

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-520227

(P2008-520227A)

(43) 公表日 平成20年6月19日(2008.6.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-542099 (P2007-542099)
 (86) (22) 出願日 平成17年11月17日 (2005.11.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年7月13日 (2007.7.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2005/004449
 (87) 国際公開番号 W02006/054096
 (87) 国際公開日 平成18年5月26日 (2006.5.26)
 (31) 優先権主張番号 0425368.8
 (32) 優先日 平成16年11月18日 (2004.11.18)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 0502681.0
 (32) 優先日 平成17年2月9日 (2005.2.9)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 505121578
 メディジーン リミテッド
 MEDIGENE LIMITED
 イギリス、オックスフォードシャー オー
 エックス14 4アールエックス、アビン
 ドン、ミルトン パーク 57シー
 (74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎
 (72) 発明者 ヤコブセン, ベント, カルステン
 イギリス、オックスフォードシャー オー
 エックス14 4アールエックス、アビン
 ドン、ミルトン パーク 57シー、アヴ
 イデックス リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性二官能性タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、T細胞レセプターとスーパー抗原との結合を含んでなる可溶性二官能性タンパク質を提供する。また、この二官能性タンパク質を含んでなる治療組成物及びその使用方法も提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(a) T 細胞レセプター (TCR) と (b) スーパー抗原との結合を含んでなる可溶性二官能性タンパク質。

【請求項 2】

成分 (a) が、(i) 膜貫通ドメインを除く TCR α 鎖の全て又は一部と (ii) 膜貫通ドメインを除く TCR β 鎖の全て又は一部とを含んでなる TCR であり、(i) 及び (ii) は各々 TCR 鎖の機能的可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを含んでなり、天然型 TCR 中に存在しない定常ドメイン残基同士のジスルフィド結合により連結している、請求項 1 に記載の可溶性二官能性タンパク質。

10

【請求項 3】

スーパー抗原の N 末端が、TCR α 鎖又は TCR β 鎖の C 末端アミノ酸に、直接又はリンカー基を介して間接的に共有結合で連結している、請求項 2 に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項 4】

スーパー抗原の N 末端が、

TCR α 鎖若しくは TCR β 鎖の C 末端アミノ酸にペプチド結合若しくはシステイン間ジスルフィド結合により直接連結しているか、又は

それ自体が TCR α 鎖若しくは TCR β 鎖の C 末端にペプチド結合若しくはシステイン間ジスルフィド結合により連結しているリンカーアミノ酸配列の C 末端アミノ酸へのペプチド結合若しくはシステイン間ジスルフィド結合により間接的に連結している、請求項 2 又は 3 に記載の可溶性二官能性タンパク質。

20

【請求項 5】

スーパー抗原の N 末端が、TCR α 鎖又は TCR β 鎖の C 末端アミノ酸に非ペプチド性ポリマー基を介して連結している、請求項 2 又は 3 に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項 6】

スーパー抗原が野生型スーパー抗原の変異体であり、その変異は TCR β 可変ドメインに関するスーパー抗原の親和性を維持しつつ、クラス II MHC 分子に関する親和性を減少させる、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項 7】

スーパー抗原が野生型の又は変異したブドウ球菌性スーパー抗原である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

30

【請求項 8】

スーパー抗原が配列番号：5 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項 9】

TCR 部分において、(i) 及び (ii) が TCR 鎖の細胞外定常 Ig ドメインの全てを含んでなる、請求項 2 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項 10】

TCR 部分において、(i) 及び (ii) が TCR 鎖の細胞外ドメインの全てを含んでなる、請求項 2 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

40

【請求項 11】

TCR 部分において、共有結合性ジスルフィド結合が、 α 鎖の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基を β 鎖の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基に連結している、請求項 2 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項 12】

TCR 部分において、天然型 TCR 中に存在する鎖間ジスルフィド結合がない、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項 13】

TCR 部分において、天然型の α TCR 鎖及び β TCR 鎖が、天然型鎖間ジスルフィド結合を形

50

成するシステイン残基が除去されるようにC末端で切断されている、請求項12に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項14】

TCR部分において、天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が別の残基に置換されている、請求項12に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項15】

TCR部分において、天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基がセリン又はアラニンに置換されている、請求項14に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項16】

TCR部分において、天然型TCRβ鎖中に存在する非対合のシステイン残基が存在しない、請求項1～15のいずれか1項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

10

【請求項17】

TCR部分において、天然型TCR中に存在しないジスルフィド結合が、β炭素原子が天然型TCR構造中で0.6nm未満離れている残基から置換されたシステイン残基同士間にある、請求項2～16のいずれか1項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項18】

TCR部分において、天然型TCR中に存在しないジスルフィド結合が、TRAC*01のエキソン1のThr 48及びTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン1のSer 57から置換されたシステイン残基同士間にある、請求項2～17のいずれか1項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項19】

(a)(i)膜貫通ドメインを除くTCRα鎖の全て又は一部と、(ii)融合した、膜貫通ドメインを除くTCRβ鎖の全て又は一部とを含んでなり、(i)及び(ii)は各々TCR鎖の機能的可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを含んでなり、(i)及び(ii)はTRAC*01のエキソン1のThr 48及びTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン1のSer 57から置換されたシステイン残基同士間のジスルフィド結合により連結している、T細胞レセプター(TCR)と；

20

(b)配列番号：5のスーパー抗原との結合を含んでなり、

TCR(a)とスーパー抗原(b)との結合は、それぞれC末端からN末端への関係で結合している、請求項2に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項20】

検出可能な標識を更に含んでなる、請求項1～19のいずれか1項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

30

【請求項21】

TCRが所定のペプチド-MHCに関して1μMより高い親和性(Kd)を有する、請求項1～20のいずれか1項に記載の可溶性二官能性タンパク質。

【請求項22】

請求項1～21のいずれか1項に記載の可溶性二官能性タンパク質を複数含んでなる多価複合体。

【請求項23】

ポリアルキレングリコールポリマー又はペプチド性配列を含んでなるリンカー基を介して互いに結合した2つ又は3つ又は4つの結合二官能性タンパク質を含んでなる、請求項22に記載の複合体。

40

【請求項24】

(i)スーパー抗原部分がTCRβ鎖可変ドメインの所定のサブセットに選択的に結合する、請求項1～21のいずれか1項に記載の可溶性二官能性タンパク質又は請求項22又は23に記載の多価複合体を提供し；

(ii)可溶性二官能性タンパク質又は多価複合体を、クラスII MHC-ペプチド複合体を提示する抗原提示細胞(APC)及び多様なT細胞の集団と接触させ；

(iii)APC-可溶性二官能性タンパク質-T細胞複合体の形成に適切な条件下で(ii)の混合物をインキュベートすることを含んでなる、多様なT細胞の集団を、TCRβ鎖可変ドメイ

50

ンの所定のサブセットを提示する T 細胞について富化する方法。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質及び/又は請求項 22 又は 23 に記載の多価複合体を医薬的に許容され得るキャリアと共に含んでなる医薬製剤。

【請求項 26】

可溶性 TCR β 鎖をコードする第 2 の核酸に融合したスーパー抗原をコードする第 1 の核酸配列を含んでなる核酸分子。

【請求項 27】

膜貫通ドメインを除き TCR β 鎖の全て又は一部をコードする第 2 の核酸に融合したスーパー抗原をコードする第 1 の核酸配列を含んでなり、ここで、TCR β 鎖をコードする核酸配列は、コードされた TCR β 鎖及び更なる非天然型システイン残基を含有する TCR α 鎖の定常ドメイン残基同士間の非天然型ジスルフィド結合を形成し得る導入システインコドンを含んでなる、核酸分子。

【請求項 28】

可溶性 TCR α 鎖をコードする第 2 の核酸に融合したスーパー抗原をコードする第 1 の核酸配列を含んでなる核酸分子。

【請求項 29】

膜貫通ドメインを除き TCR α 鎖の全て又は一部をコードする第 2 の核酸に融合したスーパー抗原をコードする第 1 の核酸配列を含んでなり、ここで、TCR α 鎖をコードする核酸配列は、コードされた TCR α 鎖及び更なる非天然型システイン残基を含有する TCR β 鎖の定常ドメイン残基同士間の非天然型ジスルフィド結合を形成し得る導入システインコドンを含んでなる、核酸分子。

【請求項 30】

請求項 26 ~ 29 に記載の 1 又は複数の核酸分子を含んでなるベクター。

【請求項 31】

請求項 30 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 32】

スーパー抗原に融合した TCR β 鎖をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞及び TCR α 鎖をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞を、それぞれ TCR β 鎖-スーパー抗原融合体及び TCR α 鎖の発現を引き起こす条件下でインキュベートし；

それぞれの TCR β 鎖-スーパー抗原融合体及び TCR α 鎖を精製し；

それぞれの TCR β 鎖-スーパー抗原融合体及び TCR α 鎖を、共有結合性ジスルフィド結合が TCR α 鎖の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基を TCR β 鎖-スーパー抗原融合体の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基に連結するようナリフォールディング条件下で混合する

ことを含んでなる、可溶性二官能性タンパク質を得る方法。

【請求項 33】

スーパー抗原に融合した TCR α 鎖をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞及び TCR β 鎖をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞を、それぞれ TCR α 鎖-スーパー抗原融合体及び TCR β 鎖の発現を引き起こす条件下でインキュベートし；

それぞれの TCR α 鎖-スーパー抗原融合体及び TCR β 鎖を精製し；

それぞれの TCR α 鎖-スーパー抗原融合体及び TCR β 鎖を、共有結合性ジスルフィド結合が TCR β 鎖の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基を TCR α 鎖-スーパー抗原融合体の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基に連結するようナリフォールディング条件下で混合する

ことを含んでなる、可溶性二官能性タンパク質を得る方法。

【請求項 34】

ガンを患っている対象に、有効量の請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質又はその機能的変形体若しくはフラグメント或いは請求項 2 2 又は 2 3 に記載のその多価複合体を投与することを含んでなるガンの治療方法。

【請求項 3 5】

ガンを患っている対象に、有効量の請求項 8 に記載の可溶性二官能性タンパク質又は請求項 2 2 又は 2 3 に記載のその多価複合体を投与することを含んでなるガンの治療方法。

【請求項 3 6】

ガンの治療用組成物の製造における請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質又はその機能的変形体若しくはフラグメント或いは請求項 2 2 又は 2 3 に記載のその多価複合体の使用。

10

【請求項 3 7】

ガンの治療用組成物の製造における請求項 8 項に記載の可溶性二官能性タンパク質又はその機能的変形体若しくはフラグメント或いは請求項 2 2 又は 2 3 に記載のその多価複合体の使用。

【請求項 3 8】

感染性疾患を患っている対象に、有効量の請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質又はその機能的変形体若しくはフラグメント或いは請求項 2 2 又は 2 3 に記載のその多価複合体を投与することを含んでなる感染性疾患の治療方法。

【請求項 3 9】

感染性疾患を患っている対象に、有効量の請求項 8 に記載の可溶性二官能性タンパク質又はその機能的変形体若しくはフラグメント或いは請求項 2 2 又は 2 3 に記載のその多価複合体を投与することを含んでなる感染性疾患の治療方法。

20

【請求項 4 0】

感染性疾患の治療用組成物の製造における請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の可溶性二官能性タンパク質又はその機能的変形体若しくはフラグメント或いは請求項 2 2 又は 2 3 に記載のその多価複合体の使用。

【請求項 4 1】

感染性疾患の治療用組成物の製造における請求項 8 に記載の可溶性二官能性タンパク質又はその機能的変形体若しくはフラグメント或いは請求項 2 2 又は 2 3 に記載のその多価複合体の使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、T 細胞レセプター (TCR) とスーパー抗原との結合を含んでなる可溶性二官能性タンパク質に関する。このタンパク質は、疾患 (例えばガン及び感染) の治療において有益である。

【背景技術】

【0 0 0 2】

(発明の背景)

可溶性 TCR

40

可溶性 TCR の作製のために、今日まで多くの構築物が考案されてきた。これら構築物は 2 つの広範なクラス、単鎖 TCR 及び二量体 TCR に分類される。これら構築物に関する文献を下記にまとめる。

【0 0 0 3】

単鎖 TCR

単鎖 TCR (scTCR) は、天然型ヘテロ二量体 TCR のように MHC-ペプチド複合体に結合する、一本のアミノ酸鎖からなる人工構築物である。不運にも、両方が 1 つのオープンリーディングフレームで発現するように α 鎖と β 鎖とを単純に連結することによって機能的な α / β アナログ scTCR を作製しようとする試みは、成功していない。これは、おそらく、 $\alpha - \beta$ 可溶性ドメインの対合の本来的な不安定性に起因する。

50

【 0 0 0 4 】

したがって、scTCRの作製には、 α 鎖及び β 鎖のいずれか又は両方の種々の切断型を使用する特別な技法が必要とされてきた。この形式は、非常に限られた範囲のscTCR配列にのみ適用可能であるように思われる。Soo Hooら(1992)(PNAS. 89 (10): 4759-63)は、25アミノ酸リンカーと連結した切断型の β 鎖及び α 鎖並びに細菌ペリプラズム発現(periplasmic expression)を使用する、2CT細胞クローンからの単鎖形式でのマウスTCRの発現を報告している(Schodinら(1996) Mol. Immunol. 33 (9): 819-29も参照)。この設計はまた、Hollerら(2000)(PNAS. 97 (10): 5387-92)により報告されたm6単鎖TCR(これは2C scTCRに由来し、同じH2-Ld-制限アロエピトープに結合する)の基礎をなす。Shustaら(2000)(Nature Biotechnology 18: 754-759)は、酵母ディスプレイ実験において単鎖2C TCR構築物(これは増大した熱安定性及び溶解性を有する変異TCRを産生した)を使用することを報告している。この報告はまた、これらディスプレイされた2C TCRが同族pMHCを発現する細胞と選択的に結合することができることを証明した。Khandekarら(1997)(J. Biol. Chem. 272 (51): 32190-7)は、マウスD10 TCRについて同様な設計を報告している(ただし、このscTCRはMBPに融合され細菌細胞質で発現された)(Hareら(1999) Nat. Struct. Biol. 6 (6): 574-81も参照)。Hilyardら(1994)(PNAS. 91 (19): 9057-61)は、 $V\alpha$ -リンカー- $V\beta$ 設計を使用し細菌ペリプラズムで発現させた、インフルエンザマトリクスタンパク質-HLA-A2に特異的なヒトscTCRを報告している。

10

【 0 0 0 5 】

Chungら(1994)(PNAS. 91 (26) 12654-8)は、 $V\alpha$ -リンカー- $V\beta$ -C β 設計及び哺乳動物細胞株の表面での発現を使用するヒトscTCRの作製を報告している。この報告は、scTCRのペプチド-HLA特異的結合に関して何ら言及していない。Plaksinら(1997)(J. Immunol. 158 (5): 2218-27)は、HIV gp120-H-2D^dエピトープに特異的なマウスscTCRを作製するための同様な $V\alpha$ -リンカー- $V\beta$ -C β 設計を報告している。このscTCRは、細菌性封入体として発現し、インビトロでリフォールディングされる。

20

【 0 0 0 6 】

二量体TCR

多くの論文が、それぞれのサブユニットを接続する天然型ジスルフィドブリッジを含むTCRヘテロ二量体の作製を記載している(Garbocziら(1996) Nature 384(6605):134-41; Garbocziら(1996) J Immunol 157(12):5403-10; Changら(1994) PNAS USA 91:11408-11412; Davodeauら(1993) J.Biol.Chem. 268(21):15455-15460; Goldenら(1997) J. Imm.Meth. 206:163-169; 米国特許第6080840号)。しかし、このTCRはTCR特異的抗体により認識され得るが、いずれも、相対的に高い濃度以外ではその天然型リガンドを認識することを示されておらず、そして/又は安定でなかった。

30

【 0 0 0 7 】

WO99/60120には、天然型リガンドを認識し得るように正確に折り畳まれ、経時的に安定であり、合理的な量で作製することが可能な可溶性TCRが記載されている。このTCRは、一対のC末端二量体化ペプチド(例えばロイシンジッパー)により、それぞれTCR β 鎖又は δ 鎖細胞外ドメインと二量体化したTCR α 鎖又は γ 鎖細胞外ドメインを含んでなる。TCRを作製するためのこの戦略は、一般に、全てのTCRに適用可能である。

