(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3742103号

(P3742103)

(45)発行日　平成18年2月1日(2006.2.1)　(24)登録日　平成17年11月18日(2005.11.18)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
A61K 35/12	(2006.01)	A61K	35/12	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
C07K 14/725	(2006.01)	C07K	14/725	
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30	

請求項の数 12　(全 27 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平7-527965
(86)(22)出願日　平成7年4月20日(1995.4.20)
(65)公表番号　特表平9-512176
(43)公表日　平成9年12月9日(1997.12.9)
(86)国際出願番号　PCT/EP1995/001494
(87)国際公開番号　WO1995/030014
(87)国際公開日　平成7年11月9日(1995.11.9)
審査請求日　平成14年1月16日(2002.1.16)
(31)優先権主張番号　94810244.7
(32)優先日　平成6年5月2日(1994.5.2)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(73)特許権者
ベルント　グロナー
スイス国，ツェーハー-４０５９　バーゼル，レーヘンシュトラーセ　２
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　鶴田　準一
(74)代理人
弁理士　渡邊　陽一
(74)代理人
弁理士　西山　雅也
(74)代理人
弁理士　樋口　外治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】二価のタンパク質、調製及び利用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．７に示すアミノ酸配列を含んで成るタンパク質。

【請求項２】

ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．６に示すアミノ酸配列を含んで成る、請求項１記載のタンパク質。

【請求項３】

請求項１又は２記載のタンパク質をコードするＤＮＡ。

【請求項４】

ＳＥＱ　ＩＤ　Ｎｏ．５に示すヌクレオチド配列を含んで成る、請求項３記載のＤＮＡ。

【請求項５】

請求項３又は４記載のＤＮＡを発現する宿主細胞。

【請求項６】

細胞障害性リンパ球（ＣＴＬ）である請求項５記載の宿主細胞。

【請求項７】

腫瘍細胞を請求項１記載のタンパク質を産生するＣＴＬとインビトロで接触させることを含んで成る、当該腫瘍細胞を溶解する方法。

【請求項８】

ＭＨＣ－非依存型及びＭＨＣ－非制限型の腫瘍細胞特異性をＣＴＬに供するための方法であって、前記ＣＴＬに請求項３又は４記載のＤＮＡを導入することを含んで成る方法。

【請求項９】

請求項１記載のタンパク質の製造のための方法であって、前記タンパク質をコードするＤＮＡの発現を可能にする条件下で請求項５記載の宿主細胞を培養することを含んで成る方法。
【請求項１０】
請求項５又は６記載の宿主細胞を含んで成る、腫瘍細胞を溶解するための組成物。
【請求項１１】
癌を処置するための医薬組成物の製造において請求項６記載のＣＴＬを使用する方法。
【請求項１２】
請求項３又は４記載のＤＮＡを含んで成るベクター。
【発明の詳細な説明】
本発明は二価のタンパク質であって、そのタンパク質を産生する宿主細胞を選定の標的細胞を特異的に認識させるように導くことのできるタンパク質に関する。更に、本発明は前記タンパク質の調製方法、前記タンパク質をコードするDNA構築体、前記DNAを発現する宿主細胞を含んで成る組成物、及び前記タンパク質を特異的に認識する抗体に関する。更に、本発明は例えばインビトロ又はインビボで腫瘍細胞を特異的に殺すためのかかる宿主細胞の利用に関する。
細胞性免疫療法とも呼ばれている養子免疫療法の原理は、哺乳動物に免疫学的に活性な細胞を移入して疾病状態に対する哺乳動物の免疫反応を強めることにある。従って、免疫細胞を例えばヒト患者又はその他の対象体から取り出し、任意的にインターロイキン２の如き免疫増強因子の存在下で培養し、次いで好都合には免疫増強因子の存在下で患者に（再）投与する。この患者において、その免疫活性細胞はその疾病状態で緩和するように働く。
養子免疫療法のために提案されている免疫活性細胞には、ナチュラルキラー（NK）細胞に由来するリンホカイン活性化キラー（LAK）細胞、及びキラーＴリンパ球とも呼ばれている細胞溶解性又は細胞障害性Ｔリンパ球（CTL）由来のインビトロ感作リンパ球（IVS）が含まれる。LAK細胞は広域の標的細胞と反応する細胞溶解性細胞である。これらは主要組織適合性複合体（MHC）制限型ではなく、そして腫瘍細胞のみならず、インビトロ正常細胞をも溶解できるものである。CTLはクローン特異性を有する。即ち、各クローンは標的細胞の表層上の特定の抗原構造に対して特異的である。特定のCTLは固有の抗原を認識してそれに結合し、これにより活性化し、次いで増殖でき、そして標的細胞を破壊する。この認識過程はMHC制限型且つ依存型であり、なぜなら抗原は標的細胞により発現される自己クラスＩMHC表層分子のうちの１つのみに関連して認識されるからである。
Ｔ細胞による特異的な抗原の認識はＴ細胞抗原レセプター（TCR）により媒介される（A. Weiss, Cell 73, 209-212（1993））。レセプターに対するリガンドの結合は細胞エフェクターのプログラム、例えばチロシンキナーゼの活性化、細胞内カルシウムイオン放出及びインターロイキン２産生を誘引しうる（R. T. Abrahamら、Trends Biochem. Sci. 17, 434-438（1992））。
TCRは少なくとも６種類の遺伝子の産物を含んで成る多量表層複合体であり、その産物は全て効率的な血漿膜発現にとって必要である。TCRのクローンタイプアルファ（α）及び（β）鎖は特異的な標的細胞認識を媒介する。これらの鎖はCD３複合体の非多形成分ガンマ（γ）、デルタ（δ）及びエプシロン（ε）、並びにゼータ（ζ）鎖と非共有結合している。ジスルフィド連結したζホモダイマーはトランスメンブラン分子であり、そしてその細胞質部はTCR媒介型シグナル変換及び細胞溶解の誘導において中心的な役割を果たす。このζは自立シグナル変換が可能であり、即ちζ単独で応答を媒介するのに十分である。ζ鎖と細胞外リガンド結合性ドメインとの融合はリガンドとの相互作用により活性化されうる分子をもたらしうる（S. J. Frankら、Science 249, 174-177（1990）; C, Romeo & B. Seed, Cell 64, 1037-1046（1990）; F. Letourneur & R. D. Klausner. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8905-8909（1991））。ζの異性体エーター（η）はζ遺伝子転写体の択一的なスプライス形態である。
腫瘍の形成は体細胞の中の癌遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子の突然変異に関与する。かかる突

然変異はタンパク質の構造変化又は過剰発現をもたらしうる。両方の現象はこれらのタンパク質の細胞内プロセシングにおける変化及び細胞の表層上の主要組織適合性抗原に関連する新たな抗原構造の表示をもたらしうる。腫瘍患者の血清中の癌遺伝子産物に対して特異的な抗体の検出は、その癌遺伝子産物が抗原性でありうることの指標である。この抗原性の更なる確証は細胞免疫応答の生起である。腫瘍細胞を認識して排除するCTLの発生はいくつかのモデル系において実証された（T. Boon, Adv. Cancer Res. 58, 177-210（1992）；M. W. Kastら、Cell 59, 603-614（1989）；Disisら、Cancer Res. 54, 16-20（1994））。

例えば癌の処置のためのＴ－リンパ球の細胞溶解活性を促進することを狙いとする現存の手法はいくつかの欠点、例えば天然CTLにおける認識過程のMHC制限に悩まされている。現状遭遇させる制約を解消するアプローチが必要である。

本発明の目的は、例えば改変したCTL効能及び選択的抗腫瘍剤を得るために、CTL認識特異性の操作を包括するかかる改良手法を提供することにある。この手法は、良性の、及び特に悪性の腫瘍細胞における一貫した遺伝子変化の同定に基づく。規定の腫瘍細胞特異性を有するCTLの提供は、規定の腫瘍細胞に対するターゲッティング、並びにこの標的細胞のMHC非制限型及びMHC非依存型破壊を可能にする。新規のMHC非依存型認識特異性の装ったCTLによる腫瘍細胞溶解は、例えば癌処置を包括する遺伝子療法においてインビトロ（生体外）又はインビボで促進されうる。

この腫瘍細胞は、本発明のキメラタンパク質の一部である抗原結合性ドメインにより認識され、それと結合する抗原性構造体（リガンド）を担持するものであると（事前）規定又は選定された標的細胞である。

本発明は、選定の腫瘍細胞を特異的に認識し、そして殺すようにCTLを誘導せしめることのできるキメラタンパク質を考慮する。より詳しくは、本発明は認識機能体、ヒンジ領域、及びTCRのζ鎖を含んで成るキメラタンパク質、並びに１又は複数種のかかるタンパク質分子を産生するCTLを提供する。本発明のキメラタンパク質の認識部分への細胞結合リガンドの結合は、CTL内でのζ鎖媒介型シグナル変換をもたらし、そして究極的にはそのリガンドを担持する細胞の溶解をもたらす。

本発明のキメラタンパク質は自然には存在していないタンパク質である。このタンパク質は、特定の抗原性構造を特異的に認識且つそれに結合する（その認識機能体を介して）、及びシグナル生成成分として働く（ζ鎖部を介して）ことの双方が可能な点で二価である。そのヒンジ領域はスパーサーを担い、そして認識機能ドメインの必須のアクセス性及び柔軟性を確実なものとする。このヒンジ領域は本発明のキメラタンパク質の機能にとって必須であると解される。好ましくは、このキメラタンパク質内で配列は、認識機能体がＮ－末端に位置し、そしてヒンジ領域を介してキメラタンパク質のＣ末端にあるζ鎖部分に連結している。細胞表層分子であることで、本発明のキメラタンパク質は細胞外ドメイン、トランスメンブランドメイン及び細胞質ドメインを含んで成り、そして宿主細胞、例えばCTLのプラスマ膜の中に挿入されている。宿主細胞内の本発明のタンパク質の機能は特定のリガンドの結合に基づいて前記タンパク質のシグナル生成能を実証するのに適当なアッセイ、例えばリガンドの結合により誘引されるシグナル生成経路の検出を可能にするアッセイにおいて検出可能であり、それ故例えばカルシウムイオン放出量の上昇、細胞内チロシンのリン酸化、イノシトールホスフェートの代謝回転、又はインターロイキン（IL）２、インターフェロンγ，GM－CSF，IL－３，IL－４生産の測定に関するアッセイを行う。（R. I. Abrahamら、Trend Biochem. Sci. 17, 434-438（1992））。かかるアッセイは当業者により容易に可能である。実施例において採用したアッセイを参照されたい。これらのアッセイはその他の適当な細胞系を利用することにより改良してよいことが明らかである。

