、MIC B、CD1d、ULBP-1、ULBP-2、ULBP-3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD9、CD27、CD28、CD30、CD69、CD134 (OX4)、CD137 (4-1BB)、CD147、CDw150 (SLAM)、CD152 (CTLA-4)、CD153 (CD3OL)、CD40L (CD154)、NKG2D、ICOS、HVEM、HLAクラスII、PD-1、Fas (CD95)、FasL、CD40、CD48、CD58、CD70、CD72、B7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、B7RP-1、B7-H3、PD-L1、PD-L2、CD134L、CD137L、ICOSL、LIGHT、CD16、NKp30、NKp44、NKp46、NKp80、2B4、KIR、LIR、CD94/NKG2AおよびCD94/NKG2Cである。

50

【0360】

上記のように、本発明はヒトを含む動物の治療のための方法に関し、該方法は有効量の明細書記載の治療用組成物を投与することを包含する。治療は免疫応答のアップレギュレーション、ダウンレギュレーション、調節、刺激、抑制、再生、増強および/または何らかの他の操作を含み得る。これは実際は本発明の組成物により達成され得る。本発明はまた細胞においてアネルギーを誘発する方法に関し、この用法により明細書に記載した治療用組成物が投与される。

【0361】

さらに別の局面において、本発明は養子免疫療法を実施する方法に関し、該方法はヒトを含む動物に本明細書に記載した治療用組成物を投与することを包含する。

10

【0362】

インビボ療法

上記のように、本発明の治療用組成物はインビボ療法に適する。

インビボ療法のための治療用組成物は1~10種の異なるMHC分子構築物を適宜含有してよい。即ち、2、3、4、5、6、またはより多くの種類の異なるMHC分子構築物の含有物を意図しており、それは場合により好都合なものと考えられている。さらにまた異なるペプチドを捕獲しているMHC分子を担持したMHC分子構築物を含むことも好都合である場合がある。各MHC分子構築物の量は該当するMHC分子構築物またはMHC分子構築物の組み合わせに依存する。さらにまた、MHC分子の親和性も考慮されるべきである。高親和性ならびに低親和性のペプチドをMHC分子により捕獲させてよい。しかしながらこれは、所望の応答を得るために必要な量および所望の応答の強度に影響してくると予測される。全身免疫応答を誘発するために必要なMHC分子構築物の量は典型的には0.0001~10000mg/kg/用量、例えば0.01~1000mg/kg/用量、0.1~100mg/kg/用量、または1~10mg/kg/用量の範囲である。一般的に、使用するMHC分子は異種反応の危険性を回避ないしは最小限とするためには投与対象と共同的作用を示すものであるべきである。

20

【0363】

本発明の組成物の投与は単回用量または複数回の用量である場合もある。特定の場合においては、1回の投与で十分である場合もある。一般的に数回の用量を、1日、1週、2週、1箇月、または数箇月などの間隔において与える必要がある。例えば、単回用量を1回で投与するか、またはある用量をプライマーとして与え、その後、1回以上投与するか、または1週当たり4回までの連続投与様式を用い、その後1ヶ月投与を行わず、さらにその後1週当たり4回までの投与（場合によりMHC分子構築物の量を漸増させる）などを行なってよい。場合により、種々のアジュバントまたはアジュバントの組み合わせを異なる投与様式で用いてよい。これらは全て例示のみであり、最適な投与様式は該当するMHC分子構築物およびその他の幾つかの要因に依存する。これを最適化する方法は当業者は容易に知るだろう。

30

【0364】

当然ながら、治療を増強または支援するために他の医薬品を同時に投与してもよい。

【0365】

特に、MHC分子は連結されていないが生物学的に活性な分子が連結されている1つ以上のMHC分子構築物をMHC分子構築物と共に投与して、組成物のMHC分子構築物が対象とするMHC認識細胞クローンよりも他のMHC認識細胞クローンを刺激、アップレギュレート、ダウンレギュレート、抑制または増強してよい。これはまた対象となる細胞クローンへの応答を促進するために添加しても良い。特にこのような生物学的に活性な分子は前述したMHC分子構築物の一部であってよい。

40

【0366】

本発明の治療用組成物を混合し、保存するための容器はガラスまたは種々の重合体材料よりなるものであってよい。選択される容器は保存されている生成物を吸着しないものでなければならない。容器は単一用量または多用量のアンプルまたはキャップ付きバイアルであるのが適している。

50

【0367】

本発明はまた本発明の治療用組成物を製造するための方法に関し、該方法は、下記工程：

本明細書に記載したMHC分子構築物を提供する工程、および、
治療用物質に適する媒体中にMHC分子構築物を溶解または分散させる工程、および、
場合により他のアジュバントおよび/または賦形剤を添加する工程、
を包含する。

【0368】

エキスビボ療法

上記のように、本発明の組成物はエキスビボ療法に適している。

10

即ち、本発明は特にMHC認識細胞の有効量を有効成分として含有する治療用組成物に関し、該MHC認識細胞は下記工程：

本明細書に記載したMHC分子構築物を用いて被験体からMHC認識細胞を単離する工程、および、
該MHC認識細胞を臨床的に適切な数量まで増殖させる工程、
により得られる。

【0369】

MHC認識細胞を単離した後、これらは所望により遺伝子的に、または任意の他の適切な方法で修飾するか操作した後に、増殖させてもよい。

【0370】

20

MHC認識細胞は多くの方法で単離でき、それらは以下においてより詳細に説明する。

【0371】

特に：

1) 本明細書において定義した1つ以上のMHC分子構築物を被験体由来のサンプルと接触させ、これによりMHC分子構築物をサンプル中のMHC認識細胞に結合させる。次にMHC分子構築物をサンプルから回収し、その後、MHC認識細胞をMHC分子構築物から遊離させ、その後、増殖させ得る。

2) 1つ以上の本明細書において定義したMHC分子構築物を被験体由来のサンプルと接触させ、これによりMHC分子構築物をサンプル中のMHC認識細胞に結合させる。次にMHC分子構築物をサンプルから回収し、その後、MHC認識細胞をMHC分子構築物から遊離させ、その後、1つ以上の他のMHC分子構築物存在下で増殖させ得る。

30

3) 本明細書において定義した固体または半固体の支持体上に固定化された本明細書において定義した1つ以上のMHC分子構築物を被験体由来のサンプルと接触させ、これによりMHC分子構築物をサンプル中のMHC認識細胞に結合させる。次にMHC分子構築物をサンプルから回収し、その後、MHC認識細胞をMHC分子構築物から遊離させ、その後、増殖させ得る。

4) 本明細書において定義した固体または半固体の支持体上に固定化された本明細書において定義した1つ以上のMHC分子構築物を被験体由来のサンプルと接触させ、これによりMHC分子構築物をサンプル中のMHC認識細胞に結合させる。次にMHC分子構築物をサンプルから回収し、その後、MHC認識細胞をMHC分子構築物から遊離させ、その後、1つ以上の他のMHC分子構築物の存在下で増殖させ得る。

40

5) 本明細書において定義した固体または半固体の支持体上に固定化された本明細書において定義した標識された1つ以上のMHC分子構築物を被験体由来のサンプルと接触させ、これによりMHC分子構築物をサンプル中のMHC認識細胞に結合させる。次にMHC分子構築物をサンプルから回収し、その後、MHC認識細胞をMHC分子構築物から遊離させ、その後増殖させ得る。

6) 本明細書において定義した固体または半固体の支持体上に固定化された本明細書において定義した標識された1つ以上のMHC分子構築物を被験体由来のサンプルと接触させ、これによりMHC分子構築物をサンプル中のMHC認識細胞に結合させる。次にMHC分子構築物をサンプルから回収し、その後、MHC認識細胞をMHC分子構築物から遊離させ、その後、1

50

つ以上の他のMHC分子構築物の存在下で増殖させ得る。

7) 本明細書において定義した1つ以上のMHC分子構築物を被験体由来のサンプルと接触させ、これによりMHC分子構築物をサンプル中のMHC認識細胞に結合させる。次に、MHC分子構築物を結合したMHC認識細胞を含有するサンプルをMHC認識細胞またはMHC分子構築物のいずれかの部分に結合する能力を有する1つ以上の分子を自らに固定させてある本明細書において定義した固体または半固体の支持体と接触させることにより、結合したMHC認識細胞を有するMHC分子構築物を支持体に結合させる。MHC認識細胞を有するこのようにして結合されたMHC分子構築物を次にサンプルから回収し、その後、MHC認識細胞をMHC分子構築物から遊離させ、その後、増殖させ得る。

8) 本明細書において定義した標識された1つ以上のMHC分子構築物を被験体由来のサンプルと接触させ、これによりMHC分子構築物をサンプル中のMHC認識細胞に結合させる。次に、MHC分子構築物を結合したMHC認識細胞を含有するサンプルをMHC認識細胞またはMHC分子構築物の任意の部分に結合する能力を有する1つ以上の分子を自らに固定させてある本明細書において定義した固体または半固体の支持体と接触させることにより、結合したMHC認識細胞を有するMHC分子構築物を支持体に結合させる。MHC認識細胞を有するこのようにして結合されたMHC分子構築物を次にサンプルから回収し、その後、MHC認識細胞をMHC分子構築物から遊離させ、その後、1つ以上の他のMHC分子構築物の存在下で増殖させる。

【0372】

上記例示は全ての方法を網羅するものではない。

【0373】

MHC分子構築物とサンプルとの間の接触の時間は数種類の要因、とりわけ、対象となるMHC分子構築物および接触を行なう条件に依存する。接触時間はMHC分子構築物へのMHC認識細胞の結合を可能にするのに十分なものである。これを最適化する方法は当業者は容易に知るだろう。一般的に、サンプルおよびMHC分子構築物は10分～2時間、例えば20～45分間、4℃～20℃の温度で接触させ得る。

【0374】

MHC認識細胞が上記において示したものであることは認識されるべきである。

「サンプル」とは上記において定義した意味を有することは認識される。特にサンプルは末梢血の単核細胞(PBMC)または他の血液由来の調製物、例えば白血球搬出法による産物、または骨髓、脾臓または臍帯であってよい。サンプルはそのまま使用するか、または種々の精製、脱汚染、濾過、または濃縮法、および/あるいは免疫磁性的分離のようなサンプルの一部を単離または除去する方法に付してよい。

【0375】

MHC認識細胞に結合されたMHC分子構築物は、磁場の使用により(支持体が磁性粒子またはビーズである場合)(即ち免疫磁性的分離法)、または、フローサイトメーターのような細胞分類装置を用いることにより、適宜単離してよい。後者の単離方法の場合は、MHC分子構築物は適宜標識してよい。MHC分子構築物とサンプルの接触の後に固体または半固体支持体への固定化を行なう場合は、MHC認識細胞を有するMHC分子構築物はそれに結合することのできる化合物を用いて固定化してよい。適切なものは上記のとおりである。より大量のサンプルからのMHC認識細胞の免疫磁性的単離のためには、使い捨ての血液バッグが適用され得る。このような目的に適する装置の例は、Isolex(登録商標)300iまたはMaxSep(登録商標)装置(バクスター・ヘルスケア(Baxter Healthcare)社)またはCliniMACS(ミリテイニ・バイオテック(Miltenyi Biotech)社)である。

【0376】

MHC認識細胞は国際公開第99/11661号パンフレット(参考文献29)に記載のとおりDNaseにより消化されたDNAリンカー、温度感受性エラスチンリンカーのような操作法により、国際公開第91/15766号パンフレット(参考文献30)に記載のとおり抗体を脱着することにより、インキュベーションによる遊離により、そして当業者に公知の他の遊離機序により、MHC分子構築物から遊離させることができる。

【0377】

MHC分子構築物は上記の定義に従って、1つ以上の生物学的に活性な分子を有してよい。これは、例えば、所望のMHC認識細胞を吸引するために、そして単離法の結果として起こるアポトーシスの潜在的な誘導を低減または防止するために、含めることができる。

細胞の増殖は上記定義した1つ以上のMHC分子構築物の存在下に行なってよいことは理解されるべきである。このように使用されるMHC分子構築物はMHC認識細胞の捕獲のために用いたものと同じであっても異なってもよい。これは上記定義に従って、1つ以上の生物学的に活性な分子を含んでよい。このような生物学的に活性な分子はさらに、MHC認識細胞上のTCRおよび同時刺激分子との複数の相互作用をさらに促進し、MHC認識細胞の効率的なエキスピボの刺激をもたらす。例えば同時刺激分子およびそのリガンドの結合親和性はMHC分子ペプチド複合体とTCRの結合親和性と同じ範囲にある（10mM範囲）。このような生物学的に活性な分子の含有により増殖中の刺激抗体のかわりとして天然の分子の使用が促進されるが、その理由は複数の結合相互作用を導入することによりそれらが低親和性を補っているためである。特にMHC認識細胞は、1) 対象となるMHC認識細胞クローンよりも他のMHC認識細胞クローンを、ならびに、2) 対象となるMHC認識細胞クローンを、刺激、アップレギュレート、ダウンレギュレート、抑制または増強するために、MHC分子は結合していないが生物学的に活性な分子が結合した、1つ以上のMHC分子構築物の存在下に増殖させてよい。増殖はまた、樹状細胞または間質細胞のような支持細胞の存在下に行なってよい。

【0378】

細胞の増殖はさらにまた別の化合物、例えば細胞の増殖を促進または刺激し、非該当細胞の生育を抑制し、あるいは、所望の細胞を選択する化合物の存在下に行なってもよい。これは例えば、1つ以上の上記の生物学的に活性な分子であることができる。そのような別の化合物はまた、サイトカイン類、例えばリンホカイン、インターフェロン、インターロイキン、成長因子およびコロニー刺激因子から選択してもよい。例えばIL-2を添加して細胞の増殖を増強したり、そして、他のサイトカインを添加して所望の特定の分化パターンを誘導してもよい。例えば、IL-4はTh2亜集団へのT細胞集団の分化を誘導し、そしてINF-gは、Th1亜集団への分化を誘導する。当然ながら、適切な培養培地および適切な条件が細胞を増殖させそして維持するのに用いられることが必要である。増殖時間は通常は3～10日であるが、細胞の生存性および持続的増殖が維持される限り、14～20日、あるいはそれ以上長い期間であることもできる。

【0379】

特定の局面において、本発明はMHC認識細胞を得る方法に関し、該方法は、下記工程：

本明細書において記載したMHC分子構築物を、MHC分子構築物にMHC認識細胞が結合するような条件下で、MHC認識細胞を含有することが疑われるサンプルと接触させる工程、および、結合したMHC分子構築物およびMHC認識細胞を単離する工程、を包含する。

【0380】

このような方法は、例えば、本発明の治療用組成物のMHC認識細胞を得るのに適している。このような方法はさらに、ランダムペプチドをMHC分子構築物の一部として適用することができ、かつMHC認識細胞に対するその結合効果を試験することができる、新しい疾患関連ペプチドの同定のために価値あるものと考えられる。この方法は免疫磁性的分離法により、または、フローサイトメトリーにより適宜行なうことができる。

【0381】

本発明はまた本発明の治療用組成物の製造方法に関し、該方法は、下記工程：

上記のMHC分子構築物を用いてMHC認識細胞を得る工程、
該MHC認識細胞を臨床的に適する数量まで増殖させる工程、
得られた細胞を投与に適する媒体中で製剤する工程、および、
場合によりアジュバントおよび/または賦形剤を添加する工程、
を包含する。

【0382】

本発明はまたMHC認識細胞を得るためのキットに関する。1つの実施態様において、このようなキットは、場合により本明細書において定義した固体または半固体の支持体に固定化された、本明細書において定義した1つ以上のMHCタンパク質構築物を含有する。別の実施態様において、このようなキットは本明細書において定義した1つ以上のMHCタンパク質構築物およびMHC認識細胞への結合の前または後の単数または複数のMHC分子構築物の固定化のための手段を含む。

【0383】

本発明はさらにまた一般的にMHC認識細胞のエキスビボの増殖のための本明細書に記載したMHC分子構築物の使用に関する。このようなエキスビボの細胞増殖のためには、MHC分子構築物は可溶性の形態で提供してよい。MHC分子構築物はまた固体または半固体の支持体上に固定化して提供してもよい。固体および半固体の支持体は上記のとおりである。ビーズおよび粒子が特に好ましく、特に重合体、磁性または超常磁性体の粒子またはビーズが好ましい。特に、MHC分子構築物は1つ以上の上記の生物活性化合物を有してよい。

【0384】

以下においてさらに特定の操作法を癌性疾患とのかかわりにおいて記載するが、操作法は他の疾患にも等しく適用される。

【0385】

例えば腫瘍細胞の免疫系への抑制効果を克服するための1つの方法は、標準的なアフエレーシス処置を通して被験体から免疫関連細胞を除去すること、および、その免疫細胞をエキスビボで増殖および修飾した後に患者に再注入することである。これは腫瘍細胞の抑制圧力を取り除くのみならず、化学療法および放射線療法を含む免疫抑制治療の前に免疫応答性細胞の救済を可能にするのである。

【0386】

末梢血T細胞を被験体から取り出し、T細胞の増殖を可能にする条件下、培養物に入れる。このような条件は、T細胞を有糸分裂促進物質または抗原と共にサイトカイン（IL-2）および抗原提示細胞としての樹状細胞の存在下に生育させることを含む。抗原は腫瘍からのタンパク質抽出物、所定のタンパク質抗原またはペプチドとして、あるいは、樹状細胞内にトランスフェクトされた腫瘍mRNAまたはDNAとしてのいずれかで培養物に導入することができる。あるいは、T細胞の増殖プロトコールは、可溶性の形態で、または、固相に結合させた、抗CD3および抗CD28抗体のような刺激抗体の使用を含むように考案されている。このような抗体系の増殖プロトコールの利点は、それらが、入手が容易でない支持細胞および腫瘍抗原の必要性を回避している点である。しばしば、100～1000倍のオーダーでのエキスビボのT細胞増殖の後、腫瘍に対する免疫機能を再生または増強するためにT細胞を患者に再注入する。

【0387】

免疫系のT細胞が多様な特異性を発現することはよく知られており、そして僅かに限定された数の使用可能なT細胞のクローンが腫瘍細胞の認識と殺傷に関する特異性を発現する。

【0388】

T細胞の増殖のための従来技術のプロトコールの大部分は腫瘍抗原に対するT細胞の抗原特異性を考慮しておらず、そして、多様な無関係のT細胞の特異性を有するT細胞のポリクローナルな増殖をもたらしている。増殖したT細胞はサイトカインの生産を通じて患者の免疫機能の再生を支援するものの、僅か一部の再注入されたT細胞のみが直接細胞を認識して殺傷できると予測される。さらにまた、T細胞のポリクローナル増殖は自己免疫特異性を有するT細胞のクローンを増殖させる危険性を増大させる。

【0389】

本発明は特に腫瘍抗原に対して公知の特異性を有するT細胞を用いた養子免疫療法に関する。免疫療法のこの局面において、予め測定されている腫瘍抗原に対して特異的なCD4およびCD8 T細胞を、免疫磁性的分離法により、または、フローサイトメトリー操作法により、抹消血、アフエレーシス産物、骨髓、リンパ節、原発腫瘍、二次臓器転移および

他の組織から単離することができる。場合により精製した後、細胞をエクスピボで増殖させ、患者に再注入することができる。このように増殖させた抗原特異的なT細胞は直接腫瘍細胞を標的とする能力を有し、このため、ポリクローナル増殖されたT細胞よりもさらに効率的なものとなる。さらにまた、抗原特異的T細胞の使用は自己免疫特異性を有するT細胞クローンを再注入する潜在的な危険性を低減する。

【0390】

本発明によれば、本明細書において定義したMHC分子構築物を自らに固定化させて保有する好ましくは上記定義したビーズまたは粒子の形態である上記のように規定された支持体は、操作およびサンプルからの該当細胞の分離を支援するように適用してよい。即ち、磁性粒子を有する支持体は磁性凝集により容易に除去でき、これにより、結合細胞をエクスピボで分離する迅速で簡素で効率的な方法を提供する。

10

【0391】

連結した特異的T細胞を有する磁性粒子またはビーズは、例えば、永久磁石を用いる磁場の適用により適切な固体または半固体の支持体上のサンプルからエクスピボで取り出すことができる。通常はサンプル混合物の入った容器の側面に磁石を適用して粒子を容器壁面に凝集させ、サンプルの残りを流出除去することで十分である。

【0392】

特に好ましいものは超常磁性粒子であるが、その理由は、反応の間の磁性凝集および粒子の集塊形成が回避できるためである。Dynabeads（登録商標）（Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway）が特に適する例の一つである。

20

【0393】

好都合な実施態様において、MHC分子構築物はサンプルと接触させる前に支持体に結合させてよい。このような結合は当該分野で周知の方法（例えばカップリング化学）により容易に行なうことができ、そして好都合にはMHC分子構築物は例えばコーティングにより固体支持体に直接結合させる。しかしながら、MHC分子構築物はまたスパーサー、リンカーまたは上記の抗体を介して連結させてもよい。MHC分子構築物は選択により共有結合させるか、または可逆的に結合してもよい。

【0394】

あるいは、上記のように、MHC分子構築物を先ずサンプルと接触させ、固体支持体に結合させる前にT細胞に結合させてもよい。この場合、固体支持体は、MHC分子構築物に結合することによりMHC分子構築物を捕獲することのできる上記の分子を共有結合により担持するか、これを具備されてよい。非限定的な例として、結合成分に対する抗体、担体分子に対する抗体、ビオチニル化担体分子と共に用いるためのストレプトアビジンまたはその誘導体、および、抗白血球抗体が挙げられる。

30

【0395】

1種を超えるMHC分子構築物を使用する場合は、それらは同じかまたは異なる支持体に結合させてよい。このような異なる固体支持体を使用する系はビーズまたは粒子のような粒状支持体の場合に特に適用される。即ち、異なるMHC分子構築物を異なるビーズまたは粒子に結合させてよい。このようなビーズまたは粒子は適宜、異なる大きさや特徴を有してよく、即ちこれらは、異なるMHC分子構築物に応じた分離を可能とする。

40

【0396】

1種を超える異なる種類のMHC分子構築物を用いる1つの実施態様において、異なる種類のMHC分子構築物を使用する適切な量または比率は当業者が容易に決定するだろう。

【0397】

上記のように、固相親和性結合に基づく細胞分離方法（例えば免疫磁性分離（IMS））は当該分野でよく知られており、これを行なう条件は当業者が容易に決定してよい。即ち、例えば抗白血球抗体を担持した固体支持体をサンプルと接触させてよい。粒状の固体支持体は、例えば、適切な培地（例えば緩衝液）中に含有（例えば懸濁）されたサンプルに添加してよい。次に支持体を細胞への結合を起こすことのできる長さの時間に渡り、サンプルと接触させたまま放置（例えばインキュベート）してもよい。工程中の条件は厳密で

50

は無く、サンプル支持体混合物は例えば4℃～20℃で、10分～2時間、例えば20～45分インキュベートしてよい。

【0398】

抗原特異的なT細胞は通常は極めて低い頻度で生じる。抗原特異的T細胞が低頻度であるため、これらの細胞は免疫磁性的単離では困難な標的となっている。さらにまた、抗体とその標的分子との結合親和性(10～0.1nMの範囲)と比較して、MHCペプチド複合体とTCRの間の結合親和性は比較的低い(10mMのオーダー)。MHCペプチド複合体の低い結合親和性は細胞単離のために使用する固相とT細胞表面上のTCRの間に複数の結合部位を導入することにより補うことができる。本発明においては、これはポリリガンド分子に複数のMHCペプチド複合体を共役させることにより達成される。複数のこのようなポリリガンド分子を固相にカップリングさせることにより、T細胞への結合の親和性が増大され、標的T細胞の効率的な単離が促進される。

10

【0399】

抗原特異的T細胞の効率的な単離は、細胞単離工程の前にビーズまたは粒子にMHC共役重合体分子をカップリングさせることにより、または、間接的に、MHC分子構築物の一部に対して結合親和性を有するビーズまたは粒子を導入する前に、可溶性MHC分子構築物をサンプルと混合することにより達成することができる。

【0400】

単離後、T細胞は生育および増殖を促進する条件下で培養することができる。T細胞の活性化および増殖は、上記のように、抗原提示細胞により送達される2種の異なるシグナルに依存している。第1のシグナルはMHCペプチド複合体からTCRに送達される抗原特異的シグナルである。第2のシグナルは抗原提示細胞上の同時刺激分子により送達される抗原非特異的シグナルである。このような同時刺激分子には、T細胞上のCD28分子と相互作用を示すB7-1 およびB7-2、ならびに他の同時刺激分子、例えばLFA-3、CD3、CD40、ICOS、NKG2D、OX40およびCD137が包含される。

20

【0401】

上記の通り、増殖した細胞の投与は任意の好都合な経路であってよい。典型的には各投与のための細胞の数は約 10^9 ～ 10^{11} 個の細胞でなければならない。細胞は投与経路および治療すべき疾患に応じて、約50ml～約1リットル、約50ml～約500ml、約50ml～約250ml、約50ml～約150ml、または約50ml～約100mlの容量中で適宜投与され得る。細胞は単回用量または複数回の用量で投与してよい。特定の場合においては、1回の投与で十分である場合もある。一般的に、数回の用量を1日、1週、2週、1箇月、または数箇月などの間隔において与える必要がある。例えば、単回用量を1回で投与するか、または、ある用量をプライマーとして与え、その後、1回以上投与するか、または1週当たり4回までの連続投与様式を用い、その後1ヶ月投与を行わず、さらにその後1週当たり4回までの投与(場合により細胞の量を増減させる)などを行なってよい。場合により、種々のアジュバントまたはアジュバントの組み合わせを異なる投与様式で用いてよい。これらは全て例示のみであり、最適な投与様式は該当する細胞およびその他の幾つかの要因に依存する。これを最適化する方法は当業者は容易に知るだろう。当然ながら、治療を増強または支援するため、他の医薬品を同時に投与してもよい。