40

【 0 0 0 8 】

Guillaumeら(2003)(Nature Immunology 4: 657-663)は、構築物のC末端に付着させたアミノ酸同士間に導入ジスルフィド鎖間結合を含有する可溶性JM22 TCRの構築を詳述する。この特別な構築物は、天然型ジスルフィド鎖間結合の位置から1アミノ酸N末端側で切断したJM22 TCRの細胞外部分から誘導された。C末端定常ドメイン伸長部(extension)がこのTCRの α 鎖及び β 鎖の両方に付加された。これら伸長部は、天然型の位置に対して、 α 鎖中で3アミノ酸、 β 鎖中で6アミノ酸ほど下流への鎖間形成性システイン残基位置の移動を引き起こした。この一般的設計の可溶性TCR(すなわち、ジスルフィド鎖間ジスルフィド結合を含有する導入C末端定常ドメイン伸長部を含んでなる可溶性TCR)もまた、本発明の多価TCR複合体において使用され得る。

50

【 0 0 0 9 】

Reiterら(Immunity, 1995, 2:281-287)は、一方がシュードモナス(Pseudomonas)エクソトキシン(PE38)の切断型形態に連結しているジスルフィド安定化TCR α 及び β 可変ドメインを含んでなる可溶性分子の構築を詳述している。述べられているこの分子を作製する理由の1つは、単鎖TCRの本来的な不安定性を克服することであった。TCR可変ドメイン中の新規ジスルフィド結合の位置は、これらが予め導入されている抗体の可変ドメインとの相同性により同定された(例えば、Brinkmannら(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:7538-7542及びReiterら(1994) Biochemistry 33:5451-5459を参照)。しかし、抗体とTCRの定常ドメイン同士間にそのような相同性はないので、この技法は、TCR定常ドメイン間の新たな鎖間ジスルフィド結合の適切な部位を同定するために用いることができなかった。

10

【 0 0 1 0 】

スーパー抗原

スーパー抗原は、抗原提示細胞(APC)の表面のクラスII MHC分子を規定のサブセットの β 鎖可変ドメインのTCRに架橋することにより免疫刺激を引き起こす、細菌性又はウイルス性のタンパク質である。この架橋は、致死性の毒素性ショック症候群を引き起こし得るサイトカイン(例えばIL-2及びTNF- β)の大量遊離を導くポリクローナルT細胞活性化を引き起こす。Liら(1999)(Annu Rev Immunol 17 435-466)は、スーパー抗原の構造及び機能の総説を提供する。

【 0 0 1 1 】

スーパー抗原融合タンパク質

スーパー抗原融合タンパク質の使用に関する多くの刊行物が存在する。

米国特許第6,692,746号は、対象に、ブドウ球菌エンテロトキシン若しくは化膿性連鎖球菌外毒素又はポリペプチド融合パートナーに融合したこれら毒素の生物学的に活性なホモログからなる組成物の殺腫瘍上の有効量を投与することを含んでなる腫瘍を有する対象を治療するための方法を提供している。

20

【 0 0 1 2 】

米国特許第6,514,498号は、標的探索成分と、TCRへの結合及びT細胞活性化を決定する領域中の1又はそれ以上のアミノ酸残基を改変させたスーパー抗原との接合体を開示している。

米国特許第6,197,299号は、細胞(好ましくはガン)上の細胞表面構造に特異的な抗体にペプチド結合により共有結合で連結したスーパー抗原を含んでなる可溶性抗体接合体、及びそのような接合体を使用する治療方法を開示している。

30

【 0 0 1 3 】

EP0998305は、T細胞活性化を誘導するスーパー抗原-標的化物質-免疫調節剤の接合体を用いる標的細胞の細胞溶解を引き起こすための方法及び組成物を開示している。

WO03094846は、スーパー抗原又はスーパー抗原融合タンパク質の腫瘍内投与及び/又はその鞘内への直接のスーパー抗原の鞘内若しくは腔内投与を含んでなる腫瘍を治療するための方法及び組成物を開示している。

【 0 0 1 4 】

Uenoら(2002)(Anticancer Res.22 (2A) 769-76)は、SEAの組換え融合タンパク質、及びガン腫に存在する糖タンパク質抗原(MK-1抗原と呼ぶ)を認識するFU-MK-1抗体の単鎖可変フラグメント(scFv)の使用を詳述している。この研究は、この融合タンパク質がヒトMK-1発現腫瘍に関して有用である可能性のある免疫療法試薬として働き得ると結論付けた。

40

【 0 0 1 5 】

別の研究(Takemuraら(2002) Cancer Immunol Immunother. 51 (1) :33-44)は、変異ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)及び抗MUC1/抗CD3ダイアボディ(diabody)(Mx3ダイアボディ)を含んでなる融合タンパク質の細菌性産生を詳述した。この融合タンパク質は、胆管ガン(BDC)異種移植重症複合免疫不全(SCID)マウスモデルにおいてMUC1特異的抗腫瘍効果を示した。

【 0 0 1 6 】

50

最後に、別の研究(Nielsenら(2000) J Immunother 23 (1): 146-53)は、進行した結腸直腸ガン又は膵臓ガンの患者における単回の上昇用量のスーパー抗原-抗体融合タンパク質(PNU-214565)の第Ⅰ相試験を詳述した。この融合タンパク質は、ブドウ球菌エンテロトキシン A (SEA)とヒト結腸直腸ガン(CRC)及び膵臓ガン(PC)を認識するモノクローナル抗体C242のFabフラグメントの組換え融合体とを含んでなっていた。著者らは、PNU-214565の単回の3時間注入は4 ng/kgまで安全に投与することができると結論付けた。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0017】

(発明の簡単な説明)

10

本発明は、T細胞レセプター(TCR)とスーパー抗原との結合を含んでなる可溶性二官能性タンパク質を初めて利用可能にする。

(発明の詳細な説明)

本発明は、(a) T細胞レセプター(TCR)と(b)スーパー抗原又はその機能的変形体との間の結合を含んでなる可溶性二官能性タンパク質を提供する。

【0018】

本発明における使用に適切な多くの可溶性TCR構築物がある。これらには、以下が含まれるがこれらに限定されない；

V α -リンカー-V β 設計(Hilyardら(1994) PNAS. 91 (19): 9057-61)又はV α -リンカー-V β -C β 設計(Chungら(1994) PNAS. 91 (26) 12654-8)の単鎖TCR(scTCR)

20

WO 99/60120、Guillaumeら(2003)(Nature Immunology 4: 657-663)又はReiterら(Immunity, 1995, 2:281-287)に記載されるような二量体TCR(dTCR)。

【0019】

本発明の1つの観点は、膜貫通ドメインを除くTCR α 鎖の全て又は一部と膜貫通ドメインを除くTCR β 鎖の全て又は一部とを含んでなるT細胞レセプター(TCR)と、スーパー抗原又はその機能的変形体との間の結合を含んでなる可溶性二官能性タンパク質により提供される。ここで、各TCR鎖は、TCR鎖の機能的可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを含んでなり、天然型TCR中に存在しない定常ドメイン残基同士のジスルフィド結合により連結している。

【0020】

30

スーパー抗原は、抗原提示細胞(APC)の表面のクラスII MHC分子を規定のサブセットの β 鎖可変ドメインのTCRに架橋することにより免疫刺激を引き起こす、細菌性又はウイルス性のタンパク質である。本明細書中で使用する場合、用語「スーパー抗原の「機能的変形体」とは、同じ様式で機能し免疫刺激を生じる、所定のスーパー抗原のアナログをいう。例えば、当業者に公知のように、機能的変形体は、所定の野生型又は変異体と比較して、アミノ酸配列中の軽微な変更を組み込みむことができる。このような軽微な変更としては、クラスII MHC及びTCR β 鎖結合性ドメインから遠隔での保存的なアミノ酸置換、単一アミノ酸欠失、及び切断が挙げられる。機能的変形体は、通常、親スーパー抗原と、少なくとも75%、より頻繁には少なくとも90%、ほとんどの場合少なくとも95~99%の配列同一性を有する。

40

【0021】

本発明の二官能性タンパク質は可溶性である。可溶性の1つの試験は、二官能性タンパク質がリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)(KCL 2.7mM、KH₂PO₄ 1.5mM、NaCl 137mM及びNa₂PO₄ 8mM、pH7.1~7.5, Life Technologies, Gibco BRL)中に1 mg/mlの濃度にて単分散種として存在し、この二官能性タンパク質の90%より多くが25 にて1時間のインキュベーション後に単分散種のままであることができることである。例えば、二官能性タンパク質の可溶性を評価するためには、先ず実施例3に記載のように二官能性タンパク質を精製する。この精製後、100 μ gの二官能性タンパク質を、例えばPBS中で平衡化したPharmacia Superdex 75 HRカラムを用いて、分析用サイズ排除クロマトグラフィーにより分析する。更に、100 μ gの二官能性タンパク質を25 にて1時間インキュベートし、次いで前回の様にサ

50

イズ排除クロマトグラフィーにより分析する。次いで、サイズ排除トレースを積分により分析し、単分散種に対応するピーク下面積を比較する。該当するピークは、分子量既知のタンパク質標準物の溶出位置との比較により同定してもよい。単分散ヘテロ二量体可溶性二官能性タンパク質は、約75～80kDaの分子量を有する。

【0022】

本明細書中で使用する場合、用語「結合」は、TCR及びスーパー抗原をこの2つが生物学的に単一実体として振舞うように近接させるTCRとスーパー抗原との間の連結をいう。このような連結は通常共有結合である。結果的に、本明細書中で使用する用語「二官能性タンパク質」は、

TCR配列及びスーパー抗原配列を含んでなる融合タンパク質

10

非ペプチド性リンカーにより共有結合で連結しているTCR配列及びスーパー抗原配列

TCR配列及びスーパー抗原配列が非共有結合的に結合している複合体

を含むと理解されるべきである。

【0023】

スーパー抗原がTCRにリンカー基を介して間接的である場合、本発明のTCRとスーパー抗原の結合に好ましい2つのクラスのリンカー基、非ペプチド性ポリマー基及びペプチド性基がある。これら2つのクラスのリンカー基は、本発明の可溶性二官能性タンパク質の多価複合体の形成における使用に関連して、下記で詳細に説明する。本明細書の実施例1は、TCRとスーパー抗原との間の結合を形成するために使用し得るペプチド性リンカーの例を提供する。

20

【0024】

本発明の或る実施形態では、スーパー抗原のN末端は、TCR α 鎖又はTCR β 鎖のC末端アミノ酸に、直接又はリンカー基を介して間接的に共有結合で連結している。本発明の更なる実施形態では、スーパー抗原のN末端は、(a)TCR α 鎖若しくはTCR β 鎖のC末端アミノ酸にペプチド結合若しくはシステイン間ジスルフィド結合により直接にか、又は(b)それ自体がTCR α 鎖若しくはTCR β 鎖のC末端にペプチド結合若しくはシステイン間ジスルフィド結合により連結しているリンカーアミノ酸配列のC末端アミノ酸へのペプチド結合若しくはシステイン間ジスルフィド結合により間接的にかのいずれかで連結している。

【0025】

本発明の具体的実施形態において、スーパー抗原のN末端は、TCR α 鎖又はTCR β 鎖のC末端アミノ酸に、ペプチド性リンカーを介して連結している。

30

【0026】

当業者に公知のように、種々のペプチドリリンカーが、TCR β 鎖をスーパー抗原に連結するために適切であり得る。以下は、この目的に使用し得るリンカー配列の例である。

ggcgggtccg これはGly-Gly-Proリンカー(L1)をコードする。

ggatccggcgggtccg (配列番号：1) - これは、BamH1制限酵素部位を含むGly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカー(L2)をコードする。

ggatccgggtgggggcggaagtggaggcagcgggtggatccggcgggtccg (配列番号：3) - これは、2つのBamH1制限酵素部位を含むGly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：4)リンカー(L3)をコードする。

40

cccggg - これはXma1制限酵素部位を含むPro-Glyリンカー(L4)をコードする。

【0027】

本発明の具体的実施形態において、スーパー抗原のN末端は、TCR α 鎖又はTCR β 鎖のC末端アミノ酸に、非ペプチド性ポリマー基を介して連結している。

スーパー抗原が野生型スーパー抗原の変異体であり、その変異がTCR β 可変ドメインに関する当該スーパー抗原の親和性を保持するがクラスII MHC分子に関する親和性を減少させる本発明の1つの観点を提供される。

【0028】

本発明の更なる観点において、スーパー抗原は野生型の又は変異したブドウ球菌性スーパー抗原である。

50

スーパー抗原が図9b(配列番号：5)に示されるアミノ酸配列を有する本発明の具体的実施形態が提供される。このスーパー抗原(SEA-E120, Active Biotech, Sweden)は、図8b(配列番号：6)に示される野生型SEA-Eスーパー抗原に対して、TCR β 可変ドメインに関する親和性を保持するがクラスII MHC分子に関する親和性を減少させるように変異している。

【0029】

本明細書中に開示された可溶性二官能性タンパク質のTCR部分は、標的化成分(targeting moiety)である。これらはTCRリガンド(例えば、ペプチド-MHC又はCD1-抗原複合体)を標的とする。このように、これらTCRは、TCRリガンドに関して、当該リガンドに特異的な天然型TCRより高い親和性及び/又は遅い解離速度を有していれば望ましい。

10

【0030】

1つの広い観点では、本発明の可溶性二官能性タンパク質のTCR部分は、それぞれWO 04/033685及びWO 03/020763に記載されるような単鎖TCR(scTCR)又は二量体TCR(dTCR)のいずれかの形態である。詳細には：

可溶性二官能性タンパク質の適切なTCR部分は、膜貫通ドメインを除くTCR α 鎖の全て又は一部と、膜貫通ドメインを除くTCR β 鎖の全て又は一部とを含んでなり、ここで各TCR鎖は、TCR鎖の機能的可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを含んでなり、天然型TCR中に存在しない定常ドメイン残基同士間のジスルフィド結合により連結している。

【0031】

本発明の1つの具体的実施形態では、このようなTCR部分は、TCR鎖の細胞外定常Igドメインの全てを含んでなる。

20

本発明の別の具体的実施形態において、このようなTCR部分は、TCR鎖の細胞外ドメインの全てを含んでなる。

【0032】

可溶性二官能性タンパク質のTCR部分は、天然型TCR中に存在しない定常ドメイン残基同士間にジスルフィド連結を有することにより特徴付けられる。

本発明の1つの観点では、この共有結合性ジスルフィド結合は、 α 鎖の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基を、 β 鎖の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基に連結する。

【0033】

TCR部分において、天然型TCR中に存在する鎖間ジスルフィド結合がない本発明の別の観点提供される。TCR部分において、天然型の α TCR鎖及び β TCR鎖が、天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基が除去されるようにC末端で切断されているこの観点の具体的実施形態が提供される。代替の実施形態では、天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基は別の残基に置換されている。別の具体的実施形態では、天然型鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン残基は、セリン又はアラニンに置換されている。

30

【0034】

TCR部分において、天然型TCR β 鎖中に存在する非対合のシステイン残基が存在しない本発明の1つの観点提供される。

40

TCR部分において、天然型TCR中に存在しないジスルフィド結合が、 β 炭素原子が天然型TCR構造中で0.6nm未満離れている残基から置換されたシステイン残基同士間にある本発明の別の観点提供される。

【0035】

TCR部分において、天然型TCR中に存在しないジスルフィド結合が、TRAC*01のエキソン1のThr 48及びTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン1のSer 57から置換されたシステイン残基同士間にある本発明の具体的実施形態が提供される。

TCR部分において、天然型TCR中に存在しないジスルフィド結合が、TRAC*01のエキソン1のThr 45及びTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン1のSer 77から置換されたシステイン残基同士間にある本発明の別の具体的実施形態が提供される。

50

【 0 0 3 6 】

TCR部分において、天然型TCR中に存在しないジスルフィド結合が、TRAC*01のエキソン 1 のTyr 10及びTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン 1 のSer 17から置換されたシステイン残基同士間にある本発明の別の具体的実施形態が提供される。

TCR部分において、天然型TCR中に存在しないジスルフィド結合が、TRAC*01のエキソン 1 のThr 45及びTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン 1 のAsp 59から置換されたシステイン残基同士間にある本発明の別の具体的実施形態が提供される。

【 0 0 3 7 】

TCR部分において、天然型TCR中に存在しないジスルフィド結合が、TRAC*01のエキソン 1 のSer 15及びTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン 1 のGlu 15から置換されたシステイン残基同士間にある本発明の別の具体的実施形態が提供される。

【 0 0 3 8 】

本発明の別の具体的実施形態は、

(a)(i)膜貫通ドメインを除くTCR α 鎖の全て又は一部と(ii)膜貫通ドメインを除くTCR β 鎖の全て又は一部とを含んでなるTCRと

(b)配列番号5のスーパー抗原

との間の結合を含んでなる可溶性二官能性タンパク質により提供される。ここで、(i)及び(ii)は各々、TCR鎖の機能的可変ドメインと定常ドメインの少なくとも一部とを含んでなり、そしてTRAC*01のエキソン 1 のThr 48及びTRBC1*01又はTRBC2*01のエキソン 1 のSer 57から置換されたシステイン残基同士間のジスルフィド結合により連結している。また、TCR(a)とスーパー抗原(b)の結合は、それぞれC末端からN末端への関係で結合している。