認識機能は抗体、特に一本鎖抗体（scFV）の抗原結合性ドメインにより司られる。一本鎖抗体はモノクーナル抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含んで成る遺伝子融合体である。この認識及び結合機能は、TCRのα／β鎖を介するMHC制限型抗原認識を回避するようTCR複合体のζ鎖に授けられている。

抗原結合性ドメインは腫瘍細胞上の適当な抗原に対して誘導され且つ特異的なモノクローナル抗体に由来する。
適当な抗原は、正常細胞に比べ、腫瘍細胞の表層上に多い、又はその上で特異的に発現する抗原、例えば腫瘍細胞における一貫した遺伝改変に由来する抗原である。適当な抗原の例には、管上皮ムチン、gp36,TAG－72、成長因子レセプター及びグリコスフィンゴ脂質、及び腫瘍細胞において優先的に発現されるその他の炭水化物抗原が含まれる（以下の見出し「抗原及び抗体」を参照されたい）。管上皮ムチンは乳、卵巣及び膵臓癌細胞上で多く発現され、そして例えばモノクローナル抗体SM３により認識される（Zotterら、Cancer Rev. 11, 55-101（1988））。糖タンパク質gp36はヒト白血病及びリンパ腫細胞の表層上で見い出せる。前記抗原を認識する典型的な抗体はSN10である。TAG－72はモノクローナル抗体CC49により認識される膵臓癌抗原である（Longenecker, Sem. Cancer Biol. 2, 355-356）。成長因子レセプターは例えばヒト表皮成長因子（EGF）レセプター（Khazaieら、Cancer and Metastasis Rev. 12, 255-274（1993））及びerbB－２又はgp185とも呼ばれているHER2（A. Ullrich and J. Schlessinger, Cell 61, 203-212（1990））である。erbB－２レセプターはトランスメンブラン分子であり、これはヒト癌腫において高い比率で過剰発現される（N. E. Hynes, Sem., h Cancer Biol. 4, 19-26（1993））。正常成人組織におけるerbB－２の発現は低い。この発現率の相違は、erbB－２レセプターを、「腫瘍増大」に相当すると特定する。
好ましくは、抗原結合性ドメインは免疫原として天然形態で抗原を表示する生存ヒト腫瘍細胞を利用することにより生産されるモノクローナル抗体より獲得できる。本発明の好適な態様において、キメラタンパク質の認識部分は成長因子レセプター、特にHER2の細胞外ドメイン上の抗原決定基に特異的に結合する。HER2成長因子に特異的なモノクローナル抗体は公知であり、そして例えばS. J. Mc Kenzieら、Oncogene 4,543-548（1990）, R. M. Hudziakら、Molecular and Cellular Biology 9, 1165-1172（1989）、国際特許出願WO89/06692（Gene tech）及び日本国特許平２－150,293（味の素（株））により述べられている。天然形態でHER2を表示する生存ヒト腫瘍細胞、例えばSKBR３細胞に対して生起させたモノクローナル抗体は例えば引用することで本明細書に組入れるヨーロッパ特許出願EP－A－502,812号（Ciba－Geigy）に記載され、そして抗体FRP5, FSP16, FSP77及びFWP51が含まれる。これらの抗体を産生するハイブリドーマ細胞系はヨーロッパ・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャーズ（ECACC, PHLC Centre for Applicd Microbiology X Research, Porton Down, Salisbury, UK）に1990年11月21日に受託番号90112115, 90112116, 90112117及び90112118号のそれぞれで寄託されている。
本発明のキメラタンパク質において、好適な抗原結合性ドメインは柔軟性リンカー（スペーサー）、好ましくはペプチドを介して重鎖可変ドメイン（V_H）に架橋した軽鎖可変ドメイン（V_L）を含んで成る一本鎖組換抗体（scFV）である。好都合には、このペプチドは約10～約30個のアミノ酸、特に天然アミノ酸、例えば約15個の天然アミノ酸より成る。好ましくは、ペプチドはＬ－グリシン及びＬ－セリンより選ばれるアミノ酸より成り、特に前記15個のアミノ酸ペプチドはGly-Gly-Gly-Gly-Serの３つの反復単位より成る。好都合には、V_Hが組換抗体のＮ末端に位置する一本鎖抗体である。好ましくは、一本鎖抗体が上記の好適な特異性を有するキメラタンパク質、例えば重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインがモノクローナル抗体に由来する一本鎖組換抗体、例えばヒト成長因子レセプターHER2に特異的なマウスモノクローナル抗体、例えばFSP16, FSP77, FRP5及びFWP51より成る群から選ばれるマウスモノクローナル抗体を含んで成るキメラタンパク質である。
抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインはいわゆるフレームワーク領域（FR）（これは様々な種で抗体においてかなり保存されている）及び相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる超可変領域（これは特定の特異性にとって一般的である）より成る。本発明に従うキメラタンパク質の抗原結合性ドメインにおいて、好ましくはFRは哺乳動物、例えばマウス又は特にヒト抗体に由来する。モノクローナル抗体のscFVはTCR／CD３複合体のζ鎖に結合している。
特に好ましくは、キメラタンパク質は、重鎖可変ドメインが次式のポリペプチドを含んで

成る一本鎖組換抗体を含んで成る：
FR_1－CDR_{1H}－FR_2－CDR_{2H}－FR_3－CDR_{3H}－FR_4（Ｉ）
（式中、このポリペプチド鎖はＮ末端で始まり、そしてＣ末端で終わり、そしてFR_1は少なくとも25～29、好ましくは25～33個のアミノ酸を含んで成るペプチド残基であり、FR_2は12～16個の天然アミノ酸を含んで成るペプチド残基であり、FR_3は30～34個の天然アミノ酸を含んで成るペプチド残基であり、FR_4は少なくとも６～10個、好ましくは６～13個の天然アミノ酸を含んで成るペプチド残基であり、
CDR_{1H}はSEQ ID NO：２のアミノ酸配列31～35のペプチド残基であり、
CDR_{2H}はSEQ ID NO：２のアミノ酸配列50～66のペプチド残基であり、そして
CDR_{3H}はSEQ ID NO：２のアミノ酸配列99～108のペプチド残基であり、又は
CDR_{1H}はSEQ ID NO：４のアミノ酸配列31～35のペプチド残基であり、
CDR_{2H}はSEQ ID NO：４のアミノ酸配列50～66のペプチド残基であり、そして
CDR_{3H}はSEQ ID NO：４のアミノ酸配列99～109のペプチド残基であり、そして
ここでアミノ酸Cysは酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していてよい。これらの相補性決定領域は、SEQ ID NO：２に従うとAsn-Tyr-Gly-Met-Asn（CDR_{1H}），Trp-Ile-Asn-Thr-Ser-Thr-Gly-Glu-Ser-Thr-Phe-Ala-Asp-Asp-Phe-Lys-Gly（CDR_{2H}）及びTrp-Glu-Val-Tyr-His-Gly-Tyr-Val-Pro-Tyr（CDR_{3H}）であり又はSEQ ID NO：４に従うとSer-Tyr-Trp-Met-Asn（CDR_{1H}），Met-Ile-Asp-Pro-Ser-Asp-Ser-Glu-Thr-Gln-Tyr-Asn-Gln-Met-Phe-Lys-Asp（CDR_{2H}）及びGly-Gly-Ala-Ser-Gly-Asp-Trp-Tyr-Phe-Asp-Val（CDR_{3H}）である。
特に好ましいのは組換一本鎖抗体が、フレームワーク領域FR_1，FR_2，FR_3及びFR_4が好ましくは哺乳動物、特にマウス又はヒト抗体に由来する式Ｉの重鎖可変ドメインを含んで成るキメラタンパク質である。
本発明の第一の態様において、最も好ましいのはキメラタンパク質、即ち、組換一本鎖抗体の重鎖可変ドメインがSEQ ID NO：２のアミノ酸配列２～120のポリペプチドを含んで成り、ここでアミノ酸配列２～30（FR_1），36～49（FR_2），67～98（FR_3）及び／又は110～120（FR_4）内の１又は複数個、例えば１，２，３又は４個の単独アミノ酸が別のアミノ酸により置き換えられているか又は欠失しており、そしてここでアミノ酸Cysが酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していることのあるキメラタンパク質；特にキメラタンパク質、即ち重鎖可変ドメインがSEQ ID NO：２のアミノ酸配列６～119のポリペプチドを含んで成り、ここでアミノ酸Cysは酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していることのあるキメラタンパク質である。
第二の態様において、最も好ましいのはキメラタンパク質、即ち組換一本鎖抗体の重鎖可変ドメインがSEQ ID NO：４のアミノ酸配列２～120のポリペプチドを含んで成り、ここでアミノ酸配列２～30（FR_1），36～49（FR_2），67～98（FR_3）及び／又は110～120（FR_4）内の１又は複数個、例えば１，２，３又は４個の単独アミノ酸が別のアミノ酸により置き換えられているか又は欠失しており、そしてここでアミノ酸Cysが酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していることのあるキメラタンパク質；特にキメラタンパク質、即ちSEQ ID NO：４のアミノ酸配列６～120のポリペプチドを含んで成る重鎖可変ドメインをもち、アミノ酸Cysが酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していることのある組換抗体である。
例えば、フレームワーク内の疎水性アミノ酸は別のアミノ酸、好ましくはそれも疎水性のアミノ酸、例えば同族アミノ酸により置き換えれていてよく、２個のアミノ酸により置き換えられていてよく（アミノ酸の挿入がもたらされる）、又は欠失していてよい。同様に、フレームワーク内の親水性アミノ酸は別のアミノ酸もしくは２個のアミノ酸により置き換えられていてよく、又は欠失していてよく、ここでアミノ酸の置き換えは好ましくは対応のフレームワーク領域の水素結合構造を維持させる。好都合には、１又は複数個のアミノ酸の任意の置き換えは抗体の再構築又はヒト化のための当業界公知のガイドラインを考慮する。特に有用なのは再構築抗体の免疫原性を低める（「オリジナル」モノクローナル抗体と比べ）及び／又は「オリジナル」抗体の結合親和力にほぼ相当する又はそれを超える抗体をデザインすることを狙いとするガイドラインである。アミノ酸の修飾は個々のFR、即ち、FR_1，FR_2，FR_3もしくはFR_4に制約してよく、又はFRのうちの２つ、３つもしくは