30

40

【0402】

特に、本明細書において定義したMHC分子構築物、あるいはMHC分子は結合していないが生物学的に活性な分子が結合した1つ以上のMHC分子構築物を治療用組成物と共に投与して、組成物のMHC分子構築物の対象となるMHC認識細胞クローンよりも他のMHC認識細胞クローンを刺激、アップレギュレート、ダウンレギュレート、抑制または増強してよい。このような構築物は場合により生体分解性の粒子に固定化してもよい。

【0403】

本発明の治療用組成物を混合し、保存するための容器はガラスまたは種々の重合体材料よりなるものであってよい。選択される容器は保存されている生成物に本質的に影響しないものでなければならない。容器は単一用量または多用量のアンブルまたはキャップ付き

50

バイアルであるのが適している。

【0404】

MHC分子の使用

特定の局面において、本発明は、
組織学的方法におけるMHC分子の使用、および、
細胞学的方法におけるMHC分子の使用、
に関する。

【0405】

このような方法はサンプルマウント方法である。「組織学的」および「細胞学的」という用語は前述の通り定義される。「マウント (mount)」という用語は前述の通り定義される (サンプルマウント法)。

10

【0406】

本発明のこの局面は、MHC分子またはMHC分子の多量体自体は低い内因性親和性のためにある用途にはあまり適していないものの、それらはサンプル搭載用途においては意外にも良好な挙動を示すという驚くべき認識に基づいている。

【0407】

上記の全ての定義、説明、および解釈は本発明のこの局面にも相互に適用されるものとする。

【0408】

即ち、1つの実施態様において、本発明はサンプル中のMHC認識細胞の存在を測定するための方法におけるMHC分子の使用に関し、ここではサンプルのMHC認識細胞は支持体上に搭載される。

20

【0409】

このような方法は種々の疾患の診断における強力な手段となる。診断を確立することは幾つかの方法では重要である。診断は疾患に関する情報を与え、即ち患者に適切な治療を与えることができる。さらにまた、より特異的な診断を確立することは特定の治療が有益となる疾患のサブタイプに関する重要な情報を与える場合がある (即ち、疾患の種々のサブタイプにはMHC認識細胞により認識される異なるペプチドの提示が関与し得、即ち、治療は特定のサブタイプに対して効果的に標的設定することができる)。この方法により、疾患または症状の進行を通じて出現する異常な細胞に関する情報を獲得したり、あるいは、細胞の特異性の影響の有無またはその態様について調べることができるようになる。MHC分子の結合がこれらの選択肢を可能とするが、その理由は、結合がサンプル中のMHC認識細胞の存在、ひいては、ペプチドを提示するMHC分子の存在の指標となるからである。

30

【0410】

別の実施態様において、本発明はサンプル中のMHC認識細胞の存在をモニタリングするための方法におけるMHC分子の使用に関し、ここではサンプルのMHC認識細胞は支持体上に搭載される。

【0411】

このような方法は、例えば治療の効果を緊密に追跡するための、疾患の進行のモニタリングにおいて、強力な手段となる。方法は、一般的には、良好な方法で疾患を維持管理するため、患者が最適な治療を受けることを確実にするため、治療を調節するため、寛解または再発を確認するため、および、疾患を治癒または緩和させない医薬品が患者に投与されないことを確実にするために用いることができる。この方法により、疾患または症状の進行を通じて出現する異常な細胞をモニタリングしたり、あるいは、T細胞の特異性の影響の有無およびその態様について調べることができるようになる。MHC分子の結合はこれらの選択肢を可能とするが、その理由は、結合がサンプル中のMHC認識細胞の存在、ひいては、ペプチドを提示するMHC分子の存在の指標となるからである。

40

【0412】

さらに別の実施態様において、本発明はMHC認識細胞の関与する疾患の状態を測定するための方法におけるMHC分子の使用に関し、ここではサンプルのMHC認識細胞は支持体上に

50

搭載される。

【0413】

このような方法は、種々の疾患を維持管理する際の価値ある手段となる。疾患は例えばある段階から別の段階へ変化することができ、即ち、疾患の状態を測定できることは重要である。この方法により、疾患または症状の進行を通じて出現する異常な細胞に関する情報を獲得したり、あるいは、細胞の特異性の影響の有無またはその態様について調べることができるようになり、これにより疾患または症状の状態を測定できるようになる。MHC分子の結合はこれらの選択肢を可能とするが、その理由は、結合がサンプル中のMHC認識細胞の存在、ひいては、ペプチドを提示するMHC分子の存在の指標となるからである。

【0414】

さらに別の実施態様において、本発明はMHC認識細胞が関与する疾患の予後を明らかにするための方法におけるMHC分子の使用に関し、ここではサンプルのMHC認識細胞を支持体上に搭載する。

【0415】

このような方法は、疾患を管理するため、一般的には、効果なく患者が治療されないことを確実にするため、疾患が最適な方法で治療されることを確実にするため、そして、生存または治癒の機会を予測するための価値ある手段である。この方法により、疾患または症状の進行を通じて出現する異常な細胞に関する情報を獲得したり、あるいは、T細胞の特異性の影響の有無またはその態様について調べることができるようになり、これにより予後を明らかにできるようになる。MHC分子の結合はこれらの選択肢を可能とするが、その理由は、結合がサンプル中のMHC認識細胞の存在、ひいては、ペプチドを提示するMHC分子の存在の指標となるからである。

【0416】

本発明はまたMHC認識細胞の関与する疾患の診断のための方法におけるMHC分子の使用に関し、ここではサンプルのMHC認識細胞を支持体上に搭載する。

【0417】

このような診断方法は種々の疾患の診断における強力な手段となる。診断を確立することは幾つかの方法では重要である。診断は疾患に関する情報を与え、即ち患者に適切な治療を与えることができる。さらにまた、より特異的な診断を確立することは特定の治療が有益となる疾患のサブタイプに関する重要な情報を与える場合がある（即ち、疾患の種々のサブタイプにはMHC認識細胞により認識される異なるペプチドの提示が関与しており、即ち、治療は特定のサブタイプに対して効果的に標的設定することができる）。疾患または症状の進行を通じて生じる異常な細胞、ならびにT細胞の特異性の影響の有無またはその態様に関する価値ある情報も得られる。MHC分子の結合はこれらの選択肢を可能とするが、その理由は、結合がサンプル中のMHC認識細胞の存在、ひいては、ペプチドを提示するMHC分子の存在の指標となるからである。

【0418】

本発明はまたサンプル中のMHC認識細胞の存在に細胞の形態を相関させる方法におけるMHC分子の使用に関する。

【0419】

このような方法は、MHC分子構築物の結合パターンおよび分布が直接観察できることから、組織学的方法の分野において適用される場合に特に価値あるものである。このような方法においてはサンプルの個々の細胞の形態が温存されるようにサンプルを処理する。得られる情報は、罹患部位が直接観察できることから診断操作において一般的に重要である。

【0420】

上記の通り、MHC分子の使用はサンプル搭載法において行なう。即ち、サンプルを支持体上に搭載する。支持体は固体または半固体の表面から選択される。特に、支持体はスライドガラス、膜、フィルター、重合体スライド、チャンバースライド、皿、およびペトリ皿から選択する。

【0421】

サンプルは適宜、組織学的材料、細胞学的材料、原発腫瘍、二次臓器転移、微細針吸引物、脾臓組織、骨髓標本、細胞スメア、剥脱細胞学的標本、接触標品、口腔スワブ、喉頭スワブ、膈スワブ、気管支洗浄液、胃洗浄液、臍帯由来物、および体液由来物、例えば血液（例えば、血液から単離した末梢血単核細胞（PBMC）集団、または他の血液由来標品、例えば白血球搬出産物）、喀出サンプル由来物、痰および気管支吸引物から選択してよい。これらを種々の処理に付してよい。ここにおいても適用される上記の定義を参照できる。

【0422】

使用されるMHC分子は、

10

重鎖、 β_2m と組み合わせられた重鎖、ペプチドと組み合わせられた重鎖、および、ペプチドを有する重鎖/ β_2m 二量体よりなる群から選択されるMHCクラスI分子；

または α/β 二量体、ペプチドを有する α/β 二量体、親和性タグを介して組み合わせられた α/β 二量体、および、ペプチドを有する親和性タグを介して組み合わせられた α/β 二量体よりなる群から選択されるMHCクラスII分子；

あるいは、MHCクラスI様分子、または、MHCクラスII様分子、である。

【0423】

「MHC分子」、「MHCクラスI分子」および「MHCクラスII分子」という用語に関する上記定義をここでも適用する。

20

【0424】

MHC分子はヒト、ネズミ、ラット、ブタ、ウシまたはトリの分子のような脊椎動物のMHC分子であることが適し得る。これらの分子に関する上記の説明をここでも適用する。

【0425】

特に、使用されるMHC分子はヒトMHC分子であり得る。

使用されるMHC分子はペプチドを含まないMHC分子またはペプチドで満たされたMHC分子であることができる。

【0426】

使用されるMHC分子は適宜、結合成分に結合させてよい。適切な結合成分は上記のもの、例えばストレプトアビジン（SA）およびアビジンおよびその誘導体、ビオチン、免疫グロブリン、抗体（モノクローナル、ポリクローナルおよび組み換え）、抗体フラグメントおよびその誘導体、AP-1のロイシンジッパードメイン（junおよびfos）、ヘキサ-his（金属キレート部分）、ヘキサ-hat GST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）、グルタチオン親和性、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、Strep-タグ、セルロース結合ドメイン、マルトース結合タンパク質、S-ペプチドタグ、キチン結合タグ、免疫反応性エピトープ、エピトープタグ、E2タグ、HAエピトープタグ、Mycエピトープ、FLAGエピトープ、AU1およびAU5エピトープ、Glu-Gluエピトープ、KT3エピトープ、IRSエピトープ、Btagエピトープ、プロテインキナーゼCエピトープ、VSVエピトープ、多様な化合物への結合を媒介するレクチン、例えば炭水化物、脂質およびタンパク質、例えばCon A（カナバリア・エンシホルミス（*Canavalia ensiformis*））またはWGA（小麦胚芽アグルチニン）およびテトラネクチンまたはタンパク質AまたはG（抗体親和性）である。結合成分は上記のものの組み合わせであってもよい。

30

40

【0427】

各結合成分は適宜、そこに結合させた状態で、1~10個のMHC分子、例えば1~9個、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、1~3個、または1~2個のMHC分子を有してよい。このようなMHC分子は同じであるかまたは異なっている（即ち異なる種に由来してもよい）。MHC分子がペプチドで満たされている場合は、そのペプチドは同じであるかまたは異なっている。結合成分に結合させるMHC分子の数は、結合成分の能力によってのみ制限される。1個より多いMHC分子が結合成分に結合している場合は、それはここではMHC分子多量体、例えば二量体（2個のMHC分子）、三量体（3個のMHC分子）および四量

50

体（4個のMHC分子）と称する。この数字は上記の説明を参照できるように、平均値と解釈される。即ち、平均の数は整数である必要は無く、2つの整数の間の任意の数値であることができる（即ち小数）。

【0428】

MHC分子の検出を可能とするためには、MHC分子はさらに標識化合物を有することができる。標識化合物は直接または間接的に検出可能なものであるのが適している。即ち、標識化合物は、蛍光標識、酵素標識、放射性同位体、化学発光標識、生物発光標識、重合体、金属粒子、ハプテン、抗体または染料であってよい。特に、標識化合物は下記：

5-（および6）-カルボキシフルオレセイン、5-または6-カルボキシフルオレセイン、6-（フルオレセイン）-5-（および6）-カルボキサミドヘキサン酸、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、テトラメチルローダミン、および、染料類、例えばCy2、Cy3およびCy5、場合により置換されたクマリン、例えばAMCA、PerCP、フィコビリタンパク質、例えばR-フィコエリスリン（RPE）およびアロフィコエリスリン（APC）、テキサスレッド、プリンセストンレッド、緑色蛍光タンパク質（GFP）およびその類縁体、およびR-フィコエリスリンまたはアロフィコエリスリンと例えばCy5またはテキサスレッドとの結合体、および、半導体ナノ結晶系の無機の蛍光標識（例えば量子ドットおよびQdot（登録商標）ナノ結晶）およびEu³⁺およびSm³⁺のようなランタニド系の経時的分割蛍光標識、

ハプテン類、例えばDNP、ビオチンおよびジゴキシギニンから選択されるか、あるいは、

酵素標識、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、ベータガラクトシダーゼ（GAL）、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ベータ-N-アセチルグルコサミニダーゼ、β-グルクロニダーゼ、インペルターゼ、キサンチンオキシダーゼ、ホタルルシフェラーゼおよびグルコースオキシダーゼ（GO）から選択されるか、あるいは、

発光標識、例えばルミノール、イソルミノール、アクリジニウムエステル類、1,2-ジオキセタン類およびピリドピリダジン類から選択されるか、あるいは、

放射性標識、例えばヨウ素、コバルト、セレン、トリチウムおよびリンの結合同位体から選択される。

【0429】

標識化合物はMHC分子、結合成分、またはMHC分子と結合成分の両方に結合してよい。

【0430】

即ち、本発明は下記工程：

(a) 支持体上に搭載されたMHC認識細胞を有することが疑われるサンプルを準備する工程、

(b) 明細書に記載したMHC分子にサンプルを接触させる工程、および、

(c) 結合がMHC認識細胞の存在を示すようなMHC分子の任意の結合を測定する工程、を包含するサンプル中のMHC認識細胞の存在を検出するための方法に関する。

【0431】

本発明はさらにまた、下記工程：

(a) 支持体上に搭載されたMHC認識細胞を有することが疑われるサンプルを準備する工程、

(b) 明細書に記載したMHC分子にサンプルを接触させる工程、および、

(c) MHC分子の任意の結合を測定することによりMHC認識細胞をモニタリングする工程、を包含するMHC認識細胞をモニタリングするための方法に関する。

【0432】

本発明はさらに、下記工程：

(a) 支持体上に搭載されたMHC認識細胞を有することが疑われるサンプルを準備する工程、

(b) 明細書に記載したMHC分子にサンプルを接触させる工程、および、
(c) MHC分子の任意の結合を測定することによりMHC認識細胞が関与する疾患の予後を明らかにする工程、
を包含するMHC認識細胞の関与する疾患の予後を明らかにするための方法に関する。

【0433】

本発明はさらに、下記工程：

(a) 支持体上に搭載されたMHC認識細胞を有することが疑われるサンプルを準備する工程、

(b) 明細書に記載したMHC分子にサンプルを接触させる工程、および、

(c) MHC分子の任意の結合を測定することにより分子認識細胞の関与する疾患の状態を測定する工程、
を包含するMHC認識細胞の関与する疾患の状態を測定するための方法に関する。

10

【0434】

本発明はさらに、下記工程：

(a) 支持体上に搭載されたMHC認識細胞を有することが疑われるサンプルを準備する工程、

(b) 明細書に記載したMHC分子にサンプルを接触させる工程、および、

(c) MHC分子の任意の結合を測定することにより細胞の形態にMHC分子構築物の結合を相関づける工程、
を包含するサンプル中のMHC認識細胞の存在に細胞の形態を相関づける方法に関する。

20

【0435】

本発明はさらに、下記工程：

(a) 支持体上に搭載されたMHC認識細胞を有することが疑われるサンプルを準備する工程、

(b) 明細書に記載したMHC分子にサンプルを接触させる工程、および、

(c) MHC分子の任意の結合を測定することによりMHC認識細胞の関与する疾患を診断する工程、
を包含するMHC認識細胞の関与する疾患を診断するための方法に関する。

【0436】

本発明はさらに、下記工程：

(a) 支持体上に搭載された医薬品による治療を受けている被検体に由来するサンプルを準備する工程、

(b) 明細書に記載したMHC分子にサンプルを接触させる工程、および、

(c) MHC分子の任意の結合を測定することにより医薬品の有効性を測定する工程、
を包含するMHC認識細胞の関与する疾患に対する医薬品の有効性を測定するための方法に関する。

30

【0437】

疾患は、炎症性、自己免疫性、アレルギー性、ウィルス性、癌性、感染性、同種異型性または異種性（移植片対宿主および宿主対移植片）起源の疾患である。特に、疾患は慢性の炎症性腸疾患、例えばクローン病または潰瘍性大腸炎、硬皮症、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、喘息、悪性メラノーマ、腎癌、乳癌、肺癌、子宮癌、子宮頸癌、前立腺癌、脳癌、頭部および頸部の癌、白血病、皮膚リンパ腫、肝癌、結腸直腸癌、膀胱癌、拒絶反応関連性疾患、移植片対宿主関連疾患、または、肝炎関連ウィルス疾患、AIDS、麻疹、痘疹、水痘、風疹またはヘルペスであってよい。

40

【0438】

上記の「MHC認識細胞」の定義およびMHC認識細胞の例をここでも適用する。

【0439】

本発明の方法の対象となるサンプルは適宜、組織学的材料、細胞学的材料、原発腫瘍、二次臓器転移、微細針吸引物、脾臓組織、骨髓標本、細胞スメア、剥脱細胞学的標本、接触標品、口腔スワブ、喉頭スワブ、膣スワブ、気管支洗浄液、胃洗浄液、臍帯由来物、お

50

よび体液由来物、例えば血液（例えば、血液から単離した末梢血単核細胞（PBMC）集団、または他の血液由来標品、例えば白血球搬出産物）、喀出サンプル由来物、痰および気管支吸引物から選択してよい。これらを種々の処理に付してよい。ここにおいても適用される上記の定義を参照される。

【0440】

説明のための実施態様

1. 乳癌における本発明の利用可能性

MHC分子構築物を使用する本発明の方法の有用性の1つの例は乳癌の診断ならびに特定の型の乳癌を治療するための適切な治療様式の選択である。

【0441】

乳癌は女性における癌の最も多い原因の一つである。新しい治療方法は乳房の腫瘍細胞上に発現する抗原に対する細胞毒性Tリンパ球（CTL）応答を誘発させる合成ペプチドの投与よりなる。その理由は、CTLは腫瘍細胞を直接殺傷する能力の最も高い免疫細胞であるため、これらの免疫応答を誘発するワクチンは癌の再発を防止し、あるいは、疾患の早期の段階における腫瘍の進行を抑制する魅力的な選択肢であることである。

【0442】

乳癌に罹患していることが疑われる患者から採取した組織サンプルを本発明のMHC分子構築物で染色することができ、その際、MHC分子には腫瘍細胞により発現されるペプチドが負荷され、そして、結合が観察されれば診断が可能となる。

【0443】

既に診断された乳癌患者から採取した組織サンプルを、特定のペプチドを満たしたMHC分子を負荷した本発明のMHC分子構築物で染色することにより、特定のペプチドが疾患に関与しているかどうかを調べることができる。結合が観察されれば、最適な治療が選択できる。例えば一部の攻撃性の乳癌はHER2/neuを発現するが、他は発現しない。従って、このような情報は治療の選択、疾患の予後、および疾患の進行の予測のいずれにおいても価値あるものとなる。他の関連するペプチドはMAGE、CEAおよびpS3ペプチドである。

【0444】

2. CTLの特異的結合に関する本発明の利用可能性

治療物質を投与されている癌患者から採取したサンプルを正しいMHC対立遺伝子に負荷された本発明のMHC分子構築物で染色し、その際、MHC分子は、癌組織サンプル中の特定の抗原および浸潤CTLを認識するペプチドを負荷される。CTLの染色陽性（結合あり）は、特定の投与されている治療用組成物の有効性を示しており、その理由は、誘導されたCTLが癌の実際の部位において同定されるからである。二重染色法により、特定の、そして全てのCTLを染色することができる。これにより処方の有効性に関する更なる情報が得られる。例えば、1つの特異的ペプチドを用いた場合の染色陽性は相当するペプチドが治療用組成物の成分として特に有効となることを示している。即ち治療用組成物は、癌組織中の特定の浸潤CTLの同定（結合）に基づいて患者の応答に従って調節/変更することができる。

【0445】

さらにまた血流中を循環している特定のCTLは、そのようなCTLを特異的に標的とするMHC分子構築物（正しい対立遺伝子およびペプチドを有する）用いながら、後にフローサイトメーターで分析することにより結合細胞を計数すれば、同定および定量することができる。循環血液の分析は侵襲性が低いため、免疫応答の連続モニタリングのためにフローサイトメトリ分析を使用できる。

【0446】

別の方法は種々のケモカイン類を同定するために2重または3重の染色法において癌組織のサンプル中の抗原および浸潤CTLを検出する複合法である。適切なペプチドで満たされたMHC分子および場合により他の物質（生物活性化合物）を負荷されたMHC分子構築物が実際に可能である。次にCTL浸潤の程度を特定のケモカインと相関させ、特定のCTLを癌に浸潤してこれを殺傷するように操作することができるようになる。

【0447】

本発明によればまた、このようなCTLは、CTLに特異的に結合する、ペプチドで満たされたMHC分子を負荷されたMHC分子構築物を用いて免疫磁性的分離方法により患者から単離することができる。単離後、CTLを増殖させ、場合により刺激し、次に単独で効果的な治療として、あるいは、治療の一部として患者に再導入することができる。

【0448】

3. 移植に関わる本発明の利用可能性

本発明はまた移植を受けた患者における特定のウィルスに対するT細胞の応答を追跡するために用いることもできる。移植患者は移植片の拒絶反応を回避するために必要な免疫抑制療法によりウィルスの攻撃に対して感受性がある場合が多い。発生中のウィルスを支援するウィルス特異的T細胞の移植後の発生をモニタリングすることにより、免疫抑制治療または他の予防的医薬品を患者の免疫状態に適合するように調節することができる。これはMHC分子構築物を用いて行なうことができるが、その際、MHC分子には進行中の感染症から発生する上記T細胞により認識されるペプチドを負荷する。医師がモニタリングを望むウィルスの例はCMV（サイトメガロウィルス）およびEBV（エプスタイン-バーウィルス）である。

【0449】

他の試みは単離してこのような感染症に対抗できる臨床的に適切な数量の細胞にまで増殖させることである。単離は細胞に結合することができる適切なMHC分子構築物を用いて行なうことができ、その後、そのように結合した細胞を免疫磁性的分離法によるか、または、フローサイトメトリーにより分離することができる。次に細胞を増殖させ、場合により刺激し、または、さらに活性化し、次に患者に再導入することにより、患者の免疫系が感染に対抗するのを支援することができる。

【0450】

本発明はまた移植片または宿主組織に対する移植患者のT細胞応答をモニタリングするために使用できる。適切なMHC分子構築物を適用し、観察された結合を用いて患者の免疫状態に相関付けるように免疫抑制治療を調節する。

【0451】

4. 種々の感染症との関わりにおける本発明の利用可能性

本発明は複合的な疾患、例えばインフルエンザ、結核、マラリア、単純疱疹およびクラミジアとの関わりにおいてT細胞の応答（またはより正しくは、特異的T細胞レセプター）を検出し、モニタリングするために用いることができる。MHC分子が適切なペプチドを負荷されたMHC分子構築物を検出およびモニタリングに適用することができる。

【0452】

このようにして得られた情報を用いて新しい治療法を考案したり、あるいは新しい医薬品を開発することすらできる。

【0453】

感染症に対抗できる細胞はまた適切なMHC分子構築物を用いながら得ることもできる。単離は免疫磁性的分離法またはフローサイトメトリーを用いて行なうことができる。このようにして得られたものを適切な条件下に増殖させ、場合により刺激し、あるいはさらに活性化し、次に患者に再導入することができる。

【0454】

5. SAポリアクリル酸アミド分子の調製

結合成分として複数のストレプトアビジン（SA）に連結して保有するポリアクリル酸アミドの担体分子を以下の操作法に従って調製する。

【0455】

ストレプトアビジン（SA、Genzyme）を一晩透析する（5ml中100mg、0.10MのNaCl1000mlに対して透析、2〜4°C、10kDaのMwCO、3回交換）。その後全ての緩衝液を窒素で飽和させた後に使用する。冷凍庫に保存しておいたアクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（Sigma Chemical Co., カタログ番号A8060）を1時間室温で放置し、その後開封し、乾燥NMP（7mg/ml）中に溶解し、SAの攪拌溶液（合計0.140mlのNMP溶液/ml、5mgSA/ml、0.