【 0 0 3 9 】

TCR部分が、膜貫通ドメインを除くTCR α 鎖の全て又は一部と膜貫通ドメインを除くTCR β 鎖の全て又は一部とを含んでなり、各TCR鎖は各々、第2のTCRの定常ドメインの全て又は一部に融合した第1のTCRの機能的可変ドメインを含んでなり、第1及び第2のTCRは同じ種に由来する本発明の更なる実施形態が提供される。

本発明の可溶性二官能性タンパク質が検出可能な標識を更に含んでなる、更なる観点が提供される。

【 0 0 4 0 】

TCRが1 μ Mより高い所定のペプチド-MHCに関する親和性(K_D)を有する更なる観点が、本発明の可溶性二官能性タンパク質により提供される。本発明者らの同時係属中の出願WO 2004/044004は、TCRリガンドに関して、当該リガンドに特異的な天然型TCRより高い親和性及び/又は遅い解離速度を有するTCRを作製する方法を詳述している。好ましくは、TCRリガンドに関するTCRの親和性(K_D)は1 μ Mより高く及び/又は解離速度(k_{OFF})は $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ より遅い。より好ましくは、TCRリガンドに関するTCRの親和性(K_D)は10nMより高く及び/又は解離速度(k_{OFF})は $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ より遅い。最も好ましくは、TCRリガンドに関するTCRの親和性(K_D)は1 nMより高く及び/又は解離速度(k_{OFF})は $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ より遅い。

【 0 0 4 1 】

親和性(K_D)及び/又は解離速度(k_{OFF})の測定は、任意の公知の方法により行うことができる。好ましい方法は、実施例4の表面プラズモン共鳴(Biacore)法である。

上記で言及した非天然型ジスルフィド結合に加えて、本発明の可溶性二官能性タンパク質のTCR部分は、天然型TCR中でジスルフィド結合により連結している残基に対応する残基同士間のジスルフィド結合を含み得る。

本発明の可溶性二官能性タンパク質のTCR部分は、好ましくは、天然型TCRの膜貫通配列に対応する配列も細胞質配列に対応する配列を含有しない。

【 0 0 4 2 】

多価複合体

本発明の1つの観点により、複数の可溶性二官能性タンパク質を含んでなる多価複合体が提供される。この観点の1つの実施形態は、ポリアルキレングリコールポリマー又はペ

10

20

30

40

50

プチド性配列を含んでなるリンカー基を介して互いに結合した2つ又は3つ又は4つの結合二官能性タンパク質により提供される。好ましくは複合体は水溶性であり、したがってリンカー基はそれ相応に選択されるべきである。更に、リンカー基は、形成される複合体の構造的多様性が最小限化するように、可溶性二官能性タンパク質上の規定位置に付着することができるべきであることが好ましい。この観点の1つの実施形態は、ポリマー鎖又はペプチド性リンカー配列がTCR部分の可変領域配列中に位置しない各可溶性二官能性タンパク質のアミノ酸残基同士間に伸びている本発明の多価複合体により提供される。

【0043】

本発明の複合体は医学用であり得るので、リンカー成分は医薬的適合性、例えば免疫原性に関して当然に注意して選択されるべきである。

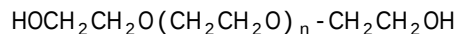
上記の望まれる基準を満たすリンカー成分の例は、当該分野、例えば抗体フラグメントの連結の分野で公知である。

【0044】

本発明の多価複合体の製造における使用に好ましい2つのクラスのリンカーが存在する。可溶性二官能性タンパク質がポリアルキレングリコール鎖により連結している本発明の多価複合体は、この観点の1つの実施形態を提供する。

【0045】

第1は、親水性ポリマー、例えばポリアルキレングリコールである。このクラスの最も一般に使用されるものは、ポリエチレングリコール又はPEG(この構造を下記に示す)をベースにする：



(式中、 n は2より大きい)。しかし、他の適切な(任意に置換されていてもよい)ポリアルキレングリコール(ポリプロピレングリコールを含む)及びエチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマーをベースにするものもある。

【0046】

このようなポリマーは、治療剤、特にポリペプチド治療剤又はタンパク質治療剤を処理するか又はこれに接合するかして、該治療剤のPKプロファイルに有益な変化(例えば、減少した腎クリアランス、向上した血漿半減期、減少した免疫原性及び向上した溶解性)を達成するために使用され得る。PEG-治療剤接合体のPKプロファイルのこのような改善は、PEG分子が該治療剤の周囲に、免疫系との反応を立体的に障害しタンパク質分解性を減少させる「殻」を形成することに起因すると考えられる(Caseyら(2000) Tumor Targeting 4 235-244)。使用する親水性ポリマーのサイズは、具体的には、TCR複合体の意図する治療用途に基づいて選択し得る。したがって、例えば、製品が、例えば腫瘍治療における使用のために、循環中を出て組織に浸潤するよう意図される場合、5 kDaのオーダーの低分子量ポリマーを使用することが有利であり得る。医薬製剤におけるPEG及び類似分子の使用を詳述する多くの総説論文及び本が存在する。例えば、Harris (1992) Polyethylene Glycol Chemistry - Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, New York, NY.; 又はHarris & Zalipsky (1997) Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol ACS Books, Washington, D.C.を参照。

【0047】

使用するポリマーは、直鎖状又は分枝状の構造を有することができる。分枝状PEG分子又はその誘導体は、グリセロール及びグリセロールオリゴマー、ペンタエリスリトール、ソルビトール並びにリジンを含む分枝成分の付加により誘導することができる。

【0048】

通常、ポリマーは、該ポリマーが可溶性二官能性タンパク質中の標的部位へ連結することが可能となるように、その構造中、例えば一方又は両方の端部及び/又は主鎖からの分枝上に、化学反応性の基を有する。下記に示すように、この化学反応性の基は親水性ポリマーに直接付着させてもよいし、又は親水性ポリマーと反応性化学成分との間にスペーサ基/成分が存在していてもよい：

反応性化学成分 - 親水性ポリマー - 反応性化学成分

10

20

30

40

50

反応性化学成分 - スペース - 親水性ポリマー - スペース - 反応性化学成分

【 0 0 4 9 】

上記で概説したタイプの構築物の形成に使用するスペースは、非反応性の化学的に安定な鎖である任意の有機成分であり得る。このようなスペースには、以下が含まれるがそれらに限定されない：

- (CH₂)_n - (式中、n = 2 ~ 5)

- (CH₂)₃NHCO(CH₂)₂

【 0 0 5 0 】

ポリアルキレングリコール鎖と複合体の可溶性二官能性タンパク質へのその付着点との間に二価アルキレンスペース基が位置する本発明の多価複合体により、この観点の更なる実施形態が提供される。

ポリアルキレングリコール鎖が少なくとも2つのポリエチレングリコール反復単位を含んでなる本発明の多価複合体により、この観点の更なる実施形態が提供される。

【 0 0 5 1 】

本発明に有用であり得る反応性化学成分に直接か又はスペースを介して連結される親水性ポリマーの商業的供給業者は多く存在する。これら供給業者としては、Nektar Therapeutics(CA、米国)、NOF Corporation(日本)、Sunbio(韓国)及びEnzon Pharmaceuticals(NJ、米国)が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

本発明に有用であり得る反応性化学成分に直接か又はスペースを介して連結される市販の親水性ポリマーとしては、以下のものが挙げられるがそれらに限定されない。

【 0 0 5 3 】

【表 1】

PEGリンカーの説明	PEGの供給源	カタログ番号
二量体リンカー		
3.4K直鎖状(マレイミド)	Nektar	2D2DOFO2
5Kフォーク状(マレイミド)	Nektar	2D2DOHOF
10K直鎖状(マレイミドに代えて オルトビリジルds-リンカーを有する)	Sunbio	
20Kフォーク状(マレイミド)	Nektar	2D2DOPOF
20K直鎖状(マレイミド)	NOF Corporation	
40Kフォーク状(マレイミド)	Nektar	2D3XOTOF
より高次の多量体リンカー		
15K,3アーム,Mal ₃ (三量体用)	Nektar	OJOONO3
20K,4アーム,Mal ₄ (四量体用)	Nektar	OJOOP04
40K,8アーム,Mal ₈ (八量体用)	Nektar	OJOOTO8

【 0 0 5 4 】

種々のカップリング化学成分を使用して、ポリマー分子をタンパク質治療剤及びペプチド治療剤とカップリングすることができる。最も適切なカップリング化学成分の選択は、所望するカップリング部位に大きく依存する。例えば、以下のカップリング化学成分が、PEG分子の1又はそれ以上の末端に付着させるために使用されてきた(出典：Nektar Molecular Engineering Catalogue 2003)：

【 0 0 5 5 】

N - マレイミド

ビニルスルホン

炭酸ベンゾトリアゾール

スクシンイミジルプロピオネート

スクシンイミジルブタノエート(succinimidyl butanoate)

チオエステル
アセトアルデヒド
アクリラート
ビオチン
一級アミン

【 0 0 5 6 】

上記のように、非PEGベースのポリマーもまた、本発明の可溶性二官能性タンパク質を多量化するために適切なリンカーを提供する。例えば、脂肪族鎖により連結したマレイミド末端を含有する成分、例えばBMH及びBMOE(Pierce, 製品番号22330及び22323)が使用できる。

10

【 0 0 5 7 】

ペプチド性リンカーが他方の好ましいクラスのリンカー基である。これらリンカーは、アミノ酸の鎖から構成され、単純なリンカー又は可溶性二官能性タンパク質を付着させ得る多量体化ドメインを作製するために機能する。ビオチン/ストレプトアビジン系は、以前に、インビトロ結合研究用の可溶性TCRの四量体(WO/99/60119を参照)を作製するために使用された。しかし、ストレプトアビジンは微生物由来のポリペプチドであり、よって治療剤における使用に理想的には適していない。

【 0 0 5 8 】

可溶性二官能性タンパク質がヒト多量体化ドメインに由来するペプチド性リンカーにより連結している本発明の多価複合体により、この観点の更なる実施形態が提供される。

20

多価複合体の作製に使用できる多量体化ドメインを含有する多くのヒトタンパク質が存在する。例えば、p53の四量体化ドメインは、単量体scFvフラグメントと比較して、増大した血清残存率及び有意に減少した解離速度を示すscFv抗体フラグメント四量体を作製するために利用されている(Willudaら(2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392)。ヘモグロビンもまた、この種の適用におそらく使用できる四量体化ドメインを有する。

【 0 0 5 9 】

少なくとも1つが本発明の可溶性二官能性タンパク質である少なくとも2つの可溶性二官能性タンパク質を含んでなる多価複合体により、この観点の別の実施形態が提供される。

【 0 0 6 0 】

30

上記の観点及びその実施形態は、以下の形態の本発明の多価複合体を作製する方法を詳述する：

(AB)_n

ここで、Aは可溶性二官能性タンパク質のTCR部分であり、Bは可溶性二官能性タンパク質のスーパー抗原部分である。可溶性二官能性タンパク質のTCR部分及び/又はスーパー抗原部分が多量体化されている代替構築物も有益であり得ると考えられる。これら構築物は以下のいずれかの形態であり得る：

【 0 0 6 1 】

本発明の1つのTCRが少なくとも2つのスーパー抗原に連結している

A(B)_n

40

又は、少なくとも2つの本発明のTCRが1つのスーパー抗原に連結している

(A)_nB

又は、少なくとも2つの本発明のTCRが少なくとも2つのスーパー抗原に連結している

(A)_n(B)_n

【 0 0 6 2 】

(治療用途)

本発明はまた、標的細胞にスーパー抗原を送達する方法を提供する。この方法は、潜在的な標的細胞を本発明に従う可溶性二官能性タンパク質又は多価複合体と、標的細胞への可溶性二官能性タンパク質又は多価複合体の付着を可能にする条件下で接触させることを含んでなる。ここで、可溶性二官能性タンパク質又は多価複合体は、所定のペプチド-MHC

50

複合体に特異的である。

【0063】

詳細には、本発明の可溶性二官能性タンパク質又は多価複合体は、特定の抗原を提示する細胞の位置までスーパー抗原を送達するために使用することができる。このことは、多くの状況で、例えば腫瘍に対して又は感染性疾患の部位で有用である。スーパー抗原は、その効果が局所的に(しかしスーパー抗原が結合する細胞のみではない)発揮されるように送達することができる。

【0064】

このように、1つの特定の戦略は、腫瘍抗原に特異的である、本発明による二官能性タンパク質又は多価複合体を使用する。ガン治療には、腫瘍又は転移の近傍への局在がスーパー抗原の効果を増強する。或いは、本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体は、感染性疾患に関連する特定の抗原を提示する細胞の位置までスーパー抗原を送達するために使用することができる。

10

【0065】

二官能性タンパク質又は多価複合体の投与前及び/又は投与と同時の患者へのインターフェロン(IFN)(例えば、IFN- γ)の投与は、標的細胞でのペプチド-MHC発現レベルを増加させることができる。このことはガンの治療において特に有益であり得る。

本発明の更なる実施形態は、本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体を医薬的に許容され得るキャリアと共に含んでなる医薬組成物により提供される。

【0066】

本発明はまた、ガン疾患を患っている対象に、有効量の本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体を投与することを含んでなるガンの治療方法を提供する。関連する実施形態では、本発明は、ガンの治療用組成物の製造における、本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体の使用を提供する。SEA E120又はその機能的変形体若しくはフラグメントは、ガン治療での本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体における使用のための特に好ましいスーパー抗原である。

20

【0067】

本発明はまた、感染性疾患を患っている対象に、有効量の本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体を投与することを含んでなる感染性疾患の治療方法を提供する。関連する実施形態では、本発明は、感染性疾患の治療用組成物の製造における本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体の使用を提供する。SEA E120又はその機能的変形体若しくはフラグメントは、感染性疾患の治療での本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体における使用のための好ましいスーパー抗原である。

30

【0068】

本発明の組成物及び方法により治療されるガンには、白血病、頭部及び頸部、肺、胸部、結腸、子宮頸部、肝臓、脾臓、卵巣、前立腺、結腸、肝臓、膀胱、食道、胃、黒色腫及び精巣が挙げられるがこれらに限定されない。

【0069】

本発明の組成物及び方法により治療される感染性疾患は、細胞内感染性生物により引き起こされるものである。本明細書中で使用する用語「細胞内感染性生物」は、ヒト細胞に侵入し得る任意の生物を包含すると理解される。このような生物は、直接に疾患を引き起こし得るか、又は直接には変化した細胞機能を導き得る。これら生物は以下のもののいずれかであり得る：

40

細菌、真菌、ウイルス、原生動物及びマイコバクテリア。

【0070】

これら疾患及び該疾患を引き起こす細胞内感染性生物の例としては、ペスト菌(*Yersinia pestis*)により引き起こされる腺ペスト及びHTLV-1ウイルスにより引き起こされるT細胞白血病が挙げられるがこれらに限定されない。

【0071】

本発明に従う治療用の二官能性タンパク質又は多価複合体は、通常、医薬的に許容され

50

得るキャリアを一般には含む滅菌医薬組成物の部分として供給される。この医薬組成物は、(これを患者に投与する望ましい方法に依存して)任意の適切な形態であり得る。これは、単位投薬剤形で提供されてもよく、一般には密封容器で提供され、キットの部分として提供されてもよい。このようなキットは、(必ずしもではないが)通常、使用のための指示書を含む。キットは、複数の単位投薬剤形を含んでもよい。

【0072】

医薬組成物は、任意の適切な経路による投与、例えば非経口経路、経皮経路又は吸入による投与、好ましくは非経口(皮下、筋肉内又は静脈内(最も好ましい)を含む)経路による投与に適合され得る。このような組成物は、薬学の分野において任意の公知方法により、例えば滅菌条件下で活性成分をキャリア又は賦形剤と混合することにより製造し得る。

10

【0073】

本発明の物質の投薬量は、処置すべき疾患又は障害、治療すべき個体の年齢及び症状などに依存して、幅広い制限範囲内で変化し得、究極的には、医師が、使用すべき適切な投薬量を決定する。

【0074】

(追加の観点)

本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体は、実質的に純粋な形態で、又は精製若しくは単離した調製物として提供され得る。例えば、本発明の二官能性タンパク質又は多価複合体は、他のタンパク質を実質的に含まない形態で提供され得る。

【0075】

20

また、可溶性TCR β 鎖をコードする第2の核酸に融合したスーパー抗原をコードする第1の核酸配列を含んでなる核酸分子も提供される。関連する実施形態は、膜貫通ドメインを除きTCR β 鎖の全て又は一部をコードする第2の核酸に融合したスーパー抗原をコードする第1の核酸配列を含んでなる核酸分子により提供される。ここで、TCR β 鎖をコードする核酸配列は、コードされるTCR β 鎖及び更なる非天然型システイン残基を含有するTCR α 鎖の定常ドメイン残基同士間に非天然型ジスルフィド結合を形成し得る導入システインコドンを含んでなる。