全てに関与してよい。
同様に好ましくは、本発明のキメラタンパク質は、軽鎖可変ドメインが次式のポリペプチドを含んで成る一本鎖組換抗体を含んで成る：
FR_6－CDR_{1L}－FR_7－CDR_{2L}－FR_8－CDR_{3L}－FR_9（Ｉ）
（式中、このポリペプチド鎖はＮ末端で始まり、そしてＣ末端で終わり、そしてFR_6は少なくとも19～25、特に19～23個のアミノ酸を含んで成るペプチド残基であり、FR_7は13～17個の天然アミノ酸を含んで成るペプチド残基であり、FR_8は30～34個の天然アミノ酸を含んで成るペプチド残基であり、FR_9は天然アミノ酸、特に７～11個の天然アミノ酸を含んで成るペプチド残基であり、そして
CDR_{1L}はSEQ ID NO：２のアミノ酸配列158～168のペプチド残基であり、
CDR_{2L}はSEQ ID NO：２のアミノ酸配列184～190のペプチド残基であり、そして
CDR_{3L}はSEQ ID NO：２のアミノ酸配列223～231のペプチド残基であり、又は
CDR_{1L}はSEQ ID NO：４のアミノ酸配列159～164のペプチド残基であり、
CDR_{2L}はSEQ ID NO：４のアミノ酸配列185～191のペプチド残基であり、そして
CDR_{3L}はSEQ ID NO：４のアミノ酸配列224～231のペプチド残基であり、そして
ここでアミノ酸Cysは酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していてよい。これらの相補性決定領域は、SEQ ID NO：２に従うとLys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Tyr-Asn-Ala-Val-Ala（CDR_{1L}），Ser-Ala-Ser-Ser-Arg-Tyr-Thr（CDR_{2L}）及びGln-Gln-His-Phe-Arg-Thr-Pro-Phe-Thr（CDR_{3L}）であり、又はSEQ ID NO：４に従うとLys-Ala-Ser-Gln-Asp-Ile-Lys-Lys-Tyr-Ile-Ala（CDR_{1L}），Tyr-Thr-Ser-Val-Leu-Gln-Pro（CDR_{2L}）及びLeu-His-Tyr-Asp-Tyr-Leu-Tyr-Thr（CDR_{3L}）である。
特に好ましいのは組換抗体が、フレームワーク領域FR_5，FR_6，FR_7及びFR_8が好ましくは哺乳動物、特にマウス又はヒト抗体に由来する式IIの重鎖可変ドメインを含んで成るキメラタンパク質である。
本発明の第一の態様において、最も好ましいのはキメラタンパク質、即ち、組換一本鎖抗体の軽鎖可変ドメインがSEQ ID NO：２のアミノ酸配列135～240のポリペプチドを含んで成り、ここでアミノ酸配列135～157（FR_6），169～183（FR_7），191～222（FR_8）及び／又は232～240（FR_9）内の１又は複数個、例えば１，２，３又は４個の単独アミノ酸が別のアミノ酸により置き換えられているか又は欠失しており、そしてここでアミノ酸Cysが酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していることのあるキメラタンパク質；特にキメラタンパク質、即ち軽鎖可変ドメインがSEQ ID NO：２のアミノ酸配列135～240のポリペプチドを含んで成り、ここでアミノ酸Cysは酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していることのあるキメラタンパク質である。
第二の態様において、最も好ましいのはキメラタンパク質、即ち組換抗体の軽鎖可変ドメインがSEQ ID NO：４のアミノ酸配列136～240のポリペプチドを含んで成り、ここでアミノ酸配列136～158（FR_6），170～184（FR_7），192～223（FR_8）及び／又は232～240（FR_4）内の１又は複数個、例えば１，２，３又は４個の単独アミノ酸が別のアミノ酸により置き換えられているか又は欠失しており、そしてここでアミノ酸Cysが酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していることのあるキメラタンパク質；特にキメラタンパク質、即ちSEQ ID NO：４のアミノ酸配列136～240のポリペプチドを含んで成る軽鎖可変ドメインをもち、アミノ酸Cysが酸化状態となってＳ－Ｓ結合を形成していることのある組換抗体である。
例えば、フレームワーク領域内のアミノ酸は重鎖に関して上記した通りに別のアミノ酸に置き換えられているか、又は欠失していてよい。
特に好ましいのは重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとが10～30個、例えば約15個のアミノ酸より成るスペーサー基を介して連結されている一本鎖組換抗体、特に次式のポリペプチド
FR_1－CDR_{1H}－FR_2－CDR_{2H}－FR_3－CDR_{3H}－FR_4－Sp
－FR_6－CDR_{1L}－FR_7－CDR_{2L}－FR_8－CDR_{3L}－FR_9　　（III）
（式中、このポリペプチド鎖はＮ末端から始まってＣ末端で終わり、そしてFR_1，CDR_{1H}，

FR_2，CDR_{2H}，FR_3，CDR_{3H}，FR_4，FR_6，CDR_{1L}，FR_7，CDR_{2L}，FR_8，CDR_{3L}及びFR_9は上記と同じ意味を有し、そしてSpは上記したペプチドスペーサーである）を含んで成る一本鎖組換抗体である。

この抗原結合性ドメインは、所定の腫瘍細胞抗原に対する特異性に関して、当業界公知の方法により、例えば高レベルで抗原を発現する細胞の免疫蛍光染色により、直接的又は免疫沈殿を介する免疫ブロッティング及び免疫複合体のタンパク質ブロッティングにより、又はその他のイムノアッセイ、例えば結合、交差阻害もしくは競合ラジオもしくは酵素イムノアッセイにより、試験することができうる。抗原結合性ドメインの結合親和性は公知の技術及び原理に基づいて当業者により簡単に樹立されうる適当な定量アッセイを利用して決定されうる。所望するなら、抗原結合性ドメインの親和力は適当な対照抗体、例えばそれが誘導された「親」モノクローナルマウス抗体の親和力と比較してよい。

抗原結合性ドメインに加え、本発明のキメラタンパク質は抗原結合性ドメインとζドメインとの間の短い柔軟性つなぎ鎖として挿入されたヒンジ領域を含んで成る。このヒンジ領域は約40～約200個の天然アミノ酸、好ましくは約60～約190個のアミノ酸を含んで成るペプチドである。好ましくは、本発明に係るキメラタンパク質におけるヒンジ領域はイムノグロブリン様ヒンジ領域、例えばCD４分子に由来するヒンジ領域、例えばD3D4イムノグロブリンドメイン（P. J. Maddonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 9155-9159（1987））又はCD８α分子に由来するヒンジ領域、例えばLyt－２（R. Zomoyskaら、Cell 43, 153-163（1985）；B. J. Classonら、Int. Immunol. 4, 2, 215-225（1992））である。SEQ ID No. ７に記載のアミノ酸配列において、ヒンジ領域（Lyt－２）は245位のアミノ酸から304位のアミノ酸にまで及ぶ。

抗原結合性ドメイン及びヒンジ領域に加え、本発明のキメラタンパク質はキメラタンパク質のトランスメンブラン及びシグナル生成ドメインに寄与する機能性ζドメインを含んで成る。機能性ζドメインは本質的にトランスメンブラン及びζ鎖の細胞質ドメインを含んで成る。特異的な抗原との本発明のキメラタンパク質の抗原結合性ドメインとの相互作用によるTCRのζドメイン媒介式活性化はいくつかのシグナル生成経路、例えば上記したものを誘引する。TCR内で、ζはζζジスルフィドホモダイマーとして存在する。機能性ζドメインは、内因性ζ発現を欠くＴ細胞ハイブリドーマの中での発現に基づいて前記ハイブリドーマにおいて機能的に活性なTCRを、例えば抗原誘発化インターロイキン－２分泌及び増殖刺激が復帰するように復活させることのできるタンパク質である（S. Frankら、Science 249, 174-177（1990））。機能性ζドメインの例にはマウスのアミノ酸28～164（A. M. Weissmann, Science 239, 1018-1021（1988））及びヒトζ鎖のアミノ酸28～163（番号付けはA. M. Weissmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9709-9713（1988）図２に従う；これは引用することで本明細書に組入れる）を含んで成る分子を含むが含まれる。本発明の目的のために利用されるζタンパク質は変異体を含むことを意図しており、ただしこれらの変異体は機能的であることを条件とする。好ましいのは哺乳動物の変異体、特にマウス及びヒト起源のものである。

例えば、変異体は特定の物質内に見い出せるζ分子の天然変異体である。かかる変異体は同一遺伝子族の近縁遺伝子又は特定の遺伝子の対立変異体によりコードされうる。「変異体」なる語には、インビトロ突然変異誘発にかけられたDNAから産生可能な修飾ζ分子を包括し、ただしこのDNAによりコードされるタンパク質が真性ζ分子の機能活性を有することが条件とされる。かかる修飾は１又は数個のアミノ酸の付加、交換及び／又は欠失より成ってよく、その最後は短くなった変異体をもたらす。

本発明の好適なキメラタンパク質はSEQ ID No.７に示すアミノ酸配列を有するタンパク質を含んで成る。

更に、本発明は本発明のタンパク質に特異的に結合するポリクローナル及びモノクローナル抗体に関する。かかる抗体は当業界周知の慣用の方法に従って調製される。

本発明のキメラタンパク質は、本発明のタンパク質を産生する以下に更に定義する適当な宿主細胞をインビトロ又はインビボで増殖させ、そして所望するならそのタンパク質を単離することを特徴とする周知の方法により調製されうる。好ましくは、本発明のタンパク