1M NaCl、25mM炭酸塩緩衝液、pH8.5) にゆっくり添加し、2時間窒素雰囲気下30℃で攪拌する。残存する反応基はすべてエタノールアミン含有緩衝液 (110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH7.0) の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、30℃で30分間攪拌する。

【0456】

重合は溶液 (0.005ml/ml) に10%の過硫酸アンモニウム水溶液 (過硫酸アンモニウム、>98%、Sigma、カタログ番号A3678) を添加することにより開始し、その後、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (Sigma、カタログ番号T9281、0.005ml/ml) を添加する。反応混合物を30℃で4時間攪拌する。部分的に非均質な反応混合物を透析管にいれ、100倍過剰容量の0.10M NaClに対して透析する (2~4℃、10kDa MwCO、24時間中で3回交換)。重合共役体を含有する溶液を20myのポリスルホンフィルターを通して濾過し、その後、ゲル濾過により未結合のSAから精製する (FPLC、Pharmacia、S-500、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2)。遊離のSAから明らかに分離され、空のピークには含まれない画分のみをSAポリアクリル酸アミド分子画分として採取する。ポリアクリル酸アミド担体分子上のSAの取りこみの程度を278nmにおけるUV吸光度から計算することができる。次にSAポリアクリル酸アミド担体分子を約3.0mgSA/mlまで濃縮する。後述する通り、分子は標識、例えばFITCまたはAlexaで標識できる。

【0457】

6. カルボキシル修飾デキストランおよびプルランの担体分子の調製

デキストラン (500kDa、Pharmacia BioTech、T-500、カタログ番号17-0320-2) またはプルラン (Sigma、カタログ番号70051、分子量 400kDa、ポリディスパリティーMW/MN=1.38) を水に溶解し、氷上で冷却し、水酸化カリウムおよびモノクロロ酢酸 (Fluka、カタログ番号24510) を添加する (合計、1.0mgデキストランまたはプルラン/ml、0.58mgモノクロロ酢酸/ml、氷冷、4時間攪拌)。氷浴上で冷却攪拌しながら、希塩酸をゆっくり添加することにより反応溶液のpHをpH7に合わせる。溶液を水に対して過剰に透析する (100倍過剰容量、室温、10kDaのMwCO、24時間で6回交換)。希釈溶液を採取し、数日間凍結乾燥し、完全に乾燥した粉末を得る。カルボキシルメチル活性化の程度は炭水化物骨格の積分値と4.2ppmにおけるメチル基の積分値を比較することによりプロトンNMR分析により測定する。乾燥粉末は室温でデシケーター中に保存する。

【0458】

7. カルボキシル修飾デキストランに結合したまたはカルボキシル修飾プルランに結合したウサギ抗ビオチン抗体またはSAの調製

ウサギ抗ビオチン抗体またはSAである結合成分の多くに結合して保有するカルボキシル修飾デキストランまたはカルボキシル修飾プルランである担体分子を以下の方法で調製することができる。カルボキシル修飾デキストランまたはカルボキシル修飾プルランを溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド (Aldrich、カタログ番号13067-2) および塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDAC、Aldrich、カタログ番号E6383、191.7) を添加し (2.0 mgカルボキシル修飾炭水化物/ml、1.42mg NHS-OH/ml、0.59mg EDAC/ml、50mM 2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸 (「MES」、Aldrich、カタログ番号M8250)、100mM NaCl、pH6.0)、その後1時間室温で攪拌する。透析された結合タンパク質、fab2親和性精製ウサギ抗ビオチン抗体またはSAを添加する (総量で1.06mg活性化カルボキシル修飾炭水化物/ml、5.3mgウサギ抗ビオチン/mL、または6.4mgストレプトアビジン/mL、50mM MES、100mM NaCl、pH6.0)。室温で一晩放置後、残存する反応基はすべてエタノールアミン含有緩衝液 (110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH7.0) の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、30℃で30分間攪拌する。結合成分を共役した担体分子を含有する溶液を20myのポリスルホンフィルターを通して濾過し、その後、ゲル濾過により未結合のタンパク質から精製する (FPLC、Pharmacia、S-500、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2)。遊離のストレプトアビジンから明らかに分離され、第1の除外ピークには含まれない画分のみを共役体画分として採取する。担体分子上の抗体またはSAの結合の程度を278nmにおけるUV吸光度から計算することができ

る。結合成分が共役した担体分子を約3.0mg抗体またはタンパク質/mlまで濃縮する。次に後述する通り、共役体を複数の標識化合物、例えばFITCまたはAlexaで標識する。

【0459】

8.SA N-ビニルピロリドン/N-アクリロアミド分子の調製

ここでは担体分子はN-ビニルピロリドン/N-アクリルオキシスクシンイミド共重合体であり、結合成分はSAである。

【0460】

活性化N-ビニルピロリドン/N-アクリルオキシスクシンイミド共重合体は標準的な方法に従ってN-ビニルピロリドン (NVP、Aldrich) およびアクリル酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Sigma Chemical Co., カタログ番号A8060) を共重合することにより調製する。NMP中のN-ビニルピロリドン/N-アクリルオキシスクシンイミド共重合体 (広範囲の分子量分布で約200kDa、10mg/ml NMP) を攪拌しながら溶液中の透析SAに滴加する (総量で6.0mgのSA/ml、1.0mg共重合体/ml、100mM NaCl、50mM 炭酸塩、pH9.0、30℃、6時間)。残存する反応基は全て上述したエタノールアミン含有緩衝液の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、白濁した重合共役体溶液を20myのポリスルホンフィルターを通して濾過し、その後、ゲル濾過により未結合のSAから精製し、上記の通り約3.0mgのSA/mlとなるまで濃縮する。後述する通り、共役体を複数の標識化合物、例えばFITCまたはAlexaで標識する。

【0461】

9.MHC分子構築物の調製

上記分子5~8からMHC分子構築物を調製するために、PBS緩衝液中の共役体にビオチニル化MHC分子を添加することにより結合成分が共役した担体分子にMHC分子を結合することができる。MHC分子は所望に応じて選択してよい (例えばHLAまたは種々のHLA対立遺伝子)。MHC分子は所望によりペプチドで満たされているかまたはペプチドを含まない場合もある。

【0462】

10.MHC分子が担体分子に直接結合している場合のMHC分子構築物

以下の例は穏やかな条件下、500kDaのデキストランである活性化重合体担体分子に直接MHC分子を結合する場合を説明するものである。

【0463】

精製したMHC分子 (対象となるペプチドおよび β_2m を含有する重鎖100nM) をビニルスルホン活性化デキストラン (500kDa、約25%活性化、総量で2ngデキストラン/ml、10ngMHC分子/ml、200mM MES、100mM NaCl、pH6.0) に添加する。硫酸アンモニウム飽和溶液を攪拌しながら混合物 (総量で初期容量の60%) にゆっくり添加する。30℃で6時間の後、混合物を遠心分離 (10.000g) し、透明な溶液を除去し、ペレットを水に溶解する (0.25ml/mgタンパク質)。残存する反応基は全て上述したようにエタノールアミン含有緩衝液の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、重合共役体溶液を20myのポリスルホンフィルターを通して濾過し、その後、ゲル濾過により未結合のタンパク質から精製し、平均でデキストラン鎖当たり5個より多いMHC分子になるようにし、そして、上記の通り約3.0mgのMHC分子/mlとなるまで濃縮する。後述する方法に従って、構築物を適切な標識化合物、例えばFITCまたはAlexaで標識する。

【0464】

11.標識化合物がアルカリホスファターゼ (AP) であるMHC分子構築物の調製

以下の例は担体分子に直接複数のMHC分子と複数の標識化合物が結合しているMHC分子構築物の結合 (共役) を説明するものである。担体分子はデキストランであり、標識化合物はAPである。

【0465】

精製したMHC分子 (対象となるペプチドおよび β_2m を含有する重鎖100nM) および透析したAP (Roche、100mM NaClに対して透析) をビニルスルホン活性化デキストラン (500kDa、約25%活性化、総量で2ngデキストラン/ml、10ng MHC分子/ml、20ng AP/ml、200mM M

10

20

30

40

50

ES、100mM NaCl、pH6.0) に添加する。硫酸アンモニウム飽和溶液を攪拌しながら混合物（総量で初期容量の60%）にゆっくり添加する。30℃で6時間の後、混合物を遠心分離（10,000g）し、透明な溶液を除去し、ペレットを水に溶解する（0.25ml/mgのMHC分子）。残存する反応基は全て上述したように、エタノールアミン含有緩衝液の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、重合共役体溶液を20myのポリスルホンフィルターを通して濾過し、その後、ゲル濾過により未結合のタンパク質から精製する。共役体にはタンパク質および酵素の安定化剤を添加する。

【0466】

本発明は以下の非限定的な実施例によりさらに説明する。

【実施例】

10

【0467】

現在まで、オリゴマー化された、例えば、四量体のMHCクラスIおよびIIの分子の特異的結合に関する幾つかの例がペプチドエピトープ特異的T細胞集団の同定に用いられている。オリゴマー-MHC複合体、例えば四量体の高い親和性は、病原性の生物および抗原に対するクローンT細胞の応答を分析するための新しく有意義な手段を与えている。以下の実施例においては、本発明の多価のMHC分子構築物の結合を検討した。

【0468】

以下に記載する実施例は、本発明の構築物の形態で提供された場合に、ポリリガンドを提示するMHC分子の、種々のペプチドエピトープ特異的T細胞クローンおよび株へのペプチド特異的で高い親和性の結合を特徴とすることを意図している。

20

【0469】

驚くべきことに、本発明のMHC分子構築物の高い結合価により発生する改善された結合親和性により、従来のMHC分子四量体と比較して少量のT細胞集団の改善された検出が可能になることがわかった。

【0470】

実施例1

ポリリガンドMHC分子および四量体の製造

A. 結合成分を有する担体分子の製造

ビニルスルホン活性化デキストラン

種々の分子サイズのデキストラン（Pharmacosmosから150および270kDaのもの、Pharmaciaから500kDaのもの）をA.LihmeおよびT.Boenischの記載（「Water soluble, polymer based reagents and conjugates comprising moieties derived from divinyl sulfone（ジビニルスルホン由来の部分をも有する水溶性重合体系試薬および結合体）」、WO93/01498、参考文献22）に従ってジビニルスルホン（Aldrich）で活性化し、モノマー単位約25%のビニルスルホン活性化の水準を得た。

30

【0471】

FITC-ストレプトアビジン-デキストラン（150,270,500kDa）結合体

ストレプトアビジン（SA、Genzyme）を一晩透析した（5ml中100mg、0.10M NaCl 1000mlに対して透析、2〜4℃、10kDaのMwCO、3回交換）。

【0472】

40

フルオレセインイソチシアネート（FITC、Molecular Probes）の溶液（14.0mg/ml DMF）をストレプトアビジンの攪拌混合物に添加した（14.0mgSA/ml、0.19mg FITC/ml、0.1M NaCl、25mM炭酸塩緩衝液、pH8.5、30℃）。

【0473】

6時間後反応混合物を150、270または500kDaのビニルスルホン活性化デキストラン（約25%活性化）の溶液に添加し（総量で、1.6mgビニルスルホンデキストラン/ml、7.7mg SA/ml、0.1M NaCl、25mM炭酸塩緩衝液、pH8.5）、30℃で18時間攪拌した。

【0474】

残存する反応基は全てエタノールアミン含有緩衝液（110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH7.0）の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチング

50

し、30℃で30分間攪拌した。

【0475】

得られた重合結合体は遊離のフルオレセインおよび未結合のストレプトアビジンからゲル濾過により精製した（FPLC、Pharmacia、S-200、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2）。

【0476】

フルオレセインとストレプトアビジンの取りこみの程度は、結合体、未結合ストレプトアビジンおよび未結合フルオレセインをそれぞれ含有する3つの画分において279および498nmにおけるUV吸光度から計算し得た。結合体には保存料として15mMとなるようにアジ化ナトリウムを添加した。

【0477】

デキストラン担体分子	デキストラン当たりのSA	SA当たりのFITC	デキストランの濃度(モル/l)
150	4.4	2.7	61.1×10^{-8}
270	6.9	2.6	54.7×10^{-8}
500	13.6	2.7	31.2×10^{-8}

【0478】

特段の記載がない限り、以下に記載する実施例で使用するFITCを結合した500、270および150kDaデキストランは、平均でデキストラン分子当たり約13.6（500kDaデキストランの場合）、6.9（270kDaデキストランの場合）、そして4.4（150kDaデキストランの場合）個のSA複合体と結合させた。

【0479】

HRP-ストレプトアビジン-デキストラン（70、150、270kDa）結合体の調製

セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP、Fairzyme）およびストレプトアビジン（SA、Genzyme）を一晩透析（5ml中100mg、0.10M NaCl 1000mlに対して透析、2～4℃、10kDaのMwCO、3回交換）した後に濃縮した。結合は活性化デキストランにHRPとストレプトアビジンを逐次的に添加することにより行なった。

【0480】

HRP溶液を70、150、または270kDaのビニルスルホン活性化デキストラン（約25%活性化）の溶液に添加し（総量で40.0mg HRP/ml、1.6mgデキストラン/ml、25mM炭酸塩、0.1M NaCl、pH8.5）、水浴上で攪拌した（30℃、6時間）。ストレプトアビジン溶液を反応混合物に添加し（総量で9.14mgのストレプトアビジン/ml、1.06mgのデキストラン/ml、26.67mgのHRP/ml、25mM炭酸塩、0.10M NaCl、pH8.5）、そして水浴上で一晩攪拌した（30℃、18時間）。

【0481】

全ての残存する反応基を、反応混合物の1/10容量のエタノールアミン含有緩衝液（110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH7.0）を添加することによりクエンチングし、30℃で30分間攪拌した。

【0482】

結合体は、結合していないストレプトアビジンおよびHRPからゲル濾過により分離した（FPLC、Pharmacia、S-200、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2）。

【0483】

HRPとストレプトアビジンの取りこみの程度は、結合体を含有する画分、ならびにストレプトアビジンおよびHRPを含有する画分の280および403nmにおけるUV吸光度から計算し得た。結合体にはタンパク質安定化剤としてBSAを、そして保存料としてブロンドックス（bronidox）を添加した。

【0484】

10

20

30

40

デキストラン担体分子	デキストラン当りのSA	デキストラン当りのHRP	デキストランの濃度(モル/l)
70	3.0	2.3	10.5×10^{-8}
150	5.4	3.7	7.0×10^{-8}
270	8.0	5.3	4.6×10^{-8}

【0485】

B. ペプチド負荷MHC分子の製造

以下の標準的操作法に従ってE.coli菌株(BL21(DE3), Novagen(Novagen, Inc, Madison, WI, USA))からHKAクラスI重鎖および軽鎖(β_2m)を作成し、封入体として部分的に精製した。

10

【0486】

単離した封入体分子は、非還元条件下で8M尿素中可溶化し、未損傷のジスルフィド結合を有する重鎖分子を得た。重鎖分子はさらに、標準的な操作法に従ってサイズ-およびイオン-交換クロマトグラフィーにより精製し、最終的に後述する通り折りたたみ処理に付した。

【0487】

ペプチドエピトープ特異的HLAクラスI複合体を「希釈による折り畳み」の方法を用いてインビトロで発生させ、その際、変性されたHLAクラスI重鎖分子の高度に精製された調製品(8M尿素中約10~20mM) A0201、1~275)を18℃で16時間、目的のペプチド(10mM)および β_2m (1mM)を含有する100倍希釈緩衝液(即ち重鎖の最終濃度は約100~200nM)中でインキュベートすることにより復元した。誤って折りたたまれたHLAクラスI重鎖は遠心分離により沈殿させ、その後、標準的な操作法に従ってG75サイズ排除クロマトグラフィーにより新しく折りたたまれたHLAクラスI分子の精製を行なった。折りたたまれたHLA A0201分子の画分は、折りたたみ反応に添加したHLA A0201重鎖分子の総量の約40~50%にも達した。誤って折りたたまれた重鎖分子の画分には不適切なジスルフィド結合が含まれており、復元に使用できなかった。上記のこの折りたたみ機構は、多形HLAおよびH-2遺伝子複合体によりコードされるペプチド負荷単量体MHCクラスI複合体の種々のものを急速に発生させるために有用であった。精製された複合体は最終的に、製造元(AVIDITY; Denver, CO, USA)による指示通りプロテインリガーゼBIR Aを用いて酵素的モノビオチニル化した。

20

30

【0488】

C. ペプチドを含まないHLAクラスI分子の製造

ペプチドを含まないMHCクラスIは、官能性モノビオチニル化MHCクラスI複合体(実施例1B参照)を先ず尿素(8M)またはグアニジン(6M)の添加により変性する工程において製造した。カオトロピック緩衝液はクラスI複合体から構造的分子サブユニットを解離させ、生化学的精製に用いることができる遊離の可溶性ビオチニル化重鎖および遊離の可溶性 β_2m 分子を生じさせる。重鎖分子は定法に従ってG75サイズ排除クロマトグラフィーにより解離 β_2m およびペプチドから除去された。精製された重鎖分子は自発的に、過剰な β_2m を含有する折りたたみ緩衝液中で重鎖および軽鎖よりなるペプチド受容性ヘテロ二量体複合体を形成する(上記実施例1:B参照)。ペプチドを含まないHLAクラスI二量体は過剰の β_2m 中では安定なままであり、ストレプトアビジンと連結して本発明のペプチドを含まない構築物またはペプチドを含まない四量体を形成し得た。目的のペプチド(1mM)を可溶性またはSA結合デキストランとの連結の工程の間またはその後に添加することにより、本発明のMHC分子構築物またはMHC分子四量体の形態のTCR結合MHC分子が得られる。

40

【0489】

D. 本発明のポリリガンドMHC分子構築物の製造

種々の分子サイズのSA結合デキストランの調製品を、SA分子当たり2個のビオチニル化HLAクラスI分子の比率に相当する量のHLA複合体と混合した。HLA分子は、直接SA結合デキストランの溶液に添加した。即ち、MHC分子構築物は下記:

(1) 担体分子は500kDaのデキストランであり、そこに連結させて27.2個のビオチニル

50

化HLAクラスI分子（MHC分子）を約13.6個のFITC標識SA（結合成分）を介して保有（SA当たり平均で2個のHLAクラスI分子）し、各SAは平均で2.7個のFITCにより標識されている、

（2）担体分子は270kDaのデキストランであり、そこに連結させて約13.8個のビオチニル化HLAクラスI分子（MHC分子）を約6.9個のFITC標識SA（結合成分）を介して保有（SA当たり平均で2個のHLAクラスI分子）し、各SAは平均で2.6個のFITCにより標識されている、

（3）担体分子は150kDaのデキストランであり、そこに連結させて約8.8個のビオチニル化HLAクラスI分子（MHC分子）を約4.4個のFITC標識SA（結合成分）を介して保有（SA当たり平均で2個のHLAクラスI分子）し、各SAは平均で2.7個のFITCにより標識されている、

（4）担体分子は70kDaのデキストランであり、そこに連結させて約6.0個のビオチニル化HLAクラスI分子（MHC分子）を約3.0個のSA（結合成分）を介して保有（SA当たり平均で2個のHLAクラスI分子）し、各デキストランは平均で2.3個のHRP酵素により標識されている、

10

（5）担体分子は270kDaのデキストランであり、そこに連結させて約10.8個のビオチニル化HLAクラスI分子（MHC分子）を約5.4個のSA（結合成分）を介して保有（SA当たり平均で2個のHLAクラスI分子）し、各デキストランは平均で3.7個のHRP酵素により標識されている、

（6）担体分子は270kDaのデキストランであり、そこに連結させて約16.0個のビオチニル化HLAクラスI分子（MHC分子）を約8.0個のSA（結合成分）を介して保有（SA当たり平均で2個のHLAクラスI分子）し、各デキストランは平均で5.3個のHRP酵素により標識されている、

20

という組成となるよう形成した。

【0490】

このように多数のHLAクラスI分子の連結はSAとビオチンとの間の高い親和性のために可能となった（親和性解離定数; $K_D=10^{15}$ ）。

【0491】

この操作法により、以下の本発明のMHC分子構築物を調製した。

【0492】

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のビオチニル化HLA A0201を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）および β_2m との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物1）、

30

270kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて13.8個のビオチニル化HLA A0201分子を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）および β_2m との複合体として、6.9個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.6個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物2）、

150kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて8.8個のビオチニル化HLA A0201分子を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）および β_2m との複合体として、4.4個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物3）、

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のビオチニル化HLA A0201を、インフルエンザマトリックスタンパク質のアミノ酸58～66（GILGFVFTL）および β_2m との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物4）、

40

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のビオチニル化HLA A0201を、野生型P53ペプチドR9V（RMPEAAPPV）および β_2m との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物5）、

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のビオチニル化HLA A0201を、野生型P53ペプチドG11V（GLAPPQHLIRV）および β_2m との複合体として、13.6個の

50

FITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物6）、

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のビオチニル化ペプチドを含まないHLA A0201を、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物7）、

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のビオチニル化HLA A0201を、gp100ペプチドKTWGQYWVおよび β_2m との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物8）、

10

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のHLA A0201重鎖を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）およびヨウ素化 β_2m との複合体として、13.6個のSAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、放射能100000cpm/サンプルを有する）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物9）、

270kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて16.0個のビオチニル化HLA A0201を、Mart-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）および β_2m との複合体として、8個のSAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子）し、デキストランに対し5.3個のHRP酵素を保有しているMHC分子構築物（MHC分子構築物10）、

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のビオチニル化HLA A0201を、sur1/M2ペプチドアナログ（LMLGEFLKL）および β_2m との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物11）、

20

150kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて10.8個のビオチニル化HLA A0201を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）および β_2m との複合体として、5.4個のSAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子）し、デキストランに対し3.7個のHRP酵素を保有しているMHC分子構築物（MHC分子構築物12）、

70kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて16.0個のビオチニル化HLA A0201を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）および β_2m との複合体として、3.0個のSAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子）し、デキストランに対し2.3個のHRP酵素を保有しているMHC分子構築物（MHC分子構築物13）、

30

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて27.2個のビオチニル化HLA A0201を、MAGE-3ペプチド（FLWGPRALV）および β_2m との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で2個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2.7個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物14）、

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて14.1個のビオチニル化HLA A0201を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）および β_2m との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で1個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物15）、

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて14.1個のビオチニル化HLA A0201を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）および β_2m および7.1個のMIC A分子との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で1個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物16）、

40

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて14.1個のビオチニル化HLA A0201を、gp100ペプチドKTWGQYWVおよび β_2m との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で1個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物17）、

500kDaのデキストラン担体分子を有し、そこに連結させて14.1個のビオチニル化HLA A0201を、gp100ペプチドKTWGQYWVおよび β_2m および7.1個のMIC A分子との複合体として、13.6個のFITC標識SAを介して保有（SA当たり平均で1個のHLA A0201分子、そして、SA当たり平均で2個のFITC）しているMHC分子構築物（MHC分子構築物18）。

50

【0493】

実施例2

MHC分子四量体の製造

四量体に使用するペプチドエピトープ特異的HLA分子は実施例1のBに記載の通り作製した。四量体は少量のPE結合SA (Molecular Probes, Holland) をビオチニル化HLA複合体の溶液に順次添加することにより形成した。混合物中のHLA複合体の最終的な量は、飽和を確実にするためにはSAの量の4倍で無ければならない (SA複合体あたり4個のビオチン結合部位)。

【0494】

この操作法により、以下の四量体を調製した。

10

【0495】

4個のビオチニル化HLA A0201を、修飾されたMART-1ペプチド (ELAGIGILTV) および β_2m との複合体として保有するPE標識四量体 (四量体1)、

4個のビオチニル化HLA A0201を、gp100ペプチド (KTWGQYWV) および β_2m との複合体として保有するPE標識四量体 (四量体2)、

4個のビオチニル化HLA A0201を、インフルエンザマトリックスタンパク質のアミノ酸58~66 (GILGFVFTL) との複合体として保有するPE標識四量体 (四量体3)、

4個のビオチニル化HLA A0201を、野生型P53ペプチドR9V (RMPEAAPPV) との複合体として保有するPE標識四量体 (四量体4)、

4個のビオチニル化HLA A0201を、野生型P53ペプチドG11V (GLAPPQHLIRV) との複合体として保有するPE標識四量体 (四量体5)、

20

P4個のPE標識ペプチドを含まないHLA A0201を保有する、E標識ペプチドを含まない四量体 (四量体6)。

【0496】

実施例3

MHC分子四量体と比較してT細胞に対する本発明のMHC分子構築物の用量依存的結合はペプチド特異的である

この実験においては、確立されたT細胞クローンへの本発明のペプチドエピトープ特異的MHC分子構築物およびMHC分子四量体の結合を調べた。

【0497】

30

予め確立され特性のわかっている「インハウス(in house)」の5/127および5/130と名づけられたT細胞クローンをメラノーマ特異的腫瘍抗原と反応させ、これを用いて標準的なフローサイトメトリープロトコルに従ってフローサイトメトリーにより細胞表面上のTCRへの本発明のHLA分子構築物 (すなわちMHC分子構築物) の結合を分析した。概略すれば、 5×10^5 個の細胞を「FACS-緩衝液」 (リン酸塩緩衝食塩水 (PBS)、10mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA)、0.2%アジド) 50ml中で、目的のペプチドを提示する本発明のポリリガンドMHC分子構築物または四量体のいずれかと共にインキュベートした。特段の記載が無い限り、細胞はFACS緩衝液で1回洗浄し、Becton Dickenton FACSCaliburフローサイトメーターで分析した。

【0498】

40

2種のT細胞クローンは腫瘍 (メラノーマ) 関連抗原MART-1およびgp100にそれぞれ由来するHLA A0201結合ペプチドと特異的に反応した。

【0499】

以下の本発明のポリリガンドHLA分子構築物を用いた。

MHC分子構築物1、

MHC分子構築物2、

MHC分子構築物3。

【0500】

以下のMHC分子四量体を用いた。

四量体1、

50

四量体2。

【0501】

PE標識四量体1および2を比較のために用いた。

【0502】

T細胞クローン5/127および5/130を解凍し、50UのIL-2および10%ヒト血清の存在下、37℃で24時間増殖させた。約 5×10^5 個のT細胞クローンを種々の量の本発明のMHC分子構築物（MHC分子構築物1:0～9.36nM、2倍希釈、図25参照；MHC分子構築物2:0～27.5nM、2倍希釈、図25参照；MHC分子構築物3:0～37.5nM、2倍希釈、図25参照）またはPE標識四量体（四量体1および2:0～200nM、2倍希釈、図25参照）と共に22℃で1時間インキュベートした。インキュベーションの後、細胞を1回のみ洗浄することにより低親和性結合MHC分子構築物または四量体の解離を回避し、細胞が結合したMHC分子構築物（結果は図25Bに示す）およびPE標識四量体（結果は25Aに示す）について標準的なフローサイトメトリー操作法に従ってフローサイトメトリーにより分析した。