【0076】

更に、可溶性TCR α 鎖をコードする第2の核酸に融合したスーパー抗原をコードする第1の核酸配列を含んでなる核酸分子が提供される。関連する実施形態は、膜貫通ドメインを除きTCR α 鎖の全て又は一部をコードする第2の核酸に融合したスーパー抗原をコードする第1の核酸配列を含んでなる核酸分子により提供される。ここで、TCR α 鎖をコードする核酸配列は、コードされるTCR α 鎖及び更なる非天然型システイン残基を含有するTCR β 鎖の定常ドメイン残基間に非天然型ジスルフィド結合を形成し得る導入システインコドンを含んでなる。

30

【0077】

また、本発明の1又は複数の核酸分子を含んでなるベクター及びそのようなベクターを含んでなる宿主細胞が提供される。

【0078】

また、スーパー抗原に融合したTCR β 鎖をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞及びTCR α 鎖をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞を、それぞれTCR β 鎖-スーパー抗原融合体及びTCR α 鎖の発現を引き起こす条件下でインキュベートし；

40

それぞれのTCR β 鎖-スーパー抗原融合体及びTCR α 鎖を精製し；

それぞれのTCR β 鎖-スーパー抗原融合体及びTCR α 鎖を、共有結合性ジスルフィド結合がTCR α 鎖の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基をTCR β 鎖-スーパー抗原融合体の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基に連結するようリフォールディング条件下で混合する

ことを含んでなる可溶性二官能性タンパク質を得る方法が提供される。

【0079】

50

更に、スーパー抗原に融合したTCR α 鎖をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞及びTCR β 鎖をコードする核酸分子を含んでなるベクターを含んでなる宿主細胞を、それぞれTCR α 鎖-スーパー抗原融合体及びTCR β 鎖の発現を引き起こす条件下でインキュベートし；

それぞれのTCR α 鎖-スーパー抗原融合体及びTCR β 鎖を精製し；

それぞれのTCR α 鎖-スーパー抗原融合体及びTCR β 鎖を、共有結合性ジスルフィド結合がTCR β 鎖の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基をTCR α 鎖-スーパー抗原融合体の定常ドメインのイムノグロブリン領域の残基に連結するようなリフォールディング条件下で混合する

ことを含んでなる可溶性二官能性タンパク質を得る代替方法が提供される。

10

【0080】

また、(i)スーパー抗原部分がTCR β 鎖可変ドメインの所定のサブセットに選択的に結合する本発明の可溶性二官能性タンパク質又は多価複合体を提供し；

(ii)可溶性二官能性タンパク質又は多価複合体を、クラスII MHC-ペプチド複合体を提示する抗原提示細胞(APC)及び多様なT細胞の集団と接触させ；

(iii)APC-可溶性二官能性タンパク質-T細胞複合体の形成に適切な条件下で(ii)の混合物をインキュベートする

ことを含んでなる、TCR β 鎖可変ドメインの所定のサブセットを提示するT細胞について多様なT細胞の集団を富化する方法が提供される。

20

【0081】

本発明の各観点の好ましい特徴は、その他の観点の各々についても、必要な変更を加えてではあるが同様である。本明細書中で言及する先行技術文献は、法が許す最大限度で本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0082】

(実施例)

本発明を以下の実施例で更に説明するが、以下の実施例は本発明の範囲を如何なる様式でも制限しない。

【0083】

以下に、添付図面について言及する。

30

図1a及び1bはそれぞれ、システインコドンが導入されるように変異させた可溶性A6 (Tax) TCRの α 鎖及び β 鎖の核酸配列を示す。影付きは、 α 鎖核酸中の導入システインコドン及び導入BamH1制限部位を示す；

【0084】

図2aは、新規なジスルフィド鎖間結合を作製するために使用するT₄₈→C変異(下線)を含むA6 (Tax) TCR α 鎖細胞外アミノ酸配列を示す。図2bは、新規なジスルフィド鎖間結合を作製するために使用するS₅₇→C変異(下線)を含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列を示す；

【0085】

図3a及び3bは、非天然型ジスルフィド結合を形成するための追加のシステイン残基を含むように変異させたJM22 TCRの α 鎖及び β 鎖のDNA配列を示す；

40

図4a及び4bはそれぞれ、図3a及び3bのDNA配列から作製したJM22 TCR α 鎖及び β 鎖の細胞外アミノ酸配列を示す；

【0086】

図5a及び5bは、非天然型ジスルフィド結合を形成するための追加のシステイン残基を含むように変異させたA6 (Tax) TCR β 鎖の高親和性変形体のDNA配列及びアミノ酸配列を示す。導入したシステインコドンは影付きで示し、親和性増大変異は太字で示している；

図6a及び6bは、非天然型ジスルフィド結合を形成するための追加のシステイン残基を含むように変異させたテロメラゼTCRの高親和性変形体の α 鎖及び β 鎖のDNA配列を示す。導入システインは影付きで示している；

50

【 0 0 8 7 】

図7a及び7bはそれぞれ、図6a及び6bのDNA配列から作製したテロメラーゼTCR α 鎖及び β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体を示す；

図8a - 野生型SEA-EのDNA配列

図8b - 野生型SEA-Eのアミノ酸配列

図9a - 変異体スーパー抗原SEA-E120のDNA配列

図9b - 変異体スーパー抗原SEA-E120のアミノ酸配列。変異アミノ酸は影付きで示している；

【 0 0 8 8 】

図10a - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

10

【 0 0 8 9 】

図10b - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

20

【 0 0 9 0 】

図11a - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

【 0 0 9 1 】

図11b - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

30

【 0 0 9 2 】

図12a - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するテロメラーゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

【 0 0 9 3 】

図12b - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むテロメラーゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

40

【 0 0 9 4 】

図13a - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するテロメラーゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

【 0 0 9 5 】

図13b - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むテロメラーゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列。導入シス

50

テインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

【 0 0 9 6 】

図14はPEX821プラスミドのDNA配列を詳述する。

図15は、高親和性A6 (Tax) TCR-SEA-E120スーパー抗原融合タンパク質を使用するAPCのペプチド-MHC特異的なCTL媒介性殺傷を示す。

図16は、T2細胞の殺傷に対するTaxペプチドパルス滴定濃度 ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$) 及び高親和性Tax TCR-L2-SEA E-120滴定濃度 ($6.4 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-7} \text{ M}$) の効果を示す。

【 0 0 9 7 】

図17は、固定濃度 (10^{-6} M) のTaxペプチド又は無関係のテロメラゼペプチド (ILAKFLHWL) コントロールを用いる高親和性Tax TCR-L2-SEA E-120融合タンパク質により誘発されるT2細胞殺傷を示す。

図18a及び18bはそれぞれ、導入システインを含有する高親和性NY-ESO TCR α 鎖のDNA配列及びアミノ酸配列を詳述する。

【 0 0 9 8 】

図19a及び19bはそれぞれ、SEA E-120に融合された、導入システインを含有する切断型高親和性NY-ESO TCR β 鎖のDNA配列及びアミノ酸配列を詳述する。切断型NY-ESO TCR β 鎖は、「正常な」可溶性TCRと比較して、C末端から最後の3アミノ酸(RAD)が除去されている。図19aでは切断型TCR β 鎖のDNA配列中の最後のグリシン残基をコードするコドンに下線を付し、図19bでは対応するグリシン残基に下線を付した。

【 0 0 9 9 】

図20a～20cはそれぞれ、多くのTCR-スーパー抗原融合体、Tax TCR-L2-SEA E120、テロメラゼTCR-L1-SEA E120及びNY-ESO TCR-LM1-SEA E120のT2細胞殺傷能力を示す。全ての融合タンパク質を2 nMの濃度で供給した。T2標的細胞を、 10^{-6} M の同族ペプチド又は無関係のペプチドでパルスした。種々のエフェクター：標的細胞(E:T)比を使用した。

【 0 1 0 0 】

図21a及び21bは、共に2 nMの濃度で供給した2つの異なるTCR-スーパー抗原融合体(それぞれTax TCR-L2-SEA E120及びテロメラゼTCR-L1-SEA E120)のT2標的細胞殺傷能力を示す。標的細胞を、これらTCR-スーパー抗原融合体の1つに関しての同族ペプチド 10^{-6} M でパルスし、種々のエフェクター：標的細胞(E:T)比を使用した。

【 0 1 0 1 】

図22は、共に2 nMの濃度で供給したTax TCR-L2-SEA E120及びテロメラゼTCR-L1-SEA E120融合タンパク質のSK-Mel 37腫瘍細胞株殺傷能力を示す。標的細胞を 10^{-6} M のTaxペプチドでパルスし、種々のエフェクター：標的(E:T)細胞比を調べた。

【 0 1 0 2 】

図23は、pEX821ベクターのプラスミドマップを提供する。

図24は、pEX954ベクターのDNA配列を詳述する。

図25は、pEX954ベクターのプラスミドマップを提供する。

【 0 1 0 3 】

実施例 1 - 可溶性高親和性A6 (Tax) TCR-スーパー抗原融合タンパク質をコードするDNAの作製

図8a及び9aにそれぞれ詳述する野生型SEAスーパー抗原又は変異SEA E120スーパー抗原のいずれかをコードするDNAの5'末端にペプチドリナーをコードするDNA配列を介して連結している図5aに詳述する可溶性高親和性A6 (Tax) TCR β 鎖をコードするDNA配列を含んでなる合成遺伝子を合成した。

適切なDNAサービスを提供する多くの会社、例えばGenearth(ドイツ)が存在する。

【 0 1 0 4 】

図10aは、Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカー(配列番号：2)を介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に参与する非天然型システインを含有するA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列を詳述する。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下

10

20

30

40

50

線を付した。

【 0 1 0 5 】

図10bは、Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカー(配列番号：2)を介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列を詳述する。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

【 0 1 0 6 】

図11aは、Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカー(配列番号：2)を介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列を詳述する。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

【 0 1 0 7 】

図11bは、Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカー(配列番号：2)を介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列を詳述する。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

【 0 1 0 8 】

当業者に公知のように、種々のペプチドリinkerが、TCR β 鎖をスーパー抗原に連結するために適切であり得る。以下は、この目的に使用され得るリンカー配列の例である。

【 0 1 0 9 】

リンカー配列：

当業者に公知のように、種々のペプチドリinkerが、TCR β 鎖をスーパー抗原と連結するために適切であり得る。以下は、この目的に使用され得るリンカー配列の例である。

【 0 1 1 0 】

ggcgggtccg - これはGly-Gly-Proリンカー(L1)をコードする。

ggatccggcgggtccg (配列番号：1) - これは、BamH1制限酵素部位を含むGly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカー(L2)をコードする。

ggatccgggtgggggcggaagtggaggcagcgggtggatccggcgggtccg (配列番号：3) - これは、2つのBamH1制限酵素部位を含むGly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：4)リンカー(L3)をコードする。

cccggg - これはXma1制限酵素部位を含むPro-Glyリンカー(L4)をコードする。

【 0 1 1 1 】

直接融合体としての可溶性TCR鎖とスーパー抗原との結合を引き起こすこともまた可能である。可溶性TCR β 鎖と必要なスーパー抗原との直接融合により形成される融合タンパク質は、本明細書中で、リンカー配列を欠いていることを意味するようにTCR-L0-スーパー抗原と示される。TCR-スーパー抗原の直接融合タンパク質は、該融合タンパク質のTCR部分又はスーパー抗原部分のいずれかの切断を含んでいてもよい。例えば、以下の2つのタイプの切断型TCR-スーパー抗原融合体が形成された。「TCR-LM1-スーパー抗原」融合体は、スーパー抗原のN末端に直接融合した、TCR鎖のC末端から最後の3アミノ酸を除去するように切断された可溶性TCR β 鎖を含んでなる。「TCR-LM2-スーパー抗原」融合体は、N末端から最初の3アミノ酸を除去するように切断されたスーパー抗原に直接融合した可溶性TCR β 鎖を含んでなる。

【 0 1 1 2 】

次いで、TCR β 鎖-リンカー-スーパー抗原融合タンパク質をコードする上記合成遺伝子の1つを、pEX821プラスミド中にサブクローニングした。pEX821のDNA配列及びプラスミドマップはそれぞれ図14及び図23に提供されている。

次いで、非天然型システインコドンを含む可溶性A6 (Tax) TCRのα鎖をコードする合成遺伝子を独立してpEX954プラスミド中にサブクローニングした(pEX954のDNA配列及び

プラスミドマップについてはそれぞれ図24及び25を参照)。

図1aに、この可溶性A6 (Tax) TCR α 鎖のDNA配列を詳述する。

【0113】

実施例2 - 可溶性高親和性テロメラゼTCR-スーパー抗原融合タンパク質をコードするDNAの作製

図8a及び9aにそれぞれ詳述する野生型SEAスーパー抗原又は変異SEA E120スーパー抗原のいずれかをコードするDNAの5'末端にペプチドリッカーをコードするDNA配列を介して連結している図6bに詳述する可溶性高親和性テロメラゼTCR β 鎖をコードするDNA配列を含んでなる合成遺伝子を合成した。

適切なDNAサービスを提供する多くの会社、例えばGeneart(ドイツ)が存在する。

10

【0114】

図12a - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号: 2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するテロメラゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

【0115】

図12b - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号: 2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むテロメラゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

20

【0116】

図13a - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号: 2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するテロメラゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

【0117】

図13b - Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号: 2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むテロメラゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

30

【0118】

当業者に公知のように、種々のペプチドリッカーが、TCR β 鎖をスーパー抗原と連結するために適切であり得る。実施例1に、この目的に使用され得るリンカー配列の例が提供されている。

【0119】

次いで、TCR β 鎖-リンカー-スーパー抗原融合タンパク質をコードする上記合成遺伝子の1つを、pEX821プラスミド中にサブクローニングした。図14にPEX821プラスミドのDNA配列が詳述されている。図23にはこのベクターのプラスミドマップが提供されている。

40

【0120】

次いで、非天然型システインコドンを含む可溶性テロメラゼTCRの α 鎖をコードする合成遺伝子を独立してpEX954プラスミド中にサブクローニングした(pEX954のDNA配列及びプラスミドマップについてはそれぞれ図24及び25を参照)。

図6aに、この可溶性テロメラゼTCR α 鎖のDNA配列を詳述する。

【0121】

当業者に明らかであるように、実施例1及び2に記載の方法は、DNA配列が既知である任意のTCRから、本発明の可溶性TCR-スーパー抗原融合タンパク質を作製するために使用し得る。例えば、図3及び4に詳述する可溶性Flu-HLA-A2特異的JM22 TCRを含有するTCR-スーパー抗原融合タンパク質は、これら方法に従って作製することができる。

50

【 0 1 2 2 】

実施例 3 - 可溶性TCR-スーパー抗原融合タンパク質の発現、リフォールディング及び精製

変異TCR α 鎖及びTCR β 鎖-スーパー抗原融合タンパク質をそれぞれ含有するpEX954発現プラスミド及びpEX821発現プラスミドを、別々にE.coli株BL21pLysSに形質転換し、1つのアンピシリン耐性コロニーを、TYP(アンピシリン100 μ g/ml)培地中で37℃にて0.4のOD₆₀₀まで増殖させた後、0.5mMのIPTGでタンパク質発現を誘導した。誘導の3時間後にBeckman J-6B中での4000rpmにて30分間の遠心分離により細胞を採集した。細胞ペレットを、50mMのTris-HCl、25% (w/v)のスクロース、1mMのNaEDTA、0.1% (w/v)のNaAzide、10mMのDTTを含有する緩衝液(pH8.0)中に再懸濁した。一晚の凍結-解凍工程の後、再懸濁細胞を、Milsonix XL2020ソニケータ中での標準の12mm径プローブを使用する1分間のバーストで合計約10分間の超音波処理に付した。封入体ペレットを、Beckman J2-21遠心機における13000rpmにて30分間の遠心分離により回収した。次いで、3回の界面活性剤での洗浄を行い、細胞残渣及び膜成分を除去した。各回、封入体ペレットをTriton緩衝液(50mMのTris-HCl、0.5%のTriton-X100、200mMのNaCl、10mMのNaEDTA、0.1% (w/v)のNaAzide、2mMのDTT、pH8.0)中でホモジナイズした後、Beckman J2-21における13000rpmにて15分間の遠心分離によりペレット化した。次いで、以下の緩衝液中での同様な洗浄により界面活性剤及び塩を除去した：50mMのTris-HCl、1mMのNaEDTA、0.1% (w/v)のNaAzide、2mMのDTT、pH8.0。最後に、封入体を30mgずつ小分けし、-70℃にて凍結させた。封入体タンパク質の収率を、6Mグアニジン-HClで可溶化し、Bradford色素結合アッセイ(PerBio)で測定することにより定量した。