質は、このタンパク質をコードするDNA構築体の発現を可能とする条件下で適当な形質転換CTLを培養する方法により生産され、そして任意的にこのタンパク質の機能を検出するアッセイを実施する。本発明は更に、プロモーターと、このプロモーターにより管理された前記タンパク質をコードするDNAとを含んで成る発現カセットを含むベクターで形質転換された適当な宿主細胞、特にCTLを前記DNAの発現を可能とする条件下で培養することを含んで成る本発明のキメラタンパク質の製造方法に関する。本発明の好適なキメラタンパク質はscFv、ヒンジ領域及び機能性ζ分子を含むように構築する。本発明のキメラタンパク質を生産するための方法は、形質転換宿主細胞に標的細胞を溶解させるのに十分な量でタンパク質を生成すべきである。

適当な宿主細胞には例えば一次細胞障害性Ｔリンパ球（$CD8^+$）、$CD4^+$Ｔヘルパー細胞及びナチュラルキラー細胞（NK）が含まれる。好ましいのは哺乳動物細胞、特に哺乳動物、特にヒト起源のCTLである。

本明細書で用いているインビトロは生体外を意味し、それ故細胞培養条件を含む。

例えば、インビトロでの哺乳動物細胞の増殖は慣用の標準培養培地である適当な培養培地、例えばダルベッコの改良イーグル培地（DMEM）又はRPMI培地であって、任意的に哺乳動物血清、例えば胎児牛血清又は微量元素及び増殖維持添加剤、例えばフィーダー細胞の補充された培地の中で実施する。

本発明はまたＴリンパ球の認識特異性を増強させるのに適当な組換DNA又はDNA構築体にも関する。より詳しくは、本発明は認識機能、ヒンジ領域及びTCRのシグナル生成成分としてのζ鎖を含んで成るキメラタンパク質の合成を誘導することのできるDNA構築体を提供する。特に、本発明は抗原結合性ドメイン、ヒンジ領域及びζドメインを含んで成るキメラタンパク質をコードするDNA構築体、特に上記で好適であると記載したタンパク質部をコードする少なくとも一種のポリヌクレオチドを含んで成るDNA構築体を提供する。好適な配列において、この抗原結合性ドメインを第一部、ヒンジ領域を第二部、そしてζ鎖を第三部とする。

定義によれば、本発明のDNAには一本鎖コードDNA、このコードDNAとそれに対して相補性のDNAとより成る二本鎖DNA、又はそれらの相補性（一本鎖）DNA自身が含まれる。

好都合には、本発明のDNA構築体は第四部を含んで成り、それは第一部（抗原結合性ドメイン）の上流に位置し、そしてリーダーペプチドをコードする。好ましくは、本発明のDNA構築体の第四部はイムノグロブリン（Ig）遺伝子のリーダーペプチド、例えばIg重鎖リーダーペプチドをコードする。このIg重鎖リーダーペプチドは新生ポリペプチドの小胞体の内腔に対するターゲッティングを促進する。これはその後切断され、そしてタンパク質はゴルジ及び膜を介して選別され、そしてそのトランスメンブラン位置に行く。特に好ましいのは次の配列を有するリーダーペプチドである：Met-Ala-Trp-Val-Trp-Thr-Leu-Leu-Phe-Leu-Met-Ala-Ala-Ala-Lys-Val-Pro-Lys。

好ましいのは、SEQ ID No.７に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA、例えばSEQ ID No.５に示すヌクレオチド配列を有するDNAを含んで成るDNAである。SEQ ID No.７に示すDNA配列は以下の特徴を有する：

配列の説明：５’－EcoRＩ－IgH鎖リーダーD6／12－scFv（FRP5）：Lyt－２－ヒンジ：CD３－ゼータ（トランスメンブラン（TM）及び細胞質（Cyt））－EcoRＩ－３’

５’EcoRＩ部位	1位
３’EcoRＩ部位	1474位
AGT開始	40位
TAA停止	1423位
IGH鎖リーダー	40～93位
scFv（FRP5）	94～819位
Lyt－２ヒンジインサート	XbaＩ（819位）～XbaＩ（1005位）
ゼータインサート	XbaＩ（1005位）～EcoRＩ（1474位）

当業界では、当業者は本明細書で供される記載情報により本発明のDNA分子を合成できるであろう。本発明のDNA構築体を獲得するための適当な方法は、例えばいくつかのオリゴ

ヌクレオチドの合成、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を利用する特異的な遺伝子配列の増幅、所望のDNA配列を得るためのそれらのスプライシング並びに／又はDNA制限酵素及びリガーゼの利用を含んで成る当業界公知の方法を含む。本発明のDNAは化学的方法と組換方法との組合せにより合成されうる。

本発明は更に本発明のDNA構築体を含んで成るベクター、例えばレトロウィルスベクターに関する。

更に、本発明はMHC非依存式に及びMHC非制限式に標的腫瘍細胞を破壊することのできる遺伝子操作された形質転換CTLを提供する。本発明に従い、CTLは本発明の上記のキメラタンパク質を産生する。このCTLは本発明のDNAにより形質転換されており、それ故前記DNAを発現することができ、そして前記DNAによりコードされるタンパク質を生産できる。標的腫瘍細胞の破壊は、このようにして作られたタンパク質が機能的であることを必要とする。即ち前記タンパク質の抗原結合性ドメインが標的腫瘍細胞を認識してそれに結合することができなければならず、そしてζドメインがCTL内で所望のシグナルを誘引できなければならない。本発明のCTLは導入したDNAの発現を（好適に）可能とする条件下で培養し、そして所望するなら、その生産についてアッセイする。前記DNAの長期化及び高揚した発現性が好ましい。

更に、本発明は、前記Ｔ－リンパ球に認識機能体、スペーサードメイン及びTCRのシグナル生成成分としてのζ鎖を含んで成るDNA構築体を導入することにより規定のMHC非依存型且つMHC非制限型腫瘍細胞特異性を有するCTLを供するための方法を提供する。このDNA構築体は当業者に自明のDNA導入法、例えばベクター系、例えばウィルス又は非ウィルスベクター系の手段によりCTLに導入できうる。適当なウィルスベクターにはレトロウィルス、アデノウィルス及びアデノ関連ウィルスベクターが含まれる。この方法はインビボ及びインビトロ刺激の双方に適用できる。インビトロ適用が好ましい。

Ｔ－リンパ球を前記DNA構築体の発現を可能とする慣用の条件下で培養し、そしてその生産についてアッセイする。前記DNAの長期化及び高揚した発現性が好ましい。好都合には、CTLをIL－２の存在下で培養する。本発明の形質転換CTLは適当なマーカーに対して選定してよい。例えば、形質転換CTLは、本発明のDNA構築体をレトロウィルスベクターを介して導入するなら、同時形質転換したneo耐性マーカーに対して選定されうる。

更に、本発明は本発明の形質転換CTLを含んで成る課題の組成物に関する。かかる組成物は例えば本発明のタンパク質を産生する形質転換CTLを、許容される、例えば薬理学的に許容される担体と一緒に又は混合されて含んで成る。かかる担体は固体又は液体担体でよい。この組成物は、例えば患者の身体から取り出された組成物（例えば体液又は組織）中の所定の標的細胞を殺すために生体外で使用してよい。標的細胞を殺した後（それはチェックすべきである）、その組成物を患者に身体に再導入する。即ち、本発明の組成物は腫瘍の処置又は補助処置のために利用できうる。

更に、本発明は、前記腫瘍細胞を本発明のキメラタンパク質産生CTLと接触させることを含んで成る、選定の腫瘍細胞を溶解するための方法を提供する。インビトロ及びインビボ刺激の双方において適用できるこの方法においては、腫瘍細胞は本発明のキメラタンパク質の一部である抗原結合性ドメインにより標的とされる。

曝露及び相互作用をインビボで行うときは特に宿主自体のCTLを使用することが好ましいが、しかし適当なら、CTLはその他の起源に由来するものであってよい。その他の起源は、例えば組織培養物又は同一もしくは異なる種の哺乳動物である。

CTLは哺乳動物の身体全体で見い出される（組織リンパ系及び血液）。適当なCTLを選定し、そして哺乳動物から取り出す。例えば、CTLはIL－２の存在下でインビトロで培養した$CD8^+$末梢リンパ球として選定される。他方、遺伝子形質転換のために未選定の末梢リンパ球が使用される。所望するなら、例えば刺激化CTLの数を増やすために宿主を処理してよい。

本発明は更に、本発明の遺伝子操作したCTLの利用を含んで成る癌の処置方法に関する。この方法は、選定の腫瘍細胞を本発明のキメラタンパク質産生CTLに曝露することを含んで成る。CTL媒介型溶解の促進のための本法のインビトロ（生体外を意味する）用途は、

癌の処置を必要とする哺乳動物、特にヒトから取り出した腫瘍細胞の特異的処置でありうる。その例は、患者、例えば放射線処置を受けている患者から取り出した骨髄から、その骨髄を再導入する前に、腫瘍細胞を排除するための本発明のCTLの利用であろう。腫瘍細胞と本発明のCTLとの相互作用の結果として、この腫瘍細胞は溶解する。癌を処置する方法をインビボで実施するなら、それは本発明の形質転換CTLを、処置すべき哺乳動物、特にヒトの身体に再導入することを更に含んで成りうる。本発明のDNAを発現するCTLは例えば癌の処置を必要とする哺乳動物の中でのDNAのインビボ形質転換により生産できることも考えられる。

本発明は更に、癌の処置方法において利用するための前記CTLを含んで成る本発明のCTL又は組成物に関する。

本発明は特に実施例に記載の特定の態様（例えばタンパク質、DNA，CTL及びその調製方法）に関する。以下の実施例は本発明を例示し、それを限定するものではない。

略語：FCS：胎児牛血清；LDH：乳酸デヒドロゲナーゼ；mAb：モノクローナル抗体；MoMLV：モロニーマウス白血病ウィルス；MoMLV－LTR：モロニーマウス白血病ウィルス長期末端リピート；scFv：一本鎖抗体；SDS－PAGE：ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動。