10

【0503】

MART-1ペプチド特異的T細胞クローン5/127（図25Aでは四角形で表示）は高い親和性でELAGIGILTVペプチドを提示する四量体（白四角）に結合した。四量体20～30nMを添加することにより5/127T細胞の染色の最高値の半分が観察された。対照実験においては、gp100ペプチドKTWGQYWQVを提示する四量体調製品（黒四角）は5/127T細胞クローンとは相互作用を示さなかった。比較として、gp100反応性T細胞クローン5/130をgp100ペプチドKTWGQYWQVを提示する四量体（黒丸）で染色し、ELAGIGILTVペプチドを提示する四量体（白丸）の高濃度と弱い相互作用を示したのみであった。2種のT細胞株へのペプチド特異的四量体の結合は、約100nMの四量体は5/127細胞株をほぼ飽和したのに対し、5/130細胞株は低い親和性の結合により部分的にのみ染色されたことを示している。ペプチド特異的四量体調製品は異なる親和性で結合したことが明らかであったが、データによれば両方の細胞株は特異的に適切なペプチドHLA複合体に結合したことが明らかに説明される。即ち、両方のT細胞クローンは本発明の構築物の分析に有用であると結論できた。

20

【0504】

本発明の種々の構築物の結合のその後の分析のため、および、四量体構築物との比較のため、頑健な5/127T細胞クローンを選択した。

【0505】

T細胞クローン5/127を本発明のMHC分子構築物1、2および3で上記の通り染色した。図25Bに示すとおり、全てのサイズのデキストラン担体分子がMART-1特異的T細胞クローンの用量依存的染色を促進した。比較として、より大型の構築物（500kDaデキストラン担体分子）は、中間的な大きさの構築物（270kDaデキストラン担体分子）およびより小型の構築物（150kDaデキストラン担体分子）より効率的にT細胞に結合した。しかしながら図25Aに示す細胞の用量依存的染色から明らかな通り、全ての3種の構築物は細胞の顕著な染色を得るためにより大量で添加しなければならなかった四量体よりも効率的に5/127T細胞クローンを染色した（図25A（白四角）と図25Bの3曲線を比較）。本発明の3種の構築物の改善された結合親和性は明らかに、半飽和に必要な構築物の濃度が低いこと（2～10nM）により反映されており、これに対し、相当する四量体は半飽和のために20～30nMを必要とした（図25Aにおける四量体染色を参照）。

30

40

【0506】

即ち、本発明の構築物は、ペプチドエピトープ特異的T細胞に用量依存的に、そして同じペプチドを提示する相当する四量体よりもより高い親和性で結合したことが結論できた。

【0507】

実施例4

インフルエンザ特異的T細胞株への本発明のMHC分子構築物および四量体の結合

本実験においては、HLA A0201分子に関する提示される従来非自己ペプチドを認識するT細胞株への本発明のペプチド特異的構築物および四量体の結合を調べた。

50

【0508】

樹状細胞（DC）は、DC培養のために250U/ml hrIL-4（R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）および500U/ml hrGM-CSF（Leucomax, Novartis/Schering-Plough, Basel, Switzerland）を用いて、そしてDCの成熟化を誘発するためにhrCD40LTの1mg/ml（Immunex Corporation, Seattle, Washington, USA）に72時間曝露させながら、標準的プロトコルに従ってHLA-A0201ドナーから新しく単離したPBMCから作成した。

【0509】

培養10日目にDCをEDTA処理により単離し、1時間インフルエンザペプチドIMP58-66（40mg/ml）を負荷し、その後、洗浄し、照射した（3000Rad）。その後、新しく単離した自己由来PBMC（ 2×10^6 /ml）を20U/mlのrhIL-4および5ng/mlのrhIL-7（Peprotech EC, London, UK）を含有する1mlのAB-培地/ウェル中の24穴プレート上のペプチド負荷DC（ $1 \sim 2 \times 10^5$ /ml）に添加した。9～11日の後、Dynabead（登録商標）分離（製造元の指示書に従う）によりT細胞培養物をCD4+細胞枯渇とし、陰性選択されたCD8+細胞（ 4×10^5 /ml）を、96ウェルのU底プレート中rhIL-4およびrhIL-7を添加したAB-培地中、ペプチドをパルスした自己由来の照射DC（ $1 \sim 2 \times 10^5$ /ml）および照射（3000Rad）した自己由来PBMC（ 10^6 /ml）で再刺激した。刺激物質として照射（6000Rad）したペプチドをパルスしたHLA-A2⁺EBV-B-細胞（ 2×10^5 /ml）および照射（3000Rad）した同種異型PBMCを用いながら上記の通り培養7日おきにさらに再刺激を行なった。各再刺激の1日後にrhIL-2（20U/ml、Proleukin, Chiron, CA, USA）を添加した。

【0510】

以下の本発明のMHC分子構築物を使用した。

MHC分子構築物4、

MHC分子構築物5、

MHC分子構築物6。

【0511】

以下の四量体を用いた。

四量体3、

四量体4、

四量体5。

【0512】

四量体3～5は比較のために用いた。

【0513】

5×10^5 個のT細胞をFACS-緩衝液（PBS、10mg/mlのBSA、0.2%アジド）50ml中で、全て目的のペプチドを提示する本発明のポリリガンドMHC分子構築物または四量体と共にインキュベートした。

【0514】

細胞は種々の用量の本発明の構築物（0～32nM、2倍希釈、図26参照）または四量体（0～112nM、2倍希釈、図26参照）と共に22℃で90分間インキュベートし、1回洗浄し、細胞が結合した分子構築物および四量体のそれぞれについて標準的なフローサイトメトリー操作法に従ってフローサイトメトリーにより分析した。

【0515】

図26に示すとおり、確立された細胞株におけるペプチド特異的T細胞の画分（約55%）は低濃度（<30nM）の本発明の構築物を用いて十分染色されたのに対し、四量体はより低い効率で細胞を染色した。染色の最高値の半分は本発明の構築物約3nMおよび四量体30nMで得られた。対照的に、野生型P53ペプチドを発現する本発明の構築物および四量体はT細胞を染色しなかった。即ち、本発明の構築物は、インフルエンザ特異的T細胞のサブ集団を特に、そして、ペプチドが同一の四量体よりも高い効率で染色したと結論できた。図25および26に示されるとおり、四量体と比較して構築物のHLA分子の結合価がより高いことにより、改善された染色効率を得られた。

【0516】

実施例5

MHC分子構築物と四量体の結合の時間依存性

本実験においては、本発明のMHC分子構築物の結合が時間依存的であることがわかった。得られた結果を図27に示す。比較のために、使用した本発明のMHC分子構築物と同じペプチドを提示するPE標識四量体を平行アッセイで試験した。

【0517】

以下の本発明のMHC分子構築物を用いた。

MHC分子構築物1

【0518】

以下の四量体を用いた。

四量体1。

【0519】

概略すると、 5×10^5 個のMART-1特異的T細胞クローン（5/127）をFACS-緩衝液（PBS、10 mg/mlのBSA、0.2%アジド）50ml中で、全て目的のペプチドを提示する本発明のポリリガンドMHC分子構築物または四量体と共にインキュベートした。T細胞クローンは、種々の用量（2倍希釈、図27参照）の、共にMART-1関連ペプチドアナログELAGIGILTVを提示する本発明の構築物または四量体の中でインキュベートした。細胞は室温でインキュベートした（22℃）。細胞のアリコートを経々の時点で採取し（図27参照）、洗浄し、細胞結合構築物（図27Bに示される）または四量体（図27Aに示される）に関して標準的なフローサイトメトリー操作法に従ってフローサイトメトリーにより測定した。図27Aに示されるとおり、四量体の場合は、定常状態の結合は高濃度の四量体（112nM）を用いた場合に、1時間のインキュベーション後に得られたが、より低い濃度（14～56nM）では測定時間間隔内に定常状態に達しなかった。比較として、本発明の構築物はかなり低い濃度（16nM）の構築物を用いた場合でも60分以内に定常状態レベルに達していた。

【0520】

即ち、本発明の構築物の会合は四量体の会合よりも速く、その理由は恐らくは本発明の構築物がより高い結合価を有するためと思われる。

【0521】

実施例6

本発明の細胞結合構築物の解離

本実験においては、本発明の細胞結合構築物の解離を調べた。

【0522】

以下のMHC分子構築物を使用した。

MHC分子構築物1。

【0523】

T細胞クローン（5/127）をMART-1関連ペプチドアナログELAGIGILTVを提示する本発明の構築物と共にインキュベートした。細胞（ 5×10^5 個）を、22℃で1時間インキュベートし、1回洗浄し、4℃、22℃および37℃でそれぞれインキュベートしたが、これは解離した構築物の再結合を防止するために50nMのCD8特異的モノクローナル抗体を含有するFACS緩衝液（PBS、10mg/mlのBSA、0.2%アジド）中で行なった。種々の時点（それぞれ0、60、90、120分）において、細胞のアリコートを採取し、洗浄し、標準的なフローサイトメトリープロトコルに従ってフローサイトメトリーにより細胞結合構築物について分析した。結果を図28に示す。4℃では、構築物の結合の半減期は約90分であり、これは22℃および30℃ではそれぞれ約50分および30分に短縮された。37℃でインキュベートした細胞からの構築物の2相性の解離は、細胞内への構築物の内在化がある程度起こっていたことを示している。あるいは、2相性の解離は、37℃におけるT細胞表面上の対抗レセプター(counter receptor)と構築物との間の相互作用が、より低い温度における同じ構築物の結合と比較して複雑であることにより説明されうる。

【0524】

即ち、細胞結合構築物の解離は時間と温度に依存していると結論できた。

【0525】

実施例7

本発明の構築物の結合:抗体の影響

本実験においては、本発明の構築物の細胞表面結合が、ペプチド結合部位の近接部においてHLAクラスIエピトープと反応するHLAクラスI特異的モノクローナル抗体により影響を受けることが示された。

【0526】

以下の本発明のMHC分子構築物を用いた。

MHC分子構築物1。

【0527】

以下のモノクローナル抗体を用いた。

BB7.2 (HLA A0201特異的)、W6/32 (HLA A、B、C汎特異的)、BBM1 (ヒト β_2m 特異的) およびマウス抗ヒト T 細胞、CD8 クローン DK25 (DAKO コード番号 M0707) (CD8-特異的抗体)。

【0528】

MART-1 特異的 T 細胞 クローン 5/127 を図 29A に示すとおり 10nM モノクローナル抗体 (それぞれ、BB7.2、W6/32、BBM1 および CD8 特異的) の存在下または非存在下、MART-1 関連ペプチドエピトープを提示する 2nM 構築物の混合物と共にインキュベートした。細胞を 22°C で 90 分間インキュベートし、1 回洗浄し、細胞結合構築物について標準的な操作法に従ってフローサイトメトリーにより分析した。HLA A0201 のペプチド結合部位の近接部でエピトープと反応したモノクローナル抗体 B7.1 および W6/32 は図 29 に示すとおりバックグラウンドに近いレベルまで構築物の結合を抑制した (バックグラウンドシグナルは HLA 分子非存在下で 10nM の FITC 標識構築物と共に細胞をインキュベートすることにより得られる)。

【0529】

対照的に、HLA クラス I の軽鎖、 β_2m に結合したモノクローナル抗体 BBM1 の存在は構築物の結合に影響しなかった。

【0530】

同様の実験において (図 29B 参照)、CD8 特異的モノクローナル抗体の影響を分析した。T 細胞 (5/127) を MHC 分子構築物 1 (図 29A 参照) および種々の用量の抗体 0~12nM (図 29B 参照) と共に 22°C で 60 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、細胞結合構築物について標準的なフローサイトメトリー操作法に従ってフローサイトメトリーにより分析した。CD8 特異的抗体は T 細胞への構築物の会合を強力に抑制 (図 29B 参照) し、T 細胞上の CD8 分子がペプチドエピトープ特異的構築物の結合に有意に寄与することを示唆している。

【0531】

即ち、構築物の結合は構築物により提示される HLA クラス I の結合部位と反応する抗体 (BB7.2 および W6/32) (立体障害) および T 細胞上のマウス抗ヒト T 細胞 CD8 クローン DK25 によりブロックされうると結論できた。しかしながら本試験において使用した抑制性抗体の何れも飽和量では添加しなかったことに注目するべきである。

【0532】

実施例8

本発明の構築物の結合:連結工程の間のHLAクラスI:デキストランの比率の影響

本実験においては、本発明のMHC分子構築物の最大細胞結合に必要なデキストラン担体分子当たりのHLAクラスI分子のより最適な数を分析した。

【0533】

以下の本発明のMHC分子構築物を使用した。

MHC分子構築物1、以下に示すような種々の量のHLA A0201を有するもの、

MHC分子構築物2、以下に示すような種々の量のHLA A0201を有するもの、

MHC分子構築物3、以下に示すような種々の量のHLA A0201を有するもの。

【0534】

MART-1ペプチドアナログ (ELAGIGILTV) を提示する組み換えビオチニル化HLA A0201複

10

20

30

40

50

合体の種々の量を種々の分子サイズのデキストラン担体分子、即ち150、270および500kDaのデキストラン担体分子をそれぞれ含有する構築物の個々の溶液に添加した。より典型的には、500kDaデキストラン（14個のSAと結合、各々平均で2個のFITCで標識）の80nM溶液を、それぞれ、88-（7040nM HLA A0201）、44-（3520nM）および14-（1121nM）倍過剰のモノビオチニル化HLA A0201複合体と共にFACS緩衝液（PBS、10mg/mlのBSA、0.2%アジド）中でインキュベートした。反応混合物を22℃で60分間インキュベートすることによりHLA A0201とデキストランに結合したSA分子との間の定常状態を得た。HLA A0201とデキストランの間の比率（デキストラン分子1個に対し88、44、14個のHLA分子）から、6.5、3.25および1に相当する連結の間のSAに対するHLAの比率が、それぞれ計算できた。SAとビオチニル化MHCの高い親和性のため、HLA A0201とデキストラン当たりのSAとの間の連結は完全な飽和（88倍過剰のHLA）、ほぼ飽和（44倍過剰のHLA）および部分的に飽和（14倍過剰のHLA）のMHC分子構築物を与えることが予期された。SA当たり4個の結合部位があると推定すると、分子構築物はデキストラン当たり54.4、44.2および14.1個のHLA A0201分子を負荷されている。溶液は4倍希釈（最終MHC分子構築物濃度20nM）した後に、標準的プロトコルに従ったフローサイトメトリーによるT細胞染色に用いた。

10

【0535】

同様の操作法において、145nMのSA/デキストラン調製品（270kDa、デキストラン当たり7個のSA、各SAは平均で二個のFITCで標識）をビオチニル化HLA A0201と連結した。連結工程において使用したHLA A0201の濃度はデキストラン濃度の48.5倍、24.2倍および8.1倍過剰量であった。HLA:SAの比率はそれぞれ7、3.5および1.1と計算された。SA当たり4個の結合部位があると推定すると、分子構築物はデキストラン当たり27.6個、24.2個および7.6個のHLA A0201分子を負荷されたことになる。溶液を20nMに希釈した後、標準的な方法でT細胞染色を行なった。

20

【0536】

同様の操作法において、244nM SA/デキストラン調製品（150kDa、デキストラン当たり4.4個のSA、各SAは平均で二個のFITCで標識）をビオチニル化HLA A0201と連結した。連結工程において使用したHLA A0201の濃度は、デキストラン濃度の28.8倍（7040nM HLA A0201）、14.4倍（3520nM HLA A0201）および7.2倍（1760nM HLA A0201）過剰量に相当した。HLA:SAの比率はそれぞれ6.5、3.3および1.6と計算できた。SA当たり4個の結合部位があると推定すると、分子構築物はデキストラン当たり17.6個、14.5個および7.0個のHLA A0201分子を負荷されたことになる。溶液を20nMに希釈した後、標準的な方法でT細胞染色を行なった。

30

【0537】

T細胞クローンを22℃で60分間インキュベートした後にT細胞クローン（5/127）の染色を行なった。T細胞クローンは、種々の量のHLA A0201を負荷されたMHC分子構築物の20nM溶液と共に室温で60分間インキュベートした。その後細胞を1回洗浄し、標準的なフローサイトメトリー操作法に従ってフローサイトメトリーにより細胞結合構築物について分析した。構築物は全て予測された通りクローン5/127に特異的に結合した（結果は図30に示す）。

【0538】

より大型（500kDa）のデキストラン担体分子を有する構築物は、平均して、デキストラン分子当たり約54個のビオチニル化HLA分子に対する結合部位の理論数で13.6個のストレプトアビジン分子と結合されていた（SA当たりビオチン結合部位4個と推定）。比較として、270kDaおよび150kDaのデキストラン担体分子を含有する構築物は、それぞれ42個および17個のビオチニル化HLAクラスI分子に相当するビオチン結合部位の理論数で、デキストラン当たり6.9個および4.4個のストレプトアビジン分子とそれぞれ結合していた。

40

【0539】

図30に示すとおり、500kDaのデキストラン担体分子を含有する構築物は、デキストラン担体分子当たり総数44個のHLAクラスI分子を負荷された場合に、T細胞に最適に結合した。比較として、それぞれ270および150kDaのデキストラン担体分子を含有する構築物は、

50

デキストラン当たり総数24.2個および14.5個のHLAクラスI分子を負荷された場合に最適に結合した（それぞれSA当たり結合HLA分子約4個に相当）。観察されたHLAクラスI/デキストランの密度は、4個のHLAクラスI分子/デキストラン分子に結合したSA分子に十分に相当するものであった。過剰なHLA分子中に発生したMHC分子構築物を用いたT細胞の染色が低下したという観察は、未結合の単量体HLA分子による抑制が原因と考えられる。即ち、本発明のMHC分子構築物は、担体分子の全ての使用可能なビオチン結合部位が連結工程の間に飽和された場合に、ペプチド特異的T細胞に最適に結合すると結論できた。しかしながら、過剰の未結合の単量体MHC分子は、MHC分子構築物と特定のTCRとの間の相互作用を抑制した。即ち、結果的に連結工程はMHC分子と結合部位に対する比率1:1で行なうべきである。

10

【0540】

実施例9

T細胞小集団へのMHC分子構築物および四量体の結合

本実験においては、本発明のMHC分子構築物の結合は四量体と比較して特定のT細胞のより小さい集団の改善された検出をもたらすことを示した。

【0541】

以下の本発明のMHC分子構築物を使用した。

MHC分子構築物1。

【0542】

以下の四量体を使用した。

20

四量体1。

【0543】

比較のために四量体を使用した。

【0544】

MART-1由来ペプチドアナログを認識するT細胞クローン5/127およびgp100由来ペプチドを認識するT細胞クローン5/130を、それぞれ、T細胞クローン5/127とT細胞クローン5/130に対する比率1:20で混合し、本発明のMHC分子構築物および四量体の分析に用いた。四量体は、本発明のペプチド相当ポリリガンドMHC分子構築物（図25および26参照）と比較して低い結合親和性（実施例3の結果参照）を補うために5倍高い濃度で使用した。

【0545】

30

細胞溶液を室温で1時間3nMのMHC分子構築物または15nMの四量体と共にインキュベートした。細胞を1回洗浄し、標準的なフローサイトメトリー操作法に従ってフローサイトメトリーにより分析した。図31に示すとおり、本発明の構築物と四量体は共に5/127T細胞クローンのMART-1特異的サブ集団に相当する約5%の細胞を染色した。しかしながら、本発明の構築物による細胞の染色は陽性と陰性のT細胞の間の区別が明瞭であった。

【0546】

比較として、四量体による染色では図31に示されるとおり2種のT細胞集団の間の区別の明瞭度はより低かった。

【0547】

結果として、本発明の構築物はより良好な染色を提供し、従って、従来技術の四量体と比較してより小さいT細胞集団のフローサイトメトリーによる検出においてより改善された能力を提供すると結論できた。

40

【0548】

実施例10

予め形成させたペプチドを含まないMHC分子構築物の適切なペプチド負荷後の特定のT細胞への結合

混合細胞サンプルにおける小さいT細胞特異性の検出（実施例9参照）における本発明のMHC分子構築物の意外にも高感度な能力をさらに、約1%のT細胞クローン5/127（「高親和性T細胞クローン」、図25参照）および1%の5/130（「低親和性T細胞クローン」、図25参照）を含有するサンプルを用いて検討した。1%の選択理由は種々の試験において増殖

50

中のT細胞のサブ集団は、多くの場合、血液サンプル中のT細胞の総数の約1%を含み、免疫応答患者において0.1~10%の範囲にあることが解かっているためである。

【0549】

以下の本発明のペプチドを含まないMHC分子構築物を、本発明のペプチドを含まないHLA A0201分子構築物から作成した。

MHC分子構築物7。

【0550】

さらにまた、MHC分子構築物1およびMHC分子構築物8も用いた。

【0551】

本実験においてはペプチド特異的ペプチドHLA A0201分子構築物をさらに作成した。

10

【0552】

以下の四量体をPEで標識したストレプトアビジンに連結したペプチドを含まないHLA A0201から作成した。

四量体6。

【0553】

さらにまた四量体1および四量体2も用いた。

【0554】

本発明のペプチドを含まないHLA分子構築物は、18℃で2時間、希釈緩衝液（20mM トリス、pH6.8、150mM NaCl）198ml中、1nmolの β_2m と共に60pmolのモノビオチニル化重鎖（実施例1.Cに記載の通りに得られた30mM重鎖分子を有する保存溶液2ml）をインキュベートすることにより形成した。形成した二量体（約270nM）は、4℃で保存した場合は数日間この緩衝液中で安定であった。本発明のペプチドを含まないHLA分子構築物は溶液100mLにストレプトアビジンデキストラン担体分子（500kDa、13.6個のSA/デキストラン、最終濃度10nMで添加）を添加することにより形成した。

20

【0555】

ペプチド提示HLA分子構築物（構築物1）は、最終濃度10mMとなるようにHLA二量体とデキストラン分子の溶液にMART-1ペプチドアナログELAGIGILTVを添加し、18℃で一晩インキュベートすることにより形成した。

【0556】

同様の方法において、gp100ペプチドを提示する本発明のMHC分子構築物8をペプチドKTW GQYWOVの添加により作成した。

30

【0557】

四量体は、MART-1ペプチドアナログELAGIGILTVまたはgp100ペプチドKTWGQYWOVを添加する前にSAとHLA分子の間の比が1:4を確実にするように70nMの最終濃度となるように順次PE標識SAを添加した以外は、同様の方法で作成した。四量体を比較のために使用した。

【0558】

染色の前に、本発明のMHC分子構築物および四量体を有する溶液を2mg/mlのBSAおよび0.2%アジドを含有する上記FACS緩衝液で2回希釈した。即ち、T細胞を染色するために使用した構築物と四量体の分子の濃度はそれぞれ5および35nMであった。

【0559】

2種のT細胞クローン5/127および5/130をそれぞれ、1:100の比率で混合、即ち、1つの細胞サンプルが約1%の5/127および99%の5/130 T細胞を含有し、もう一方の細胞サンプルが1%の5/130および99%の5/127を含有するようにした。混合細胞溶液は、T細胞の1%サブ集団により認識されるペプチドを提示する本発明の構築物または四量体の結合について試験した。

40

【0560】

フローサイトメトリーのために、細胞（ 5×10^5 ）を5分間300gで遠心分離し、本発明のMHC分子構築物または四量体を含有する溶液50ml中に再懸濁し、室温で60分間インキュベートした。その後、細胞を1回洗浄し、即座に標準的な操作法に従ってフローサイトメトリーにより分析した。

50

【0561】

図32に示すとおり、本発明のMART-1ペプチド（ELAGIGILTV）-提示構築物は陽性のT細胞（1.2%陽性染色細胞）の明確な区別をもたらしたのに対し、gp100ペプチド（KTWGQYWGV）を提示する構築物は約0.4%の染色であった。7倍高濃度で使用した場合も、相当する四量体は何れもT細胞を染色できなかった（データ示さず）。

【0562】

即ち、本発明のペプチドを含まないMHC分子構築物を作成することが実際に可能であったと結論できた。適切なペプチドをその後負荷することにより、得られるMHC分子構築物はT細胞のより小さい集団を染色できた。四量体とは対照的に、本発明のMHC分子構築物はフローサイトメトリーを用いて低親和性および高親和性のT細胞クローンの両方により認識された。

10

【0563】

実施例11

MART-1ペプチドを提示する放射標識MHC分子構築物の結合

本実験においては、放射標識された本発明のMHC分子構築物の細胞結合を調べた。分子構築物はMHC分子としてヨウ素化 β_2m の存在下で折りたたまれたHLA/ペプチド複合体を含有した。構築物は実施例1に従って調製したが、ここではヨウ素化 β_2m の存在下で折りたたみを起こさせた。

【0564】

以下の本発明のMHC分子構築物を用いた。

20

500kDaのデキストラン担体分子を有し、これはそこに連結させて27.2個のHLA A0201重鎖を、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）およびヨウ素化 β_2m との複合体として、13.6個のSAを介して保有しているMHC分子構築物。