10

20

【 0 1 2 3 】

可溶性ポリペプチドの変性：30mgの可溶化TCR β 鎖-スーパー抗原封入体及び60mgの可溶化TCR α 鎖封入体を凍結ストックから解凍した。封入体を、6Mグアニジン溶液中5mg/mlの最終濃度に希釈し、DTT(2Mストック)を10mMの最終濃度まで添加した。混合物を37℃にて30分間インキュベートした。

【 0 1 2 4 】

可溶性TCR-スーパー抗原融合タンパク質のリフォールディング：1Lのリフォールディング緩衝液を5 $\pm$ 3℃にて勢いよく攪拌した。レドックスカップル(2-メルカプトエチルアミン及びシスタミン)を約5分間加えた(それぞれ6.6mM及び3.7mMの最終濃度まで)後、変性TCR/TCR-スーパー抗原ポリペプチドを添加した。次いで、このタンパク質を、5 $\pm$ 3℃にて攪拌しながら、約5時間 $\pm$ 15分間リフォールディングさせた。

30

【 0 1 2 5 】

リフォールディングした可溶性TCR-スーパー抗原融合タンパク質の透析：リフォールディングしたTCR-スーパー抗原融合タンパク質を、Spectrapor 1メンブレン(Spectrum；製品番号132670)において、10Lの10mM Tris(pH8.1)に対して、5 $\pm$ 3℃にて18~20時間透析した。その後、透析緩衝液を新鮮な10mM Tris(pH8.1)(10L)に交換し、透析を5 $\pm$ 3℃にて更に20~22時間続けた。

【 0 1 2 6 】

実施例 4 - 特異pMHCへのTCR-スーパー抗原融合タンパク質の結合のBIAcore表面プラズモン共鳴特徴付け

40

表面プラズモン共鳴バイオセンサ(BIAcore 3000TM)を使用して、同族ペプチド-MHCリガンドへのTCR-スーパー抗原融合タンパク質の結合を分析した。これは、半配向様式(semi-oriented fashion)でストレプトアビジン被覆結合表面に固定した単一pMHC複合体(下記で説明)を作製し、同時に4つまでの異なるpMHC(別個のフローセルに固定)へのTCR-スーパー抗原融合タンパク質の結合の効率的な試験を可能にすることにより容易となった。HLA複合体の手動での注入により、正確なレベルの固定化クラスI分子を容易に操作することが可能となった。

【 0 1 2 7 】

この固定化複合体は、T細胞レセプター及びコレセプターCD8 $\alpha\alpha$ (共に可溶相に注入さ

50

れ得る)の両方に結合することができる。TCR-スーパー抗原融合タンパク質の特異的結合は低濃度(少なくとも40 µg/ml)でさえ得られ、このことはTCR-スーパー抗原融合タンパク質が比較的安定であることを示唆する。

【0128】

ビオチン化クラス I HLA-A2 - ペプチド複合体を、構成サブユニットタンパク質及び合成ペプチドを含有する細菌発現封入体から、インビトロでリフォールディングさせ、続いて精製し、インビトロにて酵素でビオチン化した(O'Callaghanら(1999) Anal. Biochem. 266: 9-15)。そのタンパク質の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインと置換したC末端ビオチン化タグを有するHLA - 重鎖を適切な構築物中で発現させた。~75mg/リットル細菌培養物の封入体発現レベルが得られた。HLA - 軽鎖又はβ2-ミクログロブリンもまた、E.coli

10

【0129】

E. coli細胞を溶解し、封入体を約80%純度まで精製した。封入体からのタンパク質を6 Mのグアニジン-HCl、50mMのTris(pH8.1)、100mMのNaCl、10mMのDTT、10mMのEDTA中で変性させ、5 より低いリフォールディング緩衝液中に変性タンパク質の単一パルス(single pulse of denatured protein)を添加することにより、0.4 MのL-アルギニン-HCl、100mMのTris(pH8.1)、3.7mMのシスタミン、mMのシステアミン、4 mg/mlのペプチド(例えば、Tax 11-19)中で30mg/リットルの重鎖、30mg/リットルのβ2mの濃度にてリフォールディングさせた。リフォールディングは、4 にて少なくとも1時間で完了に到達させた。

【0130】

緩衝液を、10容量の10mM Tris(pH8.1)での透析により交換した。溶液のイオン強度を十分に減少させるために、2回の緩衝液交換が必要であった。次いで、タンパク質溶液を1.5 µm酢酸セルロースフィルターに通して濾過し、POROS 50HQアニオン交換カラム(8ml床容量)に充填した。タンパク質を0~500mMのNaCl線形勾配で溶出させた。HLA-A2 - ペプチド複合体は約250mM NaClで溶出した。ピーク画分を収集し、プロテアーゼインヒビターのカクテル(Calbiochem)を加え、画分を氷上で冷却した。

20

【0131】

ビオチン化タグを付したHLA複合体を、10mM Tris(pH8.1)、5 mM NaCl中に、同じ緩衝液中で平衡化したPharmacia迅速脱塩カラムを使用して移して緩衝液を交換した。溶出に際して即座に、タンパク質含有画分を氷上で冷却し、プロテアーゼインヒビターカクテル(Calbiochem)を加えた。次いで、ビオチン化試薬を加えた：1 mMビオチン、5 mM ATP(pH 8に緩衝化)、7.5mM MgCl₂及び5 µg/ml BirA酵素(O'Callaghanら(1999) Anal. Biochem. 266: 9-15に従って精製)。次いで、混合物を室温にて一晚インキュベートした。

30

【0132】

ゲル濾過クロマトグラフィーを使用してビオチン化HLA複合体を精製した。Pharmacia Superdex 75 HR 10/30カラムを濾過PBSで予め平衡化し、1mlのビオチン化反応混合物を充填し、カラムをPBSで0.5ml/分にて展開した。ビオチン化HLA複合体は、約15mlで単一ピークとして溶出した。タンパク質を含む画分をプールし、氷上で冷却し、プロテアーゼインヒビターカクテルを加えた。クーマシー結合アッセイ(PerBio)を使用してタンパク質濃度を測定し、ビオチン化HLA複合体のアリコートをして-20 で凍結保存した。標準的なアミンカップリング法によりストレプトアビジンを固定化した。

40

【0133】

TCR-スーパー抗原融合タンパク質とその同族MHC複合体又は無関係のHLA - ペプチド組合せ(これらの製造は上記で説明)との間の相互作用を、BIAcore 3000™表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサで分析した。SPRは、レセプターリガンド相互作用を検出しその親和性及び動力学的パラメータを分析するために使用することができる原理である、小さなフローセル内のセンサ表面近くでの屈折率の変化(応答単位(RU)で表示)を測定する。β2mに架橋したビオチンとフローセルの活性化表面に化学的に架橋されているストレプトアビジンとの間の結合を介して、個々のHLA - ペプチド複合体を別個のフローセルに固定化することにより、プローブフローセルを準備した。次いで、異なるフローセルの表面上にTCR-ス

50

ーパー抗原融合タンパク質を一定流速で通過させ、そうしている間のSPR応答を測定することにより、アッセイを実施した。最初に、TCR-スーパー抗原融合タンパク質を5 μ l/分の一定流速で2つの異なる表面(一方は~5000RUの特異ペプチド-HLA複合体を被覆し、2つめは~5000RUの非特異ペプチド-HLA複合体を被覆)上を通過させることにより、相互作用の特異性を検証した。ペプチド-HLA複合体上に一定流速で異なる濃度の可溶性TCR-スーパー抗原融合タンパク質を注入してバックグラウンドの共鳴を規定した。これらコントロールの測定値を、特異ペプチド-HLA複合体を用いて得られた値から減算し、これを使用して解離定数Kdとして表される結合親和性を算出した(Price及びDwek、Principles及びProblems in Physical Chemistry for Biochemists(第2版)1979, Clarendon Press、Oxford)。

10

【0134】

実施例5 - 高親和性TCR-SEA E-120融合タンパク質媒介性細胞溶解のインビトロ細胞アッセイ

エフェクター細胞の作製

0日目に、6ウェルプレート(Nunc)における8mlのR10培地中のバフィーコートから単離した 2×10^7 のPBMCを、10ng/mlの野生型SEA及び25 μ lのIL-7(2 μ g/ml)で刺激した。次いで、培養物を37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にてインキュベートした。4日目、20ユニット/mlのIL-2をこれら培養物に加えた。

【0135】

7日目、SEA刺激細胞を、Taxペプチド(LLFGPVYV)(配列番号:7)をコードするミニ遺伝子でトランスフェクトした 1×10^6 の照射J82ガン細胞で再度刺激した。1 μ g/mlの高親和性Tax TCR-SEA E-120及び20ユニット/mlのIL-2もまたこの時点で培養物に加えた。11日目、20ユニット/mlのIL-2をこれら培養物に加えた。

20

【0136】

インビトロ細胞溶解アッセイ

14日目、50 μ lのR10培地中5000標的細胞/ウェル(PP-LCL細胞、EBV形質転換B細胞株の1つ)(1×10^{-6} M Taxペプチド又はコントロールウェルについては 1×10^{-6} Mの無関係のFluペプチド、及びユーロピウム/DELFIAアッセイキット(Perkin Elmer)で供給される指示書により指示されているように3 μ lのBATDA試薬(1×10^6 細胞でパルスした)を、96ウェルプレート(Nunc)に配置した。10 μ g/mlの抗MHCクラスII抗体を追加的に含む更なるコントロールウェルもまた準備した。

30

【0137】

次いで、以下を上記標的細胞培養物に添加した:

50 μ lのR10培地中の、上記のように調製した 2.25×10^5 のエフェクター細胞(45:1のエフェクター:標的比を得るため)

50 μ lのR10培地中の、一連の濃度(2×10^{-11} M ~ 2×10^{-6} M)の高親和性Tax TCR-SEA E-120融合タンパク質。

【0138】

次いで、これら培養物を37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にて2時間インキュベートした。次いで、20 μ lの上清を各ウェルから取り出し、黒色不透明の96ウェルプレート(Nunc)中に配置した。次いで、ユーロピウム/DELFIAアッセイキットの200 μ lのユーロピウム溶液を各ウェルに加え、生じた標的細胞溶解のレベルを、Wallac Victor 2(Perkin Elmer)中での時間分解蛍光によりアッセイした。

40

【0139】

計算:

$$\% \text{細胞溶解} = 100 \times (\text{RFU}_{\text{Exp}} - \text{RFU}_{\text{Spont}}) / (\text{RFU}_{\text{Max}} - \text{RFU}_{\text{Spont}})$$

式中:

RFUは、相対蛍光単位であり、

RFU_{Exp}は、(サンプルウェル中で測定したRFU) - (細胞フリーのバックグラウンドRFU)である

50

$RFU_{S_{pont}}$ は、(エフェクター細胞を含有しないサンプルウェル中で測定したRFU) - (細胞フリーのバックグランドRFU)である

RFU_{Max} は、(triton x-100を添加したサンプルウェル中で測定したRFU) - (細胞フリーのバックグランドRFU)である。

【0140】

結果

0.2~0.3nMのEC50及び2nMでの最大殺傷(ほぼ100%)を有する、高親和性Tax TCR-SEA E-120融合体媒介性の特異的殺傷が証明された(図15を参照)。

【0141】

実施例6 - 高親和性Tax TCR-SEA E-120融合タンパク質媒介性細胞溶解の更なるインビトロ細胞のアッセイ

10

エフェクター細胞作製

0日目に、6ウェルプレート(Nunc)における8mlのR10培地中の同族ペプチド(1×10^{-5} M)でパルスしたパフィーコートから単離した 2×10^7 のPBMCを、 $1 \mu\text{g/ml}$ のTax TCR-L2-SEA E-120及び25 μl のIL-7($2 \mu\text{g/ml}$)で刺激した。次いで、培養物を37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂にてインキュベートした。3日目、20ユニット/mlのIL-2をこれら培養物に加えた。

【0142】

7日目、Tax TCR-L2-SEA-E120刺激細胞を、Taxペプチド(LLFGPVYV)(配列番号:7)をコードするミニ遺伝子でトランスフェクトした 3×10^6 の照射J82ガン細胞で再度刺激した。 $1 \mu\text{g/ml}$ の高親和性Tax TCR-SEA E-120及び20ユニット/mlのIL-2もまたこの時点で培養物に加えた。11日目、20ユニット/mlのIL-2をこれら培養物に加えた。

20

【0143】

インビトロ細胞溶解アッセイ

14日目、50 μl のR10培地中2500標的細胞/ウェル(T2細胞、T-B細胞ハイブリドーマ株の1つ)(一連($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-10}$ M)の同族ペプチド又はコントロールウェルについては 1×10^{-6} Mの無関係のFluペプチド、及びユーロピウム/DELFLIAアッセイキット(Perkin Elmer)で供給される指示書により指示されているように3 μl のBATDA試薬/ 1×10^6 細胞でパルスした)を、96ウェルプレート(Nunc)に配置した。

【0144】

次いで、以下を上記標的細胞培養物に添加した:

30

50 μl のR10培地中の、上記のように調製した 5×10^4 のエフェクター細胞(20:1のエフェクター:標的比を得るため)

50 μl のR10培地中の、一連の濃度(2×10^{-11} M ~ 2×10^{-6} M)の高親和性Tax TCR-SEA E-120融合タンパク質。

【0145】

次いで、これら培養物を37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂にて2時間インキュベートした。次いで、20 μl の上清を各ウェルから取り出し、黒色不透明の96ウェルプレート(Nunc)中に配置した。次いで、ユーロピウム/DELFLIAアッセイキットの200 μl のユーロピウム溶液を各ウェルに加え、生じた標的細胞溶解のレベルを、Wallac Victor 2(Perkin Elmer)中での時間分解蛍光によりアッセイした。

40

【0146】

計算:

上記実施例5のとおり。

結果

T2標的細胞を用いて初期実験を行い、Taxペプチドパルス濃度($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ M)及び高親和性Tax TCR-L2-SEA E-120濃度($6.4 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-7}$ M)での滴定の効果を調べた。最大80~90%細胞溶解が得られた(図16を参照)。

【0147】

固定濃度(10^{-6} M)のTaxペプチド又は無関係のテロメラゼペプチド(ILAKFLHWL)コントロールを使用して上記の実験を繰り返した。同族Taxペプチドを使用して最大80~90%細

50

胞溶解が得られたのに対し、無関係のペプチドを使用しては約20%の細胞溶解が得られた(図17を参照)。

【0148】

全て2 nMの濃度で供給した多くのTCR-スーパー抗原融合体(Tax TCR-L2-SEA E120、テロメラーゼTCR-L1-SEA E120及びNY-ESO TCR-LM1-SEA E120)の細胞殺傷能力を、 10^{-6} Mの同族ペプチド又は無関係のペプチドでパルスしたT2標的細胞に対して、一連のエフェクター：標的(E:T)細胞比で上記のアッセイを用いて試験した。

【0149】

導入システインを含有する高親和性NY-ESO TCR α 鎖のDNA配列及びアミノ酸配列を、図18a及び18bにそれぞれ詳述する。SEA E-120に融合された、導入システインを含有する切断型高親和性NY-ESO TCR β 鎖のDNA配列及びアミノ酸配列を図19a及び19bにそれぞれ詳述する。切断型NY-ESO TCR β 鎖は、「正常な」可溶性TCRと比較して、C末端から最後の3アミノ酸(RAD)が除去されている。図19aにおいて切断型TCR β 鎖のDNA配列中の最後のグリシン残基をコードするコドンに下線を付し、図19bにおいて対応するグリシン残基に下線を付した。

10

【0150】

得られた最大溶解は、Tax TCR-L2-SEA E120融合タンパク質、テロメラーゼTCR-L1-SEA E120融合タンパク質及びNY-ESO TCR-LM1-SEA E120融合タンパク質についてそれぞれ約50%、約75%及び約100%であった(それぞれ図20a~20cを参照)。

【0151】

20

共に2 nMの濃度で供給した2つの異なるTCR-スーパー抗原融合体(Tax TCR-L2-SEA E120及びテロメラーゼTCR-L1-SEA E120)の細胞殺傷能力を、これらTCR-スーパー抗原融合体の1つについての同族ペプチド 10^{-6} MでパルスしたT2標的細胞に対して、一連のエフェクター：標的(E:T)細胞比で上記のアッセイを用いて試験した。得られた最大溶解は、Tax TCR-L2-SEA E120融合タンパク質及びテロメラーゼTCR-L1-SEA E120融合タンパク質についてそれぞれ約65%及び約75%であった(それぞれ図21a及び21bを参照)。