材料及び方法

細胞系及び培養条件

クローン96（C196）はＣ57BL／６マウス由来のＨ－2K^{d}－制限型細胞障害性Ｔ細胞系である（K. Eichmannら、J. Immunol. 147, 2075-2081（1991））。C196及び感染体を、10％のFCS（Boehringer），５×の10^{-5}Ｍの２－メルカプトエタノール、10mMのHEPES，２mMのＬ－グルタミン及びマウスIL－２cDNAで感染させたX63Ag8－653プラストサイトマ細胞より獲得した３％のコンディション済み上清液（H. Karasuyama and F. Melchers, Eur. J. Immunol. 18, 97-104（1988））の添加されたダルベッコ改良イーグル培地（DMEM, Gibco）の中に維持した。ヒト白血病Ｔ細胞系ジャーカット、レトロウィルスパッケージング細胞系ΩＥ（J. P. Morgenstern and H. Land, Nuc. Acids Res. 18, 3587-3596（1990））及びP317（A. D. Miller and G. J. Rosman, Biotechniques 7, 980-990（1989））及び感染体、並びに活性化ヒトerbB－２レセプターをトランスフェクションしたマウス線維芽細胞系NIH3T3＃3.7を10％のFCSの添加されたDMEMの中で培養した。HC11R1＃11は、10％のFCS,10ng／mlの表皮成長因子及び５μｇ／mlのインスリンの添加されたRPMI 1640（Gibco）の中で増殖させたヒトerbB－２プロト癌遺伝子のトランスフェクションしたマウス乳表皮細胞系である（N. E. Hynesら、Mol. Cell. Biol. 10, 4027-4034（1990））。

実施例１：scFv（FRP5）：ヒンジ：ゼータ（ζ）cDNAの構築

認識機能体、スペーサードメイン及びTCR／CD３レセプター複合体のシグナル生成成分としてのζ鎖より成るDNAを構築する。この認識機能体はscFvドメインにより寄与される。このドメインはモノクローナル抗体FRP5に由来する（ヨーロッパ特許出願EP－Ａ－502,812号）。FRP5はerbB－２レセプターの細胞外ドメインに特異的である。scFv（FRP5）は15個のアミノ酸リンカー配列（SEQ ID NO：２）により連結されたモノクローナル抗体（mAb）重鎖及び軽鎖（V_HとV_L）の可変ドメインを含んで成る。このscFvドメインはerbB－２レセプターの細胞外ドメインを認識できる（W. Welら、Biotechnology 10, 1128-1132（1992）；W. Welsら、Cancer Res. 15, 6310-6317（1992））。イムノグロブリン重鎖のリーダー配列をscFvドメインのＮ末端に付加する。scFv（FRP5）cDNAをCD８α遺伝子のイムノグロブリン様ヒンジ領域由来の59個のアミノ酸をコードする短いリンカー配列にライゲーションする（R. Zomoyskaら、Cell 43, 153-163（1985））。トランスメンブラン及びシグナル生成ドメインはTCRのζ鎖により寄与される。この鎖はTCR活性化を経たシグナル変換を司る。

erbB－２分子の細胞外ドメインに特異的な一本鎖抗体FRP5をコードするcDNA（SEQ ID NO：１）をイムノグロブリン重鎖リーダー（LIgH）を含むプラスミドの中にサブクローニングする：ζcDNA及びCD８αヒンジcDNAは共に、逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応（RT－PCR）の組合せを利用し、細胞障害性Ｔ細胞系C196の全RNAから誘導される。MoMLV逆転写酵

素を第１鎖cDNA合成のために用いる。これらの反応は３’ζ－特異的オリゴヌクレオチド5813（SEQ ID NO：６）又は３’CD８α－特異的オリゴヌクレオチド8764（SEQ ID NO：７）のそれぞれにより誘導する。これらのcDNAはPCR鋳型として用い、ζプライマーペアー5812／5813（SEQ ID NO：８及び６）は５’XbaＩ部位及び３’HindIII/BglII部位を導入し、そしてCD８αヒンジプライマーペアー8763－8764（SEQ ID NO：10及び８）は両端にXbaＩ部位を導入する。LIgh－scFv（FRP5）DNAを融合用のXbaＩ部位を用い、アミノ酸残基28（A. M. Weissmanら、Science 239, 1018-1021（1988））から始まるζcDNAにライゲーションする。アミノ酸残基105～164（番号付けはR. Zomoyskaら、Cell 43, 153-163（1985）に従う）をコードするCD８αヒンジcDNAを次にXbaＩ部位の中に挿入し、そして正しい配向についてチェックする。得られるscFv：ヒンジ：ζcDNA構築体（SEQ ID No.７）を完全DNA配列決定により確認し、そして最後にpLXSNレトロウィルスベクターの固有EcoRＩ部位（A. D. Miller and G. J. Rosman、前掲）にサブクローニングし、pL（scFv（FRP5）：ヒンジ：ζ）SN構築体を得る。DNAの発現は５’MoMLV－LTRにより管理される。このプラスミドはSV40早期プロモーター（SN）により機能するネオマイシン耐性用選択マーカーも担持する。

pL（scFv：D3／D4：ζ）SNのクローニング

第１分子デザインはつなぎ鎖としてマウスLyt－２又はCD８α分子の比較的短く、且つ柔軟性のイムノグロブリンヒンジ様領域を含み、第２デザインはマウスL3T4又はCD４分子のD3及びD4として表示されている２つの膜近傍イムノグロブリン様ドメインをより長い、且つより硬質なスペーサーとして包括する（S. J. Clarkら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1649-1653（1987））。D3／D4をコードするcDNAはpcd－L3T4 4.25プラスミドDNAを用いるPCRにより獲得される（D. R. Litlman and S. N. Getlnev, Nature 325, 453-455（1987））。特異的なプライマーペアー＃8761／＃8762はCD４分子のアミノ酸残基184～370についてのコード配列を増幅し（P. J. Maddonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9155-9159（1987））, cDNAの両端にXbaＩ制限部位を導入する。その生成物をpL（FZ）SNベクターのXbaＩ部位にサブクローニングする。インサートの適正な配向についてチェックした後、得られる構築体の配列同一性をDNA配列決定により確認する。pL（F4Z）SNの構造を図１に示す。

L3T4/CD4D3/D4 cDNAの増幅用プライマー：

「上流」－５’Lyt－２／CD８－特異的オリゴヌクレオチド＃8761[1)]：

＃8761：５’－AGCTTCTAGAGTTTCAGAGCACAGCTCTCACGGCC－３’

「下流」－３’Lyt－２／CD８－特異的オリゴヌクレオチド＃8762[1)]：

＃8762：５’－TCGATCTAGAGTCTGGTTCACCCCTCTGG－３’

[1)] XbaＩ制限部位に下線を付した。

実施例２：レトロウィルス遺伝子導入後のscFv（FRP5）：ヒンジ：ζDNAの発現

pLXSNベクター系は細胞障害性Ｔ細胞への形質転換後にscFv（FRP5）：ヒンジ：ζDNAの効率的な合成を誘導することができ、そして感染細胞のG418選定を可能とする。確立したマウスCTL系C196を実施例１のpL（scFv（FRP）5：ヒンジ：ζ）SN構築体で感染せしめる。エコトロピックパッケージング細胞系ΩＥをリン酸カルシウム沈殿によりpL（scFv（FRP5）：ヒンジ：ζ）SNプラスミドDNAでトランスフェクションする。トランスフェクションした細胞はネオマイシン類似体G418（ゲニチシン、１mg／ml, Gibco）の存在下で安定的に選択される。ウィルス上清液をG418耐性ヘルパー細胞のプールから48時間後に回収し、そして８mg／mlのポリブレンの存在下で両性（アンホトロビック）パッケージング細胞系PA317を感染するのに用いる。高力価生産クローン細胞系を1.0mg／mlのG418含有培地の中での選択により誘導する。これらの生産細胞系の上清液をC196細胞を感染するために用いる。scFv（FRP5）：ヒンジ：ζDNAの高発現率のために選択した感染細胞のクローンを誘導し、そしてキメラ細胞表層タンパク質の生産についてアッセイする（実施例３）。クローンCFYZ.1は1.0mg／mlのG418の中での増殖により誘導される。ジャーカット細胞を同じ手順を利用して感染させ、クローンJFYZ.4を2.0mg／mlのG418の中での増殖により誘導する。