【0565】

β_2m は標準的な操作法に従ってヨウ素化し、上記の通り完全にビオチニル化された活性な重鎖の折りたたみのために用いた（実施例1.C参照）。新しく発生した、ペプチド、重鎖および放射標識 β_2m 分子を含有するHLA A0201複合体は標準的なプロトコルに従ってG50クロマトグラフィーにより過剰の β_2m およびペプチドから精製した。放射活性はCOBRAガンマカウンターを用いて計数し、その後精製されたHLA A0201複合体をSA結合デキストランに連結した。

30

【0566】

1%のBSAを含有するPBS100ml中のMART-1またはgp100特異的T細胞（ 5×10^5 ）クローン5/127および5/130のサンプルを、実施例7に記載した種々の抗体の存在下または非存在下、1時間18℃で本発明の放射標識MHC分子構築物（100000cpm/サンプル）と共にインキュベートした。細胞を5回洗浄し、新しい試験管に移した後に細胞に結合した放射能を計数した。

【0567】

図33に示すとおり、5/127T細胞は、本発明の放射標識MHC分子構築物（MHC分子構築物1）に結合したのに対し、gp100ペプチド特異的T細胞クローン5/130は予測された通り結合しなかった。

40

【0568】

さらにまた、抗体BB7.2およびW6/32は実施例7の結果と合致して本発明の構築物の結合を抑制したが、BBM1は抑制しなかった。

【0569】

即ち、放射標識 β_2m を有する本発明のMHC分子構築物は特定のT細胞に結合することができる結論できた。さらにまた、標識されたMHC分子構築物のこの種の結合は異なるように標識されたMHC分子構築物の結合に匹敵するものであった。

【0570】

別の重要な特徴は、このような関係においては β_2m の標識は、 β_2m が種々のHLA分子の折りたたみを促進する共通のサブユニットであることから、重鎖またはペプチドの標識の

50

汎用的な代替となることである。

【0571】

実施例12

腫瘍特異的 T 細胞の染色

本実施例においては、乳癌患部における特異的な T 細胞を標識するポリリガンド MHC 分子構築物の能力を試験した。試験はスライド上に搭載されたヒトの皮膚、リンパ節および腫瘍幹部にそれぞれ由来するアセトン固定化された凍結生検サンプルに対して行なった。

【0572】

以下の MHC 分子構築物を使用した。

MHC 分子構築物 8、

MHC 分子構築物 11。

10

【0573】

図38において乳癌患部由来の HLA A2 陽性生検サンプル中の特異的 T 細胞の染色を示す。染色は最近同定された腫瘍関連抗原であるサーバイビン(survivin)由来のペプチドアナログ (SUR1M2) (LMLGEFLKL) と組み合わせた最大量の HLA-A0201 を提示するポリリガンド MHC 分子構築物 (500kDa) により行なった。

【0574】

凍結組織を切片化し、スライドガラス (Superfrost Plus Gold Slides, Erie Scientific Co, Portsmouth, New Hampshire) 上に採取し、一晚風乾し、5分間冷アセトン中に固定化した。

20

【0575】

以下の全ての操作工程は暗所において室温で行った。各工程の間、スライドをリン酸塩緩衝化生理食塩水 (PBS) 緩衝液 (pH7.6) で10分間3回洗浄した。

【0576】

スライドはまず (i) 一次抗体; 抗 CD8 (抗 CD8 クローン HIT8a, カタログ番号 550372, Pharmingen, San Diego, CA, USA, PBS 緩衝液中 1:100 希釈) と共にインキュベート (45 分間) し、その後 (ii) Cy3-結合ヤギ抗マウス (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA, PBS 中 1:500 希釈) と共に 45 分間、そして最後に (iii) ポリリガンド MHC 分子構築物 (100 μl、20 μM 構築物、PBS 中) と共に 75 分間インキュベートした。

30

【0577】

最後に染色したスライドをアンチフェード (antifade) 溶液 (Vectashield, Vector labs, Burlingame, CA, USA) 中でカバーガラスで被覆し、共焦顕微鏡下に分析するまで冷蔵庫に補完した。

【0578】

腫瘍生検サンプル中の細胞毒性 TILS の全集団を Cy3 結合抗 CD8 特異的抗体により可視化し (図 25、左列)、一方 SUR1M2 特異的 T 細胞クローンは FITC 結合ポリリガンド MHC 分子構築物 (上の右列) により可視化できた。CD8 陽性およびペプチドエピトープ特異的 T 細胞の二重染色は中央列 (上) の合体写真中に明らかになった。MHC 分子構築物により提示された別の HLA A0201 結合ペプチドであるメラノーマ関連 gp100 抗原は試験した乳癌組織中の TILS を染色しなかった (右列、中央)。第 2 の対照において SUR1M2 ポリリガンド MHC 分子構築物は、A2 陰性患者の乳癌生検サンプル中の T 細胞を染色しなかった (右側、下)。

40

【0579】

即ち、ペプチド特異的ポリリガンド MHC 分子は小さな標的 T 細胞集団に特異的に結合し、従って、乳癌患者の生検サンプル中の T 細胞の発現のインサイチュの分析を可能にすると結論づけた。

【0580】

実施例13

SUR1M2 ポリリガンド MHC 分子構築物を用いたメラノーマおよびリンパ節組織のインサイチュ染色

50

本実施例においてはHLA-A2陽性患者の材料に由来するメラノーマおよびリンパ節組織中のT細胞を特異的に染色するポリリガンドMHC分子構築物の能力を試験した。

【0581】

以下のMHC分子構築物を用いた。

MHC分子構築物11

【0582】

本実施例の実験上の詳細は組織がメラノーマ患者から得られたものであることを除き実施例12と同様である。

【0583】

図39の左列において、腫瘍（上）およびリンパ節（下）に由来する組織サンプルにおけるCD8+T細胞のCy-3染色を示す。右列はFITC A2-SUR1M2 MHC分子構築物による局在化染色を示す。CD8陽性およびSUR1M2ペプチド特異的T細胞の二重染色は、合体写真を示す中央列に示す。

10

【0584】

結論として、メラノーマ患部およびリンパ節由来の生検サンプル中のCD8+T細胞に対するSUR1M2ペプチド提示ポリリガンドMHC分子構築物のインサイチュの特異的結合が検出されることがわかった。

【0585】

実施例14

MART-1ペプチド提示ポリリガンドMHC分子構築物を用いたメラノーマ組織中のCD8+T細胞のインサイチュ染色

20

本実施例においてはA2-MART-1 MHC分子構築物によるHLA-A0201陽性患者由来のメラノーマ組織の特異的染色を調べた。

【0586】

以下のMHC分子構築物を用いた。

MHC分子構築物1

【0587】

本実施例の実験上の詳細は組織がメラノーマ患者から得られたものであること、およびポリリガンドMHC分子構築物がMART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）を提示したことを除き実施例12と同様である。

30

【0588】

メラノーマ生検サンプルの実験的染色の結果を図40に示す。左側の図はPEで染色されたCD-8陽性細胞の局在を示し、右側の図はFITCで染色されたMART-1特異的T細胞の存在を示す。二重染色されたMART-1/CD-8陽性細胞は合体した中央の図に観察される。

【0589】

結論として、実施例12と同様の方法を用いながら、HLA A0201陽性メラノーマ患者由来の患部におけるCD8T細胞へのMART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）を提示するポリリガンドMHC分子構築物の特異的結合がインサイチュで検出されることが示された。

【0590】

実施例15

40

MART-1およびMAGE-3ペプチド提示ポリリガンドMHC分子構築物を用いた注射部位由来の皮膚生検サンプル中のBV12反応性および非反応性T細胞のインサイチュ染色

治癒力のある免疫療法を開発する試みには、可溶性ペプチド候補、例えばSUR1M2および/またはペプチドもしくは腫瘍溶解液を負荷した樹状細胞（DC）を患者のどこに注射するかが解決策の一部を構成する。細胞免疫応答はT細胞と抗原提示細胞、例えば二次リンパ臓器中のDCの相互作用により開始されるが、治療上のワクチン接種は別のシナリオ、即ち、抗原特異的T細胞の局所的増殖および蓄積をもたらすと考えられる。腫瘍関連ペプチドを提示するポリリガンドMHC分子構築物を用いて、ペプチド特異的T細胞が注射部位において過剰出現するかどうかを調べた。

【0591】

50

以下のMHC分子構築物を使用した。

MHC分子構築物1

MHC分子構築物14

【0592】

実施例12で用いたのと同様の実験方法を用いて、Cy-3標識TCR VB12抗体、およびMART-1またはMAGE-3ペプチドを提示するFITC標識ポリリガンドMHC分子構築物を用いたインサイチュ二重染色分析を、注射部位由来の皮膚生検サンプルに対して行なった。TRC VB12抗体は、可変β鎖ファミリー12領域を発現するT細胞レセプターに対して特異的であるため、T細胞のサブセットとのみ反応する。

【0593】

10

結果を図41に示す。左列はT細胞の3種の異なった集団を示す。集団は、BV12-/MART-1反応性細胞(A)、BV12+/MART-1反応性細胞(B)ならびにBV12+/MART-1非反応性細胞(C)を含む。即ち、BV12ファミリーの全てのメンバーとMART-1/HLA A0201ポリリガンドMHC分子構築物との非特異的相互作用が除外され得た。さらにまた、MAGE-3ペプチド認識細胞は小さいクラスター中に認められ、このT細胞特異性が局所的に拡大していることを示唆している(D)。

【0594】

即ち結論として、特異的T細胞を認識するポリリガンドMHC分子構築物を用いながら、腫瘍溶解物をパルスしたDCの皮下注射48時間後の注射部位における特異的T細胞の集団のインサイチュの存在を明らかにすることが可能であり、抗原特異的T細胞の局所的拡大が

20

【0595】

実施例16

gp-100およびMAGE-3ペプチド提示ポリリガンドMHC分子構築物を用いた注射部位由来皮膚生検サンプル中のCD8反応性T細胞のインサイチュ染色

本実験においては、ペプチド抗原特異的T細胞の蓄積を実施例15に記載したのと同様の方法を用いてさらに検討した。

【0596】

以下のMHC分子構築物を使用した。

MHC分子構築物8

MHC分子構築物14

30

【0597】

実験結果は図42に示す。左側および中央の列は抗CD8抗体およびペプチド特異的ポリリガンドによる染色をそれぞれ示している。合体写真は右列に示す。

【0598】

gp100ペプチドエピトープでパルスしたDCによる患者の免疫化は、HLA A0201ポリリガンドMHC分子構築物により提示されるペプチド(図42B)を認識するがMAGE-3エピトープ(図42A)は認識しない特異的T細胞の浸潤をもたらすと結論づけられる。

【0599】

実施例17

40

MART-1ペプチド提示ポリリガンドMHC分子構築物によるメラノーマ組織中のCD8+T細胞の色原体インサイチュ染色

HLA A0201陽性メラノーマ患者由来の患部のCD8T細胞へのMART-1ペプチドアナログ(ELAGIGILTV)を提示するポリリガンドMHC分子構築物の特異的結合が、2種の異なる過酸化物ブロッキング法を用いてHRP媒介色原体染色により可視化できるかどうか調べた。

【0600】

以下のMHC分子構築物を使用した。

MHC分子構築物13

【0601】

凍結したメラノーマ患部を切片化(5mm)し、スライドガラス(Superfrost(登録商標

50

) Plus Gold Slides, Erie Scientific Co,Portsmouth,New Hampshire) 上に採取し、30分間風乾し、冷無水試薬等級アセトン (Aldrich,Milwaukee,WI,USA) 中に5分間固定化した。

【0602】

以下の全ての操作工程は室温で行った。各工程の間、スライドをPBS緩衝液 (pH7.6) で10分間3回バッチバイス(batchvice)で洗浄した。

【0603】

内因性ペルオキシダーゼは2種の試薬を用いる方法によりブロッキングした。

【0604】

ペルオキシド/メタノール溶液 (3% H_2O_2 50ml+メタノール200ml) (図43A) またはペルオキシダーゼブロッキング溶液 (コード番号S2023、DAKO A/S、Glostrup、Denmark) (図43B)。

【0605】

洗浄後、スライドを所定のHLAペプチドデキストラン270 HRP構築物 (100ml、2.9 10⁻⁹M/PBS) と共に30分間インキュベートした。

【0606】

2回洗浄後、結合した複合体を3-アミノ-9-エチルカルバゾール (AEC) -基質 (DAKO AEC Substrate System,DAKO A/S,Glostrup,Denmark) を用いて可視化した。25分後に反応を終了した。

【0607】

スライドはMayerのヘマトキシリン (コード番号S330930,DAKO A/S,Glostrup,Denmark、15秒) で対比染色し、僅かに青色となるまで (約30秒) PBS緩衝液中で洗浄した。最後にスライドにAquamount (DAKO Corporation,Carpenteria,CA,USA) を用いてカバーガラスを搭載し、写真機能を有する明視野顕微鏡 (Zeiss) を用いて分析した。

【0608】

結論として内因性ペルオキシドをブロックするために用いた方法とは無関係に良好な染色が達成された。

【0609】

実施例18

MHC分子構築物により誘発されるT細胞の活性化:同時刺激分子の影響

本実験においては、MHC構築物とともにインキュベートしたT細胞クローンの活性化が、NKRの活性化イソ型に結合するMHC分子構築物に結合した同時刺激分子の存在により影響を受けることが解かった。

【0610】

以下のMHC分子構築物を使用した。

MHC分子構築物15、

MHC分子構築物16、

MHC分子構築物17、

MHC分子構築物18。

【0611】

MHC分子構築物17および18は対照として使用した。

【0612】

MART-1ペプチドアナログ (ELAGIGILTV) またはgp100ペプチド (KTWGQYWV) を提示する組み換えビオチニル化HLA A0201複合体の最適以下の量を500kDのデキストラン担体分子を含有する構築物の溶液に添加した。より詳しくは、デキストランの80nM溶液 (13.6個のSAと結合、各々平均2個のFITCで標識) を1121nMのモノビオチニル化HLA A0201複合体と共に、510nMのモノビオチニル化MIC Aタンパク質の存在下または非存在下、PBS中でインキュベートした。実施例8から、HLA複合体のみを含有する分子構築物は、デキストラン当たり14.1個のHLA A0201分子を負荷されているものと考えられうる。HLAおよびMIC Aタンパク質を含有する分子構築物にデキストラン当たり14.1個のHLA A0201分子およびデキ

10

20

30

40

50

ストラン当たり7.1個のMIC A分子をそれぞれ負荷した。

【0613】

MART-1ペプチド/HLA A0201特異的T細胞クローン5/127 (5×10^5) を、培地中で増殖させ、MIC Aタンパク質の存在下または非存在下、MART-1またはgp100ペプチドのいずれかを提示する分子構築物5nMと共にインキュベートした。細胞は37℃でそれぞれ24時間および48時間インキュベートした後に標準的な操作法に従ってELISAにより上澄み中のIFN-gを測定した。

【0614】

図44に示すとおり、MIC Aと組み合わせた、または組み合わせないMART-1ペプチドを提示するHLA A0201を含有する構築物は、24時間後に5/127 T細胞クローンのIFN γ 放出を刺激し、両方の構築物は結合が可能であり、何らかのシグナル伝達を誘発すると示唆された。一方、HLAおよびMIC Aを含有する分子構築物のみが、IFN γ の増量により示されるとおりそれ以上の刺激を行なうことができた。比較として、MART-1ペプチド/HLA複合体のみを含有するMHC分子構築物の刺激ではIFN γ の放出は不変であった。gp100ペプチドを提示するMHC分子構築物はいずれもこの実験では刺激を起こすことが不可能であった（データ示さず）。

10

【0615】

結論として、適切なペプチドを提示するMHC分子の分子構築物はペプチド特異的TCRに結合した場合にT細胞を刺激することができるといえる（図25Bおよび30参照）。しかしながら適切なペプチド-HLA複合体およびMIC Aタンパク質を含有する分子構築物のみが長時間のインキュベーションの際にT細胞を刺激した。この特徴は、同時刺激タンパク質を有さない分子構築物で刺激された場合のT細胞のアネルギーの誘導により説明できる。この構築物は初期の刺激、その後のT細胞の不活性化が可能であり、これはアネルギーの特徴である。HLAおよびMIC Aを有するMHC分子構築物は継続的な刺激が可能であった。

20

【0616】

実施例19

複数の結合成分を連結して保有する担体分子の調製

複数の結合成分（例えばストレプトアビジン（SA））を自らに連結して保有する種々の担体分子（例えばそれぞれ150、270および500kDaのデキストラン）を以下に記載する操作法に従って調製した。MHC分子および/または生物活性化化合物をその後連結した。各SAに対するカップリング部位の理論数は4であり、このことは各SAデキストラン分子の負荷許容量は22.4 (4×5.6)、41.2 (4×10.3) および68 (4×17.0) であることを意味している。さらにまた、MHC分子/生物活性化化合物を直接デキストラン分子に結合させることができ、即ち、より大きい負荷許容量を得ることができる。

30

【0617】

SA-デキストラン（150、270、500kDa）

ストレプトアビジン（SA、Genzyme）を一晩透析した（5ml中100mg、0.10M NaCl 1000 mlに対して透析、2~4℃、10kDaのMwCO、3回交換）。UV吸光度の測定の後、濃度を計算した。

【0618】

40

SA溶液を150、270または500kDaのビニルスルホン活性化デキストラン（約25%活性化）の溶液に添加し（総量で、1.6mgビニルスルホンデキストラン/ml、7.7mg SA/ml、0.1M NaCl、25mM炭酸塩緩衝液、pH8.5）、18時間30℃で攪拌した。残存する反応基は全てエタノールアミン含有緩衝液（110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH7.0）の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、30℃で30分間攪拌した。このようにして得られた重合体分子（SA-デキストラン）はゲル濾過（FPLC、Pharmacia、S-200、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2）により未結合のSAから精製した。

【0619】

デキストラン分子当たりのSAの取りこみの程度は、278nmにおけるUV吸光度から計算した。SAの取りこみは、それぞれ平均して、5.6（150kDaデキストランの場合）、10.3（270

50

kDaデキストランの場合) および17.0 (500kDaデキストランの場合) であった。分子はミリポアフィルターの遠心分離機を用いて3.0mgのSA/mLの等価となるまで濃縮した。

【0620】

実施例20

複数の標識結合成分を連結して保有する担体分子の調製

以下に記載する操作法により、複数の標識化合物 (例えばAlexa 647) で標識した複数の結合成分 (例えばストレプトアビジン (SA)) を自らに連結して保有する種々の担体分子 (例えばそれぞれ150、270および500kDaのデキストラン) を調製した。MHC分子および/または生物活性化合物をその後連結した。各SAに対するカップリング部位の理論数は4であり、このことは各SAデキストラン分子の負荷許容量は22.4 (4×5.6)、41.2 (4×10.3) および68 (4×17.0) であることを意味している。さらにまた、MHC分子/生物活性化合物を直接デキストラン分子に結合させることができ、即ち、より大きい負荷許容量を得ることができる。

10

【0621】

Alexa 647標識SA-デキストラン (150、270、500kDa)

実施例19で得たSAデキストラン分子をAlexa Fluor 647 Protein標識キット (Molecular Probes, 製品番号A-20173) の製造元の指示書に従ってAlexa 647で標識した。反応条件は1バイアルのAlexa 647、2.0mg SA/mL、0.10M NaCl、50mM炭酸塩、pH 8.0、総量0.500mL、30℃暗所1時間とした。残存する反応基は全てエタノールアミン含有緩衝液 (110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH7.0) の0.050mL容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、30℃で30分間攪拌した。得られた蛍光標識重合体分子は透析により未結合の染料から精製した (1000mlの0.10M NaClに対して透析、2~4℃、10kDa MwCO、3回交換、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2)。

20

【0622】

デキストラン分子当たりのSAの取りこみの程度、およびSA当たりのAlexa 647の取りこみならびに分子の濃度は278および650nmのUV吸光度から計算した。分子には保存料として15mMとなるようにアジ化ナトリウムを添加した。結果を以下に示す。

【0623】

デキストラン 担体分子	デキストラン当たり のSA(平均)	SA当たりの Alexa 647(平均)	デキストランの 濃度(モル/l)
150	5.6	2.7	60×10^{-8}
270	10.3	2.6	50×10^{-8}
500	17.0	2.7	20×10^{-8}

30

【0624】

実施例21

複数の結合成分を自らに連結して保有する担体分子の調製

以下に記載する方法により、複数の結合成分 (例えばウサギ抗ビオチン抗体) を自らに連結して保有する種々の担体分子 (例えばそれぞれ150、270および500kDaのデキストラン) を調製した。MHC分子および/または生物活性化合物をその後所望に応じて連結しうる。

【0625】

40

ウサギ抗ビオチンデキストラン (150、270、500kDa)

ウサギ抗ビオチン抗体 (アフィニティー精製、Fab2、約100kDa、DAKOコード番号DM0069) を一晚透析した (5ml中100mg抗体、0.10M NaCl 1000mLに対して透析、2~4℃、10kDaのMwCO、3回交換)。UV吸光度の測定の後、濃度を計算した。抗体溶液を150、270または500kDaのビニルスルホン活性化デキストラン (約25%活性化) の溶液にそれぞれ添加し (総量で0.680mL、1.07mgビニルスルホンデキストラン/ml、15.25mg抗体/ml、0.1M NaCl、25mM炭酸塩緩衝液、pH8.5)、18時間30℃で攪拌した。残存する反応基は全てエタノールアミン含有緩衝液 (110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH7.0) の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、30℃で30分間攪拌した。得られた重合体分子はゲル濾過 (FPLC、Pharmacia、S-200、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2) に

50

より未結合の抗体から精製した。

【0626】

デキストラン当たりの抗体の取りこみの程度は278nmにおけるUV吸光度から計算した。デキストラン当たりの抗体の数は、平均で8.4 (150kDaデキストランの場合)、19.5 (270kDaデキストランの場合) および34.4 (500kDaデキストランの場合) であった。分子はミリポアフィルターの遠心分離機を用いてそれぞれ3.9、3.4および3.4mg抗体/mLの等価となるまで濃縮した。

【0627】

同じ条件を用いた他の調製において、デキストラン当たりの抗体の取りこみは7.2 (150kDaデキストランの場合) および11.2 (500kDaデキストランの場合) であった。これらの分子はミリポアフィルターの遠心分離機を用いてそれぞれ3.5mg抗体/mLの等価となるまで濃縮した。

【0628】

実施例22

複数の標識結合成分を自らに連結して保有する担体分子の調製

以下に記載する操作法により、複数の標識化合物 (例えばAlexa 532またはAlexa 647) で標識した複数の結合成分 (例えばウサギ抗ビオチン抗体) を自らに連結して保有する種々の担体分子 (例えばそれぞれ150および270kDaのデキストラン) を調製した。MHC分子および/または生物活性化合物をその後所望により連結しうる。

【0629】

Alexa 532または 647標識ウサギ抗ビオチンデキストランの調製

実施例21で得たウサギ抗ビオチンデキストラン分子をAlexa Fluor 532Protein標識キット (Molecular Probes, 製品番号A-10236) またはAlexa Fluor 647Protein標識キット (Molecular Probes, 製品番号A-20173) の製造元の指示書に従ってAlexa 532またはAlexa 647で標識した。反応条件は1バイアルのAlexa染料、2.0mg抗体/mLの等量、0.10M NaCl、50mM炭酸塩、pH 8.0、総量0.500mL、30℃暗所1時間とした。残存する反応基は全てエタノールアミン含有緩衝液 (110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH 7.0) の0.050mL容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、30℃で30分間攪拌した。4種の異なるように蛍光標識された重合体分子は透析により未結合の染料から精製した (1000mlの0.10M NaClに対して透析、2~4℃、暗所、10kDa MwCO、3回交換)、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2)。

【0630】

抗体当たりのAlexa 532の取りこみの程度、およびデキストラン当たりの抗体の取り込み、ならびに濃度を、278および530nmのUV吸光度から計算した。分子には保存料として15mMとなるようにアジ化ナトリウムを添加した。

【0631】

抗体当たりのAlexa 647の取りこみの程度、およびデキストラン当たりの抗体の取り込み、ならびに濃度を、278および650nmのUV吸光度から計算した。分子には保存料として15mMとなるようにアジ化ナトリウムを添加した。

【0632】

デキストラン 担体分子	デキストラン当たり の抗体(平均)	抗体当たりの Alexa 532(平均)	デキストランの 濃度(モル/l)
150	8.4	3.0	165.5×10^{-8}
270	19.5	2.9	69.4×10^{-8}

【0633】

デキストラン 担体分子	デキストラン当たり の抗体(平均)	抗体当たりの Alexa 647(平均)	デキストランの 濃度(モル/l)
150	7.21	2.7	150×10^{-8}
270	11.2	2.6	65×10^{-8}

【0634】

実施例23

複数の標識結合成分を自らに連結して保有する担体分子の調製

以下に記載する操作法により、複数の標識化合物（例えばFITC）で標識した複数の結合成分（例えばウサギ抗ビオチン抗体）を自らに連結して保有する種々の担体分子（例えばそれぞれ150および270kDaのデキストラン）を調製した。MHC分子および/または生物活性化合物をその後所望により連結しうる。