【0152】

共に2 nMの濃度で供給したTax TCR-L2-SEA E120融合タンパク質及びテロメラーゼTCR-L1-SEA E120融合タンパク質の細胞殺傷能力を、 10^{-6} MのTaxペプチドでパルスしたSK-Mel 37腫瘍細胞株標的細胞に対して、一連のエフェクター：標的(E:T)細胞比で上記のアッセイを用いて試験した。得られた最大溶解は、同族Tax TCR-L2-SEA E120融合タンパク質を用いて約35~40%であったのに対し、テロメラーゼTCR-L1-SEA E120融合タンパク質については約10%であった(図22を参照)。

30

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図1】図1a及び1bはそれぞれ、システインコドンが導入されるように変異させた可溶性A6 (Tax) TCRの α 鎖及び β 鎖の核酸配列を示す。影付きは、 α 鎖核酸中の導入システインコドン及び導入BamH1制限部位を示す。

【図2】図2aは、新規なジスルフィド鎖間結合を作製するために使用する $T_{48} \rightarrow C$ 変異(下線)を含むA6 (Tax) TCR α 鎖細胞外アミノ酸配列を示す。図2bは、新規なジスルフィド鎖間結合を作製するために使用する $S_{57} \rightarrow C$ 変異(下線)を含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列を示す。

40

【図3】図3a及び3bは、非天然型ジスルフィド結合を形成するための追加のシステイン残基を含むように変異させたJM22 TCRの α 鎖及び β 鎖のDNA配列を示す。

【図4】図4a及び4bはそれぞれ、図3a及び3bのDNA配列から作製したJM22 TCR α 鎖及び β 鎖の細胞外アミノ酸配列を示す。

【図5】図5a及び5bは、非天然型ジスルフィド結合を形成するための追加のシステイン残基を含むように変異させたA6 (Tax) TCR β 鎖の高親和性変形体のDNA配列及びアミノ酸配列を示す。導入したシステインコドンは影付きで示し、親和性増大変異は太字で示している。

50

【図 6】図6a及び6bは、非天然型ジスルフィド結合を形成するための追加のシステイン残基を含むように変異させたテロメラーゼTCRの高親和性変形体の α 鎖及び β 鎖のDNA配列を示す。導入システインは影付きで示している；

【図 7】図7a及び7bはそれぞれ、図6a及び6bのDNA配列から作製したテロメラーゼTCR α 鎖及び β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体を示す。

【図 8】図8aは野生型SEA-EのDNA配列を示し、図8bは野生型SEA-Eのアミノ酸配列を示す。

【図 9】図9aは変異体スーパー抗原SEA-E120のDNA配列を示し、図9bは変異体スーパー抗原SEA-E120のアミノ酸配列を示す。変異アミノ酸は影付きで示している。

【図 10 a】図10aは、Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列を示す。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

10

【図 10 b】図10bは、Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列を示す。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

【図 11 a】図11aは、Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列を示す。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

20

【図 11 b】図11bは、Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むA6 (Tax) TCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列を示す。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

【図 12 a】図12aは、Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するテロメラーゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列を示す。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

30

【図 12 b】図12bは、Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介して野生型SEA Eスーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むテロメラーゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列を示す。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

【図 13 a】図13aは、Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインを含有するテロメラーゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のDNA配列を示す。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-ProリンカーをコードするDNA配列には下線を付した。

40

【図 13 b】図13bは、Gly-Ser-Gly-Gly-Pro(配列番号：2)リンカーを介してSEA E120スーパー抗原に連結している、新規な鎖間結合の形成に關与する非天然型システインコドンを含むテロメラーゼTCR β 鎖細胞外アミノ酸配列の高親和性変形体のアミノ酸配列を示す。導入システインは影付きで示されている。Gly-Ser-Gly-Gly-Proリンカーには下線を付した。

【図 14 - 1】図14はPEX821プラスミドのDNA配列を詳述する。

50

【図 1 4 - 2】図14-1の続きである。

【図 1 5】図15は、高親和性A6 (Tax) TCR-SEA-E120スーパー抗原融合タンパク質を使用するAPCのペプチド-MHC特異的なCTL媒介性殺傷を示す。

【図 1 6】図16は、T2細胞の殺傷に対するTaxペプチドパルス滴定濃度 ($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$ M) 及び高親和性Tax TCR-L2-SEA E-120滴定濃度 ($6.4 \times 10^{-13} \sim 1 \times 10^{-7}$ M) の効果を示す。

【図 1 7】図17は、固定濃度 (10^{-6} M) のTaxペプチド又は無関係のテロメラゼペプチド (ILAKFLHWL) コントロールを用いる高親和性Tax TCR-L2-SEA E-120融合タンパク質により誘発されるT2細胞殺傷を示す。

【図 1 8】図18a及び18bはそれぞれ、導入システインを含有する高親和性NY-ESO TCR α 鎖のDNA配列及びアミノ酸配列を詳述する。 10

【図 1 9】図19a及び19bはそれぞれ、SEA E-120に融合された、導入システインを含有する切断型高親和性NY-ESO TCR β 鎖のDNA配列及びアミノ酸配列を詳述する。図19aでは切断型TCR β 鎖のDNA配列中の最後のグリシン残基をコードするコドンに下線を付し、図19bでは対応するグリシン残基に下線を付した。

【図 2 0】図20a～20cはそれぞれ、多くのTCR-スーパー抗原融合体、Tax TCR-L2-SEA E120、テロメラゼTCR-L1-SEA E120及びNY-ESO TCR-LM1-SEA E120のT2細胞殺傷能力を示す。

【図 2 1】図21a及び21bは、共に 2 nMの濃度で供給した 2 つの異なるTCR-スーパー抗原融合体 (それぞれTax TCR-L2-SEA E120及びテロメラゼTCR-L1-SEA E120) のT2標的細胞殺傷能力を示す。 20

【図 2 2】図22は、共に 2 nMの濃度で供給したTax TCR-L2-SEA E120及びテロメラゼTCR-L1-SEA E120融合タンパク質のSK-Mel 37腫瘍細胞株殺傷能力を示す。

【図 2 3】図23は、pEX821ベクターのプラスミドマップを提供する。

【図 2 4 - 1】図24は、pEX954ベクターのDNA配列を詳述する。

【図 2 4 - 2】図24-1の続きである。

【図 2 5】図25は、pEX954ベクターのプラスミドマップを提供する。

【図 1】

(a)

atgcagaaaggaaagtggagcagaactctggagccctcagtggtccagagggagacatt
ggctctctcaactgcactctcagtggaagggttccaggtccctctctcggtaacaga
caatattctgggaaagacccctggagttgaatgtccatatactccaatggtagacaaa
gaagatggaaaggtttacagcagacagctcaataaagccagccagatgtgtttctcgtctc
atcagagacactccagccaggtgatttcagccacactacctctgtgcgtgtacaactgac
agctgggggaaattgcagtttggagcagggagccaggttgttggtcaccocagatatac
cagaacccctgactcgcgtgtaccagctgagagacactcaataccagtgacaaggtctc
gtctgctctattccagcagattttgattctcaacaacatgtgtcacaagtaaggattct
gatgtgtatattcagagacaaaagggtgtgtagacatgaggtcttatggacttcaagagc
aacagtgctgtggctggagcacaacatctgacttgcattgtcgaacgccttcaac
aacagcattattccagaagaacactctctccccagccagaaaagttctctaa

(配列番号: 8)

(b)

atgaacgctgggtgtcactcagaccccaaatccaggtcctgaagacaggacagagc
atgacactgcagtggtgccaggatatgaacctgaatacatgtctcgtgtatcgcacaa
gaaccagcagctggggctggagctggtcttactatcagttggtgcgtgtatcactgac
caagggaaggtccccaatgggtacaactgctccagatcaaccacagagagatttccgc
ctcaggtctgtgtcgtgctgctccctccagacatctgtgtacttctgtgcagcagg
ccgggactagcgggagggcgacacagagcagctactctggggccgggacccaggtcagc
gtccacagagagacctgaaaaaacgtggtccacacccagaggtcgcgtgtgttggagccatca
gaagcagagatctctccacaccccaaaaggccacactggtgtgctcgtggccacaggctctc
taaccgcacacagctggagctgagctgggtgggtgaatggggaaggaggtgcacagtgagc
gtctgggacagaccccgagccctcaaggagagcgcgcgcctcaatgactccagatcac
gctctgcagcagcgcgcctgaggggtctcaggccacactctcggaggaaccccccgaacac
ttccgctgtccaagtccagttctcaccgggctctcggagaatgacagagtggaacaaaggat
agggcacaacccgctcaccacagctcgtcagcgcgcagggcctggggtagagcagactaa

(配列番号: 9)

【図 4】

(a)

M Q L L E Q S F Q F L S I Q E G E N L T V Y C N S S S V F
S S L Q W Y R Q E P G E G P V L L V T V V T G G E V K K L
K R L T F Q P Q D A R K D S S L H I T A A Q P G D T G L Y
L C A G A Q S G N L I F G K G K L S V K P N I Q N P D
P A V Y Q L H D S K S D K S V C T F T D P D S Q T N V S
Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S N D F K S N S A V A
W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P P R S
S

(配列番号: 14)

(b)

M V D G G I T Q S F K Y L F R K E G Q N V T L S C E Q K L
N H D A M Y M Y R Q D P G Q G L R L I Y S Q I V N D F Q
K O D I A S O Y S V S R E K K E S P L T V T V T S A Q K N P
C A F V L C A S S S R S S Y E Q Y F P G T R L T V T E D
L K N V F P F R V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C
L A T G F Y P D H V E L S W Y N X E Z V H S G V C T D P
Q P L K B O P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q N
P R N S F R C Q V G F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T
Q I V S A E A W G R A D

(配列番号: 15)

【図 5】

(a)

atgaacgctgggtgtcactcagaccccaaatccaggtcctgaagacaggacagagc
atgacactgcagtggtgccaggatatgaacctgaatacatgtctcgttatcgcacaa
gaaccagcagctggggctgaggtgtacttacttactcagttggtgctgttatcactgac
caaggagaaggtccccaatgggtctcaatgtctccagatcaacacacagagatttccgc
ctcaggtctgtgtcggctgtcctccacagacatctgtgtactctgtgtcctcagagc
ccggggctgtgtagtgccggaacacagacagctactcgggcgggacacaggtcacg
gtcacagagagacctgaaaaacgtgttccacacccaggtgcgtgtgtttgagccatca
gaagcagagatctctccacaccccaaaaggccacactggtgtgctcgtgaccccggttctc
taaccgcgacacagctggagctgagctgggtgggtgaatggggaaggaggtgcacagtgagg
gtctgggacagaccccgagccctcgaaggagagcgcgcgcctcaatgactccagatcac
gctctgagcagcgcgcctgaggggtctcgggcacactctcagagagaccccccgaacac
ttccgctgtcagatccagttctcaggggtctcggagaatgacagatggacccaggtat
agggcacaacccgctcaccacagatcgtcagcgcgcagggcctggggtagagcagactaa

(配列番号: 16)

(b)

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
S V Y F C A S R P G L M S A Q P E O Y F G P G T R L T V T
E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L
V C L A T G F Y P D H V E L S W Y N X E Z V H S G V C T D P
D P Q P L X E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W
Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P
V T Q I V S A E A W G R A D

(配列番号: 17)

【図 2】

(a)

M Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D R
G S Q S F F W Y R Q Y S G K S F E L I M S I Y S N G D K E
J G R F T A Q L Z K A S Q Y V S J L I R D S Q P S D S A T
Y L C A V T D S W Q X L Q F G A G T Q V V T P D I Q N
P D P A V Y Q L R D S K S D K S V C L F T D F D S Q T N
V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S N D F K S N S A
V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P
E S S

(配列番号: 10)

(b)

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
S V Y F C A S R P G L M S A Q P E O Y F G P G T R L T V T
E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L
V C L A T G F Y P D H V E L S W Y N X E Z V H S G V C T D
D P Q P L X E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W
Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P
V T Q I V S A E A W G R A D

(配列番号: 11)

【図 3】

(a)

atgcactactagaacaaagtccctcagtttcttaagcatccaaaggagggaacactctc
actgtgtactgcacactcccaagtgttttctccagcttacaatggtacagacaggag
cctggggaaaggtccctgctcctcgtggtgacagtagttacgggtggagaagtgaagaag
ctgaaggagactaaccttccagtttggtgtgacgaagaaggacagttctctccacatc
actgcggccagccttggtgatacagggtctaacctctgtgcgggaggggaagcaaa
ggaaaactctctctgggaaggagcactaaactctctgttlaaaccaatattccagagc
ccggatcctcgcgtgtaccagctgagagaotctaaatccagtgacaaagtctgtctgc
ctattccacagatttttgattctccaacaaatgtgtccaagaatgaagatttctgtgtg
tatattccagacaaatgtgtgtacagatcagaggtctatggactccaagagcagag
gctgtgtgcggaggaacaaatctgacttctgcatgtgcaaacgccttccaacacagc
attattccagagagacacactctctccagcccggaaggattctctaa

(配列番号: 12)

(b)

atgggtggatgggtggaatcactcagttcccaaaagtacotgttccagaagggaaggacag
aattgtgacotcagttgtggaacagaatttgaacacagatgacatgtactggttacoga
caggacccagggccaagggtcgagattgtactctactcactcagagatgttaattgacttt
cagaaggagatatagotggaagggtacagcgtctctcggggaaggaaggaaatccttt
ctctcactgtgacatctgggcccacaaagaaacccgacagcttctctactctgtgcaggt
agttccagagagactctccagagatgacttccgggcgggcccagggccacaggtccacaa
gaggaactgaacaaagctgttccaccccgaggtcgtgtgtttgagccacacagagca
gagatctccacacacccaaaggccacactggtgtgctcgtggccacaggtcttctaccc
gaaccagctggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtgagggtctgc
acagacccgcagcgcctccacaggagacagccgcgcctccaaatgactccagatatacagcctg
agcagccgcctgagggtctcgggcacactctcgggcagaaaccccccgaacacacttccgc
tgtcaagtccagttctcaggggtctcgggagaaatgacagagtggaacccaggtatggggc
aaactcgtcaccacagatctgcagcgcagaggtctggggtagagcagactaa

(配列番号: 13)

【図 6】

(a)

atgggaatacaagtgaggcagaggtcctccagacctgattctccagggaaggagccaat
tccacgctgggtgtgcaattttctgactctgtggaacaaatttgacgtgtgttctcaacaa
aacctctggggacagactctcaacactgttttaacttccctcagggaacaaacagaaat
ggaaagataagcgcgcacagctgctgcgtacgggaacgtcacagctattgtacattctcc
tctccacagacacagactcaggcgtttattctctgtcgtgagctctgtacacggc
ctgcgtatgggtgaacactttggaacaggccacaggttgaaaggttttgagaaatctcc
cagacaccttgacccctgcgtgtacacagctgagagactctaaatccaggtgacaaggt
gctcgtctattccagattttgattctcaacaaatgtgtccaagaatgaagattctc
gaggtgttatatccacagacaaatgtgtgtcagacatgaggtctatgtgactccaagagc
aacagtgctgtggtcgtggagacacaaatctgactttgcatgtgcaaacgcctccaac
aacagccttatttccagaagacacacttcttccccagcccggaaggattctctaa

(配列番号: 18)

(b)

atgaatgctgggtgtcacccagaccccaaatccaggtcctgaagacagggaacagagc
atgacactgcagtggtgtgcggagatgacacacagatgactcagttggtgtcactcagcag
gaaccagcagctggggctgaggtgagttacatctcagttcagttggtgtcactcagcag
caagggaagatccccaatgctacaaatgtctccagatcaaacacagagagatttccgc
ctcagcgtgctgtcgtcgtcgtcctccacagacatctgtgtactctgtgggtatcag
cctcagggtcactgaagcttctttgggaacagggaacagacacagctgttagagagac
ctgaacaaaggtgttccacacccaggtgcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatc
tccacaccccaaaaggccacacactggtgtgtcgtggtccacccggtttctcaccgcagacac
gtgaggtcaggtgtggtgtgaaatgggaaggaggtgacagctgggggtgtccacagc
ccgcagccctccaagggaagacccgcctccaatgactccagatgaagctctgagcagc
cgctcaggggtctcgggcacacttctggcaggaaccccccgaacacacttccgctgtcaca
gtccagattctcaggggtctcgggaagatgacagatgggaacacaggtatgggccaacaccc
gtcaccagatcgtcagcgcgcaggtcctgggttagagcagactaa

(配列番号: 19)

【図 7】

(a)

M G I Q V E Q S F P D L I L Q E G A N S T L R C N F S D S
V N N L Q W F H Q N P W G Q L I N L F Y I P S G T K Q N G
R L S A T T V A T E R Y S L L L Y I S S S Q L T D S G V Y F
C A V D S A T A L F Y Q Y I F G T G T R L K V L A N Y Q N
P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N
V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S N D F K S N S A
V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P
E S S