実施例３：細胞表層タンパク質の生化学的特性決定

ａ）形質転換CTLにより産生された。キメラscF（FRP5）：ヒンジ：ζタンパク質のSDS－PAGE分析

実施例２の選定クローンを細胞表層ビオチニル化し、溶解し、そして抗ζmAbで免疫沈殿させる。表層ビオチニル化のため、3×10^7個の生存細胞をビワ（biwa）バッファー（PBS，１mMの$MgCl_2$，0.1mMの$CaCl_2$）の中で３回洗い、そしてビワバッファーの中の1.5mlのスルホーNHSビオチン（Pierce,0.5mg／ml）の中に再懸濁させる。これらの細胞をクエンチングバッファー（ビワバッファー中の25mMのＬ－リジン）の中で３回洗い、そしてプロテアーゼインヒビターカクテルの添加された１％のNP－40，150mMのNaCl，50mMのトリス／HCl pH8.0,５mMのEDTA，１mMのPMSF含有バッファーの中で溶解させる。核形成後（postnuclear）リゼートをプロテインＡ Sepharose（Pharmacia）で一夜かけて清浄化する。免疫沈殿はζ鎖のヒト及びマウスCOOH末端を認識する３mgのζ特異的mAb H146-968の添加、３時間のインキュベーション、その後のプロテインＡ Sepharoseとの１時間のインキュベーションにより実施する。沈殿物をNET－TON（650mMのNaCl，５mMのEDTA，50mMのトリス／HCl，0.5%のトリトンＸ－100,１mg／mlのオバルブミン）の中で４回洗う。脱グリコシル化のため、沈殿物を５％のSDSの中で10%の２－メルカプトエタノール入りで又は抜きで100℃で変性させ、次いで、2.000UのPNGase Ｆ（Biolabs）と37℃で１時間インキュベートする。サンプルを非還元又は還元ラエムリ・サンプルバッファーのいづれかの中で煮沸し、そして５～20%のSDS－PAGE勾配ゲルにわたって電気泳動させる。このタンパク質をPVDF膜（Milliporc）に転写し、そして５％の脱脂粉乳（Fluka）を含むPBS－Ｔ（PBS，0.4％のTween－20）の中でブロッキングする。この膜を西洋ワサビペルオキシダーゼ－ストレプトアビジンを含むPBS－Ｔ（HRP－Strep，Southern Biotechnology，１：5.000）と１時間インキュベートする。洗浄後、この膜をPBS－Ｔの中で７分にわたり４回洗い、そのブロットをECL－ケモルミネッセンス試薬（Amercham）を用いて発色させる。還元条件下での免疫沈殿物のSDS－PAGE分析は、感染細胞のリゼートに由来する約48～65KDaの見かけ上の分子量を有する一連のバンドを表示するが（クローンCFYZ.1）、親細胞のリゼート（C196細胞）においては表示はない。48KDのバンドは48.7KDの算定分子量を有するscFv（FRP5）：ヒンジ：ζタンパクス質に相当する。前記タンパク質のアミノ酸配列をSEQ ID NO：５に示す。この配列表において、mAb FRP5由来の認識部は６位のアミノ酸（Gln）から240位のアミノ酸（Ile）に及び、CD８α由来のヒンジ領域は245位のアミノ酸（Ile）から304位のアミノ酸（Phe）に及び、そしてζ鎖は307位のアミノ酸（Asp）から443位のアミノ酸（Arg）に及ぶ。より高分子量の物質はscFv及びヒンジ領域の複雑なグリコシル化の結果として生ずる。エンドグリコシダーゼPNGase Ｆによる脱グリコシル化は単純なタンパク質パターンをもたらし、且つ約47KDaに至る見かけ上の分子量の低下をもたらす。内因性ζ鎖は非感染及び感染細胞において16KDaのバンド（推定16.3KDa）として検出される。SDS－PAGE分析を非還元条件下で行ったとき、約96KDaの見かけ上の分子量を有するジスルフィド－連結scFv：ヒンジ：ζホモダイマー及び約64KDaの見かけ上の分子量を有する内因性ζを伴うscFv（FRP5）：ヒンジ：ζ分子のヘテロダイマーが観察される。PNGase Ｆ処理はこれら２本のバンドの分子量を若干小さくする。検出された32KDaのバンドはCTLの内因性ζ－ζホモダイマーに相当する。

ｂ）scFv（FRP5）：ヒンジ：ζタンパク質産生Ｔ細胞のフローサイトメトリー分析

形質転換C196CTL及び形質転換ジャーカット細胞におけるscFv（FRP5）：ヒンジ：ζタンパク質の細胞表層発現及びerbB－２レセプター結合能力をフローサイトメトリーにより確認する。

5×10^5個の生存細胞（ジャーカット細胞、JFYZ.4細胞、C196細胞、CFYZ.1細胞）の単一細胞懸濁物をerbB－２タンパク質の精製細胞外ドメイン（erbB－2^{ecd}；バキュロウィルス発現ベクターを用いてSf９昆虫細胞において発現；Disisら、Cancer Res. 54，16-20（1994））により１時間、次いで１％のBSA及び0.1%のアジ化ナトリウムを含む100μｌのPBSの中でのFITCコンジュゲート化抗－erbB－２モノクローナル抗体FSP77（ヨーロッパ特許出願EP－Ａ－502,812号）により４℃で45分かけて染色する。ESP77はerbB－２レセプタ

ーの細胞外ドメインに対しても特異的であるが、しかしmAb FRP5由来の別のエピトープも認識する（I. M. Harwethら、J. Biol. Chem. 21, 15160-15167（1992））。１万個の前方散乱／側方散乱放出された生存細胞を獲得して分析し、フローサイトメーターは形質転換Ｔ細胞JFYZ.4及びCFYZ.1に対するerbB－２レセプターの精製可溶性細胞外ドメインの結合を示したが、非感染ジャーカット又はC196細胞に対しては示さなかった。
ヒンジ領域はscFv成分に柔軟性及びアクセス性を供し、そしてscFvドメインに対するerbB－２レセプターの細胞外ドメインの結合にとって必須不可決である。CD4D3D4の挿入も結合を可能とする。ヒンジ領域又はスペーサー抜きでζ鎖に対するscFvドメインの直接融合を試験した構築体はerbB－２タンパク質に結合できない表層レセプターをもたらす。
実施例４：scFv（FRP5）：ヒンジ：ζ融合タンパク質のシグナル変換
適当なカルシウムキレート化性蛍光色素の負荷されたＴ細胞の細胞内カルシウム（Ca^{2+}）濃度を可溶性erbB－２レセプターとのインキュベーションの後に測定する。この目的のため、培養したJFYZ.4感染体及びジャーカット細胞を２％のFCS及び５mMのインド－１／AM（Calbiochem）の添加されたRPMI 1640（M. Lopezら、Cytometry 10, 165-173（1989））の中で１×10^7/mlで懸濁し、そして37℃で45分回転させる。２回洗浄後、３×10^5個の細胞を氷の上で２mgの精製erbB－２^{ecd}と共にインキュベートする。誘引は５mgの抗erbB－２ mAb FSP77の同時投与、それに続くヤギ抗－マウスIg抗血清（GαM Ig, Southern Biotechnology）との架橋により37℃で行う。コントロールとして、細胞を抗－ヒトCDEmAb（Serva）及びGαM Igの添加により誘引する。カルシウムフラックスを405及び525nmでエミッションを測定することによりフローサイトメーターで15分かけてモニターする。
架橋は、非感染細胞における抗CD３∈mAbとのCD３複合体の架橋により得られるものと比べ、JFCZ.4細胞中では細胞内カルシウムの迅速上昇をもたらすが親ジャーカット細胞においてはもたらさない。これは細胞内シグナル生成が、細胞外リガンドドメインを介するscFv（FRP5）：ヒンジ：ζタンパク質の架橋に基づいて誘引されること及びscFv（FRP5）：ヒンジ：ζタンパク質が機能的に活性であることを示す。
実施例５：インビトロ細胞障害アッセイ
感染C196（CFYZ.1）細胞の細胞障害活性をインビトロで決定する。
癌遺伝子で形質転換されたマウスNIH／3T3繊維芽細胞及びヒトerbB－２レセプターを発現するHC11表皮細胞（N. E. Hynesら、前掲）を標的細胞として利用する。これらの細胞からのLDHの放出を細胞溶解の尺度として用いる（T. Decker and M. L. Lohmann-Matthes, J. Immunol. Methods 115, 61-69（1988））。細胞障害アッセイを組換マウスIL－２（rmIL－２、上記参照）含有の４％のコンディション済み上清液の添加されたフェノールレッド・フリー培地の中で実施する。一定数の標的細胞（7.500/ウェル）を一連の２倍系列エフェクター（CFYZ.1細胞）に加え、次いで37℃及び５％のCO_2で８時間インキュベーションする。希釈は全て三重測定で行う。この上清液の50μｌアリコートのLDH含有量をCytoTox 96アッセイ（Promega）を利用してアッセイする（T. Decker and M. L. Lohmann-Matthes、前掲）。0.4%のトリトンＸ－100による標的細胞の溶解後に測定されるLDH活性を100%と考える。測定された実験値を、エフェクター及び標的細胞からのLDHの自発的放出に対して補正する。scFv（FRP5）：ヒンジ：ζ構築体を発現する感染196細胞は１～10のエフェクター、対、標的の比においてerbB－２発現NIH／3T3細胞又はHC11細胞を効率的に溶解する。ヒトerbB－２レセプターによりトランスフェクションされた表皮及び標的繊維芽細胞の溶解は、正常な抗原特異的細胞障害とは区別できないほどに非MHC制限式に起こる。反対に、細胞溶解は親C196細胞をエフェクターとして用いるときに観察される。mAb FRP5及び誘導scFvドメインはヒトerbB－２分子に対して特異的であり、そして双方の細胞系において低レベルで発現するマウス同族体は認識しない。このため、非感染NIH／3T3細胞又はHC11細胞をscFv（FRP5）：ヒンジ：ζ構築体発現Ｔ細胞とインキュベートしたとき、細胞溶解は認められない。
実施例６：インビボ抗腫瘍活性
インビボでの形質転換CTL（感染化C196細胞）の抗腫瘍活性を評価するために２通りの実験計画を利用する。第１計画においては、５×10^5個のNIH3T3＃3.7腫瘍細胞を５×10^6個

のCFYZ.1細胞又は親C196細胞と0.1mlの培養培地の中で混合し（１：10のエフェクター：標的の比）、そして直ちにBalb／ｃヌードマウス（H. J. Winn, J. Immunol. 86, 228-234（1961））の右わき腹に皮下注射（S.C.）する腫瘍の成長をノギス測定により追跡する。第２計画において、Balb／ｃヌードマウスの右わき腹に４×10^5個のNIH3T3＃3.7腫瘍細胞を接種する。４及び５日目に、腫瘍が触診可能となったら、親C196細胞及びCFYZ.1細胞を尾静脈の中に静脈注射する（0.2mlの培養培地中１×10^7個の細胞）。0.2mlのPBS中の500UのrhIL－２（Hoffmann－La Roche）を４，５及び６日目に腹腔内投与する。腫瘍の成長をノギス測定により追跡する。IL－２抜き及びIL－２抜きのNIH3T3＃3.7細胞をコントロールとして注射する。各グループは５匹の動物より成る。ヒトerbB－２癌遺伝子により形質転換されたNIH／3T3細胞は、無胸腺Balb／ｃヌードマウスへの皮下注射の後に腫瘍の急速形成をもたらす。CFYZ.1感染体及び腫瘍細胞の同時投与は腫瘍形成を７日間まで完全に抑制する。しかしながら、非感染親C196細胞の投与は腫瘍細胞に対して何ら作用を及ぼさない。ヌードマウスをまずNIH／3T3－erbB－２腫瘍細胞で接種せしめ、次いで内因性IL－２と組合せてCFYZ.1細胞で処理したときに似たような結果が得られる。形質転換CTLの投与は７日間にわたり腫瘍細胞の増殖を抑制しそれ故全身系インビボ作用を示す。これらの細胞は別の部位に投与されたとき、活性化する腫瘍を休息させ、そしてその細胞障害活性を発揮する能力を有す。