10

【0635】

FITC標識ウサギ抗ビオチンデキストランの調製

実施例21で得たウサギ抗ビオチンデキストラン（150kDaおよび270kDaのデキストラン）をFITC標識に用いた。冷凍庫に保存したFITCバイアル（FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、Molecular Probes、製品番号F-1906）を開封前1時間室温で放置した。FITC溶液（10.1mg/ml NMP）をウサギ抗ビオチンデキストラン分子の攪拌混合物に添加した（総量で0.750ml、分子濃度は1.5mg抗体/mlに等量、0.0487mgFITC/ml、抗体当たり約8.3個のFITCに等量、0.1M NaCl、200mM炭酸塩緩衝液、pH8.5、30℃、1時間暗所）。残存する反応基は全てエタノールアミン含有緩衝液（110mMエタノールアミン、50mM HEPES、0.1M NaCl、pH7.0）の1/10容量の反応混合物を添加することによりクエンチングし、30℃で30分間攪拌した。2種の異なるようにFITC標識されたウサギ抗ビオチン重合体分子はフロート・ア・ライザー中で透析することにより未結合のフルオレセインから精製した（500mlの0.10MのNaClに対して透析、2〜4℃、暗所、10kDa MwCO、3回交換、0.1M HEPES、0.1M NaCl、pH7.2）。

20

【0636】

抗体当たりのフルオレセインの取りこみならびにデキストラン当たりの抗体の取りこみの程度は、278および498nmのUV吸光度から計算した。分子には保存料として15mMとなるようにアジ化ナトリウムを添加した。

30

【0637】

デキストラン 担体分子	デキストラン当たり の抗体(平均)	抗体当たりの フルオレセイン (平均)	デキストランの 濃度(モル/l)
150	8.4	1.7	125.2×10^{-8}
270	19.5	1.8	41.6×10^{-8}

【0638】

実施例24

免疫磁性的分離方法におけるMHC分子を用いたCTLの単離

本実験においては、抗原反応性細胞傷害性Tリンパ球（CTL）が磁性ビーズ上に固定化したMHC分子の使用によりHLA-A0201陽性患者のリンパ節サンプルから単離できることが示された。

40

【0639】

メラノーマ浸潤リンパ節生検材料由来の単細胞懸濁液は、細胞破碎物を除去するためのホモゲナイズと遠心分離の後に入手した。細胞の単離は最近同定された腫瘍関連抗原であるサーバイビン由来のペプチドアナログ（SUR1/M2）（LMLGEFLKL）と組み合わせたHLA A0201を提示するビオチニル化MHC分子でコーティングされた磁性ビーズ（Dynabeads（登録商標）、ストレプトアビジン添加）を用いて行なった。固定化されたMHC分子を有する磁性ビーズを細胞懸濁液に添加し、30℃で30分間インキュベートすることによりビーズを細胞に結合させた。結合後、広がった細胞を磁石を用いて単離した。図45に結果を示す。図

50

45Aは、このようにして単離されたMHC分子構築物コーティングビーズに結合したサーバイ
ビン反応性CTLを示す明視野顕微鏡写真である。

【0640】

同様の実験において、ビオチニル化組み換えHLA A0201/インフルエンザペプチドでコー
ティングされた磁性ビーズを陰性対照として用いた。図45Bに示されているとおり、HLA
A0201/インフルエンザペプチド複合体でコーティングされた磁性ビーズはメラノーマ浸
潤リンパ節生検材料由来のCTL細胞に結合しなかった。

【0641】

即ち、本発明のMHC分子構築物の高い親和性は目的の細胞により良好な特異的結合をも
たらし、従って、そのような細胞は本発明のMHC分子構築物を用いることにより得ること
ができることが期待される。

【0642】

参考文献

1. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, and Davis MM, Science 274 (5284), 94-96 (October 1996), "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes". Erratum in Science 230(5371), 1821 (19 June 1998).
2. Dal Porto, J, Johansen TE, Catipovic B, Parfiit DJ, Tuveson D, Gether U, Kozolowski S, Fearon DT, Schneck JP, PNAS USA 90(14), 6671-6675 (15 July 1993), "A soluble divalent Class I major histocompatibility complex molecule inhibits alloreactive T-cells at nanomolar concentrations". 10
3. Viola A, and Lanzavecchia A., APMIS 107(7), 615-623 (July 1999), "T-cell activation and the dynamic world of rafts". 20
4. Zhang W, Sommers CL, Burshtyn DN, Stebbins CC, DeJarnette JB, Tribble RP, Grinberg A, Tsay HC, Jacobs HM, Kessler CM, Long EO, Love PE, and Samelson LE, Immunity 10(3), 323-332 (March 1999), "Essential role of LAT in T-cell development".
5. Ugolini S, and Vivier E., Curr. Opin. Immunol. 12(3), 295-300 (June 2000), "Regulation of T-cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules". 30
6. Ljunggren HG, Stam NJ, Ohlen C, Neefjes JJ, Hoglund P, Heemels MT, Bastin J, Schumacher TN, Townsend A, Karre K, et al., Nature 346(6283), 476-480 (2 August 1990), "Empty MHC class I molecules come out in the cold".
7. Coles MC, McMahon CW, Takizawa H, and Raulet DH., Eur. J. Immunol. 30(1), 236-244 (January 2000), "Memory CD8 T

lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors".

8. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, and Wiley DC., Nature 329(6139), 512-518 (8-14 October 1987), "The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens".

9. Matsumura M, Fremont DH, Peterson PA, and Wilson IA, Science 257(5072), 927-934 (14 August 1992), "Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules".

10. US 5,635,363 (Altman).

11. Marchand M, Weynants P, Rankin E, Arienti F, Belli F, Parmiani G, Cascinelli N, Bourlond A, Vanwijck R, Humblet Y, et al., Int. J. Cancer 63(6),883-885 (11 December 1995), "Tumor regression responses in melanoma patients treated with a peptide encoded by gene MAGE-3".

12. "HLA: Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implication", Ed. Dominique Charron, EDK Press 1997.

13. "Molecular Cloning" (Sambrook, Fritsch and Maniatis), Cold Spring Harbor Press, 1989.

14. Merrifield RB, Stewart JM, et al., Anal. Chem. 38, 1905-1914 (1966), "Instrument for Automated Synthesis of Peptides".

15. Merrifield B., Science 232, 341-347 (1986), "Solid Phase Synthesis".

10

20

30

16. Barany G, Kneib-Cordonier N, et al., Int. J. Peptide Protein Res. 30, 705-739 (1987), "Solid-phase peptide synthesis: A silver anniversary report".
17. Fields GB, and Noble RL, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 161-214 (1990), "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids".
18. Gordon EM, Barrett RW, et al., J. Med. Chem. 37(10), 1385-1401 (1994), "Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and future directions". 10
19. Houghten RA, Pinilla C, et al., Nature 354, 84-86 (1991), "Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery". 20
20. Jung G, and Beck-Sickinger AG, Angew. Chem. Int. Engl. 31(4), 367-384 (1992), "Multiple Peptide Synthesis Methods and Their Applications".
21. Garboczi DN, Hung DT, and Wiley DC, PNAS USA 8(8), 3429-3433 (15 April 1992), "HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in Escherichia coli and complexed with single antigenic peptides". 30
22. WO 93/01498 (A. Lihme and T. Boenisch, "Water soluble, polymer based reagents and conjugates comprising moieties derived from divinyl sulfone").
23. Larsson, Lars-Inge, "Immunocytochemistry: Theory and Practice", CRC Press inc., Boca Raton, Florida, (1988), Chapter 3, page 77-146.

24. Kuttler, C., Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Rammensee, H.-G., Schild, H., Haderer, K.P., An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages, J. Mol. Biol. 298 (2000), 417-429

25. US 4,336,173

26. EP 0 106 873 (Sintef)

27. US 4,459,378

28. US 4,654,267

29. WO 99/11661

30. WO 91/15766

31. WO 2000/15665

10

20

【図面の簡単な説明】

【0643】

【図1】図1は、図2～図24において使用される記号のまとめである。直接的または間接的な標識、結合実体のペア、ハプテン、抗体、特異的なレセプター、MHC分子、ペプチドおよびポリマー。

【図2】図2は、標識された結合実体を介してキャリア分子に結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。

【図3】図3は、結合実体を介してキャリア分子に結合している、異なるペプチドで満たされた異なるMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。

【図4】図4は、標識されたキャリア分子に結合実体を介して結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。

30

【図5】図5は、標識されたキャリア分子に結合実体を介して結合している、異なるペプチドで満たされた異なるMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。

【図6】図6は、標識されたキャリア分子に結合実体を介して結合している、異なるペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。

【図7】図7は、異なる結合実体を介してキャリア分子に結合している、異なるペプチドで満たされた異なるMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。結合実体が標識される。

【図8】図8は、結合実体を介してキャリア分子に結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。MHC分子が標識される。

【図9】図9は、キャリア分子に直接結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。MHC分子が標識される。

40

【図10】図10は、キャリア分子に直接結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。キャリア分子が標識される。

【図11】図11は、キャリア分子に直接結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。ペプチドが標識される。

【図12】図12は、キャリア分子に直接結合している、異なるペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。MHC分子が標識される。

【図13】図13は、キャリア分子に直接結合している、異なるペプチドで満たされた異なるMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。キャリア分子が標識される。

【図14】図14は、特異的な抗体および/または抗原である結合実体を介してキャリア

50

分子に結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。抗体/抗原が標識される。

【図15】図15は、特異的な抗体および/または抗原である結合実体を介してキャリア分子に結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。キャリア分子が標識される。

【図16】図16は、特異的な抗体および/または抗原である結合実体を介してキャリア分子に結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。MHC分子が標識される。

【図17】図17は、特異的な抗体および/または抗原である結合実体を介してキャリア分子に結合している、異なるペプチドで満たされた異なるMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。MHC分子が標識される。

10

【図18】図18は、特異的な抗体および/または抗原である結合実体を介してキャリア分子に結合している、標識されたペプチドでそれぞれが満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。

【図19】図19は、特異的な抗体および/または抗原である結合実体を介してキャリア分子に結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。標識された二次的な抗体/抗原が結合実体の抗体/抗原に結合している。

【図20】図20は、標識された特異的な抗体および/または抗原である結合実体を介してキャリア分子に結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。標識された二次的な抗体/抗原が結合実体の抗体/抗原に結合している。標識は同じまたは異なってもよい。

20

【図21】図21は、ハプテンで標識された結合実体を介してキャリア分子に結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。標識された抗体が結合実体上のハプテンに結合している。

【図22】図22は、ハプテンで標識されたキャリア分子に直接結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。標識された二次抗体がキャリア分子上のハプテンに結合している。

【図23】図23は、ハプテンで標識されたキャリア分子に直接結合している、異なるペプチドで満たされた複数のMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。標識された二次抗体がキャリア分子上のハプテンに結合している。

30

【図24】図24は、ハプテンで標識されたキャリア分子に直接結合している、それぞれがペプチドで満たされた複数の異なるMHC分子を含むMHC分子構築物を示す。標識された二次抗体が結合実体のハプテンに結合している。

【図25】図25は、本発明のMART-1特異的ポリリガンドMHC分子構築物およびMART-1特異的MHC分子四量体の特異的T細胞クローンに対する結合のフローサイトメトリー分析を示す。データは、ポリリガンドMHC分子構築物およびMHC分子四量体のそれぞれの、漸増濃度を関数とする生存T細胞の染色強度として表される。図25Aは、MART-1およびgp100に対して特異的なT細胞クローンの5/127および5/130に対するPE-A2-MART-1四量体の結合における特異性を示す。図25Bは、FITC A2-MART-1ポリリガンドMHC分子構築物のT細胞クローン5/127への結合に対するキャリア分子サイズの影響を示す。

40

【図26】図26は、ポリリガンドMHC分子構築物およびMHC分子四量体のインフルエンザ特異的T細胞株に対する結合のフローサイトメトリー分析を示す。これは特異的かつ用量依存的な染色を例示する。図26A:PE標識された四量体のインフルエンザ特異的T細胞株に対する結合。図26B:FITC標識されたポリリガンドMHC分子構築物のインフルエンザ特異的T細胞株に対する結合。

【図27】図27は、T細胞クローン5/127に対する本発明のポリリガンドMHC分子構築物およびMHC分子四量体による時間および濃度に依存する染色の比較フローサイトメトリー分析を示す。図27A:14nM~112nMの四量体濃度におけるPE標識のMART1-A2四量体の時間依存的結合。図27B:2nM~16nMの濃度におけるFITC標識のMART1-A2ポリリガンドMHC分子構築物の時間依存的結合。

50

【図 28】図 28 は、細胞と結合した本発明の A2-MART-1 ポリリガンド MHC 分子構築物の T 細胞クローン 5/127 からの脱離に対する温度影響のフローサイトメトリー分析を示す。影響は、4°C、22°C および 37°C でそれぞれ調べられた。

【図 29】図 29 は、ペプチド結合部位近傍に対するモノクローナル抗体による、T 細胞クローン 5/127 への A2-MART-1 ポリリガンド MHC 分子構築物の結合の阻害のフローサイトメトリー分析を示す。図 29A: 下記抗体の影響が試験された: BB7.2、HLA A0201 特異的; W6/32、HLA A、B、C の汎特異的; BBM1、 β_2m 特異的。すべての抗体は 10nM の濃度で使用された。bck: バックグラウンド値、-mab: 抗体処理なし。図 29B: 2 つのモノクローナル抗体 (BBM1 (β_2m 特異的) 抗体およびマウス抗ヒト T 細胞 CD8 抗体) の濃度を増大したときの試験。

【図 30】図 30 は、T 細胞クローン 5/127 に対する HLA クラス I ポリリガンド構築物の結合のフローサイトメトリー分析を示す。これは、結合プロセスにおける HLA 対デキストラン比の変化の影響を示す。150kDa、270kDa および 500kDa のデキストランが試験された。

【図 31】図 31 は、(A) 15nM の濃度の PE 標識四量体 MART-1/HLA 分子、(B) 3nM の濃度の FITC 標識ポリリガンド MART-1/HLA 分子構築物で 5% 染色された A2-MART-1 ペプチド特異的 T 細胞亜集団の分析を示すフローサイトメトリーダイアグラムである: T 細胞集団は、T 細胞クローン 5/127 (MART-1 特異的) および T 細胞クローン 5/130 (gp100 特異的) の 2 つを混合することによって得られた。

【図 32】図 32 は、(A) MART-1 特異的 T 細胞 (クローン 5/127) および (B) gp100 特異的 T 細胞 (クローン 5/130) のポリリガンド MHC 分子構築物染色を示すフローサイトメトリーダイアグラムである。それぞれの場合において、T 細胞集団の 1% のみが陽性であった。これは、患者サンプルにおいて典型的に見出される陽性 T 細胞のレベルを模倣している。T 細胞集団は、T 細胞クローンの 5/127 および 5/130 の 2 つを関連する比率で混合することによって得られた。

【図 33】図 33 は、A2-MART-1 を示すヨウ素化 (^{125}I 標識された β_2m) ポリリガンド MHC 分子構築物の T 細胞クローン 5/127 (MART-1 特異的) への結合に対する 10nM のモノクローナル抗体の存在/非存在の影響を示す結合アッセイである。下記の抗体が使用された: BBM1 (ヒト β_2m 特異的); W6/32 (HLA A、B、C の汎特異的); および BB7.2 (HLA-A0201 特異的)。Ctrl 5/130: 陰性のコントロール細胞株 5/130。

【図 34】図 34 は、HLA クラス I 分子および HLA クラス II 分子の興味深い結合モチーフを示す。

【図 35】図 35 は、興味深い HIV/SIV タンパク質を示す。

【図 36】図 36 は、T リンパ球によって認識される興味深い腫瘍関連抗原を示す。

【図 37】図 37 は、興味深い HIV CTL エピトープを示す。

【図 38】図 38 は、標識された CD8 抗体およびポリリガンド MHC 分子構築物を用いた、種々の乳癌病巣から採取された生検物における T 細胞の蛍光インサイチュ染色を示す。図 38A: HLA A2 陽性患者の生検物に対する、Cy3 標識 CD8 抗体による染色 (左写真)、フルオレセイン標識サーバイビン (survivin) アナログペプチドポリリガンド HLA A0201 分子構築物による染色 (右写真)、および合体写真 (中央の写真)。図 38B: HLA A2 陽性患者の生検物に対する、Cy3 標識 CD8 抗体による染色 (左写真)、フルオレセイン標識ナンセンス gp100 アナログペプチドポリリガンド HLA A0201 分子構築物による染色 (右写真)、および合体写真 (中央の写真)。図 38C: HLA A2 陰性患者の生検物に対する、Cy3 標識 CD8 抗体による染色 (左写真)、フルオレセイン標識サーバイビンアナログペプチドポリリガンド HLA A0201 分子構築物による染色 (右写真)、および合体写真 (中央の写真)。

【図 39】図 39 は、標識された CD8 抗体およびポリリガンド MHC 分子構築物を用いた、メラノーマ病巣およびリンパ節から採取された生検物における T 細胞の蛍光インサイチュ染色を示す。上段: HLA A2 陽性患者由来のメラノーマ病巣の、Cy3 標識 CD8 抗体による染色 (左写真)、フルオレセイン標識サーバイビンアナログペプチドポリリガンド HLA A0201 分子構築物による染色 (右写真)、および合体写真 (中央の写真)。下段: HLA A2 陽性患者由来のリンパ節の、Cy3 標識 CD8 抗体による染色 (左写真)、フルオレセイン標識サーバイビンアナログペプチドポリリガンド HLA A0201 分子構築物による染色 (右写真)、および

合体写真（中央の写真）。

【図４０】図４０は、HLA A2陽性患者由来のメラノーマ病巣の、PE標識CD8抗体によるT細胞の蛍光インサイチュ染色（左写真）、フルオレセイン標識MART-1ペプチドポリリガンドHLA A0201分子構築物によるT細胞の蛍光インサイチュ染色（右写真）、および合体写真（中央の写真）である。

【図４１】図４１は、標識されたTCR VB12抗体およびMART-1ペプチドポリリガンドMHC分子構築物またはMAGE-3ペプチドポリリガンドMHC分子構築物を用いた、免疫化注射部位からの皮膚生検物における種々のT細胞集団の蛍光インサイチュ染色を示す。図41A、図41Bおよび図41C: Cy3標識TCR BV12抗体による染色（左写真）、フルオレセイン標識MART-1ペプチドポリリガンドHLA A0201分子構築物による染色（中央の写真）、および合体写真（右写真）。図41D: Cy3標識TCR BV12抗体による染色（左写真）、フルオレセイン標識MAGE-3ペプチドポリリガンドHLA A0201分子構築物による染色（中央の写真）、および合体写真（右写真）。

10

【図４２】図４２は、CD8抗体およびポリリガンドMHC分子構築物を用いた、gp100ペプチドエピトープ免疫化注射部位からの皮膚生検物におけるT細胞の蛍光インサイチュ染色を示す。図42A: Cy3標識CD8抗体による染色（左写真）、フルオレセイン標識ナンセンスMAGE-3ペプチドポリリガンドHLA A0201分子構築物による染色（中央の写真）、および合体写真（右写真）。図42B: Cy3標識CD8抗体による染色（左写真）、フルオレセイン標識gp100ペプチドポリリガンドHLA A0201分子構築物による染色（中央の写真）、および合体写真（右写真）。

20

【図４３】図４３は、MART-1ペプチドアナログ（ELAGIGILTV）ポリリガンドHRP標識MHC分子構築物を用いた、HLA A0201陽性メラノーマ組織におけるT細胞のAEC色素原インサイチュ染色の明視野顕微鏡写真である。異なる内因性ペルオキシダーゼブロッキング試薬が使用された。図43A: 過酸化水素/メタノール溶液、図43B: DAKOペルオキシダーゼブロッキング溶液。陽性の細胞は赤く着色される。

【図４４】図４４は、T細胞からのIFN-gの放出に対する、MIC Aタンパク質の非存在下またはMIC Aタンパク質との混合におけるポリリガンドMHC分子構築物の影響を示す。細胞は、上清中のIFN-gの測定の前に、示された期間にわたってMHC分子構築物とインキュベーションされた。T細胞クローンは、関連しないペプチドを示すMHC分子構築物とインキュベーションされたとき、IFN-gを分泌しなかった。

30

【図４５】図４５は、磁気ビーズを使用してメラノーマ浸潤リンパ節から単離されたサーバイビン反応性細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の明視野顕微鏡写真である。図45A: サーバイビンペプチド反応性CTLが、組換えHLA A0201/サーバイビンペプチド複合体がコーティングされたDynabeads（登録商標）により単離/ロゼット化された。図45B: 組換えHLA A0201/インフルエンザペプチド複合体がコーティングされたDynabeads（登録商標）が陰性コントロールとして使用される。

【図４６】図４６は、異物のペプチドおよびタンパク質は、細胞の表面に示されたMHC分子を介して免疫装置に提示される。一部の細胞が、細胞の表面に提示されたペプチドとの複合体でMHC分子を認識して、複合体となったMHC分子に結合する。そのような細胞（MHC認識細胞）はMHC分子/ペプチドの種々の組合せを「試食(taste)」する。MHC認識細胞表面のレセプターがMHC分子/ペプチド複合体に結合することができる場合、一連の細胞応答が誘導され得る。

40

【図４７】図４７は、ペプチドとの複合体を形成したMHC分子が細胞によってレセプターにどのように合致するかを例示する。本発明のMHC構築物のMHC分子はそれぞれが、MHC分子/ペプチド複合体を示す細胞のように作用する。従って、特異的な細胞の存在、すなわち、MHC分子/ペプチドの特定の組合せを認識するレセプターを有する細胞の存在を同定することができる。

【図４８】図４８は、本発明のMHC分子構築物のMHC分子が「数珠つなぎの真珠」として見ることができる様子を例示する。MHC分子構築物は、MHC認識細胞表面のレセプターに対して大きい結合力で結合する。

50

【図４９】図４９は、本発明のMHC分子構築物が、ペプチドで満たされたHLA分子を含む、本発明の実施形態を示す。この図において、MHC分子構築物は、固体または半固体の担体に、この場合にはビーズまたは粒子に直接結合（固定化）している。

【図５０】図５０は、本発明のMHC分子構築物が、ペプチドで満たされたHLA分子ならびに共刺激分子（例えば、CD80またはCD86）を含む、本発明の実施形態を示す。この図において、本発明のMHC構築物は、固体または半固体の担体に、この場合にはビーズまたは粒子に直接結合（固定化）している。

【図５１】図５１は、本発明のMHC分子構築物が、ペプチドで満たされたHLA分子を含む、本発明の実施形態を示す。この図において、本発明のMHC構築物は、キャリア分子に結合する抗体を使用して、固体または半固体の担体に、この場合にはビーズまたは粒子に結合（固定化）している。

10

【図５２】図５２は、本発明のMHC分子構築物が、ペプチドで満たされたHLA分子および共刺激分子を含む、本発明の実施形態を示す。この図において、本発明のMHC構築物は、キャリア分子に結合する抗体を使用して、固体または半固体の担体に、この場合にはビーズまたは粒子に結合（固定化）している。

【図５３】図５３は、本発明のMHC分子構築物が、ペプチドで満たされたHLA分子を含む、本発明の実施形態を示す。この図において、本発明のMHC構築物は、ビオチン-アビジンの結合対によって、固体または半固体の担体に、この場合にはビーズまたは粒子に結合（固定化）している。

【図５４】図５４は、本発明のMHC分子構築物が、ペプチドで満たされたHLA分子および共刺激分子を含む、本発明の実施形態を示す。この図において、本発明のMHC構築物は、ビオチン-アビジンを介して、固体または半固体の担体に、この場合にはビーズまたは粒子に結合（固定化）している。

20

【図５５】図５５は、T細胞がTCR/CD3複合体を介して1つのシグナルを受けるだけである場合、このシグナルにより、T細胞のアポトーシスが誘導され得る。原理的には、これは、T細胞が、MHC分子を有する磁気ビーズによって接触することがあるか、またはMHC分子構築物を有する磁気ビーズによって接触することがある分離手順のときに生じ得る。アポトーシスは、細胞単離手順のとき、T細胞に共刺激シグナルを与えることによって回避または減少させることができる。MHC分子および共刺激分子の両方によるポリリガンド構築物は細胞単離の特異性を弱めると考えられる。これを回避または減少させるために、T細胞の単離は、可溶性MHC分子構築に結合させた共刺激性の抗体またはリガンドの存在下、ビーズに固定化されたMHC分子構築物を用いて行うことができる。

30

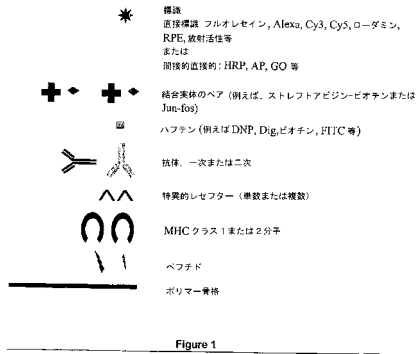
【図５６】図５６は、T細胞がTCR/CD3複合体を介して1つのシグナルを受けるだけである場合、このシグナルにより、T細胞のアポトーシスが誘導され得る。原理的には、これは、T細胞が、MHC分子を有する磁気ビーズによって接触することがあるか、またはMHC分子構築物を有する磁気ビーズによって接触することがある分離手順のときに生じ得る。アポトーシスは、細胞単離手順のとき、T細胞に共刺激シグナルを与えることによって回避または減少させることができる。MHC分子および共刺激分子の両方によるポリリガンド構築物は細胞単離の特異性を弱めると考えられる。これを回避または減少させるために、T細胞の単離は、別の固相または半固相に結合させた共刺激性の抗体またはリガンドの存在下、ビーズに固定化されたMHC分子構築物を用いて行うことができる。