(配列番号: 20)

(b)

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
S V Y F C A S R P G L M S A Q P E O Y F G P G T R L T V T
E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A
V C L A T G F Y P D H V E L S W Y N X E Z V H S G V C T D P
L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q D P R
N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q I
V S A E A W G R A D

(配列番号: 21)

【 図 8 】

(a)

```

agcgagaaagcgagaaataaatgaaaaagattttcgaaaaagtcctgaattgcgag
ggaaagctttgaggaagcttaacaaactcttatataaagagaaataaagag
gaaaaataaagagagtcacgaatcaatttttaacagatcaactatattgttttaaggcttt
tttaacagatcaattcgtggtataaagctttattatagatattttgatctaaaggaatt
gttgataaataataaaggaataaagtagactgttagtggtgtctattatgttatca
tgtgcggggtgttacaccaaacaacaaagcgtgtgatgtatgtggtgtaacggttacat
gataataatcagattgacccgaagagaaaaagtgccgatcaatttatggctagacggt
aaacaaataacagctacctttggaaacggttaaaacgaataaagaaataatgtacgtgtt
caggagtgagcttccagagagagcgtttattacaggaataataataatttatataac
tcctgaggttttttgatgggaaggttcagaggggattaaacggtgttttcaacttca
gaacgttcgtttaattacgattatttttggtgtccaaagacagtatccaatacacta
ttaagaaatataagagataataaaacgattaaactctgaaacacatgcataattgatata
tatttatatacagtttaa
(配列番号:22)

```

(b)

```

S E K S E B I N B K D L R K K S E L Q G T A L G N L K Q I
Y Y Y N E K A K T E N K E S H D Q F L Q H C I L P K G F F
T D H S W Y N D L L V D F D S K D I V D K Y K G K K V D L
Y G A Y Y G Y Q C A G G T F N K T A C M Y G G V T L H D N
N R L T E S K K V P I N L W I D G K Q N T V N L S T V K T
N K R N V T V Q R L D L Q A R Y L Q E K Y N L N S D V
F D G K V Q R G L I V F H T S T E S V N Y D L F G A Q G
Q Y S N T L L R I Y R D N K T I N S E N M H I D I Y L Y T
S
(配列番号:6)

```

【 図 9 】

(a)

```

atgtccggagaaagtcggaagaaataaatgaaaagattctgcgaanaaagtcctgagctc
caagggtaccgctcaggcaatctcttaagcaaatcttatattatataagcaaaagctata
actgacgcggaanaaggtgcgggtacagttttcccggaatactcttgatatttaaggtt
tttttccacaggtccatccatggtataacgacttaactagtgagatctcttggttcaacggg
gctactagcgaatctgaaagggttagtgatgattatattggtgtctattatggatata
caatgtgtctggaggccaccccaataaataacagacgtatgtacgggggtgtaacattca
catgataataactcagatgacccgagagaaagagtaacccaataaactctggtatagac
gggaanaaaactacagtaacctatagataaagtttaaacaggaanaaagagtagaact
gttccagaagctagacccctcaggcgcgcaattatttacaacggaataattggttttat
aaactcagacagcttttgccggttaagggtgcaagagaggtctgattggttttcaattctc
gaagggttccacggttaagttatgatctgtttgatgtccaaagggcacaataccagataca
ctctcccggtcttaacagagataataacacattttcgtctacggagctcagcattagc
ctgtattctgtacacaacttaa
(配列番号:23)

```

(b)

```

M S E K S S E I N B K D L R K K S E L Q G T A L G N L K Q Q
I Y Y Y N N K A A T T T S S S S S S S S S S S S S S S S S S
P T D H S W Y N D L L V D F D S K D I V D K Y K G K K V D L
L Y G A Y Y G Y Q C A G G T F N K T A C M Y G G V T L H D N
T D H S W Y N D L L V D F D S K D I V D K Y K G K K V D L
F D G K V Q R G L I V F H T S T E S V N Y D L F G A Q G
Q Y S N T L L R I Y R D N K T I N S E N M H I D I Y L Y T S
(配列番号:5)

```

【 図 10 b 】

(b)

```

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
H E Y M S W Y R Q D P M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
S V Y F C A S R P G L M S A Q P E S Q Y F F G P G T R L T V T
E D L K N V P P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L
V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V T
D F Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W
Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P
V T Q I V S A R A W G R A D G S G G P S E S K S E I N E K
D L R K K S E L Q G T A L G N L K Q Q Y Y Y N E K A K T E S
N K E S H D Q P L Q H T L L F K G F F T D H S W Y N D L L
V D P D S K D I V D K Y K G K V D L Y G A Y Y Q Y Q C A
G G T P N K T A C M Y G G V T L H D N N R L T E E K K V P
I N L W I D G K Q N T V P L E T V X N N K N V T V Q B L
D L Q A R R Y L Q E K Y N L Y S N D V F D G K V Q R G L I
V F H T S T S F S V N Y D L F G A Q Q Q Y S N T L L R I Y
R D N X T I N S E N M H I D I Y L Y T S * A* I
(配列番号:25)

```

【 図 11 a 】

(a)

```

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaatttccaggctcctgaagacaggaagagc
atgacactgtcagtgctgccaggatatgaaccatgatacattgtctcgggtatcgacaa
gaacccaggcatgggggtgaggtctgattcattactcagtttggtgctggtatcactgac
caagggaagaagtcctccaatgggtacaatgtctccagatcaacccacagaggaattcccg
ctcaggctgtgtgtcgggtgctctccctccagacatctgtgtactctctgtcctcgagg
ccgggggtgtatgagtcgggaacccagagcagctactctggggccgggcaacaggctcaacg
gtcacagaggaacctgaanaagctgttcccacccagggtcgtgtgtgtttgagccatca
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgtcctggccacccggtttc
taccccagacacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaaggtgcaacagtgagg
gtctgcaacagaccccgagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatac
gctctgagcagccgctcagggtctcgggcacctctctgcaggaccccccgaacccac
ttcgcgtgtcaagttccagttctcagggctctcgggagaatgacgagtggaacccaggat
agggccaaaacccctcaccagatctgttcacgcgcgagggcctggggtagagcagacgga
tcggagcgttccgtctcgagagagagagagaaataatgaanaagatctgcgaaaaaag
tctgagctccaggttacgcgccttagccaatcttaagcaaatattattatatataagc
aaagctataactagcagcgaagaagagtgccggtcagttctccacgaatactttgttta
tttaagggttttttccaggtcattccatgggtataagcacttactagtggtcttggtt
tcaacccggtcactagcgaatatgaaggagtagtgatgatactatggtgcttat
tatggatatacattgtgtctggaggccacccaataaaacagcatgttatgtacgggggt
gtacattatacatgataataatcgattgacccgaagaaaaaaagttaccattaaacttg
tggtatagacggaaaaacaaactacagtaacctatagataaagttaaaacagcaaaaaa
gaagtaactgttcaagagctagacccctcaggcgccattattttacacggaaatttt
ggtttatataactcagacagctttggcggtgaagtgcaaaagaggtctgattgtgttt
cattctctctgaagggttccaggttaagttatgattttgttgatgtccaaaggcaatat
ccagatacaattactccggattttacagagataatacacaactcttgctctacagcgctc
agcattagctgttatgtttgtaacaaacttaa
(配列番号:26)

```

【 図 10 a 】

(a)

```

atgaacgctgggtgtcactcagacccccaaaatttccaggctcctgaagacaggaagagc
atgacactgtcagtgctgccaggatatgaaccatgatacattgtctcgggtatcgacaa
gaacccaggcatgggggtgaggtctgattcattactcagtttggtgctggtatcactgac
caagggaagaagtcctccaatgggtacaatgtctccagatcaaacacagaggaattcccg
ctcaggctgtgtgtcgggtgctctccctccagacatctgtgtacttctgtgctcctcgagg
ccgggggtgtatgagtcgggaacccagagcagctactctggggccgggcaacaggctcaacg
gtcacagaggaacctgaanaagctgttcccacccagggtcgtgtgtttgagccatca
gaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgctcctggccacccggttcc
taccccagacacccgtggagctgagctggttggttgaatgggaaggaagtgacacagtggg
gtctgcaacagaccccgagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatac
gctctgagcagcgcgtctgagggtctcggccacctcttgggcaggaccccccgaacccac
ttcgcgtgtcaagttccagttctcagggctctcggagatgacgagtggaacccaggat
agggccaaaacccgtcaccagatctgcagcgcgagggctggggtagagcagacagga
tcgggctgggtccgagcgagagaaagcgaagaaataaatgaanaagatttcggaanaaag
tctgaattgcaggggaacgctttagccaatotttaacaaatattattatacaatga
aaagctaaaaactgaanaataaagagagtcacagatacaatttttaccagctactatttg
tttaagggttttttaccagatcatctggtgtataacgatttattagtagattttgat
tcaaaaggatatctgttgataaataaagggaanaaaagctagactgttatggtgtcttat
tatggtttatcaatgtgtcgggtgtgtacacccaaaacacagcttggtatgtatggtggt
gttaogttacatgataataactcgattgacccgaagagaaaaagtgccgatcaattta
tggttagcgggttaaaccaataacagtaaccttggaacgggttaaaaacgaataaagaaa
aatgtaactgttccaggagttggatcttcaagcagagcttattttacagggaanaatat
aatttatataactctgattgttttttaggggaaggttcagagggggataatogtgttt
ctactctctcagacacccctcgtgttaattacgatttatttggtgctcgaaggcagat
tcaaatatacactattaagaataatagagataataaaccagattaaactctgaacacatg
caatttgatataattatttatatacaagttaa
(配列番号:24)

```

【 図 11 b 】

(b)

```

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
H E Y M S W Y R O D P M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
S V Y F C A S R P G L M S A Q P E S Q Y F F G P G T R L T V T
E D L K N V P P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L
V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V T
D P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W
Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P
V T Q I V S A R A W G R A D G S G G P S E S K S E I N E K
D L R K K S E L Q G T A L G N L K Q I Y Y Y N S K A I T S
S E K S A D Q F L N T L L F K G F F T G H P W Y N D L L
V D L G S T A A T S E Y E S G S S V D L Y G A Y Y G Y Q C A
G G T P N K T A C M Y G G V T L H D N N R L T E E K K V P
I N L W I D G K Q T V F I D K V K T S K K E T V Q B L
D L Q A R R Y L H G K F Q L Y N S D S F G K V Q R G L I
V F H S S E G S T V S Y D L F D A Q G Q Y P D T L L R I Y
R D N T T I S S T S L S I S L Y L Y T T
(配列番号:27)

```

【図 1 2 a】

(a)

atgaatgctggtgtcactcagacccccaaattccaggctcctgaagacaggacagagc
 atgacactgcagtggtgccagatatgaacatgaatacatgtctcgtgtatcgacaa
 gaccaggatcgtgggtcaggtgtgattcattactcagtttggtgctgtatcactgac
 caaggaggaagtccccaatggctacatgtctccagatcaaacacagaggaattccgc
 ctccaggctgtgtcggctgtctccctccacagacatctgtgtactctctgggaattcag
 cctcagggtcactgaagctttctctggacaaggccaccagactcacagttgtagaggac
 ctgacacaaaggtttcccccaggtgctgtgtgtttggccatcagaagcagagabc
 tccccacccccaaaggccacactggtgtgctgtggccacgggtttctaccccagaccac
 gtggagctgagctggtggtgaattgggaagggtgtgcacagtgggtctgcacagac
 ccgcagccctccaggagcagcccgccctcaatgaactccagatacgtctctgagcagc
 cgcctgagggtctcggccacactctctggcaggacccccgcacacacttccgctgtcaa
 gtccagttctacgggtctctcggagaatgcagggtgaacccaggataggcccaaccc
 gtcacccagatcgtcagcgcagagccctgggttagagcagacaggaatccgggtccg
 agcgcagaaagcgaagaaataaactgaataagatttgcgaataaagttctgaattgcag
 ggaacagcttttagcgaactcttaaacaaactattattacaatgaataaagctaaact
 gaaataaagagagtcacgtcaattttacagcactactatattgtttaaaggcttt
 tttacagatcaattcgtgggtatacagatttatattagtagattttgattcaaaaggtatt
 gttgataaataataagggtgaaataagtagacttgtatggtgcttattatggttatcaa
 tgtgcgggtggttatcacccaaacaaacagctgttatgtatggtggtgaacgtttacat
 gataataatcagattgacccgaagagaaataaagtgccagatcaatttatggtctagcgg
 aaacaaatacagtagcttttggaaacggtttaaacaggaataagaaaaatgttaactgtt
 caggagttggagcttccacgaacagacttatttccagggaataataatttatataac
 ctctgatgtttttgatgggaaggtctcagagggttaatactcgttttctacactttotaca
 gaacccctcgggttaattacgatttatitgggtcctcaaggcagatctcaaatcaccta
 ttaagaataatataagagataataaataacgatttaactctgaaacacatgcattatgata
 tatthataatacagtttaa

(配列番号: 28)

【図 1 3 b】

(b)

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
 N E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
 G E V P N G Q Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
 S V Y F C G I Q P Q G T E A F F Q G G T R L T V V E D L N
 K V F P P E V A V F E P S S A E I S H T Q K A T L V C L A
 T G F Y P D H V E L S W M V N G K E V H S G V C T D F O P
 L K E Q P A L N D S R Y A L S R L R V S A T F M Q D P R
 N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q I
 V S A E A W G R A D G S G G P S E K S E E I N R K D L R K
 K S E L Q G T A L G N L K Q I Y Y Y N S K A I T S S K K S
 A D Q F L T N T L L F K G F F T G H P N Y N D L L V D L G
 S T A A T S E Y B G S V D L Y G A Y Y G Y Q C A G G T P
 N K T A C M Y G O V T L H D N M R L T E K K V P I N L W
 I D G K Q T T V P I D K V K T S K E V T V Q E L D L Q A
 R Y Y L H G K F G L Y N S D S F G G K V Q R G L I V F H S
 S E G S T V S Y D L F D A Q G Q Y P D T L L R I Y R D N T
 T I S S T S L S I S L Y L Y T T

(配列番号: 31)

【図 1 2 b】

(b)

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
 H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
 G E V P N G Q Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
 S V Y F C G I Q P Q G T E A F F Q G G T R L T V V E D L N
 K V F P P E V A V F E P S S A E I S H T Q K A T L V C L A
 T G F Y P D H V E L S W M V N G K E V H S G V C T D F O P
 L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q D P R
 N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q I
 V S A E A W G R A D G S G G P S E K S E E I N R K D L R K
 K S E L Q G T A L G N L K Q I Y Y Y N S K A K T E N K E S
 H D Q F L Q H T I L F K G F F T D H S W Y N D L L V D P D
 S K D L V D N Y K G K K V D L Y G A Y Y G Y Q C A G G T P
 N K T A C M Y G O V T L H D N M R L T E K K V P I N L W
 L D G K Q N T V P L E T V K T N K K X V T V Q E L D L Q A
 R R Y L Q E X Y N L Y N S D V F D G X V Q R G L I V F H T
 S T E P S V N Y D L F G A Q G Q Y S N T L L R I Y R D N X
 T I N S E N M H I D I Y L Y T

(配列番号: 29)

【図 1 3 a】

(a)