これらの結果は、形質転換CTLの特異性及び細胞障害エフェクター機構が、乳、卵巣、胃及び結腸癌を含む数多くのヒト腺癌の病因において重要な役割を果たす所定の表層抗原erbB－２レセプターに対して効率的に再誘導されうることを示す。従って、標的化Ｔ細胞作用の原理は有用な治療的アプローチと考えられ、そして一般に正常細胞よりも高レベルで表層抗原を発現する腫瘍細胞の排除に適用可能である。このデザインは、scFv成分を交換し、そしてそれを特異的なモノクローナル抗体に由来する任意の現存の抗原認識機能体に置き換えることにより、数多くの所望の特異性を有するCTLの作製を可能にする。効率的な転写系、例えばレトロウィルスベクターの利用は、トランスフェクションが容易でないタイプの細胞へのscFv：ヒンジ：ζDNAの移入を可能にする。

寄託データー：

抗体FRP5, FSP16, FSP77及びFWP51を産生するハイブリドーマ細胞系はヨーロピアン－コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャーズ（ECACC, PHLS Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, UK）に1990年11月21日に受託番号90112115, 90112116, 90112117及び90112118でそれぞれ寄託してある。

【図面の簡単な説明】

図１：pL（F4Z）SNレトロウィルスベクターの構造。CD４イムノグロブリン様D3及びD4ドメインのアミノ酸残基番号184～370をコードするcDNAをPCRにより誘導し、そしてpL（FX）SNベクターのＸｂａＩ部位の中にサブクローニングする。融合境界のアミノ酸配列を一文字コードにおいて示す。

配列表

（１）一般情報：

（ｉ）出願人：

（Ａ）名称：CIBA－GEIGY AG

（Ｂ）通り：Klybeckstr. 141

（Ｃ）市：バゼル

（Ｅ）国：スイス国

（Ｆ）郵便番号：4002

（Ｇ）電話番号：＋41 61 69 11 11

（Ｈ）ファックス番号：＋41 61 696 79 76

（Ｉ）テレックス番号：962 991

（ii）発明の名称：二価のタンパク質、調製及び利用

（iii）配列の数：11

（iv）コンピューター読取フォーム：

（Ａ）媒体タイプ：フロッピーディスク
（Ｂ）コンピューター：IBM PCコンパチブル
（Ｃ）作動システム：PC－DOS／MS－DOS
（Ｄ）ソフトウェア：パテント　イン　リリース　＃1.0,バージョン＃1.25（EPO）
（２）SEQ ID NO：１についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：748塩基対
（Ｂ）タイプ：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖
（ii）分子のタイプ：cDNA
（ix）特徴：
（Ａ）名称／キー：CDS
（Ｂ）位置：9..728
（Ｄ）その他の情報：／産物＝「scFv（FRP）5」
（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：１：

```
AAGCTTCT CAG GTA CAA CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAA CTG AAG AAG CCT        50
         Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro
           1               5                  10

GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC TGC AAG GCC TCT GGG TAT CCT TTC ACA        98
Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 15                  20                  25                  30

AAC TAT GGA ATG AAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA CAG GGT TTA AAG       146
Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys
                 35                  40                  45

TGG ATG GGC TGG ATT AAC ACT TCC ACT GGA GAG TCA ACA TTT GCT GAT       194
Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp
             50                  55                  60

GAC TTC AAG GGA CGG TTT GAC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AAC ACT       242
Asp Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr
         65                  70                  75

GCC TAT TTG CAG ATC AAC AAC CTC AAA AGT GAA GAC ATG GCT ACA TAT       290
Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr
     80                  85                  90

TTC TGT GCA AGA TGG GAG GTT TAC CAC GGC TAC GTT CCT TAC TGG GGC       338
Phe Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly
 95                 100                 105                 110

CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTT TCC TCT GGC GGT GGC GGT TCT GGT GGC       386
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                115                 120                 125

GGT GGC TCC GGC GGT GGC GGT TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CAC       434
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His
            130                 135                 140

AAA TTC CTG TCC ACT TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG       482
Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys
        145                 150                 155

GCC AGT CAG GAT GTG TAT AAT GCT GTT GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA       530
Ala Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
    160                 165                 170

GGA CAA TCT CCT AAA CTT CTG ATT TAC TCG GCA TCC TCC CGG TAC ACT       578
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr
175                 180                 185                 190

GGA GTC CCT TCT CGC TTC ACT GGC AGT GGC TCT GGG CCG GAT TTC ACT       626
Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr
                195                 200                 205
TTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT       674
Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys
            210                 215                 220

CAG CAA CAT TTT CGT ACT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAA TTG       722
Gln Gln His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
        225                 230                 235

GAG ATC TAGCTGATCA AAGCTCTAGA                                        748
Glu Ile
    240
```

（２）SEQ ID NO：２についての情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：240アミノ酸

（Ｂ）タイプ：アミノ酸

（D）トポロジー：直鎖
（ii）分子のタイプ：タンパク質
（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：２：

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe
    130                 135                 140

Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
145                 150                 155                 160

Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
                165                 170                 175

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

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr
        195                 200                 205

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
    210                 215                 220

His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225                 230                 235                 240
```

（２）SEQ ID NO：３についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：748塩基対
（Ｂ）タイプ：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖
（ii）分子のタイプ：cDNA
（ix）特徴：
（Ａ）名称／キー：CDS
（Ｂ）位置：9..728
（Ｄ）その他の情報：／産物＝「scFv（FWP51）」
（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：３：

```
AAGCTTCT CAG GTA CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT        50
          Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
            1               5                  10

GGG ACT TCA GTG AAG CTG TCC TGC AAG GCT TCT GAT TAC ACC TTC ACC        98
Gly Thr Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr
 15                  20                  25                  30

AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA CAA GGC CTT GAA       146
Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
                 35                  40                  45

TGG ATT GGT ATG ATT GAT CCT TCA GAC AGT GAA ACT CAA TAC AAT CAA       194
Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Gln Tyr Asn Gln
             50                  55                  60
ATG TTC AAG GAC AAG GCC GCA TTG ACT GTA GAC AAG TCC TCC AAT ACA       242
Met Phe Lys Asp Lys Ala Ala Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr
         65                  70                  75

GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT       290
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
     80                  85                  90

TAC TGT GCA AAA GGG GGG GCC TCT GGG GAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG       338
Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Ala Ser Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 95                  100                 105                 110

GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTT TCC TCT GGC GGT GGC GGT TCT GGT       386
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                115                 120                 125

GGC GGT GGC TCC GGC GGT GGC GGT TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT       434
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
            130                 135                 140

CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT CTG GGA GGC GAA GTC ACC ATC ACT TGC       482
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Gly Glu Val Thr Ile Thr Cys
        145                 150                 155

AAG GCA AGC CAA GAC ATT AAG AAG TAT ATA GCT TGG TAC CAA CAC AAG       530
Lys Ala Ser Gln Asp Ile Lys Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys
    160                 165                 170

CCT GGA AAA AGT CCT CGG CTA CTC ATA CAC TAC ACA TCT GTA TTA CAG       578
Pro Gly Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Val Leu Gln
175                 180                 185                 190

CCA GGC ATC CCA TCC AGG TTC AGT GGA AGT GGG TCT GGG AGA GAT TAT       626
Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr
                195                 200                 205

TCC TTC AGC ATC CAC AAC CTG GAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT TAT TAT       674
Ser Phe Ser Ile His Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr
            210                 215                 220

TGT CTA CAT TAT GAT TAT CTG TAC ACG TTC GGA GGG GGC ACC AAG CTG       722
Cys Leu His Tyr Asp Tyr Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
        225                 230                 235

GAG ATC TAGCTGATCA AAGCTCTAGA                                        748
Glu Ile
    240
```

（２）SEQ ID NO：４についての情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：240アミノ酸

（Ｂ）タイプ：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖

(ii) 分子のタイプ：タンパク質

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：４：

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
  1               5                  10                  15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Gln Tyr Asn Gln Met Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Ala Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Lys Gly Gly Ala Ser Gly Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser
    130                 135                 140

Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Gly Glu Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala
145                 150                 155                 160

Ser Gln Asp Ile Lys Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly
                165                 170                 175

Lys Ser Pro Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Val Leu Gln Pro Gly
            180                 185                 190

Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe
        195                 200                 205

Ser Ile His Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu
    210                 215                 220

His Tyr Asp Tyr Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225                 230                 235                 240
```

（２）SEQ ID NO：５についての情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：1479塩基対