40

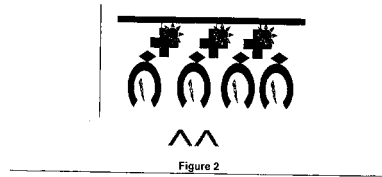
【図５７】図５７は、T細胞がTCR/CD3複合体を介して1つのシグナルを受けるだけである場合、このシグナルにより、T細胞のアポトーシスが誘導され得る。原理的には、これは、T細胞が、MHC分子を有する磁気ビーズによって接触することがあるか、またはMHC分子構築物を有する磁気ビーズによって接触することがある分離手順のときに生じ得る。アポトーシスは、細胞単離手順のとき、T細胞に共刺激シグナルを与えることによって回避または減少させることができる。MHC分子および共刺激分子の両方によるポリリガンド構築物は細胞単離の特異性を弱めると考えられる。これを回避または減少させるために、T細胞の単離は、可溶性の共刺激性の抗体またはリガンドの存在下、ビーズに固定化されたMHC分子構築物を用いて行うことができる。

50

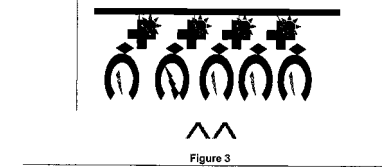
【図 1】



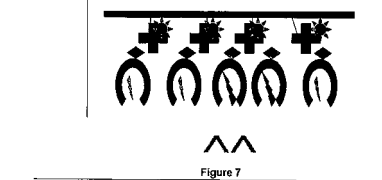
【図 2】



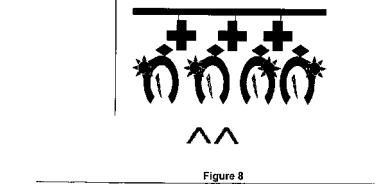
【図 3】



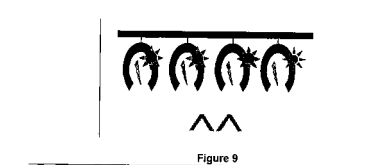
【図 7】



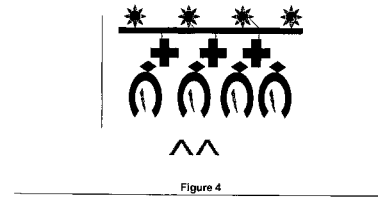
【図 8】



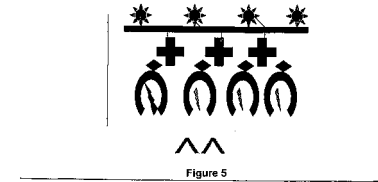
【図 9】



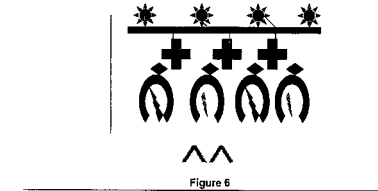
【図 4】



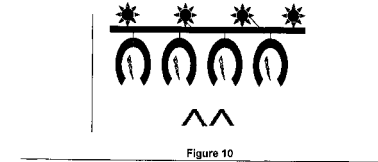
【図 5】



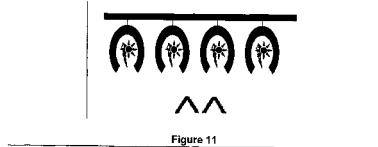
【図 6】



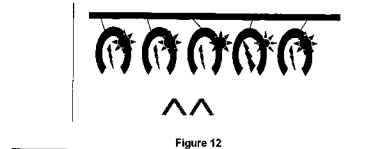
【図 10】



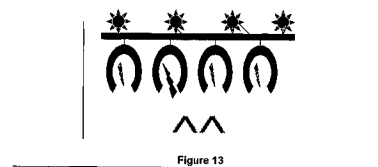
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【図 14】

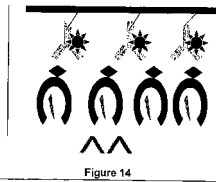


Figure 14

【図 17】

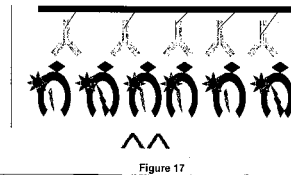


Figure 17

【図 15】

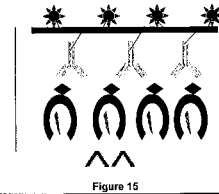


Figure 15

【図 18】

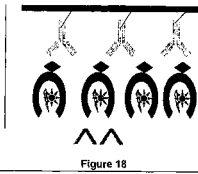


Figure 18

【図 16】

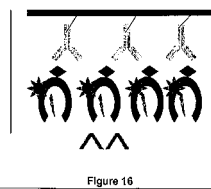


Figure 16

【図 19】

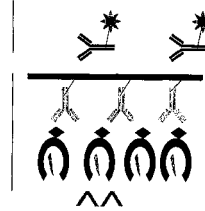


Figure 19

【図 20】

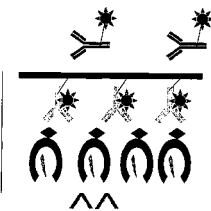


Figure 20

【図 23】

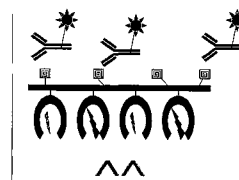


Figure 23

【図 21】

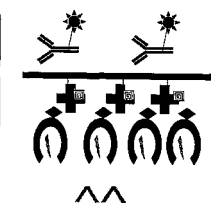


Figure 21

【図 24】

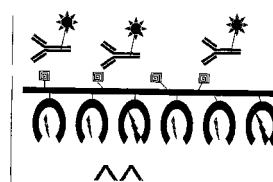


Figure 24

【図 22】

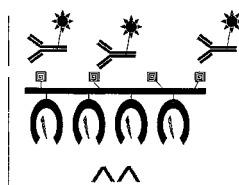


Figure 22

【図 25】

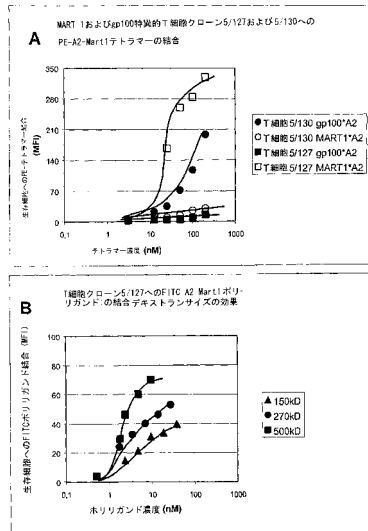


Figure 25

【図 26】

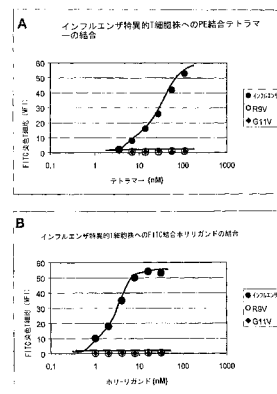


Figure 26

【図 27】

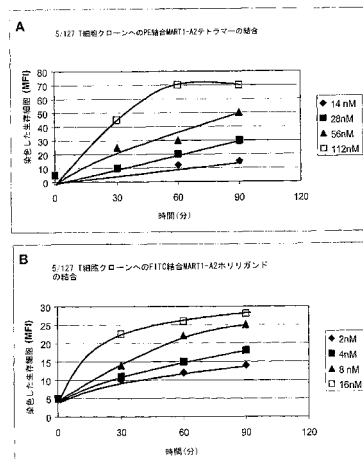


Figure 27

【図 29】

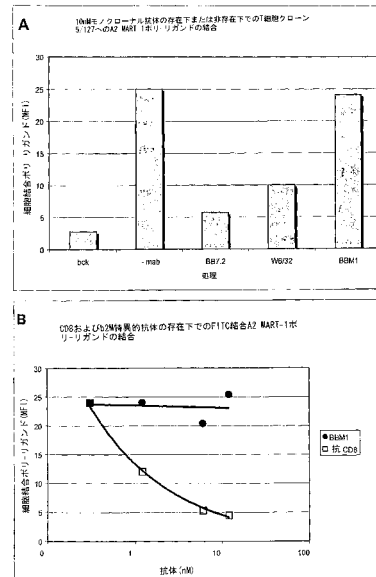


Figure 29

【図 28】

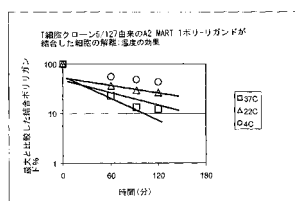
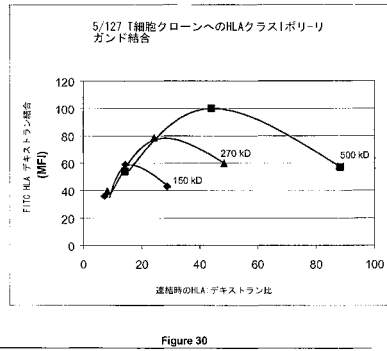
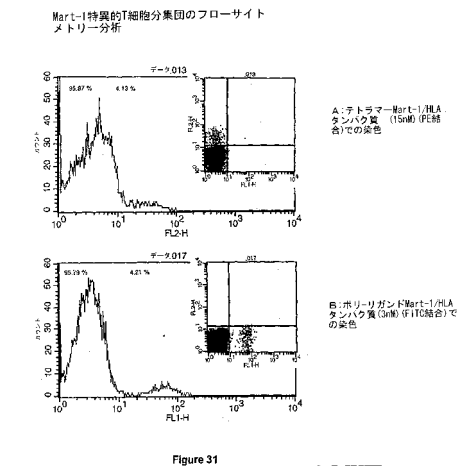


Figure 28

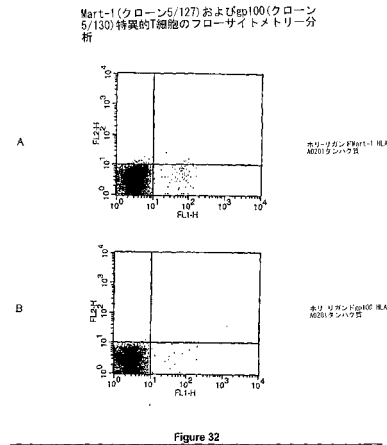
【図 30】



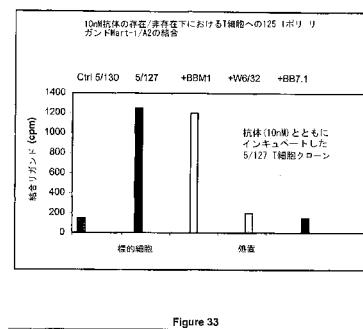
【図 31】



【図 32】



【図 33】



【図 34 (a)】

Figure 34
表中、「X」は可変アミノ酸を示す

HLAクラス I	モチーフ	結合型	結合型
1 クラス I	KX(DS)XXXXXXXX(V)	A1	
2 クラス I	KX(DS)XXXXXXXX(V)	A1	
3 クラス I	KX(DS)XXXX(V)	A1	
4 クラス I	XXXXXXXXXX(D)	A11	A*1101
5 クラス I	XXXXXXXXXX(K)	A11	A*1101
6 クラス I	XXXXXXXXXX(K)	A11	A*1101
7 クラス I	X(LS)XXXXXXXXXX(VL)	A2	A*0201
8 クラス I	X(LS)XXXXXXXXXX(VL)	A2	A*0201
9 クラス I	X(LS)XXXXXXXXXX(VL)	A2	A*0201
10 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
11 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
12 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
13 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
14 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
15 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
16 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
17 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
18 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
19 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
20 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
21 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
22 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202
23 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0202

【図 34 (b)】

24 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0207
25 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0214
26 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0214
27 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A2	A*0214
28 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A24	
29 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A24	
30 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A24	
31 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A29	A*2902
32 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A29	A*2902
33 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A29	A*2902
34 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A3	
35 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A3	
36 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A3	
37 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A31	A*3101
38 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A31	A*3101
39 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A31	A*3101
40 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A33	A*3302
41 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A33	A*3302
42 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A33	A*3302
43 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A68	A*6801
44 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A68	A*6801
45 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A68	A*6801
46 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A69	A*6901
47 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A69	A*6901
48 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	A69	A*6901
49 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	B14	
50 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	B14	
51 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	B14	
52 クラス I	X(L)XXXXXXXXXX(LV)	B27	

【図 3 4 (c)】

53	クラス I	X[B]XXXXX	827	
54	クラス I	X[B]XXXXXX	827	
55	クラス I	X[B]XXXXXX (PTLM)	827	B*2702
56	クラス I	X[B]XXXXX (PTLM)	827	B*2702
57	クラス I	X[B]XXXXXX (PTLM)	827	B*2702
58	クラス I	X[B]XXXXXX (LP)	827	B*2709
59	クラス I	X[B]XXXXXX (LP)	827	B*2705
60	クラス I	X[B]XXXXXX (LP)	827	B*2705
61	クラス I	X[P]XXXXXX (YPMG)	835	B*35
62	クラス I	X[P]XXXXXX (YPMG)	835	B*35
63	クラス I	X[P]XXXXXX (YPMG)	835	B*35
64	クラス I	X[P]XXXXXX (YPMG)	835	B*3501
65	クラス I	X[P]XXXXXX (YPMG)	835	B*3502
66	クラス I	X[P]XXXXXX (YPMG)	835	B*3501
67	クラス I	X[B]XXXXXX (M)	835	B*3503
68	クラス I	X[P]XXXXXX (M)	835	B*3503
69	クラス I	X[B]XXXXXX (M)	835	B*3503
70	クラス I	X[DB]XXXXX (PML) (TL)	837	B*3701
71	クラス I	X[DB]XXXXX (PML) (TL)	837	B*3701
72	クラス I	X[DB]XXXXX (PML) (TL)	837	B*3701
73	クラス I	XXXXXXXXXX (PL)	838	B*3801
74	クラス I	XXXXXXXXXX (PL)	838	B*3801
75	クラス I	XXXXXXXXXX (PL)	838	B*3801
76	クラス I	X[PH]XXXXXXXX (L)	839	B*39011
77	クラス I	X[PH]XXXXXXXX (L)	839	B*39012
78	クラス I	X[PH]XXXXXXXX (L)	839	B*39011
79	クラス I	X[PH]XXXXXXXX (L)	839	B*3902
80	クラス I	X[PH]XXXXXXXX (L)	839	B*3902
81	クラス I	X[PH]XXXXXXXX (L)	839	B*3902

【図 3 4 (d)】

82	クラス I	X[B]XXXXXXXX (L)	840	
83	クラス I	X[B]XXXXXXXX (L)	840	
84	クラス I	X[B]XXXXXXXX (L)	840	
85	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	
86	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	
87	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	
88	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
89	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
90	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
91	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
92	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
93	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
94	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
95	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
96	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	844	B*4402
97	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5101
98	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5101
99	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5101
100	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5102
101	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5102
102	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5102
103	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5103
104	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5103
105	クラス I	X[APG]XXXXX (V)	851	B*5103
106	クラス I	XXXXXXXX (V) (V)	852	B*5201
107	クラス I	XXXXXXXX (V) (V)	852	B*5201
108	クラス I	XXXXXXXX (V) (V)	852	B*5201
109	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L) (V)	853	B*5301
110	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L) (V)	853	B*5301

【図 3 4 (e)】

111	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L) (V)	853	B*5302
112	クラス I	X[P]XXXXXXXX	854	B*5401
113	クラス I	X[P]XXXXXXXX	854	B*5401
114	クラス I	X[P]XXXXXXXX	854	B*5401
115	クラス I	X[P]XXXXXXXX	855	B*5501
116	クラス I	X[P]XXXXXXXX	855	B*5501
117	クラス I	X[P]XXXXXXXX	855	B*5501
118	クラス I	X[P]XXXXXXXX	855	B*5502
119	クラス I	X[P]XXXXXXXX	855	B*5502
120	クラス I	X[P]XXXXXXXX	855	B*5502
121	クラス I	X[P]XXXXXXXX (A)	856	B*5601
122	クラス I	X[P]XXXXXXXX (A)	856	B*5601
123	クラス I	X[P]XXXXXXXX (A)	856	B*5601
124	クラス I	X[AST]XXXXXXXX (PW)	858	B*5801
125	クラス I	X[AST]XXXXXXXX (PW)	858	B*5801
126	クラス I	X[AST]XXXXXXXX (PW)	858	B*5801
127	クラス I	X[B]XXXXXXXX (L)	860	B*40012
128	クラス I	X[B]XXXXXXXX (L)	860	B*40012
129	クラス I	X[B]XXXXXXXX (L)	860	B*40012
130	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	861	B*4006
131	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	861	B*4006
132	クラス I	X[B]XXXXXXXX (V)	861	B*4006
133	クラス I	X[QL]XXXXXXXX (V)	862	B*1501
134	クラス I	X[QL]XXXXXXXX (V)	862	B*1501
135	クラス I	X[QL]XXXXXXXX (V)	862	B*1501
136	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	867	B*6701
137	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	867	B*6701
138	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	867	B*6701
139	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	867	B*6701

【図 3 4 (f)】

140	クラス I	X[P]XXXXXXXX (LP)	87	
141	クラス I	X[P]XXXXXXXX (LP)	87	
142	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0702
143	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0702
144	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0702
145	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0703
146	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0703
147	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0703
148	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0705
149	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0705
150	クラス I	X[P]XXXXXXXX (L)	87	B*0705
151	クラス I	X[B]XXXXXXXX (P)	873	B*7301
152	クラス I	X[B]XXXXXXXX (P)	873	B*7301
153	クラス I	X[B]XXXXXXXX (P)	873	B*7301
154	クラス I	X[PAQ]XXXXXXXX	878	B*7801
155	クラス I	X[PAQ]XXXXXXXX	878	B*7801
156	クラス I	X[PAQ]XXXXXXXX	878	B*7801
157	クラス I	XXXXXXXX (L) (L)	88	
158	クラス I	XXXXXXXX (L) (L)	88	
159	クラス I	XXXXXXXX (L) (L)	88	
160	クラス I	X[PPF]XXXXXXXX (LP)	C4	Cw*0401
161	クラス I	X[PPF]XXXXXXXX (LP)	C4	Cw*0401
162	クラス I	X[PPF]XXXXXXXX (LP)	C4	Cw*0401
163	クラス I	X[AL]XXXXXXXX (L)	Cw1	Cw*0102
164	クラス I	X[AL]XXXXXXXX (L)	Cw1	Cw*0102
165	クラス I	X[AL]XXXXXXXX (L)	Cw1	Cw*0102
166	クラス I	X[A]XXXXXXXX (L)	Cw10	Cw*0304
167	クラス I	X[A]XXXXXXXX (L)	Cw10	Cw*0304
168	クラス I	X[A]XXXXXXXX (L)	Cw10	Cw*0304

【図 3 4 (g)】

169	クラス I	XXXXXXXXXX(LPM1)	Cw3	Cw*0301
170	クラス I	XXXXXXXXXX(LPM1)	Cw3	Cw*0301
171	クラス I	XXXXXXXXXX(LPM1)	Cw3	Cw*0301
172	クラス I	XXXXXXXXXX(LIVF)	Cw6	Cw*0601
173	クラス I	XXXXXXXXXX(LIVF)	Cw6	Cw*0601
174	クラス I	XXXXXXXXXX(LIVF)	Cw6	Cw*0601
175	クラス I	XXXXXXXXXX(LIVF)	Cw6	Cw*0602
176	クラス I	XXXXXXXXXX(LIVF)	Cw6	Cw*0602
177	クラス I	XXXXXXXXXX(LIVF)	Cw6	Cw*0602
178	クラス I	XXXXXXXXXX(VPL)	Cw7	Cw*0702
179	クラス I	XXXXXXXXXX(VPL)	Cw7	Cw*0702
180	クラス I	XXXXXXXXXX(VPL)	Cw7	Cw*0702
181	クラス II	(MV) XXXX(MV) XX (MV) X	DPA1*0102	DPA1*0102
182	クラス II	(WV) XXXXXXXX	DPA1*0102	DPA1*0102
183	クラス II	(PL) XXX (PL) XX (IA) X	DPA1*0102	DPA1*0102
184	クラス II	XXXXXXXXXX(L)	DPA1*0201	DPA1*0201
185	クラス II	(A) XXXXX (A) XXX	DPA1*0201	DPA1*0201
186	クラス II	(WV) XXXXXXXX	DPB1*0201	DPB1*0201
187	クラス II	(MV) XXX (MV) XX (MV) X	DPB1*0201	DPB1*0201
188	クラス II	(VPL) XXX (PL) XX (IA) X	DPB1*0201	DPB1*0201
189	クラス II	(A) XXXXX (A) XXX	DPw4	DPB1*0401
190	クラス II	XXXXXXXXXX(L)	DPw4	DPB1*0401
191	クラス II	XXXX (I) XXXXX	DQ2	DQB1*0201
192	クラス II	XXXXXXXXXX(M)	DQ2	DQB1*0201
193	クラス II	XXXXXXXXXX(M)	DQ2	DQB1*0201
194	クラス II	XXXX (V) XXXX	DQ2	DQB1*0301
195	クラス II	XXXXXXXXXX(M)	DQA1*0501	DQA1*0501
196	クラス II	XXXX (V) XXXXX	DQA1*0501	DQA1*0501
197	クラス II	XXXX (V) XXXXX	DQA1*0501	DQA1*0501

【図 3 4 (h)】

198	クラス II	XXXXXX (S) XXX	DQA1*0501	DQA1*0501
199	クラス II	XXXXXX (P) XXX	DR1	DRB1*0101
200	クラス II	XXXX (Q) XXXXX (V)	DR1	DRB1*0101
201	クラス II	XXXXXX (P) XXX	DR1	DRB1*0102
202	クラス II	XXXX (M) XXXXX	DR1	DRB1*0102
203	クラス II	(P) XXXXX (S) XXX	DR11	DRB1*1101
204	クラス II	(V) XXXXXXXX	DR11	DRB1*1104
205	クラス II	(L) XX (M) XXXXX	DR11	DRB1*1104
206	クラス II	(S) XXXXX (S) XXX	DR11	DRB1*1104
207	クラス II	(V) X (A) XXXXX (V) X	DR22	DRB1*1201
208	クラス II	(L) XX (S) X (M) XX (V)	DR13	DRB1*1301
209	クラス II	(V) XX (V) X (S) XX (P)	DR13	DRB1*1301
210	クラス II	XXXX (M) XXXX (A)	DR13	DRB1*1301
211	クラス II	XXXX (A) XXXX (S)	DR13	DRB1*1301
212	クラス II	XXXX (M) XXXX (V)	DR13	DRB1*1301
213	クラス II	XXXX (V) XXXXX	DR13	DRB1*1301
214	クラス II	XXXXXX (S) XXX	DR13	DRB1*1302
215	クラス II	(S) XX (M) XXXXX	DR13	DRB1*1302
216	クラス II	(A) XX (A) XXXX (T)	DR13	DRB1*1302
217	クラス II	(V) XX (M) X (K) XXXX	DR13	DRB1*1302
218	クラス II	XXXX (V) XXXXX	DR13	DRB1*1302
219	クラス II	(I) XX (I) XX (V) XX	DR15	DRB1*1501
220	クラス II	(L) XX (P) XX (S) XX	DR15	DRB1*1501
221	クラス II	XXXXXX (V) XX	DR15	DRB1*1501
222	クラス II	(V) XX (V) XX (L) XX	DR15	DRB1*1501
223	クラス II	XXXXXX (M) XX	DR15	DRB1*1501
224	クラス II	XXXXXXXXXX (P)	DR17	DRB1*0301
225	クラス II	(V) XXXX (M) XXX	DR17	DRB1*0301
226	クラス II	XXXX (S) XXXXX	DR17	DRB1*0301

【図 3 4 (i)】

227	クラス II	(M) XXXXXXXX	DR4	DRB1*0401
228	クラス II	XXXXXXXXXX (K)	DR4	DRB1*0401
229	クラス II	XXXX (M) XXXXX	DR4	DRB1*0402
230	クラス II	XXXXXX (K) XX (M)	DR4	DRB1*0402
231	クラス II	XXXX (M) XXXXX	DR4	DRB1*0402
232	クラス II	XXXXXX (S) XX (S)	DR4	DRB1*0404
233	クラス II	(M) XXXXXXXX	DR4	DRB1*0405
234	クラス II	(W) XX (VE) X (DS) XX (N)	DR4	DRB1*0407
235	クラス II	(PK) XX (A) X (NV) XX (Q)	DR4	DRB1*0407
236	クラス II	XXXX (M) XXXXX	DR52	DRB3*0202
237	クラス II	XXXXXXXXXX (V)	DR52	DRB3*0301
238	クラス II	(L) XX (M) X (AS) XX (IL)	DR52	DRB3*0301
239	クラス II	XXXX (S) XXXXX	DR52	DRB3*0301

【図 3 5】

Figure 35

HIV/SIV タンパク質 (ソース <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/-index.html>)

名称	サイズ	機能
Gag MA	p17	複製
		env 相互作用
CA	p24	核カプシドアセンブリ
NC	p7	メタボカプシド、RNAポリソニに結合
		Vpr ポリソニ
プロテアーゼ (PR)	p15	gag/pol 切断および成熟
		ポリソニ
リバーシトランス	p66	p51 成熟等
リファターゼ (RT)		ポリソニ
Env	pg120/gp41	外部ウイルス膜タンパク質は CD4およびタモリンコリンゼ
		フラグ-糖質に結合する
Tat	p16/p14	ウイルス転写のトランスアクリベーター
Rev	p19	RNA 輸送、安定性および利用能
Nef	p27-p25	CD4 および MHC クラス I
		ダウンレギュレーション
Vpx	p12-16	Vpr 系モロタ HIV-2 に存在
Vif	p28	3 重 tat+env+rev タンパク質