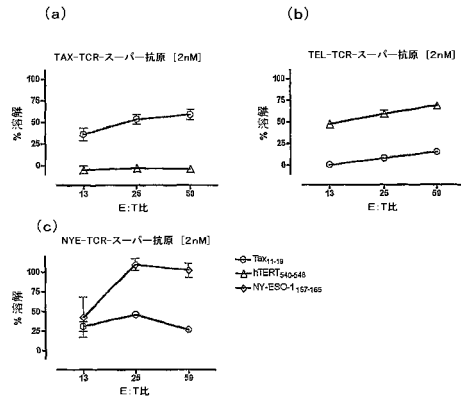
atgaatgctggtgtcactcagacccccaaattccaggctcctgaagacaggacagagc
 atgacactgcagtggtgccagatatgaacatgaatacatgtctcgtgtatcgacaa
 gaccaggatcgtgggtcaggtgtgattcattactcagtttggtgctgtatcactgac
 caaggaggaagtccccaatggctacatgtctccagatcaaacacagaggaattccgc
 ctccaggctgtgtcggctgtctccctccacagacatctgtgtactctctgggaattcag
 cctcagggtcactgaagctttctctggacaaggccaccagactcacagttgttagaggac
 ctgacacaaaggtgttccccacgggtgctgtgtttgagccatcagaagcagagatc
 tccccacccccaaaggccacactgggtgtgctgtggccacgggtttctaccccagaccac
 gtggagctgagctggtggtgaattgggaagggtgtgcacagtgggtctgcacagac
 ccgcagccctccaggagcagcccgccctcaatgaactccagatacgtctctgagcagc
 cgcctgagggtctcggccacactctctggcaggacccccgcacacacttccgctgtcaa
 gtccagttctacgggtctctcggagaatgcagggtggaacccaggataggcccaaccc
 gtcacccagatcgtcagcgcagagccctgggttagagcagacaggaatccgggtccg
 agcgcagaaagcgaagaaataaactgaataagatttgcgaataaagttctgaattgcag
 ggaacagcttttagcgaactcttaaacaaactattattacaatgaataaagctaaact
 gaaataaagagagtcacgtcaattttacagcactactatattgtttaaaggcttt
 tttacagatcaattcgtgggtatacagatttatattagtagattttgattcaaaaggtatt
 gttgataaataataagggtgaaataagtagacttgtatggtgcttattatggttatcaa
 tgtgcgggtggttatcacccaaacaaacagctgttatgtatggtggtgaacgtttacat
 gataataatcagattgacccgaagagaaataaagtgccagatcaatttatggtctagcgg
 aaacaaatacagtagcttttggaaacggtttaaacaggaataagaaaaatgttaactgtt
 caggagttggagcttccacgaacagacttatttccagggaataataatttatataac
 ctctgatgtttttgatgggaaggtctcagagggttaatactcgttttctacactttotaca
 gaacccctcgggttaattacgatttatitgggtcctcaaggcagatctcaaatcaccta
 ttaagaataatataagagataataaataacgatttaactctgaaacacatgcattatgata
 tatthataatacagtttaa

(配列番号: 30)

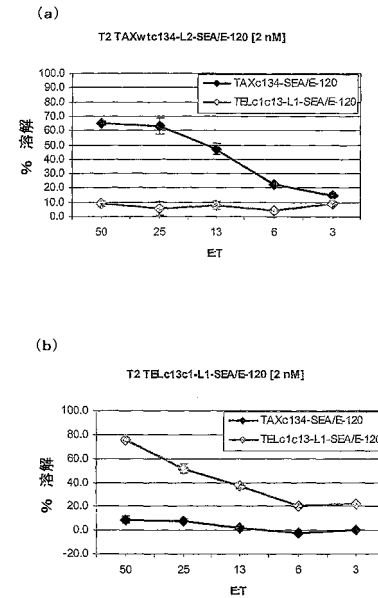
【図 1 4 - 1】

gattctcgatcccggaataataacagactcactataggggagacacacacgggttccc
 tccagaataaattttgtttaactttaagaaggagatatatacatgaacgtggtgtc
 actcagacccccaaattccaggctcctgaagacaggacagacagacactgacactg
 gccaggatatgaacatgaatacatgtctcgtgtatcgcacagacccaggatgggt
 ctgaggtcgatcacttaccacagttgggtgtgttatcactgacacagaggaagctccc
 aatgggtataaattgtctcagatcaacacagaggaatttccggtcaggtgtgtcgt
 gctgtccctccagacacactgtgtactctgtgcacagcagggcggtcagcagcggga
 cggcgacacagagcagtagtctcggcgccgggacacaggctccacgttccagaggaactg
 aaaaacgtgttccccacgggtgctgtgttttaggcactcagaagcagagatctcc
 cacacccaaaggccacactggtgtgctgtggccacgggtttctaccccagacacgtg
 gagctgagcttggtgggtgaattgggaagggtgtgcacagtgggtctgcacagacccg
 cagccctccaggagcagcccgccctccatgactccagatacagcttctgagcagccgc
 ctgaggtgtctggccctctctgggaaggaccccgcaaacacttccggtcaggtc
 cagttctacagggtctcggaggaatgacaggtggacccaggataggggcaaacccgtc
 acccagatcgtcagcgcggaggccctgggttagagcagactaagcttgaattccgac
 cggctgtatacaaaagccggaagggaagctgagttgggtgctgcacacccgtgagcaat
 aactagcataaaccccttggggccctcaaacgggtctctgaagggttttttgcgaag
 ggggaactatataccggataattcttgaagacgaaggggccctcgtgatcagcctattt
 ctataggttaattgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggacacttctgg
 ggaattgtgcgggaacccctatttgtttatttttaataatcttaataatgattgtat
 ccggtcattgagataataacccctgataaattgtcttaataatttttgaataattcgc
 gtaaaatttttgaataatcagctcatttttaacaaataggccgaatccggcaaaat
 cccctataaatacaaaagataagccagatagaggttgaggtgttggttccagtttggaa
 caagggtccactattagaagcgtggactccacgtccaaaggccgaataacccgtcta
 tcagggcgatggccactcagtgaaacacacccatacactaagtttttgggttgag
 gtgcgtgaagacacataactcggaaactcaaaaggagagcccccagtttagaggttag
 ggaaggccggcagacgtggcgaaggaaggaggaagggaaggaagggaaggcgggc
 tagggcgctggcaggtgtagcgttcagcgtgcgcgttaacccacacaccccgccgct
 taatgcgcgcgtcacaggcgccgtcagggtgcgccttttcgggggaattgtgcgcgaac
 cccattattgtttatttttcaataacattcaaatatgtatccgtcagtagacaata
 accctgataaattgctcaataatattgaaaaaggagagtagtagtatcaacattt
 ccgtgtgcoccttattcccttttttggggcattttgccttctgtttttgtgcaccc
 agaaacgtgtgtgaagtgaagtagctggaagtagctgtgggtgcagaggtgggtga
 catcgaactgattctcaacgcgtgaagtagcttttagagcttttgcgtccgggaagag
 ttttcaatgagtagcacttttaagatttgtgtatgtggcgggtattatcccggtgt
 tgacgcggggcgaagcacaactcgtgcgcgcgatacactattctcagaatgacttggt
 tgagtaactccacagtcacagaaagcattcctcaggttagcagtagtaaggaatt
 atgcagtgctgcataaaccttgagtgataaacactcgggccaacttactctgcaaac
 gatcggagagccggaaggagcacaacccgtttttgcacaaactgggggattcattgaac
 tgccttgatcgttgggaacggagcgtggaatgagcctcagtagcctccacagagaggtga
 ccccgagcgtcgtgcagataggcgaacacagcttgccgaactatcaactggcgaact
 acttactctagcttcccggaacaaatgaatagctggatggagcgggataaagggttg
 aggaacactctcgtgcgtccgctcccggtcggctgttctgtgtgataaattcgtg
 agccggtgagcgtgggtctcgggtatcattgcagcactggggcgaagtagtaagcc

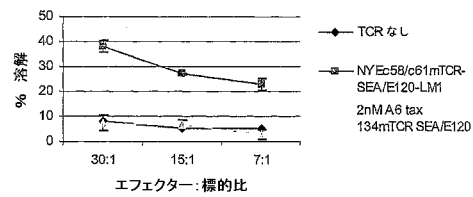
【図 20】



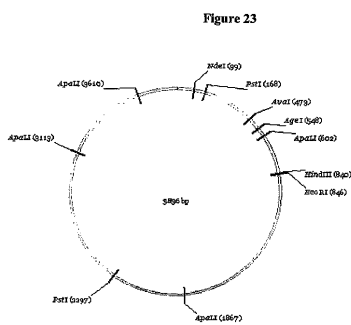
【図 21】



【図 22】



【図 23】



【図 24 - 1】

gattctcgatcccggaatttaatacgaactactatagggagaccacacggtttcc
 totagaataattttgtttaacttaagaaggagataatcgatgttataactcgag
 tgacaagtcgtgtgctatccacgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaag
 taaggattctgagtgatattccacgacaaatgtgtgtagcatgaggtctatgga
 ctccaagcgcaacagtcgtgtggtcggaacaaatctgactttgcatgtgcaca
 cgcctcaacacagcatattccagagacacattcttccacgacgacaaagttc
 ctaagcttgatccgatccggtgtacacaaagccgaaaggaagctgagttggt
 gctgcacccgctgagcaataactagatcaaccccttggggtctcaacgggtcttg
 aggggtttttgtgtaaggaggaactatccggataattcttgagacgaaagg
 cctcgatgacgctattttataggttaattgtcatgataataatggtttcttagac
 gtgaggtggcactttcggggaattgtgcgggaacccctattgtttatcttcta
 aatacattcaaatatgtatccgctcatgagacataacccctgataatgtctcaata
 atattttgttaaaatccggttaaaattttgttaaatcagctcatttttaacaaat
 aggcgaattccgcaaatccctataaatcaaaagataagacgagataggggttga
 gtgtttgttcagtttgggaacaaaggtcactataaagaacgtgactccaacgtca
 aaggcgaaaaacggtctatccggggtatggccactacgtgaacccatccctaat
 caagttttttgggttgagggtgcgcgttaagacataatccggaacccaaaggagcc
 ccgatttagagcttgacggggaagccggcgaaacgtggcggaaggaagggaaga
 aagcgaaaggagcggtgctaggggtcgtggaagtgtagcgttcacgtgcgtgtaa
 ccacacaccccgcggttaagtgcgcgtacagggtcgcgtcaggtggcacttttc
 ggggaattgtgcgggaacccctattgtttattttctaaatcattcaaatatgt
 atccgctcatgagacataacccctgataatgcttcaataatttgaaaagggaaga
 gtatgagattcaacattccgtgtgccttattcccttttttggggaattttgc
 ttccgtttttgtgcacccgaacacgtggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagt
 tgggtgcacgagttgggttacatcgaaactggtctcaacacgggttaagatccttgaga
 gttttgcggcggaagacgttttccaatgatgagcacttttaagttctgtatgtg
 ggcgggtattcccggtgttgacgcgggggaagacacccgtgcgcgtatcact
 attctcagatgacttggttggtactccacgtcacagaaagatcttccggatg
 gcatgacagtaagagaattatgcatgtgcctaacctagtgatgataacacgtgcgg
 ccaacttactctgacaacgatcggaggaacgaagagctaacogcttttttgacac

【圖 25】

Figure 25

ClaI (99)
AatII (110)
NotI (180)
PstI (242)
XbaI (250)
SpeI (349)
AatII (373)
ori
pEX954
3842 bp

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2005/004449
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/62 C07K19/00 C07K14/705 C07K14/31 A61K38/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/033685 A (AVIDEX LTD; JAKOBSEN, BENT, KARSTEN; GLICK, MEIR) 22 April 2004 (2004-04-22)	1,2
Y	page 15, line 9 - page 18, line 24; figures 2,5 page 2, line 1 - line 8 page 5, line 26 - page 6, line 9; claims 1-35 page 20, line 26 - line 31	3-23, 25-41
X	WO 99/18129 A (SUNOL MOLECULAR CORPORATION) 15 April 1999 (1999-04-15) claims 1-43; example 5 ----- -/-	1,2
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 May 2006		Date of mailing of the international search report 01/06/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PC1/GB2005/004449

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97/36932 A (PHARMACIA & UPJOHN AB; ANTONSSON, PER; HANSSON, JOHAN; BJOERK, PER; DO) 9 October 1997 (1997-10-09) page 1, line 1 - page 4, line 26; claims 1-31 page 10, line 25 - page 11, line 29	3-23, 25-41
Y	WO 03/002143 A (ACTIVE BIOTECH AB; FORSBERG, GOERAN; ERLANDSSON, EVA; ANTONSSON, PER;) 9 January 2003 (2003-01-09) claims 1-41; figure 2	8,19
A	WO 2004/044004 A (AVIDEX LIMITED; JAKOBSEN, BENT, KARSTEN; ANDERSEN, TORBEN, BENT; MOLLO) 27 May 2004 (2004-05-27) examples 9,11; sequences 156,159,160,161,164	3-41
A	WO 03/020763 A (AVIDEX LIMITED; JAKOBSEN, BENT, KARSTEN; GLICK, MEIR) 13 March 2003 (2003-03-13) figure 86b; example 10	3-41
A	WO 96/01650 A (PHARMACIA AB; ABRAHMSSEN, LARS; BJOERK, PER; DOHLSTEN, MIKAEL; KALLAND,) 25 January 1996 (1996-01-25) cited in the application abstract; claims 1-13	3-41
E	WO 2005/116075 A (AVIDEX LTD; JAKOBSEN, BENT, KARSTEN; LI, YI) 8 December 2005 (2005-12-08) abstract; claims 1-59; sequences 71,76	1-3,22, 25,26, 28,30, 31,36, 37,40,41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/GB2005/004449
Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 Although claims 34,35,38,39 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/GB2005/004449

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004033685	A	22-04-2004	AU 2003271904 A1 CA 2501870 A1 EP 1549748 A1 JP 2006502741 T	04-05-2004 22-04-2004 06-07-2005 26-01-2006
WO 9918129	A	15-04-1999	AU 742650 B2 AU 9586998 A CA 2305630 A1 CN 1279690 A EP 1019439 A1 JP 2001519143 T	10-01-2002 27-04-1999 15-04-1999 10-01-2001 19-07-2000 23-10-2001
WO 9736932	A	09-10-1997	AT 294818 T AU 707827 B2 AU 2525197 A BR 9702179 A CA 2222757 A1 CZ 9703712 A3 DE 69733179 D1 DE 69733179 T2 EP 0835266 A1 ES 2242222 T3 ID 16512 A JP 2002502363 T NO 975435 A NZ 329145 A PL 323626 A1 PT 835266 T TW 517061 B US 2003092894 A1	15-05-2005 22-07-1999 22-10-1997 16-03-1999 09-10-1997 13-05-1998 09-06-2005 06-10-2005 15-04-1998 01-11-2005 02-10-1997 22-01-2002 29-01-1998 23-06-2000 14-04-1998 29-07-2005 11-01-2003 15-05-2003
WO 03002143	A	09-01-2003	BG 108499 A BR 0210568 A CA 2451847 A1 CN 1522156 A CZ 20033559 A3 EE 200400037 A EP 1406657 A1 HR 20031054 A2 HU 0400313 A2 JP 2005503362 T MX PA03011761 A NZ 529827 A SK 16112003 A3 US 2003039655 A1 ZA 200309150 A	31-03-2005 03-08-2004 09-01-2003 18-08-2004 16-06-2004 15-04-2004 14-04-2004 30-04-2004 28-09-2004 03-02-2005 02-04-2004 19-12-2003 03-11-2004 27-02-2003 25-11-2004
WO 2004044004	A	27-05-2004	AU 2003276403 A1 CA 2505558 A1 EP 1558643 A2	03-06-2004 27-05-2004 03-08-2005
WO 03020763	A	13-03-2003	AT 290020 T CA 2457652 A1 CN 1561343 A DE 60203125 D1 DE 60203125 T2 EP 1421115 A2 ES 2239246 T3	15-03-2005 13-03-2003 05-01-2005 07-04-2005 06-04-2006 26-05-2004 16-09-2005

Form: PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International application No

PCT/GB2005/004449

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 03020763	A	HK 1066018 A1 JP 2005514006 T MX PA04001974 A NO 20041325 A NZ 531208 A PT 1421115 T	07-10-2005 19-05-2005 16-07-2004 30-03-2004 26-08-2005 29-07-2005	
WO 9601650	A	25-01-1996	AT 200626 T AU 699147 B2 AU 2994095 A CA 2194673 A1 CN 1152877 A DE 69520739 D1 DE 69520739 T2 DK 766566 T3 EP 0766566 A1 ES 2158950 T3 FI 970100 A GR 3036187 T3 HK 1012226 A1 HU 77257 A2 IL 114445 A JP 11500407 T NO 970108 A NZ 289951 A PL 318162 A1 PT 766566 T RU 2183215 C2 SE 9402430 A TW 413636 B UA 73067 C2 US 2005260215 A1 ZA 9505746 A	15-05-2001 26-11-1998 09-02-1996 25-01-1996 25-06-1997 23-05-2001 20-09-2001 13-08-2001 09-04-1997 16-09-2001 10-01-1997 31-10-2001 04-01-2002 02-03-1998 22-09-1999 12-01-1999 20-02-1997 23-12-1998 26-05-1997 28-09-2001 10-06-2002 12-01-1996 01-12-2000 15-12-2004 24-11-2005 20-02-1996
WO 2005116075	A	08-12-2005	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21			
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00		A	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02		C	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02			
A 6 1 K 39/085 (2006.01)	A 6 1 K 39/085			
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12			
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00			
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00			
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04			
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04			
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10			
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12			
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02			

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

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA63 BA80 CA02 CA07 DA01 DA02 DA05 DA11
EA04 GA11 HA03
4B064 AG01 AG20 AG31 CA02 CA19 CC24 CE10 DA01
4B065 AA01X AA26X AA53Y AA57X AA89X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02
CA24 CA44
4C085 AA02 AA03 AA05 BA13 BB11 CC07 CC08 CC21 CC24 DD62
EE01 EE03
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA57 CA11 CA40 DA50
DA86 EA28 FA74 GA22