（Ｂ）タイプ：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖

(ii) 分子のタイプ：cDNA

(ix) 特徴：

（Ａ）名称／キー：CDS

（Ｂ）位置：40..1422

（Ｄ）その他の情報：／産物＝「リーダー－scFv（FRP5）：lyt－２ヒンジ：ゼータ」

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：５：

```
GAATTCGGCA CGAGCTTAAG GCACCACTTC TTAGACATC ATG GCT TGG GTG TGG          54
                                            Met Ala Trp Val Trp
                                             1               5

ACC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC AAA GTG CCC AAG CAG ATC CAG        102
Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Lys Val Pro Lys Gln Ile Gln
                10                  15                  20

TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG        150
Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys
            25                  30                  35

ATC TCC TGC AAG GCC TCT GGG TAT CCT TTC ACA AAC TAT GGA ATG AAC        198
Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
        40                  45                  50

TGG GTG AAG CAG GCT CCA GGA CAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATT        246
Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile
    55                  60                  65

AAC ACC TCC ACT GGA GAG TCA ACA TTT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG        294
Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg
70                  75                  80                  85

TTT GAC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AAC ACT GCC TAT TTG CAG ATC        342
Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Ile
                90                  95                  100

AAC AAC CTC AAA AGT GAA GAC ATG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA TGG        390
Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Trp
            105                 110                 115

GAG GTT TAC CAC GGC TAC GTT CCT TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC        438
Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
        120                 125                 130

ACC GTT TCC TCT GGC GGT GGC GGT TCT GGT GGC GGT GGC TCC GGC GGT        486
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    135                 140                 145

GGC GGT TCT GAC ATC CAG CTG ACC CAG TCT CAC AAA TTC CTG TCC ACT        534
Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr
150                 155                 160                 165
```

```
TCA GTA GGA GAC AGG GTC AGC ATC ACC TGC AAG GCC AGT CAG GAT GTG        582
Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val
                170                 175                 180

TAT AAT GCT GTT GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGA CAA TCT CCT AAA        630
Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
            185                 190                 195

CTT GTG ATT TAC TCG GCA TCC TCC CGG TAC ACT GGA GTC CCT TCT CGC        678
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg
        200                 205                 210

TTC ACT GGC AGT GGC TCT GGG CCG GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC AGT        726
Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser
    215                 220                 225

GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAA CAT TTT CGT        774
Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Phe Arg
230                 235                 240                 245

ACT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAA TTG GAG ATC AAA GCT CTA        822
Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Leu
                250                 255                 260

GAG ATC AGC AAC TCG GTG ATG TAC TTC AGT TCT GTC GTG CCA GTC CTT        870
Glu Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val Pro Val Leu
            265                 270                 275

CAG AAA GTG AAC TCT ACT ACT ACC AAG CCA GTG CTG CGA ACT CCC TCA        918
Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser
        280                 285                 290

CCT GTG CAC CCT ACC GGG ACA TCT CAG CCC CAG AGA CCA GAA GAT TGT        966
Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys
    295                 300                 305

CGG CCC CGT GGC TCA GTG AAG GGG ACC GGA TTG GAC TTT CTA GAG GAT       1014
Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe Leu Glu Asp
310                 315                 320                 325

CCC AAA CTC TGC TAC TTG CTA GAT GGA ATC CTC TTC ATC TAC GGA GTC       1062
Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val
                330                 335                 340

ATC ATC ACA GCC CTG TAC CTG AGA GCA AAA TTC AGC AGG AGT GCA GAG       1110
Ile Ile Thr Ala Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu
            345                 350                 355

ACT GCT GCC AAC CTG CAG GAC CCC AAC CAG CTC TAC AAT GAG CTC AAT       1158
Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
        360                 365                 370

CTA GGG CGA AGA GAG GAA TAT GAC GTC TTG GAG AAG AAG CGG GCT CGG       1206
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys Arg Ala Arg
    375                 380                 385

GAT CCA GAG ATG GGA GGC AAA CAG CAG AGG AGG AGG AAC CCC CAG GAA       1254
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg Arg Asn Pro Gln Glu
390                 395                 400                 405
```

```
GGC GTA TAC AAT GCA CTG CAG AAA GAC AAG ATG GCA GAA GCC TAC AGT      1302
Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
                410                 415                 420

GAG ATC GGC ACA AAA GGC GAG AGG CGG AGA GGC AAG GGG CAC GAT GGC      1350
Glu Ile Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
            425                 430                 435

CTT TAC CAG GGT CTC AGC ACT GCC ACC AAG GAC ACC TAT GAT GCC CTG      1398
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
        440                 445                 450

CAT ATG CAG ACC CTG GCC CCT CGC TAACAGCCAG GGCATTTCTC CCTCACGGGC      1452
His Met Gln Thr Leu Ala Pro Arg
    455                 460

AGATCCCCGG GTACCGAGCT CGAATTC                                        1479
```

（２）SEQ ID NO：６についての情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：461アミノ酸

（Ｂ）タイプ：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖

（ii）分子のタイプ：タンパク質

（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：６：

```
Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Lys Val
  1               5                  10                  15

Pro Lys Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro
             20                  25                  30

Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
         35                  40                  45

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys
     50                  55                  60

Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp
 65                  70                  75                  80

Asp Phe Lys Gly Arg Phe Asp Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr
                 85                  90                  95

Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Ser Glu Asp Met Ala Thr Tyr
            100                 105                 110

Phe Cys Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly
        115                 120                 125
```

```
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His
145                 150                 155                 160

Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys
                165                 170                 175

Ala Ser Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
            180                 185                 190

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Thr
        195                 200                 205

Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr
    210                 215                 220

Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys
225                 230                 235                 240

Gln Gln His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
                245                 250                 255

Glu Ile Lys Ala Leu Glu Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser
            260                 265                 270

Val Val Pro Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val
        275                 280                 285

Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln
    290                 295                 300

Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu
305                 310                 315                 320

Asp Phe Leu Glu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu
                325                 330                 335

Phe Ile Tyr Gly Val Ile Ile Thr Ala Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe
            340                 345                 350

Ser Arg Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu
        355                 360                 365

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu
    370                 375                 380

Lys Lys Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg
385                 390                 395                 400

Arg Asn Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met
                405                 410                 415

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
            420                 425                 430

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
        435                 440                 445

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Thr Leu Ala Pro Arg
    450                 455                 460
```

（２）SEQ ID NO：７についての情報：

（ｉ）配列の特徴：

（Ａ）長さ：443アミノ酸

（Ｂ）タイプ：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖

（ii）分子のタイプ：タンパク質

（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：７：

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asn Thr Ser Thr Gly Glu Ser Thr Phe Ala Asp Asp Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Trp Glu Val Tyr His Gly Tyr Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

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

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser His Lys Phe
    130                 135                 140

Leu Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
145                 150                 155                 160

Gln Asp Val Tyr Asn Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
                165                 170                 175

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

Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Phe Thr
        195                 200                 205
```

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
210 215 220

His Phe Arg Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
225 230 235 240

Lys Ala Leu Glu Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe Ser Ser Val Val
245 250 255

Pro Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys Pro Val Leu Arg
260 265 270

Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln Pro Gln Arg Pro
275 280 285

Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr Gly Leu Asp Phe
290 295 300

Leu Glu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile
305 310 315 320

Tyr Gly Val Ile Ile Thr Ala Leu Tyr Leu Arg Ala Lys Phe Ser Arg
325 330 335

Ser Ala Glu Thr Ala Ala Asn Leu Gln Asp Pro Asn Gln Leu Tyr Asn
340 345 350

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Glu Lys Lys
355 360 365

Arg Ala Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Gln Gln Arg Arg Arg Asn
370 375 380

Pro Gln Glu Gly Val Tyr Asn Ala Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
385 390 395 400

Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Thr Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
405 410 415

His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
420 425 430

Asp Ala Leu His Met Gln Thr Leu Ala Pro Arg
435 440

（２）SEQ ID NO：８についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：41塩基対
（Ｂ）タイプ：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖
（ii）分子のタイプ：cDNA
（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：８：
CTGAAAGCTT AGATCTGCCC GTGAGGGAGA AATGCCCTGG C 41

（２）SEQ ID NO：９についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：35塩基対
（Ｂ）タイプ：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖
（ii）分子のタイプ：cDNA
（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：９：

TCGATCTAGA AAGTCCAATC CGGTCCCCTT CACTG 35

（２）SEQ ID NO：10についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：33塩基対
（Ｂ）タイプ：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖
（ii）分子のタイプ：cDNA
（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：10：
GATCTCTAGA GGATCCCAAA CTCTGCTACT TGC 33

（２）SEQ ID NO：11についての情報：
（ｉ）配列の特徴：
（Ａ）長さ：37塩基対
（Ｂ）タイプ：核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖
（ii）分子のタイプ：cDNA
（xi）配列の詳細：SEQ ID NO：11：
TCGATCTAGA GATCAGCAAC TCGGTGATGT ACTTCAG 37

【図１】

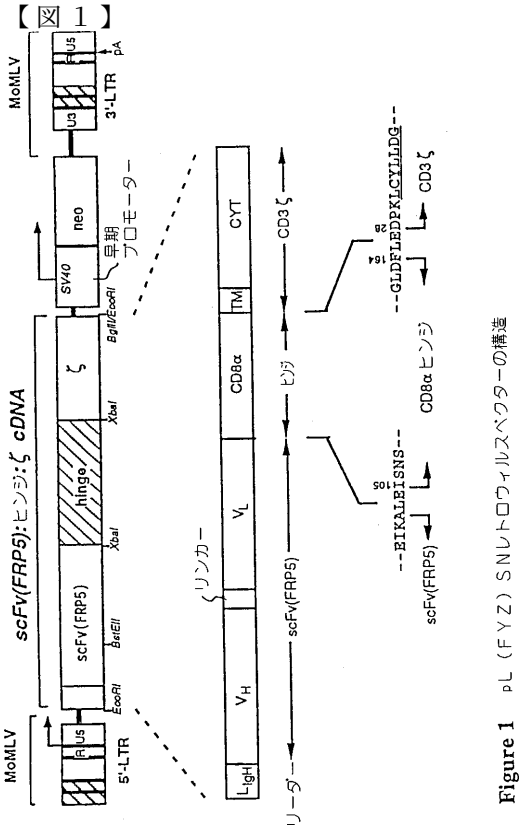

Figure 1 pL（FYZ）SNレトロウィルスベクターの構造

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C07K	***19/00***	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ	19/00	
C12P	***21/02***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｐ	21/02	C
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	5/00	B
A61K	***38/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	37/00	
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	E
			Ａ６１Ｋ	39/395	T

(72)発明者　グロナー，ベルント
スイス国，ツェーハー－４０５９　バーゼル，レーヘンシュトラーセ　２
(72)発明者　モリツ，ダーク
スイス国，ツェーハー－４０５３　バーゼル，グンデルデンガーシュトラーセ　２０３

審査官　高堀　栄二

(56)参考文献　特表平０５－５０２０２５（ＪＰ，Ａ）
特表平０５－５０２０３９（ＪＰ，Ａ）
特表平０５－５０４２６２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９４／００４６８８（WO，Ａ１）
特開平０５－１７８８９７（ＪＰ，Ａ）
Bio/Technology, 1992, Vol.10, p.1128-1132
Cancer Research, 1992, Vol.52, p.6310-6317
Journal of Immunological Methods, 1994, Vol.170, p.261-268

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 15/90
JICSTファイル(JOIS)
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
BIOSIS/WPI(DIALOG)
PubMed