【図 3 6】

Figure 36

T-リンパ球により認識される腫瘍抗原 (供給源: Danish Cancer Society)

腫瘍において過剰発現されるタンパク質

p53, WT1, HER-2/neu, α フェトプロテイン, MUC-1, MUC-2, テロメラゼ, サルベニン, FBP

ウイルス性タンパク質

HPV タンパク質 (E6 および E7), EBV (LPM2)

変異、ユニークまたは低発現タンパク質

CDK-4, p21 ras, MUM-1, MUM-2, MUM-3 (ヘリカーゼ), β -カテニン, NA17-A/Gnt-V, p15, pg100-in4, カスパーゼ-8, hsp70-2, 伸長因子 2, 変異 HLA-A2, クラス I ミオシン, 結合 カルボキシル エステラーゼ, BCR-ABL 融合タンパク質, イディオタイプ

系統特異的分化抗原

前立腺 : PSA, PSMA, PAP
黑色素 : オロチナーゼ, gp100, MART-1, TRP-1, TRP-2, MC1R

癌 / 腫瘍抗原

MAGE-A ファミリー: MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12

MAGE-B ファミリー: MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B6
GAGE ファミリー: GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8

LAGE ファミリー: LAGE-1a, LAGE-1b, NY-ESO-1

分離したメンバー : BAGE, PRAME (MAPE), SART-1, SART-3, ART-4

【図 37 (a)】

Figure 37

最もよく規定された HIV CTL エピトープ (ソース <http://hiv-web.lanl.gov/immunology/index.html>)

HLA	タンパク質	AA	長さ	配列
HLA-A2	p17	77-85	LAI	SYNYIVATL
	Johnson91			
	Parker92			
	Parker94			
	RT	33-41	LAI	ALVSLCTRM
	RT	346-354	LAI	VIVQVNDGL
A*0201	Walker88			
	Tsomiides91			
	gp120	311-320	III-B	RQPGAPVTI
	gp41	818-827	LAI	SLAMATDIIV
HLA-A3.1	nef	136-145	LAI	PLTFQWCYGL
	nef	180-189	LAI	VLEKRFUSGL
	p17	18-26	LAI	KIRLRPGQK
	p17	20-28	LAI	RLRPGQKKY
HLA-A11	p17	26-29	LAI	RLRPGQKKY
	RT	33-43	LAI	ALVSLCTRMK
	RT	325-333	LAI	ALFQSSMTK
	gp120	37-46	LAI	TVYVQVPGWK
	gp41	775-785	LAI	RLRDLGLIVTR
	nef	73-82	LAI	QVPLRPMTYK
HLA-A11	p17	84-92	LAI	TLVYCHQRI
	p24	349-359	III-B	ACQGVGPGGGRK
	RT	325-333	LAI	ALFQSSMTK
	RT	508-517	LAI	PLRPMTYK

【図 37 (b)】

HLA-A*9	nef	75-82	LAI	PLRPMTYK
	nef	84-82	LAI	AVULSHFLK
A*7401	RT	71-79	Clade A/B/D	ITLWQRPLV
HLA-A24	p17	28-36	LAI	KYKLGHIYN
	p24	296-306	III-1	EDYVDRFFKTL
	gp120	53-62	LAI	LFCASDANAY
	gp41	591-598	LAI	YLKDDQLL
HLA-A25	nef	138-147	LAI	EYPLTFQW
	p24	145-155	LAI	QAISPTLNAY
HLA-A26	p24	203-212	LAI	RTINERAAEW
	p24	167-175	LAI	EVIMPFSL
HLA-A28	RT	593-603	LAI	RTFYVDGAAR
	RT	71-79	Clade A/B/D	ITLWQRPLV
A*6802	RT	85-93	Clade D	DTVLEBNL
HLA-A29	gp120	376-384	LAI	FNCGQBFY
	gp41	775-785	LAI	RLRDLGLIVTR
HLA-A32	RT	559-568	LAI	PIQKSTWTV
	gp120	439-427	III-B	RIKQIRNW
HLA-B7	p24	148-156	LAI	SPRTLNAY
	p24	179-187	LAI	ATPQDINTM
	RT	323-332	LAI	SPATPQSSMT

【図 37 (c)】

HLA-B8	gp120	303-312	LAI	RPQNTWESI
	gp41	843-851	LAI	IPRRIRQGL
	nef	68-77	LAI	FFVTPQVPLR
	nef	77-85	LAI	RPWYKQAL
	nef	128-137	LAI	TPGQVPTPL
HLA-B8	p17	24-31	LAI	GGKKKKL
	p17	74-82	LAI	RLRSLVTVV
	p24	260-267	LAI	KIYKRWI
	gp120	2-10	III-B	KVKKKYQRL
	gp41	591-598	LAI	YLKDDQLL
	Johnson92			
	Shankar96			
	nef	13-20	LAI	MPVIREM
	nef	90-97	LAI	FLKXQGL
	Culmann-Pectiolell194			
	Price97			
HLA-B14	p24	298-306	LAI	HSFVXTLRA
	gp41	589-597	LAI	EFYLDQQL
HLA-B15	gp120	375-383	LAI	SPKCGEFF
	p24	293-302	HIV-1 Clade B/p	REDYVDRFYK
HLA-B27	nef	135-143	LAI	YPLTFQWCY
	p17	18-27	LAI	KIRLRPGQKK
HLA-B27	p17	19-27	LAI	IRLRPGQKK
	p24	263-273	LAI	KRWIIGLQNK
	Hixon88, Buseyne93			
	gp41	590-597	LAI	RYLKDQQL

【図 37 (d)】

HLA-B*2703	gp41	791-799	LAI	CRGRGKRAY
	p24	265-274	HIV-2	RRWIGLQGLK
B*2705	nef	105-114	LAI	RRQDILDMT
	nef	73-82	LAI	QVPLRPMTYK
	nef	134-141	LAI	EYPLTFQW
HLA-B35	p17	124-132	III-B	NRSKVSQNY
	p17	36-44	LAI	NASRELERP
	p24	254-262	IV-5	PPVPGQIVY
	RT	262-270	LAI	TVLQVDRAY
	RT	273-282	III-B	VPLRERPERY
	Sipras97, Shiga96			
	RT	328-336	III-B	HPQIVIVQY
	gp120	42-52	LAI	VPVKEATITL
	gp41	611-619	LAI	TANFVNASW
	nef	74-81	LAI	VPLRPMTY
	Culmann91, Culmann-Penciolell194			
	gag	245-253	HIV-2	NPVPGNIVY
HLA-B37	nef	120-128	LAI	YFDWQNTY
	p24	193-201	LAI	GHQAAMQML
HLA-B42	p17	20-29	LAI	RLRPGQKKY
	RT	438-446	LAI	YPGIIVQRL
HLA-B44	p17	306-316	SF2	ASQASQVKNW
	gp120	20-38	SF3	ARNLKVTVY
HLA-B*4402				

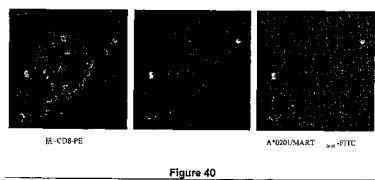
【図 37 (e)】

	p24	294-304	HIV-1 Clade B	RDIVDRFYKTL
HLA-B45	RT	591-600	LAI	QARTFYVQGA
HLA-B51	p24	325-333	LAI	KMPDCKTI
	RT	42-50	LAI	ERMGKISKI
	RT	295-302	III-B	TAPTIPSI
	gp120	557-565	III-B	SAIEAQG
HLA-B52	p24	275-282	LAI	RNYSPISI
HLA-B53	HIV-2 gag	173-181	HIV-2	TPYLINQW
HLA-B55	gp120	42-51	LAI	VPVWKEATT
HLA-B57	p24	147-155	III-B	ISPRTLMAN
	Johnson91, Goulder96			
	p24	140-149	LAI	TSTLQEQIQW
	p24	162-172	LAI	KAPSPDVIMPF
	p24	240-249	LAI	TSTLQEQIQW
	p24	311-319	LAI	QASQVVMW
	p24	311-319	LAI	QASQVVMW
	nef	116-125	LAI	HTQGVFFWQ
	nef	120-128	LAI	YFPWKEAT
HLA-B58	p24	240-249	LAI	TSTLQEQIQW
HLA-B60	p17	240-249	LAI	TSTLQEQIQW
HLA-Bw62	p17	20-29	LAI	RLSPGRKKY
	p24	268-277	LAI	LGLAKIVDMY

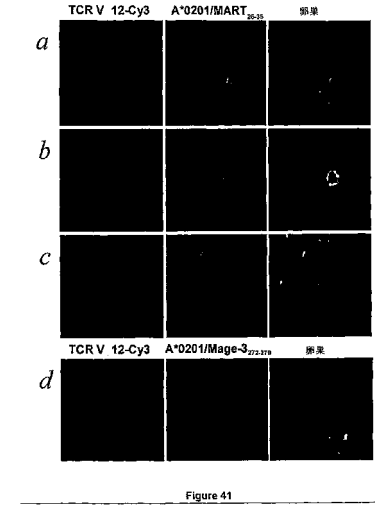
【図 37 (f)】

	RT	415-426	III-B	LWKLHNASQIV
	RT	476-485	LAI	ILKEFVNGVY
	nef	84-91	LAI	AVDLSHFL
	Culmann- Peniolell1194			
	nef	117-127	LAI	TQVVFEDWQVY
HLA-Cw*01.02	p24	168-175	LAI	VIMFSAI
HLA-Cw4	gp120	380-388	LAI	SPNCQGEFF

【図 40】



【図 41】



【図 38】

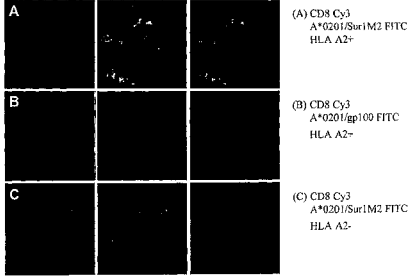


Figure 38

【図 39】

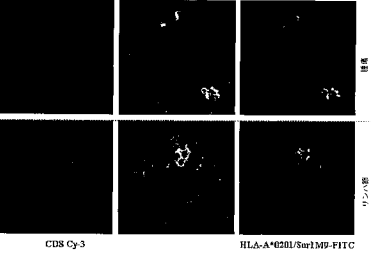


Figure 39

【図 42】

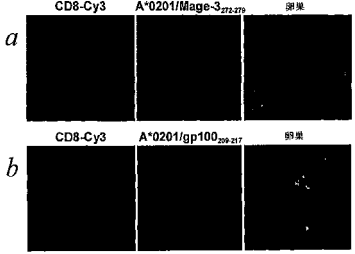


Figure 42

【図 43】

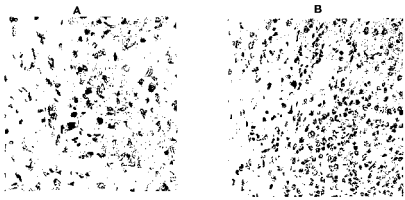


Figure 43

【図 4 4】

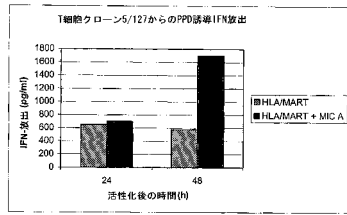


Figure 44

【図 4 5】

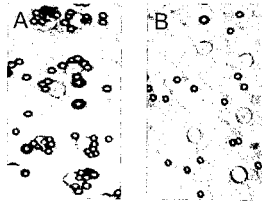


Figure 45

【図 4 6】

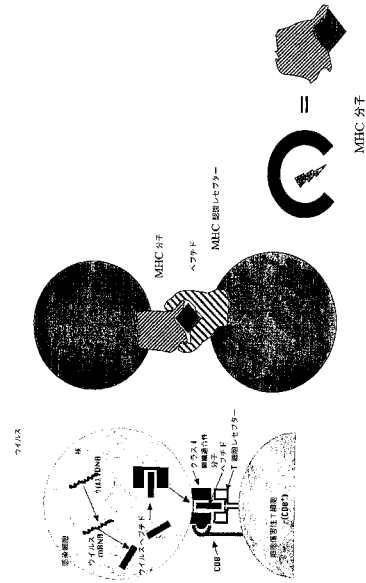


Figure 46

【図 4 7】

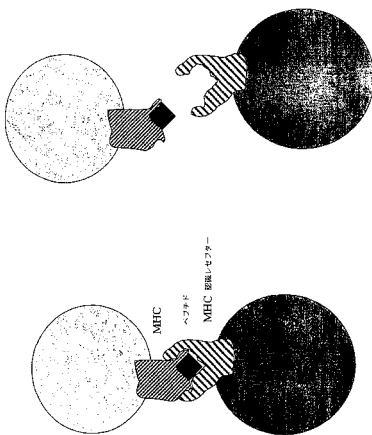


Figure 47

【図 4 8】

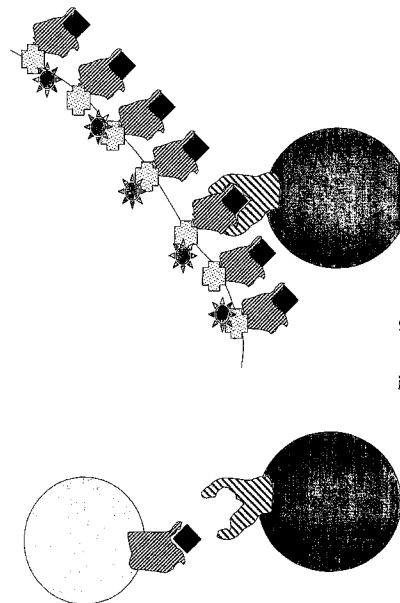
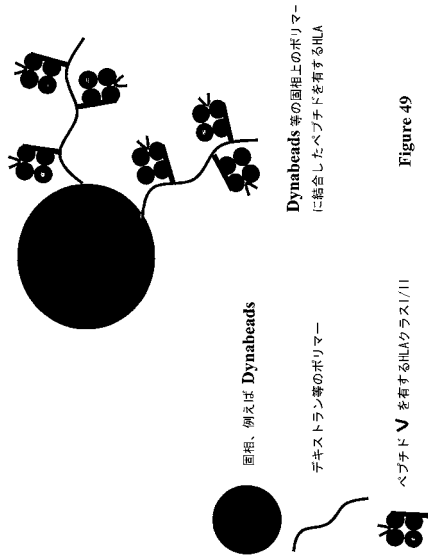
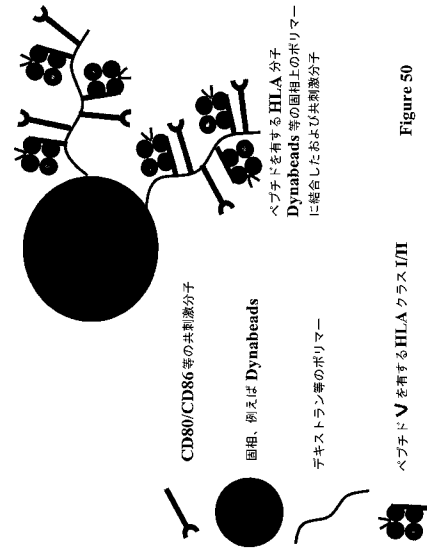


Figure 48

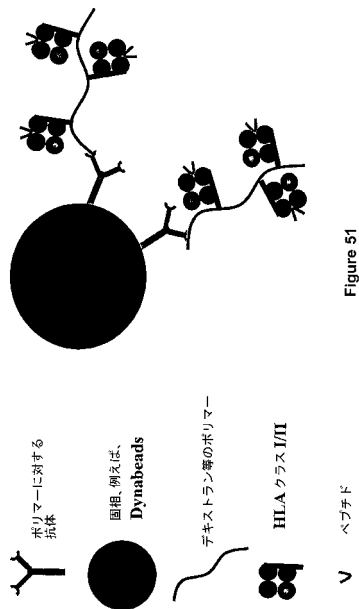
【図 49】



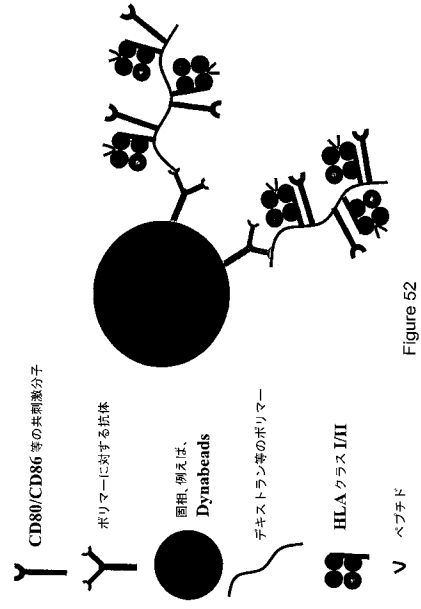
【図 50】



【図 51】



【図 52】



【図 53】

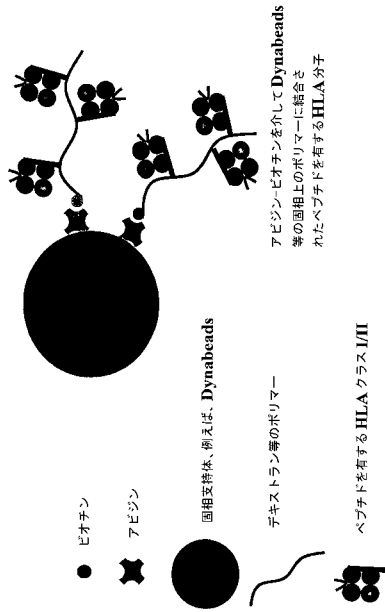


Figure 53

【図 54】

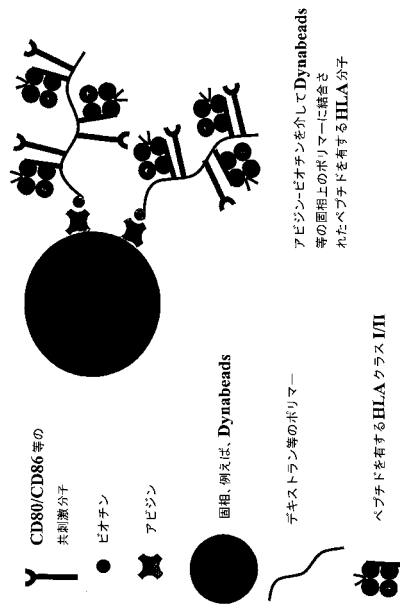


Figure 54

【図 55】

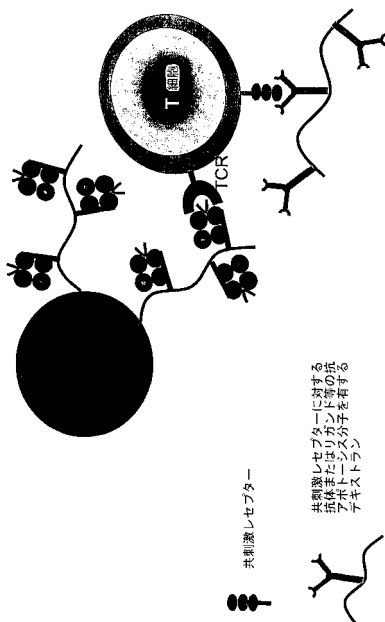


Figure 55

【図 56】

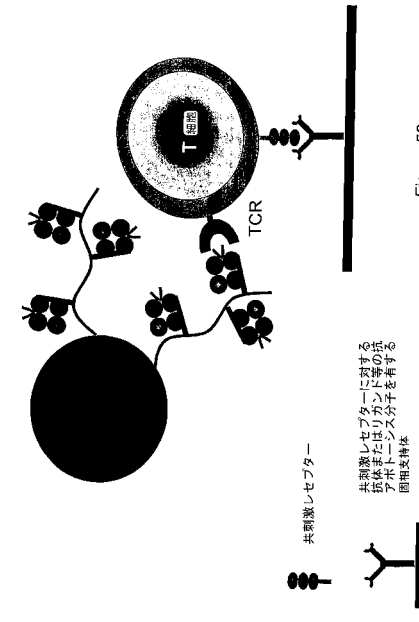


Figure 56

【図 57】

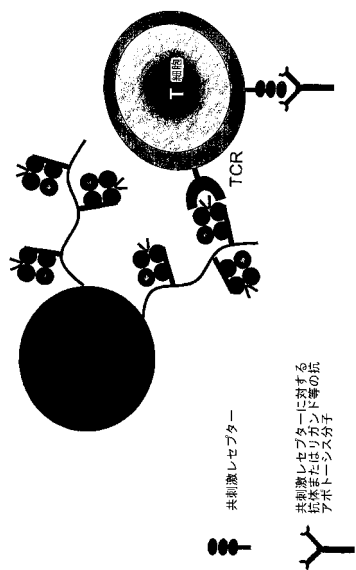


Figure 57

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 37/00 (2006.01) G 0 1 N 37/00 1 0 3

(31)優先権主張番号 PA 2001 00441
(32)優先日 平成13年3月14日(2001.3.14)
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号 60/275,470
(32)優先日 平成13年3月14日(2001.3.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/275,448
(32)優先日 平成13年3月14日(2001.3.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/275,447
(32)優先日 平成13年3月14日(2001.3.14)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(72)発明者 ピーターセン, ラーズ, エスターガード
デンマーク国 コペンハーゲン エヌバイ ディーケイー2400 ヴェド ヴィゲン 14
(72)発明者 ブース, セレン
デンマーク国 ブレンシェイ ディーケイー2700 ステンマグルヴェイ 29
(72)発明者 シェラー, ジェルゲン
デンマーク国 ケイジーエス. リングビー ディーケイー2800 スヴェリゲスヴェイ 13
エイ
(72)発明者 ルード, エリック
ノルウェイ国 オスロ エヌー1177 ステインハンマーヴェイーン 23
(72)発明者 アーメレム, オエイステイン
ノルウェイ国 ジャー エヌー1358 カプラルホーゲン 43

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 特表平11-501124 (JP, A)
特開平02-104599 (JP, A)
国際公開第94/009148 (WO, A1)
国際公開第99/014236 (WO, A1)
J.Immunol., 1988年, Vol.141, p.1451-1455

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07K 17/02
C12Q 1/04
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	新型MHC分子构建体和使用这些构建体进行诊断和治疗的方法，以及MHC分子的用途		
公开(公告)号	JP4608184B2	公开(公告)日	2011-01-05
申请号	JP2002571544	申请日	2002-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	DAKOCYTOMATION丹麦		
申请(专利权)人(译)	DakoCytomation，丹麦，ACTY洛杉矶萝卜 Dynal公司生物Eiesuei		
当前申请(专利权)人(译)	丹麦Dako公司洛杉矶ACTY萝卜 酒店的Vie托罗仁的Dynal Eesu		
[标]发明人	ウィンザーラース ピーターセンラースエスターガード ブースセレン シェラージェルゲン ルードエリック アーメレムオエイステイン		
发明人	ウィンザー,ラース ピーターセン,ラース,エスターガード ブース,セレン シェラー,ジェルゲン ルード,エリック アーメレム,オエイステイン		
IPC分类号	C07K17/02 C12Q1/04 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/543 G01N37/00 A61K38/00 A61K45/00 A61K47/48 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/08 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31 /00 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/74 C12N5/06 C12N13/00 C12Q1/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/08 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31 /00 A61P31/12 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 B82Y5/00 B82Y10/00 C07K14/70539		
FI分类号	C07K17/02.ZNA C12Q1/04 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/543.597 G01N37/00.103		
审查员(译)	石丸聡		
优先权	200100435 2001-03-14 DK 200100436 2001-03-14 DK 200100441 2001-03-14 DK 60/275470 2001-03-14 US 60/275448 2001-03-14 US 60/275447 2001-03-14 US		
其他公开文献	JP2005500257A5 JP2005500257A		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

公开了携带能够与相关靶细胞上的反受体连接的配体的新化合物。该化合物具有许多有利特征，使它们非常适用于广泛的应用，包括用作检测系统，检测相关靶细胞以及各种方法。特别地，公开了包含一种或多种MHC分子的新型MHC分子构建体。构建体的MHC分子的亲和力和亲合力令人惊讶地高。向靶细胞呈递多个MHC分子的可能性使得MHC分子构建了极其强大的工具，例如，在诊断领域。本发明一般涉及治疗领域，包括治疗方法和治疗组合物。本发明还包括MHC分子，MHC分子多聚体和MHC分子构建体的样品安装用途。

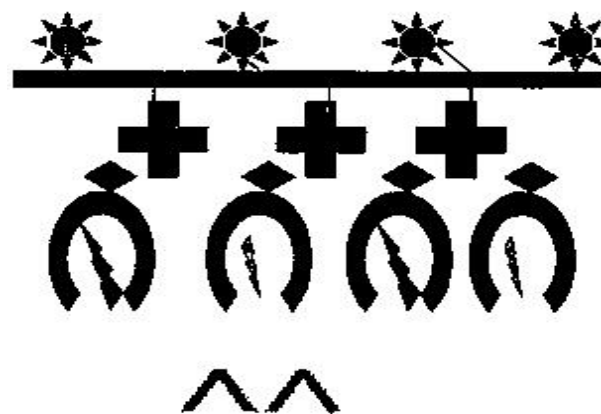


Figure 6